بررسی پاسخ IgE ، IgG تام انسانی و زیر کلاس‌های آن علیه آنتی‌ژن‌های خام مایع کیست هیداتیک گاو، گوسفند، موش و آنتی ژن B با استفاده از روش الایزا

محمد فلاح[۱]، مرتضی شمسی[۲*]، افرا خسروی[۳]، امیر حسین مقصود[۴]، علی محمد بهرامی[۵]، رضا هوشمندفر[۶]

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۱

چکیده

استفاده از آنتی‌ژن‌های خام مایع کیست هیداتیک با منشأ حیوانی و بررسی پاسخ‌های ایمونولوژیکی، در تشخیص صحیح و به موقع بیماری با استفاده از روش‌های سرولوژی کاری ارزشمند است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه پاسخ سرم‌های انسانی به آنتی ژن‌های مورد مطالعه گاو، گوسفند، موش و آنتی‌ژن B برای دسترسی به آنتی‌ژنی که بیشترین پاسخ را ایجاد کند، طراحی و اجرا گردید. ازکشتارگاه صنعتی ایلام تعداد ۳۰ نمونه مایع کیست هیداتیک جداگانه از هر میزبان گاو و گوسفند، جمع‌آوری و آنتی‌ژن اولیه، استخراج و آماده‌سازی گردید. سه گروه موش Balb/c با آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک گوسفندی به طور تجربی آلوده شدند. سرم انسان‌های بیمار هیداتیدی علیه آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه، آزمایش شدند و پاسخ آنتی‌بادی‌های E، G تام انسانی و زیر کلاس‌های آن علیه آنتی‌ژن‌های مذکور با استفاده از روش الایزا به صورت مورد-شاهدی بررسی گردیدند. شدت پاسخ به هر آنتی‌ژن محاسبه و با دیگر آنتی‌ژن‌ها مقایسه شد. از آزمون‌های آماری Anova و Post Hoc برای تحلیل نتایج استفاده شد. IgG4 انسان بیشترین میانگین OD را علیه آنتی‌ژن گاو ایجاد نمود. شدت پاسخ برای آنتی‌ژن گاو برابر ۱۰،۲ و سپس آنتی‌ژن B برابر۹ گزارش شد. پاسخ IgE انسان به غیر ازIgG4 از دیگر زیرکلاس‌های IgG بیشتر بود. آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه واکنش متقاطع قابل توجهی ایجاد کردند. آنتی‌ژن موش برای طراحی کیت تشخیص بیماری هیداتیدوز انسانی مناسب‌تر به نظر می‌رسد که حتی می‌تواند در طراحی کیت‌های تشخیصی جایگزین شود. آنتی بادی‌ها IgG تام انسان و زیرکلاس IgG4 بیشترین شدت پاسخ را علیه آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه در مقایسه با دیگر آنتی‌بادی‌ها ایجاد کردند.

واژگان کلیدی: کیست هیداتیک، آنتی‌ژن ، گاو، موش، گوسفند، ، الایزا

مقدمه

هیداتیدوز بیماری انگلی ناشی از سستود اکی‌نوکوکوس گرانولوزوس است که عمدتاً کبد، ریه و سایر ارگان‌های بدن را درگیر می‌سازد. به دلیل آندمیک بودن بیماری در کشور ایران و ابتلای تعداد قابل توجهی از مردم، هیداتیدوز به عنوان یک مشکل بهداشتی محسوب می‌شود. اکی‌نوکوکوزیس در ایران ازلحاظ بهداشتی، پزشکی و دامپزشکی حائز اهمیت است. جمعیت روستایی به ویژه در کشورهای توسعه نیافته که در تماس مستقیم با حیوانات اهلی و وحشی به خصوص سگ و سگ‌سانان هستند بیشتر در معرض

۱- استاد،گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲- کارشناس، مرکز تحقیقات می‌کروب شناسی بالی‌نی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۳- دانشیار، گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۴- استادیار،گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۵- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی دانشکده پیرا دامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۶- کارشناس، گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیرا دامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Shamsi_ilam@yahoo.com

آلودگی قرار دارند. البته در ایران الگوی انتشار در جمعیت عشایر و زنان شهری از طریق مصرف میوه و سبزیجات آلوده می‌باشد. بیماری از تمام استان‌های کشور با بالاترین میزان آلودگی در انسان (٤/٤٥ در صد هزار) از استان خراسان و کمترین آن (٠/١ در صد هزار) از استان هرمزگان گزارش شده است. برای کل کشور میانگین موارد جراحی ١/٢ در صد هزار تعیین شده است(٣). نشانه‌های بالینی و پاتولوژیکی بیماری بسته به بافت درگیر ، اندازه و اثرات ضایعات، متفاوت خواهد بود. در این بیماری به دلیل فقدان فرآورده انگلی در نمونه‌های عادی مانند ادرار و مدفوع و مشکل در تشخیص پارازیتولوژیک بیماری به دلیل استقرار بافتی کیست‌ها و نیز نیاز به روش‌های تهاجمی عکس برداری، به کار گیری روش‌های معتبر سرولوژیک جزو اولویت‌های بهداشتی است. اگرچه تأثیر بیماری در کاهش فرآورده‌های دامی همچون(غیر قابل فروش و مصرف بودن امعاء و احشاء و ضبط اندام آلوده و تأثیر در کاهش تولید گوشت و شیر)، در مقایسه با تأثیر آن بر سلامت انسان اهمیت کمتری دارد، اما به دلیل این که بیماری جزء بیماری‌های مشترک بین انسان و دام محسوب شده و در مواردی می‌تواند منجر به مرگ انسان گردد، دارای اهمیت ویژه‌ای است(٣،١،٢). این بیماری علامت بالینی خاصی ندارد، بنابراین جهت تشخیص بیماری، ارزیابی بالینی آن کافی نیست. برای تشخیص بیماری بهتر است از چند روش تشخیصی استفاده کرد(١،٢). انسان و سایر میزبانان واسط اکی‌نوکوکوس در معرض شاخص‌های آنتی‌ژنیک متنوعی قرار می‌گیرند که ممکن است پاسخ‌های ایمنی علیه آن‌ها تحریک شوند. تشخیص سرولوژیک بیماری با استفاده از شناسایی آنتی‌بادی موجود در سرم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های این انگل تا چند سال پس از بهبودی باقی می‌مانند به همین جهت بسیاری از تست‌های سرولوژی برای یافتن آنتی‌بادی‌های IgE و IgG در سرم بیماران در طی بیماری و حتی پس از عمل جراحی یا درمان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (٥). با توجه به محاسن بسیار زیاد از قبیل صرف زمان کمتر، استفاده انرژی کمتر، حساسیت و اختصاصیت بیشتر و غیره امروزه تست الایزا، ایمونوالکتروفورز و ایمونوبلاتینگ به عنوان تست‌های مقبول از نظر حساسیت و ویژگی در تشخیص بیماری‌های مختلف انگلی حایز اهمیت هستند (٩). استفاده از آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک در تشخیص بیماری هیداتیدوز، یکی از روش‌هایی است که با بررسی‌های سرولوژیکی به موقع می‌توان اثرات سودمندی در درمان سریع بیماری ایجاد نماید. تهیه آنتی‌ژن با منشأ انسانی مشکل بوده و از نظر مالی(خرید کیت تشخیصی) نیز هزینه‌بر است(٦). اگر تشخیص سرولوژیکی با استفاده از آنتی‌ژن حیوانی در مقایسه با آنتی‌ژن انسانی، قابل اتکاء و از درصد اعتماد بالایی برخوردار باشد، طراحی کیت تشخیصی با این نوع آنتی‌ژن می‌تواند روشی ساده، ارزان و در دسترس باشد. بیشتر آزمایش‌های سرولوژیک در تشخیص بیماری هیداتیدوز از مشکلات، حساسیت و ویژگی‌های متفاوتی برخوردار هستند. برخی از این آزمایش‌ها به قابلیت‌های تکنیکی خاص و پرسنل مجرب نیاز دارند(١٥). در مطالعات مختلف حساسیت آزمون الایزا به طور متوسط ٩٠-٦٠ درصد و ویژگی آن ٩٠-٧٠ درصد مشخص شده است که بسته به نوع آنتی‌ژن، روش تهیه، منطقه جغرافیایی انجام آزمایش و بیماری‌های آندمیک منطقه متفاوت می‌شود (٤). تکنیک الایزا با آنتی‌ژن B مایع کیست هیداتیک در مقایسه با سایر آنتی‌ژن‌ها بیشترین حساسیت را دارد(١٠). گاهی به دلیل واکنش متقاطع در آزمایش‌های سرولوژیکی و در نتیجه کاهش دقت تشخیص می‌توان از آزمون ایمونوبلات، با ویژگی بالا به عنوان یک آزمایش تکمیلی همراه با الایزا برای تأیید تشخیص استفاده نمود(١٣). از طرفی هر کدام از آنتی‌ژن‌ها دارای زیر

واحدهای مختلف هستند. به عنوان مثال، آنتی‌ژن B دارای زیر واحدهای ۸، ۱۶، ۲۴ و ۳۸ کیلو دالتونی است که حساسیت هر کدام از آن‌ها می‌تواند در تشخیص بیماری مفید باشد. این واکنش‌ها نیز در هر حیوانی دارای حساسیت‌های متفاوتی هستند (۱۰). لذا یافتن آنتی‌ژنی که در پاسخ به سرم انسانی دارای زیر واحد با حساسیت و ویژگی بالا باشد، پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در خصوص ابداع یک روش ارزان و تکامل یک کیت ساده محسوب می‌شود. از طرف دیگر، هر کدام از کلاس‌ها و زیرکلاس‌های برخی از ایمونوگلوبولین‌ها نقش ویژه‌ای در تشخیص بیماری هیداتیدوز دارند که در نتیجه انتخاب مناسب نوع آنتی-ژن و کلاس مناسب آنتی‌بادی نیز کمک کننده می-باشد(۲۰). مطالعه حاضر با استناد به شواهد معتبر علمی و منطبق بر شرایط آنتی‌ژن‌های منطقه، در صدد بررسی وجود یا فقدان واکنش متقاطع بین آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه، تشخیص آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن‌هایی که بیشترین شدت پاسخ آنتی‌بادی‌های انسانی را به خود اختصاص می‌دهند و هم‌چنین تشخیص ایمونوگلوبولین ارجح برای این پاسخ‌ها، می‌باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع تحلیلی بوده که در آن نمونه-های مایع کیست هیداتیک گوسفند، موش، گاو و آنتی-ژن B (به عنوان نمونه‌های آنتی‌ژنیک) و نمونه‌های سرمی مثبت و منفی انسان (به عنوان آنتی‌بادی) آزمایش شدند.

- تهیه و آماده سازی آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک

برای تهیه مایع کیست هیداتیک گوسفند و پروتواسکولکس‌های زنده جهت تلقیح به موش و ایجاد عفونت ثانویه و هم‌چنین مایع کیست هیداتیک گاو با مراجعه به کشتارگاه صنعتی ایلام با تشخیص بافت‌آلوده به کیست‌های هیداتیک کبد و ریه گوسفندان، جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پیرا دامپزشکی دانشگاه ایلام منتقل می‌گردید. با استریل کردن سطح رویی کیست‌ها با الکل یده در محیط استریل هود، به صورت جداگانه مایع کیست‌های هیداتیک کبدی و ریوی با استفاده از سرنگ‌های پنج و ده میلی‌لیتری تخلیه گردید. کیست‌های چرکی و غیرشفاف از جریان نمونه‌برداری حذف شدند. با بازکردن کیست‌ها، ابتدا با قرار دادن غشای زاینده‌ی آن‌ها در بافر PBS پروتواسکولکس‌های درون آن‌ها کاملاً تخلیه شدند. شستشو و تغلیظ پروتواسکولکس‌ها با استفاده از سه تا پنج بار سانتریفوژ با محلول PBS (pH= ۷/۲) به مدت ۵ دقیقه و سرعت g × ۱۵۰۰ انجام پذیرفت. مایع رویی نمونه‌ها با روش انجماد و ذوب مکرر در تانک ازت مایع هموژنیزه شدند. محلول حاصل به وسیله دستگاه سونیکاتور که روی ۵۰ سیکل بر ثانیه و ماگزیمم تن ۳۰ ثانیه تنظیم شده بود، در حمام یخ برای ۴ بار سونیکه شد. در مرحله بعد به منظور تغلیظ پروتئین‌ها عمل دیالیز انجام شد. تعیین غلظت پروتئین عصاره‌های سوماتیک دیالیز شده به روش برادفورد انجام گرفت(۱۹). این مایع به عنوان منبع آنتی‌ژن سطحی گوسفند تا زمان انجام آزمایش در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری در دمای $-۲۰^{\circ}c$ نگهداری شدند(۱۶). پروتواسکولکس‌های ته‌نشین شده حاصل از سانتریفوژ نیز جهت انجام آزمایش تعیین باروری برای تزریق به موش‌ها و ایجاد آلودگی ثانویه در آن ها به لوله‌های استریل منتقل شدند. اما کیست‌های نوع گاوی عقیم بوده و فقط مایع رویی کیست‌ها بعد از سانتریفوژ به عنوان آنتی‌ژن خام تا زمان انجام آزمایش در دمای $-۲۰^{\circ}c$ نگهداری شدند.

- تعیین میزان باروری پروتواسکولکس‌ها

تعیین درصد زنده بودن و میزان باروری پروتواسکولکس‌ها با اندکی تغییر انجام شد(۷). با انجام روش رنگ‌آمیزی انحصاری ائوزین ۰/۱ درصد و شمارش پروتواسکولکس‌های زنده با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۱۰، درصد پروتو-

اسکولکس‌ها به دست آمد. در فرایند رنگ‌آمیزی، پروتواسکولکس‌هایی که رنگ قرمز ائوزین را قبول می‌کردند، پروتواسکولکس مرده بوده، از جریان شمارش خارج می‌شدند اما پروتواسکولکس‌های بدون رنگ، زنده محسوب می‌شدند. هم‌چنین فعالیت سلول‌های شعله‌ای پروتواسکولکس‌های رنگ نگرفته و زنده با حرکات چشمک‌زن آن‌ها در زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت(۷). پس از تعیین میزان باروری پروتواسکولکس‌ها، آماده‌سازی آن‌ها برای تزریق به موش‌ها انجام گردید.

– آلوده کردن موش‌ها جهت استحصال مایع کیست هیداتیک.

مطالعه مرحله ایجاد کیست هیداتیک در میزبان‌های واسط طبیعی اکی‌نوکوکوس گرانولوزوس در غالب موارد امکان‌پذیر نمی باشد. استفاده از حیوان مناسب آزمایشگاهی جهت ایجاد کیست هیداتیک ثانویه می‌تواند کمک بزرگی به انجام مطالعات در زمینه‌های مختلف کیست از جمله پاتولوژی، ایمونولوژی و درمان نماید و نتایج این مطالعات در نهایت جهت استفاده در آلودگی‌های انسان مورد استفاده واقع شود. مدل آزمایشگاهی کیست هیداتیک درموش به وسیله محققین مختلف طراحی شده است (١٤). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که موش‌های Balb/c حساسیت بالایی نسبت به عفونت کیست هیداتیک دارند و برای مطالعات ایمونولوژیک این انگل مناسب می‌باشند (۲۲). موش‌های Balb/c مورد استفاده در این تحقیق از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. در این مطالعه از ۳۰ سر موش Balb/c که سن آن‌ها ٦ هفته و از جنس نر بودند، استفاده شد. موش‌ها جهت انجام عملیات واکسیناسیون و تلقیح از حیوان‌خانه خارج و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سپس گروه‌بندی آن‌ها صورت گرفت. برای انجام عمل تلقیح، هر کدام از موش‌ها در داخل رک مخصوص قرار می‌گرفت.

ایمن سازی موش‌ها با اندکی تغییرات به صورت تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند به همراه ۱۰ میکرولیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین، جهت پیش‌گیری از عفونت‌های باکتریایی، انجام شد. سپس با گذشت سه هفته، تعداد ۲۰۰۰ عدد پروتواسکولکس زنده همراه با ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین به صورت داخل صفاقی به هر موش تزریق گردید. تزریق یادآور حدوداً با ۲۰۰۰ عدد پروتواسکولکس زنده دو هفته پس از تزریق اول انجام گرفت(١٤). در مدت ۹ – ۳ ماه کیست‌ها در حفره شکمی موش Balb/c تشکیل شدند.

با تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکرو لیتر ادجوانت کامل فروند و ۱۰۰ میکرولیتر PBS همراه با ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین واکسینه شدند. سه هفته بعد، ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت ناکامل فروند، ۱۰۰ میکرولیتر PBS و ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک به صورت داخل صفاقی به آن‌ها تزریق گردید. موش‌های گروه شاهد دو هفته بعد فقط ادجوانت کامل فروند را به عنوان یادآور دریافت نمودند(١٤).

– تهیه نمونه سرم‌های انسان

تعداد ۳۰ نمونه سرم از بیماران مبتلا به کیست هیداتیک که ابتلای آن‌ها به بیماری توسط پزشک معالج و انجام آزمایشات سرولوژیک قطعی شده بود، از بیمارستان‌های شهرستان‌های همدان و ایلام جمع‌آوری شد. نمونه‌های سرم شاهد به عنوان کنترل منفی نیز از افراد سالم تهیه گردید. سالم بودن نمونه‌ها با انجام آزمون‌های الایزا و ایمنوفلورسانس (IFA) تأیید شد (۱۵). همه‌ی نمونه سرم‌های مذکور بلافاصله بعد از تهیه در ویال‌های کوچک کدگذاری شده و در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

– تعیین غلظت آنتی‌ژن‌های خام مایع کیست هیداتیک

با استفاده از بافر PBS استریل و محلول کار برادفورد، رقت‌های مختلفی از آنتی‌ژن‌های خام مایع کیست هیداتیک گوسفند، موش، گاو و آنتی‌ژن B تهیه

گردید. OD رقت‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت شد(۱۹).

– روش انجام الایزا

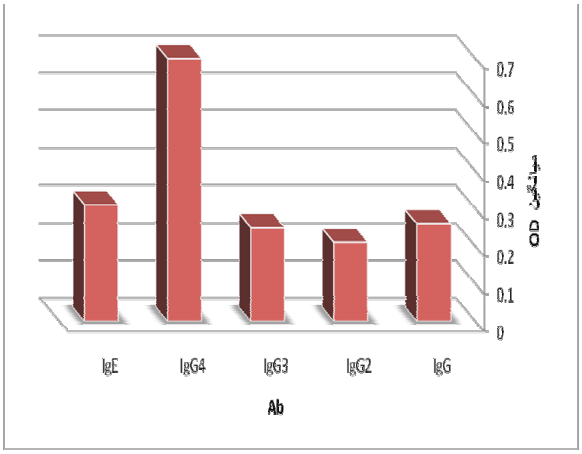
۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی‌ژن‌های مایع خام کیست هیداتیک نسبتاً خالص گوسفند، موش، گاو و آنتی‌ژن B ، هر کدام جداگانه به ترتیب با غلظت مشخص ۱/۲ ، ۱/۵، ۲/۵ میکروگرم در میکرولیتر و آنتی ژن B معادل ۶۰۰ میلی‌گرم و بافر کوت‌کننده کربنات (۱ مولار، PH=۹/۶) تهیه شد و به همه‌ی چاهک‌های میکرو پلیت‌های پلی استرینی ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت یک شب در دمای c ۲۴° انکوبه شدند. پس از شستشو ، ۲۰۰ میکرولیتر محلول مسدود کننده بافر TBSTwith Tween20)(Tris Salin Buffered به همراه شیر بدون چربی ۱ درصد به چاهک‌ها اضافه شدند. سپس پلیت‌ها به مدت یک ساعت در c ۳۷° انکوبه شدند. پس از شستشو، سرم با رقت ۱:۱۰۰ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در c ۳۷° انکوبه شدند. بعد از شستشو، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کونژوگه HRP(Horseradish Peroxidas) (Invitrogen) با رقت ۱:۱۰۰۰ به چاهک‌ها، پلیت‌ها به مدت یک ساعت در37°c نگهداری شدند. پس از سه تا پنج بار شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای ABTS 2,2 – azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6sulfonic acid) (سیگما) با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای c ۳۷° انکوبه شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اسید سولفوریک ۲/۵ مولار به هر چاهک اضافه شد. مقدار جذب نوری (OD:Optical Density) در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش‌گر الایزا (مدل 650Bio-Rad، آلمان) قرائت گردید(۸).

برای تعیین سطح حداقل (Cut off)، از تعداد ۳۰ نمونه سرم انسان، که فاقد بیماری کیست هیداتیک بودند، استفاده شد. برای این نمونه‌ها آزمایش الایزا انجام و مقدار جذب نوری نمونه‌ها، میانگین و انحراف معیار محاسبه شد، سپس میانگین به اضافه دو برابر انحراف معیار به عنوان سطح حداقل تعیین گردید.

نرمال بودن داده‌های تحقیق با آزمون Post Hoc و تحلیل آن‌ها با آزمون آماری ANOVA انجام شد. در سرتا سر تحقیق میزان P<0.05 به عنوان سطح معنی‌دار مورد استفاده قرار گرفت.

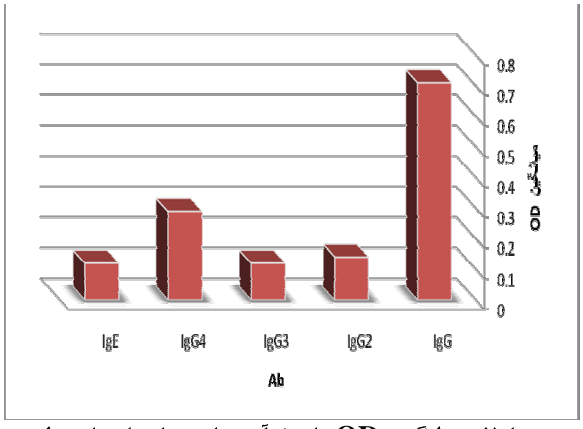
نتایج

در ارزیابی میانگین OD پاسخ آنتی‌بادی‌های انسانی IgE ، IgG تام و زیر کلاس‌های آن علیه آنتی-ژن خام مایع کیست هیداتیک گوسفند به روش الایزا، IgG4 بیشترین پاسخ را داشت. IgE نیز نسبت به دیگر زیرکلاس‌های IgG به غیر از IgG4 از سطح پاسخ بالایی برخوردار بود(نمودار۱).



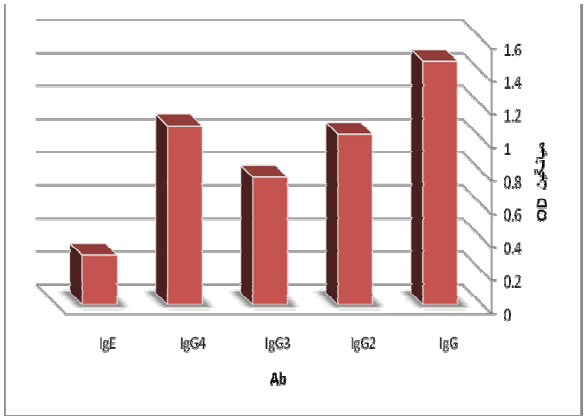
نمودار۱- میانگین OD پاسخ آنتی بادی‌های انسان علیه آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک گوسفند

میانگین OD پاسخ‌های IgE، IgG تام و زیرکلاس‌های آن علیه آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک موش، حاکی از افزایش پاسخ IgG تام و زیر کلاس IgG4 در مقایسه با دیگر آنتی‌بادی‌ها می‌باشد که بهترین پاسخ بوده اگر چه پاسخ ایجاد شده سایر آنتی-بادی‌ها نیزتا حدودی به یک نسبت می‌باشد (نمودار ۲).



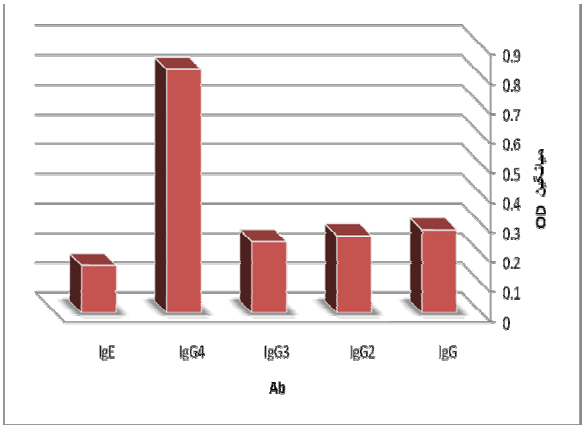
نمودار۲- میانگین OD پاسخ آنتی‌بادی‌های انسان علیه آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک موش

در بررسی میانگین OD پاسخ آنتی‌بادی‌های IgE، IgG تام و زیرکلاس‌های آن علیه آنتی‌ژن B، بیشترین پاسخ به ترتیب مربوط به IgG تام و زیر کلاس‌هایIgG4 و IgG2 بود. میانگین تمام ODها از میزان Cut off محاسبه شده بیشتر بود، لذا کلیه نمونه‌ها مثبت ارزیابی شدند. هم‌چنان که آنالیز واریانس داده‌ها نیز حاکی از بیان اختلاف معنی‌دار بین میانگین OD آنتی‌بادی‌ها در پاسخ علیه آنتی‌ژن B بوده است(P=0.000) (نمودار ۳).



نمودار۳- میانگین OD پاسخ آنتی‌بادی‌های انسان علیه آنتی‌ژن B

در آزمون الایزا که برای ارزیابی پاسخ آنتی بادی‌های انسانی IgE، IgG تام و زیر کلاس‌های آن علیه آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک گاو انجام شد، آنتی بادی های IgG تام و IgG4 به ترتیب بیشترین پاسخ ایمونولوژیک را داشته‌اند(نمودار ٤).



نمودار ٤- میانگین OD پاسخ آنتی بادی‌های انسان علیه آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک گاو

بحث

هدف اصلی این مطالعه بررسی واکنش ایمونولوژیکی انسان به آنتی ژن‌های حیوانی بوده است تا بر اساس آن بهترین آنتی‌ژن حیوانی، انتخاب و برای طراحی کارهای تحقیقاتی به جای آنتی‌ژن انسانی مورد استفاده قرار گیرد. در پاسخ سرم انسان به آنتی‌ژن‌های خام مایع کیست هیداتیک گاو، گوسفند، موش و آنتی‌ژن B، IgG4 انسانی بیشترین پاسخ ایمونولوژیکی را ایجاد نمود که با نتایج Siracusano4 در سال ۲۰۰٤و Tabatabaie در سال ۲۰۱۳ هم‌خوانی دارد. محاسبه شدت پاسخ هر آنتی‌ژن (تقسیم OD آن به Cut off مربوطه) به محققین این امکان را داد تا بیشترین میانگین OD ایجاد شده که مربوط به IgG4 و IgG تام انسانی علیه هر چهار آنتی‌ژن بود، شناسایی کنند. به عبارت دیگر واکنش‌های متقاطع پاسخ‌های سرم انسانی علیه آنتی‌ژن‌های مایع کیست هیداتیک گاو، گوسفند، موش و آنتی‌ژن B در حد بسیار بالایی وجود دارد. میزان OD یا شدت پاسخ در آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بادی زیرکلاس IgG4 انسانی به شرح زیر می باشد (توضیح این که برای نشان دادن شدت واکنش علیه هر آنتی‌ژن، Cut off آن آنتی‌ژن تهیه شده است) :

بر اساس محاسبات انجام شده مطالعه حاضر، بیشترین شدت پاسخ آنتی‌بادی انسانی علیه آنتی‌ژن‌های گاو و آنتی ژن B بوده است که شدیدتر از پاسخ آنتی‌ژن‌های موش و گوسفند است، اما این نکته، ارزش آنتی‌ژن‌های موش و گوسفند را که OD آنتی‌بادی انسان علیه آن‌ها در شرایط طبیعی به ترتیب ۷/۲۵ و ۵ برابر بالاتر از Cut off بوده و ایجاد پاسخ نموده است را از بین نمی‌برد. لذا این آنتی ژن‌ها هم بیشترین واکنش متقاطع را ایجاد نموده‌اند و هم بالاترین پاسخ ایمنی انسان را به خود اختصاص داده‌اند(۱۱). آنتی‌ژن موشی انتخاب مناسبی برای طراحی کیت‌های تشخیصی در مقیاس‌های کوچک متناسب با نیاز و توان‌مندی‌های منطقه می‌باشد(۱۲). با همه این تفاسیر، در طراحی کیت‌های تشخیصی می‌توان از آنتی‌ژن‌های خام مایع کیست هیداتیک گاو، موش، گوسفند و آنتی‌ژن B و IgG4 برای حصول بهترین و معتبرترین پاسخ‌ها سود جست. اگر بهترین و بالاترین شدت پاسخ مد نظر قرار گیرد، انتخاب آنتی‌ژن گاو و آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک موش با استفاده از IgG تام به عنوان آنتی‌بادی مرجع مناسب‌ترین گزینه است. مطالعاتی که توسط Sbihi در سال ۱۹۹۷ انجام شد، نتایج این مطالعه را تأیید می‌نماید. در این مطالعات آنتی‌ژن B به عنوان منبع آنتی‌ژنی است که آنتی‌بادی‌های IgG و IgE علیه آن دارای بیشترین پاسخ ایمونولوژیک بوده‌اند.

طبق نتایج به دست آمده، آنتی‌ژن گاوی هم بیشترین واکنش متقاطع را ایجاد نموده، هم بالاترین پاسخ ایمنی انسان را به خود اختصاص داده است. لذا در طراحی کیت‌های تشخیص می‌توان از این آنتی‌ژن و IgG4 برای حصول بهترین و معتبرترین پاسخ‌ها سود جست. اختلاف بین پاسخ‌های سرم انسانی به آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار است به عبارت دیگر تفاوت قابل قبولی در پاسخ سرم انسان از نظر زیر کلاس‌های مختلف آنتی‌بادی و نیز از نظر نوع آنتی‌ژن وجود دارد به گونه‌ای که آنتی‌ژن اصلی مورد نظر در بین آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه که بهترین پاسخ و نیز دارای اندیکاسیون کافی برای همه کیست‌های هیداتیک مورد مطالعه است، آنتی‌ژن حیوانی گاو است که هم بی ضرر و هم به آسانی در دسترس است. در مرتبه بعدی آنتی‌ژن موش هم مناسب بوده و OD آنتی‌بادی انسان علیه آن ۷/۲۵ برابر بالاتر از Cut off بوده است و مزیت این مطالعه نیز همین است که بر اساس نتایج اگر نتوان از آنتی‌ژن گاو استفاده نمود، آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک موش نیز دارای ارزش بالایی بوده که در شرایط طبیعی ۷/۲۵ برابر Cut off مربوطه پاسخ ایجاد کرده است که انتخاب مناسبی برای طراحی کیت‌های تشخیص در مقیاس‌های کوچک متناسب با نیاز و توان‌مندی منطقه است. نکته قابل توجه دیگر، حساسیت و ویژگی تست‌های تشخیص است که در مطالعه حاضر مد نظر بوده است که برای IgG4 و آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه، حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی نیز بالاتر از ۹۰ درصد بوده است. با توجه به این داده‌ها می‌توان به‌درستی اظهار نظر کرد که استفاده از آنتی‌ژن‌های حیوانی مشابه با آنتی‌ژن انسانی می‌تواند جایگزین مناسبی برای مطالعات مختلف تشخیصی و تحقیقی باشد به‌خصوص در مواردی که آنتی‌ژن‌های حیوانی به سهولت بهتر و بیشتری در دسترس می‌باشد و خطرات کمتری نیز دارد.

تشکر و قدردانی

در پایان از حوزه معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر تأمین اعتبار هزینه این پایان نامه دوره کارشناسی ارشد و تمامی عزیزانی که در انجام طرح همکاری داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱- ارفع، ف. (۱۳۸۸): کرم شناسی پزشکی، سستودها. چاپ ششم، تهران، انتشارات خسروی، صفحه

.۱۱۵-۱۲٤

۲- اسلامی، ع. (۱۳۸۵): کرم شناسی دامپزشکی، سستودها. چاپ سوم، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۱٤٦-۱٤٤.

۳- موبدی، ا.، دلیمی، ع. (۱۳۷٤): اپیدمیولوژی کیست هیداتیک در ایران و جهان. چاپ اول، تهران، انتشارات مقدم، صفحه ۱٤۷-۱۳۲.

4- Auer,H., Stockl, C., Suhendra, S.,(2009): Sensitivity and specificity of new commercial tests for the detection of specific Echinococcus antibodies.Wien Klin Wochenschr:37-41

5- Beaver, P.C., Jung, R.C., Cupp, E.W., (1984):Cyclophyllideantapeworms. In: Clinical parasitology. 9th ed.Philadelphia:Lea and Febiger:527-43

6- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P.,(1992):Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitology.54(2): 165-173

7- Dempster, R.P., Berridge, M.V., Harrison, G.B., Heath, D.D.,(1991): Echinococcus granulosus: development of an intermediate host mouse modle for use in vaccination studies. International Journal Parasitology.21(5):549-554

8- Golass, L., Abebe, T., Hailu, A.,(2011): Evaluation of crud hidatid cyst fluid antigen for the serological diagnosis of hydatidosis in cattle. Journal Helmintology.85(1):100-108

9- Jahani, Z., Meshgi, B., Ragabi.B, M., Jalousian, F.,(2014):Improved serodiagnosis of hydatid cyst diseas using gold nanoparticle labelee antigen B in naturally infected sheep. Iranian journal parasitology.9(2):218-225

10- Jiang, L., Zhang, Y. G., Liu, M. X.,(2012): Analysis on the reactivity of five subunits of antigen B family serodiagnosis of echinococcosis.Exp Parasitology.131(1):85-91

11- Khosravi, A., Ghafourian,S., Shamsi, M., Sadeghifard, N., Maleki, A., Babaahmadi, E.,(2012): Crossreaction beetwin the crud hidatid cyst fluid antigens of human and animals origin in response to human IgG class and subclass.Journal Parasitology Research.b:947-948

12- Khosravi, A., Shamsi, M., Sadeghifard, N., Ghafourian,S.,(2012):Evaluation of mice,sheep and human IgG and IgE antibody responses aginst the mice crud Hydatid cyst fluid(HCF)antigens.Journal of Cell and Biology.6(5):66-72

13- Liance, M., Janin, V., Bresson-Handi, S., (2000) : Immunodiagnosis of Echinococcus infections: confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western Blot.Journal Clincal Microbiology.38(10):3718-3721

14- Mamuti, W., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakaya, K., Nakao, M., Marshall ,W., (2002) : Usefulness of Hydatid Cyst Fluid of Echinococcus granulosus developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. clinical and diagnostic laboratory immunology. 9(3):573-576

15- Sari, C., Ertug, S., Karadam, S. Y.,(2009): The comparative evaluation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Indirect Hemagglutination Test (IHA) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) in the diagnosis of cystic echinococcosis.Turkiye Parasitology Derg.33(1): 73-76

16- Sbihi, Y., Jansen, D., Osuna, A.,(1996): Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods.Diagnosis Microbiology Infection Disease.24:205-211.

17- Sbihi , Y. , Janssen , D. , Osuna, A . , (1997): Specific recognition of hydatid cyst antigens by serum IgG, IgE, and IgA using western blot. Journal Clinical Laboratory Anal.11(3):154-1٥7.

18- Siracusano, A., Buttari, B., Delunardo, F., Profumo, E., Margutti, P., Ortana, E., Rigano, R., Teggi, A.,(2004): Critical points in the immunodiagnosis of cystic echinococcosis in humans.journal Parasitologia.46:401-403

19- Tabatabaie, F., Akhlaghi, L., Noori, M., Maleki, F.,(2013):Prepration and purification of antigens of hydatid cyst fluid by serologic diagnosis. Annals of Biological Reaserch.4(6):236-241

20- Tawfeek, G. M., Elwakil, H. S., El-Hoseiny, L., :(2011) Comparative analysis of the diagnostic performance of crude sheep hydatid cyst fluid, purified antigen B and its subunit (12 Kda), assessed by ELISA, in the diagnosis of human cystic echinococcosis.Parasitology Reserch.108(2):371-376

21- Wen, H., Craig, P.S.,(1994): Immunoglobulin G sub class responses in human cystic and alveolar echinococcosis. Am Journal Tropical Medical Hygiene.51:741-748

22- Zhang, W., You, H., Li, J., Zhang, Z., Troson, G., Ali, H., (2003): Immunoglobulin profiles in murine intermediate host modelof resistance for Echinococcus grnulosus infection. Parasite Immunology.253:161-168.