

بررسی ایمونوگلوبولین IgG ضد کریپتوسپورییدیوم پارووم در نوزادان موش BALB/c آلوده شده

معصومه احمدیان^۱، جاوید صدرائی^{۲*}، احمد زواران حسینی^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

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۱/۲۳

دریافت مقاله: ۸۷/۰۸/۲۴

چکیده

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

مواد و روش‌ها: اووسیت‌ها از نمونه‌های مدفوع اسهالی گوساله‌های جوان جمع‌آوری و خالص شده در محلول نگاهدارنده دی کرومات ۲/۵ درصد و در یخچال ۴ درجه نگهداری شدند. ۴۰ نوزاد موش (۳-۴ روزه) BALB/c در هشت گروه پنج تایی شامل چهار گروه نمونه و چهار گروه کنترل استفاده شد و سپس 5×10^6 اووسیت به گروه‌های نمونه، از راه دهانی به کمک لوله گاواژ تلقیح شد. از قلب موش‌های گروه‌های نمونه و کنترل روزهای ۶، ۹، ۱۲، ۱۶ 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 به دست آمده توسط روش وسترن بلات تجزیه و تحلیل شد. افزایش ترشح آنتی‌بادی در نوزادان موش آلوده به اووسیت کریپتوسپورییدیوم پارووم، از نوع IgG تأیید شد و میزان میانگین جذب نوری آن از 0.099 ± 0.035 در روز ۶ بعد از تزریق به میزان 0.099 ± 0.077 افزایش یافت؛ در حالی که میزان جذب نوری گروه‌های کنترل در روز ششم 0.016 ± 0.024 بود و در روز ۱۶ فقط به 0.016 ± 0.032 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 اووسیت کریپتوسپورییدیوم از نوع IgG بود که علیه غشای خارجی اووسیت ترشح می‌شود و اختلاف معنی‌داری در نوزادان موش گروه مورد نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

کلیدواژه‌گان: کریپتوسپورییدیوم، وسترن بلات، IgG

۱- مقدمه

کریپتوسپورییدیوزیس (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: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶
Email: sadraej@modares.ac.ir

دستگاه گوارش می‌شوند [۸، ۹]. از نظر بیماری‌زایی، کریپتوسپورییدیوم پارووم سبب سوء جذب و اسهال حاد و ترش‌خی 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 IgM و IgG تولید می‌کنند و این پاسخ هماهنگ با دفع اووسیست است. ولی در سایر موجودات این پاسخ، هماهنگ نیست. حداقل ۷ آنتی‌ژن کریپتوسپورییدیوم پارووم قادر به ایجاد آنتی‌بادی خنثی کننده است. متعاقب عفونت‌های تجربی، فعالیت IgG نسبت به آنتی‌ژن‌های ۱۵، ۱۷ و ۲۷ کیلودالتونی کریپتوسپورییدیوم، در افراد دارای علائم شایع نسبت به افراد بدون علامت بسیار بیشتر است [۱۴، ۱۵].

در مطالعه حاضر وضعیت ایمنی هومورال (IgG) موش‌های BALB/c نوزاد که آلوده به کریپتوسپورییدیوم پارووم شده بودند، بررسی شد. هدف از این مطالعه، استفاده از نوزادان موش آلوده به کریپتوسپورییدیوم پارووم، برای مطالعه و اندازه‌گیری پاسخ‌های آنتی‌بادی سرم برای ارزیابی مؤثر و به‌صرفه کریپتوسپورییدیوزیس 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، 5×10^6 اووسیست با PBS (Phosphate Buffered Saline) مخلوط شد و به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. این سوسپانسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد. در این مطالعه از ۴۰ موش BALB/c شیرخوار که همگی ۲ تا ۳ روزه بودند، استفاده شد. این نوع موش‌ها از بدو تولد تا سن ۱۴ روزگی به این انگل حساسند و پس از آلوده شدن به آن، علائم 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 5×10^6 اووسیست به کمک لوله

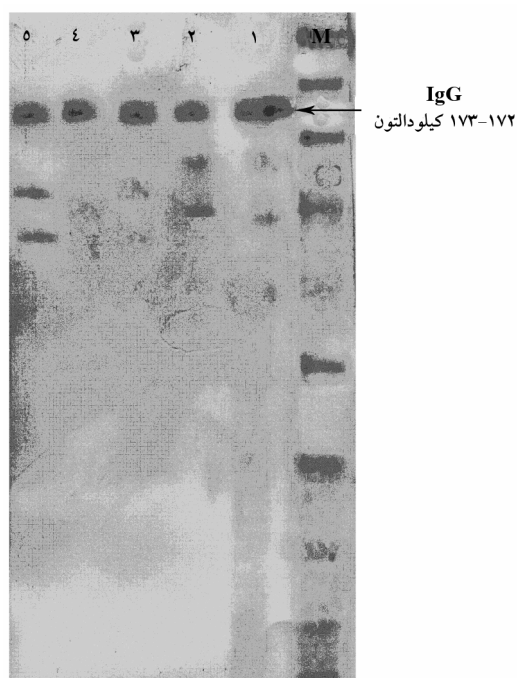
جنس کریپتوسپورییدیوم (*Cryptosporidium*) ایجاد می‌شود. با ظهور پاندمی ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) در دهه ۱۹۸۰ این تک‌یاخته به‌عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در بیماران دچار نقص ایمنی و یکی از عوامل اسهال کودکان اهمیت جهانی یافت. امروزه حضور این تک‌یاخته در تمامی کشورهای جهان در افراد سالم و در افراد با نقص سیستم ایمنی به اثبات رسیده است. کودکان جنبه‌های مختلفی از عفونت کریپتوسپورییدیوزیس 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 کریپتوسپورییدیوزیس با کاهش تعداد لنفوسیت‌های $CD4^+$ به‌ویژه زمانی که تعداد سلول‌ها به کمتر از ۲۰۰ سلول در هر میلی‌متر مکعب برسد افزایش می‌یابد [۱]. گونه‌های متعددی از کریپتوسپورییدیوم پس از جداسازی آن‌ها از میزبانان مربوط نام‌گذاری شدند که یکی از این گونه‌ها کریپتوسپورییدیوم پارووم (*Cryptosporidium parvum*) است. به‌نظر می‌رسد این انگل برای تعداد زیادی از پستانداران از جمله انسان عفونت‌زا باشد [۲-۴]. اخیراً مشخصات مولکولی، یک سازگاری گسترده میزبانی در تکامل کریپتوسپورییدیوم نشان می‌دهد و بسیاری از پستانداران یا گروه‌هایی از پستانداران با ژنوتیپ‌های کریپتوسپورییدیوم تطابق میزبانی داشته‌اند؛ به‌طوری که اختلاف آن‌ها از یکدیگر فقط در توالی DNA و عفونت‌زایی مشخص می‌شود [۵]. امروزه کریپتوسپورییدیوم را به‌عنوان عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن در انسان و نشخوارکنندگانی مانند گاو، گوسفند، بز، گوزن می‌شناسند [۶، ۷]. کریپتوسپورییدیوم 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، اسپوروزوئیت‌ها (Sporozoites) از اووسیست خارج شده و باعث آلوده شدن سلول‌های پوششی

Gel Electrophoresis انجام گرفت. همچنین به منظور تجزیه و تحلیل آنتی‌بادی‌های به دست آمده، از روش وسترن بلات (Western Blot) استفاده شد. بدین منظور از غشای نیترو سلولز با منافذ ۰/۴۵ 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.

گاوژ از راه دهانی به گروه‌های نمونه، تلقیح شد و قبل از هر بار خون‌گیری برای تأیید آلودگی در روزهای ۶، ۹، ۱۲ و ۱۶ بعد از تلقیح، آزمایش شمارش اوویسیست 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 به منظور تأیید وجود ایمونوگلوبولین‌ها، (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide SDS-PAGE.

جدول ۱ میانگین OD گروه‌های نمونه و کنترل در روزهای مختلف

میانگین \pm انحراف معیار		
آزمون	کنترل	
روز ۶	۰/۳۵۰ \pm ۰/۰۹۹	۰/۲۴۴ \pm ۰/۰۱۶
روز ۹	۰/۴۹۰ \pm ۰/۰۶۲	۰/۲۷۰ \pm ۰/۰۲۰
روز ۱۲	۰/۵۲۹ \pm ۰/۰۵۷	۰/۲۹۹ \pm ۰/۰۲۱
روز ۱۶	۰/۶۷۶ \pm ۰/۰۹۹	۰/۳۲۲ \pm ۰/۰۱۶



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

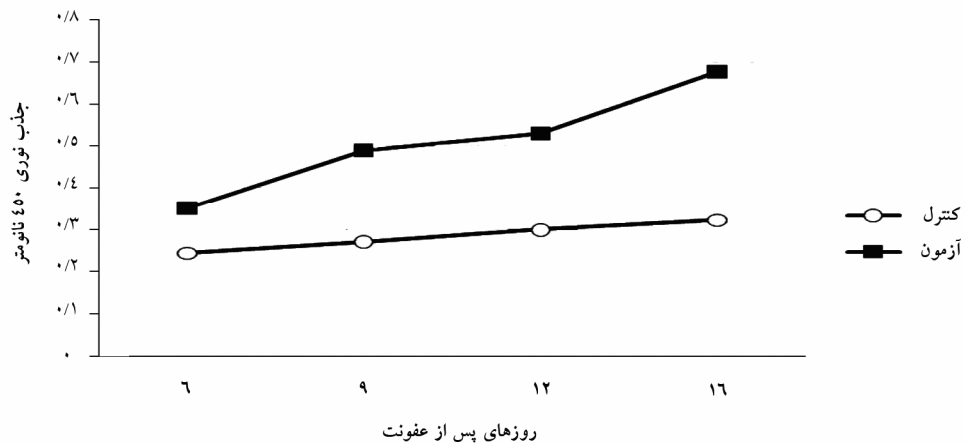
کمک آنتی‌بادی مونوکلونال (Monoclonal)، وجود آنتی‌بادی IgG، در نمونه‌های گروه آزمون تأیید شد. از نظر اندازه در

۳- نتایج

پس از طی مرحله SDS-PAGE و وسترن بلات و به

با موش‌های گروه کنترل دارد ($P < 0.05$). گروه روز ۱۶ دارای بالاترین میانگین سطح IgG بودند، هر چند که سطح IgG گروه‌های روزهای ۹، ۶ و ۱۲ هم به‌طور کاملاً محسوسی از گروه‌های کنترل بالاتر بودند (جدول ۱، شکل ۱ و نمودار ۱).

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



نمودار ۱ میزان جذب نوری IgG در روزهای مختلف

آنتی‌بادی خنثی کننده است. متعاقب عفونت‌های تجربی، فعالیت IgG نسبت به آنتی‌ژن‌های ۱۵، ۱۷ و ۲۷ کیلودالتونی کریپتوسپوریدیوم، در افراد دارای علائم شایع نسبت به افراد بدون علامت بسیار بیشتر است [۱۴، ۱۵].

آنتی‌بادی‌های ایجاد شده در نوزاد موش آلوده به اووسیت کریپتوسپوریدیوم پارووم، از نوع IgG (بیشتر زیرکلاس IgG1) و IgM بوده که علیه غشای خارجی اووسیت 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 ۹۶ موش نوزاد صورت گرفت، از روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) برای تعیین میزان آنتی‌بادی استفاده شد؛ میزان

۴- بحث

تک‌یاخته انگلی کریپتوسپوریدیوم پارووم 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 اووسیت در مدفوع می‌شود. در موارد شدید، حتی امکان مرگ حیوان آلوده نیز وجود دارد [۱۶]. 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 اووسیت است؛ ولی در سایر موجودات این پاسخ، هماهنگ نیست. حداقل ۷ آنتی‌ژن کریپتوسپوریدیوم پارووم قادر به ایجاد

بود؛ شناسایی کردند. در این بررسی پروتئین‌های استخراج شده محلول، به موش‌ها تزریق و آنتی‌بادی آن‌ها بررسی شد. مثلاً در اثر تزریق، آنتی‌ژن‌های دیواره اوویست سطح IgG, IgM 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.

آنتی‌بادی IgG در روزهای ۶ و ۱۶ 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 ۲۰۰۶ به نوزادان موش، اوویست‌های کریپتوسپورییدیوم 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 IgA, IgM, IgG را در روزهای ۹، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ بعد از آلودگی سنجیدند و نشان دادند که در روز ۱۶ کمترین مقدار آنتی‌بادی وجود دارد [۲۰].

ویر (Weir) و همکاران در سال ۲۰۰۰، شش آنتی‌ژن متفاوت سطح اوویست را که علیه آن‌ها IgG, IgM تولید شده

۶- 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. *Cryptosporidium agni sp.n.* from lambs, and *cryptosporidium 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 growth 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, Amsterdam. The Netherlands 2003; p: 19-44.
- [14] Sulaiman IM. Differentiation of human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg 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 antiparasite 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 colostrum 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.