

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

قربان ملیجی^{۱*}، محمود صادقی^۲، محمود حاجی احمدی^۳، سیدعزت اله موسی کانی^۴، علی اکبر کریمی^۵

۱- استادیار گروه ایمنولوژی 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 IL-۱۰ و IL-۱۲ ابزار مهمی در بررسی پاسخ های ایمنی در مقابل محرکهائی نظیر عوامل بیماریزا، واکسنها و سایر عکس 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. ۵ cc خون از افراد گرفته شد و اندازه گیری میزان سایتوکاینهای IL-۱۰ و IL-۱۲ به روش الایزا (کیت های شرکت Diaclone) انجام شد.

یافته ها: میانگین سطح سرمی IL-۱۰ در دامداران مبتلا به تب مالت $133/6 \pm 20/4$ ، دامداران سالم $50/5 \pm 29/2$ و در کنترل سالم $16/1 \pm 3/2$ پیکوگرم در میلی لیتر بوده است که در مقایسه با کنترل سالم از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($p < 0/05$). میانگین میزان IL-۱۲ در دامداران مبتلا به تب مالت $16/6 \pm 14/7$ پیکوگرم در میلی لیتر، در دامداران سالم $15/2 \pm 8/6$ و در کنترل سالم $3/7 \pm 0/8$ بوده است. در واقع تولید IL-۱۲ در پاسخ به آنتی ژنهای بروسلا در گروه دامداران مبتلا به تب مالت و دامداران سالم در مقایسه با کنترل سالم هر چند تفاوت قابل توجهی را نشان می دهد ولی از نظر آماری معنی دار نمی باشد.

نتیجه گیری: افزایش سطح IL-۱۰ در دامداران مبتلا به تب مالت بیانگر نقش موثرتر پاسخ ایمنی وابسته به Th ۲ 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: ۸۷/۶/۱۸، پذیرش: ۸۷/۴/۱۹

مقدمه

تب مالت بیماری عفونی قابل انتقال بین انسان و دام در سراسر جهان می باشد. نسبت به جمعیت عادی، دامداران به علت تماس با دام آلوده یا مصرف مواد لبنی آلوده بیشتر در خطر ابتلاء به بیماری هستند. این بیماری توسط باکتری های داخل سلولی از جنس بروسلا ایجاد می شود که واجد مکانیسم های متنوع و خاصی است که آنرا در برابر هضم، توسط سلول های فاگوسیتی حفاظت می کند، و بدنبال

آن در بدن میزبان عفونت شدیدی ایجاد می کند (۱). این بیماری اگرچه در کشورهای پیشرفته صنعتی کنترل شده است، ولی بعنوان یک مشکل پزشکی مهم در اکثر کشورهای در حال توسعه بشمار می رود. در ایران نیز تب مالت هنوز جزء معضلات مهم بهداشتی می باشد (۲) که دانستن هرچه بهتر مکانیسم های بقای درون سلولی بروسلا برای ریشه کنی و کنترل بیماری ضروری است. ابتلاء به

بروسلوز باعث فعال شدن پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌گردد. در اوایل سیر عفونت، سایتوکاینهائی از قبیل IL-۱۲ 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. سایتوکاینهائی 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 (۴و۵). IL-۱۰ یک سایتوکاین مهم ضد التهابی بشمار می‌رود که در کاهش تولید IL-۱۲ نقش اساسی داشته و دارای اثر مهارى روی IL-۱۲ بوده و از نظر کلینیکی با ارزش می‌باشد (۶). ارزیابی تولید سایتوکاینهائی IL-۱۰ و IL-۱۲، می‌تواند ابزار مهمی در بررسی پاسخ‌های ایمنی در مقابل محرک‌های نظیر عوامل پاتوژن، واکسن‌ها 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 و ۲۰ نفر از افراد کنترل سالم با نمونه‌گیری آسان طی سالهای ۸۵ تا ۸۶ 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، ۵cc خون از افراد گرفته شد که پس از لخته شدن، به آزمایشگاه بخش ایمونولوژی منتقل شده پس از ساترفیوژ و جدا

کردن سرم در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شد. تشخیص بروسلوزیس بر اساس علائم و نشانه‌های بالینی و آزمایشهای سرولوژیک بوده است. آزمایش سروآگلوتیناسیون استاندارد (STA) با تیتراژ $\geq 1/320$ یا آزمایش ۲ مرکاپتاتانول (2ME) با تیتراژ $\geq 1/40$ به همراه علائم بالینی معیار تشخیصی بروسلوز بود. برای اندازه‌گیری میزان سایتوکاینهائی IL-۱۰ و IL-۱۲ از روش ELISA استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی اختصاصی هر یک از سایتوکاینهائی ساخت شرکت Diaclone هلند در چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ساخت شرکت Nunk کشور دانمارک پیپت شد. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در یخچال ۴-۲ درجه سانتیگراد با ۰.۵٪ Tween-PBS 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 Peroxidase) کوئزوگه 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 ۱۵-۱۰ دقیقه 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-Mann-whitney مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p < 0.05$ 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 ($p = 0.008$). میانگین سن افراد در دامداران مبتلا به تب مالت $32/8 \pm 17/8$ سال، در دامداران سالم $36/6 \pm 19/2$ در مقایسه با کنترل $22/5 \pm 13/1$ بود.

میانگین و انحراف معیار سطح IL-۱۰ در دامداران مبتلا به تب مالت، دامداران سالم و گروه کنترل به ترتیب $133/6 \pm 20/4$ ،

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 برخوردار 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 پاتوژن بیماری تب مالت در این افراد ضروری می‌نماید.

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 امرام... مصطفی زاده در انجام آزمایش و آقای محمد منتظری که در ویرایش این مقاله همکاری داشته‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

۵۵/۵±۲۹/۲ و ۱۶/۱±۳/۲ پیکوگرم در میلی لیتر بود ($p=0/0001$). همچنین سطح IL-۱۰ در دامداران مبتلا ($p=0/0001$) و دامداران سالم ($p=0/0001$) بطور معنی داری بیشتر از کنترل سالم بود. همچنین میزان IL-۱۲ در دامداران مبتلا به تب مالت $14/7 \pm 16/6$ و در دامداران سالم $8/6 \pm 15/2$ و در مقایسه با کنترل سالم $8/8 \pm 3/7$ 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 و IL-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 می‌باشد. 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 $3/5 \pm 18/9$ پیکو گرم در میلی لیتر و در بروسلوز مزمن $9/9 \pm 56$ 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 کربمی‌نیا و همکاران میزان IL-۱۰ بالا بوده

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.

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 interferon 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- γ is accompanied 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.

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