AF 14F

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۰، ۴۱، ۴۲ بهار ۱۳۷۸

ارزیابی آزمون هما گلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA) در تشخیص هیداتیدوزیس گوسفندی

● **غلامرضا معتمدی**، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات رازی
● **عبدالحسین دلیمی‌اصل**، عضو هیأت علمی دانشگاه تربیت مدرس
● **سعید عطایی‌کچویی**، عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات رازی
تاریخ دریافت: اردیبهشت‌ماه ۱۳۷۷

چکیده

در این بررسی تعداد ۴۸ نمونه سرم گوسفند شامل ۳۲ نمونه سرم از گوسفندان دارای کیست هیداتیک و ۱۶ نمونه سرم از گوسفندان فاقد کیست از لحاظ آزمون هما گلوتیناسیون غیرمستقیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای انجام آزمایش از پادگن خام تهیه شده از مایع کیست استفاده گردید. نتایج نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمون IHA بر مبنای تیتر ۱:۶۴ به ترتیب ۸۱/۲۵ و ۸۱/۲۵ درصد و بر مبنای تیتر ۱:۱۲۸ حساسیت ۷۵ درصد و ویژگی آزمون ۱۰۰ درصد بوده‌اند. با توجه به نتایج به دست آمده و ساده و ارزان بودن آزمایش IHA، می‌توان این تست را به عنوان یک روش تشخیصی در مطالعات اپیدمیولوژی پیشنهاد نمود.

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 40, 41, 42**
PP: 138-139

Evaluation of IHA in sheep hydatidosis diagnosis.

By: Motamedi GH.R. Razi vaccine and serum research Institute; Dalimi Asl, A.H.; Medical Faculty of Tarbiat Modarres University, Kachooei, S. Razi Vaccine and Serum Research Institute

In the present survey, 32 sera from sheep infected with hydatid cyst, confirmed in autopsy procedure, and 16 sera from uninfected sheep were evaluated by Indirect Haemagglutination test (IHA). Titres ≥ 1:64 and ≥ 1:128 in two steps were considered as positive. The sensetivity and specificity of the test for the titre 1:64 were evaluated 81.25% and 81.25% but for the titre 1:128 75% and 100% respectively.

مقدمه

هیداتیدوزیس یکی از بیماری‌های انگلی مشترک انسان و دام به حساب می‌آید که در اکثر نقاط دنیا پراکنده بوده و باعث زیانهای اقتصادی و بهداشتی فراوانی می‌گردد. طبق گزارشات موجود میزان آلودگی کیست هیداتید در حیوانات میزبان واسط بین ۱/۵ تا ۵۷/۷ درصد و آلودگی به کرم بالغ در میزبان‌های نهائی بین ۵/۵ تا ۱۰۰ درصد می‌باشد (۲، ۱۱ و ۱۲).

کاربرد روشهای سرولوژی در تشخیص هیداتیدوزیس از سال ۱۹۰۸ به وسیلهٔ Parvu و Weinberg شروع شد. سپس سایر محققین روشهای مختلف سرولوژی مانند CFT, ID, IHA, ELISA و... را مورد ارزیابی و مقایسه قرار دادند.

Garabedian و همکاران (۱۹۷۵) برای اولین بار آزمون IHA را برای تشخیص آلودگی به کیست هیداتید انسان معرفی نمودند.

Gonzales (۱۹۶۲), Gordi (۱۹۶۲), Vibe (۱۹۶۳)، Gomez (۱۹۸۰) و ... به دلایل محاسن موجود در روش IHA آن را نسبت به سایر روشها مناسب‌تر گزارش کردند.

با توجه به موارد فوق برای تشخیص بیماری هیداتیدوزیس در دام ارزیابی آزمون IHA تشخیص بیماری در گوسفند مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

سوسپانسیون گلبول قرمز ۵۰٪ راسه مرتبه در بافر PBS (pH=۷/۲) شسته و سپس به صورت محلول ۱۰٪ آماده گردید. در این آزمایش از گلبول قرمز گوسفندان غیر آلوده استفاده گردید.

پادگن از مایع کیست بارور گوسفند تهیه گردید. بدین‌ترتیب که پس از جمع‌آوری مایع کیست آن را سانترفیوژ کرده (۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه)، سپس به مدت ۲۴ ساعت در مجاور آب معمولی و آب مقطر دیالیز نموده و با عمل تبخیر حجم مایع را دو برابر غلیظ نموده و میزان پروتئین آن با روش لوری محاسبه گردید ($\frac{۳۳۰mg}{۱۰۰cc}$) و به عنوان منبع پادگن استفاده گردید (۳، ۴ و ۱۶).

از گلبول قرمز ۱۰ درصد محلول ۲/۵ درصد تهیه و با حجم مساوی اسیدتانیک $\frac{۱}{۲۰۰۰۰}$ مجاور نموده و سپس محلول ۲/۵ درصد از این گلبول قرمز تانیکه با حجم مساوی پادگن اپتیمم نیز مجاور نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در گرمخانه و یا ۲۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده و پس از سانترفیوژ نمودن گلبول قرمز حساس شده با پادگن را در سرم نرمال خرگوش $\frac{۱}{۱۰۰}$ به صورت سوسپانسیون ۲ درصد در آورده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به عنوان پادگن به کار برده شد (۳ و ۴).

برای انجام آزمایش از صفحات ۹۶ حفره‌ای u شکل استفاده شد. در حفرات صفحه آزمایش ۵۰ لاندا محلول رقیق کننده ریخته و سپس به حفره اول هر ردیف ۵۰ لاندا سرم اضافه کرده و به طور سریالی ۵۰ لاندا مخلوط را از حفره اول به حفره دوم و الا آخر مخلوط نموده و نهایتاً از حفره آخر ۵۰ لاندا مخلوط بیرون می‌ریزیم در نتیجه در تمام حفرات صفحه آزمایش ۵۰ لاندا مخلوط سرم و محلول رقیق کننده با رقتهای مختلف وجود خواهد داشت.

سپس ۲۵ لاندا از پادگن مصرفی به هر حفره اضافه می‌شود و به مدت ۲-۳ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده و بعد نتیجه قرار گردید.

در حفره‌ای که گلبول قرمز به صورت تکمه قرمز رنگ ته نشین شود نتیجه منفی می‌باشد و در صورتیکه گلبول قرمز به صورت پلاک باکناره نامنظم دیده شود واکنش مثبت است ضمناً برای هر آزمایش کنترلهای محلول رقیق کننده + گلبول قرمز غیر حساس ۲ درصد محلول رقیق کننده + گلبول قرمز حساس ۲ درصد سرم منفی + گلبول قرمز حساس ۲ درصد سرم مثبت + گلبول قرمز غیر حساس ۲ درصد می‌گذاریم. تمام چهار مورد فوق باید منفی باشند در صورتیکه واکنش

جدول شماره ۱- تیتراسیون سرم گوسفندان دارای کیست و فاقد کیست بوسیله آزمون IHA

تیتر سرم / گروههای تحت مطالعه	منفی		مثبت													
			۱:۴		۱:۸		۱:۳۲		۱:۶۴		۱:۱۲۸		۱:۲۵۶		۱:۵۱۲		۱:۱۰۲۴	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱-گوسفندان دارای کیست هیداتید	۰	۰	۳۲	۱۰۰	۳۰	۹۳/۷۵	۲۹	۹۰/۰۶	۲۶	۸۱/۲۵	۲۴	۷۵	۱۸	۵۶/۲۵	۱۰	۳۱/۲۵	۴	۱۲/۵
۲-گوسفندان فاقد کیست هیداتید	۷	۴۳/۷۵	۹	۵۶/۲۵	۸	۵۰	۳	۱۸/۷۵	۳	۱۸/۷۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

مثبت دیده شود باید سرمها و سرم نرمال خرگوش را در دمای ۵۶ درجه غیر فعال و با گلبول قرمز غیر حساس مجاور نموده تا پادتنهای هترولوگ جذب شوند.

نتایج

در این مطالعه ۴۸ نمونه سرم گوسفند بررسی گردید. نتایج مطالعه سرم، گوسفندان مبتلا به کیست هیداتیک (۳۲ مورد) و سرم گوسفندان فاقد کیست (۱۶ مورد) در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. با توجه به جدول شماره ۱، ۱۲/۵ درصد گوسفندان حاوی کیست دارای تیتر تا ۱:۱۰۲۴ را نشان دادند و هیچگونه تیتر منفی در آنها مشاهده نشد. از طرف دیگر ۴۳/۷۵ درصد گوسفندان فاقد کیست دارای تیتر منفی بوده‌اند، با اینحال ۷۵/۱۸ درصد این گروه از گوسفندان تیتر مساوی ۱:۶۴ را نشان دادند.

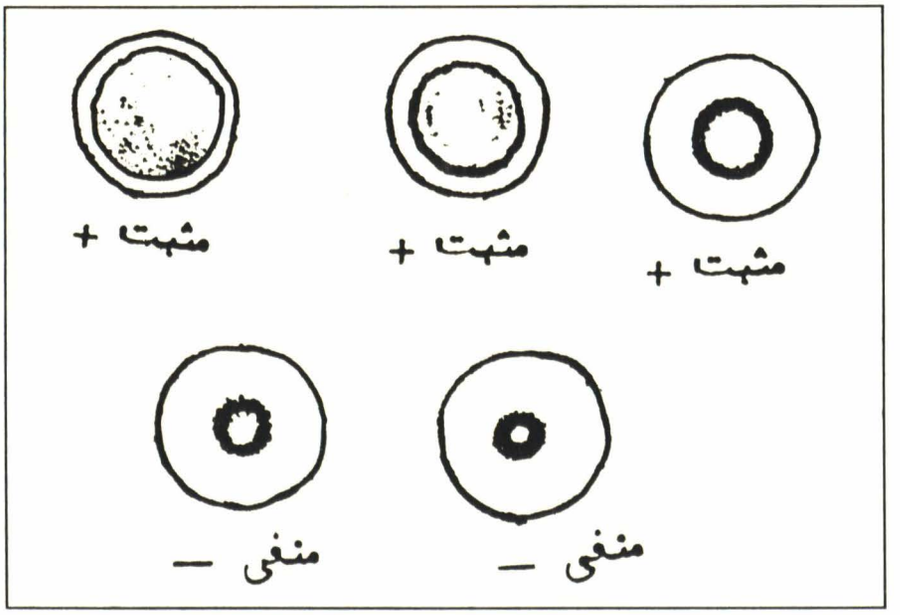
با توجه به جدول شماره دو، حساسیت و ویژگی آزمون در تیتر ۱:۶۴ به ترتیب ۸۱/۲۵ و ۸۱/۲۵ درصد است. ارزش اخباری مثبت و منفی و نسبت مثبت کاذب و منفی کاذب نیز در جدول نشان داده شده است.

حساسیت و ویژگی در تیتر مبنای ۱:۱۲۸ به ترتیب ۷۵ و ۱۰۰ درصد محاسبه گردید. ارزش اخباری مثبت و منفی و نسبت منفی کاذب و مثبت کاذب در این مورد نیز نشان داده شده است.

بحث

Boyden در سال ۱۹۵۱ اتصال پروتئین‌های مختلف بر سطح گلبول قرمز گوسفند را شرح داد. استفاده از آزمایش IHA در گاو و گوسفند در سال ۱۹۶۱ توسط Pinelli به کار برده شد، سپس این آزمون با روشهای دیگر مقایسه و به علت سریع بودن، نیاز به مقدار اندک پادگن و حساسیت نسبتاً بالا به عنوان یک روش مناسب مطرح گردید (۴، ۵، ۸ و ۱۴).

به نظر Todorove و Stojanove پس از آلوده شدن میزبان واسط به علت پخش شدن دائمی مواد ایمونوژن از کیست به بدن میزبان سیستم ایمنی بر علیه این مواد پادتن می‌سازد (۲۰). Matossian و همکاران در سال ۱۹۷۲ نشان دادند که ایمونوگلبولین ایجاد شده در بیماری هیداتیدوز از رده ایمونوگلبولینهای A,M,G بوده و در واکنش ایمونولوژیک همیشه IgG شرکت دارد، و هر گاه تغییری در کیست ایجاد شود (آهکی شدن، چرکی شدن و...) این پاسخ تغییر می‌کند. به علاوه وجود آلودگیهای انگلهای دیگر منجمله سیستی سرکوس اویس و بوویس، مونیزیا، فاسیولا، بیلارزیا، و... و وجود اتوآنتی بادیهای میزبان باعث واکنش مثبت کاذب می‌گردد. مسائل دیگر مانند آهکی شدن، چرکی شدن و غیر بارور بودن کیست باعث واکنش منفی خواهد شد



جدول شماره ۲- نتایج ارزیابی آزمایش IHA

آزمون / تیتر	حساسیت	ویژگی	ارزش اخباری مثبت	ارزش اخباری منفی	نسبت مثبت کاذب	نسبت منفی کاذب
۱:۶۴	۸۱/۲۵	۸۱/۲۵	۸۹/۶۵	۴۴/۸۲	۱۸/۷۵	۱۸/۷۵
۱:۱۲۸	۷۵	۱۰۰	۱۰۰	۶۶/۶۶	۳۳/۳۳	۰

(۵، ۱۴ و ۲۱).

در مطالعه اخیر اگر تیتر ۱:۶۴ را به عنوان مبنای تشخیص مثبت در نظر گرفته شود حساسیت و ویژگی آزمون IHA در تشخیص هیداتیدوزیس گوسفندی هر دو ۸۱/۲۵ درصد بوده است با توجه به اینکه ۱۸/۷۵ درصد گوسفندان فاقد کیست تیتر مساوی ۱:۶۴ را نشان داده‌اند برای افزایش ویژگی آزمون تیتر مبنای تشخیص را ۱:۱۲۸ در نظر گرفته شده است. در این صورت ویژگی آزمون تا ۱۰۰ درصد افزایش می‌یابد ولی از میزان حساسیت کاسته شده و ۷۵ درصد می‌گردد. محققین دیگر نیز با به کارگیری تیترهای مبنای مختلف حساسیت و ویژگی متفاوتی را برای آزمون IHA نموده‌اند. Pozzuoli با تیتر مبنای ۱:۶۴ (۱۹۷۵) حساسیت آزمون را ۸۰ درصد گزارش نموده است.

Njeruh با تیتر مبنای ۱:۱۲۸ (۱۹۸۷) حساسیت را ۹۲/۷ و ویژگی را ۹۹/۷ در صورتی که با تیتر مبنای ۱:۲۵۶ حساسیت ۶۴/۷ و ویژگی را ۱۰۰ گزارش کرده است. Gomez با تیتر مبنای ۱:۴۰۰ (۱۹۸۰) حساسیت آزمون IHA را ۷۶/۱۹ درصد گزارش نموده است.

همچنین حساسیت به دست آمده در این مطالعه با نتایج به دست آمده توسط Penilli (۱۹۶۱)، Cordi (۱۹۶۲)، Vibe (۱۹۶۳)، Pauluzzi (۱۹۶۵) و Gomez (۱۹۸۰) به ترتیب ۷۵/۷، ۸۰، ۸۴/۲، ۸۸ و ۷۹/۱۶ درصد همخوانی دارد (۲، ۱۰ و ۱۳).

لذا این آزمایش را برای تشخیص بیماری هیداتیدوزیس گوسفند و در بررسیهای اپیدمیولوژی و غربالگری می‌توان پیشنهاد نمود.

منابع مورد استفاده

1- Boyden S.V., 1951. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent heamagglutination by antiprotein sera. J, Exper, med, 93:107-120.

2- Carig P.S. & et. al. 1981. Murine hybridoma - derived antibodies in the processing of antigens for the immunodiagnosis of hydatid (*Echinococcus granulosus*) infection in sheep. Parasitol., 83; 303-317.

3- Dennis E.W.,1973. A stable concentrated purified antigen for the immunological study of hydatid disease. J. parasitol., 23:62-66.

4- Garabedian G.A., 1957. An indirect heamagglutination test for hydatid disease. J. Immunol., 78: 269-272.

5- Gomez F.M. & et. al., 1980. Serological test in relation to the viability, fertility and localization of hydatid cysts in cattle, sheep goats and swine. Vet, parasitol, 7: 33-38.

6- Heath D.D. & et.al, 1992. *Echinococcus granulosus* in sheep. Transfer from ewe to lamb of (Arc5) antibodies and oncosphere killing activity, but not protection, Int.J. parasitol., Vol 22, No.7 1017-1021.

7- Hutchison W.F., 1967. Studies on *Echinococcus granulosus*. Deletion of echinococcus antibodies in naturally infected Mississippi swine. J. Parasitol, Vol 53, No. 6/12141-1244.

8- Kagan I.G., 1959. An evaluation of the heamagglutination and flucculation tests in the diagnosis of echinococcus disease. Am, J trop, med and hygen. /8:51-55.

9- Kagan I.G. & et. al., 1960. Studies on echincoccusis: serology of crude and fractionated antigens prepared from *Echinococcus granulosus* and *Echinoccocus multilocularis* Am. J. trop. Med and hygen. 9: 248-261.

10- Kagan I.G., 1968. A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease, Bull, wld, Hlth, org., 39: 25-37.

11- Khan A., 1974. Host parasite relationship in echinococcusis.

1- parasite biomass and antibody response in three strain of inbreed mice against graded doses of *E. multilocularis* cyst. J. parasitol, Vol. 60, No. 2; 231-235.

12- Lightowlers M.W., 1990. Immunology and mulecular biology of echinococcus infections Int. J. Parasitol, Vol. 20, No. 4/471-478.

13- Liu. D., Rickard M.D. & Lightowlers. M.W., 1992. Comparative immunoelectrophoretic analysis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia pisiformis* cyst fiuid antigen by hyperimmune rabbit, Res, Vet. Sci, 53(1) 133-135.

14- Matossian R.M., 1972. The specific immunoglobulin in hydatid desease. 22, 423-430.

15- Moskowitz M., 1957. Surface altration and agglutination test for red cells. Natrue., Vol. 180, No 4594; 16, 1649-1050.

16- Njeruh F.M. & et. al., 1989. Diagnosis of hydetid disease in livestock by use of indirect heamagglutination (IHA) test and its possible application in the control of hydatid disease in kenya. Bull. Anim hlth. Prod. Afr, 163-165.

17- Rickard M.D., 1979. The immunological diagnosis of hydatid disease. Aust. Vet. J.Vol. 55. 99-104.

18- Shapiro S.Z. BAHR G.M. and Hira P.R., 1992. Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection, ann, trop, med parasilo, Vol. 86. No. 5, 503-509.

19- Stavitsky A.B., 1954. Micromethods for the study of proteins and antibodies I, II, procedure and general applications of heamagglutination and heamagglutination inhibition reactions with tannic acid and protein treated Red-blood cells. J. Immunol., 72: 360-375.

20- Todorov T. and Stojanov G., 1979. Circulating antibodies in human echinococcusis befor and after surgical treatment. Bull. wld. hlth, org. 51(5): 151-158.

21- Varela-Diaz. V.M., 1972. Further evidence of the passage of host immunoglobulins into hydatid, J parasitol, No. 5 1015-1016.

22- Yar zabai, L.A. et. al., 1997. further observation on the spesificity of antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. J. Parasitol vol 63. No3 495-499.