مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۲: از ۷۳-۷۸
تابستان ۱۳۸۹

مقاله کوتاه

بررسی ایمونوگلوبولین IgG ضد کریپتوسپوریدیوم پاروم در نوزادان موش BALB/c آلوده شده

معصومه احمدیان[۱]، جاوید صدرایی[۲*]، احمد زواران‌حسینی[۳]

۱- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۸/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۱/۲۳

چکیده

هدف: کریپتوسپوریدیوزیس یک بیماری انگلی است که توسط تک یاخته‌ای کوچک از جنس کریپتوسپوریدیوم ایجاد می‌شود. انتقال عفونت به‌صورت مدفوعی- دهانی، از طریق تماس مستقیم یا غیرمستقیم و از طریق مواد غذایی یا نوشیدنی است. هدف از این مطالعه، بررسی ایمونوگلوبولین IgG ضد کریپتوسپوریدیوم پاروم در نوزادان موش BALB/c آلوده شده است.

مواد و روش‌ها: اووسیست‌ها از نمونه‌های مدفوع اسهالی گوساله‌های جوان جمع‌آوری و خالص شده در محلول نگاهدارنده دی کرومات ۲/۵ درصد و در یخچال ٤ درجه نگهداری شدند. ٤۰ نوزاد موش (۳-٤ روزه) BALB/c در هشت گروه پنج تایی شامل چهار گروه نمونه و چهار گروه کنترل استفاده شد و سپس 5×10^5 اووسیست به گروه‌های نمونه، از راه دهانی به کمک لوله گاواژ تلقیح شد. از قلب موش‌های گروه‌های نمونه و کنترل روزهای ٦، ۹، ۱۲، ۱٦ بعد از تزریق خون‌گیری و سرم‌ها در شرایط استریل ذخیره شد. ایمونوگلوبولین‌ها به روش رسوب‌دهی نمک استخراج و برای تأیید وجود ایمونوگلوبولین‌ها از روش SDS-PAGE استفاده شد.

نتایج: آنتی‌بادی‌های به‌دست آمده توسط روش وسترن بلات تجزیه و تحلیل شد. افزایش ترشح آنتی‌بادی در نوزادان موش آلوده به اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم، از نوع IgG تأیید شد و میزان میانگین جذب نوری آن از ۰/۰۹۹ ± ۰/۳۵ در روز ٦ بعد از تزریق به میزان ۰/۰۹۹ ± ۰/٦۷۷٦ افزایش یافت؛ در حالی‌که میزان جذب نوری گروه‌های کنترل در روز ششم ۰/۰۱٦ ± ۰/۲٤٤ بود و در روز ۱٦ فقط به ۰/۰۱٦ ± ۰/۳۲۲ افزایش یافته بود و این افزایش در گروه‌های مورد، نسبت به گروه‌های کنترل از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: آنتی‌بادی بررسی شده در این مطالعه در نوزادان موش آلوده به اووسیست کریپتوسپوریدیوم از نوع IgG بود که علیه غشای خارجی اووسیست ترشح می‌شود و اختلاف معنی‌داری در نوزادان موش گروه مورد نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

کلیدواژگان: کریپتوسپوریدیوم، وسترن بلات، IgG

۱- مقدمه

کریپتوسپوریدیوزیس (Cryptosporidiosis) یک بیماری انگلی است که توسط تک یاخته‌ای کوچک از کوکسیدیاها از

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی،گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: sadraeij@modares.ac.ir

جنس کریپتوسپوریدیوم (*Cryptosporidium*) ایجاد می‌شود. با ظهور پاندمی ایدز (Acquired Immunodeiciency Syndrome: AIDS) در دهه ۱۹۸۰ این تک یاخته به‌عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در بیماران دچار نقص ایمنی و یکی از عوامل اسهال کودکان اهمیت جهانی یافت. امروزه حضور این تک یاخته در تمامی کشورهای جهان در افراد سالم و در افراد با نقص سیستم ایمنی به اثبات رسیده است. کودکان جنبه‌های مختلفی از عفونت کریپتوسپوریدیوزیس را می‌توانند داشته باشند که نشان می‌دهد ایمنی ناشی از این انگل پایدار نیست. در افراد با نقص سیستم ایمنی مثل بیماران HIV (Human Immunodeficiency Virus) مثبت منتشر می‌شود و شدت کریپتوسپوریدیوزیس با کاهش تعداد لنفوسیت‌های CD_4^+ به‌ویژه زمانی که تعداد سلول‌ها به کمتر از ۲۰۰ سلول در هر میلی‌متر مکعب برسد افزایش می‌یابد [۱]. گونه‌های متعددی از کریپتوسپوریدیوم پس از جداسازی آن‌ها از میزبانان مربوط نام‌گذاری شدند که یکی از این گونه‌ها کریپتوسپوریدیوم پاروووم (*Cryptoporidium parvum*) است. به‌نظر می‌رسد این انگل برای تعداد زیادی از پستانداران از جمله انسان عفونت‌زا باشد [۲-٤]. اخیراً مشخصات مولکولی، یک سازگاری گستردهٔ میزبانی در تکامل کریپتوسپوریدیوم نشان می‌دهد و بسیاری از پستانداران یا گروه‌هایی از پستانداران با ژنوتیپ‌های کریپتوسپوریدیوم تطابق میزبانی داشته‌اند؛ به‌طوری که اختلاف آن‌ها از یکدیگر فقط در توالی DNA و عفونت‌زایی مشخص می‌شود [۵]. امروزه کریپتوسپوریدیوم را به‌عنوان عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن در انسان و نشخوارکنندگانی مانند گاو، گوسفند، بز، گوزن می‌شناسند [٦، ۷]. کریپتوسپوریدیوم در داخل مجرای گوارش میزبان تکامل می‌یابد. این انگل تنها در مرحله اووسیست (Oocyst) در خارج از روده به‌سر می‌برد. اووسیست از طریق مدفوع از بدن میزبان آلوده دفع می‌شود و پس از این‌که توسط میزبان مناسب بلعیده شد، اسپورزوئیت‌ها (Sporozoites) از اووسیست خارج شده و باعث آلوده شدن سلول‌های پوششی دستگاه گوارش می‌شوند [۸، ۹]. از نظر بیماری‌زایی، کریپتوسپوریدیوم پاروووم سبب سوء جذب و اسهال حاد و ترشحی خود محدود شونده در انسان و سایر پستانداران می‌شود [۱۰-۱۳]. در عفونت با این انگل، ایمنی هومورال در موش‌های BALB/c بررسی شده است. این حیوانات مقادیر اندکی IgG و IgM تولید می‌کنند و این پاسخ هماهنگ با دفع اووسیست است. ولی در سایر موجودات این پاسخ، هماهنگ نیست. حداقل ۷ آنتی‌ژن کریپتوسپوریدیوم پاروووم قادر به ایجاد آنتی‌بادی خنثی کننده است. متعاقب عفونت‌های تجربی، فعالیت IgG نسبت به آنتی‌ژن‌های ۱۵، ۱۷ و ۲۷ کیلودالتونی کریپتوسپوریدیوم، در افراد دارای علایم شایع نسبت به افراد بدون علامت بسیار بیشتر است [١٤، ۱۵].

در مطالعه حاضر وضعیت ایمنی هومورال (IgG) موش‌های BALB/c نوزاد که آلوده به کریپتوسپوریدیوم پاروووم شده بودند، بررسی شد. هدف از این مطالعه، استفاده از نوزادان موش آلوده به کریپتوسپوریدیوم پاروووم، برای مطالعه و اندازه‌گیری پاسخ‌های آنتی‌بادی سرم برای ارزیابی مؤثر و به‌صرفه کریپتوسپوریدیوزیس است.

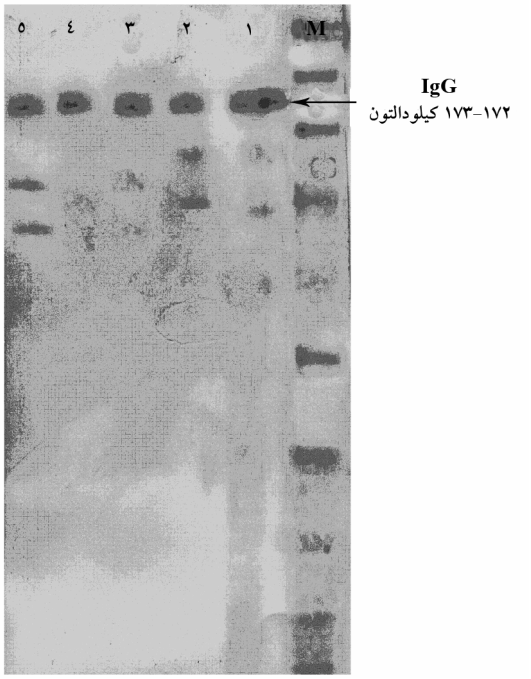
۲- مواد و روش‌ها

نمونه‌های مدفوع اسهالی از گوساله‌های جوان به‌صورت تازه از گاوداری جمع‌آوری شد و اووسیست‌ها با روش شناورسازی سوکروز، خالص شدند. در نهایت، برای هر موش، 5×10^5 اووسیست با PBS (Phosphate Buffered Saline) مخلوط شد و به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. این سوسپانسیون در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد. در این مطالعه از ٤۰ موش BALB/c شیرخوار که همگی ۲ تا ۳ روزه بودند، استفاده شد. این نوع موش‌ها از بدو تولد تا سن ١٤ روزگی به این انگل حساسند و پس از آلوده شدن به آن، علایم گوارشی بروز می‌دهند. موش‌ها، به هشت گروه پنج‌تایی که شامل چهار گروه نمونه و چهار گروه کنترل بودند، تقسیم شدند. وقتی وزن موش‌ها به سه گرم رسید، تعداد 5×10^5 اووسیست به کمک لوله

گاواژ از راه دهانی به گروه‌های نمونه، تلقیح شد و قبل از هر بار خون‌گیری برای تأیید آلودگی در روزهای ٦، ۹، ۱۲ و ١٦ بعد از تلقیح، آزمایش شمارش اووسیست از هر دو گروه نمونه و کنترل انجام شد و سپس سرم آن‌ها در شرایط استریل و با دقت جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. برای جداسازی و استخراج ایمونوگلوبولین‌ها از روش رسوب‌دهی نمک (Salting Out) استفاده شد و به‌منظور تأیید وجود ایمونوگلوبولین‌ها، (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide SDS-PAGE. Gel Electrophoresis) انجام گرفت. همچنین به‌منظور تجزیه و تحلیل آنتی‌بادی‌های به‌دست آمده، از روش وسترن بلات (Western Blot) استفاده شد. بدین منظور از غشای نیترو سلولز با منافذ ۰/٤٥ میکرومتر استفاده شد. انتقال پروتئین‌ها بعد از الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید ۵ درصد با استفاده از بافر تریس-گلیسین صورت گرفت. تجزیه و تحلیل‌های آماری آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ و آزمون T زوجی (Paired-samples T test) انجام شد.

جدول ۱ میانگین OD گروه‌های نمونه و کنترل در روزهای مختلف

	میانگین ± انحراف معیار	
	آزمون	کنترل
روز ٦	۰/۳۵۰±۰/۰۹۹	۰/۲٤٤±۰/۰۱٦
روز ۹	۰/٤۹۰±۰/۰٦۲	۰/۲۷۰٦±۰/۰۲۰
روز ۱۲	۰/۵۲۹٤±۰/۵۷	۰/۲۹۹۲±۰/۰۲۱
روز ١٦	۰/٦۷۷٦±۰/۰۹۹	۰/۳۲۲±۰/۰۱٦

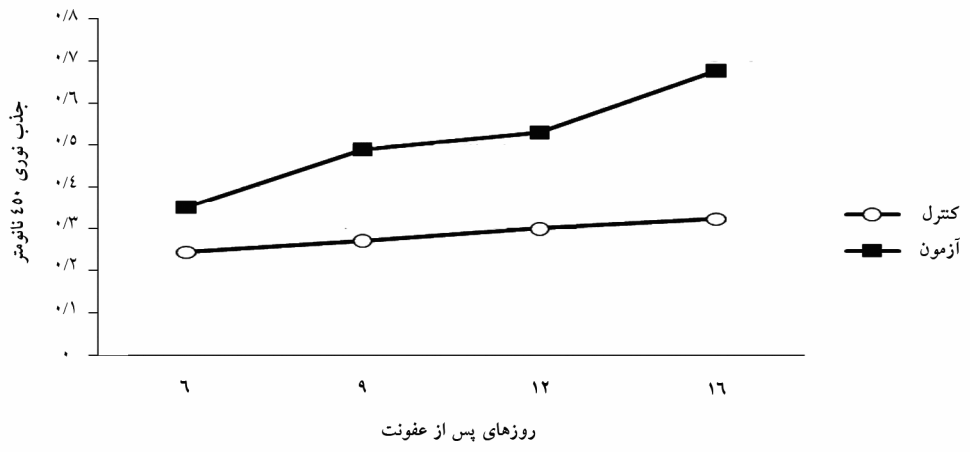


شکل ۱ تأیید وجود آنتی‌بادی IgG با روش وسترن بلاتینگ در پنج نمونه گروه مورد

۳- نتایج

پس از طی مرحلهٔ SDS-PAGE و وسترن بلات و به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال (Monoclonal)، وجود آنتی‌بادی IgG، در نمونه‌های گروه آزمون تأیید شد. IgG از نظر اندازه در

مکان مناسب، یعنی ۱۷۲-۱۷۳ کیلودالتون قرار گرفت (شکل ۱). مقایسه میزان IgG در گروه‌های کنترل با گروه آزمون نشان داد که میزان جذب نوری (Optical Density: OD) به‌دست آمده از هریک از موش‌های گروه آزمون از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با موش‌های گروه کنترل دارد (P<۰/۰۵). گروه روز ۱۶ دارای بالاترین میانگین سطح IgG بودند، هر چند که سطح IgG گروه‌های روزهای ۶، ۹ و ۱۲ هم به‌طور کاملاً محسوسی از گروه‌های کنترل بالاتر بودند (جدول ۱، شکل ۱و نمودار ۱).



نمودار ۱ میزان جذب نوری IgG در روزهای مختلف

٤- بحث

تک‌یاخته انگلی کریپتوسپوریدیوم پاروم موجب بیماری کریپتوسپوریدیوزیس می‌شود. این انگل، حیوانات وحشی، اهلی و انسان‌ها (به‌خصوص افراد دارای نقص ایمنی) را آلوده می‌نماید. در نشخوارکنندگان اهلی، آلودگی به این انگل، در هفته‌های اول تا سوم زندگی بسیار طبیعی است که باعث اسهال خفیف تا شدید، دهیدراسیون، دردهای شکمی، بی‌حسی و افسردگی، کاهش وزن و ریزش قابل توجه اووسیست در مدفوع می‌شود. در موارد شدید، حتی امکان مرگ حیوان آلوده نیز وجود دارد [۱٦]. در عفونت با این انگل، ایمنی هومورال در موش‌های BALB/c بررسی شده است. این حیوانات مقادیر اندکی IgG و IgM تولید می‌کنند و این پاسخ هماهنگ با دفع اووسیست است؛ ولی در سایر موجودات این پاسخ، هماهنگ نیست. حداقل ۷ آنتی‌ژن کریپتوسپوریدیوم پاروم قادر به ایجاد آنتی‌بادی خنثی کننده است. متعاقب عفونت‌های تجربی، فعالیت IgG نسبت به آنتی‌ژن‌های ۱۵، ۱۷ و ۲۷ کیلودالتونی کریپتوسپوریدیوم، در افراد دارای علایم شایع نسبت به افراد بدون علامت بسیار بیشتر است [۱٤، ۱۵].

آنتی‌بادی‌های ایجاد شده در نوزاد موش آلوده به اووسیست کریپتوسپوریدیم پاروم، از نوع IgG (بیشتر زیرکلاس IgG1) و IgM بوده که علیه غشای خارجی اووسیست است [۱۷]، البته افزایش میزان IgM کمتر بود [۱۸] و به همین دلیل در این مطالعه IgM اندازه‌گیری نشد. تفاوت‌های معنی‌داری در میزان پاسخ ایمنی در نوزادان موش نمونه در مقایسه با نوزادان موش گروه کنترل از نظر سطح IgG مشاهده شد.

در بررسی که توسط مارتین-گومز (Martín-Gómez) و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی ۹٦ موش نوزاد صورت گرفت، از روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) برای تعیین میزان آنتی‌بادی استفاده شد؛ میزان

آنتی‌بادی IgG در روزهای ٦ و ١٦ به‌طور کاملاً محسوسی بالا بود ولی در گروه‌های کنترل تغییر قابل توجهی در میزان آنتی‌بادی سرمی در روزهای متفاوت مشاهده نشد [۱۹].

مارتین-گومز و همکاران در سال ۲۰۰٦ به نوزادان موش، اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم جدا شده از علفخواران را خوراندند و آن‌ها را به‌عنوان گروه مورد در نظر گرفتند و به یک گروه انگل را تلقیح نکرده و به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفتند و مقدار IgG، IgM، IgA را در روزهای ۹، ۱۲، ١٦ و ۲۰ بعد از آلودگی سنجیدند و نشان دادند که در روز ١٦ کمترین مقدار آنتی‌بادی وجود دارد [۲۰].

ویر (Weir) و همکاران در سال ۲۰۰۰، شش آنتی‌ژن متفاوت سطح اووسیست را که علیه آن‌ها IgM، IgG تولید شده بود؛ شناسایی کردند. در این بررسی پروتئین‌های استخراج شده محلول، به موش‌ها تزریق و آنتی‌بادی آن‌ها بررسی شد. مثلاً در اثر تزریق، آنتی‌ژن‌های دیواره اووسیست سطح IgM، IgG بالا رفت [۲۱].

نتایج حاصل از تحقیق حاضر با نتایج آقایان مارتین-گومز و ویر همخوانی و هماهنگی دارد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات اعضای گروه انگل‌شناسی و معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی بابت حمایت علمی، عملی و مالی قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes Infect 2002; 4(10): 1047-58.

[2] Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. Int J Parasitol 2004; 34(7): 769-77.

[3] Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. Science 2004; 304(5668): 248-53.

[4] Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol Res 1999; 85(11): 899-904.

[5] Barker IK, Carbonell PL. C*ryptosporidium agni sp.n*. from lambs, and c*ryptosporidium bovis sp.n.* from a calf, with observations on the oocyst. Z Parasitenkd 1974; 44(4): 289-98.

[6] Upton SJ, Current WL. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting mammals. J Parasitol 1985; 71(5): 625-9.

[7] Morgan UM, Monis PT, Fayer R, Deplazes P, Thompson RC. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. J Parasitol 1999; 85(6): 1126-33.

[8] Hoover DM, Hoerr FJ, Carlton WW, Hinsman EJ, Ferguson HW. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, Naso lituratus Bloch and Schneider. J Fish Dis 1981; 40: 425-8.

[9] Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium spp.* and cryptosporidiosis. Microbiol Rev 1986; 50(4): 458-83.

[10] Tyzzer EE. A Sporozoan Found in the peptic glands of the common mouse. Proceeding of the Society for Experimental Biology and

Medicine 1907; 5: 12-13.

[11] Buret AG, Chin AC, Scott KGE. Infection of human and bovin epithelial cells with C. andersoni induces apoptosis and disrupts tight junction 20-1: effects of epidermal grouth factor. Int J Parasitol 2003; 35: 1363-71.

[12] Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes Infect 2004; 6(8): 777-85.

[13] Chappell CL, Okhuysen PC, White Jr AC. *Cryptosporidium parvum*: infectivity, pathogenesis and the host– parasite relationship. In: Thompson RCA, Armson A, Ryan UM (Eds). *Cryptosporidium*: from Molecules to Disease. Elsevier, Amesterdam. The Netherlands 2003; p: 19-44.

[14] Sulaiman IM. Differentiation of human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. Emerge Infect Dis 1998; 4: 681-685.

[15] Blanshard C, Jackson AM, Shanson DC, Francis N, Gazzard BG. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. Q J Med 1992; 85(307-308): 813-23.

[16] O'Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int J Parasitol 1995; 25(2): 139-95.

[17] Arrowood MJ, Mead JR, Mahrt JL, Sterling CR. Effects of immune colostrum and orally administered antisporozoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. Infect Immun 1989; 57(8): 2283-8.

[18] Taghi-Kilani R, Sekla L, Hayglass KT. The role of humoral immunity in *Cryptosporidium spp.* infection. Studies with B cell-depleted mice. J Immunol 1990; 145(5): 1571-6.

[19] Martín-Gómez S, Alvarez-Sánchez MA, Rojo-Vázquez FA. Oral administration of hyperimmune anti-*Cryptosporidium parvum* ovine colostral whey confers a high level of protection against cryptosporidiosis in newborn NMRI mice. J Parasitol 2005; 91(3): 674-8.

[20] Martín-Gómez S, Alvarez-Sánchez M, Rojo-Vázquez F. A newborn mouse *Cryptosporidium parvum* infection model: its application to the study of therapeutic and prophylactic measures for controlling cryptosporidiosis in ruminants. Parasitol Res 2006; 99(1): 1-6.

[21] Weir C, Vesey G, Slade M, Ferrari B, Veal DA, Williams K. An immunoglobulin G1 monoclonal antibody highly specific to the wall of *Cryptosporidium* oocysts. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7(5): 745-50.