

بررسی ارزش تشخیصی آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس کیست هیداتیک با استفاده از روش دات بلاتینگ

فرزاد عربی * ، دکتر بهزاد حق پناه ** ، زهرا غیور *** ، بدرالسادات مساوات ****

دریافت : ۸۴/۲/۲۱ ، پذیرش : ۸۴/۹/۱۶

چکیده:

مقدمه و هدف: بیماری کیست هیداتیک یکی از مهمترین زئونوزهای انگلی است که در مناطق مختلف دنیا از جمله ایران شیوع دارد. استفاده از روش های سرولوژیکی که بتواند با حساسیت و ویژگی بالایی در تشخیص هیداتیدوز بکار رود ارزشمند می باشد. از این رو در این پژوهش ، آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس بعنوان دو آنتی ژن اختصاصی انگل، تخلیص شده و سپس با تست دات بلاتینگ با سرم بیماران هیداتیدوزی و غیر هیداتیدوزی مورد ارزیابی قرار گرفته است تا حساسیت و ویژگی این دو آنتی ژن با این روش معرفی گردد.

روش کار: در یک مطالعه تحلیلی مقایسه ای از ۲۲ بیمار تحت عمل جراحی کیست هیداتیک و ۱۲ بیمار غیر هیداتیدوزی نیز که مبتلا به توکسوپلاسموز حاد (۴ نفر)، لیشمانیوز (۴ نفر) و سستودهای غیر کیست هیداتیک (۴ نفر) بودند و همچنین ۴ فرد نرمال به عنوان سرم کنترل ، خون گیری به عمل آمد. مایع کیست هیداتیک کبد و ریه گوسفند حاوی پروتواسکولکس استخراج شد و سپس این مایع جهت تهیه آنتی ژن B تحت تخلیص نسبی و عبور از ستون پروتئین A قرار گرفت و محتوای سلولی پروتواسکولکس نیز تحت عنوان آنتی ژن پروتواسکولکس تهیه شد. با متد دات بلات آنتی ژن های B و پروتواسکولکس با سرم های هیداتیکی و کنترل واکنش داده و حساسیت و ویژگی این آنتی ژن ها ارزیابی گردید.

نتایج: نتایج حساسیت و ویژگی آنتی ژن B به ترتیب ۹۰/۹٪ و ۸۱٪ و آنتی ژن پروتواسکولکس به ترتیب ۱۰۰٪ و ۶۳٪ در متد دات بلات برآورد شد.

نتیجه نهایی: ارزیابی حساسیت و ویژگی آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس با استفاده از دات بلاتینگ نشان داد آنتی ژن B از ارزش بالایی در تشخیص هیداتیدوز برخوردار است و دات بلاتینگ با استفاده از آنتی ژن B می تواند به عنوان یک روش تشخیصی ارزشمند بکار گرفته شود.

کلید واژه ها: آنتی ژن بی / آنتی ژن پروتواسکولکس / ایمنو بلاتینگ / کیست هیداتیک

مقدمه:

استرالیا، آفریقا، آمریکا و خاور میانه از جمله ایران شیوع دارد (۱،۲).

ایران از مناطق هیپرآندمیک بیماری بوده و موجب ضررهای اقتصادی به دلیل آلودگی در دام و آسیب های شدید جسمی، روانی و اقتصادی به دلیل آلودگی انسان

کیست هیداتیک که توسط مرحله لاروی سستود سگ و سگ سانان به نام *Echinococcus granulosus* ایجاد می شود یکی از مهمترین زئونوزهای انگلی است که در مناطق مختلف دنیا نظیر اروپا، آسیای مرکزی ، چین ،

* مربی گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** استادیار گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (haghpanah@med.mui.ac.ir)

*** مربی گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

**** کارشناس ارشد انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مایع کیست جمع آوری گردید. مایع هیداتیک سانتریفوژ شده و محلول رویی در دمای ۷۰- درجه نگهداری گردید. پس از این که پروتواسکولکس ها با رسوبات دیگر از مایع جدا گردید ۲ یا ۳ بار در بافر PBS (Phosphate Buffer saline) با $\text{pH}=7.4$ شستشو داده شده و سپس در دمای ۷۰- درجه فریز گردید.

تهیه سرم های انسانی: در مجموع ۳۸ مورد سرم جمع آوری و آزمایش شدند که شامل: ۲۲ مورد سرم از بیماران مبتلا به کیست هیداتیک که ابتلای آنها بعد از عمل جراحی با آزمایش انگل شناسی و یا بافت شناسی ضایعه به اثبات رسیده بود. ۴ مورد توکسو پلاسموزیس حاد، ۴ مورد مبتلا به سستوهای غیر از اکیونوکوکوس گرانولوزوس (۱ مورد تنیا ساژیناتا و ۳ مورد هیمنولیپیس نانا) و ۳ مورد لیشمانیوز جلدی و ۱ مورد کالآزار و ۴ مورد سرم از افراد سالم جهت ارزیابی واکنش های متقاطع و غیر اختصاصی تهیه شدند.

تهیه و تخلیص آنتی ژن B (Ag B) از مایع کیست هیداتیک: ۱۰۰ میلی لیتر مایع هیداتیک سانتریفوژ شد. بعد از حذف رسوبات، مایع حاصل به مدت یک شب در مقابل بافر استات $0.05/0.05$ مولار $\text{pH}=5$ در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیالیز گردیده و سپس محتویات کیسه دیالیز با اولتراسانتریفوژ $50000 \times g$ در شرایط خلاء و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل از مرحله فوق با ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات $0.2/0.2$ مولار $\text{pH}=8$ بصورت محلول در آورده شد (resuspension). محلول حاصل در یک حمام آب برای ۱۵ دقیقه جوشانده شده و در نهایت با اولتراسانتریفوژ $50000 \times g$ در شرایط خلاء و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب دور ریخته شده و محلول بدست آمده برای اعمال بعدی در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۷-۹).

خالص سازی آنتی ژن B بوسیله ستون کروماتوگرافی پروتئین A برای ایجاد تعادل در ستون های کروماتوگرافی آماده، دو برابر حجم ستون، بافر شروع کننده یا Start buffer از ستون عبور داده شد. تنظیم بافر ورودی و خروجی انجام گرفت. نمونه بر اساس $7/7$ از ستون کروماتوگرافی عبور داده شد بطوریکه در هر لوله حدود ۴۰-۲۰۰ میکرولیتر محلول وجود داشت. بافر فسفات به میزان ۵ حجم از

می شود (۳). تشخیص و تفسیر بالینی هیداتیدوز بیشتر بر اساس تصاویر رادیولوژیک، سیتی اسکن یا سونوگرافی می باشد که با مشکلاتی همراه بوده و در تشخیص دقیق ماهیت این ضایعات ناتوان است (۴). بنابراین روش های ایمونولوژیک در تشخیص آزمایشگاهی هیداتیدوز از اهمیت و اعتبار ویژه ای برخوردارند. تقریباً اکثر آزمایشات رایج سرولوژیک از قبیل Casoni و Complement Fixation Test (CFT) Indirect Hemmagglutination Antibody Test (IHA) Latex Agglutination (LA) Immuno Fluorescent Antibody Test (IFAT) Counter Immuno Electrophoresis (CIEP) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) از آغاز تا به امروز برای تشخیص این بیماری بکار رفته اند (۵). در کشور ما نیز بطور معمول، روش IFAT در آزمایشگاهها انجام می شود که دارای مثبت و منفی کاذب می باشد و علاوه بر آن در شرایط خاص، جدا نمودن بیماران هیداتیک که بیماری آنها با کیست جدید مجدداً فعال شده باشد، از بیماران جراحی شده فاقد کیست جدید مشکل بوده و روش IFAT فاقد امکان تمایز اینگونه بیماران است زیرا با این روش آنتی بادی که بر ضد مجموعه آنتی ژن پروتواسکولکس وجود دارد، اندازه گیری می شود که برای کل بیماران هیداتیدوزی تا مدتها پس از عمل نیز مثبت کاذب نشان می دهد. همچنین مایع کیست که به طور معمول به عنوان آنتی ژن در روشهایی که نام برده شد مورد استفاده قرار می گیرد، دارای اجزا و ترکیبات مختلفی است که بعضی از آنها فاقد حساسیت و ویژگی لازم می باشند (۶). بنابراین لزوم تأیید بیماری توسط یک تست سرولوژی دقیق امری ضروری به نظر می رسد. در این راستا تعیین آنتی ژنی که از نظر ویژگی و حساسیت بتواند چنین هدفی را برآورده کند از اهمیت خاصی برخوردار است. از این رو در این پژوهش، آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس بعنوان دو آنتی ژن اختصاصی انگل انتخاب شده و سپس توسط دات بلاتینگ ارزیابی گردیدند.

روش کار:

این مطالعه از نوع تحلیلی مقایسه ای بود که در آن نمونه های مورد آزمایش عبارت بودند از نمونه های مایع هیداتیک (آنتی ژن) و نمونه های سرمی (آنتی بادی). پس از تشخیص گوسفند آلوده به کیست هیداتیک، در کشتارگاه خوراسگان در حومه اصفهان کبد و ریه آلوده را انتخاب کرده و پس از انتقال به بخش انگل شناسی

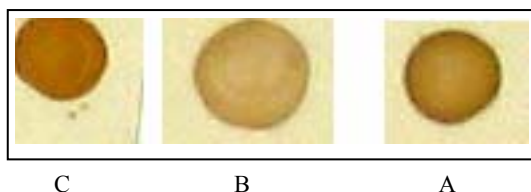
جدول ۱: فراوانی جنسی ۲۲ بیمار هیداتیدوز

تحت بررسی		
جنس	تعداد	درصد
زن	۱۰	۴۵/۵
مرد	۱۲	۵۴/۵
کل	۲۲	۱۰۰

از ۲۲ مورد بیمار، ۱۵ نفر (۶۸٪) دارای کیست کبدی، ۵ نفر (۲۳٪) کیست ریوی و ۲ نفر (۵٪) کیست کبد و کلیه توام داشتند.

میزان پروتئین مایع هیداتیک در نمونه های مختلف به روش برادفورد (Bradford) اندازه گیری شد که این میزان در کیست های مختلف بر حسب عضو آلوده و وضعیت باروری (وجود یا عدم وجود پروتواسکولکس) از ۸۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر با حد متوسط ۴۵۰-۳۵۰ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود.

ارزیابی آنتی ژن های B و پروتواسکولکس با استفاده از روش دات بلاتینگ (شکل ۱): ۲۰ بیمار هیداتیک (۹۰/۹٪) با AgB و هر ۲۲ بیمار (۱۰۰٪) با آنتی ژن پروتواسکولکس واکنش مثبت داشتند. یکی از مبتلایان به توکسوپلازما و ۲ نفر از بیمارانی که آلوده به سستوهای غیر از اکینووکوکوس گرانولوزوس بودند نیز با آنتی ژن B واکنش مثبت داشتند. هیچکدام از افراد سالم و مبتلایان به لیشمانیوز جلدی و یا کالاآزار با آنتی ژن B واکنش مثبت نداشتند. یکی از مبتلایان به لیشمانیوز احشایی و ۲ نفر از مبتلایان به توکسوپلاسموز و ۲ نفر از مبتلایان به هیمنولیس نانا و یکی از افراد سالم نیز با آنتی ژن پروتواسکولکس در این تست واکنش مثبت داشتند (جدول ۲).



شکل ۱. دات بلاتینگ

- (A) واکنش مثبت با آنتی ژن پروتواسکولکس
 (B) واکنش منفی
 (C) واکنش مثبت با آنتی ژن B

ستون عبور داه شد و جمع آوری نمونه ها از ستون انجام گرفت (Pharmacia Biotech 71-7002-00).

جداسازی آنتی ژن پروتواسکولکس: حجم مورد نظر (۲۰۰ μ l) از پروتواسکولکس ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد هموژنیزه شد. این محلول بوسیله سونیکاتور که روی ۵۰ سیکل برثانیه و ماکزیم تن ۳۰ ثانیه تنظیم شده بود در حمام یخ برای ۴ بار سونیکه شد و در مرحله بعدی سانتریفوژ گردید. (۱۰۰۰۰ g، ۳۰ دقیقه) سپس محلول رویی از رسوب جدا شد. محلول حاصل در مقابل PBS دیالیز گردید (۱۰) و سپس سنجش پروتئین به روش برادفورد انجام شد (۱۱).

دات بلاتینگ: در این روش Load کردن آنتی ژن های B و پروتواسکولکس بروی کاغذ نیتروسولولز انجام گرفت. سپس از یک محلول Blocking برای پوشش دادن قسمتهای خالی کاغذ نیتروسولولز استفاده شد که این محلول BSA+PBS-T ۱٪ است. با اضافه کردن سرم حاوی آنتی بادی (با رقتی معادل ۱:۱۰۰ با PBS-T) بر علیه آنتی ژن مورد نظر، اتصال آنتی بادی به آنتی ژن صورت گرفته و در مرحله بعد با اضافه کردن آنتی هیومن آنتی بادی کونزوگه (آنتی هیومن [DAKO P0214] با رقتی معادل ۱:۱۵۰۰ با PBS-T) به کاغذ نیتروسولولز اتصال آن به کمپلکس ایمنی انجام گرفت و در مرحله آخر برای رنگ آمیزی کاغذ نیتروسولولز ابتدا ۵ میلی گرم از دی آمینو بنزیدین (DAB) با ۵ میلی لیتر از PBS-T حل کرده و به آن ۵ میکرولیتر آب اکسیژنه اضافه شد و کاغذ نیتروسولولز در این محلول غوطه ور گردید که ظرف ۱ دقیقه رنگ در خانه ها ظاهر گردید. برای متوقف کردن واکنش بعد از خالی کردن محلول فوق، آب مقطر به کاغذ نیتروسولولز اضافه گردید (۱۲، ۱۳).

اطلاعات بدست آمده با استفاده از آزمون آماری χ^2

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج:

در این مطالعه ۳۸ نمونه سرمی شامل ۲۲ نمونه بیمار هیداتیدوزی (جدول ۱)، ۴ نمونه افراد سالم، ۴ مورد توکسوپلاسموزیس حاد، ۳ مورد لیشمانیوز جلدی و ۱ مورد کالاآزار، ۳ مورد سرم آلوده به هیمنولیس نانا و ۱ مورد تنیاسازیات مورد بررسی قرار گرفت. جهت مقایسه حساسیت دو آنتی ژن پروتواسکولکس و آنتی ژن B از آزمون آماری استفاده شد.

جدول ۲. نتایج واکنش سرم ها با آنتی ژن های B و پروتواسکولکس به روش دات بلاتینگ

سرم های مورد آزمایش	آنتی ژن B	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
هیداتیدوز	۲۲ (۹۰/۹)	۲۲ (۱۰۰)
توکسوپلاسموز	۴ (۲۵)	۲ (۵۰)
سسئودهای غیر از اکتینوکوکوس گرانولوزوس	۴ (۵۰)	۲ (۵۰)
لیشمانیوز جلدی و کالآزار	۴	۱ (۲۵)
نرمال	۴	۱ (۲۵)
تعداد کل	۱۶ (۱۲/۵)	۶ (۳۷)

ارزش تشخیصی آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس کیست هیداتیک به روش دات بلاتینگ در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳. نتایج ارزش تشخیصی آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس کیست هیداتیک به روش دات بلاتینگ

	حساسیت و ویژگی اعتبار ارزش اخباری مثبت ارزش اخباری منفی				
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ag B	۹۰/۹	۸۱	۸۸	۸۷	۸۶
AgPsc	۱۰۰	۶۳	۸۱/۵	۷۸	۱۰۰

بحث:

بیشتر ابزارهای موجود برای تشخیص، نظیر پرتونگاری، اولتراسونوگرافی و سی تی اسکن، گرچه می توانند مکان، اندازه و ظاهر فیزیکی (محتوی مایع یا آهکی شده) ضایعات توده ای را تعیین کنند ولی قادر به تشخیص ماهیت دقیق این توده ها نمی باشند (۴). از طرف دیگر به علت خطر نشت پروتواسکولکس ها و ایجاد کیست ثانویه یا آنافیلاکسی، بایستی از اسپیراسیون کیست ها اجتناب کرد (۱۴). بنابراین به دلیل وجود مشکلات مختلف در تشخیص نهایی توسط روش های مذکور، روش های ایمونولوژیک در تشخیص هیداتیدوز از جایگاه ویژه ای برخوردار هستند.

بخش عمده ای از پیشرفت تشخیص ایمونولوژیک هیداتیدوز، مرهون شناسایی آنتی ژن های انگل است. معرفی آنتی ژن های اختصاصی، قطعاً کارآیی تشخیص ایمونولوژیک بیماری در انسان و حیوانات را گسترده تر و مفیدتر خواهد کرد.

مایع هیداتیک که بطور معمول به عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرار می گیرد، دارای اجزا و ترکیبات مختلفی

است که بعضی از آنها فاقد حساسیت و ویژگی لازم در تشخیص اختصاصی هیداتیدوز می باشد (۱۶، ۱۵، ۱۱). مطالعات مختلف نه تنها نشان دهنده وجود آنتی ژن های مشترک و واکنش متقاطع در آزمایشات سرولوژیک با بیماری های ناشی از انگلهای دیگر نظیر اکتینوکوکوس مولتی لوکولاریس، تنیاسولیوم، تنیاسازیناتا، هیمونولپیس نانا، فاسیولا، توکسوکارا، توکسو پلاسما، لیشمانیا و بعضی بیماریهای غیرانگلی نظیر بدخیمی ها می باشد (۱۷-۱۵)، بلکه وجود بعضی ترکیبات سرم میزبان از قبیل آلبومین و ایمونوگلوبولینها در مایع هیداتیک، کارآیی مایع هیداتیک خام را به عنوان آنتی ژن در تشخیص هیداتیدوز محدود می سازد (۱۸). بنابراین اولین گام اساسی در تشخیص سرولوژیک بیماری تهیه و تخلیص یک آنتی ژن مناسب است که ضمن دارا بودن حساسیت لازم، از ویژگی مناسب تری در تشخیص اختصاصی بیماری با حداقل واکنش متقاطع با دیگر عوامل انگلی و غیر انگلی، برخوردار باشد.

پروتواسکولکس کیست هیداتیک حاوی آنتی ژنهایی است که صد در صد متعلق به خود انگل هستند (۱۹) ولی دارای واکنش مثبت کاذب با سرم بیماران توکسوپلاسموزیس، سیستی سرکوزیس، لیشمانیوزیس و بیماران دیگر نیز می باشد (۱۵). متدهای مختلفی برای خالص سازی و تفکیک آنتی ژن های مایع هیداتیک مورد استفاده قرار گرفته اند که ارزیابی سرولوژیک این آنتی ژن ها با نتایج متفاوتی همراه بوده است (۲۰).

در این مطالعه از میان روش های متفاوتی که برای تخلیص آنتی ژن ها معرفی شده اند، بنا به ضرورت و امکانات موجود از روشی موسوم به تخلیص نسبی آنتی ژن B (۷) و روش کروماتوگرافی میل ترکیبی پروتئین A استفاده گردید. طبق روش اوربول (۷) یکسری آنتی ژنهای دیگر انگل نظیر Ag5 و یکسری آنتی ژن های مربوط به میزبان که به مایع راه پیدا کرده اند نظیر آلبومین تا حدودی حذف گردید و یک تخلیص نسبی صورت پذیرفت و طبق متد کروماتوگرافی میل ترکیبی حذف ایمونوگلوبولینهای میزبان که در مایع کیست وجود داشتند انجام گرفت. با حذف ایمونوگلوبولینها، تداخل واکنش آنتی بادی میزبان واسط حقیقی (مثلاً گوسفند) با آنتی ژنهای موجود در سرم انسان به حداقل رسیده و در نتیجه از ایجاد واکنش مثبت کاذب جلوگیری گردید. علت دیگر این کار تغلیظ آنتی ژن مورد نظر یعنی آنتی ژن B می باشد (۱۷، ۷).

احتمال آلودگی توأم هیداتیدوز و توکسوپلاسموزیس حاد یا سیستمی سرکوزیس در کشور ما ناچیز است، ارزش تشخیصی آنتی ژن B محفوظ می ماند.

همچنین تعداد دو نفر از افراد مبتلا به سستوهای دیگر (تنیا ساژیناتا و هیمنولیپیس نانا) و دو نفر از افراد مبتلا به توکسوپلاسموز حاد و یک نفر از افراد سالم و یک نفر از افراد مبتلا به لیشمانيوز احشایی با آنتی ژن پروتواسکولکس واکنش مثبت کاذب نشان دادند و در نتیجه میزان حساسیت و ویژگی آنتی ژن پروتواسکولکس در آزمایش دات بلات ۱۰۰٪ و ۶۳٪ برآورد شد. واکنشهای مثبت کاذب نیز که در این آزمایش دیده می شود ممکن است مربوط به تشابه آنتی ژنی با بیماران دیگر توکسوپلاسموز، لیشمانيوز و مبتلایان به سستوهای دیگر و حتی افراد نرمال باشد (۲۱). احتمالاً اگر آنتی بادی های اختصاصی با نیمه عمر کمتر مانند IgE ردیابی گردند درصد واکنش مثبت کاذب به مراتب کم می شود.

نتیجه نهائی :

با توجه به نتایج مذکور با اینکه حساسیت این آنتی ژنها بوسیله دات بلات در تشخیص بیماران مبتلا به کیست هیداتیک ۹۰/۹٪ و ۱۰۰٪ بود ولی به علت واکنش متقاطع با سرم مبتلایان به سستوهای دیگر ، توکسوپلاسم ، لیشمانيوز و سرم افراد نرمال ویژگی آنتی ژن B ۸۱٪ و آنتی ژن پروتواسکولکس ۶۳٪ برآورد گردید و اعتبار آزمایش برای آنتی ژن B ۸۸٪ و برای آنتی ژن پروتواسکولکس ۸۱/۵٪ بدست آمد. بنابراین دات بلاتینگ با استفاده از آنتی ژن B از ارزش تشخیصی بهتری برخوردار بوده و بکارگیری این آزمایش می تواند در تشخیص هیداتیدوز بطور وسیعی بکار گرفته شود بویژه آنکه برخلاف روشهایی مانند IFAT و IHA که نیاز به وسایل ودستگاههایی دارد که امکان حضور آن در تمام مناطق وجود ندارد روش دات بلاتینگ در شرایط ساده تری قابل اجرا می باشد زیرا در این روش مشاهده نتیجه واکنش توسط چشم غیر مسلح نیز امکان پذیر می باشد. لذا با توجه به سرعت و زمان ناچیز انجام آزمایش دات بلاتینگ ، این آزمایش می تواند علاوه بر استفاده تشخیصی در آزمایشگاه های طبی به عنوان یک متد سریع و ارزان در غربالگری اولیه سودمند باشد.

برای ارزیابی آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس کیست هیداتیک در تشخیص اختصاصی هیداتیدوز و تعیین اعتبار و ارزش تشخیص هر کدام از آنها آزمایش دات بلات انجام شد.

طی آزمایش دات بلات از مجموع ۲۲ سرم مبتلایان به کیست هیداتیک ، ۲۰ مورد با آنتی ژن B و ۲۲ مورد با آنتی ژن پروتواسکولکس واکنش مثبت داشتند . علت واکنش های منفی کاذب که در مطالعه حاضر مانند مطالعه محققین دیگر مشهود بود شاید به علت اختلاف در پاسخ متفاوت میزبان به تحریکات آنتی ژنی انگل باشد. این بیماران احتمالاً با سایر روش های سرولوژیک نیز نتایج مثبتی نشان نداده اند. down regulation سایتوکاین Th_2 می تواند این مطلب را توضیح دهد که چرا بیماران هیداتیکی سرم منفی ، قادر به تولید آنتی بادی در پاسخ به انگل نیستند (۲۱).

همچنین ممکن است اختلافات در تهیه و تخلیص آنتی ژن B ، خصوصیات کلینیکی بیماران مثل عمر، اندازه ، تعداد، مکان، کیست در بدن، دور از دسترس سیستم ایمنی بودن کیست ها، کیست های بارور و غیر بارور، عفونی یا سالم بودن کیست در میزان حساسیت آزمایش تاثیر داشته باشد.

از مجموع ۱۶ سرم کنترل که مربوط به بیماران دیگر و افراد نرمال بود دو نفر از مبتلایان به سستوهای دیگر و یک نفر از توکسوپلاسموز با آنتی ژن B واکنش مثبت کاذب نشان دادند و بنابراین حساسیت و ویژگی آنتی ژن B در این آزمایش ۹۰/۹٪ و ۸۱٪ برآورد شد. این مسئله احتمالاً بیانگر آنتی ژن های مشترک می باشد که در این گروه بیماران (هیداتیکی و مبتلایان به سستوهای دیگر و توکسوپلاسموزیس حاد) یافت می گردد که در تحقیق اورتونا نیز گزارش شده است (۲۱). در مورد بیماران لیشمانيوزی که هیچ واکنش مثبت کاذبی با آنتی ژن B ندارند احتمالاً نبودن تشابه آنتی ژن در بیماران مبتلا به کالاآزار و یا دور از دسترس سیستم ایمنی قرار داشتن آنتی ژنهای لیشمن در سالک پوستی و در نتیجه تولید نشدن آنتی بادی در این بیماران ، می تواند علت باشد. (بویژه آنکه در لیشمانيوز جلدی میزان آنتی بادی های سیستمیک میزبان در حدی نیست که بتواند با آنتی ژنهای کیست هیداتیک واکنش مثبت کاذب ایجاد نماید). هر چند ذکر این نکته ضروری است که بدلیل آنکه

منابع:

1. Schmidth GS, Roberts L. Foundation of parasitology. 5th ed. St. Louis: Mosby, 2000: 338-41.
2. Thompson RCA Biology and systematics of Echinococcus. In: Thompson RCA , Lymbery AJ (eds.) Echinococcus and hydatid disease. CAB International, London : Wallingford , 1995: 1-50.
۳. اسلامی ع. کرم شناسی دامپزشکی. سستودها، ج ۲. تهران: دانشگاه تهران، ۱۳۷۰، ۱۱۷-۱۶۷.
4. Harris KM, Morris DL, Tudor R. Clinical and radiological features of simple and hydatid cysts of the liver. Br J Surg 1986; 73:835-8
5. Parija SC. A review of some simple immunoassays in the serodiagnosis of cystic hydatid disease. Acta Tropica 1998; 70:17-24
6. Ben Ismail R, Carme B, Niel G. Non specific serological reactions with Echinococcus granulosus antigens: role of anti-P1 antibodies. Am J Trop Med Hyg 1980a; 29:239-45.
7. Oriol R, Williams JF, Perez-Esandi MV, Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. Am J Trop Med Hyg 1971; 20: 569-74.
8. Muronetz VI, Korpela AT. Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography. J Chromatography B, 2003; 790: 53-66.
9. Johnstone A, Thorpe R. Immunochemistry in practice. 3rd ed. London: Blackwell , 1996.
10. Sbihi Y, Jansen D, Osuna A. Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 24: 205-211.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye Binding. Ann Biochem. 1976, 77: 248-254.
12. Grodzicki RL, Steere AC. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme linked immuno sorbent assay using different antigen Preparations for diagnosing Early Lyme disease. J Infect Dis 1988;157(4).
13. Graft JE, Gradzickir L. Antibody response in lyme disease: Evaluation of diagnostic tests. J Infect Dis 1984; 149: 789-795.
14. Lightowlers MW, Gottstein B, Echinococcus/Hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis In: Thompson RCA , Lymbery AJ (eds) Echinococcus and Hydatid Disease, CAB International. London: Wallingford , 1995: 335-410.
15. Farag H, Bout D, Capron A. Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the ELISA. Biomedicine. 1975; 23: 276-8.
16. Poretti D, Delleisen E, Grimm F, Pfister M, Gottstein B. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 193-8.
17. Varela Diaz VM, Coltorti EA. Immunoelectrophoresis tests showing Echinococcus granulosus arc 5 in human cases of Echinococcus vogeli and cysticercosis and multiple myeloma. Am J Trop Med Hyg 1978; 27: 554-7.
18. Coltorti EA , Varela - Diaz VM. IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. J Parasitol 1972;58: 753-6.
19. Rafiei A, Craig S. The immunodiagnostic potential of protoscolecs antigens in human cystic echinococcosis and the possible influence of parasite strain. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96(4): 383-9
20. Gottstine B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. Clin Microbiol Rev 1992b; 5:248-61
21. Ortona E, Rigano R, Margutti P. Siracusano A. Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. Parasite Immunol 2000; 22: 553-59.