Arch

مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

ارزیابی آنتی ژن‌های پروتواسکولکس در تشخیص هیداتیدوزیس، قبل و بعد از عمل جراحی

علی جلودار[۱و۲]، محمود صافی[۲]، عبدالله رفیعی*[۱و۲]، ملوک بیروم وند[۱و۲]، محمود راهدار[۱و۲]

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲- گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۶

تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۲۰

***نویسنده مسئول:** عبدالله رفیعی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

تلفن: ۶۱۱-۳۳۳۷۰۷۷

پست الکترونیک:
rafieiabdollah@yahoo.com

چکیده

مقدمه

اکینوکوکوزیس بیماری انگلی مشترک بین انسان و حیوانات است که بر اثر ابتلاء به مرحله لاروی انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد گردیده و دارای انتشار جهانی می‌باشد. یکی از مشکلات مهم بیماران پس از جراحی احتمال عود بیماری است. به همین دلیل لازم است به منظور ارزیابی موفقیت یا شکست در درمان، بیمار به مدت طولانی مورد ارزیابی و پیگیری قرار داده شود.

مواد و روش‌ها

برای تهیه آنتی ژن این انگل پروتواسکولکس‌های، کیست‌های تازه از کشتارگاه جمع‌آوری و پروتواسکولکس‌ها از این کیست‌ها استخراج شد. از مجموع ۱۸۰ سرم، ۴۱ سرم مربوط به بعد از جراحی، ۶۹ نمونه سرم بیماران قبل از جراحی، ۵۰ نمونه شاهد سالم و ۲۰ نمونه سرمی هترولوگ جمع‌آوری شد. در انتها آنتی ژن تهیه شده با روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

میزان حساسیت آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتون در بیماران مبتلا به انواع کیست‌ها قبل و بعد از جراحی به ترتیب ۶۷ و ۸۳ درصد تعیین گردید. اختصاصیت آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتون در تشخیص بیماران هیداتیکی ۱۰۰ درصد تشخیص داده شد و مشاهده گردید که تمامی بیماران مبتلا به کیست کبدی با یکی از آنتی ژن‌های پروتواسکولکس واکنش نشان داده‌اند در حالیکه در بیماران مبتلا به کیست ریوی این رقم ۶۶/۶ درصد تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری

آنتی بادی‌های اختصاصی IgG, IgG1 و IgG4 مهمترین آنتی بادی‌ها در تشخیص سرولوژیک اکینوکوکوزیس در مرحله فعال بیماری هستند و آنتی بادی‌های زیر کلاس IgG و بویژه IgG4 جهت پیگیری بیماران پس از عمل جراحی مناسب‌تر تشخیص داده شدند.

کلیدواژه‌ها

اکینوکوکوزیس، اکینوکوکوس گرانولوزوس، آنتی ژن، تشخیص

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

مقدمه

اکینوکوکوس گرانولوزوس سستودی است که در روده سگ و سگ سانان به عنوان میزبان نهایی انگل زندگی می‌کند. مرحله لاروی این سستود بصورت کیست در بدن میزبان‌های واسط متعددی از جمله انسان تشکیل می‌شود که به آن هیداتیدوزیس یا کیست هیداتیک می‌گویند (۱). کیست هیداتیک، در اعضاء مختلف بدن میزبان واسط ایجاد می‌گردد. علایم بیماری به محل ایجاد کیست، تعداد کیست و اندازه آن بستگی دارد، و در بسیاری از موارد ممکن است فاقد علائم بالینی باشد. لذا ارزیابی بالینی کافی نبوده و بهتر است از چند روش جهت تشخیص استفاده گردد (۲).

امروزه از روش‌های مختلفی جهت تشخیص کیست هیداتیک استفاده می‌شود که همگی مکمل یکدیگر هستند. این روش‌ها شامل، تکنیک‌های تصویربرداری مثل رادیوگرافی، سونوگرافی، سی تی اسکن و یا تکنیک‌های سرولوژیک می‌باشند. تکنیک‌های سرولوژیکی، جهت تشخیص آنتی بادی‌های میزبان که علیه آنتی ژن‌های کیست هیداتیک ساخته می‌شوند و یا جستجوی آنتی ژن‌های مترشحه از متاستود اکینوکوکوس گرانولوزوس طراحی می‌شوند (۳).

بالاترین میزان ترشح آنتی بادی علیه آنتی ژن‌های کیست هیداتیک مربوط به IgG و بخصوص IgG4 می‌باشد (۴). آنتی بادی‌های IgM و IgE آنتی بادی‌های هستند که میزان آنها بعد از عمل جراحی کاهش می‌یابد و در حدود ۴۸ ماه بعد از عمل جراحی این دو آنتی بادی منفی می‌گردند و تنها آنتی بادی IgG کل است که ممکن است حتی تا پنج سال باقی بماند (۵).

از مهمترین آنتی ژن‌های موجود درکیست هیداتیک آنتی ژن B و آنتی ژن Arc 5 می‌باشند که در تشخیص کیست هیداتیک نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶). یکی از مشکلات در این بیماری عود مجدد آن بعد از عمل جراحی می‌باشد. زیرا ممکن است در حین عمل جراحی قسمت‌های کوچکی از لایه زایا و یا پروتواسکولکس‌های موجود در کیست هیداتیک در بدن باقی مانده و ایجاد کیست‌های ثانویه نماید. بطوریکه در برخی منابع میزان عود را بالا و حدود ۴/۶-۲۲درصد گزارش نموده‌اند (۷-۹).

با توجه به احتمال عود بیماری پس از عمل جراحی و خطرات ناشی از آن، به نظر می‌رسد روند پیگیری بیماری با استفاده از روش‌های سرولوژیکی پس از جراحی امری مهم و ضروری است تا بتوان از تشکیل کیست‌های ثانویه مطلع شد. گزارشات متفاوتی در مورد حساسیت و ویژگی آنتی ژن‌های مختلف کیست و همچنین تفاوت نتایج آنتی ژن‌های یکسان در مناطق مختلف وجود دارد که همین مسئله باعث طراحی این مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۴۱ نمونه (۳۵ نمونه کبدی و ۶ نمونه ریوی) مربوط به بیماران بعد از عمل جراحی می‌باشد که مدت زمان بعد از عمل جراحی در همگی متفاوت بوده و از شش ماه تا ۱۵ سال بوده است. تعداد نمونه‌های سرمی مثبتی که جراحی ننموده‌اند نیز مربوط به ۶۹ بیمار بود که تست آنها با روش الیزا مثبت گزارش گردیده بود.

نمونه‌های سرمی هترولوگ شامل نمونه سرم بیماران مبتلا به سایر بیماری‌های انگلی و یا بیماری‌های شایع در منطقه که احتمال واکنش متقاطع با کیست هیداتید را دارند ۲۰ نمونه بوده که شامل موارد ذیل می باشد: ۲ نمونه سل ریوی ،۲ نمونه سرطان ریه، ۲ نمونه سرطان کبد، ۱ نمونه مبتلا به استرانژیلوئیدس استر کورالیس، ۲ نمونه مبتلا به ژیاردیا، ۱ نمونه مولتیپل مایلوما، ۲ نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

انتا موبا هیستولیتیکا، ۲ نمونه مبتلا به آسیت کبدی، ۲ نمونه مبتلا به هپاتیت ویروسی، ۲ نمونه مبتلا به لنفوم و ۲ نمونه سرمی فرد مبتلا به توکسو پلاسما.

تهیه آنتی ژن پروتواسکولکس

کبدهای گوسفندی آلوده به کیست هیداتیک از کشتارگاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس کبدهای آلوده را شسته و محتویات داخل کیست‌ها با سرنگ تخلیه و در یک ظرف تمیز جمع‌آوری گردید. کیست‌ها و مایع جمع‌آوری شده، از نظر بارور بودن و وجود پروتواسکولکس مورد بررسی قرار گرفت. مایع کیست جهت جدا سازی پروتواسکولکس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفوژ گردید و رسوب حاوی پروتواسکولکس‌ها سه مرتبه با PBS شستشو داده شد. پروتواسکولکس‌های جدا شده با دو حجم PBS مخلوط و با استفاده از دستگاه سونیکیتور (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG- Germany) (۱۵۰ وات بمدت ۱۵ دقیقه و ۲ ثانیه روشن یک ثانیه خاموش) سونیکه شدند. در تمام مدت سونیکه کردن نمونه‌ها در یخ قرار داشتند. سونیکیت تا زمانی انجام گردید که کلیه پروتواسکولکس‌ها کاملا خرد شده و با میکروسکوپ قابل مشاهده نبودند. پس از پایان سونیکیت نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه بدون حرکت در همان ظرف یخ قرار داده و سپس با سانتریفوژ یخچال دار (Hettich – Germany)در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. بعد از سانتریفوژ مایع رویی به عنوان آنتی ژن جدا گردید و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (۱۰).

اندازه‌گیری میزان پروتئین آنتی ژن

بعد از فرآیند جداسازی و تهیه آنتی ژن، مقدار آنتی ژن به روش بیوره اندازه‌گیری و میزان آن ۱ میلی گرم در میلی لیتر مشخص گردید.

انجام آزمایش SDS–PAGE

این روش با هدف تعیین تعداد و اوزان مولکولی زیر واحدهای آنتی ژن تخلیص شده پروتواسکولکس بر اساس وزن مولکولی آنها استفاده گردید

پس از تهیه ژل‌های با درصدهای متفاوت و الکتروفورز (BIO-RAD – USA)نمونه آنتی ژن بر روی آنها، بهترین نتیجه با ژل ۱۲ درصد بدست آمد و باندهای آنتی ژن در آن به خوبی مشخص بودند.

بعد از اتصال سیم رابط به منبع نیرو و الکترودهای مربوطه نمونه‌ها در ژل متراکم با ولتاژ ۱۰۰ ولت و در ژل جدا کننده با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند و قبل از رسیدن رنگ نشانگر (برومونفل بلو و مارکر استاندارد) به انتهای ژل (حدود ۰/۵ سانتی متر به انتهای ژل) جریان برق قطع گردید (۱۱).

انجام ایمنوبلات

ایمنوبلات شامل سه مرحله می‌باشد.

الف : الکتروفورز آنتی ژن در ژل پلی آکریل آمید

ب : انتقال باندهای آنتی ژنی از ژل به کاغذ نیتروسلولز

ج : واکنش دادن نمونه‌های سرمی با آنتی ژن‌های منتقل شده به کاغذ نیتروسلولز

ابتدا با کمک قیچی تمیز غشاء نیتروسلولز و کاغذ صافی-ها به ابعاد ژل بریده شدند. سپس غشاء نیتروسلولز را به همراه کاغذ صافی‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر گذاشته تا خیس بخورد. در مرحله بعد ژل حاوی باندهای تفکیک شده و کاغذ نیتروسلولز بمدت ۲۰ دقیقه در بافر منتقل کننده قرار داده شد. اسفنج‌ها را نیز در آب مقطر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

خیس کرده و در بافر منتقل کننده قرار داده و پس از آن به ترتیب زیر اجزای فوق روی هم قرار داده شدند. لایه‌ها به ترتیب از پائین به بالا شامل اسفنج، کاغذ صافی، کاغذ نیتروسلولز، ژل، کاغذ صافی و لایه اسفنجی بودند. بعد از گذاشتن هر لایه حباب‌های هوا را با پیپت پاستور از حد فاصل لایه‌ها خارج کرده تا در انتقال باندها اختلال ایجاد نکند.

مجموع لایه‌های فوق را همانند ساندویچ در داخل قاب پلاستیکی مربوطه محکم کرده و در تانک بلات که تا ارتفاع مناسب از بافر منتقل کننده پر شده بود بطوریکه ژل در طرف الکترود منفی و کاغذ نیتروسلولز در طرف الکترود مثبت باشد، قرار دادیم. جریان ثابت ۳۰۰ میلی آمپر به مدت ۲ ساعت به خوبی صورت گرفت.

با جدا کردن لایه های اسفنج و کاغذ صافی، محدوده ژل را روی کاغذ نیتروسلولز مشخص کرده و وزن مولکولی باندهای آنتی ژن را با توجه به مارکر استاندارد در کنار آنها روی کاغذ نیتروسلولز نوشته و به آرامی کاغذ نیتروسلولز از ژل جدا و ژل دور انداخته شد.

کاغذ نیتروسلولز بمدت یک ساعت در محلول بلوک کننده PBS حاوی ۱۰ درصد شیر خشک بدون چربی، قرار داده شد. (در این مرحله می‌توان کاغذ نیتروسلولز را روی یک سطح شیشه‌ای قرار داد و برای کارهای بعدی فریز کرد).

کاغذ نیتروسلولز با PBS حاوی ۰/۰۱ درصد تواین ۲۰ سه بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شسته شد.

کاغذ نیتروسلولز را در دستگاه چند حفره‌ای (Multi-Track Incubation chamber: Biometra Germany) مخصوص اضافه کردن سرم قرار داده و نمونه‌های سرم را به نسبت یک به صد رقیق کرده و به شیاردستگاه چند حفره‌ای اضافه نموده و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق گذاشته شد. کاغذ نیتروسلولز از دستگاه خارج و همانند مرحله دوم شستشو داده شد. سپس آن را در یک ظرف مناسب قرار داده و کنژوگه با رقت یک به چهار هزار طوریکه کاغذ درآن شناور شود به آن اضافه نموده و به مدت یک ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شده و همانند مراحل قبلی شستشو انجام گردید(۱۲).

در انتها سوبسترای برموکلروایندولیل فسفات- نیتروبلو تترازولیوم (به صورت قرص موجود بوده که در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید) اضافه نموده و پس از ۲۰ دقیقه کاغذ نیتروسلولز را همانند مراحل قبلی شستشو داده و آنرا خشک نموده و واکنشهای صورت گرفته بررسی و تفسیر گردیدند (۱۰).

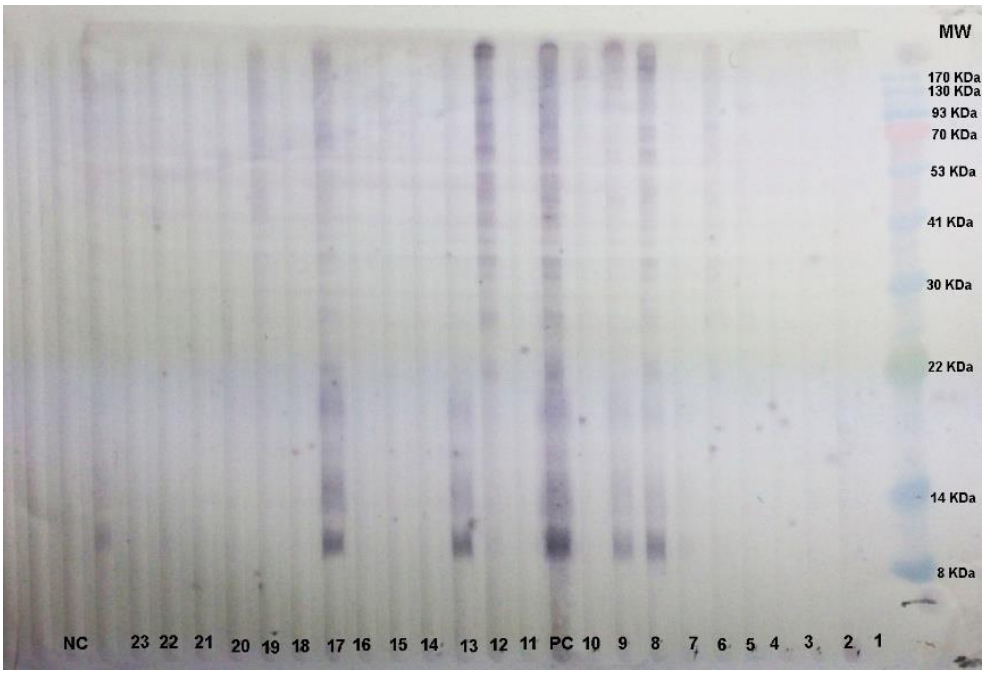
یافته‌ها

بعد انجام SDS-PAGE و وسترن بلات مشاهده گردید که آنتی ژن‌های ۱۲، ۲۲، ۳۰، ۳۸، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ کیلو دالتون با سرم بیماران واکنش نشان دادند (تصویر۱). میزان حساسیت آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتون در بیماران مبتلا به هیداتیدوزیس قبل از عمل جراحی ۶۷ و در بعد از عمل جراحی ۸۳ درصد تشخیص داده شد و اختصاصیت این آنتی ژن در تشخیص مبتلایان به کیست هیداتیک ۱۰۰ درصد تعیین گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019



PC: positive control NC: Negative control MW: Molecular weight

تصویر ۱- نمونه وسترن بلات انجام شده

در این مطالعه مشـــاهده گردید تمامی بیماران مبتلا به کیســـت کبدی با یکی از آنتی ژن‌های پروتواســـکولکس واکنش نشان داده اند (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج وسترن بلات بیماران مبتلا به کیست کبدی بعد از عمل جراحی (n=۳۵)

IgG کل			IgG1		IgG4	
کیلو دالتون	تعداد	%	تعداد	%	تعداد	%
۱۲	۱۶	۵۱	۹	۲۹	۷	۲۲
۲۲	۲۱	۶۸	۱۲	۳۹	۵	۱۶
۳۰	۲۲	۷۱	۲۰	۶۴	۳	۱۰
۳۸	۲۵	۸۱	۲۲	۷۱	۲	۶
۴۵	۱۷	۵۴	۱۱	۳۵	۲	۶
۵۵	۱۳	۴۲	۸	۲۶	۳	۱۰
۶۵	۱۹	۶۱	۱۸	۵۸	۱	۳

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

در شرایطی که ۶۶/۶ درصد بیماران مبتلا به کیست ریوی با یکی از آنتی ژن‌های پروتواسکولکس واکنش نشان داده بودند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج وسترن بلات بیماران مبتلا به کیست هیداتیک ریوی بعد از عمل جراحی (n=۶)

IgG4		IgG1		IgG کل		
%	تعداد	%	تعداد	%	تعداد	کیلو دالتون
۳۳	۲	۳۳	۲	۶۶/۶	۴	۱۲
-	-	۵۰	۳	۵۰	۳	۲۲
-	-	۵۰	۳	۶۶/۶	۴	۳۰
-	-	۶۶/۶	۴	۶۶/۶	۴	۳۸
-	-	۳۳	۲	۳۳	۲	۴۵
-	-	۳۳	۲	۳۳	۲	۵۵
۳۳	۲	۵۰	۳	۵۰	۳	۶۵

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حساسیت IgG1 در تشخیص کیست هیداتیک ۶۹ درصد و حساسیت IgG4 در تشخیص کیست هیداتیک ۴۳ درصد می‌باشد.

بحث

علی رغم پیشرفت‌های فراوانی که در زمینه تشخیص بیماری‌ها بوجود آمده، هنوز روش مطمئنی جهت تشخیص کیست هیداتیک وجود ندارد و این مشکل در زمان پیگیری بیماران بعد از عمل جراحی به منظور تشخیص عود مجدد بیماری بیشتر به نظر می‌آید. مشکلات موجود در تشخیص دارای دلایل متعدد از جمله اندازه، محل قرار گرفتن ، بارور بودن یا غیر بارور بودن، سن و تعداد کیست می‌باشد که همگی آنها می-تواند با عث خطا در تشخیص گردد (۱۳). جهت رفع این مشکل مطالعات گسترده‌ای بر روی مایع کیست هیداتیک صورت گرفته است ولی در مقایسه با آن به مراتب مطالعات کمتری بر روی پروتواسکولکس انجام گرفته است. از دیگر روش‌های تشخیص و پیگیری بیماری در بیمارانی که جراحی نموده‌اند تشخیص آنتی ژن‌ها در خون بیماران و یا تشخیص آنتی بادی‌ها بر ضد اجزاء مختلف کیست هیداتیک می‌باشد (۱۴).

در مطالعه حاضر با بررسی‌های انجام شده بر روی عصاره پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک کبدی به عنوان آنتی ژن مشاهده گردید که سرم بیماران مبتلا به کیست هیداتیک با ۷ آنتی ژن ۱۲، ۲۲، ۳۰، ۳۸، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ کیلو دالتون واکنش نشان دادند.

در مطالعه حاضر مشاهده شد که میزان حساسیت آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتون عصاره پروتواسکولکس در بیماران هیداتیدوزیس قبل از عمل جراحی ۶۷ درصد می‌باشد. در مطالعه رفیعی و همکاران آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتون دارای حساسیت ۸۶ درصدی در بیماران هیداتیدوزی بود (۱۵). اختلاف موجود در این دو مطالعه می‌تواند مربوط به جمعیت مورد مطالعه باشد که در مطالعه رفیعی بیماران مبتلا به کیست هیداتیک و تحت عمل یکجا مورد بررسی قرار گرفته‌اند در حالیکه در این

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

مطالعه دو گروه از هم تفکیک و جداگانه بررسی شده‌اند. اگر در مطالعه حاضر کل بیماران را یکجا مورد بررسی قرار دهیم (صرفنظر از قبل و یا بعد از عمل جراحی) حساسیت ۷۶ درصد است که نزدیک به مطالعه مذکور می‌باشد که می‌تواند به دلیل یکسان بودن روش آزمایش و نوع آنتی ژن به کار برده شده باشد.

دویز[1] و همکاران با مطالعه بر روی آنتی ژن ۳۹ کیلو دالتون مایع کیست هیداتیک مشاهده نمودند که حساسیت آن قبل از عمل جراحی ۹۲ درصد می‌باشد (۱۶). با مقایسه مطالعه فوق و مطاله حاضر در بیماران قبل از عمل اختلاف مشخصی وجود دارد که دلایل متعددی می‌تواند داشته باشد. در مطالعه دویز آنتی ژن بکار رفته مایع کیست هیداتیک بوده ولی در مطالعه حاضر عصاره پروتواسکولکس بکار گرفته شده است. همچنین ممکن است محل کیست در بیماران مورد مطالعه دویز با مطالعه حاضر متفاوت باشد در نتیجه پاسخ ایمنی نیز متفاوت بوده و در نتایج به دست آمده نیز تاثیرگذار می‌باشد.

در مطالعات مختلف نشان داده اند که آنتی ژن‌های تهیه شده از پروتواسکولکس و مایع کیست ممکن است با برخی بیماری‌های انگلی و غیر انگلی واکنش متقاطع نشان دهند(۴, ۱۰, ۱۷-۱۹). در مطالعه حاضر اختصاصیت آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتون پروتواسکولکس ۱۰۰ درصد مشخص گردید. در مطالعه رفیعی و همکاران در سال ۲۰۰۲ با کار بر روی آنتی ژن های پروتواسکولکس مشاهده نمودندکه سرم بیماران مبتلا به *اکینو کوکوس مولتی لوکولاریس*، سیستی سرکوزیس و تریپانوزومیازیس افریقایی با آنتی ژن‌های پروتواسکولکس واکنش متقاطع نشان دادند (۱۰). در مطالعه رفیعی و همکاران در سال ۲۰۰۵ با کار بر روی آنتی ژن های پروتواسکولکس دارای اختصاصیت ۶۴ درصد می‌باشد (۱۹). در مطالعه دیگری توسط عریضی و همکاران بر روی آنتی ژن‌های پروتواسکولکس مشاهده کرد که دارای اختصاصیت ۶۳ درصدی می‌باشند (۲۰). در مطالعات ذکر شده نمونه‌های سرمی مورد استفاده جهت تعیین اختصاصیت از نمونه‌های بیماران مبتلا به آلوئولار هیداتیدوزیس و سیستی سرکوزیس نیز استفاده شده است. در مطالعه حاضر به دلیل عدم دسترسی به نمونه‌های بیماران آلوئولار هیداتیدوزیس و سیستی سرکوزیس ارزیابی واکنش متقاطع با بیماری‌های مذکور میسر نشد. از آنجا که این دو بیماری در مناطق محدودی از جهان مشاهده می‌شوند، به نظر می‌رسد ویژگی بدست آمده در مطالعه حاضر در غالب نقاط جهان قابل تعمیم باشد.

تمامی بیماران مبتلا به هیداتیدوز کبدی و ۶۶/۶ درصد از بیماران مبتلا به هیداتیدوز ریوی با آنتی ژن‌های پروتواسولکس واکنش نشان دادند و در حدود ۳-۴۰ درصد موارد هیداتیدوز انسانی در آزمایشات سرولوژیکی جواب منفی دادند که این میزان در مواقعی که کیست در ریه یا مغز قرار دارد و یا دیواره آن هیالینی یا کلسیفیه باشد بیشتر هم می‌شود (۱۴, ۲۱, ۲۲). نتایج بدست آمده نشانگر حساسیت مناسب آنتی ژن‌های پروتواسکولکس در تشخیص کیست هیداتیک می‌باشد. در مطالعه حاضر حساسیت آنتی بادی زیرکلاس IgG1 در تشخیص بیماران هیداتیدوزیس ۶۹ درصد می‌باشد.

[1] Doiz

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

در مطالعه تنگوریا[1] و همکاران با کار بر روی مایع کیست هیداتیک مشاهده نمودند که زیرکلاس IgG1 دارای حساسیتی حدود ۸۲ درصد می‌باشد (۲۳). در مطالعه ون[2] و همکاران بر روی مایع کیست هیداتیک مشاهده کردند که در بیماران هیداتیدوزیس حدود ۵۸ درصد با IgG1 واکنش نشان می‌دهند و مشخص نمودند که IgG1 در تشخیص آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتون و IgG4 در تشخیص آنتی ژن B عملکرد بهتری از خود نشان می‌دهند (۲۴). در مطالعه دیگری که توسط شمبش[3] و همکاران با کار بر روی مایع کیست هیداتیک صورت گرفت، حساسیت IgG1 در تشخیص کیست هیداتیک ۵۵ درصد تعیین گردید(۲۵). اختلاف در نتایج مطالعات فوق الذکر و مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از منبع آنتی ژنی مورد استفاده باشد. همچنین غالب مطالعات بر روی مایع کیست صورت گرفته در حالیکه در این مطالعه از عصاره پروتواسکولکس استفاده شده است. نزدیک بودن نتایج در برخی از این مطالعات نیز می‌تواند به دلیل تشابه اپی تپ‌های آنتی ژنی در مایع کیست هیداتیک و پروتواسکولکس باشد.

در مطالعه حاضر حساسیت IgG4 در تشخیص هیداتیدوزیس ۵۳ درصد قبل از عمل و ۲۴ درصد بعد از عمل تعیین گردید. تنگوریا و همکاران با کار بر روی مایع کیست هیداتیک برای زیرکلاس IgG4 حساسیت ۸۶ درصد قبل از عمل و ۲۸ درصد بعد از عمل را گزارش نمودند (۲۳). میزان IgG4 بعد از عمل جراحی تقریبا مشابه بوده که می‌تواند ناشی از افت آنتی بادی در بیماران بعد از عمل جراحی بوده باشد اما در بیماران قبل از عمل جراحی اختلاف زیادی وجود دارد که احتمالا به دلیل نوع آنتی ژن بکار رفته و روش بکار برده شده می‌باشد. در مطالعه تنگوریا آزمایش بر روی مایع کیست هیداتیک و به وروش الیزا انجام شده است در صورتیکه در مطالعه حاضر عصاره پروتواسکولکس و روش وسترن بلات استفاده شده است.

مطالعه ون و همکاران بر روی مایع کیست هیداتیک نشان داد حدود ۷۳ درصد مبتلایان به هیداتیدوزیس با IgG4 واکنش نشان می‌دهند (۲۴). در مطالعه شمبش و همکاران حساسیت IgG4 در تشخیص کیست هیداتیک ۷۱ درصد تعیین گردید (۲۵). اختلافات موجود می‌تواند علاوه بر موارد گفته شده در مطالعه قبلی ناشی از اختلاف محل قرار گرفتن کیست در بیماران هر مطالعه باشد که خود سبب ایجاد پاسخ‌های ایمنی متفاوت می‌گردد (۲۶, ۲۷) و در نتیجه حساسیت را نیز تحت تاثیر خود قرار می‌دهد. از طرف دیگر استرین‌های مختلف انگل در مناطق مختلف با یکدیگر متفاوت است که سبب می‌گردد آنتی ژن‌های مناطق مختلف با یکدیگر تفاوت داشته و در نتیجه حساسیت را در مطالعات مختلف تحت تاثیر قرار دهد (۲۱, ۲۷-۲۹).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد پروتواسکولکس می‌تواند به عنوان منبع آنتی ژنیک مناسبی جهت تشخیص مبتلایان به هیداتیدوزیس بکار گرفته شود ولی جهت پیگیری بیماران پس از عمل جراحی کاربرد لازم را ندارد تشخیص زیر کلاس‌های IgG4 شاخص مناسبی برای پیگیری بیماران بعد از عمل جراحی باشد. IgG4 بعد از عمل جراحی افت بسیار بیشتری نسبت به قبل از عمل داشته و می‌توان از آن جهت پیگیری بعد از عمل استفاده

[1] Tenguria
[2] Wen
[3] Shambesh

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

نمود. مطالعه حاضر موید پاسخ ایمنی کمتر مبتلایان به کیست‌های ریوی در مقایسه با کیست‌های کبدی می-باشد.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری و معاونت توسعه و پژوهش دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که در اجرای این مطالعه ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌شود. این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد بوده که با کد شماره ajums.REC. 1393.447 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تایید و هزینه آن از محل اعتبار طرح تحقیقاتی مصوب OG-93148 تامین شده است.

References

1. Baba Ahmadi E, Khosravi A, Shamsi M, Sayehmiri K, Hooshmandfar R. Human IGg class and subclass against crude hydatid cyst fluid (HCF) antigens of human compared to antigen B. J Ilam Univ Med Sci 2011;19(1):9-16.
2. Brunetti E, Tamarozzi F, Macpherson C, Filice C, Piontek MS, Kabaalioglu A, *et al*. Ultrasound and cystic echinococcosis. Ultrasound Int Open 2018;4(3):E70-E78.
3. Ioppolo S, Notargiacomo S, Profumo E, Franchi C, Ortona E, Rigano R, *et al*. Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. Parasite Immunol 1996;18(11):571-8.
4. Khosravi A, Ghafourian S, Shamsi M, Sadeghifard N, Maleki A, Babaahmadi E. Cross-reaction between the crude hydatid cyst fluid antigens of human and animals origin in response to human IgG class and subclasses. J Parasitol Res 2012;2012:947948.
5. Zarzosa MP, Domingo AO, Gutiérrez P, Alonso P, Cuervo M, Prado A, *et al*. Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;35(4):255-62.
6. Khabiri A, Bagheri F, Assmar M, Siavashi M. Analysis of specific IgE and IgG subclass antibodies for diagnosis of *Echinococcus granulosus*. Parasite immunol 2006;28(8):357-62.
7. Little JM, Hollands MJ, Ekberg H. Recurrence of hydatid disease. World J Surg 1988;12(5):700-3.
8. Mottaghian H, Saidi F. Postoperative recurrence of hydatid disease. Br J Surg 1978;65(4):237-42.
9. Prousalidis J, Kosmidis C, Anthimidis G, Kapoutzis K, Karamanlis E, Fachantidis E. Postoperative recurrence of cystic hydatidosis. Can J Surg 2012;55(1):15-20.
10. Rafiei A, Craig P. The immunodiagnostic potential of protoscolex antigens in human cystic echinococcosis and the possible influence of parasite strain. Ann Trop Med Parasitol 2002;96(4):383-9.
11. Debarba JA, Monteiro KM, Moura H, Barr JR, Ferreira HB, Zaha A. Identification of newly synthesized proteins by Echinococcus granulosus protoscoleces upon induction of strobilation. PLoS Negl Trop Dis 2015;9(9):e0004085.
12. Hassanain MA, Shaapan RM, Khalil FAM. Sero-epidemiological value of some hydatid cyst antigen in diagnosis of human cystic echinococcosis. J Parasit Dis 2016;40(1):52-6.
13. Grimm F, Maly FE, Lü J, Llano R. Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of Echinococcosis by a standard enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 1998;5(5):613-6.
14. Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. Clin Dev Immunol 2012.
15. Rafiei A, Dezfulinejad M, Mirzaei ASAD. Evaluation and comparison of hydatid cyst fluid and protoscolex antigens to different intermediate hosts and human by sds-page gel electrophoresis and western blotting. Journal of ilam university of medical sciences 2005;13(1):3-12.
16. Doiz O, Benito R, Sbihi Y, Osuna A, Clavel A, Gómez-Lus R. Western blot applied to the diagnosis and post-treatment monitoring of human hydatidosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2001;41(3):139-42.
17. Al-Olayan EM, Helmy H. Diagnostic value of different antigenic fractions of hydatid cyst fluid from Camel and Sheep in Kingdom of Saudi Arabia. Journal of Saudi Chemical Society 2012;16(2):203-7.

www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

18. Leggatt G, Yang W, McManus DP. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992;86(2):189-92.
19. Rafiei A MA, Jahanshahi A.H, Talaizadeh A.H, Maraghi S. Evaluation of *Echinococcus granulusus* protoscolex antigen for hydatid cyst detection using ELISA and immunoblot. Jundishapur Scientific Medical Journal 2006;4(4):331-40.
20. Oreyzi F, Haghpanah B, Ghayour Z, Mosavat B. Comparison of diagnostic value of antigen band protoscoleces antigen in diagnosis of hydatid cyst by blotting method. Avicenna Journal of Clinical Medicine 2006;12(4):49-54.
21. Gadea I, Ayala G, Diago M, Cunat A, de Lomas JG. Immunological diagnosis of human cystic echinococcosis: utility of discriminant analysis applied to the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6(4):504-8.
22. Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. Clin Microbiol Rev 2003;16(1):18-36.
23. Tenguria RK, Naik MI. Evaluation of human cystic echinococcosis before and after surgery and chemotherapy by demonstration of antibodies in serum. Ann Parasitol 2014;60(4):297-303.
24. Wen H, Craig PS. Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. Am J Trop Med Hyg 1994;51(6):741-8.
25. Shambesh M, Craig P, Wen H, Rogan M, Paolillo E. IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. Acta Trop 1997;64(1):53-63.
26. Rigano R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzara A, Ioppolo S, *et al*. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. Infect Immun 2001;69(1):288-96.
27. Todorov T, Dakov I, Kosturkova M, Tenev S, Dimitrov A. Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis: 1. A comparative study of immunodiagnostic tests. Bull World Health Organ 1979;57(5):735.
28. Abu-Eshy S, Ali ME. Hydatid cyst associated with pregnancy: A case report and review of the literature. Ann Saudi Med 1999;19(2):130-1.
29. Sanchez F, Garcia J, March F, Cardenosa N, Coll P, Muñoz C, *et al*. Ultrastructural localization of major hydatid fluid antigens in brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* of human origin. Parasite immunol 1993;15(8):441-7.

www.SID.ir

Archive

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Evaluation of Protoscolex Antigens for Hydatidosis Detection before and after Surgery

Ali Jelowdar [1,2], Mahmoud Safi [2], Abdollah Rafiei [*1,2], Molouk Beiromvand [1,2], Mahmoud Rahdar [1,2]

1- Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
2- Department of Parasitology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 11:31 IRDT on Saturday July 13th 2019

Original Article

Received: 17 Mar, 2019
Accepted: 10 Jun, 2019

***Corresponding Author:**
Abdollah Rafiei, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
TEL: 611-3337077
Email:
rafieiabdollah@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction
Cystic echinococcosis (CE) is a zoonotic infection caused *Echinococcus granulosus* with worldwide distribution. As one of the problems that can be encountered after treating CE patients is the risk of postsurgical relapses or treatment failure, a long-term clinical and serological follow-up is required to evaluate the success and failure of therapy.

Materials and Methods
We used extract protoscolex antigen from fresh sheep hydatid cyst collect from slaughtered in Ahvaz. Overall we tested 180 serum samples comprising: 41 sera from post surgically confirmed CE from 6 month to 20 years after surgery, 69 sera from patients with symptomatic CE and 50 sera from non CE patients and 20 heterologous sera were evaluated with SDS-PAGE gel electrophoresis and western blotting.

Results
The sensitive of the 38 KDa PSC Antigen was 67 % pre and 83 % after surgery and 100% specify. All hepatic CE and 66.6 % of pulmonary CE sera was reacted with PSC Antigen.

Conclusion
The results indicate that the hydatid specific antibodies of IgG, IgG1 and IgG4 are the most important antibodies for the serological diagnosis of CE during the active stage of the disease and Ig G, particularly sub-class Ig G4 was more suitable for postoperative follow up.

Keywords
echinococcosis, *Echinococcus granulosus*, antigens, diagnosis

► ***Please cite this article as:*** Jelowdar A, Safi M, Rafiei A, Beiromvand M, Rahdar M. Evaluation of Protoscolex antigens for Hydatidosis detection before and after surgery. J Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(2):23-33.

www.SID.ir