مقاله پژوهشی

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

فرزاد عریضی* ، 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 ایـران شـیوع دارد. استفاده از روش های سرولوژیکی که بتواند بـا حساسـیت و ویژگـی بـالایـی در تشـخیص هیداتیـدوز بکـار رود ارزشـمند می باشد. از این رو در این پژوهش ، آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس بعنوان دو آنتی ژن اختصاصی انگـل، تخلـیص شـده و سپس با تست دات بلاتینگ با سرم بیماران هیداتیدوزی و غیر هیداتیدوزی مورد ارزیابی قرار گرفته است تا حساسیت و ویژگـی این دوآنتی ژن با این روش معرفی گردد.

روش کار : در یک مطالعه تحلیلی مقایسه ای از ۲۲ بیمار تحت عمل جراحی کیست هیداتیک و۱۲ بیمار غیر هیداتیـدوزی نیـز کـه مبتلا به توکسوپلاسموزحاد(٤نفر)، لیشمانیوز(٤نفر)وسستودهای غیرکیست هیداتیک(٤نفر) بودنـد و همچنـین ٤ فـرد نرمـال بـه عنوان سرم کنترل ، خون گیری به عمل آمد. مایع کیست هیداتیک کبد وریه گوسفند حاوی پروتواسکولکس استخراج شد و سپس ایـن مـایع جهـت تهیـه آنتـی ژن B تحـت تخلـیص نسـبی و عبـور از ستـــون پروتئیـــن A قـرار گرفـت و محتـــوای سـلولی پروتواسکـــولکس نیز تحت عنوان آنتی ژن پروتواسکولکس تهیه شد. با متد دات بلات آنتی ژن های B و پروتواسکولکس بـا سـرم 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 پروتواسـکولکس بـه ترتیـب ۱۰۰٪ و ۶۳٪ در متـد دات بلات برآورد شد.

نتیجه نهائی : ارزیابی حساسیت و ویژگی آنتی ژن B و آنتی ژن پروتواسکولکس با استفاده از دات بلاتینگ نشان داد آنتـی ژن B از ارزش بالایی در تشخیص هیداتیدوز برخـوردار اسـت و دات بلاتینـگ بـا اسـتفاده از آنتـی ژن B مـی تواندبـه عنـوان یـک روش تشخیصی ارزشمند بکار گرفته شود.

کلید واژه ها : آنتی ژن بی / آنتی ژن پروتواسکولکس / ایمنوبلاتینگ / کیست هیداتیک

مقدمه :

کیست هیداتیـــک کـــه توسط مرحله لاروی سستود سگ و سگ سانـــان به نـــام Echinococcus granulosus ایجاد می شود یکی از مهمترین زئونوزهای انگلی است که در مناطق مختلف دنیا نظیر اروپا، آسیای مرکزی ، چـین ، استرالیا، افریقا، امریکا و خاور میانه از جملـه ایـران شـیوع دارد(۱،۲).

ایران از مناطق هیپرآندمیک بیمـاری بـوده و موجـب ضررهای اقتصادی به دلیل آلودگی در دام و آسـیب هـای شدید جسمی، روانی و اقتصادی به دلیـل آلـودگی انسـان

* 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

مـی شـود(۳). تشـخیص و تفسـیر بـالینی هیداتیـدوز بیشتر بر اسـاس تصـاویر رادیولوژیـک ، سـیتی اسـکن یـا سونوگرافی می باشـد کـه بـا مشـکلاتی همـراه بـوده و در تشخیص دقیق ماهیت این ضایعات ناتوان است(۴).بنابراین روش هـــای ایمونولوژیـــک در تشـــخیص آزمایشـــگاهی هیداتیـــدوز از اهمیـــت و اعتبـــار ویـــژه ای برخوردارنـــد. تقریبـــاً اکثر آزمایشات رایج سرولوژیک از قبیل Casoni و

Complement Fixation Test (CFT)
Indirect Hemmaglutination Antibody Test (IHA)
Latex Agglutination(LA)
Immuno Fluorescent Antibody Test (IFAT)
Counter Immuno Electrophoresis (CIEP)
Enzyme Linked Immunosorbent Assey(ELISA)

از آغاز تـا بـه امـروز بـرای تشـخیص ایـن بیمـاری بکـار 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 عـلاوه بـر آن در شـرایط خـاص، جـدا نمـودن بیماران هیداتیکی که بیماری آنها با کیست جدید مجـدداً فعال شده باشـد، از بیمـاران جراحـی شـده فاقـد کیسـت جدید مشکل بوده و روش IFAT فاقد امکان تمایز اینگونه بیماران است زیرا بـا ایـن روش آنتـی بـادی کـه بـر ضـد مجموعه آنتی ژن پروتواسکولکس وجود دارد، اندازه گیری می شود که برای کل بیماران هیداتیدوزی تا مدتها پس از عمل نیز مثبت کـاذب نشـان مـی دهـد. همچنـین مـایع کیست که به طور معمول به عنوان آنتی ژن در روشـهایی که نام برده شد مورد استفاده قرار می گیرد، دارای اجـزا و ترکیبات مختلفی است که بعضی از آنها فاقد حساسـیت و ویژگی لازم می باشند(۶). بنابراین لزوم تائید بیماری توسط یک تست سرولوژی دقیق امری ضروری به نظر می رسـد. 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 ایـن پـژوهش ، آنتـی ژن B و آنتـی 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 بـود کـه در آن نمونه های موردآزمایش عبارت بودند از نمونه هـای مـایع هیداتیک (آنتی ژن) و نمونه های سرمی (آنتی بادی). پس از تشـخیص گوسـفند آلـوده بـه کیسـت هیـداتیک ، در کشتارگاه خوراسگان در حومه اصفهان کبد وریـه آلـوده را انتخاب کرده و پس از انتقال به بخش انگل شناســـــــی 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 کـه پروتواسکولکس ها با رسوبات دیگر از مایع جدا گردید ۲ یـا ۳بار در بافر PBS (Phosphate Buffer saline) بـا pH=7.4 شستشـو داده شـده و سـپس در دمـای ۷۰- درجـه فریـز گردید.

تهیه سرم های انسانی : در مجمـوع ۳۸ مـورد سـرم جمـع آوری و آزمایش شدندکه شامل: ۲۲ مورد سرم از بیمـاران مبتلا به کیست هیـداتیک کـه ابـتلای آنهـا بعـد از عمـل جراحی با آزمایش انگل شناسی و یا بافت شناسـی ضـایعه به اثبات رسیده بود. ۴ مورد توکسو پلاسـموزیس حـاد ، ۴ مورد مبتلا به سستودهای غیر از اکینوکوکوس گرانولوزوس (۱مورد تنیا ساژیناتا و۳ مورد هیمنو لیپیس نانا) و۳ مـورد لیشمانیوزجلدی و۱مورد کالاآزار و ۴ مـورد سـرم از افـراد سالم جهت ارزیابی واکنش های متقاطع و غیر اختصاصـی تهیه شدند.

تهیه و تخلیص آنتی ژن B (Ag B) از مایع کیسـت هیـداتیک : ۱۰۰ میلی لیتر مایع هیداتیک سانتریفوژ شد.بعد از حذف رسوبات ، مایع حاصل به مـدت یـک شـب در مقابـل بـافر استات ۰/۰۰۵ مولار pH = ۵ در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیـالیز گردیـده و سـپس محتویـات کیسـه دیـالیز بـا اولتراسـانتریفوژ ۵۰۰۰۰ ×g در شـرایط خـلاء و دمـای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد.رسوب حاصل از مرحله فوق با۱۰ میلی لیتر بافر فسفات۰/۲ مولار pH =۸ بصـورت محلـول در آورده شـد (resuspension). محلول حاصل در یک حمام آب برای ۱۵ دقیقه جوشانده شده و در نهایت با اولتراسانتریفوژ ۵۰۰۰۰ ×g در شـرایط خـلاء و دمـای ۴ درجـه سـانتیگراد بـه مـدت ۶۰ دقیقـه سانتریفوژ شد. رسوب دور ریختـه شـده و محلـول بدسـت آمده برای اعمال بعدی در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهـداری شد(۹-۷).

خالص سازی آنتی ژن B بوسیله ستون کروماتوگرافی پروتئین A برای ایجاد تعادل در ستون های کرومـاتوگرافی آمـاده، دو برابر حجم سـتون ، بافرشـروع کننـده یـا Start buffer از ستون عبور داده شد. تنظیم بافر ورودی و خروجـی انجـام گرفت. نمونه بر اساس v/v از سـتون کرومـاتوگرافی عبـور داده شد بطوریکه در هر لوله حـدود۴۰۰-۲۰۰ میکرولیتـر محلول وجود داشت. بافر فسفات به میزان ۵ حجـــــم از

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

جداسـازی آنتـی ژن پروتواسـکولکس : حجـم مـورد نظـر (٢٠٠ µl) از پروتواسـکولکس هـا در دمـای ۴ درجـه سانتیگراد هموژنیزه شد. این محلول بوسیله سونیکاتور که روی ۵۰ سیکل برثانیه و مـاکزیمم تـن ۳۰ ثانیـه تنظـیم شده بود در حمام یخ برای ۴ بار سونیکه شـد و در مرحلـه بعدی سانتریفوژ گردیـد. (g ١٠٠٠٠، ٣٠ دقیقـه) سـپس محلول رویی از رسوب جدا شد. محلول حاصـل در مقابـل PBS دیالیز گردید(١٠) و سپس سنجش پروتئین به روش برادفورد انجام شد(١١).

دات بلاتینگ : در این روش Load کردن آنتـی ژن هـای B و پروتواسکولکس بـروی کاغـذ نیتروسـلولز انجـام گرفـت. سـپس از یـک محلـول Blocking بـرای پوشـش دادن قسمتهای خالی کاغذ نیتروسـلولز اسـتفاده شـد کـه ایـن محلـول BSA+PBS-T ١٪ اسـت .بـا اضـافه کـردن سـرم حاوی آنتی بادی (با رقتی معادل ١٠٠: ١ بـا PBS-T) بـر علیه آنتی ژن مورد نظر ، اتصال آنتـی بـادی بـه آنتـی ژن صورت گرفته و در مرحله بعد با اضافه کردن آنتی هیـومن آنتی بادی کونژوگه (آنتی هیومنHRP [DAKO P0214]با رقتی معادل ١٥٠٠ : ١بـا PBS-T) بـه کاغـذ نیتروسـلولز اتصال آن به کمپلکس ایمنی انجام گرفت و در مرحله آخر برای رنگ آمیزی کاغذ نیتروسلولز ابتدا ۵ میلی گرم از دی آمینو بنزیدین(DAB)با ۵ میلی لیتر از PBS-T حل کـرده و بـه آن ۵ میکرولیتـر آب اکسـیژنه اضـافه شـد و کاغـذ نیتروسلولز در این محلول غوطـه ور گردیـد کـه ظـرف ١ دقیقه رنگ در خانه ها ظاهر گردیـد.بـرای متوقـف کـردن واکنش بعد از خالی کردن محلول فوق، آب مقطر به کاغذ نیتروسلولز اضافه گردید (١٢،١٣) .

اطلاعات بدست آمده با استفاده از آزمـون آمـاری χ^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج :

در ایـن مطالعـه ٣٨ نمونـه سـرمی شـامل٢٢ نمونـه بیمـاران هیداتیـدوزی(جـدول ١) ، ۴ نمونـه افـراد سـالم، ۴ مورد توکسوپلاسموزیس حاد ، ٣ مورد لیشـمانیوزجلدی و ١مورد کالاآزار،٣ مورد سرم آلوده به هیمنـولیپس نانـاو ١مورد تنیاساژنیاتا مورد بررسی قرارگرفت. جهت مقایسـه حساسیت دو آنتـی ژن پروتواسکـولکس و آنتـی ژن B از آزمـون آماری استفاده شد.

جدول ١: فراوانی جنسی ٢٢ بیمار هیداتیدوز تحت بررسی

جنس	تعداد	درصد
زن	١٠	۴۵/۵
مرد	١٢	۵۴/۵
کل	٢٢	١٠٠

از٢٢ مورد بیمار، ١٥ نفر(۶٨٪) دارای کیست کبدی، ۵ نفر (٢٣٪) کیست ریوی و ٢ نفـر (۵٪) کیسـت کبـد و کلیـه توام داشتند.

میزان پروتئین مایع هیداتیک در نمونه های مختلـف بـه روش برادفـورد(Bradford) انـدازه گیـری شـد کـه ایـن میـزان در کیسـت هـای مختلـف بـر حسـب عضـو آلـوده و وضـعیت بـاروری (وجـود یـا عـدم وجـود پروتواسکولکس) از ٨٠٠-١٠٠ میکروگرم در میلی لیتر بـا حد متوسط ۴۵٠- ٣۵٠ میکروگرم در میلـی لیتـر متغیـر بود.

ارزیابی آنتی ژن هایB و پروتواسکولکس بـا اسـتفاده از روش دات بلاتینگ (شکل ١): ٢٠ بیمار هیداتیکی(٩٠/٩٪) با AgB و هر ٢٢ بیمار (١٠٠٪) با آنتی ژن پروتواسکولکس واکنش مثبت داشتند. یکی ازمبتلایان به توکسوپلاسما و ٢ نفر از بیمارانی که آلـوده بـه سسـتودهای غیـر از اکینوکوکـوس گرانولوزوس بودند نیز با آنتی ژن B واکنش مثبت داشتند. هیچکدام از افرادسالم و مبتلایان به لیشـمانیوزجلدی و یـا کالاآزار بـا آنتـی ژن B واکـنش مثبـت نداشـتند. یکـی از مبتلایـان بـه لیشمانیوزاحشـایی و ٢نفـر از مبتلایـان بـه توکسوپلاسموز و ٢نفر از مبتلایان بـه هیمنـولیپس نانـا و یکی از افراد سالم نیز با آنتی ژن پروتواسـکولکس در ایـن تست واکنش مثبت داشتند (جدول ٢).

C B A

شکل ١. دات بلاتینگ

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

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

سرم های مورد آزمایش	تعداد	آنتی ژن B تعداد(درصد)	آنتی ژن پروتواسکولکس تعداد(درصد)
هیداتیدوز	۲۲	۲۰ (۹۰/۹)	۲۲ (۱۰۰)
توکسوپلاسموز	۴	۱ (۲۵)	۲ (۵۰)
سستودهای غیر از اکینوکوکوس گرانولوزوس	۴	۲ (۵۰)	۲ (۵۰)
لیشمانیوزجلدی و کالاآزار	۴	۰	۱ (۲۵)
نرمال	۴	۰	۱ (۲۵)
تعداد کل	۱۶	۳ (۱۲/۵)	۶ (۳۷)

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

جدول۳. نتایج ارزش تشخیصی آنتی ژنB و آنتی ژن پروتواسکولکس کیست هیداتیک به روش دات بلاتینگ

	حساسیت (٪)	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 آسپیراسیون 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 مورداستفاده قرار می گیرد ، دارای اجزا و ترکیبات مختلفی است که بعضی از آنها فاقد حساسیت و ویژگی لازم در تشخیص اختصاصی هیداتیدوز می باشد(۱۱،۱۵،۱۶). مطالعات مختلف نه تنها نشاندهنده وجود آنتی ژن های مشترک و واکنش متقاطع در آزمایشات سرولوژیک با بیماری های ناشی از انگلهای دیگر نظیر اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس، تنیاسولیوم ، تنیاساژیناتا، هیمنولیپیس 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 ایمونوگلبولینها 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 باسرم 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 اوریول(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 (۷،۱۷).

برای ارزیابی آنتی ژن B و آنتـی ژن پروتواسـکولکس کیسـت هیـداتیک در تشـخیص اختصاصـی هیداتیـدوز و تعیین اعتبار و ارزش تشخیص هـر کـدام از آنهـا آزمـایش دات بلات انجام شد.

طی آزمایش دات بلات از مجموع ۲۲ سـرم مبتلایـان به کیست هیداتیک ، ۲۰ مورد با آنتی ژن B و ۲۲ مورد با آنتی ژن پروتواسـکولکس واکـنش مثبـت داشـتند . علـت واکنش هـای منفـی کـاذب کـه در مطالعـه حاضـر ماننـد 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 سـرولوژیک نیـز نتـایج مثبتی نشان نداده اند. down regulation سـایتوکاین Th_2 می تواند ایـن مطلـب را توضـیح دهـد کـه چـرا بیمـاران هیداتیکی سرم منفی ، قادر به تولید آنتی بـادی در پاسـخ به انگل نیستند(۲۱).

همچنین ممکن است اختلافات در تهیـه و تخلـیص آنتی ژن B ، خصوصیات کلینیکی بیماران مثل عمر، اندازه، تعداد، مکـان، کیسـت در بـدن، دور از دسـترس سیسـتم ایمنی بودن کیست ها، کیسـت هـای بـارور و غیـر بـارور، عفونی یا سالم بودن کیست درمیـزان حساسـیت آزمـایش تاثیر داشته باشد.

از مجموع ۱۶ سرم کنترل که مربوط به بیماران دیگر و افراد نرمال بود دو نفر از مبتلایان به سستودهای دیگر و یک نفر از توکسوپلاسموز بـا آنتـی ژن B واکـنش مثبـت کاذب نشان دادند و بنابراین حساسیت و ویژگی آنتـی ژن B در این آزمـایش ۹۰/۹٪ و ۸۱٪ بـرآورد شـداین مسـئله احتمالاً بیانگر آنتی ژن های مشترک می باشد که در ایـن گروه بیماران (هیداتیکی و مبتلایان به سسـتودهای دیگـر وتوکسوپلاسموزیس حاد) یافت می گـردد کـه در تحقیـق اورتونـا نیـز گـزارش شـده اسـت(۲۱). در مـورد بیمـاران لیشمانیوزی که هیچ واکنش مثبت کاذبی بـا آنتـی ژن B ندارند احتمالاً نبودن تشابه آنتی ژن دربیمـاران مبـتلا بـه کالاآزار و یا دور از دسترس سیسـتم ایمنـی قـرار داشـتن آنتی ژنهای لیشمن در سـالک پوسـتی و در نتیجـه تولیـد نشدن آنتی بادی در این بیماران ، می توانـد علـت باشـد. (بویژه آنکه در لیشمانیوز جلدی میـزان آنتـی بـادی هـای سیستمیک میزبان در حـدی نیسـت کـه بتوانـد بـا آنتـی ژنهای کیست هیداتیک واکنش مثبت کاذب ایجاد نماید). هر چند ذکر این نکته ضروری است که بدلیل آنکـــــه احتمال آلودگی توأم هیداتیدوز و توکسوپلاسموزیس حاد یـا سیسـتی سـرکوزیس درکشـور مـا نـاچیز اسـت،ارزش تشخیصی آنتی ژن B محفوظ می ماند.

همچنین تعداد دو نفر از افراد مبـتلا بـه سسـتودهای دیگر(تنیا ساژیناتا و هیمنـولیپیس نانـا) و دو نفـر از افـراد مبتلا به توکسوپلاسموز حاد و یک نفر از افرادسالم و یـک نفـر از افـراد مبـتلا بـه لیشمانیوزاحشـایی بـا آنتـی ژن پروتواسـکولکس واکـنش مثبـت کـاذب نشـان دادنـدو در نتیجه میزان حساسیت و ویژگی آنتی ژن پروتواسـکولکس در آزمایش دات بلات۱۰۰٪ و ۶۳٪ برآورد شد. واکنشـهای مثبت کاذب نیز که در این آزمایش دیده می شود ممکـن است مربوط به تشابه آنتـی ژنـی بـا بیمـاران دیگـر ماننـد توکسوپلاسموز، لیشمانیوز و مبتلایان به سستودهای دیگر و حتـــی افـــراد نرمـــال باشـــد (۲۱) . احتمـــالا اگـــر آنتی بادی های اختصاصی با نیمه عمـر کمتـر ماننـد IgE ردیابی گردند درصد واکنش مثبت کـاذب بـه مراتـب کـم می شود.

نتیجه نهائی :

با توجه به نتایج مذکور با اینکه حساسیت ایـن آنتـی ژنهـا بوسـیله دات بـلات در تشـخیص بیمـاران مبـتلا بـه کیست هیداتیک ۹۰/۹٪ و ۱۰۰٪ بود ولی به علت واکنش متقـاطع بـا سـرم مبتلایـان بـه سسـتودهای دیگـر ، توکسوپلاسما ، لیشمانیا و سرم افراد نرمال ویژگـی آنتـی ژن B ۸۱٪ و آنتی ژن پروتواسکولکس ۶۳٪ برآورد گردیـد و اعتبار آزمایش برای آنتـی ژن B ۸۸٪ و بـرای آنتـی ژن پروتواسکولکس ۸۱/۵٪ بدست آمد. بنابراین دات بلاتینگ بـا اسـتفاده از آنتـی ژن B از ارزش تشخیصـی بهتـری برخوردار بـوده و بکـارگیری ایـن آزمـایش مـی توانـد در تشـخیص هیداتیـدوز بطـور وسـیعی بکـار گرفتـه شـود بویژه آنکه برخلاف روشهایی مانند IFAT و IHAکه نیاز به وسـایل ودسـتگاههایی دارد کـه امکـان حضـور آن در تمام مناطق وجود نـدارد روش دات بلاتینـگ در شـرایط سـاده تـری قابـل اجـرا مـی باشـد زیـرا در ایـن روش مشاهده نتیجه واکنش توسط چشم غیر مسلح نیـز امکـان پذیر می باشد.لذا با توجه به سرعت و زمـان نـاچیز انجـام آزمـایش دات بلاتینـگ ، ایـن آزمـایش مـی توانـد عـلاوه بـر اسـتفاده تشخیصـی در آزمایشـگاه هـای طبـی بـه عنوان یک متد سریع وارزان در غربـالگری اولیـه سـودمند باشد.

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 utilizating 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 assey 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, Echinococcusis/Hydatidosis: antigens, imunological 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-reactiv 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. Gottestine B. Molecular and immounological diagnosis of echinococcosis. Clin Microbiol Rev1992b; 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.