● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره دهم، شمارهٔ ۳، مرداد – شهریور ۱۳۸۷، صفحه ۳۴-۳۰

مقایسه سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ و اینترلوکین ۱۲ بروسلوز انسانی در دامداران و افراد سالم (بابل)

قربان ملیجی[*1]، محمود صادقی[2]، محمود حاجی احمدی[3]، سیدعزت اله موسی کانی[4]، علی اکبر کریمی[5]

۱- استادیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار گروه عفونی دانشگاه علوم پزشکی بابل
۳- عضو هیأت علمی گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۴- کارشناس آزمایشگاه ۵- پزشک عمومی

سابقه و هدف: بروسلوز انسانی بیماری عفونی قابل انتقال بین انسان و دام می باشد. دامداران به علت تماس با دام در معرض خطر ابتلاء به بیماری هستند. ارزیابی تولید سایتوکاینها بویژه سایتوکاینهای ۱۰ -IL و۱۲ -IL ابزار مهمی در بررسی پاسخ های ایمنی در مقابل محرکهائی نظیرعوامل بیماریزا، واکسنها و سایرعکس العمل های ایمنی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی وضعیت سیستم ایمنی شامل میزان تولید سایتوکاینهای فوق در سرم دامداران بروسلوز مثبت و منفی در مقایسه با کنترل سالم است.

مواد و روشها: این مطالعه مقطعی و تحلیلی بر روی ۳۰ نفر از دامداران مبتلا به بیماری بروسلوز، ۳۰ نفر دامدار غیر بیمار و ۲۰ نفر از افراد کنترل سالم انجام شد. cc ۵ خون از افراد گرفته شد و اندازه گیری میزان سایتوکاینهای ۱۰ -IL و ۱۲-IL به روش الایزا (کیت‌های شرکت Diaclone) انجام شد.

یافته‌ها: میانگین سطح سرمی ۱۰ -IL در دامداران مبتلا به تب مالت ۲۰/٤±۱۳۳/٦، دامداران سالم ۲۹/۲±۵۵/۵ و در کنترل سالم ۳/۲±۱٦/۱ پیکوگرم در میلی لیتر بوده است که در مقایسه با کنترل سالم از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p<0/05$). میانگین میزان ۱۲ -IL در دامداران مبتلا به تب مالت ۱٤/۷±۱٦/٦ پیکوگرم در میلی لیتر، در دامداران سالم ۸/٦±۱۵/۲ و در کنترل سالم ۰/۸±۳/۷ بوده است. در واقع تولید۱۲ -IL در پاسخ به آنتی ژنهای بروسلا درگروه دامداران مبتلا به تب مالت و دامداران سالم درمقایسه با کنترل سالم هرچند تفاوت قابل توجهی را نشان می دهد ولی از نظر آماری معنی‌دار نمی باشد.

نتیجه‌گیری: افزایش سطح۱۰ -IL در دامداران مبتلا به تب مالت بیانگر نقش موثرتر پاسخ ایمنی وابسته به۲ Th در ایجاد تظاهرات بالینی بیماری می باشد که مهار این نوع پاسخ ایمنی شاید در درمان بیماری موثر باشد.

واژه های کلیدی: *بروسلوز، دامداران، الایزا، اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱۲، سایتوکاین.*

دریافت: ۸۷/۱/۱۷، ارسال جهت اصلاح: ۸۷/۲/۱۸، پذیرش: ۸۷/۴/۱۹

مقدمه

تب مالت بیماری عفونی قابل انتقال بین انسان و دام در سراسر جهان می‌باشد. نسبت به جمعیت عادی، دامداران بعلت تماس با دام آلوده یا مصرف مواد لبنی آلوده بیشتر در خطر ابتلاء به بیماری هستند. این بیماری توسط باکتری‌های داخل سلولی از جنس بروسلا ایجاد می‌شود که واجد مکانیسمهای متنوع و خاصی است که آنرا در برابر هضم، توسط سلول‌های فاگوسیتی حفاظت می‌کند، و بدنبال آن در بدن میزبان عفونت شدیدی ایجاد می‌کند (۱). این بیماری اگرچه در کشورهای پیشرفته صنعتی کنترل شده است، ولی بعنوان یک مشکل پزشکی مهم در اکثر کشورهای در حال توسعه بشمار می‌رود. در ایران نیز تب مالت هنوز جزء معضلات مهم بهداشتی می‌باشد (۲) که دانستن هرچه بهتر مکانیسم‌های بقای درون سلولی بروسلا برای ریشه‌کنی و کنترل بیماری ضروری است. ابتلاء به

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.3.4.6]

بروسلوز باعث فعال شدن پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌گردد. در اوایل سیر عفونت، سایتوکاینهائی از قبیل۱۲ -IL موجب پیشبرد تولید IFN-γ شده، که پاسخ‌های Th از نوع ۱ و فعال شدن ماکروفاژها را تحریک می‌نماید. ماکروفاژهای فعال شده می‌توانند بروسلاهای داخل سلولی را کشته و عفونت را پاکسازی نمایند. TNF-α نیز در اوایل پاسخ ایمنی تولید می‌شود و لنفوسیتهای سایتوتوکسیک را تحریک می‌کند، که قادرند به پاکسازی نسبی دست پیدا کنند. با این وجود، توانائی بروسلاهای ویرولان در سرکوب پاسخ TNF-α ممکن است نقش محدود آن در حفاظت را توجیه نماید. سایتوکاینهای التهابی از جمله IL-۶ و IL-۱۰ موجب تنظیم کاهشی پاسخ حفاظتی می‌شوند (۳).

مطالعات نشان می‌دهد که حفاظت در این بیماری توسط سلول‌های کمکی T یک (Th ۱) صورت می‌گیرد، در حالیکه پاسخ Th ۲ در تشدید بیماری موثرند (۵و۴). IL-۱۰ یک سایتوکاین مهم ضد التهابی بشمار می‌رود که درکاهش تولید IL-۱۲ نقش اساسی داشته و دارای اثر مهاری روی۱۲-IL بوده و از نظر کلینیکی با ارزش می باشد (۶). ارزیابی تولید سایتوکاینهای IL-۱۰ و IL-۱۲، می‌تواند ابزار مهمی در بررسی پاسخهای ایمنی در مقابل محرکهائی نظیر عوامل پاتوژن، واکسن ها و چالشهای ایمنی باشد. همچنین با توجه به شیوع بیماری بروسلوز در ایران، دانستن هر چه بهتر مکانیسم‌های بقای داخل سلولی میکروب بروسلا برای کنترل و ریشه‌کنی این بیماری کاملاً ضروری می‌باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه مقطعی و تحلیلی ۳۰ نفر از دامداران مبتلا به بیماری تب مالت، ۳۰ نفر دامدار غیر بیمار و۲۰ نفر از افراد کنترل سالم با نمونه‌گیری آسان طی سالهای ۸۵ تا۸۶ مورد بررسی قرار گرفتند. دامداران بیمار از بین بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید یحیی نژاد و آزمایشگاه امام حسین (ع) بندپی شرقی و غیر بیمار از دامداران ساکن منطقه بندپی شرقی بابل انتخاب شدند. هر یک از افراد پرسشنامه حاوی مشخصات فردی، سن، جنس و سابقه قبلی به بیماری بروسلوز را تکمیل نمودند. جهت انجام آزمایش الایزا، 5cc خون از افراد گرفته شد که پس از لخته شدن، به آزمایشگاه بخش ایمونولوژی منتقل شده پس از سانتریفیوژ و جدا کردن سرم در دمای ۷۰− درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شد. تشخیص بروسلوزیس بر اساس علائم و نشانه های بالینی و آزمایشهای سرولوژیک بوده است. آزمایش سروآگلوتیناسیون استاندارد (STA) با تیتر ۱/۳۲۰ ≥ یا آزمایش ۲ مرکاپتواتانول (2ME) با تیتر ۱/۴۰ ≥ به همراه علائم بالینی معیار تشخیصی بروسلوز بود. برای اندازه‌گیری میزان سایتوکاینهای۱۰-IL و ۱۲-IL از روش ELISA استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی اختصاصی هر یک ازسایتوکاینهای ساخت شرکت Diaclone هلند در چاهک میکروپلیت ۹۶خانه‌ای، ساخت شرکت Nunk کشور دانمارک پیپت شد. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در یخچال ۴-۲ درجه سانتیگراد با ٪۰/۰۵ PBS- Tween ۳ تا ۴ بار شستشو داده شد و بعد از بلوکه کردن فضای خالی میکروپلیت با ٪۱ BSA (Bovine Serum Albumin) نمونه رقیق شده به هر حفره اضافه شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. بعد از شستشو، آنتی بادی لایه دوم که با آنزیم HRP (Horse Radish Proxidase) کونژوگه شده بود به عنوان Label به هر حفره اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون، سوبسترا (H_2O_2) و کروموژن را اضافه کرده و پس از ۱۵−۱۰دقیقه محلول متوقف کننده اضافه گردید و آنگاه در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از نمونه‌های استاندارد، غلظت هر یک از نمونه‌ها بدست آمد. پس از انجام آزمایشات فوق و تکمیل پرسشنامه‌ها، کلیه داده‌ها توسط آزمونهای آماری Chi-Square، ANOVA، Kruskal-wallis، Mann-whitney مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p<۰/۰۵$ معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

در این تحقیق ۳۰ نفر دامدار مبتلا به تب مالت (۱۶ مرد، ۱۴ زن)، ۳۰ نفر دامدار غیر بیمار (۱۷ مرد، ۱۳ زن) و ۲۰ نفر کنترل سالم (۳ مرد، ۱۷ زن) مورد بررسی قرار گرفتند که توزیع جنسی بین ۳ گروه از نظر آماری معنی دار بوده است ($p=۰/۰۰۸$). میانگین سن افراد در دامداران مبتلا به تب مالت ۱۷/۸±۳۲/۸ سال، در دامداران سالم ۱۹/۲±۳۶/۶ در مقایسه با کنترل ۱۳/۱±۲۲/۵ بود.

میانگین و انحراف معیار سطح IL−۱۰ در دامداران مبتلا به تب مالت، دامداران سالم و گروه کنترل به ترتیب ۲۰/۴±۱۳۳/۶،

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.3.4.6]

۵۵/۵±۲۹/۲ و ۱۶/۱±۳/۲ پیکوگرم در میلی لیتر بود (p=۰/۰۰۰۱). همچنین سطح IL-۱۰ در دامداران مبتلا (p=۰/۰۰۰۱) و دامداران سالم (p=۰/۰۰۰۱) بطور معنی داری بیشتر از کنترل سالم بود. همچنین میزان IL-۱۲ در دامداران مبتلا به تب مالت ۱۶/۶±۱۴/۷ و در دامداران سالم ۱۵/۲±۸/۶ و در مقایسه با کنترل سالم ۳/۷±۰/۸ پیکوگرم در میلی لیتر بوده است که این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبوده است و در مقایسه دو به دو در گروهها نیز ارتباط معنی داری مشاهده نگردید.

بحث و نتیجه گیری

افزایش سطح سایتوکاینهای IL-۱۰ وIL-۱۲ در سرم افراد مبتلا به بروسلوز نشان می‌دهد که این دسته از سایتوکاینها در این بیماری در انسان از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار هستند. بویژه سطح IL-۱۰ افزایش قابل توجهی داشته است، که از نظر آماری نیز معنی‌دار بوده است. در مطالعه حاضر اگرچه سطح IL-۱۲ در افراد مبتلا به تب مالت افزایش قابل توجهی داشته، اما از نظر آماری معنی‌دار نبوده که با مطالعه انجام شده توسط Ahmed و همکاران که در آن اختلاف سطح سرمی IL-۱۲ در افراد مبتلا به بروسلوز در مقایسه با کنترل سالم معنی‌دار بوده است (۷) متفاوت می باشد. در مطالعه رفیعی و همکاران تولید IL-۱۲ در دو گروه از بیماران حاد و مزمن نسبت به گروه شاهد بطور معنی‌داری بیشتر بوده است، بطوریکه میانگین میزان IL-۱۲ در افراد با بروسلوز حاد ۱۸/۹±۳/۵ پیکو گرم در میلی لیتر و در بروسلوز مزمن ۵۶±۱۴/۹ پیکو گرم در میلی لیتر بوده است (۸) که با مطالعه حاضر علیرغم شباهت از نظر میزان با بروسلوز حاد در دو گروه در مقایسه با کنترل سالم همخوانی نداشته است. در بررسی کریمی‌نیا و همکاران میزان IL-۱۰ بالا بوده در حالیکه میزان IL-۱۲ افزایش نداشته است (۹) که می‌تواند نتایج این مطالعه از نظر تولید سایتوکاین همخوانی داشته باشد.

به هر حال این مطالعه نشان داد که بیماری تب مالت در تولید IL-۱۰ نقش موثری داشته و میزان آن بشدت افزایش پیدا کرد، در حالیکه در تولید IL-۱۲ به میزان کمتری نقش داشته است. تحقیق Baldwin و همکارانش بر روی موش در عفونت بروسلوز، IL-۱۰ ایش یافته بود (۱۰) که با بررسی حاضر همخوانی دارد.

Huang و همکاران نشان دادند که IL-۱۰ به عنوان یک سایتوکاین ذخیره در سرم، دارای ماندگاری طولانی تری است (۱۱). بنابراین مطالعه تولید IL-۱۰ در پاسخ به عفونت بروسلوز در انسان از اهمیت خاصی بر خوردار است. تب مالت می‌تواند یک عامل بسیار قوی در تولید IL-۱۰ محسوب گردد که در میان سایتوکاین تولیدی ناشی از Th۲ در پاسخ به بیماری تب مالت از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد. همچنین کاهش تولید IL-۱۲ در مهار عملکرد ایمنی ذاتی نقش اساسی ایفا می‌کند و علاوه بر آن در جلوگیری از فعالیت Th۱ که از سلولهای مهم ایمنی اختصاصی است دخالت داشته باشد. مطالعه سایر سایتوکاینها از جمله IL-۴ و IFN-γ به منظور تعیین نقش سایتوکاینهای فوق در پاتوژنز بیماری تب مالت در این افراد ضروری می نماید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کلیه کارکنان بخش عفونی و آزمایشگاه های بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل و امام حسین (ع) بندپی شرقی در تهیه نمونه ها و آقای دکتر امرا... مصطفی زاده در انجام آزمایش و آقای محمد منتظری که در ویرایش این مقاله همکاری داشته‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

****

References

1. Young EJ. Brucella species, In: Mandell GL; Douglas GR and Bennett JE. Principles and practice of infectious disease, 6th ed, New York, Churchill Livingstone 2005; pp: 2669-7.

2. Zowghi E, Ebadi A. A survey on human brucellosis Malta fever in Iran. Arch Inst Razi 1986: 36-7.

3. Corbel MJ, Beeching N. Brucellosis. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS. Harrison's principles of internal medicine, 16th ed, New York, McGraw Hill 2005; pp: 914-17.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.3.4.6]

4. Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Differential activation of brucella reactive CD4+T cells by brucella infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun 1995; 63:969-75

5. Rafiei A, Ardestani SK, Kariminia A, Keyhani A, Mohraz M, Amirkhani A. Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease. J Infect 2006; 53 (5): 315-24.

6. Goodier MR, Londei M. Lipopolysacchride stimulates the proliferation of human CD56+ CD3- NK cells: a regulatory role for monocytes and IL-10. J Immunol 2000; 165(1): 134-47.

7. Ahmed K, Al Matrouk KA, Martinez G, Oishi K, Rotimi VO, Nagatake T. Increased serum levels of interforon gamma and IL-12 during human brucellosis. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(3): 425 -7.

8. Rafiei AR, Kariminia A, Ajami A, Kabodanyan Ardestani S. Reduction in production of IFN-? is accompained with an increase in production of IL-12 in chronic Brucellosis patients. J Mazandaran Univ Med Sci 2004; 42(14): 11-21.

9. Kariminia A, Kavoossy G, Khatami S, Zowghi E, Ardestani SK. Study of interleukin-10 and interleukin-12 productions in response to lipopolysaccharides extracted from two different brucella strains. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2002; 25(2): 85-93.

10. Baldwin CL, Parent M. Fundamentals of host Immune response against brucella abortus: what the mouse model has revealed about control of infection Vet Microbiol 2002; 90(1-4): 367-82.

11. Huang L, Kreig AM, Eller N, Scott DE. Induction and regulation of Th1 inducing cytokines by bacterial DNA lipopolysaccharide and heat-inactivated bacteria. Infect Immun 1999; 67(12): 6257- 63.

*آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی، تلفن: ۴-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.3.4.6]

COMPARISON OF SERUM LEVEL OF INTERLEUKIN (IL)-10 AND INTERLEUKIN (IL)-12 HUMAN BRUCELLOSIS IN CATTLE OWNERS AND HEALTH CONTROLS (BABOL)

G. Maliji (PhD) [1*], M. Sadeghi (MD) [2], M. Haji Ahmadi (MSc) [3], S.E. Mosavi Kani (MSc) [4], A.A. Karimi (GP) [5]

1. Assistant Professor of Immunology Department, Cellular and Molecular Biology **Research Center,** Babol Univesity Medical Sciences, Babol, Iran, ghmaliji @ yahoo.com, 2. Assistant Professor of Infectious Diseases Department, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, 3. Academic Member of Social Medicine, Babol University of Medical Sciences,Babol, Iran, 4. Instructor of Laboratory, 5. General Practitioner*

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Human brucellosis is a worldwide zoonotic infectious disease that can be transmitted between animals and humans. Cattle owners who have occupational contact with animals are at the risk of this disease. Evaluation of production of cytokines especially IL-10 and IL-12 are important factor in investigation of immune response against a variety of intracellular pathogen, vaccination and other immune reactions. In the present study, the cytokines induced during this infection determined the level of IL-10 and IL-12 in serum of cattle owners with brucellosis and without brucellosis compared with health controls.

METHODS: This cross-sectional and descriptive study was performed on 30 cattle owners with brucellosis and 30 cattle owners without brucellosis and 20 person of health control. Then 5cc blood sample have been taken from donors and cytokines IL-10 and IL-12 of ELISA were determined by Diaclone company.

FINDINGS: The mean serum IL-10 level of cattle owners with positive brucellosis (133.6 ± 20.4) and negative brucellosis (55.5±29.2) compared with the health control (16.1±3.2). This difference was statistically significant ($p<0.05$). Considering the results of this investigation the mean IL-12 level in positive brucellosis cattle owners (16.6±14.7) and negative brucellosis (15.2±8.6) compared with the health control (3.7±0.8). However production of IL-12 response to brucella antigenic in positive brucellosis cattle owners and negative brucellosis was increased in comparison to the health control, differences between the values was not significant.

CONCLUSION: Increase of IL-10 indicated relationship between brucellosis and Th2 cell response. Control of immune response can be effective in the treatment of disease.

KEY WORDS: *Brucellosis, Cattle owners, ELISA, Interleukin (IL)-10, Interleukin (IL)-12, Cytokine*.

Journal of Babol University of Medical Sciences 2008; 10(3): 30-34.

Received: April 5th 2008, Revised: May 7th 2008, Accepted: July 9th 2008

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.3.4.6]