



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

علی جلودار^{۱*}، محمود صافی^۲، عبدالله رفیعی^{۳*}، ملوک بیروم وند^{۱*}، محمود راهدار^{۱*}

- 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

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
مقدمه اکینوкокوزیس بیماری انگلی مشترک بین انسان و حیوانات است که بر اثر ابتلاء به مرحله لاروی انگل اکینوкокوس 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 IgG1, IgG و IgG4 مهمترین آنتی بادی‌ها در تشخیص سرولوژیک اکینوкокوزیس 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 اکینوкокوزیس، اکینوкокوس گرانولوزوس، آنتی ژن، تشخیص	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: rafieabdollah@yahoo.com



مقدمه

اکینوкокوس گرانولوزوس سستودی است که در روده سگ و سگ سانان به عنوان میزبان نهایی انگل زندگی می کند. مرحله لاروی این سستود بصورت کیست در بدن میزبان های واسط متعددی از جمله انسان تشکیل می شود که به آن هیداتیدوزیس یا کیست هیداتیک می گویند (۱). کیست هیداتیک، در اعضاء مختلف بدن میزبان واسط ایجاد می گردد. علائم 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 روش های مختلفی جهت تشخیص کیست هیداتیک استفاده می شود که همگی مکمل یکدیگر هستند. این روش ها شامل، تکنیک های تصویربرداری مثل رادیوگرافی، سونوگرافی، سی تی اسکن و یا تکنیک های سرولوژیک می باشند. تکنیک های سرولوژیک، جهت تشخیص آنتی بادی های میزبان که علیه آنتی ژن های کیست هیداتیک ساخته می شوند و یا جستجوی آنتی ژن های مترشحه از متاسستود اکینوкокوس گرانولوزوس طراحی می شوند (۳).

بالا ترین میزان ترشح آنتی بادی علیه آنتی ژن های کیست هیداتیک مربوط به IgG و بخصوص IgG4 می باشد (۴). آنتی بادی های IgM و IgE آنتی بادی های هستند که میزان آنها بعد از عمل جراحی کاهش می یابد و در حدود ۴۸ ماه بعد از عمل جراحی این دو آنتی بادی منفی می گردند و تنها آنتی بادی IgG کل است که ممکن است حتی تا پنج سال باقی بماند (۵).

از مهمترین آنتی ژن های موجود در کیست هیداتیک آنتی ژن B و آنتی ژن Arc 5 می باشند که در تشخیص

کیست هیداتیک نیز مورد استفاده قرار می گیرند (۶). یکی از مشکلات در این بیماری عود مجدد آن بعد از عمل جراحی می باشد. زیرا ممکن است در حین عمل جراحی قسمت های کوچکی از لایه زایا و یا پروتواسکولکس های موجود در کیست هیداتیک در بدن باقی مانده و ایجاد کیست های ثانویه نماید. بطوریکه در برخی منابع میزان عود را بالا و حدود ۴/۶-۲۲ درصد گزارش نموده اند (۷-۹).

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

مواد و روش ها

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

نمونه های سرمی هترولوگ شامل نمونه سرم بیماران مبتلا به سایر بیماری های انگلی و یا بیماری های 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، ۲۰ نمونه سرطان ریه، ۲ نمونه سرطان کبد، ۱ نمونه مبتلا به استرانژیلولیدس استر کورالیس، ۲ نمونه مبتلا به ژیا ردیا، ۱ نمونه مولتیپل مایلوما، ۲ نمونه



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

کبد های گوسفندی آلوده به کیست هیداتیک از کشتارگاه جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس کبد های آلوده را شسته و محتویات داخل کیست ها با سرنگ تخلیه و در یک ظرف تمیز جمع آوری گردید. کیست ها و مایع جمع آوری 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 پروتواسکولکس ها سه مرتبه با PBS شستشو داده شد. پروتواسکولکس های 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 نمونه ها در یخ قرار داشتند. سونیکیت تا زمانی انجام گردید که کلیه پروتواسکولکس ها کاملاً 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).

اندازه گیری میزان پروتئین آنتی ژن

بعد از فرآیند جداسازی و تهیه آنتی ژن، مقدار آنتی ژن به روش بیوره اندازه گیری 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 ژل های 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 نمونه ها در ژل متراکم با ولتاژ ۱۰۰ ولت و در ژل جدا کننده با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند و قبل از رسیدن رنگ نشانگر (بروموفنل بلو و مارکر استاندارد) به انتهای ژل (حدود ۵/۰ سانتی متر به انتهای ژل) جریان برق قطع گردید (۱۱).

انجام ایمنوبلات

ایمنوبلات شامل سه مرحله می باشد.

الف : الکتروفورز آنتی ژن در ژل پلی آکریل آمید

ب : انتقال باندهای آنتی ژنی از ژل به کاغذ نیتروسلولز

ج : واکنش دادن نمونه های سرمی با آنتی ژن های 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 صافی ها 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. اسفنج ها را نیز در آب مقطر



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 نیتروسولولز، 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 الکتروود منفی و کاغذ نیتروسولولز در طرف الکتروود مثبت باشد، قرار دادیم. جریان ثابت ۳۰۰ میلی آمپر به مدت ۲ ساعت به خوبی صورت گرفت.

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

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

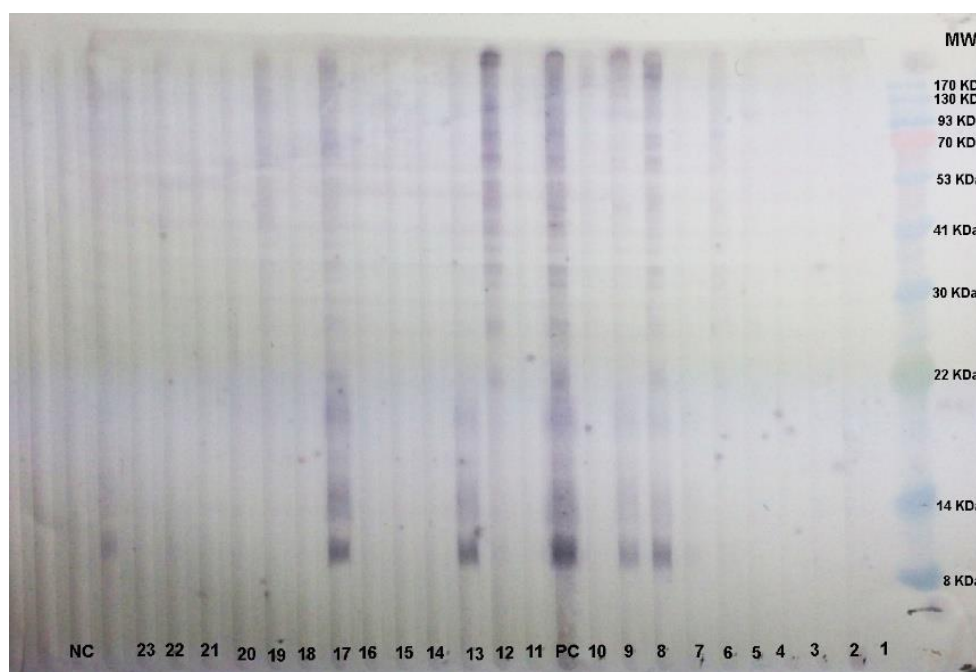
کاغذ نیتروسولولز با PBS حاوی ۰/۰۱ درصد تواین ۲۰ سه بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شسته شد.

کاغذ نیتروسولولز 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 شیار دستگاه چند حفره‌ای اضافه نموده و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق گذاشته شد. کاغذ نیتروسولولز 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 در آن 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 برمکلروایندولیل 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 نیتروسولولز 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 (تصویر ۱). 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.



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

تصویر ۱- نمونه وسترن بلات انجام شده

در این مطالعه مشاهده گردید تمامی بیماران مبتلا به کیست کبدی با یکی از آنتی ژن های پروتواسکولکس 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



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

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

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

بیماری در بیمارانی که جراحی نموده اند تشخیص آنتی ژن ها در خون بیماران و یا تشخیص آنتی بادی ها بر ضد اجزاء مختلف کیست هیداتیک می باشد (۱۴).

در مطالعه حاضر با بررسی های انجام شده بر روی عصاره پروتواسکولکس های 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 می باشد. 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 می تواند مربوط به جمعیت مورد مطالعه باشد که در مطالعه رفیعی بیماران مبتلا به کیست هیداتیک و تحت عمل یکجا مورد بررسی قرار گرفته اند در حالیکه در این

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 می باشد.

بحث

علی رغم پیشرفت های فراوانی که در زمینه تشخیص بیماری ها 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 می آید. مشکلات موجود در تشخیص دارای دلایل متعدد از جمله اندازه، محل قرار گرفتن، بارور بودن یا غیر بارور بودن، سن و تعداد کیست می باشد که همگی آنها می تواند باعث خطا در تشخیص گردد (۱۳). جهت رفع این مشکل مطالعات گسترده ای 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 روش های تشخیص و پیگیری



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^۱ 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 مطالعه 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 ژن های تهیه شده از پروتواسکولکس و مایع کیست ممکن است با برخی بیماری های 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 نمودند که سرم بیماران مبتلا به /کینو کوکوس مولتی لوکولاریس، سیستمی سرکوزیس و تریپانوزومیازیس افریقایی با آنتی ژن های

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 ژن های پروتواسکولکس مشاهده کرد که دارای اختصاصیت ۶۳ درصدی می‌باشند (۲۰). در مطالعات ذکر شده نمونه های سرمی مورد استفاده جهت تعیین اختصاصیت از نمونه های بیماران مبتلا به آلوتلار هیداتیدوزیس و سیستمی سرکوزیس نیز استفاده شده است. در مطالعه حاضر به دلیل عدم دسترسی به نمونه های بیماران آلوتلار هیداتیدوزیس و سیستمی سرکوزیس ارزیابی واکنش متقاطع با بیماری های 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 ژن های 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 ژن های پروتواسکولکس در تشخیص کیست هیداتیک می‌باشد. در مطالعه حاضر حساسیت آنتی بادی زیرکلاس IgG1 در تشخیص بیماران هیداتیدوزیس ۶۹ درصد می‌باشد.

^۱Doiz



در مطالعه تنگوریا^۱ و همکاران با کار بر روی مایع کیست هیداتیک مشاهده نمودند که زیر کلاس IgG1 دارای حساسیتی حدود ۸۲ درصد می باشد (۲۳). در مطالعه ون^۲ و همکاران بر روی مایع کیست هیداتیک مشاهده کردند که در بیماران هیداتیدوزیس حدود ۵۸ درصد با IgG1 واکنش نشان می دهند و مشخص نمودند که IgG1 در تشخیص آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتون و IgG4 در تشخیص آنتی ژن B عملکرد بهتری از خود نشان می دهند (۲۴). در مطالعه دیگری که توسط شمبش^۳ 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 می تواند 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 می تواند به دلیل تشابه اپی تپ های 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 زیر کلاس IgG4 حساسیت ۸۶ درصد قبل از عمل و ۲۸ درصد بعد از عمل را گزارش نمودند (۲۳). میزان IgG4 بعد از عمل جراحی تقریباً مشابه بوده که می تواند 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 احتمالاً به

دلیل نوع آنتی ژن بکار رفته و روش بکار برده شده می باشد. 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 می دهند (۲۴). در مطالعه شمبش و همکاران حساسیت IgG4 در تشخیص کیست هیداتیک ۷۱ درصد تعیین گردید (۲۵). اختلافات موجود می تواند علاوه بر موارد گفته شده در مطالعه قبلی ناشی از اختلاف محل قرار گرفتن کیست در بیماران هر مطالعه باشد که خود سبب ایجاد پاسخ های ایمنی متفاوت می گردد (۲۶، ۲۷) و در نتیجه حساسیت را نیز تحت تاثیر خود قرار می دهد. از طرف دیگر استرین های مختلف انگل در مناطق مختلف با یکدیگر متفاوت است که سبب می گردد آنتی ژن های مناطق مختلف با یکدیگر تفاوت داشته و در نتیجه حساسیت را در مطالعات مختلف تحت تاثیر قرار دهد (۲۱، ۲۷-۲۹).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد پروتواسکولکس می تواند 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 کلاس های 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 می توان از آن جهت پیگیری بعد از عمل استفاده

^۲Wen

^۳Shambesh

^۱Tenguria



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.

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

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, Dezfulejad 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.

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 granulosus* 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 protoscolex 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 protoscolexes of *Echinococcus granulosus* of human origin. *Parasite immunol* 1993;15(8):441-7.



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

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.