ارزیابی آنتی‌ژن‌های مایع هیداتیک و دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و لایه ژرمینال در تشخیص هیداتیدوز

محمدحسین راضی جلالی[۱*]، علیرضا البرزی[۲]، مسعود قربان‌پور[۳]، عاطفه آقابیگی[۴]

۱- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
٤- دانش‌آموخته گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: mh.jalali@scu.ac.ir

(دریافت مقاله: //پذیرش نهایی: ۹٦/۱۱/۱٦)

چکیده

اکینوکوکوس گرانولوزوس عامل بیماری مشترک هیداتیدوز در انسان و برخی از حیوانات می‌باشد. با توجه به نقش و اهمیت نشخوارکنندگان از جمله گوسفند در بقاء و انتقال انگل به میزبانان اصلی و انسان، این مطالعه به منظور ارزیابی اولیه مواد دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و لایه ژرمینال به منظور انجام آزمایش‌های سرولوژیک انجام شد. در این مطالعه، واکنش مایع کیست و مواد دفعی-ترشحی لایه ژرمینال و پروتواسکولکس در مجاورت با سرم تهیه‌شده از گوسفند و موش آزمایشگاهی آلوده به کیست هیداتیک ارزیابی شد. خون مورد نیاز برای تهیه سرم آلوده و غیرآلوده از ۱۰۰ رأس گوسفند در حین کشتار جمع‌آوری و آزمون کانترایمنوالکتروفورز روی نمونه‌های مذکور صورت گرفت. با استفاده از روش کانترایمنوالکتروفورز در مجاورت با آنتی‌ژن مایع کیست ۸۰ درصد، آنتی‌ژن دفعی-ترشحی پروتواسکولکس ۷۲ درصد و آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لایه ژرمینال ۹۲ درصد از سرم‌های گوسفندان آلوده به کیست هیداتیک واکنش مثبت نشان دادند و در ۵ نمونه سرم موش آزمایشگاهی آلوده به کیست هیداتیک تجربی به روش کانترایمنوالکتروفورز با استفاده از مایع کیست هیداتیک ۸۰ درصد، آنتی‌ژن دفعی-ترشحی پروتواسکولکس ۸۰ درصد و آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لایه ژرمینال ۱۰۰ درصد از سرم‌ها واکنش مثبت نشان دادند. طبق نتایج به‌دست آمده، آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لایه ژرمینال با داشتن درصد حساسیت بالاتر در تشخیص نمونه‌های آلوده، قابل ارزیابی در مطالعات تکمیلی در این زمینه می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: کیست هیداتیک، سرولوژی، آنتی‌ژن دفعی-ترشحی، آنتی‌ژن مایع هیداتیک.

مقدمه

اکینوکوکوس گرانولوزوس یکی از انگل‌های مهم روده باریک سگ بوده که مرحله نوزادی آن تحت عنوان کیست هیداتیک به عنوان یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و علف‌خواران می‌باشد که نه تنها موجب ایجاد بیماری شدید و مرگ‌ومیر احتمالی در انسان می‌شود، بلکه با تحمیل هزینه‌های درمانی و از کارافتادگی بیماران و همچنین کاهش فراورده‌های دامی، موجب خسارات اقتصادی نیز می‌گردد. سگ، گربه، روباه و سایر گوشت‌خواران میزبان‌های نهایی و نشخوارکنندگان، انسان و سایر پستانداران به عنوان میزبان واسط در سیر تکاملی این انگل مطرح هستند (Budk *et al*., 2006).

آلودگی به کیست هیداتیک در ایران از تمام استان‌ها گزارش شده است. بالاترین میزان آلودگی در انسان (٤/٤٥ در صدهزار) مربوط به استان خراسان و کمترین میزان آن (٠/١ در صدهزار) مربوط به استان هرمزگان بود و میانگین شدت آلودگی برای کل کشور ١/١٢ در صدهزار گزارش شده است. یکی از مسائل عمده بیماری هیداتیدوز تشخیص کیست هیداتیک در انسان و حیوانات است. چنانچه مایع کیست هیداتیک خارج شده و یا آن‌که کیست پاره شود، به سبب بروز واکنش‌های آنافیلاکتیک توأم با ائوزینوفیلی می‌توان تا حدی به تشخیص بیماری نزدیک شد. بنابراین ضروری است که تاریخچه بیماری، احتمال ارتباط بیمار با سگ، اطلاعات همه‌گیرشناسی، مشاهدات بالینی، وضعیت پاتولوژیکی کیست، تصویربرداری (رادیوگرافی، توموگرافی، سی‌تی‌اسکن و ام.آر.آی) و تست‌های سرولوژیک (تست کازونی، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و....) را جمعاً مورد ارزیابی قرار داد. کیست‌های هیداتیک ریوی به وسیله رادیوگرافی تشخیص داده شده، لیکن معمولاً در سایر اعضا تنها کیست‌های آهکی شده قابل‌شناسایی هستند (Anderson, 1997). خارج کردن مایع کیست هیداتیک به دلیل احتمال عفونت ثانوی و شوک آنافیلاکسی توصیه نمی‌شود. پاسخ ایمنی به موضع ابتلا، شدت آلودگی، سالم بودن کیست و عمر کیست بستگی دارد. حساسیت آزمایش‌ها در مورد کیست‌های سالم کمتر است. متاسستودهای سالم سطح کمی از تحریک آنتی‌ژنی را موجب می‌گردند. هر گونه شکاف یا پارگی کیست افزایش سریع پادتن‌ها را در سرم میزبان به دنبال دارد (Razi Jalali *et al*., 2007). روش‌های سرولوژیک از گذشته در این زمینه مورد توجه بوده‌اند. آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در این زمینه عمدتاً بر پایه مایع کیست می‌باشند. یکی از معایب استفاده از مایع کیست، احتمال بروز واکنش‌های متقاطع در این تست‌ها بوده که علت اصلی آن عدم خلوص مایع کیست می‌باشد. استفاده از آنتی‌ژن‌های مبتنی بر انگل خالص تا حدی می‌توانند این نقیصه را برطرف نمایند. مواد دفعی-ترشحی پیکره انگل در صورت خلوص بالا می‌توانند به عنوان آنتی‌ژن مورد ارزیابی قرار گیرند (Yakhchali and Morshedi, 2011).

این مطالعه به منظور ارزیابی حساسیت و ویژگی مواد دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و لایه ژرمینال در تشخیص کیست هیداتیک در گوسفند و موش صورت گرفت. در این مطالعه از روش کانترایمنوالکتروفورز به عنوان روشی با ویژگی بالا (Parija, 1997) در تشخیص هیداتیدوز استفاده شد. از آن‌جایی‌که این روش ویژگی بالایی داشته موارد مثبت نشان داده شده در تست

مذکور از قابلیت اعتماد بیشتری نسبت به روش‌های حساس نظیر الایزا برخوردار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

– **نمونه‌برداری:** در این مطالعه نمونه‌های خون ۵۰ رأس گوسفند آلوده به کیست هیداتیک کبدی و ۵۰ رأس گوسفند غیرآلوده پس از معاینه کشتارگاهی از کشتارگاه اهواز جمع‌آوری و به آزمایشگاه بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردیدند. نمونه‌های سرم از خون جدا و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

به ۵ سر موش از طریق صفاقی تعداد ۲۰۰۰ پروتواسکولکس تزریق و پس از ۸ ماه از آن‌ها خون‌گیری به عمل آمده، سرم آن‌ها جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. به منظور ارزیابی واکنش متقاطع با برخی بیماری‌های انگلی دیگر، تعداد ۵ نمونه سرم از گوسفندان آلوده به فاسیولوز و ۵ نمونه سرم از گوسفندان آلوده به دیکروسلیوز نیز تهیه و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

به منظور تهیه آنتی‌ژن‌های مایع کیست، دفعی- ترشحی پروتواسکولکس و لایه ژرمینال، کبد و ریه‌های آلوده به کیست هیداتیک از کشتارگاه اهواز جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردیدند. مایع کیست با استفاده از سرنگ و سوزن در کنار شعله و زیر هود جدا و به لوله‌های استریل منتقل شد. قطره‌ای از محتویات سرنگ روی لام منتقل و وجود پروتواسکولکس با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه به منظور بالا بردن توان آنتی‌ژنی تنها از کیست‌های بارور استفاده شد. برای این منظور لوله‌های حاوی مایع کیست به مدت ۲ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی به لوله استریل دیگر منتقل گردید. مایع کیست‌های مختلف از نظر میزان پروتئین به وسیله روش برادفورد مورد سنجش قرار گرفت و تنها مایعاتی استفاده شدند که میزان پروتئین آن‌ها از ۶۰۰ میکروگرم در دسی‌لیتر بالاتر بود. مایع به کیسه دیالیز منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در برابر آب مقطر دیالیز صورت گرفت. مایع کیست تا رسیدن به یک‌سوم حجم اولیه تغلیظ گردید، سپس مایع به وسیله سرنگ استریل از کیسه خارج و به لوله استریل منتقل گردید. به‌منظور ته‌نشین شدن ناخالصی‌های احتمالی، لوله‌های حاوی مایع به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. به منظور ایزوتونیک کردن مایع کیست هیداتیک از محلول نمک کلرید سدیم ۱۰ درصد استفاده شده، به این نحو که ۲/۳ میلی‌لیتر پادگن با ۰/۲ میلی‌لیتر محلول کلریدسدیم ۱۰ درصد مخلوط گردید. به‌منظور جلوگیری از رشد میکرب‌ها، از محلول ۰/۰۵ درصد آزید سدیم استفاده شد. به این نحو که به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۵ درصد آزید سدیم اضافه شد. آنتی‌ژن تهیه‌شده به میکروتیوب‌های استریل منتقل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. به منظور تهیه آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و لایه ژرمینال تنها از کیست‌های با قابلیت زنده‌مانی بالای ۹۰ درصد استفاده شد، به این صورت که پس از جدا کردن پروتواسکولکس و لایه ژرمینال هر کدام از آن‌ها به

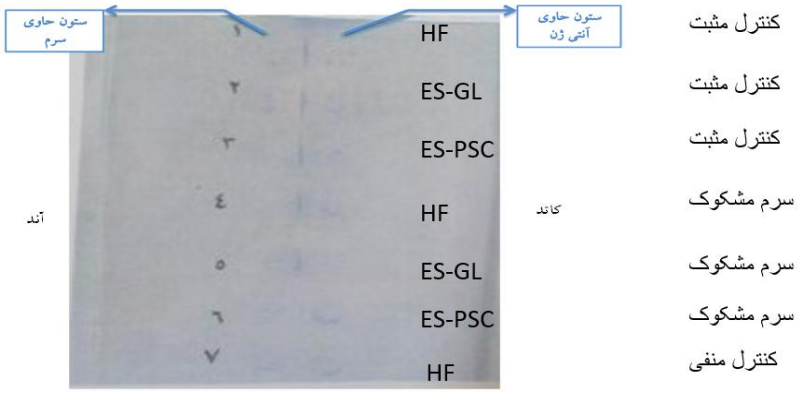
صورت جداگانه در فلاسک‌های کشت حاوی محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) و در مجاور CO_2 به مدت یک هفته نگه‌داری شدند. طی این مدت هر ۱۲ ساعت محیط RPMI جمع‌آوری و تعویض می‌گردید. مایع جمع‌آوری شده پس از تزریق گاز نیتروژن و فیلترکردن، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شد. به منظور تغلیظ ۱۰ برابر محیط کشت حاوی مواد دفعی-ترشحی، مقادیر بالایی از فرآورده‌های دفعی-ترشحی جمع‌آوری شد. هنگام استفاده از مایعات مذکور پروتئین آن‌ها به روش برادفورد اندازه‌گیری می‌شد (Bradford, 1976). طی مدت یک هفته انکوباسیون با استفاده از رنگ ائوزین ۱ درصد، زنده‌مانی پروتواسکولکس‌ها و لایه ژرمینال مورد ارزیابی قرار می‌گرفت (Razi Jalali *et al,* 2007).

- **آزمایش کانترایمنوالکتروفورز:** در این آزمایش بعد از زیرسازی اسلایدهای شیشه‌ای به ابعاد ۸×٦/٥ سانتی‌متر با استفاده از آگاروز ۱ درصد و خشک شدن بعد از ٢٤ ساعت در دمای آزمایشگاه، عمل پوشاندن آن‌ها با آگاروز ۱ درصد صورت گرفت. روی هر اسلاید پوشیده‌شده با آگاروز، ۷ زوج حفره تعبیه گردید و در تمام حفرات یک طرف، هر کدام از آنتی‌ژن‌های مایع هیداتیک، دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و دفعی ترشحی لایه ژرمینال و در طرف مقابل سرم‌های گوسفندان و موش‌های آلوده و غیرآلوده و نیز سرم‌های هترولوگ قرار داده می‌شد. اسلایدهای آماده طوری در داخل تانک الکتروفورز قرار گرفت که سرم‌ها در سمت آندیک و هر یک از آنتی‌ژن‌ها در سمت کاتدیک تانک قرار گیرند. برای برقراری جریان الکتریسیته، دو طرف ژل توسط دو قطعه کاغذ واتمن آغشته به بافر ورونال به محفظه‌های آندی و کاتدی متصل می‌گردید. سپس جریان قطع و اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه داخل ظرف حاوی رنگ کوماسی بلو ۵ درصد قرار می‌گرفت . به منظور رنگ‌بری اسلایدها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول رنگ‌بر قرار داده شده و نهایتاً اسلایدها از نظر خطوط رسوبی مورد بررسی قرار گرفته، نمونه‌های مثبت شده به صورت خطوط رسوبی آبی‌رنگ در بین حفره‌ها مشاهده می‌شد.

وجود خط رسوبی آبی‌رنگ بین حفره حاوی سرم و حفره حاوی آنتی‌ژن بیان‌گر مثبت بودن نمونه و عدم وجود آن بیان‌گر منفی بودن نمونه است.

یافته‌ها

با استفاده از روش برادفورد، پروتئین مایع کیست ۰/۹ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، دفعی-ترشحی لایه ژرمینال ۱/٤ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و دفعی-ترشحی پروتواسکولکس ۲/۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر محاسبه شد. نتایج ارزیابی هر یک از آنتی‌ژن مایع هیداتیک، دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و دفعی ترشحی لایه ژرمینال به روش کانترایمنوالکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- پاسخ مثبت تست کانترایمونوالکتروفورز روی نمونه‌های سرم گوسفند و آنتی‌ژن‌های مایع کیست هیداتیک، پروتواسکولکس و لایه ژرمینال

آزمایش ۵۰ نمونه سرم گوسفندان آلوده به کیست هیداتیک به روش کانترایمنوالکتروفورز با استفاده از آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک، ٤٠ نمونه (حساسیت ۸۰ درصد) و با استفاده از آنتی‌ژن دفعی-ترشحی پروتواسکولکس، ۳۸ نمونه (حساسیت ٧٦ درصد) و با استفاده از آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لایه ژرمینال، ٤٦ نمونه (حساسیت ۹۲ درصد) از سرم‌ها واکنش مثبت نشان داد.

با آزمایش ۵۰ نمونه سرم گوسفندان غیرآلوده به کیست هیداتیک به روش کانترایمنوالکتروفورز با استفاده از آنتی‌ژن مایع هیداتیک، آنتی‌ژن دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لایه ژرمینال ۱ نمونه واکنش مثبت نشان داد. ویژگی به‌دست آمده در تمام انواع آنتی‌ژن‌های به‌کاررفته ۹۸ درصد بود (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمایش کانترایمونوالکتروفورز روی سرم گوسفندان آلوده و غیرآلوده به کیست هیداتیک

آنتی‌ژن مورد استفاده	مایع کیست هیداتیک (HF)				دفعی ترشحی پروتواسکولکس (ES-PSC)				دفعی-ترشحی لایه ژرمینال (ES-GL)			
	مثبت		منفی		مثبت		منفی		مثبت		منفی	
گوسفندان	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد
آلوده به کیست هیداتیک	٤٠	۸۰	۱۰	۲۰	۳۸	٧٦	۱۲	۲٤	٤٦	۹۲	٤	۸
غیرآلوده به کیست‌هیداتیک	۱	۲	٤۹	۹۸	۱	۲	٤۹	۹۸	۱	۲	٤۹	۹۸

با آزمایش ۵ نمونه سرم موش آزمایشگاهی آلوده به کیست هیداتیک تجربی به روش کانترایمنوالکتروفورز با استفاده از آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک ٤ نمونه (حساسیت ۸۰ درصد) و با استفاده از آنتی‌ژن دفعی ترشحی پروتواسکولکس ٤ نمونه (حساسیت ۸۰ درصد) و با استفاده از آنتی‌ژن دفعی‌ترشحی لایه ژرمینال هر ۵ نمونه (حساسیت ۱۰۰ درصد) واکنش مثبت نشان دادند. با آزمایش ۵ نمونه سرم موش

غیرآلوده به کیست هیداتیک تجربی به روش کانترایمنوالکتروفورز با استفاده از آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک، آنتی‌ژن دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و لایه ژرمینال هیچ واکنش مثبتی مشاهده نگردید (ویژگی ۱۰۰ درصد) (جدول ۲). در ضمن، هیچ‌یک از سرم‌های گوسفندان آلوده به فاسیولوز و دیکروسلیوز واکنش مثبتی را با آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی پروتواسکولکس و لایه ژرمینال و نیز مایع هیداتیک نشان ندادند.

جدول ۲- نتایج حاصل از آزمایش کانترایمونوالکتروفورز روی سرم موش‌های آلوده و غیرآلوده به کیست هیداتیک

آنتی‌ژن مورد استفاده	مایع کیست هیداتیک (HF)				دفعی ترشحی پروتواسکولکس (ES-PSC)				دفعی ترشحی لایه ژرمینال (ES-GL)			
	مثبت		منفی		مثبت		منفی		مثبت		منفی	
موش	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد
آلوده به کیست هیداتیک تجربی	٤	٨٠	١	٢٠	٤	٨٠	١	٢٠	٥	١٠٠	٠	٠
غیرآلوده به کیست هیداتیک تجربی	٠	٠	٥	١٠٠	٠	٠	٥	١٠٠	٠	٠	٥	١٠٠

بحث و نتیجه‌گیری

هیداتیدوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که نه تنها از نظر چرخه زندگی انگل و دارا بودن سویه‌های مختلف، بلکه از حیث تشخیص به موقع در جمعیت‌های انسانی و حیوانی و هم‌چنین جنبه‌های درمانی از پیچیدگی‌های زیادی برخوردار است. هر کیست هیداتیک می‌تواند تا صدها هزار عدد پروتواسکولکس داشته باشد که با خورده شدن آن‌ها توسط سگ در مدت ٦ هفته به کرم بالغ تبدیل خواهند شد.

تاکنون چندین مطالعه برای نگه‌داری پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک در محیط آزمایشگاه صورت گرفته است. هانی‌لو و همکاران در سال ۱۳۹۰ مطالعه‌ای در رابطه با میزان تولید پروتئین‌های (آنتی‌ژن‌های) دفعی‌ترشحی از طریق کشت کوتاه مدت پروتواسکولکس‌ها در محیط‌های RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium، DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) و PBS (Phosphate Buffered Saline) غنی‌شده با گلوکز انجام دادند. نتیجه این پژوهش نشان داد که برای تهیه پروتئین‌های دفعی- ترشحی پروتواسکولکس، محیط PBS غنی‌شده با گلوکز نسبت به دو محیط دیگر مناسب‌تر است. حداکثر زمان مناسب برای تولید این پروتئین‌ها، تا ٤٨ ساعت بعد از کشت اولیه پروتواسکولکس‌ها می‌باشد (Haniloo *et al*., 2011).

موذنی و همکاران در سال ۱۳۹۱ امکان زنده ماندن پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک ریوی گوسفند در آزمایشگاه را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دو محیط سرم فیزیولوژی و مایع کیست هیداتیک ریوی مورد مطالعه قرار داده‌اند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که برای

نگه‌داری پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک ریوی گوسفند در آزمایشگاه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مایع کیست هیداتیک ریوی در مقایسه با سرم فیزیولوژی برتری قابل‌توجهی دارد (Moazeni and Gorjipour, 2012).

بخش عمده‌ای از پیشرفت تشخیص ایمونولوژی هیداتیدوز، مرهون شناسایی آنتی‌ژن‌های انگل است. معرفی آنتی‌ژن‌های اختصاصی، قطعاً کارآیی تشخیص ایمونولوژیک بیماری در انسان و حیوانات را گسترده‌تر و مفیدتر خواهد کرد. مایع هیداتیک که به طور معمول به عنوان آنتی‌ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد، دارای اجزا و ترکیبات مختلفی است که بعضی از آن‌ها فاقد ویژگی لازم در تشخیص اختصاصی هیداتیدوز می‌باشد (Barbieri *et al*., 1994). مطالعات مختلف نشان‌دهنده وجود آنتی‌ژن‌های مشترک و واکنش متقاطع در آزمایش‌های سرولوژیک با بیماری‌های ناشی از انگل‌های دیگر نظیر *اکینوکوکوس مولتی‌لوکولاریس*، *تنیا سولیوم*، *تنیا ساژیناتا*، *هیمنولیپیس نانا*، فاسیولا، توکسوکارا، توکسوپلاسما، لیشمانیا و بعضی بیماری‌های غیرانگلی نظیر بدخیمی‌ها می‌باشد (Craig and Nelson, 1984). وجود بعضی ترکیبات سرم میزبان از قبیل آلبومین و ایمونوگلبولین‌ها در مایع هیداتیک، کارآیی مایع هیداتیک خام را به عنوان آنتی‌ژن اختصاصی در تشخیص هیداتیدوز محدود می‌سازد (Rafiei and 2006 Craig,). بنابراین، اولین گام اساسی در تشخیص سرولوژیک بیماری تهیه و تخلیص یک آنتی‌ژن مناسب است که ضمن دارا بودن حساسیت لازم، از ویژگی مناسب‌تری در تشخیص اختصاصی بیماری با حداقل واکنش متقاطع با دیگر عوامل انگلی و غیر انگلی، برخوردار باشد. پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک حاوی آنتی‌ژن‌هایی است که صد درصد متعلق به خود انگل هستند، ولی دارای واکنش مثبت کاذب با سرم بیماران مبتلا به توکسوپلاسموز، سیستی‌سرکوز و لیشمانیوز نیز می‌باشد (Poretti *et al*., 2009). روش‌های مختلفی برای خالص‌سازی و تفکیک آنتی‌ژن‌های مایع هیداتیک مورد استفاده قرارگرفته‌اند که ارزیابی سرولوژیک این آنتی‌ژن‌ها با نتایج متفاوتی همراه بوده است (Ortona *et al*., 2008). در بررسی که توسط فکور و مشکی در سال ۱۳۸۸ تحت عنوان شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی کیست هیداتیک توسط روش وسترن بلاتینگ به منظور کاربرد تشخیصی آن صورت گرفت، چهار نوع آنتی‌ژن مایع خام، مایع جوشانده، آنتی‌ژن هموژنیزه پروتواسکولکس و آنتی‌ژن دیواره کیست هیداتیک تهیه گردید. نمونه‌های سرمی مثبت و عاری از آلودگی در بازرسی کشتارگاهی تهیه شد. با استفاده از ایمونوبلاتینگ در آنتی‌ژن مایع‌خام یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳۵ و در آنتی‌ژن دیواره کیست ۳ باند ۳۰، ۳۳ و ٤٦ کیلودالتون به عنوان آنتی‌ژن‌های اختصاصی شناسایی شدند. اگرچه یکی از شایع‌ترین منابع آنتی‌ژنی برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد کیست هیداتیک استفاده از آنتی‌ژن‌های مایع است ولی سوارنا و پاریجا در سال ۲۰۰۸ در ارزیابی آنتی‌ژن‌های مایع، پروتواسکولکس و دیواره کیست هیداتیک برای تشخیص هیداتیدوز انسانی با روش الایزای نقطه‌ای استفاده از آنتی‌ژن پروتواسکولکس و دیواره کیست را هم مناسب دانستند (Swarna and Parija, 2008).

روند ظهور آنتی‌بادی در سرم به وسیله تست ژل دیفیوژن که از ویژگی بالایی در تشخیص هیداتیدوز

برخوردار است، توسط راضی‌جلالی و همکاران در سال ۱۳۸٦ مورد بررسی قرار گرفت. با انجام آزمایش ژل دیفیوژن با استفاده از آنتی‌ژن مایع هیداتیک، مشخص گردید که حساسیت این آزمایش تا ۵ هفته پس از آلودگی صفر و در هفته ششم به ۱۵ درصد رسیده، سپس به تدریج افزایش یافته و در هفته چهاردهم به ٦۹ درصد می‌رسد. در هفته‌های بعد میزان حساسیت به تدریج کاهش می‌یابد. در مطالعه ایشان ویژگی یا اختصاصیت آزمایش در تمام هفته‌ها ۱۰۰ درصد بود. چنین به نظر می‌رسد که توانایی تشخیص آنتی‌بادی ضد کیست هیداتیک بستگی به مرحله رشد کیست داشته و گرچه اخذ جواب مثبت ارزش بسیاری دارد، ولی نتایج منفی نشانه عدم وجود کیست هیداتیک نبوده و انجام آزمایش‌های سرولوژیک دیگر با حساسیت بالا جهت تشخیص ضروری به نظر می‌رسد (Razi Jalali *et al.*, 2007). یخچالی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در پژوهشی، ارزیابی واکنش آنتی‌ژن در مجاورت با سرم تهیه‌شده از گوسفند را در مقایسه با یافته‌های کشتارگاهی و مولکولی مورد مطالعه قرار دادند (Yakhchali and Morshedi, 2011). پاریجا در سال ۱۹۹۷ با روش کانترایمنوالکتروفورز به تشخیص آنتی‌ژن‌های کیست هیداتیک در ادرار بیماران پرداخت و توانست حساسیت این آزمایش را در مورد بیماران دارای کیست هیداتیک، ٤۳/۷۵ درصد و ویژگی آن را بین ۹۲ تا ۱۰۰ درصد گزارش نمایند (Parija, 1997).

برای افزایش دقت در تشخیص هیداتیدوز بهتر است ابتدا نمونه‌های سرمی با یک آزمون با حساسیت بالا آزمایش شوند و سپس از آزمونی استفاده شود که دارای ویژگی بالاتری باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، آزمون کانترایمنوالکتروفورز می‌تواند روش غربالگری مناسبی برای هیداتیدوزی گوسفندان باشد.

تست کانترایمنوالکتروفورز از محاسن تکنیکی مختلفی برخوردار است، ازجمله قابلیت اجرا در اکثر آزمایشگاه‌ها، ماندگاری طولانی آنتی‌بادی، سادگی نسبی روش، ارزانی و قابلیت انجام تعدادی واکنش در مدت زمان کوتاه است (Vevategui *et al.*, 1992). با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر جهت انجام مطالعات تکمیلی می‌توان روش کانترایمنوالکتروفورز را با استفاده از آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لایه ژرمینال در هیداتیدوز تجربی پیشنهاد نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که با اعطای پژوهانه امکان این پژوهش را فراهم ساختند اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در این مطالعه ندارند.

منابع

- Anderson, F.L. (1997). Introduction to cystic echinococcosis and description of cooperative research project in Morocco. Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern countries with special references to Morocco. USA: Brigham Young University, Provo, pp: 1-17
- Barbieri, A.M., Sevri, M.A., Pirez, M.I., Battistoni, J. and Nieto, A. (1994). Use of specific antibody and circulating antigen serum levels in the hydatid immune-diagnosis of asymptomatic population. International Journal for Parasitology, 24(7): 937-942.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Budk, C.M., Deplazes, P., Paul, R. and Torgerson, P.L. (2006). Global socioeconomic impact of cystic echinoccosis. Emerging Infectious Diseases, 12: 296-303.
- Craig, P.S. and Nelson, G.S. (1984). The detection of circulating antigen in human hydatid disease. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 38(3): 219-227.
- Fakour, Sh. and Meshki, B. (2009). Identification of the specific antigen of hydatid cyst using western blotting method for diagnostic purposes. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 2(14): 14-20. [In Persian]
- Haniloo, A., Najafi, F., Fazaeli, A. and Nourian, A.A. (2011). Comparison and evaluation of Echinococcus granulosus protoscoleces excretory/secretory proteins in PBS complemented with glucose, DMEM and RPMI culture media. Journal of Zanjan University of Medical Sciences and Health Services, 19(74): 44-53. [In Persian]
- Ibrahem, M.M., Rafiei, A., Dar, F.K., Azwai, S.M., Carter, S.D. and Craig, P.S. (2002). Serodiagnosis of cystic echinococcosis in naturally infected camels. Parasitology, 3(125): 245-251.
- Moazeni, M. and Gorjipour, S. (2012). In vitro maintenance of protoscolices of lung hydatid cyst of sheep at 37 ^{oC}. Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences, 6(1): 35-42. [In Persian]
- Ortona, E., Rigano, R., Margutti, P. and Siracusano, A. (2008). Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis, Parasite Immunology, 22: 553-559.
- Parija, S.C. (1997). A review of some simple irnmunoassays in the serodiagnosis of cystic hydatid disease. Acta Tropica, 70: 17-24.
- Poretti, D., Delleisen, E., Grimm, F., Pfister, M. and Gottstein, B. (2009). Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 60: 193-198.
- Rafiei, A. and Craig, S. (2006). The immunodiagnostic potential of protoscoleces antigens in human cystic echinococcosis and the possible influence of parasite strain. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 96(4): 383-389.
- Razi Jalali, M.H., Ghorbanpoor, M. and Hoghooghi Rad, N. (2007) Evaluation of gel diffusion test for diagnosis of unilocullar hydatid cyst in experimentally infected sheep. Iranian Veterinary Journal, 3(9): 91-99 [In Persian]
- Swarna, S.R. and Parija, S.C. (2008). DOT-ELISA for evaluation of hydatid cyst wall, protoscoleces and hydatid cyst fluid antigens in the serodiagnosis of cystic. echinicoccosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 50: 233-236.
- Vevategui, M., Moro, P., Guevara, A. and Gilman, R.H. (1992).Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of hydatid disease. Journal of Clinical Microbiology, 30(6): 1557-1561.
- Yakhchali, M. and Morshedi, A. (2011). Comparison of the validity of different diagnostic methods in determining hydatidosis in large ruminants. 87(2): 64-71. [In Persian]
- Zarzosa, M.P., Domingo, A.O., Gutierrez, P., Alonso, M., Cuervo, M., Drado, A., *et al*. (1999). Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 35: 255-262.