

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

افرا خسروی<sup>۱</sup>، مرتضی شمسی<sup>۲</sup>، ابراهیم بابا احمدی<sup>۳</sup>، کورش سلیه میری<sup>۴</sup>، کورش ساکی<sup>۵</sup>

## 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 سرولوژیکی 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 سوالات موضوع بحث مطالعه حاضر بود.

**روش‌ها:** آنتی‌ژن گوسفندی برای آلدگی تجربی سه گروه موش بالب-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 بالای وجود داشت، ولی علیه آنتی‌ژن موش شدت پاسخ انسان با IgG تام به مرتب بیشتر از پاسخ آنتی‌بادی انسان به آنتی‌ژن انسانی بود. موش‌های سوری آلدگی تجربی به کیست هیداتیک را بیشتر و بهتر از بالب-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 تام و IgG4 بالاترین پاسخ‌ها را در این واکنش‌های متقاطع نشان دادند.

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

**نوع مقاله:** تحقیقی

پذیرش 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، ایلام، ایران.

**مقدمه**

نخاع و ... تشخیص آن دشوار است و اغلب از روش‌های پارا کلینیکی 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 آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک (HCF) در تشخیص بیماری هیداتیدوز یکی از روش‌هایی است که با بررسی‌های سرولوژیکی به موقع می‌توان اثرات سودمندی در درمان سریع بیماری ایجاد نمود. تهیه آنتی‌ژن با منشأ انسانی مشکل است و از نظر مالی (خرید کیت تشخیص) نیز هزینه‌بر است (۸). اگر تشخیص سرولوژیکی با استفاده از آنتی‌ژن حیوانی در مقایسه با آنتی‌ژن انسانی، قابل اتکا و از درصد اعتماد بالایی برخوردار باشد، طراحی کیت تشخیصی با این نوع آنتی‌ژن 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 آنتی‌ژن B مایع کیست هیداتیک در مقایسه با سایر آنتی‌ژن‌ها بیشترین حساسیت را دارد (۹). آزمایش ELISA برای اولین بار توسط فاراگ در تشخیص سرولوژیکی کیست هیداتیک به کار رفت (۱۰). در مطالعات مختلف حساسیت آزمون ELISA به طور متوسط ۶۰-۹۰ درصد و ویژگی آن ۷۵-۹۰ مشخص شده است که بسته به نوع آنتی‌ژن، روش تهیه آن، منطقه جغرافیایی انجام آزمایش و بیماری‌های آندمیک منطقه متفاوت می‌باشد (۱۱-۱۳).

گاهی اوقات واکنش متقاطع در آزمایش‌های سرولوژیکی 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 آنتی‌ژن‌ها دارای فراکشن‌های مختلف هستند. به طور مثال آنتی‌ژن B دارای فراکشن‌های ۸، ۱۶، ۲۴ و ۳۸ کیلو Daltonی است که حساسیت هر کدام از آن‌ها

کیست هیداتیک، مرحله نوزادی کرم نواری اکی نوکوکوس گرانولوژوس است. این کرم ۳-۷ میلی‌متری، انگل روده باریک سگ است. تخمهای کرم همراه با مدفوع سگ آلوده دفع و در محیط خارج پراکنده می‌شوند. انسان و حیوانات با خوردن تخمهای همراه آب، غذا و سبزیجات آلوده می‌شوند. در نتیجه کیست هیداتیک در بدن آن‌ها تشکیل می‌شود. عالیم 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 کشورهایی که در آن‌ها دامپروری رایج است، شایع می‌باشد. بیماری سالیانه زیان‌های بهداشتی و اقتصادی زیادی را به دنبال دارد (۲). آلودگی به این انگل ضمن گسترش جهانی، در بیشتر مناطق گرم سیر و نیمه‌گرم سیر دنیا انتشار دارد. آلودگی در کشورهای حوزه مدیترانه، اروپا، آسیای مرکزی، خاورمیانه، خاور دور، روسیه، استرالیا، زلاند نو، آمریکا و آفریقا وجود دارد (۳، ۴). اکی نوکوکوزیس در ایران که از مناطق هیپر آندمیک است، از لحاظ بهداشتی، پزشکی و دامپزشکی حائز 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 (۱/۰ 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 عالیم 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،

سونیکاتور که روی ۵۰ سیکل بر ثانیه و ماگزیمم تن ۳۰ ثانیه تنظیم شده بود، در حمام بخ برای ۴ بار سونیکه شد (۱۵). در مرحله بعد به منظور تغییل 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 آنتی‌ژن مایع جهت اقدامات بعدی در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

پروتواسکولکس‌های تنه‌شین 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 کیلوالوتون بریده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب قطره‌جوشانده شد تا حالت چسبندگی کیسه از بین بود 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 قطره دیالیز گردید. روزی ۳ مرتبه آب قطره 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 (۱۳، ۱۷، ۱۸). مطالعات قبلی نشان دادند که موش‌های بالب-سی (Balb/C) حساسیت بالایی نسبت به عفونت کیست هیداتیک دارند و برای مطالعات ایمونولوژیک این انگل مناسب‌تر می‌باشدند (۱۲). موش‌های بالب-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 بالب-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 آنتی‌ژنی 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 آنتی‌ژن و کلاس مناسب آنتی‌بادی نیز کمک‌کننده می‌باشد (۱۴).

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 سوالات 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 آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفت. از نمونه‌های سرمی موش و انسان نیز به عنوان آنتی‌بادی استفاده شد.

#### الف) روش تهیه آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک

مایع کیست هیداتیک تازه جمع‌آوری شده از کیست‌های هیداتیک بارور انسان و موش با نیروی  $g \times 3000$  به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. این عمل باعث رسوب پروتواسکولکس‌ها و ذرات معلق گردید. مایع رویی جدا شد. سپس در لوله‌های فالکون 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  $g = 1500$  سانتریفیوژ 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 فورده، 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  $1/2$  میکروگرم برای هر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

### روش انجام ELISA

پس از تهیه آنتیژن به نسبت خالص،  $100$  میکرولیتر از سوپسیانسیون آنتیژن (با غلظت  $7/5$  میکروگرم در میلی‌لیتر) و بافر کوت‌کننده کربنات ( $1$  مولار،  $pH = 9/6$ ) تهیه و به همه چاهک‌های ظرف پلی‌استیرینی اضافه شد. سپس ظرف به مدت یک شب در  $4$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از TBST شستشو  $200$  میکرولیتر محلول مسدودکننده بافر (Tris buffered salin, tween ۲۰) همراه با شیر خشک بدون چربی  $1$  درصد به چاهک‌ها اضافه شدند. سپس ظرف به مدت  $1$  ساعت در  $37$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو، سرم با رقت  $1:100$  به میزان  $100$  میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت  $1$  ساعت در  $37$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشوی دوباره و اضافه HRP کردن  $100$  میکرولیتر آنتی‌بادی‌های کنزوگه با Invitrogen (Horseradish peroxidase) به مدت  $1$  ساعت در  $37$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. دوباره پس از شستشو،  $100$  میکرولیتر سویسترای (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 تعییرات 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،  $100$  میکرولیتر از آنتیژن مایع کیست هیداتیک که به روش Lightowers آماده‌سازی شده بود و حاوی  $10$  میکرولیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و  $100$  میکرولیتر ادجوانت کامل فروند بود، دریافت نمودند (۱۹).  $4$  هفته بعد تزریق مشابه ولی با ادجوانت ناکامل فروند دریافت نمودند.  $2$  هفته پس از آخرین تزریق مقدار  $۲۰۰$  میکرولیتر مایع کیست هیداتیک که حاوی  $2000$  عدد پروتوكولکس زنده بود، دریافت نمودند.

**گروه مورد ۲:** تزریق داخل صفاقی،  $100$  میکرولیتر آنتیژن سطحی گوسفندی استخراج شده به همراه  $100$  میکرولیتر ادجوانت کامل فروند دریافت کردند. چهار هفته بعد،  $100$  میکرولیتر ادجوانت ناکامل فروند به همراه  $100$  میکرولیتر آنتیژن به عنوان یادآور به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

**گروه شاهد:** گروه شاهد با تزریق داخل صفاقی  $100$  میکرولیتر ادجوانت کامل فروند و  $100$  میکرولیتر فسفات بافر سالین (PBS) یا (Phosphate buffered saline) واکسینه شدند. چهار هفته بعد نیز  $100$  میکرولیتر ادجوانت ناکامل فروند با  $100$  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 ۶-۹ ماه، فقط (۳۳/۳۳ درصد) آلوه شدند. بیشترین موضع آلوهگی کیست هیداتیک، کیست کبدی و شکمی بود. طولانی ترین مدت زمان برای آلوهگی موش بالب-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 زیر کلاس های IgG بالاترین میزان میانگین OD در پاسخ به آنتی ژن مایع کیست هیداتیک انسانی مربوط به IgG<sup>۴</sup> و پایین ترین میانگین OD مربوط به IgG<sup>۳</sup> بود (جدوال 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 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 زیر کلاس های IgG مربوط به IgG<sup>۴</sup> می باشد، اما IgE هم پاسخی بالاتر از دیگر زیر کلاس 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 میکرولیتر 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 درجه سانتی گراد انکوبه شد. واکنش بعد از مدت ۱۵ دقیقه انکوباسیون، با افزودن ۵۰ میکرولیتر 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-reader (Bio-Rad مدل ۵۵۰) 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

#### آلوهگی موش های سوری و بالب-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 ۶-۹ ماه، آلوه شدند. بهترین و بیشترین میزان آلوهگی تشکیل کیست هیداتیک در ناحیه کبد و بعد در ناحیه شکمی نمایان گردید. در حالی که برای موش های بالب-سی

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

Cut off	Range	Number	Max	Min	Std.Deviation	Mean	OD Ab
.0/۸	.0/۱	۲۴	.0/۱۱	.0/۰۱	.0/۰۲	.0/۰۴	IgG
.0/۱۲	.0/۱۳	۲۴	.0/۱۳	.	.0/۰۴	.0/۰۴	IgG۲
.0/۱۱	.0/۱۲	۲۴	.0/۱۲	.0/۰۱	.0/۰۳	.0/۰۵	IgG۳
.0/۱۵	.0/۱۵	۲۴	.0/۱۵	.	.0/۰۴	.0/۰۹	IgG <sup>۴</sup>
.0/۰۶	.0/۰۶	۲۴	.0/۰۶	.	.0/۰۴	.0/۰۲	IgE

$$P = 0.001, F = 15/98$$

جدول ۲: نتایج ELISA گروه مورد، فرایند کوتیک با آنتیژن 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		IgG2
۰/۱۱	۰/۲۶	۳۰	۰/۳۸	۰/۱۲	۰/۰۴	۰/۱۶		IgG2
۰/۱۵	۰/۶۸	۳۰	۱/۹۹	۱/۳۱	۰/۱۸	۱/۵۸		IgG4
۰/۰۶	۰/۶۲	۳۰	۰/۷۶	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۴۹		IgE

 $P < 0/001, F = 725/38$ 

بعد از ۶-۹ ماه از طریق جراحی اثبات گردید. در این بررسی، آنتی بادی پلی کلونال IgGAM بیشترین پاسخ را علیه آنتی زن خام مایع کیست هیداتیک انسانی نسبت به دیگر آنتی بادی ها از خود نشان داد. اما در بین آنتی بادی های مونوکلونال، IgG2b بالاترین میزان OD را نشان داد. با توجه به این که میانگین OD های به دست آمده بالاتر از میزان Cut off محاسبه شده می باشد، از این رو تمام نمونه ها مثبت تشخیص داده شدند (جداول ۳ و ۴). انجام آنالیز واریانس، تفاوت معنی دار بین میزان میانگین OD آنتی بادی های موشی علیه آنتی زن خام مایع کیست هیداتیک انسانی نشان داد ( $P < 0/001$ ). میزان حساسیت و ویژگی محاسبه شده برای پاسخ آنتی بادی های IgG، IgE و زیر کلاس IgGAM و IgG2b موش علیه آنتی زن خام مایع کیست هیداتیک انسان در آزمون ELISA ۱۰۰ درصد تعیین گردید.

در بررسی پاسخ IgG تام انسانی به آنتی زن خام مایع کیست هیداتیک انسانی با استفاده از آزمون ELISA در بین گروه های 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 بادی های موش در دو گروه مورد و شاهد به آنتی زن خام مایع کیست هیداتیک انسان

در ادامه بررسی، نحوه واکنش آنتی بادی های IgE، IgG و زیر کلاس IgG2b در موش های بالب- سی و سوری به آنتی زن های خام مایع کیست هیداتیک انسانی با آزمون ELISA مورد ارزیابی قرار گرفتند. این موش ها از طریق تزریق پروتوبولکس های استحصال شده، مبتلا به عفونت ثانویه کیست هیداتیک شده بودند و وجود کیست ها

جدول ۳: میانگین OD پاسخ آنتی بادی های موش های سوری و Balb/C علیه آنتی زن 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 سوری و Balb/C علیه آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسان (گروه مورد)

Cut off	Range	Number	Max	Min	Std.Deviation	Mean	OD	Ab
. / . ۴	. / . ۱۲	۳۰	. / . ۲۶	. / . ۱۵	. / . ۰۳	. / . ۱۸		IgG
. / . ۵	. / . ۲۶	۳۰	. / . ۶۷	. / . ۴۲	. / . ۰۶	. / . ۴۶		IgG2b
. / . ۴	. / . ۰۹	۳۰	. / . ۳	. / . ۲۱	. / . ۰۳	. / . ۲۵		IgE
. / . ۷	. / . ۱۶	۳۰	. / . ۹۱	. / . ۷۵	. / . ۰۵	. / . ۸۴		IgGAM

 $P = . / . ۰۰۱, F = ۶۴۵ / ۱$ 

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
. / . ۶	. / . ۵	۳۰	. / . ۹۹	. / . ۴۹	. / . ۱۴	. / . ۷۱		IgG
. / . ۱۲	. / . ۰۵	۳۰	. / . ۱۷	. / . ۱۲	. / . ۰۲	. / . ۱۴		IgG2
. / . ۱۶	. / . ۰۱	۳۰	. / . ۱۲	. / . ۱۱	. / . ۰۰۴	. / . ۱۲		IgG3
. / . ۴	. / . ۹	۳۰	. / . ۹۷	. / . ۰۷	. / . ۳۶	. / . ۲۹		IgG4
. / . ۱۱	. / . ۰۴	۳۰	. / . ۱۴	. / . ۱	. / . ۰۱	. / . 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.

جدال 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 بالب - سی و سوری 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
. / . ۶	. / . ۰۴	۳۰	. / . ۰۴	.	. / . ۰۲	. / . ۰۲		IgG
. / . ۱۲	. / . ۰۹	۳۰	. / . ۱۱	. / . ۰۲	. / . ۰۳	. / . ۰۶		IgG2
. / . ۱۶	. / . ۱۳	۳۰	. / . ۱۳	.	. / . ۰۴	. / . ۰۴		IgG3
. / . ۴	. / . ۰۴	۳۰	. / . ۰۴	.	. / . ۰۱	. / . ۰۲		IgG4
. / . ۱۱	. / . ۰۸	۳۰	. / . ۰۹	. / . ۰۱	. / . ۰۳	. / . ۰۵		IgE

هیداتیک نیز بعد از ۴۶ هفته ۹۲ درصد گزارش شد (۲۱). در صورتی که مطالعه ما نشان می‌دهد که در موش‌های بالب-سی بالاترین میزان آلوودگی در ناحیه کبد است و تشکیل اولیه کیست و آلووده شدن موش‌ها در مدت زمان ۳ ماهگی آشکار می‌شود. اما استحصال مایع کیست در ۹ ماهگی و بعد از آن صورت گرفت. میزان آلوودگی آنان به کیست هیداتیک  $\frac{33}{3}$  درصد است که رقم بالایی نمی‌باشد. آن چه به نظر می‌رسد در این مطالعه امتیازی محسوب گردد، توفیق در آلوودگی بیشتر و بهتر موش‌های سوری است که دلیل آن دو نکته می‌تواند باشد. اول استحصال پروتواسکولکس‌های زیاد از جداره داخلی کیست هیداتیک گوسفندي در نمونه‌ای که قرار است به موش تزریق شود. دوم تزریق یادآوری به موش‌ها که در فاصله هفتگی صورت گرفت و باعث آلوودگی بیشتر و بهتر موش‌ها گردید. در حالی که محققان 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 ارایه می‌نماید.

#### **ELISA**

در پاسخ سرم انسان به آنتیژن‌های خام مایع کیست هیداتیک انسانی، بالاترین پاسخ مربوط به زیرکلاس IgG $\text{IgG}_4$  بود که این نتایج با نتایج Siracusano و همکاران (۲۲)، Grimm و همکاران (۲۳) و Drewreck و همکاران (۲۴) Sbihi و همکاران (۲۵) و Khabiri و همکاران (۲۶) همخوانی داشت. IgG $\text{IgG}_4$  انسانی علیه آنتیژن موش نیز پاسخ بالاتر از بقیه زیرکلاس‌ها نشان داد. بنابراین می‌توان به راحتی در خصوص این که بیشترین میانگین OD ایجاد شده مربوط به IgG $\text{IgG}_4$  و IgG تام علیه این دو آنتیژن متفاوت Cross-reaction می‌باشد، اظهار نظر نمود. مثل این که پاسخ‌های سرم انسانی علیه هر دو آنتیژن مایع کیست هیداتیک انسان و موش وجود دارد. اما نکته قابل توجه میزان OD یا شدت پاسخ است که در آنتیژن‌های بررسی شده به

با انجام آزمون Post Hoc ارتباط بین پاسخ IgG تام انسان علیه آنتیژن موش از نظر آماری معنی‌دار به دست آمد ( $P < 0.001$ ). همچنین آزمون Post Hoc برای بررسی ارتباط بین آنتیژن‌ها با یکدیگر در پاسخ به IgG تام موش مورد ارزیابی قرار گرفت که حاصل آن وجود رابطه معنی‌دار بین آنتیژن انسان با آنتیژن موش ( $P < 0.018$ ) بود.

#### **بحث**

#### **آلوودگی موش‌ها**

بررسی کیست هیداتیک در حیوانات مختلف از آن جهت مهم می‌باشد که این بیماری انگلی در طیف وسیعی از میزبانان واسط انتشار دارد. خود این حیوانات قادرند سیکل این بیماری مهلك 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 می‌باشد، استفاده می‌نمایند. یکی از ساده‌ترین راه‌ها برای مطالعه خصوصیات فیزیولوژیکی، ایمونولوژیکی و اثرات پیش‌گیری و درمانی انگل، مطالعه بر روی موش‌های آزمایشگاهی است. برای این منظور آلووده کردن موش آزمایشگاهی بهترین راه است اما شکلی که فرا روی محقق وجود دارد طولانی بودن زمان آلوودگی است که به طور معمول برای موش‌های C Balb/C بین ۳-۹ ماه می‌باشد. 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 آلوودگی موش صورت گرفته است، بیشتر در موش‌های بالب-سی صورت گرفته است (۱۸-۲۰).

دلیل انتخاب موش بالب-سی برای آلوودگی، حساسیت بالای حیوان نسبت به عفونت کیست هیداتیک می‌باشد. همچنین برای مطالعات ایمونولوژیک انگل مناسب می‌باشد (۱۳). آزمایش انجام شده توسط رفیعی و Craig، مشخص نمود که کیست هیداتیک ایجاد شده در موش بالب-سی، به صورت توده‌های سفید رنگ به اندازه ۲-۳ میلی‌متر و بیشتر از نوع کیست شکمی می‌باشد. میزان آلوودگی موش به کیست

مختلف به وجود می آید. به گونه ای که می توان از یک آنتی ژن خاص که دارای شرایط لازم برای ایجاد پاسخ سرم انسانی است، استفاده نمود. این آنتی ژن که می تواند 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 IgG<sup>4</sup> به عنوان انتخاب اصلی و آنتی ژن موشی با استفاده از IgG<sup>1</sup> تام به عنوان آنتی بادی رفانس مدنظر قرار می گیرد. مطالعاتی که توسط Sbihi و همکاران انجام شدند، نیز نتایج این مطالعه را تأیید می نمایند (۲۵). در این مطالعات آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک انسانی و آنتی ژن B به عنوان منبع آنتی ژنی است که آنتی بادی های تام IgE و IgG<sup>1</sup> علیه آنتی ژن های مورد نظر دارای بیشترین پاسخ و همکاران بر روی آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک بیماران مبتلا به هیداتیدوز صورت گرفت، دریافتند که به ترتیب IgG<sup>4</sup> بیشترین پاسخ و نسبت به IgG<sup>2</sup> و IgG<sup>3</sup> کمترین پاسخ را علیه آنتی ژن های خام و تخلیص شده مایع کیست هیداتیک، ایجاد می نماید (۲۶). نتایج این مطالعات نشان دادند که مطالعه کنونی می تواند فصل خطابی برای انتخاب آنتی ژن و آنتی بادی در طراحی کیت تشخیصی باشد.

### نتیجه گیری

آنتی ژن مایع کیست هیداتیک انسان و موش واکنش متقاطع دارند. در مواردی آنتی ژن موش ارجحیت دارد و می تواند در طراحی کیست هیداتیک مورد استفاده قرار گیرد. در طراحی کیت های تشخیصی می توان از IgG<sup>4</sup> تام و IgG<sup>1</sup> استفاده نمود. موش های سوری می توانند مورد مناسبی برای آلدگی های تجربی باشند.

### References

1. Roberts LS, Schmidt GD, Janovy J. Foundations of Parasitology. 7<sup>th</sup> 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

شرح زیر می باشد (شدت واکنش برابر است با OD علیه هر آنتی ژن تقسیم بر Cut off آن آنتی ژن). شدت پاسخ IgG<sup>4</sup> انسانی به آنتی ژن انسانی و موشی با آنتی ژن انسان:  $10/5 \approx 10/5$  ، آنتی ژن موش:  $7/25 \approx 7/25 / 0.04 \approx 0.04$  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 نمی برد. 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 می باشد. در شرایط طبیعی ۷ برابر Cut off مربوط، ایجاد پاسخ می نماید. بنابراین انتخاب مناسبی برای طراحی کیت های تشخیص در مقیاس های کوچک متناسب با نیاز و توانمندی منطقه می باشد.

این شدت پاسخ برای IgG<sup>4</sup> تام هم به شرح زیر محاسبه شد.  
IgG<sup>4</sup> انسانی به آنتی ژن انسانی:  $5/25 = 0.08 / 0.08 = 0.08$   
IgG<sup>4</sup> انسانی به آنتی ژن موش:  $12 / 0.06 = 0.72 / 0.06 = 0.72$

همان گونه که مشخص است شدت پاسخ IgG<sup>4</sup> 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 آزمایش های تشخیص است که در مطالعه حاضر مدنظر قرار گرفت. همان گونه که پیشتر ذکر شد، برای IgG<sup>4</sup> و آنتی ژن های مختلف حساسیت ۱۰۰ درصد به دست آمد. ویژگی نیز رقم بسیار قابل قبولی به دست آمد. به عنوان یک نتیجه کلی در این مبحث می توان گفت که فرضیات مطالعه ما به اثبات رسید. واکنش متقاطع بین آنتی ژن های

- 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 Helmintology, Cestodes. 3<sup>rd</sup> 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, Lightowers 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. Lightowers 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. Echinococcosis 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 Khosravi<sup>1</sup>, Mortaza Shamsi<sup>2</sup>, Ebrahim Babaahmadi<sup>3</sup>,  
Kourosh Salyemiri<sup>4</sup>, Kourosh Saki<sup>5</sup>**

### 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, freezed-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.