Archive of SID

ارزیابی آنتی‌ژن پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس در تشخیص بیماران مبتلا به کیست هیداتید با استفاده از روش الایزا و ایمنوبلات

عبداله رفیعی*[1]، اسد میرزائی**، عبدالهادی جهانشاهی***،
عبدالحسین طلائی‌زاده[3]**** و شریف مراغی****

چکیده

هدف: تشخیص سرولوژیکی کیست هیداتید که در اثر ابتلا به اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود، به کمک تکنیکهای مختلف انجام شده است. نبودن یک روش استاندارد جهت تهیه آنتی ژن، حساسیت و ویژگی تستها را تحت تاثیر قرارداده است. هدف از این مطالعه ارزیابی کاربرد آنتی‌ژن پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس(تهیه شده از گوسفندان آلوده) با استفاده از روش الایزا و ایمنوبلات در تشخیص کیست هیداتید انسان بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه در مجموع ۳۵۳ نمونه سرم شامل ۱۰۰ نمونه از افراد بیمار مبتلا به کیست هیداتید که تشخیص آنها با جراحی و آزمایشات پاتولوژی صورت گرفته بود، ۲۰۰ نمونه سرم از افراد سالم اهدا کننده خون و ۵۳ نمونه سرم افراد مبتلا به بیماریهای هترولوگ و دیگر بیماری‌های انگلی بررسی شدند.

یافته ها: بعد از انجام آزمایش تمام نمونه‌های سرم به روش الایزا، از مجموع ۱۰۰ نمونه سرم افراد مبتلا به کیست، ۸٦ نمونه مثبت و ١٤ نمونه منفی شدند و از ۵۳ نمونه سرم هترولوگ ۱۳ نمونه بطور کاذب مثبت شدند. بنابراین حساسیت و ویژگی الایزا به ترتیب ۸٦ و ۷۵/۵ درصد بدست آمد و بدون در نظر گرفتن افراد مبتلا به آلوئولار اکینوکوکوزیس و سیستی سرکوزیس ویژگی الایزا به ۸۰٪ افزایش می‌یابد. آنتی‌ژن پروتواسکولکس در روش SDS-PAGE شامل ۱۳ باند آنتی‌ژنی در محدوده ۱۱۲_ ۲۸ کیلودالتون بود، که در آزمایش ایمنوبلات با نمونه‌های سرم واکنش نشان دادند. در آزمایش ایمنوبلات از مجموع ۱۰۰ نمونه، ۹۳ نمونه مثبت و ۷ نمونه از سرم‌ها با هیچ‌کدام از باندها واکنش ندادند و باندهای ۳۸ و ۵۹ کیلودالتون به ترتیب دارای بیشترین ویژگی و حساسیت بودند. به طور کلی حساسیت و ویژگی ایمنوبلات به ترتیب ۹۳ و ٦٤/١ درصد بدست آمد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه بنظر می‌رسد که پروتواسکولکس می‌تواند یک منبع مناسب آنتی‌ژن در تشخیص سرولوژیکی هیداتیدوزیس انسانی باشد. به نظر می رسد استفاده همزمان از تکنیک الایزا و وسترن بلات جهت تشخیص و تائید نهایی یست دارای مزیت بیشتری باشد. باند ۳۸ کیلودالتون آنتی‌ژن پروتواسکولکس اختصاصی‌ترین باند این آنتی ژن در تشخیص سرولوژی کیست هیداتید می‌باشد.

کلید واژگان: اکینوکوکوس گرانولوزوس، کیست هیداتید، پروتواسکولکس، الایزا و ایمنوبلات

---

*مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری. مدیر گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز

**مرکز انتقال خون ایلام

*** استادیار بخش جراحی بیمارستان امام خمینی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز

**** استاد بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز

۱- نویسنده مسؤل

دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۳/۱۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸٤/۳/۲۸ اعلام قبولی: ۱۳۸٤/۷/۱۹

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سیستیک اکینوکوکوزیس (هیداتیدوزیس)[1] انسانی در نتیجه ابتلا به مرحله لاروی اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. با توجه به این‌که کیست هیداتید در ۶۰٪ موارد فاقد علائم بالینی است و ممکن است تا ۲۰ سال بدون علامت باقی بماند، بنابراین تشخیص آن بسیار مشکل می‌باشد(۱). تشخیص سرولوژی کیست هیداتید بر اساس اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های کیست در مطالعات اپیدمیولوژیکی در مناطق اندمیک همراه با تکنیک‌های عکسبرداری همانند التراسونوگرافی به طور چشمگیری صورت می‌گیرد(۲). با این حال روش‌های تشخیصی مختلفی همانند تست کازونی، فنون تصویربرداری مثل رادیوگرافی، سی‌تی اسکن، التراسونوگرافی، MRI[2] و تست‌های سرولوژیکی مختلفی در تشخیص کیست هیداتید بکار می‌رود (۱۲-۳).

در تشخیص کیست هیداتید از آنتی‌ژنهای مختلف کیست همانند مایع کیست، آنتی‌ژن B، لایه زاینده کیست و پروتواسکولکس استفاده می‌شود. اگر چه بیشترین مطالعات صورت گرفته بر روی کیست هیداتید با استفاده از مایع کیست بوده است (۱۳،۱۴،۱۵) ولی تحقیقات صورت گرفته بر روی پروتواسکولکس به عنوان آنتی‌ژن در تشخیص سرولوژیکی کیست هیداتید نتایج رضایت‌بخشی داده است(۲،۱۶). با این وجود بهترین تست آنتی‌ژنیک کیست هیداتید انتی‌ژن B می‌باشد که بیشترین ویژگی را در تشخیص کیست هیداتید دارد(۱۷). تست‌الایزا برای اولین بار توسط فاراگ در تشخیص کیست هیداتید بکار رفت(۱۸). امروزه در تشخیص بیماری‌های انگلی زیادی همانند مالاریا، توکسوپلاسما، فیلریا، شیستوزوما، تریپانوزوما و کیست هیداتید بکار می‌رود(۱۴). در مطالعات مختلف حساسیت الایزا به طور متوسط ۹۰٪-۶۰٪ و ویژگی آن ۹۰٪- ۷۵٪ می‌باشد که بسته به نوع آنتی‌ژن، روش تهیه آنتی‌ژن ، منطقه جغرافیائی انجام آزمایش و بیماری‌های اندمیک منطقه متفاوت می‌باشد (۱۴،۱۹،۲۰)

ایمنوبلات معمولاً به عنوان یک تست تکمیلی همراه با لایزا بکار می‌رود و قادر است تا حد پیکوگرم، آنتی‌ژن را مشخص کند و دارای حساسیت و ویژگی مناسب جهت تشخیص باندهای آنتی ژنیک می باشد(۶،۲۱،۲۲).

با توجه به این که تست‌های تشخیصی زیادی برای کیست هیداتید طراحی شده است و هر کدام نتایج متفاوتی نیز داشته است و کیست هیداتید یکی از مشکلات بهداشتی جامعه ما می‌باشد و خسارات اقتصادی و بهداشتی فراوانی متوجه جامعه ما می‌کند، ما را بر آن داشت که به ارزیابی آنتی‌ژن پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس در تشخیص بیماران مبتلا به کیست هیداتید بپردازیم.

روش بررسی

سیصد و پنجاه وسه نمونه سرم شامل ۲۰۰ نمونه از افراد سالم اهدا کننده خون به عنوان شاهد که از سازمان انتقال خون تهیه شده بودند، ۱۰۰ نمونه از بیماران مبتلا به کیست هیداتید که با تست‌های پاتولوژی بعد از جراحی تأیید شده بودند و تعداد ۵۳ نمونه از بیماران مبتلا به دیگر بیماری‌های انگلی و غیر انگلی شامل اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس ۷ نمونه، سیستی سرکوزیس، ۶ نمونه که از کشور انگلستان تهیه شده بودند، سل ۶ نمونه، آبسه ریوی، سرطان ریه و ژیاردیا هر کدام ۵ نمونه، پنومونی ۴ نمونه، آبسه کبد، کونه سیستیت و همانژیوم کبد هر کدام ۳ نمونه، سرطان کبد و سیروز کبد هر کدام ۲ نمونه، آمفیزم ریوی و سرطان استخوان هر کدام یک نمونه بودند به روش الیزا و ایمونوبلاست با استفاده از آنتی‌ژن پروتواسکولکس مورد آزمایش قرار گرفتند.

1 - Cystic Echinococcosis (Hydatidosis)
2 - Magnetic Resonance Imaging (MRI)

www.SID.ir

Archive of SID

روش تهیه آنتی‌ژن پروتواسکولکس

پروتو اسکولکسها از کیست هیداتید کبدهای آلوده گوسفندان کشتار شده درکشتارگاه جمع‌آوری شدند. سپس سه بار با PBS[1] با pH = ۷/۲ شستشو داده شده و هر بار در ۶۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند، سپس آن‌ها را سه مرتبه فریز و مجدداً ذوب کرده و با دو حجم PBS با pH = ۷/۲ مخلوط شد و اقدام به خرد کردن پروتواسکولکس‌ها گردید. در مرحله خرد کردن پروتواسکولکس‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با قدرت ۱۵۰ وات با دستگاه التراسونیک به صورت ۱۰ ثانیه روشن و ۵ ثانیه خاموش بطوری‌که در طول مدت شکستن بر روی یخ قرار داشت تا جائی که هیچ‌گونه پروتواسکولکس سالمی به طور میکروسکپی در سوسپانسیون مشاهده نشود خرد گردید. سوسپانسیون پروتواسکولکس را به مدت یک ساعت بدون حرکت بر روی یخ قرار داده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ بوسیله سانتریفوژ یخچال دار دردمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و در نهایت مایع روئی را جدا کرده و در۲۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر تا زمان استفاده نگهداری شد(۲). میزان پروتئین آنتی‌ژن به روش بیوره ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود(۲۳).

الایزا

هر کدام از نمونه‌های سرم جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد اکینوکوکوس گرانولوزوس به روش الایزا به شرح زیر آزمایش شدند.۱۰۰ میکرولیترآنتی‌ژن پروتواسکولکس(حاوی ۲ میکروگرم پروتئین) با رقت ۱:۵۰۰ در بافر بی‌کربنات با pH = ۹/٦ به میکروپلیت الایزا[2] اضافه گردید سپس سطح پلیت را پوشانده و به مدت یک شب در دمای c 4^{o} نگهداری شد. سپس پلیت با PBS حاوی ۰/۱٪ توین ۲۰[3] شستشو داده شد. بعد از آن پلیت در بافر PBS حاوی ۵٪ شیر خشک به مدت یک ساعت در حرارت اتاق بلوک شد و بعد همانند مرحله قبل شستشو انجام گردید. سپس سرم‌ها را در PBS با pH = ۷/۲ به نسبت ۱:۱۰۰رقیق کرده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهکها اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت در حرارت اتاق نگهداری شد. بعد شستشو همانند مراحل قبل انجام شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از کنژوگه آنتی‌هیومن گلوبولین الکالین فسفاتاز[4] با رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت یک ساعت به چاهکها افزوده شد. شستشو همانند مراحل قبل صورت گرفت و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای پی- نیتروفنیل فسفات[5] به چاهکها اضافه گردید و پلیت به مدت ۲۰ دقیقه در محل تاریک در حرارت اتاق نگهداری می شد(۲). در نهایت جذب نوری پلیت توسط دستگاه خواننده الایزا[6] در طول موج ٤۵۰ نانومتر خوانده شد. میانگین بعلاوه SD^{7} ۲ نمونه‌های سرم کنترل منفی (OD = ۰/۲۵۰)[8] بعنوان معیار مثبت[9] بودن ملاک قرار گرفت.

SDS- PAGE[10] و ایمنو بلات

SDS-PAGE با ژل ۸٪ و تحت شرایط احیاء با کمی تغییر بر اساس روش رفیعی و کریج (۲) به شرح زیر انجام شد. ابتدا آنتی‌ژن تهیه شده پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس به نسبت مساوی در بافر نمونه‌گذاری[11] مخلوط و به مدت دو دقیقه در آب جوش قرار داده و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دورسانتریفوژ شد . الکتروفورزیس در ژل متراکم با شدت جریان ۲۰-۱۵ میلی‌آمپر و در ژل جداکننده با شدت جریان ۳۰

1- Phosphate Buffer Saline (PBS)
2- Microplate Immunol
3 - Tween 20
4 - Anti Human IgG Alkalin Phosphatas (Sigma)
5 - P-Nitrophenyl Phosphate
6- ELISA reader, Dynex MRX
7 - Standard Divilation
8 - Optical Density
9- Cut off point
10- Sodium Dodecyl Sulphate Poly acrylamid Gel Electrophoresis
11- Sample Buffer

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌آمپر به ازاء هر ژل انجام شد. سپس پروتئین‌های تفکیک شده آنتی‌ژن بر روی ژل بوسیله تانک ایمنوبلات به مدت ۲ ساعت و با شدت جریان ۲۵۰ میلی‌آمپر به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند.

در مرحله بعد کاغذ نیتروسلولز در دستگاه چند حفره‌ای مخصوص اضافه کردن سرم۴ قرار داده و (PBS) نمونه‌های سرم رقیق شده به نسبت ۱:۱۰۰در بافر PBS با PH =۷/۲ اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در حرارت اتاق نگهداری شد. بعد از شستشو همانند مرحله قبل، کنژوگه آنتی هیومین گلوبولین الکالین فسفاتاز با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه و به مدت یک ساعت در درجه حرارت اتاق انکوبه و برروی شیکر با حرکت ملایم قرار گرفت. شستشو همانند مرحله قبل صورت گرفت و در نهایت سوبسترای الکالین فسفاتاز بروموکلرو ایندولیل فسفات – نیتروبلوتترازولیوم تهیه شده در بافر سوبسترای ایمنوبلات بمدت ۲۰ دقیقه اضافه شد(۲).

یافته ها

آنتی‌بادی‌برعلیه‌کیست هیداتید به‌روش الایزا

بعد از انجام آزمایش الایزا به منظور اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس در بیماران مبتلا به کیست، از مجموع ۱۰۰ نمونه سرم افراد مبتلا، تعداد۸٦ (۸٦٪) نمونه با روش الایزا مثبت و ۱٤ (۱٤٪) نمونه منفی بودند. همانند دیگر آنتی‌ژن‌های کیست هیداتید، آنتی‌ژن پروتواسکولکس نیز با ۱۳ نمونه (۲٤/۵٪) از ۵۳ نمونه سرم افراد مبتلا به بیماری‌های هترولوگ واکنش متقاطع نشان داد. بدین‌ترتیب حساسیت تست الایزا ۸٦٪ و ویژگی آن ۷۵/۵٪ بدست آمد. (جدول شماره ۱) اگر نمونه های آلوئولار اکینوکوکوزیس و سیستی سرکوزیس حذف شوند ویژگی آنتی ژن پروتواسکولکس در تشخیص کیست هیداتید به روش الایزا ۸۰٪ خواهد بود دویست نمونه سرم افراد سالم در آزمایش الایزا همگی فاقد آنتی بادی بر علیه کیست هیداتیک بودند.

جدول ۱: نتایج بررسی سرمهای هترولوگ در واکنش با آنتی‌ژن پروتواسکولکس به روش الایزا

نوع بیماری	تعداد نمونه	موارد مثبت و درصد آنها	موارد منفی و درصد آنها
آلوئولاراکینوکوکوزیس	۷	۳ (٪۴۲/۹)	۴ (٪۵۷/۱)
سیستی سرکوزیس	۶	۲(٪۳۳/۳)	۴(٪۶۶/۶)
سل	۶	۰(٪۰)	۶(٪۱۰۰)
سرطان ریه	۵	۰(٪۰)	۵(٪۱۰۰)
آبسه ریوی	۵	۱(٪۲۰)	۴(٪۸۰)
ژیاردیا	۵	۰(٪۰)	۵(٪۱۰۰)
پنومونی	۴	۱(٪۲۵)	۳(٪۷۵)
آبسه کبدی	۳	۱(٪۳۳/۳)	۲(٪۶۶)
هماتزیوم	۳	۲(٪۶۶/۶)	۱(٪۳۳/۳)
کونه سیستیت	۳	۱(٪۳۳/۳)	۲(٪۶۶/۶)
سرطان کبد	۲	۰(٪۰)	۲(٪۱۰۰)
سیروز کبد	۲	۲(٪۱۰۰)	۰(٪۰)
سرطان استخوان	۱	۰(٪۰)	۱(٪۱۰۰)
آمفیزم	۱	۰(٪۰)	۱(٪۱۰۰)
تعداد کل	۵۳(٪۱۰۰)	۱۳(٪۲۴/۵)	۴۰(٪۷۵/۵)

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌های SDS-PAGE وایمنوبلات

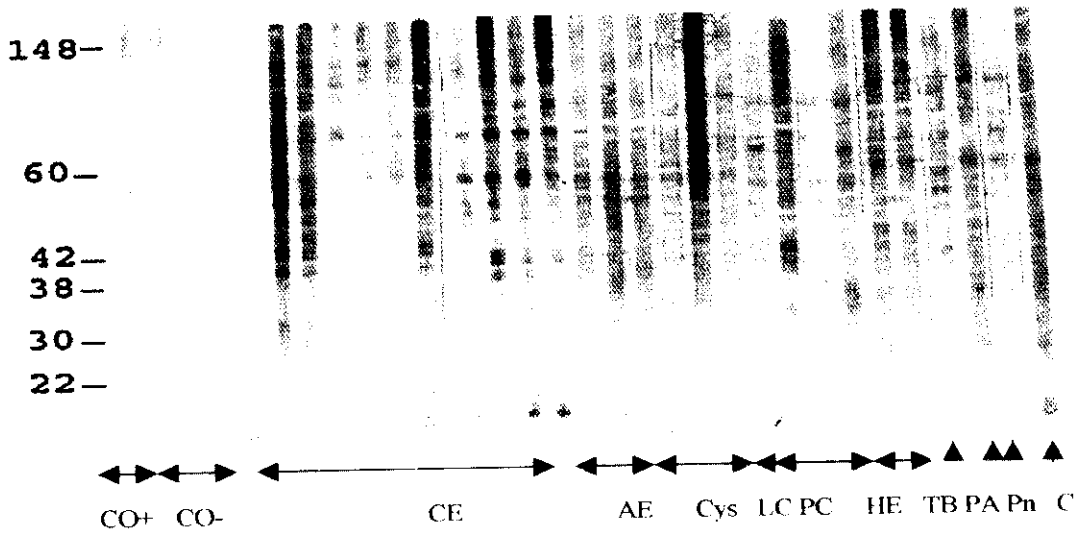
بعداز الکتروفورز آنتی‌ژن بر روی ژل ۸٪ اکریل آمید، تعداد ۱۳ باند آنتی‌ژنی با اوزان تقریبی ۲۸، ۳۳، ۳۸، ۴۳، ۴۷، ۵۳، ۵۹، ۶۸، ۷۴،۸۱، ۹۱، ۱۰۴، ۱۱۲ کیلودالتون جدا شد.(تصویرشماره۱). بعد از انتقال باندهای آنتی‌ژن به کاغذ نیتروسلولز و انجام آزمایش ایمنوبلات و واکنش دادن نمونه‌های سرمی مختلف برروی آن ، از ۱۰۰ نمونه سرم افراد مبتلا به کیست هیداتید تعداد ۹۳ (۹۳٪) نمونه سرم با آزمایش ایمنوبلات مثبت شدند و ۷ (۷٪) نمونه از سرم‌ها با هیچ‌کدام از باندهای آنتی‌ژنی واکنش نشان ندادند. از تعداد ۵۳ نمونه سرم هترولوگ ۱۹ نمونه از آن‌ها در روش ایمنوبلات با آنتی‌ژن پروتواسکولکس واکنش متقاطع نشان دادند وبه‌طور کاذب مثبت شدند (جدول شماره ۲). بدین‌ترتیب حساسیت ایمنوبلات ۹۳٪ و ویژگی آن ۶۴/۱٪ بدست آمد. . اگر نمونه های آلوئولار اکینوکوکوزیس و سیستی سرکوزیس حذف شوند ویژگی آنتی ژن پروتواسکولکس در تشخیص کیست هیداتید به روش ایمنوبلات ۷۲/۵٪ خواهد بود و باندهای ۵۹ و ۳۸ کیلودالتون بیشترین حساسیت را نشان دادند.

جدول ۲: وزن مولکولی باندهای آنتی‌ژنی پروتواسکولکس و واکنش آنها با نمونه‌های سرم بیماران مبتلا به کیست هیداتید و بیماران مبتلا به عفونتهای انگلی و غیر انگلی مختلف به روش وسترن بلات

نوع بیماری	تعداد نمونه	۲۸ KDa	۳۳ KDa	۳۸ KDa	۵۹ KDa	۸۱ KDa	۹۱ KDa	۱۰۴ KDa	۱۱۲ KDa
هیداتیدوزیس	۱۰۰	۲۵	۳۵	۸۶	۸۹	۶۵	۶۳	۴۵	۴۲
آلوئولاراکینوکوکوس	۷	–	–	–	۴	۳	–	–	–
سیستی سرکوزیس	۶	–	–	–	۴	۱	۱	۱	–
سل	۶	–	–	–	۴	–	–	۱	۱
ژیاردیا	۵	–	–	–	–	–	–	–	–
سرطان ریه	۵	۲	۱	۲	۳	۲	۱	۱	–
آبسه ریوی	۵	–	۱	۱	۱	–	–	۱	–
پنومونی	۴	–	–	–	۱	۱	۱	۱	–
آبسه کبدی	۳	–	–	–	–	–	–	–	–
همانژیوم کبدی	۳	–	۲	–	۱	۲	۲	–	۲
کوله سیستیت	۳	–	–	۱	–	–	–	–	۱
سیروز کبد	۲	–	–	–	–	۱	۱	–	–
سرطان کبد	۲	–	–	–	–	–	–	–	–
سرطان استخوان	۱	–	–	–	–	–	–	–	–
آمفیزم ریوی	۱	–	–	–	–	–	–	–	–

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نتیجه ایمنویلات آنتی ژن پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس با نمونه‌های سرم انسانی مختلف+CO کنترل مثبت، -CO کنترل منفی، CE کیست‌هیداتید، AE آلوئولار اکینوکوکوزیس، Cys سیستی‌سرکوزیس، LC سیروزکبد، PC سرطان ریه، HE همانژیوم کبد، TB سل، PA آبسه ریوی، Pn پنومونی، C کوله سیستیت.

بحث

علیرغم پیشرفتهای بدست آمده در تشخیص سرولوژیکی کیست هیداتید هنوز هم روش استانداردی جهت تشخیص قطعی این بیماری در دسترس نبوده و برخی مطالعات حاکی از کاربرد آنتی ژن پروتواسکولکس در تشخیص این بیماری می باشد.(۲،۱۶).

در مطالعه حاضر عصاره پروتواسکولکس کیست هیداتید کبدی گوسفند به عنوان آنتی‌ژن در اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضدپروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس استفاده شده و در الایزا حساسیتی معادل ۸۶٪ و ویژگی ۷۵/۵٪ بدست آمده است. این نتیجه با یافته‌های دیگر تحقیقات با حساسیت ۹۰/۵٪ و ویژگی ۷۵/۵٪ (۲) و حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۵۸/۳٪ (۱۶) تقریباً مشابه است. هرچند مطالعات زیادی در زمینه کاربرد آنتی ژن صورت نگرفته است اما نتایج حاصله نشان دهنده حساسیت مناسب پروتواسکولکس در تشخیص کیست هیداتید می باشد. ویژگی کمتر آنتی‌ژن پروتواسکولکس در تحقیق رفیعی و کریج احتمالاً به خاطر واکنش متقاطع آنتی‌ژن با نمونه‌های سرم تریپانوزومیازیس افریقائی به طور ۱۰۰٪ می‌باشد که برای اولین بار گزارش گردید و در دیگر مطالعات مورد بررسی قرار نگرفته بود. نتایج متفاوت در مورد ویژگی آنتی ژن می تواند مربوط به بیماری‌های اندمیک منطقه همانند آلوئولار اکینوکوکوزیس و سیتی‌سرکوزیس منطقه باشد که به خاطر واکنش متقاطع باعث کاهش ویژگی می‌شوند.

در این مطالعه در روش الایزا واکنش متقاطع آنتی‌ژن پروتواسکولکس با نمونه‌های آلوئولار اکینوکوکوزیس، سیستی‌سرکوزیس پنومونی، سیروز کبد، آبسه کبد، آبسه ریوی و همانژیوم کبد مشاهده شد. ولی با سل، سرطان ریه، سرطان کبد، ژیاردیا، کوله‌سیستیت، آمفیزم و سرطان استخوان واکنش نشان نداد. واکنش متقاطع آنتی‌ژن پروتواسکلولکس در

www.SID.ir

Archive of SID

روش الایزا با سیستی سرکوزیس، لیشمانیازیس و توکسوپلاسموزیس(۱۶)و آلونولار اکینوکوکوزیس، سیستی‌سرکوزیس و تریپانوزومیازیس آفریقائی(۲) مشاهده شده است. در این مطالعه ویژگی الایزا بدون در نظر گرفتن بیماران مبتلا به آلوئولاراکینوکوکوزیس و سیستی سرکوزیس به ۸۰٪ افزایش می یابد لذا با توجه به عدم شیوع این بیماریها در ایران بنظر می رسد واکنش متقاطع در این زمینه حائز اهمیت نبوده و ویژگی تست نیز افزایش خواهد یافت.

در آزمایش ایمنوبلات بعد از SDS -PAGE تحت شرایط احیاء، مشخص شد که سرم افراد مبتلا به کیست هیداتید با باندهای آنتی‌ژن پروتواسکولکس با وزن‌های مولکولی ۲۸،۱۴،۱۰، ۳۳، ۳۸، ۵۹، ۸۱، ۹۱، ۱۰۴، ۱۱۲ کیلو دالتون واکنش نشان می‌دهد. این یافته‌ها با کمی اختلاف همانند باندهای ۷۹،۵۹،۳۸،۳۱،۲۹،۱۴،۱۰ کیلو دالتون(۲) و باندهای ۱۴- ۱۲، ۲۰، ۳۴، ۳۷، ۳۹، ۴۲، و ۱۱۰ کیلو دالتون(۱۶) و باندهای ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۴۵، ۶۷، و ۷۶ کیلو دالتون (۲۴) می‌باشند.

در این مطالعه ۵ نمونه (۳نمونه ریوی و ۲ نمونه کبدی) از نمونه‌های سرم افراد مبتلا به کیست هیداتید به هر دو روش الایزا و ایمنوبلات منفی شدند. در مطالعه‌ای ۶/۷٪ از ۹۰ بیمار مورد مطالعه با چهار روش اگلوتیناسیون لاتکس، فیکساسیون کمپلمان، هماگلوتیناسیون پاسیو و تست پوستی منفی بودند که همگی مبتلا به کیست ریوی بودند و در مجموع ۹/ ۳۸٪ از بیماران حداقل با یکی از روش‌ها منفی بودند(۲۵). در یک مطالعه دیگر دو نفر از ۲۱ بیماری که مبتلا به کیست ریوی بودند به روش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم، ایمنوالکتروفورزیس تیتر آنتی‌بادی آن‌ها منفی بود(۱۵).در تحقیقی دیگر بر روی ۳۰ بیمار که مبتلا به کیست هیداتید بودند تعدادی از آن‌ها به سه روش بکار گرفته شده الایزا منفی بودند(۳). در روش ایمنوالکتروفورزیس با استفاده از آنتی ژن خام و خالص شده مایع کیست هیداتید ۱۳/۳٪ از ۷۵ بیمار مورد مطالعه مبتلا به کیست هیداتید به هر دو آنتی‌ژن جواب منفی دادند(۲۶).

بنظر می‌رسد کیست‌های ریوی با مایع شفاف و روشن، اندازه کوچک، احاطه شده در لایه فیبروزی با دیواره سالم و دست نخورده، کیست‌های دچار مرگ و کلسیفیه شده و دژنره، با دوره رشد کوتاه، غیر فعال و غیربارور پاسخ ایمنی ضعیفی ایجاد می‌کنند. همچنین موقعیت کیست، تعداد کیست ، حالت کیست؛عضومبتلا وایمنی فرد مبتلا در میزان پاسخ‌دهی ایمنی و تشخیص سرولوژی کیست بسیار مؤثر است، بطوری‌که کیست‌های کبدی و چندگانه بهتر از کیست‌های ریوی و دیگراعضاء پاسخ ایمنی راتحریک می کنند و این دلایل می تواند ازموارد عدم پاسخ ایمنی به کیست و تشخیص منفی آن باشد (۳،۱۲،۱۵،۱۷).

در مواردی نیز تیتر آنتی‌بادی به روش الایزا مثبت و در ایمنوبلات منفی است و عکس این حالت هم اتفاق می‌افتد(۲۷). در این مطالعه نیز مواردی به روش الایزا مثبت بودند و در ایمنوبلات منفی و یا بر عکس در ایمنوبلات مثبت و در الایزا منفی بودند.

در آزمایش ایمنوبلات بعد از SDS-PAGE، باند ۵۹ کیلودالتون حساس‌ترین و ۳۸ کیلودالتون اختصاصی‌ترین باند آنتی‌ژنیک بود و این دوباند تقریباً با ۹۳٪ نمونه‌های سرم افراد مبتلا به کیست هیداتید واکنش نشان دادند. نمونه‌های آلوئولار اکینوکوکوزیس، سیستی‌سرکوزیس، سل، سرطان ریه، آبسه‌ریه، پنومونی، همانژیوم کبد و سیروز کبد نیز واکنش نشان دادند. در یک مطالعه مشابه باند ۳۸ کیلودالتون بهترین نتیجه را در تشخیص کیست هیداتید نشان داده و همراه با باند ۵۹ کیلودالتون تقریباً با همه نمونه‌های سرمی آزمایش شده مبتلا به کیست

www.SID.ir

Archive of SID

هیداتید واکنش نشان داده است. آنتی‌ژنهای ذکر شده احتمالاً دو بخش آنتی‌ژنیک لیپوپروتئینی ۵ می‌باشند و باند ۳۸ کیلودالتون مشابه باند ۳۹ کیلودالتون جدا شده از مایع کیست می‌باشد(۲). باندهای ۲۰ و ۱٤ کیلودالتون با حساسیت کم و ویژگی بالا احتمالاً مشابه باندهای ۲۰ و ۱٤ و ۱۲ کیلودالتون جدا شده در دیگر تحقیقات بوده که احتمالاً مشتقی از آنتی‌ژن B3 می باشند(۱٦). باند ۲۸ کیلودالتون جدا شده در این تحقیق ویژگی بسیار بالایی نشان داد که ممکن است مشابه باندهای ۲۹ و ۳۰ کیلودالتون جدا شده در دیگر مطالعات باشد(۲،۲٤). باندهای ۳۳ و ٤۳ کیلودالتون مشابه باندهای ۳٤ و٤۲ کیلودالتون (۱٦) و ۳۱ و ٤۲ کیلودالتون (۲) بوده‌اند. باند ۸۱ کیلودالتون اگر چه حساسیت خوبی (٦۵٪) را نشان داد ولی ویژگی آن بسیار کم بود، این باند مشابه باند ۷۹ کیلودالتون(۲) و باند ۷٦ کیلودالتون (۲٤) گزارش شده توسط سایر محققین باشد. باند ۱۱۲ کیلودالتون احتمالاً مشابه باند ۱۱۰ کیلودالتون(۱٦) می‌باشد. باند ٤٦ کیلودالتون حساسیت و ویژگی بسیار بالائی در تشخیص کیست هیداتید نشان داده و با نمونه‌های کنترل منفی واکنش نشان نداده است(۱٦). باند ٤٦ کیلودالتون جدا شده در این مطالعه با تمام نمونه‌های کنترل منفی و هترولوگ و هیداتیدوز واکنش نشان داد و به نظر می‌رسد فاقد ارزش در تشخیص کیست هیداتید باشد. باندهای ۹۱ و ۱۰٤ کیلودالتون در این مطالعه جدا شدند و حساسیت خوبی نیز از خود نشان دادند، ولی در مطالعات سایر محققین از این دو باند در تشخیص کیست هیداتید نام برده نشده است. این اختلاف ممکن است ناشی از حساسیت روش، تفاوت پاسخهای ایمنولوژیکی افراد مبتلا و یا سایر فاکتورهایی باشد که در بروز واکنشهای ایمنولوژیکی در کیست هیداتید مؤثر می باشند.

تقریباً کلیه باندهای آنتی‌ژنی جدا شده از پروتواسکولکس در این مطالعه حداقل با یکی از نمونه‌های سرم سرطان ریه واکنش دادند ولی هیچ‌کدام از باندهای آنتی‌ژنی با نمونه‌های سرم افراد مبتلا به ژیاردیا، سرطان کبد، آبسه کبد، آمفیزم و سرطان استخوان واکنش نشان ندادند و فقط باندهای ۸۱ و ۵۹ کیلودالتون با نمونه‌های آلوئولاراکینوکوکوزیس واکنش نشان دادند. با این حال در ایمنوبلات واکنش متقاطع آنتی‌ژن پروتواسکولکس با نمونه‌های سرم افراد مبتلا به الوئولار اکینوکوکوزیس، سیستی سرکوزیس ، سل، سرطان ریه، آبسه‌ریوی، پنومونی، همانژیوم و کوله‌سیستیت مشاهده شد. تشخیص کیست هیداتید به خاطر میزان بالای پاسخ‌های مثبت کاذب محدودیت‌های جدی دارد، این مسأله ممکن است تا حدودی به خاطر غیر اختصاصی بودن آنتی‌ژن‌های انگل، آنتی‌ژن‌های مشترک بین انگل‌ها و پایداری آنتی‌ژن انگل‌ها در سرم بیمار تا سال‌ها بعد از بهبودی باشد(۱۵،۲۸،۲۹).

با توجه به نتایج حاصله از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که اهمیت بسیاری از بیماری‌های غیر انگلی همانند سرطان ریه در ایجاد واکنش متقاطع و پاسخ مثبت کاذب بسیار زیاد است و باید مورد توجه باشند، در ضمن آنتی‌ژن پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس یکی از منابع آنتی‌ژنیک مناسب جهت تشخیص سرولوژیکی کیست هیداتید می‌باشد و باند ۳۸ کیلودالتون آنتی‌ژن اختصاصی‌ترین بخش آن است. بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که پروتواسکولکس می‌تواند به عنوان یکی از منابع آنتی‌ژنی قابل تهیه در آزمایش الایزا و ایمنوبلات در تشخیص بیماران مبتلا به کیست هیداتید بکار رود. هم‌چنین با توجه به عدم شیوع آلوئولار اکینوکوکوزیس و سیستی‌سرکوزیس در غالب مناطق ایران، می‌توان با اطمینان بیشتری به نتایج

www.SID.ir

کتابخانه منطقه‌ای علوم و تکنولوژی شیراز
Archive of SID

حاصل از این تحقیق توجه کرد و نتایج حاصله ارزش باند ۳۸ کیلودالتون را بعنوان یک باند اختصاصی در تشخیص و تایید کیست هیداتید مورد تایید قرار داده است. وجود واکنش متقاطع آنتی‌ژن پروتواسکولکس و تایید نهائی کیست باید مورد توجه قرار گیرد و انجام مطالعات بیشتربه منظور افزایش حساسیت و ویژگی آنتی ژنهای اختصاصی پروتواسکولکس بویژه باند آنتی ژنیک ۳۸ کیلودالتونی می تواند مورد توجه جدی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

تحقیق فوق در قالب طرح تحقیقاتی مصوب با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به انجام رسید. از همه همکاران بویژه پرسنل و دانشجویان رزیدنت بخش جراحی بیمارستانهای امام و گلستان دانشگاه جندی‌شاپور صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1-Huroo MU, Wani NA, Avid G, Khan BA, Yattoo GN, Shah AH, et al. (1997). Percutaneouse drainag compared with surgery for hepatic hydatid cyst. N Engl J Med. 337(13): 881-8

2-Rafiei A, Criag PS.(2002).The immunodiagnostic potential of protoscolex antigen in human cystic echnococcosis and possible influence parasite strain. Annal of Tropcal Medicine and parasitology, 96(4): 383-389.

3-Paul M, Stefaniak J.(2001). Comparison of the Dot Immunobinding Assay and two Enzyme Linked Immunosorbent Assay kits for diagnosis of liver cystic echinococcosis.Hepathology Rsearch, 21: 14-26.

4-Ravinder PT, Parija SC, and Subarao, KSVK.(2000). Urinary hydatid antigen detection by coagglutination a cost-effective and rapid test for diagnosis of cystic echinococcosis in a rural or field setting. JCM. Agust; 38 (8): 2972-2974.

5-Amman R, and Ekert J.(1995). Clinical diagnosis and treatment of Echinococcosis in humans in:Thompson R.C.A. and Lymbery A.J. Echinococcus and Hydatid disease.CAB International , wallingford, UK: 411-463.

6-Ito A, Liang MA, Schantz PM, Gotsstien B, Yue-Han L, JunJie C, et al. (1999). Diffrential serodiagnosis for cystic alveolar echinococcosis using fraction of Echinococcus granulosus cyst fluid (AgB) and Echinococcus multilocularis Protoscolex (EM18). Am.J.Trop. Med.Hyge. 60(2):188-192.

7-Frider B, Moguilensky J, Salvitti JC, Odriozola M, Cantoni G, Larrieu E. (2001). Epidmiological surveillance of human hydatidosis by means of ultrasonography:Its contribution to the evaluation of control programs. Acta.Tropica, 79: 219-223.

8-Frider B, Larrieu E,and Odriozola M.(1999). long term outcome of symptomatic liver hydatidosis. Journal of Hepathology, 30: 228-231.

9-Grimm F, Maly FE, Lu J, Llano, R.(1998). Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of echinociccosis by a standard Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clinical and Diagnostic laboratory Immuonology, sept; 5(50): 613-616.

10-William SK, and Miguela V.Perez-Esandi.(1974). Chemothrapy of experimental Echinococcus granulosus infection.Am.J. Trop.Med. Hyg. Jun; 24(1): 90-95.

11-Rigano R, Profomo E, Bruschi F, Carulli G, Azzard A, Ioppolo S, et al. (2001). Modulation of humn response by Echinococcus granulosus antigen B and its possible role in evading host defenses. Infection and Immunity, Jan; 68(1): 288-296.

12-Todorov T, Raicev I, Tenev S, Kostorkova M, Dakov I, Dimitriv A. (1979). Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis.Bulletin of the World Health Organisation, 57(5): 741-750.

www.SID.ir

Archive of SID

13-Gadea I, Ayała G, Diago MT, Cunat A,Garcia D.L.M. J. (2000). Immunological diagnosis of human cyst relapse : utility of the Enzyme-linked mmunoelectrotransfer Blot and Discriminant analysis.Clinical and Diagnostic Laboratory immunology, July; 7(4): 549-552.

14-Iacona A, Pini C, Vicari G.(1980). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the serodiagnosis of hydatid disease. Am.J.Trop.Med. Hyg. 29(1): 95-102

15-Schantez PM, Shanks D, and Wilson M. (1980). Serology cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. Am.J. Trop.Med.Hyg. 29(4): 609-612

16-Sbihi Y, Janssen D, and Osuna A.(1996). Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods.Diag. Microbiol.Infect.Dis. 24: 205-211.

17-Gadea I, Ayala J, Diago MT, Gunat A, Garcia delomas J.(1999) . Immunological diagnosis of human cystic echinococcosis: utility of discriminant analysis applied totheEnzyme inked Immunoelectrotransfer Blot.Clinical and diagnostic laboratory Immunology, July; 6 (4): 504-508.

18-Ortona R, Rigano R, Margguti P, Notargiacomo S, Ioppolo S, Vacari S et al. (2000). Native and recombinant antigens in the diagnosis of human cystic echinococcosis. Parasite. Immunol. Nov; 22(11): 553-9.

19-Criag PS, Rogan MT, and Allan JC.(1995). Hydatidosis and larval cysticercosis cestods in: Gillespie, S.H. and hawkey, P.M. Medical parasitology, Oxford University, Newyork: 209-237.

20-Madissons E, Slemenda SB, schantz PM, Fried JA, Wilson M, And Tsang VCW.(1989). Specificdiagnostic antigen of Echinococcus granulosus with an appearent molecular weight of 8KDa. Am.j.trop. Med.Hyg. 40(4): 377-383.

21-Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakaya K, Nakao M, Lightowlers MW, and Ito A.(2002).Usefulness of hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus develope in Mice with secondary infection for diagnosis of cystic echinococcosis in humans.Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, May; 9(3): 573-576.

22-Criag PS, Zeyhle E, Romig T.(1986). Hydatid disease : Reaserch and control in Turkana, the role of immunological techniques for the diagnosis of hydatid disease.Transaction of the royal society of tropical medicine and hygien, 80: 183-192.

23-Todorov T, Dakov I, Kosturkova M, Tenev S, Dimitrov A.(1979). Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis. Bulletin of the World Health Organisation, 57(5): 735-740.

24-Varela-Diaz VM, Guisantez JA, Ricardes MI,Yarzabel LA, Coltorti E.(1974). Evaluation of whole and purified hydatid fluid antigens in the diagnosis of human hydatidosis by the Immunoelectrophoresis test. Am.J. Trop.Med. Hyg. 24(2): 298-303

25-Poretti D,Fellesens E,Grim F,Pfister M,Teuscher F,Zuercher C etal.(1999).Differential munodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am.J.Trop. Med.Hyg. 6(2): 193-198.

26-Kanwar JR, Kaushik SP, Sawheny IMS, Kamboj MS, Mehta SK, and Vinayak VK. (1992).Specific antibody in serum of patients with hydatidosis recognised by Immunoblotting. J.Med.Microbiol.36:46-51.

27-Ioppolo S, Notargiacomo S, Profumo E, Franchi C, Ortona E, Rigano R, et al. (1996). Immunological responses to antigen B from Echinococcus granulosus cyst fluid in hydatid patients. Parasite Immuonology,18:571-578

www.SID.ir