

واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌های انسانی به آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک (HCF) انسان و موش

افرا خسروی^۱، مرتضی شمسی^۲، ابراهیم بابا احمدی^۳، کورش سلیه میری^۴، کورش ساکی^۵

چکیده

مقدمه: استفاده از آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک (HCF یا Hydatid cyst fluid) در تشخیص بیماری هیداتیدوز یکی از روش‌هایی است که با بررسی‌های سروزولوژیکی به موقع می‌توان اثرات سودمندی در درمان سریع بیماری ایجاد نمود. تهیه آنتی‌ژن با منشأ انسانی مشکل می‌باشد و از نظر مالی نیز هزینه‌بر است، اما آیا در انسان و موش واکنش متقاطع به آنتی‌ژن‌های مایع کیست وجود دارد یا خیر؟ کدام آنتی‌ژن بالاترین پاسخ آنتی‌بادی انسانی را به خود اختصاص می‌دهد؟ در چه محدوده‌ای، کدام ایمونوگلوبولین برای این پاسخ‌ها ارجح‌تر است؟ این سؤالات موضوع بحث مطالعه حاضر بود.

روش‌ها: آنتی‌ژن گوسفندی برای آلودگی تجربی سه گروه موش بальب-سی و سوری مورد استفاده قرار گرفت. سرم انسان‌های بیمار جراحی شده برای کیست هیداتیک علیه آنتی‌ژن مایع انسانی و موشی مورد آزمایش قرار گرفتند. آنتی‌بادی تام و زیرکلاس‌های IgG و نیز IgE به روش ELISA اندازه‌گیری شدند. سرم موش‌های ایمن نیز از نظر IgG، IgG2b، IgE و IgGAM مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج با استفاده از آزمون‌های ANOVA و نیز POST HOC مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: IgG و IgG4 انسانی بالاترین میانگین پاسخ را علیه آنتی‌ژن‌های خام انسانی و موشی کیست هیداتیک نشان دادند. واکنش متقاطع در پاسخ انسان به هر دو آنتی‌ژن و نیز در پاسخ سرم موش به هر دو آنتی‌ژن در سطح بالایی وجود داشت، ولی علیه آنتی‌ژن موش شدت پاسخ انسان با IgG تا به مراتب بیشتر از پاسخ آنتی‌بادی انسانی به آنتی‌ژن انسانی بود. موش‌های سوری آلودگی تجربی به کیست هیداتیک را بیشتر و بهتر از بальب-سی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بین دو آنتی‌ژن هم واکنش متقاطع آنتی‌بادی انسانی و هم آنتی‌بادی موشی وجود دارد. آنتی‌ژن موش جایگزین مناسبی در طراحی کیت‌های تشخیصی کیست هیداتیک می‌تواند باشد. IgG و IgG4 بالاترین پاسخ‌ها را در این واکنش‌های متقاطع نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: کیست هیداتیک، آنتی‌ژن مایع، واکنش متقاطع.

نوع مقاله: تحقیقی

پدیرش مقاله: ۹۰/۲/۲۳

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۱۰

۱. دانشیار، گروه ایمنی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران. (نویسنده مسؤول)

Email: afra@medilam.ac.ir

۲. کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایران.

۳. استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایران.

۴. استادیار، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران.

۵. استادیار، گروه روان‌پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران.

مقدمه

کیست هیداتیک، مرحله نوزادی کرم نواری یکی نوکوکوس گرانولوزوس است. این کرم ۷-۳ میلی متری، انگل روده باریک سگ است. تخم‌های کرم همراه با مدفوع سگ آلوده دفع و در محیط خارج پراکنده می‌شوند. انسان و حیوانات با خوردن تخم‌ها به همراه آب، غذا و سبزیجات آلوده می‌شوند. در نتیجه کیست هیداتیک در بدن آن‌ها تشکیل می‌شود. علایم بالینی بیماری هیداتیدوز در انسان و حیوانات بستگی به تعداد، اندازه و محل تشکیل کیست‌ها دارد. در صورتی که کیست هیداتیک در اندام‌های حیاتی مثل مغز و قلب تشکیل شود، خطرات ناشی از بیماری جدی‌تر است (۱).

این بیماری در بیشتر نقاط جهان به ویژه در کشورهای که در آن‌ها دامپروری رایج است، شایع می‌باشد. بیماری سالیانه زبان‌های بهداشتی و اقتصادی زیادی را به دنبال دارد (۲، ۳). آلودگی به این انگل ضمن گسترش جهانی، در بیشتر مناطق گرم سیر و نیمه گرم سیر دنیا انتشار دارد. آلودگی در کشورهای حوزه مدیترانه، اروپا، آسیای مرکزی، خاورمیانه، خاور دور، روسیه، استرالیا، زلاند نو، آمریکا و آفریقا وجود دارد (۴، ۵). یکی نوکوکوزیس در ایران که از مناطق هیپر آندمیک است، از لحاظ بهداشتی، پزشکی و دامپزشکی حایز اهمیت است. جمعیت روستایی به خصوص در کشورهای توسعه نیافته که در تماس مستقیم با حیوانات اهلی و وحشی به خصوص سگ و سگ‌سانان هستند، بیشتر در معرض آلودگی قرار دارند. البته در ایران الگوی انتشار در جمعیت عشایر و زنان شهری از طریق مصرف میوه و سبزیجات آلوده می‌باشد. بیماری از تمام استان‌های کشور با بالاترین میزان آلودگی در انسان (۴/۴۵ در صد هزار) از استان خراسان و کمترین آن (۰/۱ در صد هزار) از استان هرمزگان گزارش شده است. برای کل کشور میزان متوسط موارد جراحی ۱/۲ در صد هزار تعیین شده است (۶). بیماری هیداتیدوز در ۶۰ درصد موارد، فاقد علایم بالینی است و ممکن است تا ۲۰ سال بدون علامت باقی بماند. همچنین این بیماری به دلیل استقرار انگل در ارگان‌های مختلف انسان مانند کبد، ریه، طحال، قلب، مغز،

نخاع و ... تشخیص آن دشوار است و اغلب از روش‌های پاراکلینیک مثل روش‌های سرولوژیک برای تشخیص استفاده می‌شود (۷). نظر به این که تنها راه درمان بیماری جراحی است، بنابراین تشخیص سریع و قطعی بیماری بسیار حیاتی است (۸). استفاده از آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک (HCF یا Hydatid cyst fluid) در تشخیص بیماری هیداتیدوز یکی از روش‌هایی است که با بررسی‌های سرولوژیک به موقع می‌توان اثرات سودمندی در درمان سریع بیماری ایجاد نمود. تهیه آنتی ژن با منشأ انسانی مشکل است و از نظر مالی (خرید کیت تشخیص) نیز هزینه‌بر است (۸). اگر تشخیص سرولوژیک با استفاده از آنتی ژن حیوانی در مقایسه با آنتی ژن انسانی، قابل اتکا و از درصد اعتماد بالایی برخوردار باشد، طراحی کیت تشخیصی با این نوع آنتی ژن می‌تواند روشی ساده، ارزان و در دسترس باشد. بیشتر آزمایش‌های سرولوژیک در تشخیص بیماری هیداتیدوز از مشکلات خاص، محدودیت‌ها، حساسیت و ویژگی‌های متفاوتی برخوردار هستند. برخی از این آزمایش‌ها به قابلیت‌های تکنیکی خاص و پرسنل مجرب نیاز دارند. تکنیک ELISA با آنتی ژن B مایع کیست هیداتیک در مقایسه با سایر آنتی ژن‌ها بیشترین حساسیت را دارد (۹). آزمایش ELISA برای اولین بار توسط فاراگ در تشخیص سرولوژیک کیست هیداتیک به کار رفت (۱۰). در مطالعات مختلف حساسیت آزمون ELISA به طور متوسط ۹۰-۶۰ درصد و ویژگی آن ۹۰-۷۵ مشخص شده است که بسته به نوع آنتی ژن، روش تهیه آن، منطقه جغرافیایی انجام آزمایش و بیماری‌های آندمیک منطقه متفاوت می‌باشد (۱۱-۱۳).

گاهی اوقات واکنش متقاطع در آزمایش‌های سرولوژیک رخ می‌دهد و دقت تشخیص را کاهش می‌دهد که می‌توان با انجام آزمون ایمونوبلات، با ویژگی بالا به عنوان یک آزمایش تکمیلی همراه با ELISA تشخیص را تأیید نمود (۱۱). از سوی دیگر هم، هر کدام از آنتی ژن‌ها دارای فراکشن‌های مختلف هستند. به طور مثال آنتی ژن B دارای فراکشن‌های ۸، ۱۶، ۲۴ و ۳۸ کیلودالتونی است که حساسیت هر کدام از آن‌ها

سونیکاتور که روی ۵۰ سیکل بر ثانیه و ماگزیمم تن ۳۰ ثانیه تنظیم شده بود، در حمام یخ برای ۴ بار سونیکه شد (۱۵). در مرحله بعد به منظور تغلیظ پروتئین‌ها، عمل دیالیز انجام شد (۸). سپس عصاره‌های سوماتیک دیالیز شده در این مرحله با روش براد فورد مورد سنجش پروتئین قرار گرفت (۱۶). این مایع به عنوان منبع آنتی ژن مایع جهت اقدامات بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

پروتواسکولکس‌های ته‌نشین شده جهت انجام آزمایش وایابلیتی (باروری) به لوله‌های استریل منتقل شد.

ب) روش آماده‌سازی کیسه‌های دیالیز:

به منظور حذف املاح و مولکول‌های کوچک از مایع هیداتیک، ابتدا قطعات مورد لزوم از تیوب دیالیز با نقطه برش (Cut off) ۱۲ کیلودالتون بریده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر جوشانده شد تا حالت چسبندگی کیسه از بین برود و دو انتهای آن کاملاً باز شود. سپس با اطمینان حاصل کردن از عدم پارگی کیسه‌ها، بعد از ریختن مایع کیست هیداتیک به داخل تیوب و گره زدن دو طرف آن، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مقابل آب مقطر دیالیز گردید. روزی ۳ مرتبه آب مقطر داخل ظروف تعویض شد.

ج) آلوده کردن موش‌ها جهت به دست آوردن مایع کیست هیداتیک

مدل آزمایشگاهی کیست هیداتیک در موش به وسیله محققین مختلف طراحی شده است (۱۸، ۱۷، ۱۳). مطالعات قبلی نشان دادند که موش‌های بلب-سی (Balb/C) حساسیت بالایی نسبت به عفونت کیست هیداتیک دارند و برای مطالعات ایمونولوژیک این انگل مناسب‌تر می‌باشند (۱۲). موش‌های بلب-سی و موش سوری مورد استفاده در این تحقیق، از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. در این مطالعه از سه گروه ده تایی از موش‌های بلب-سی که سن آنان ۶ هفته و از جنس نر بودند، استفاده شد. برای مقایسه وضعیت پاسخ‌دهی سیستم ایمنی و مدت زمان تشکیل

در تشخیص بیماری می‌تواند متفاوت باشد. این فراکشن‌ها نیز در هر حیوانی دارای حساسیت‌های متفاوتی هستند (۹). از این رو یافتن آنتی ژنی که در پاسخ به سرم حیوانات مختلف دارای فراکشنی با حساسیت و ویژگی بالا باشد، پیشرفت چشمگیری در خصوص ابداع یک روش ارزان و تکامل یک کیت ساده محسوب می‌شود. از طرف دیگر، هر کدام از کلاس‌ها و زیرکلاس‌های برخی از ایمونوگلوبولین‌ها، نقش ویژه‌ای در تشخیص بیماری هیداتیدوز دارند که یافتن نوع آنتی ژن و کلاس مناسب آنتی‌بادی نیز کمک‌کننده می‌باشد (۱۴).

اما آیا در انسان و موش واکنش مقاطع به آنتی ژن‌های مایع کیست وجود دارد یا خیر؟ کدام آنتی ژن بالاترین پاسخ آنتی‌بادی انسانی را به خود اختصاص می‌دهد؟ در چه محدوده‌ای، کدام ایمونوگلوبولین برای این پاسخ‌ها ارجح‌تر است؟ این سؤالات موضوع بحث مطالعه حاضر است.

روش‌ها

این مطالعه از نوع تحلیلی می‌باشد. نمونه‌های مورد آزمایش، نمونه‌های مایع کیست هیداتیک موش و انسان است که به عنوان منبع آنتی ژن مورد استفاده قرار گرفت. از نمونه‌های سرمی موش و انسان نیز به عنوان آنتی‌بادی استفاده شد.

الف) روش تهیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک

مایع کیست هیداتیک تازه جمع‌آوری شده از کیست‌های هیداتیک بارور انسان و موش با نیروی $3000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. این عمل باعث رسوب پروتواسکولکس‌ها و ذرات معلق گردید. مایع رویی جدا شد. سپس در لوله‌های فالكون استریل نگهداری گردید. از مایع جمع‌آوری شده کیست هیداتیک گوسفند به خاطر استحصال پروتواسکولکس‌های سالم جهت تزریق به موش‌ها و ایجاد عفونت ثانویه در موش‌ها نیز استفاده شد که در این مورد مایع به مدت ۲-۳ دقیقه با سرعت $1500 \times g$ سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی نمونه‌ها با استفاده از انجماد و ذوب مکرر در تانک ازت مایع هموژنیزه شد. سپس محلول حاصل به وسیله دستگاه

نمونه‌های سرم مثبت موش نیز از موش‌های ایمن شده تهیه شدند. نمونه‌های سرم شاهد منفی نیز از افراد سالم و موش‌های سالم که پیشتر تهیه و نگهداری شده بودند، تهیه شدند.

تعیین غلظت آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان

ابتدا با استفاده از بافر PBS استریل و محلول کار براد فورد، رقت‌های مختلفی از آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان تهیه گردید. OD رقت‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت و ثبت شدند. سپس غلظت آنتی‌ژن محاسبه شد و از طریق نمودار مربوطه کنترل گردید. غلظت آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان ۱/۲ میکروگرم برای هر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

روش انجام ELISA

پس از تهیه آنتی‌ژن به نسبت خالص، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی‌ژن (با غلظت ۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) و بافر کوت‌کننده کربنات (۱ مولار، $\text{pH} = 9/6$) تهیه و به همه چاهک‌های ظرف پلی‌استیرینی اضافه شد. سپس ظرف به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو ۲۰۰ میکرولیتر محلول مسدودکننده بافر TBST (۲۰ Tris buffered saline, tween) همراه با شیر خشک بدون چربی ۱ درصد به چاهک‌ها اضافه شدند. سپس ظرف به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو، سرم با رقت ۱:۱۰۰ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشوی دوباره و اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی‌های کنژوگه با HRP (Horseradish peroxidase) با رقت ۱:۱۰۰۰ Invitrogen به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. دوباره پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای (ABTS) [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] تهیه شده از شرکت سیگما با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در

کیست، نیز ۳۰ سر موش سوری نر به همراه موش‌های بالب-سی، مورد آزمایش قرار گرفتند.

ایمن کردن موش‌ها بر اساس روش (Wulamu mamuti) با تغییرات مختصری به شرح زیر انجام شد (۸).

ابتدا موش‌ها از حیوان‌خانه خارج شدند و به محل آزمایشگاه جهت انجام عملیات واکسیناسیون و تلقیح منتقل شدند. سپس گروه‌بندی آن‌ها صورت گرفت. برای انجام عمل تلقیح، هر کدام از موش‌ها در داخل رک مخصوص قرار گرفتند.

گروه مورد ۱: موش‌ها ابتدا به صورت تزریق داخل صفاقی، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک که به روش Lightowers آماده‌سازی شده بود و حاوی ۱۰ میکرولیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند بود، دریافت نمودند (۱۹). ۴ هفته بعد تزریق مشابه ولی با ادجوانت ناکامل فروند دریافت نمودند. ۲ هفته پس از آخرین تزریق مقدار ۲۰۰ میکرولیتر مایع کیست هیداتیک که حاوی ۲۰۰۰ عدد پروتواسکولکس زنده بود، دریافت نمودند.

گروه مورد ۲: تزریق داخل صفاقی، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌ژن سطحی گوسفندی استخراج شده به همراه ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند دریافت کردند. چهار هفته بعد، ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت ناکامل فروند به همراه ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌ژن به عنوان یادآور به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

گروه شاهد: گروه شاهد با تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند و ۱۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین (PBS) یا (Phosphate buffered saline) واکسینه شدند. چهار هفته بعد نیز ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت ناکامل فروند با ۱۰۰ میکرولیتر PBS به عنوان یادآور به صورت داخل صفاقی به آن‌ها تزریق گردید.

(د) تهیه نمونه‌های سرم:

نمونه‌های سرم از بیماران مبتلا به کیست هیداتید که ابتلای آن‌ها به بیماری توسط پزشک معالج و انجام آزمایشات سرولوژیکی مربوطه قطعی شده بود، جمع‌آوری شدند.

از تعداد ۱۰ موش تزریق شده پس از مدت زمان ۹-۶ ماه، فقط (۳۳/۳۳ درصد) آلوده شدند. بیشترین موضع آلودگی کیست هیداتیک، کیست کبدی و شکمی بود. طولانی ترین مدت زمان برای آلودگی موش بـالـب- سی ۹ ماه و کوتاه ترین زمان، ۶ ماه بود. بهترین موضع کیست ایجاد شده، کیست شکمی بود.

آزمون ELISA: پاسخ آنتی بادی های انسانی در دو گروه مورد و شاهد به آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان

میانگین OD آنتی بادی های انسانی علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان در یک گروه مورد ۳۰ نفره از افراد مبتلا به کیست هیداتیک که این بیماران جراحی شدند، به روش ELISA مورد ارزیابی قرار گرفتند. در بین زیرکلاس های IgG بالاترین میزان میانگین OD در پاسخ به آنتی ژن مایع کیست هیداتیک انسانی مربوط به IgG^۴ و پایین ترین میانگین OD مربوط به IgG^۳ بود (جدول ۱ و ۲). میانگین به دست آمده از تمامی آنتی بادی ها در پاسخ به آنتی ژن انسانی بالاتر از میزان محاسبه شده Cut off برای آن ها بود. بنابراین همه نمونه سرم ها مثبت تلقی می شوند. با انجام آنالیز واریانس برای داده های به دست آمده، مشاهده گردید که اختلاف میانگین OD آنتی بادی های انسانی علیه آنتی ژن مایع کیست هیداتیک از نظر آماری کاملاً معنی دار است ($P < 0.001$)؛ به عبارت دیگر، پاسخ ایمنی هومورال انسانی علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک از نظر نوع آنتی بادی کاملاً متفاوت می باشد. بهترین پاسخ در بین زیرکلاس های IgG مربوط به IgG^۴ می باشد، اما IgE هم پاسخی بالاتر از دیگر زیرکلاس های IgG داده است (جدول ۲).

میلی لیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. قبل از ریختن محلول ABTS به چاهک ها، مقدار ۵ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد به ازای ۱۰ میلی لیتر از محلول ABTS، به چاهک ها اضافه شد و بعد از به هم زدن، سریع و با ترتیب منظم به درون هر یک از چاهک ها ABTS ریخته شد. درب پلیت بسته و در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. واکنش بعد از مدت ۱۵ دقیقه انکوباسیون، با افزودن ۵۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده اسید سولفوریک ۲ نرمال به ازای هر چاهک به پایان رسید. میزان جذب نوری (OD یا Optical density) در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه سنجش ELISA (ELISA-reader)، مدل ۶۵۰ Bio-Rad) اندازه گیری شد.

برای تعیین سطح حداقل (Cut off) در این تحقیق، از تعداد ۳۰ نمونه سرم برای انسان و موش که قطعاً فاقد بیماری کیست هیداتیک بودند، استفاده شد. برای این نمونه ها، آزمایش ELISA گرفته شد. سپس از میزان جذب این نمونه ها، میانگین و انحراف معیار محاسبه شد. در آخر میانگین به اضافه دو برابر انحراف معیار به عنوان سطح حداقل تعیین شد.

یافته ها

آلودگی موش های سوری و بالـب- سی

از تعداد ۱۰ سر موش سوری مورد تزریق با پروتواسکولکس های تازه جدا شده از مایع کیست های هیداتیک کبدی و ریوی گوسفند، هر ۱۰ سر (۱۰۰ درصد) پس از گذشت مدت زمان ۹-۶ ماه، آلوده شدند. بهترین و بیشترین میزان آلودگی تشکیل کیست هیداتیک در ناحیه کبد و بعد در ناحیه شکمی نمایان گردید. در حالی که برای موش های بالـب- سی

جدول ۱: نتایج ELISA گروه شاهد، کویتینگ با آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک

Cut off	Range	Number	Max	Min	Std.Deviation	Mean	OD	Ab
۰/۰۸	۰/۱	۲۴	۰/۱۱	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۴		IgG
۰/۱۲	۰/۱۳	۲۴	۰/۱۳	.	۰/۰۴	۰/۰۴		IgG ^۲
۰/۱۱	۰/۱۲	۲۴	۰/۱۲	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۵		IgG ^۳
۰/۱۵	۰/۱۵	۲۴	۰/۱۵	.	۰/۰۴	۰/۰۹		IgG ^۴
۰/۰۶	۰/۰۶	۲۴	۰/۰۶	.	۰/۰۴	۰/۰۲		IgE

P = ۰/۰۰۱، F = ۱۵/۹۸

جدول ۲: نتایج ELISA گروه مورد، فرایند کوتینگ با آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان

Cut off	Range	Number	Max	Min	Std.Deviation	Mean	OD	Ab
۰/۰۸	۰/۰۸	۲۸	۰/۴۷	۰/۳۹	۰/۰۲	۰/۴۲		IgG
۰/۱۲	۰/۱۹	۳۰	۰/۴۱	۰/۲۲	۰/۰۴	۰/۳۴		IgG۲
۰/۱۱	۰/۲۶	۳۰	۰/۳۸	۰/۱۲	۰/۰۴	۰/۱۶		IgG۳
۰/۱۵	۰/۶۸	۳۰	۱/۹۹	۱/۳۱	۰/۱۸	۱/۵۸		IgG۴
۰/۰۶	۰/۶۲	۳۰	۰/۷۶	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۴۹		IgE

$P < ۰/۰۰۱$, $F = ۷۲۵/۳۸$

بعد از ۹-۶ ماه از طریق جراحی اثبات گردید. در این بررسی، آنتی بادی پلی کلونال IgGAM بیشترین پاسخ را علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسانی نسبت به دیگر آنتی بادی‌ها از خود نشان داد. اما در بین آنتی بادی‌های مونوکلونال، IgG2b بالاترین میزان OD را نشان داد. با توجه به این که میانگین ODهای به دست آمده بالاتر از میزان Cut off محاسبه شده می‌باشد، از این رو تمام نمونه‌ها مثبت تشخیص داده شدند (جدول ۳ و ۴). انجام آنالیز واریانس، تفاوت معنی‌دار بین میزان میانگین OD آنتی بادی‌های موشی علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسانی نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$). میزان حساسیت و ویژگی محاسبه شده برای پاسخ آنتی بادی‌های IgE، IgG، تام، IgGAM و زیرکلاس IgG2b موش علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان در آزمون ELISA ۱۰۰ درصد تعیین گردید.

در بررسی پاسخ IgG تام انسانی به آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسانی با استفاده از آزمون ELISA، در بین گروه‌های مورد و شاهد حساسیت آزمایش با استفاده از انتقال نقاط برش OD، ۱۰۰ درصد و ویژگی آن برابر ۹۵/۸ درصد محاسبه گردید.

آزمون ELISA: پاسخ آنتی بادی‌های موش در دو گروه مورد و شاهد به آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان

در ادامه بررسی، نحوه واکنش آنتی بادی‌های IgG، IgE، IgGAM و زیرکلاس IgG2b در موش‌های بالب-سی و سوری به آنتی ژن‌های خام مایع کیست هیداتیک انسانی با آزمون ELISA مورد ارزیابی قرار گرفتند. این موش‌ها از طریق تزریق پروتواسکولکس‌های استحصال شده، مبتلا به عفونت ثانویه کیست هیداتیک شده بودند و وجود کیست‌ها

جدول ۳: میانگین OD پاسخ آنتی بادی‌های موش‌های سوری و Balb/C علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان (گروه شاهد)

Cut off	Range	Number	Max	Min	Std.Deviation	Mean	OD	Ab
۰/۰۴	۰/۰۳	۳۰	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲		IgG
۰/۰۵	۰/۰۴	۳۰	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳		IgG2b
۰/۰۴	۰/۰۴	۳۰	۰/۰۴	۰	۰/۰۱	۰/۰۲		IgE
۰/۰۷	۰/۰۶	۳۰	۰/۰۷	۰	۰/۰۲	۰/۰۳		IgGAM

$P = ۰/۱۴۶$, $F = ۱/۸۹$

OD: Optical density

جدول ۴: میانگین OD پاسخ آنتی بادی های موش های سورى و Balb/C علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان (گروه مورد)

Cut off	Range	Number	Max	Min	Std.Deviation	Mean	OD	Ab
۰/۰۴	۰/۱۲	۳۰	۰/۲۶	۰/۱۵	۰/۰۳	۰/۱۸		IgG
۰/۰۵	۰/۲۶	۳۰	۰/۶۷	۰/۴۲	۰/۰۶	۰/۴۶		IgG2b
۰/۰۴	۰/۰۹	۳۰	۰/۳	۰/۲۱	۰/۰۳	۰/۲۵		IgE
۰/۰۷	۰/۱۶	۳۰	۰/۹۱	۰/۷۵	۰/۰۵	۰/۸۴		IgGAM

P = ۰/۰۰۱, F = ۶۴۵/۱

جدول ۵: میانگین OD پاسخ آنتی بادی های انسان علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک موش (گروه مورد)

Cut off	Range	Number	Max	Min	Std.Deviation	Mean	OD	Ab
۰/۰۶	۰/۵	۳۰	۰/۹۹	۰/۴۹	۰/۱۴	۰/۷۱		IgG
۰/۱۲	۰/۰۵	۳۰	۰/۱۷	۰/۱۲	۰/۰۲	۰/۱۴		IgG۲
۰/۱۶	۰/۰۱	۳۰	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۰۰۴	۰/۱۲		IgG۳
۰/۰۴	۰/۹	۳۰	۰/۹۷	۰/۰۷	۰/۳۶	۰/۲۹		IgG۴
۰/۱۱	۰/۰۴	۳۰	۰/۱۴	۰/۱	۰/۰۱	۰/۱۲		IgE

ویژگی آن نیز ۱۰۰ درصد محاسبه گردید. همچنین حساسیت و ویژگی برای پاسخ IgG۲ انسانی به آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک موش ها با استفاده از روش ELISA در بین گروه های مورد و شاهد به ترتیب برابر ۹۰ و ۱۰۰ درصد محاسبه گردید. این نسبت ها برای IgG۳ و IgG۴ به ترتیب برابر ۱۰۰ درصد حساسیت و ۱۰۰ درصد ویژگی و برای پاسخ IgE انسان علیه آنتی ژن خام مایع هیداتیک موش ها، حساسیت و ویژگی آزمایش ELISA به ترتیب برابر ۷۰ و ۱۰۰ درصد تعیین شد.

جداول ۵ و ۶ داده های مربوط به میانگین OD پاسخ آنتی بادی های انسان علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک موش را در دو گروه مورد و شاهد نشان می دهند. بیشترین مقدار OD مربوط به پاسخ IgG تام و IgG۴ علیه آنتی ژن موش است. در بررسی شدت پاسخ IgG تام انسانی به آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک موش - سی و سورى به روش ELISA در بین گروه های مورد و شاهد، حساسیت آزمایش با استفاده از انتقال نقاط برش میانگین OD ها، برابر ۱۰۰ درصد و

جدول ۶: میانگین OD پاسخ آنتی بادی های انسان علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک موش (گروه شاهد)

Cut off	Range	Number	Max	Min	Std.Deviation	Mean	OD	Ab
۰/۰۶	۰/۰۴	۳۰	۰/۰۴	۰	۰/۰۲	۰/۰۲		IgG
۰/۱۲	۰/۰۹	۳۰	۰/۱۱	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۶		IgG۲
۰/۱۶	۰/۱۳	۳۰	۰/۱۳	۰	۰/۰۴	۰/۰۴		IgG۳
۰/۰۴	۰/۰۴	۳۰	۰/۰۴	۰	۰/۰۱	۰/۰۲		IgG۴
۰/۱۱	۰/۰۸	۳۰	۰/۰۹	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۵		IgE

با انجام آزمون Post Hoc، ارتباط بین پاسخ IgG تام انسان علیه آنتی ژن موش از نظر آماری معنی دار به دست آمد ($P < 0/001$). همچنین آزمون Post Hoc برای بررسی ارتباط بین آنتی ژن ها با یکدیگر در پاسخ به IgG تام موش مورد ارزیابی قرار گرفت که حاصل آن وجود رابطه معنی دار بین آنتی ژن انسان با آنتی ژن موش ($P < 0/018$) بود.

بحث

آلودگی موش ها

بررسی کیست هیداتیک در حیوانات مختلف از آن جهت مهم می باشد که این بیماری انگلی در طیف وسیعی از میزبانان واسط انتشار دارد. خود این حیوانات قادرند سیکل این بیماری مهلک را در طبیعت حفظ نمایند اما مطالعه انگل در این حیوانات کاری بس دشوار است. اکثر محققان برای بررسی رشد کیست هیداتیک در حیوانات آزمایشگاهی، از پروتواسکولکس که کم خطر می باشد، استفاده می نمایند. یکی از ساده ترین راه ها برای مطالعه خصوصیات فیزیولوژیکی، ایمونولوژیکی و اثرات پیش گیری و درمانی انگل، مطالعه بر روی موش های آزمایشگاهی است. برای این منظور آلوده کردن موش آزمایشگاهی بهترین راه است اما شکلی که فرا روی محقق وجود دارد طولانی بودن زمان آلودگی است که به طور معمول برای موش های Balb/C بین ۹-۳ ماه می باشد. از طرف دیگر موش بالب- سی هم گران و هم حساس است. از این رو نگهداری آن نیز دشوار است. اما مطالعاتی که تاکنون برای آلودگی موش صورت گرفته است، بیشتر در موش های بالب- سی صورت گرفته است (۲۰-۱۸). دلیل انتخاب موش بالب- سی برای آلودگی، حساسیت بالای حیوان نسبت به عفونت کیست هیداتیک می باشد. همچنین برای مطالعات ایمونولوژیک انگل مناسب می باشد (۱۳). آزمایش انجام شده توسط رفیعی و Craig، مشخص نمود که کیست هیداتیک ایجاد شده در موش بالب- سی، به صورت توده های سفید رنگ به اندازه ۲-۳ میلی متر و بیشتر از نوع کیست شکمی می باشد. میزان آلودگی موش به کیست

هیداتیک نیز بعد از ۴۶ هفته ۹۲ درصد گزارش شد (۲۱). در صورتی که مطالعه ما نشان می دهد که در موش های بالب- سی بالاترین میزان آلودگی در ناحیه کبد است و تشکیل اولیه کیست و آلوده شدن موش ها در مدت زمان ۳ ماهگی آشکار می شود. اما استحصال مایع کیست در ۹ ماهگی و بعد از آن صورت گرفت. میزان آلودگی آنان به کیست هیداتیک ۳۳/۳ درصد است که رقم بالایی نمی باشد. آن چه به نظر می رسد در این مطالعه امتیازی محسوب گردد، توفیق در آلودگی بیشتر و بهتر موش های سوری است که دلیل آن دو نکته می تواند باشد. اول استحصال پروتواسکولکس های زیاد از جداره داخلی کیست هیداتیک گوسفندی در نمونه ای که قرار است به موش تزریق شود. دوم تزریق یادآوری به موش ها که در فاصله هفتگی صورت گرفت و باعث آلودگی بیشتر و بهتر موش ها گردید. در حالی که محققانی همچون Dempster و همکاران عنوان نمودند که موش بالب- سی بهترین موش برای مطالعات تحقیقاتی در هیداتیدوز است (۱۳)، تحقیق حاضر اثبات کرد که موش سوری در شرایط مساعد به مراتب نتایج بهتری را ارائه می نماید.

ELISA

در پاسخ سرم انسان به آنتی ژن های خام مایع کیست هیداتیک انسانی، بالاترین پاسخ مربوط به زیرکلاس IgG^۴ بود که این نتایج با نتایج Siracusano و همکاران (۲۲)، Dreweck و همکاران (۲۳) و Grimm و همکاران (۲۴)، Sbihi و همکاران (۲۵) و Khabiri و همکاران (۲۶) همخوانی داشت. IgG^۴ انسانی علیه آنتی ژن موش نیز پاسخ بالاتر از بقیه زیرکلاس ها نشان داد. بنابراین می توان به راحتی در خصوص این که بیشترین میانگین OD ایجاد شده مربوط به IgG^۴ و IgG تام علیه این دو آنتی ژن متفاوت می باشد، اظهار نظر نمود. مثل این که Cross-reaction پاسخ های سرم انسانی علیه هر دو آنتی ژن مایع کیست هیداتیک انسان و موش وجود دارد. اما نکته قابل توجه میزان OD یا شدت پاسخ است که در آنتی ژن های بررسی شده به

مختلف به وجود می‌آید. به گونه‌ای که می‌توان از یک آنتی ژن خاص که دارای شرایط لازم برای ایجاد پاسخ سرم انسانی است، استفاده نمود. این آنتی ژن که می‌تواند آنتی ژن مایع کیست هیداتیک انسان یا موش باشد، از حساسیت و ویژگی خاص خود نیز برخوردار است. اگر بهترین پاسخ و بالاترین شدت پاسخ مد نظر قرار گیرد، به طور قطع آنتی ژن انسان با استفاده از IgG⁴ به عنوان انتخاب اصلی و آنتی ژن موشی با استفاده از IgG تام به عنوان آنتی بادی رفرانس مدنظر قرار می‌گیرد. مطالعاتی که توسط Sbihi و همکاران انجام شدند، نیز نتایج این مطالعه را تأیید می‌نمایند (۲۵). در این مطالعات آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسانی و آنتی ژن B به عنوان منبع آنتی ژنی است که آنتی بادی‌های تام IgG و IgE علیه آنتی ژن‌های مورد نظر دارای بیشترین پاسخ ایمنولوژیک هستند (۲۵). در مطالعه‌ای که توسط Grimm و همکاران بر روی آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک بیماران مبتلا به هیداتیدوز صورت گرفت، دریافتند که به ترتیب IgG⁴ بیشترین پاسخ و نسبت به IgG² و IgG³ کمترین پاسخ را علیه آنتی ژن‌های خام و تخلیص شده مایع کیست هیداتیک، ایجاد می‌نماید (۲۴). نتایج این مطالعات نشان دادند که مطالعه کنونی می‌تواند فصل خطایی برای انتخاب آنتی ژن و آنتی بادی در طراحی کیت تشخیصی باشد.

نتیجه‌گیری

آنتی ژن مایع کیست هیداتیک انسان و موش واکنش متقاطع دارند. در مواردی آنتی ژن موش ارجحیت دارد و می‌تواند در طراحی کیت هیداتیک مورد استفاده قرار گیرد. در طراحی کیت‌های تشخیصی می‌توان از IgG تام و IgG⁴ استفاده نمود. موش‌های سوری می‌توانند مورد مناسبی برای آلودگی‌های تجربی باشند.

شرح زیر می‌باشد (شدت واکنش برابر است با OD علیه هر آنتی ژن تقسیم بر Cut off آن آنتی ژن). شدت پاسخ IgG⁴ انسانی به آنتی ژن انسانی و موشی با آنتی ژن انسان: $10/5 \approx 1/15$ / $1/58$ ، آنتی ژن موش: $7/25 \approx 0/4$ / $0/29$ برابر است.

همان گونه که از محاسبات فوق پیدا است، شدت پاسخ آنتی بادی انسانی علیه آنتی ژن انسان بالاتر از آنتی ژن موش است اما این نکته به هیچ وجه ارزش آنتی ژن موش را که OD آنتی بادی انسان علیه آن ۷ برابر بالاتر از Cut off است را از بین نمی‌برد. مزیت این مطالعات نیز همین است که بر اساس نتایج اگر نتوان از آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان استفاده نمود، کیست هیداتیک موش نیز دارای ارزش بالایی می‌باشد. در شرایط طبیعی ۷ برابر Cut off مربوط، ایجاد پاسخ می‌نماید. بنابراین انتخاب مناسبی برای طراحی کیت‌های تشخیص در مقیاس‌های کوچک متناسب با نیاز و توانمندی منطقه می‌باشد.

این شدت پاسخ برای IgG تام هم به شرح زیر محاسبه شد.

IgG انسانی به آنتی ژن انسانی: $5/25 = 0/08$ / $0/42$

IgG انسانی به آنتی ژن موش: $12 = 0/6$ / $0/72$

همان گونه که مشخص است شدت پاسخ IgG انسانی به آنتی ژن موش بیشتر از آنتی ژن انسانی است و حتی بیش از دو برابر آنتی ژن انسانی است.

نکته دیگر که آن هم قابل توجه است، حساسیت و ویژگی آزمایش‌های تشخیصی است که در مطالعه حاضر مدنظر قرار گرفت. همان گونه که پیش‌تر ذکر شد، برای IgG⁴ و آنتی ژن‌های مختلف حساسیت ۱۰۰ درصد به دست آمد. ویژگی نیز رقم بسیار قابل قبولی به دست آمد. به عنوان یک نتیجه کلی در این مبحث می‌توان گفت که فرضیات مطالعه ما به اثبات رسید. واکنش متقاطع بین آنتی ژن‌های

References

1. Roberts LS, Schmidt GD, Janovy J. Foundations of Parasitology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Higher Education; 2005. p. 338-41.
2. Thompson RC. Biology and systematic of Echinococcus. In: Thompson RC, Lymbery AJ, Editors. Echinococcus

- and hydatid disease. Oxford: CAB International; 1995. p. 1-50.
3. Todorov T, Boeva V. Human echinococcosis in Bulgaria: a comparative epidemiological analysis. *Bull World Health Organ* 1999; 77(2): 110-8.
 4. Eslami A. *Veterinary Helminthology, Cestodes*. 3rd ed. Tehran: University of Tehran Publication; 2005.
 5. Scantz PM, Chai J, Echert A, Craig PS. Epidemiology and control of hydrated disease. In: Thompson RC, Lymbery AJ, Editors. *Echinococcus and hydatid disease*. Oxford: CAB International; 1995. p. 232-74.
 6. Mobedi I, Dalimi Asl A. *Epidemiology of Hydatid Cyst in Iran and World*. Tehran: Moghaddam Publication; 1994. p. 132-47.
 7. McManus DP, Smyth JD. Hydatidosis: changing concepts in epidemiology and speciation. *Parasitol Today* 1986; 2(6): 163-8.
 8. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 54(2): 165-73.
 9. Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 57(2): 231-9.
 10. Bowles J, Blair D, McManus DP. Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 1994; 109(Pt 2): 215-21.
 11. Thompson RC, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 2002; 18(10): 452-7.
 12. Thompson RC, Lymbery AJ, Constantine CC. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 1995; 35: 145-76.
 13. Dempster RP, Berridge MV, Harrison GB, Heath DD. *Echinococcus granulosus*: development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies. *Int J Parasitol* 1991; 21(5): 549-54.
 14. Pednekar RP, Gatne ML, Thompson RC, Traub RJ. Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Vet Parasitol* 2009; 165(1-2): 58-65.
 15. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2003; 127(Pt 3): 207-15.
 16. Eckert J, Thompson RC. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop* 1997; 64(1-2): 19-34.
 17. Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakaya K, Nakao M, Lightowlers MW, et al. Usefulness of hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic Echinococcosis in humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(3): 573-6.
 18. Zhang W, You H, Li J, Zhang Z, Turson G, Aili H, et al. Immunoglobulin profiles in a murine intermediate host model of resistance for *Echinococcus granulosus* infection. *Parasite Immunol* 2003; 25(3): 161-8.
 19. Lightowlers MW, Liu DY, Haralambous A, Rickard MD. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 37(2): 171-82.
 20. Fotiadis C, Sergiou C, Kirou J, Troupis TG, Tselentis J, Doussaitou P, et al. Experimental echinococcus infection in the mouse model: pericystic cellular immunity reaction and effects on the lymphoid organs of immunocompetent and thymectomized mice. *In Vivo* 1999; 13(6): 541-6.
 21. Rafee A, Craig PS. *Echinococcus Granulosis in Laboratorial animals*. *Journal of Veterinary Research* 2003; 58(3): 227-30.
 22. Siracusano A, Buttari B, Delunardo F, Profumo E, Margutti P, Ortona E, et al. Critical points in the immunodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. *Parassitologia* 2004; 46(4): 401-3.
 23. Dreweck CM, Luder CG, Soboslay PT, Kern P. Subclass-specific serological reactivity and IgG4-specific antigen recognition in human echinococcosis. *Trop Med Int Health* 1997; 2(8): 779-87.
 24. Grimm F, Maly FE, Lu 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.
 25. Sbihi Y, Janssen D, Osuna A. Specific recognition of hydatid cyst antigens by serum IgG, IgE, and IgA using western blot. *J Clin Lab Anal* 1997; 11(3): 154-7.
 26. Khabiri AR, Bagheri F, Assmar M, Siavashi MR. Analysis of specific IgE and IgG subclass antibodies for diagnosis of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol* 2006; 28(8): 357-62.

Cross Reaction of Human Antibody to Hydatid Cyst Fluid Antigens of Human and Mice

**Afra Khosravi¹, Mortaza Shamsi², Ebrahim Babaahmadi³,
Kourosh Salyemiri⁴, Kourosh Saki⁵**

Abstract

Background: The aim of the current study was to assess the cross reaction of the crude hydatid cyst fluid (HCF) antigens of *Echinococcus granulosus*, obtained from mice experimentally infected with hydatid cyst and from naturally infected human using sera of infected human who had surgery at different hospitals in Iran.

Methods: hydatid cysts obtained from lungs and livers of naturally infected sheep slaughtered from local abattoirs in Ilam, Iran. HCF recovered from cysts was centrifuged at 10000 rpm for 25 minutes. The supernatant was dialysed against PBS, freeze-thawed and used as crude HCF.

Findings: HCFs obtained from two different host species were highly useful for ELISA and most sera from CE patients equally recognized the HCF antigen of both mice and human. Mice sera showed a cross-reaction with human sera in recognition of HCF antigens of echinococcosis. IgG4 was the highest IgG subclass recognizing HCF of both mice and human HCF. Human IgG was high in response to both antigens while the OD ratio was two times using human IgG against mice antigen compared to human antigen.

Conclusion: IgG and IgG4 of human sera are reacting against both mice and human HCF with the greatest response from IgG total to mice HCF. Cross reaction of human IgG and IgG4 was observed for both mice and human HCF. Mice HCF can be relied on as an appropriate antigen in detection of human hydatidosis.

Key words: Hydatid Cyst, Hydatid cyst fluid (HCF), IgG, Cross reaction.

* This article derived from master thesis.

1- PhD, Department of Immunology, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran. (Corresponding Author), Email: afra@medilam.ac.ir

2- MSc, Department of Parasitology, School of Veterinary Sciences, Ilam University, Ilam, Iran.

3- Assistant Professor, PhD, Department of Pathology, School of Veterinary Sciences, Ilam University, Ilam, Iran.

4- Assistant Professor, PhD, Department of Epidemiology, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.

5- Assistant Professor, Department of Psychology, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.