مقایسه دو روش فعال‌سازی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک در شرایط آزمایشگاهی

زینب شاکرمی گنداب [۱]، وجیهه خدادادیان [۲]*، شهریار یاوری [۳]

(تاریخ دریافت ۹۲/۴/۸؛ تاریخ پذیرش ۹۲/۶/۱۰)

چکیده

هیداتیدوزیز در انسان و حیوان اهمیت دارد. هدف از انجام این مطالعه مقایسه دو روش مختلف جهت فعال‌سازی پروتواسکولکس‌های موجود در کیست هیداتیک بود. ۴۰ ریه و کبد آلوده به کیست هیداتیک از گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه ارومیه به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. در شرایط استریل، محلول درون کیست‌های هیداتیک غیر کلسیفیه شده به دست آمد. پروتواسکولکس‌های موجود در شن هیداتیک در محلول ۰/۹ درصد سدیم کلراید (PH= 2) و کربنات هیدروژن سدیم حاوی پانکراتین (PH= 8) با عمل تکان دادن و در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مدت ۳۰ دقیقه فعال‌سازی شدند. از طرف دیگر تعدادی پروتواسکولکس در همین شرایط در صفرای سگ قرار گرفتند و با استفاده از میکروسکوپ اینورت، مدت زمان فعال شدن پروتواسکولکس‌ها مورد بررسی قرارگرفت. مدت فعال‌سازی پروتواسکولکس با محلول سدیم کلراید و کربنات هیدروژن سدیم حاوی پانکراتین ۳ ساعت و مدت فعال‌سازی پروتواسکولکس‌ها با همان روش در مجاورت صفرای سگ یک ساعت نشان داده شد. با توجه به اینکه فعال‌سازی پروتواسکولکس‌ها با صفرای سگ یک ساعت طول می‌کشد بنابراین صفرای سگ ماده مناسبی جهت تهیه آنتی‌ژن و آزمایشات سرولوژی است که در مدت زمان کوتاه‌تری در مقایسه با سدیم کلراید و کربنات هیدروژن سدیم حاوی پانکراتین باعث فعال‌سازی پروتواسکولکس‌ها می‌گردد.

لغات کلیدی: کیست هیداتیک، پروتواسکولکس، فعال‌سازی.

[۱] کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[۲] کارشناس ارشد انگل‌شناسی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳]. کارشناس ارشد انگل‌شناسی دام‌پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: اداره کل دامپزشکی استان لرستان، خرم آباد، ایران. آدرس پست الکترونیکی:khodadadianvajihe@yahoo.com

مقدمه

امروزه در اکثر نقاط جهان، بیماری‌های انگلی و به خصوص کرمی از مهمترین بیماری‌های نشخوارکنندگان به شمار می‌آیند. بیماری‌های کرمی اغلب به شکل مزمن بروز کرده بنابراین نشانه‌های بالینی آشکاری را بروز نمی‌دهند و کمتر باعث مرگ و میر مشخص در گله گردیده بلکه عمدتاً در طول زمان موجب ضررهای اقتصادی فراوان می‌گردند (۲).

اکینوکوکوزیس یکی از بیماری‌های انگلی مشترک انسان و حیوانات اهلی و وحشی محسوب می‌شود، این بیماری انگلی در اکثر مناطق گرمسیری و معتدله دنیا وجود دارد و در برخی مناطق، شدت آلودگی قابل توجه است (۵،۳،۱).

به دلیل اهمیت کیست هیداتیک در انسان و حیوان سعی بر آن شد تا بهترین روش و بهترین محلول شیمیایی فعال کننده پروتو اسکولکس‌های موجود در کیست هیداتیک (گوسفند/ گاو) که اندامه‌ای مانند کبد، ریه را آلوده می‌نمایند، تعیین شود. به همین دلیل تصمیم بر آن شد که مقایسه‌ای بین روش‌های مختلف فعال‌سازی بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک در شرایط آزمایشگاه انجام گیرد. امید است که نتایج این مطالعه مقدمه‌ای جهت تهیه آنتی‌ژن و متعاقباً انجام یک سری از آزمایشات سرولوژی باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه طی دو مرحله انجام گردید در مرحله اول شن‌های هیداتیک از کبد و ریه‌های آلوده جدا گردید و در مرحله دوم یک سری آزمایشات روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک انجام گرفت.

مرحله اول

۴۰ریه و کبد آلوده به کیست هیداتیک از گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه ارومیه به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده را داخل تشتک قرار داده و ابتدا سطح آن از نظر وجود کیست هیداتیک بررسی گردید و سپس کیست‌های غیر کلسیفیه را مشخص کرده و با پنبه و الکل سطح کیست‌ها را ضد عفونی نموده با استفاده از سرنگ محلول درون کیست را آشپیره نمود.

مرحله دوم

فعال کردن پروتواسکولکس‌ها:

۱. فعال کردن پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک با محلول ۰/۹ درصد سدیم کلراید در PH=2: ۰/۹ گرم سدیم کلراید را وزن کرده و در ۱۰۰ سی سی آب مقطر استریل حل کرده و PH آن را به ۲ رسانده (چون PH اسیدی است ابتدا دستگاه PH متر را با بافر PH=4 تنظیم کرده سپس با اضافه کردن اسید کلریدریک ۱ مولار البته خیلی جزئی PH محلول سدیم کلراید را به ۲ رسانده). محلول مایع رویی شن‌های هیداتیک را آسپیره نموده و به لوله و نوجکت محتوی پروتواسکولکس‌های هیداتیک محلول سدیم کلراید اضافه نموده (به اندازه نصف لوله) سپس نمونه را به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده پس از این مدت نمونه را رسوب داده و مایع رویی را آسپیره نموده به طوری که شن‌ها در ته لوله باقی بماند. سپس محلول کربنات هیدروژن سدیم حاوی پانکراتین با PH=8 را به اندازه نصف لوله به نمونه اضافه کرده (محلول کربنات هیدروژن سدیم: ۱ گرم NaHCo3 را وزن کرده در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر استریل حل کرده و سپس به مقدار جزئی سود ۱ نرمال را به محلول اضافه کرده

تا PH=8 شود). نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه روی Shaker (هر ۵ دقیقه یک بار به مدت یک دقیقه) در ۳۷ درجه بن ماری قرار داده سپس محتویات در پلیت خالی شده و به وسیله لوپ بررسی می‌گردد در صورتی که از میکروسکوپ invert استفاده شود محتویات به قسمت تست تیوب منتقل شده تا بررسی راحت‌تر باشد. در صورت فعال بودن پروتواسکولکس‌ها باید حداقل نصف پروتواسکولکس‌ها فعال شوند برای این منظور مدت زمان بیشتری لازم است که این مرحله حدوداً ۳ ساعت طول می‌کشد.

۲- فعال کردن پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک با صفرای سگ، مایع رویی شن‌های هیداتیک را آسپیره نمودن و به اندازه نصف لوله محتوی شن‌های هیداتیک، صفرای سگ اضافه نموده پس از قرار دادن در انکوباتور ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه (هر ۵ دقیقه یک بار به مدت ۱ دقیقه روی Shaker قرار داده) و مثل نمونه قبلی به وسیله لوپ یا میکروسکوپ بررسی می‌شود. این مراحل حدوداً ۱ تا ۲ ساعت طول می‌کشد.

نتایج

در طی این بررسی نتایج نشان داد که فعال شدن پروتواسکولکس‌ها با صفرای سگ حدوداً یک ساعت طول می‌کشد و با محلول سدیم کلراید و محلول NaHCo3 حاوی پانکراتین حدوداً ۳ ساعت طول می‌کشد.

بحث

کیست هیداتیک یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و دام بوده که عوارض این بیماری ممکن است به حدی شدت باشد که منجر به مرگ بیمار گردد. این بیماری نه تنها از نظر بهداشتی با اهمیت است بلکه از نظر اقتصادی نیز در خور توجه بوده و فرد مبتلا را نیز از نظر توانایی‌های اقتصادی- اجتماعی متحمل خسارت می کند (۳،۱).

الف – فعالیت B cells موش سالم به وسیله اکینوکوکوس گرانولوزوس:

موش BALB\C که با پروتواسکولکس‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس آلوده شده بعد از ۴ روز با سلول‌های قرمز (RBC) گوسفند که تحت اثر تری نیتروفنول و سلول‌های موش که تحت اثر Bromelain قرار داده شده سلول‌های تشکیل دهنده پلاک را افزایش داد. این یافته‌ها، شبیه موش‌های CBA فاقد تیموس و واجد تیموس بودند. فعالیت Bcells، به طوری که توسط تکنیک پلاک معکوس نشان داده شده است، به همراه ترشح IG می‌باشد. Cocalture of PSCبا pre-B Cell z\3 70 منجر به ایجاد تمایز و بروز IG سطحی می‌شود علاوه بر این از این مطالعات چنین نتیجه گرفته می‌شود که اکینوکوکوس گرانولوزوس یک فعال‌کننده پلی کلونال B cell می‌باشد که موجب تمایز Bcell ها می‌گردد و اثرش مستقل از تیموس است (۶).

ب- آلودگی اولیه سگ‌ها با اکینوکوکوس گرانولوزوس

پاسخ ایمنی سیستمیک و موضعی (پلاک‌های پیر):

تکثیر لنفوسیت‌ها به صورت موضعی و سیستمیک و تولید آنتی‌بادی، در ۵ سگ، ۳۵ روز بعد از آلودگی تجربی با اکینو کوکوس گرانولوزوس آزمایش شد. تکثیر قابل توجه سلول، به وسیله ترکیب تیمیدین(3H)، در سلول‌های مزانتریک، popliteal و پلاک‌های پیر در پاسخ به پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس یا آنتی‌ژن کرم بالغ در سه سگ از ۵ سگ آلوده نشان داده شده در حالی که این مورد در ۵ سگ مبتلا نشده (شاهد) اتفاق نیفتاد. در عوض سلول‌های سونونوکئار خون، پاسخ نسبتاً ضعیفی، فقط در دو

تا از سگ‌های آلوده به آنتی‌ژن انگل دارند. نسبت‌های زیاد (در مقایسه با حالت های قبل از آلودگی) ازIgG اختصاصی سرم برای آنتی‌ژن کرم بالغ و پروتواسکولکس، به وسیله تست الایزا در چهار سگ از پنج سگ آلوده ۳۵ روز بعد از آلودگی تعیین شده بنابراین مقادیر نسبت کمی از IgE و IgA اختصاصی انگل در سرم‌های (به ترتیب ۳ و ۴) آلوده مشاهده شد. IgM اختصاصی سرم افزایش قابل توجهی، ۳۵ روز بعد از آلودگی نسبت به قبل از آلودگی نداشت. تولید آنتی بادی موضعی در invitro از سلول‌های Poplteal مزانتریک و پلاک‌های پیر جدا شده از ۳ سگ آلوده و ۳ سگ غیرآلوده به وسیله الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های کرم بالغ مطالعه شد. در دو کشت از سه کشت سلول‌های پیر تحریک نشده سگ‌های آلوده، IgG اختصاصی انگل کشف شده بود IgM و IgA اختصاصی انگل در یکی از کشت‌های سلول‌های پلاک‌های پیر تحریک شده مشتق از سگ آلوده، تعیین شد. به دنبال تحریک invitro با آنتی‌ژن مخصوص سلول‌های پلاک‌های پیر از هر سه سگ آلوده، IgA اختصاصی انگل را تولید کردند. سلول‌های پلاک‌های پیر غیر آلوده (شاهد) مقدار قابل توجه آنتی‌بادی اختصاصی انگل را تولید نکردند. و سلول‌های مزانتریک وpopliteal لنف نودها از سگ‌های آلوده و غیرآلوده در مدتی که در کشت‌های invitro نتی بادی‌هایی تولید کردند.

ج) مشخصات پاسخ ایمنی ایجاد شده به وسیله تعدادی کربوهیدرات اکینوکوکوس گرانولوزوس (E4+) در گروهی از بیماران مبتلا به کیست هیداتیک مطالعه شده است. پروفایل ساب کلاس IgG بر ضد E4+ و عصاره غیر غنی شده طبیعی (آنتی‌ژن سوماتیک پروتواسکولکس) مقایسه شده‌اند.

نسبت نسبی IgG4: IgG2 به وسیله E4+ بیشتر فراهم می‌شود. تا به وسیله آنتی‌ژن سوماتیک پروتواسکولکس به ترتیب(۱۲/۴ و ۳/۶) داده‌های سرولوژیکی مقدار پارامترهای کلینیکی به نتیجه بیماری وابسته بودند. بروز ساب کلاس IgG1 و IgG4 بر ضد هر دو آنتی‌ژن، به پیشرفت بیماری بستگی داشتند. میزان‌های مشابه از IL-B به وسیله سلول‌های منونوکئار خون محیطی از بیماران در زمان Incubated با هر یک از دو آنتی‌ژن‌ها پدیدار شدند. در صورتی که میزان‌های بیشتر از IL-70 در سلول‌های شناور شده تحریک شده با E4+ ($P<0.029$) بیش از آن‌هایی است که با آنتی‌ژن سوماتیک پروتواسکولکس تحریک شده‌اند. مقادیر قابل توجه از IL-70(IL-10) (به طور متوسط pg\mg۶۰) در سلول‌های شناور شده افراد سالم incubated با E4+ ایجاد شده‌اند.

نتایج ما نقش فرضی برای E4+ در مدت Immunoreglation در دوره آلودگی با اکینوکوکوس گرانولوزوس در انسان‌ها را پیشنهاد می‌کند (۴).

با توجه به اینکه زمان فعال‌سازی پروتواسکولکس‌ها با صفرای سگ یک ساعت طول کشید بنابراین جهت آزمایشات ایمنی‌شناسی نظیر تهیه آنتی‌ژن و انجام آزمایشات سرولوژی توسط پروتواسکولکس‌های فعال شده، صفرای سگ ماده مناسبی است که در مدت زمان کوتاه‌تری در مقایسه با سدیم کلراید و بی‌کربنات هیدروژن سدیم حاوی پانکراتین باعث فعال‌سازی پروتواسکولکس‌ها می‌گردد.

منابع

۱. اسلامی، علی (۱۳۷۷). کرم شناسی دامپزشکی. جلد اول (ترماتودا)، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: 155-119.

۲. امیربیگی، باقر (۱۳۷۲). تحلیلی بر اپیدمیولوژی هیداتیدوزیس و آلودگی آن در انسان و دام در ایران، پایان نامه شماره ۲۷۷، دوره دکتری دامپزشکی دانشگاه ارومیه، صفحات ۴۴-۳۷ .

۳. صائبی، اسماعیل (۱۳۸۸). بیماری های انگلی، انتشارات آییژ، صفحات:۱۶۸-۱۴۷

4. Deplazes, P. etal. 1994-Primary infection of dog with *Echinococcus granulos* systemicand local (peyer's patches) immune response. Vet Immunol Immunooathol, 40(2): 171-184.
5. Soulsby, E. J. L. (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.7th ed. Bailliere Tindall. London. pp:119-122.
6. Thompson, R.C.A. etal. (1990). Uniform strobilab development of Echinococcus moltilocula pis invitro from proroscolem to immature stages. J. parsitol,76(2):241.