DOI: 10.22092/vj.2018.123937.1519
شماره ۱۲۳ تابستان ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی ارزش تشخیصی آنتی‌ژن B کیست هیداتید، به روش دات بلات در استان آذربایجان شرقی

• **سالار ضرابی اهرابی**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
• **رسول مدنی (نویسنده مسئول)**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
• **بهار شمشادی**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
• **شاهرخ رنجبر بهادری**
گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، سمنان، ایران
• **حسین هاشم‌زاده فرهنگ**
گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
• **مجید منتظر باویلی**
گروه جراحی توراکس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۸-۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۹-۰۷

Email: madanirasool@gmail.com

چکیده

هیداتیدوزیس بعنوان یک بیماری مهم مشترک بین انسان و حیوان مطرح است و در مناطق مختلف جهان، از جمله ایران از شیوع بالایی برخوردار است. روش‌های سرولوژیکی که بتوانند با حساسیت و ویژگی بالا، هیداتیدوز را تشخیص دهند، از ارزش بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. در این مطالعه، آنتی‌ژن B مایع کیست هیداتید را جداسازی کرده و بر روی نمونه‌های سرم بدست آمده از انسان‌ها و گوسفندان مبتلا به کیست هیداتید و نمونه‌های سالم، تست دات بلات انجام گرفت تا دقت، حساسیت و ویژگی آن مورد ارزیابی قرار بگیرد. بعد از انجام تمام مراحل تست دات بلات بر روی ۲۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، مشخص شد که دقت این تست در موارد انسانی معادل با ۹۶٪ و در موارد گوسفندی معادل با ۹۲٪ می‌باشد. حساسیت این تست در موارد انسانی معادل با ۹۲٪ و در گوسفندی هم معادل با ۸۴٪ می‌باشد. ویژگی این تست هم در هر دو مورد معادل ۱۰۰٪ بدست آمده است. ارزیابی تمامی این موارد مشخص می‌کند که آنتی‌ژن B، در تشخیص هیداتیدوزیس از ارزش بسیار بالایی برخوردار است و روش دات بلات با استفاده از این آنتی‌ژن، می‌تواند به عنوان یک روش تشخیصی ارزشمند و هم‌چنین بعنوان یک روش غربالگری اولیه مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: کیست هیداتید، دات بلات، آنتی‌ژن B، اکینوکوکوس گرانولوزوس

Veterinary Researches & Biological Products No 123 pp: 34-41

Diagnostic Value Of Antigen B In Hydatid Cyst By Dot-Blot Technique In The East Azerbaijan Province

By: Zarrabi Ahrabi1, S., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Madani1, R., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Shemshadi1, B., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Ranjbar Bahadori, S.H., Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Semnan, Iran. Hashemzadeh Farhang, H., Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. and Montazer Bavili4, M., Department of Thoracic Surgery, Faculty of Medical Science, Tabriz Medical University, Tabriz, Iran.

Received: 2018-10-29 **Accepted: 2018-11-28**

Email: madanirasool@gmail.com

Hydatidosis has been recognized as one of the most important zoonotic diseases in different parts of the world, including Iran. Serological methods that can detect hydatidosis with high sensitivity and specificity are have high value. In this study, the antigen B fluid of hydatid cysts was isolated and Dot-Blot technique performed on serum samples from human and sheep with hydatid cysts and healthy samples to evaluate their accuracy, sensitivity and specificity. After completing all stages of the dot blot test on 200 samples, it was found that the accuracy of the test in human cases is equivalent to 96% and in sheep cases it is equivalent to 92%. The sensitivity of this test is 92% in human cases and 84% in sheep. The test specificity is also 100% in both cases calculated. The evaluation of all of these cases indicates that B antigens have a high value in the diagnosis in hydatidiosis, and the dot blot technique using this antigen can be valuable as a diagnostic method and also as a method initial screening should be used.

Keywords: Hydatid cyst, Dot blot, Antigen B, *Echinococcus granulosus*

مقدمه

بیماری اکینوکوکوزیس، یکی از بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد که دارای انتشار جهانی است. این بیماری به علت آلودگی با مرحله نوزادی کرم اکینوکوکوس گرانولوزوس رخ می‌دهد، این سستود کوچک دارای اهمیت زیادی از نظر پزشکی و دامپزشکی دارد (۲۲،۸).سگ و سگ‌سانان به عنوان میزبان نهایی این انگل، تخم‌های کرم را به همراه مدفوع وارد محیط می‌گردانند، حیوانات اهلی از جمله گوسفند، گاو، بز، شتر و نیز انسان که به عنوان میزبان واسط، پس از بلع تخم‌ها به مرحله نوزادی انگل که همان کیست هیداتید می‌باشد، مبتلا می‌گردند. کیست‌ها در اندام‌های داخلی میزبان واسط به خصوص کبد و ریه و به نسبت کمتر در سایر اندام‌ها تشکیل می‌شود (۸). در مواقعی که کیست هیداتید از نظر آناتومیکی، اندام‌های حیاتی و مهم را مبتلا نکند و یا اکیست از نظر اندازه کوچک باشد و اختلالی در عملکرد ارگان‌ها ایجاد نکند، بیماری عموماً فاقد علائم بالینی می‌باشد. بنابر این به جهت تشخیص بیماری، می‌توان از چند روش تشخیصی از قبیل رادیوگرافی، توموگرافی و تکنیک‌های ایمنی شناسی، به صورت همزمان استفاده نمود (۱، ۲).

به علت نبود علائم مشخص بیماری در جمعیت‌های انسانی، فرد بیمار معمولاً زمانی متوجه بیماری خود می‌شود که تنها روش برای درمان بیماری، استفاده از جراحی می‌باشد و در مورد جمعیت‌های حیوانی (میزبان واسط اهلی) تشخیص بیماری تا زمان کالبدگشایی معمولاً اتفاق نمی‌افتد (۲، ۸).

آنتی‌ژن B یک پروتئین پلیمری با وزن مولکولی ۱۶۰ ـ ۱۲۰ کیلودالتون که تحت شرایط احیا به تحت واحدهایی به وزن مولکولی ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ کیلودالتون تجزیه می‌شود. نقش AgB در بیولوژی انگل کاملاً روشن نشده است، اما به نظر می‌رسد در تعدیل پاسخ ایمنی میزبان (مهارکننده پروتئاز و مهارکننده کموتاکسی نوتروفیل‌ها)، پیشبرد پاسخ ایمنی Th2 غیرحفاظت کننده و القای آپوپتوز (مرگ سلولی) سلول‌های ایمنی در بیماران دخیل باشد، تحقیقات اخیر نشان داده است که آنتی‌ژن B می‌تواند همچنین در مکانیسم‌های سم‌زدایی دخالت نماید. مطالعات مولکولی نشان داده است که آنتی‌ژن B توسط خانواده چند ژنی که به صورت متغیری با حداقل پنج مجموعه ژنی عمده به نام‌های EgAgB1 - EgAgB2 - EgAgB3 - EgAgB4 - EgAgB5 بیان می‌شوند، کد می‌شود. تا به امروز فقط EgAgB1 و EgAgB2 کلون شده‌اند و به عنوان پروتئین‌های نوترکیب برای تشخیص استفاده می‌شوند. از بین آن‌ها EgAgB2 بهترین کارایی تشخیصی را دارد. جالب توجه اینکه یک پاسخ برجسته از سیستم

ایمنی میزبان در برابر، هم آنتی‌ژن B طبیعی و هم نوترکیب در سرم بیماران به هیداتیدوز مشاهده شده که نشانگر این مطلب است که شاید بتوان به عنوان ایزوتیپ انتخابی در تست‌های تشخیص سرولوژیکی مورد ارزیابی قرار داد (۲۲، ۲۶).

روش‌های تشخیص ایمونولوژیک در هیداتیدوز در حیوانات اهلی همچون گوسفند و گاو، در مقایسه با انسان، به میزان کمتری انجام شده است. در رابطه با واکنش بین انگل و میزبان در انسان به نسبت حیوانات، تحقیقات بیشتری انجام شده است (۲، ۱۴).

به طور کلی مفهوم بلات اشاره به تکنیک‌هایی دارد که در آنها از ژل‌ها به RNA و یا DNA انتقال باندهای جدا شده پروتئین، ورق‌های نازکی مثل کاغذ نیتروسلولز صورت می‌گیرد. این تکنیک دارای مزایای فراوانی می‌باشد، سریع و ساده بودن این آزمایش باعث می‌شود که به عنوان یک روش تشخیصی بسیار با ارزش در تشخیص هیداتیدوزیس به کار رود (۲). آنتی‌بادی‌های اختصاصی که علیه آنتی‌ژن‌های این انگل تولید شده، تا چندین سال پس از بهبودی فرد در بدن باقی می‌ماند، در نتیجه بسیاری از تست‌های سرولوژی توانایی ردیابی آنتی‌بادی‌های اختصاصی بیماری هیداتیدوزیس را حتی پس از درمان دارویی و جراحی، دارا می‌باشند (۱۱). بیشتر از نیم قرن است که از تست‌های سرولوژی همچون الایزا، ایمونوبلات و ایمونوالکتروفورز برای تشخیص آنتی‌بادی‌های کیست هیداتید در بیماران استفاده می‌شود، که این تست‌ها از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار می‌باشند (۵، ۱۰). دات بلات را می‌توان بعنوان یک روش تأیید شده و مفید برای مشخص نمودن آنتی‌ژن‌های اختصاصی، در نظر گرفت. این روش حتی قادر به تشخیص آنتی‌ژن‌ها تا حدود یک نانوگرم هم می‌باشد (۱، ۷).

هدف از این مطالعه، ارزیابی روش دات بلات به واسطه آنتی ژن B در تشخیص بیماری هیداتیدوز در انسان و گوسفند و ارزیابی دقت، حساسیت و ویژگی این آزمون در افراد مبتلا به کیست هیداتید می‌باشد.

مواد و روش کار

خونگیری و تهیه سرم

نمونه‌گیری سرم انسانی

از افراد مبتلا به کیست هیداتید که تشخیص جراحی داده شده بود، قبل از عمل جراحی خونگیری به عمل آمد. همچنین جهت تهیه نمونه‌های منفی از سرم افراد سالمی که تحت آزمایش قرار گرفته بودند و هیچگونه بیماری در تابلوی خونی آنها مشاهده نشده بود، پس از خون گیری نمونه خونی به مدت ۱۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه جهت لخته شدن قرار داده شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوز با دور ۱۰۰۰ قرار داده شده وسرم خون افراد بیمار و سالم جدا شده است.

نمونه‌گیری سرم گوسفندی

در مورد گوسفندان، جهت تأمین نمونه‌های واقعی مثبت و منفی با مراجعه به کشتارگاه، از خون موجود در قلب بلافاصله پس از کشتار و تشخیص وجود کیست هیداتید، استفاده شده است. بدین صورت که بلافاصله پس از کشتار گوسفند و خروج احشاء در خط کشتار، گوسفندان مبتلا به کیست هیداتید شناسایی شده و باقی مانده خون داخل قلب اخذ شده و به لوله‌های خونگیری منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه جهت لخته شدن در محیط قرار داده شد وسپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ قرار داده شده و سرم خون مورد نظر جداشد. بعلت وجود نمونه‌های واقعی مثبت و منفی در مورد نمونه‌های گوسفندی سالم نیز از این روش خونگیری استفاده گردید.

* آنتی‌ژن B مایع کیست هیداتید مورد استفاده از بخش مرجع انگل شناسی انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

مرحله دات بلات

۱. مرحله آماده سازی کاغذ: کاغذهای نیتروسلولز (sigma) را در ابعاد ۱,۵ * ۱,۵ سانتی‌متر برش داده و ۲۵ میکرولیتر از آنتی‌ژن را در وسط کاغذ در پنج مرحله بصورتی که هر بار پنج میکرولیتر ریخته، کاغذ را خشک کرده و این عمل تکرار می‌شود و نهایتاً کاغذ کاملاً خشک می‌گردد. آنتی‌ژنی که بدین صورت روی کاغذ خوابانده شده است تا چندین ماه می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شود.

۲. مرحله تهیه بافر TBST: در کلیه مراحل آزمایش از بافر TBST یا Tris Buffer Saline plus Tween استفاده می‌شود. مواد استفاده شده برای بافر شامل: ۸,۱۹ گرم NaCl بهمراه ۱,۲۱ گرم Tris در یک لیتر آب مقطر حل شود و pH را با اسید کلریدریک به ۷,۴ رسانده و سپس پنج میلی‌لیتر Tween ۲۰ را به آن افزوده و با همزن خوب مخلوط می‌نماییم.

۳. مرحله فیکس کردن آنتی‌ژن: کاغذهای نیتروسلولز که آنتی‌ژن‌ها روی آنها خوابانده شده است را به مدت ۳۰ دقیقه در بافر TBST در داخل پلیت قرار داده و بر روی دستگاه روتاتور به آرامی حرکت دورانی داده می‌شود.

۴.مرحله انکوباسیون در سرم: از نمونه‌های سرم با بافر TBST رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲ تهیه گردید سپس هر کدام از نمونه های تهیه شده از رقت های مختلف سرمی در پلیت‌های کوچک جداگانه قرار گرفتند و به مدت ۴۵ دقیقه بر روی دستگاه روتاتور در دمای اتاق نگهداری شد.

۵. مرحله شستشو: سرم‌ها را از پلیت خالی نموده و بر روی کاغذها، بافر TBST ریخته و به مدت پنج دقیقه روی دستگاه روتاتور قرار داده و اینگونه شستشو انجام می‌شود و این عمل سه مرتبه تکرار می‌گردد.

۶. مرحله انکوباسیون در کونژوگه: به تناسب در نمونه‌های انسانی از کونژوگه Anti-human و در نمونه‌های گوسفندی از Anti-sheep که با پراکسیداز کوبل شده‌اند، استفاده می‌شود. پلیت حاوی کونژوگه را به مدت ۴۵ دقیقه بر روی دستگاه روتاتور در دمای اتاق نگهداری نموده و سپس عملیات شستشو، طبق مرحله قبل انجام می‌شود.

۷. مرحله تهیه سوبسترای DAB: در این تحقیق از دی‌آمینوبنزیدین (DAB) و آب اکسیژنه جهت تولید رنگ بر روی کاغذهای نیتروسلولز استفاده شد که در صورت حضور آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن مورد استفاده در نمونه، لکه رنگی بر روی کاغذ نیتروسلولز آشکار خواهد شد. برای تهیه سوبسترا، ۲۰ میلی‌گرم از DAB را در ۲۰ میلی‌لیتر بافر TBST کاملاً حل نموده و آن را در محلول سوبسترای تهیه شده، مخلوط کرده و این مخلوط سوبسترا، آماده مصرف می‌باشد (کلیه مراحل تهیه سوبسترا هم باید در تاریکی انجام شود).

۸. مرحله انکوباسیون در سوبسترا: سوبسترای تازه تهیه شده را بر روی کاغذهای نیتروسلولز ریخته، بطوری‌که کاغذها در آن غوطه‌ور باشند. سپس روی پلیت را با کاغذ آلومینیومی پوشانده تا نور به سوبسترا نرسد و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه بر روی دستگاه روتاتور در دمای اتاق قرار می‌دهیم.

۹. مرحله آبکشی کاغذها: معمولاً پس از گذشت ۲۰ دقیقه، نتیجه آزمایش بر روی کاغذهای نیتروسلولز غوطه‌ور در سوبسترا، مشخص می‌شود. در صورت وجود آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن در نمونه سرم، نتیجه مثبت تست بصورت تولید رنگ متمایل به زرد بصورت واضح در زمینه سفید کاغذ، مشاهده می‌شود. برای پایدار ماندن رنگ بر روی کاغذ، آنها را با آب مقطر، آبکشی نموده و از آنها عکس رنگی تهیه کرده‌ایم.

نتایج

با توجه به وجود نمونه‌های واقعی مثبت و منفی در بررسی نتایج به دست آمده از رقت های تهیه شده سرمی ،مشاهده شد که بیشترین میزان دقت آزمون در نمونه های با رقت ۱/۴ می‌باشد. لذا تفسیر نتایج نمونه های بر اساس همین رقت تهیه شده از نمونه های سرمی انجام گرفت.

از ۵۰ نمونه مثبت انسانی که در رقت ۱/۴ مورد بررسی قرار گرفت، تعداد چهار نمونه منفی کاذب بودند (شکل ۶). نتایج نشان داد که همه‌ی ۵۰ نمونه سرم کنترل، منفی بودند (شکل ۳) و نتایج بررسی ۵۰ نمونه مثبت گوسفندی، هشت نمونه منفی کاذب را نشان داد (شکل ۵). نتایج نشان داد که همه‌ی ۵۰ نمونه منفی گوسفندی، منفی بوده (شکل ۴) و مثبت کاذب هم وجود نداشت.

جهت ارزیابی نتایج دات بلات از سه شاخص دقت، حساسیت و ویژگی استفاده می‌شود.

با توجه به این داده‌ها، دقت تست در موارد انسانی معادل با ۹۶٪ و در گوسفندان هم ۹۲٪ بوده است (۶).

$$\text{دقت} = \frac{\text{منفی حقیقی} + \text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب} + \text{منفی حقیقی} + \text{مثبت کاذب} + \text{مثبت حقیقی}}$$

توانایی یک تست برای پیدا کردن موارد بیماری را حساسیت می‌گویند. در نتیجه و با توجه به داده‌ها، حساسیت تست در موارد انسانی ۹۲٪ و در گوسفندان هم ۸۴٪ محاسبه گردیده است (۶).

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب} + \text{مثبت حقیقی}}$$

با توجه به داده‌ها، هر دو مورد دارای ویژگی ۱۰۰٪ بوده‌اند (۶).

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{منفی حقیقی} + \text{مثبت کاذب}}$$

بحث

روش‌های مختلفی در تشخیص سرولوژیک و ملکولی در مبتلایان به بیماری هیداتیدوز وجود دارد که هر یک دارای مزایا و معایبی می‌باشد. روش‌های ملکولی علی رغم دارا بودن حساسیت و ویژگی بالا، نیاز به تجهیزات گران قیمت و زمان بر می‌باشند. تست تثبیت کمپلمان، آزمون حساسی است ولی در تشخیص اولیه بیماری، ارزش محدودی دارد زیرا در این آزمایش، سرم برخی از افراد به ویژه مبتلایان به سرطان ریه و به دنبال تزریق واکسن ضد هاری، به طور کاذب مثبت می‌شوند (۱۵). تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم هم از آزمون‌های معمول است، اما به علت واکنش‌های متقاطع در مبتلایان به سیستی سرکوزیس، شیستومیازیس و نماتودها، ارزش این تست را در مناطقی که به صورت شایع عفونی هستند، پایین می‌آورد (۱۳). تست آگلوتیناسیون لاتکس تستی ساده، حساس و اختصاصی می‌باشد، ولی یکسری موارد مثبت کاذب را ایجاد می‌کند (۲۵). تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم از جمله تست‌هایی می‌باشد که به تجهیزات گران قیمت نیاز دارد (۲۴). تست الایزا دارای حساسیت و ویژگی در حد منطقی می‌باشد، اما ممکن است در مورد کیست‌های موجود در مغز و طحال، به علت تحریک کمتر دستگاه ایمنی، موارد منفی کاذب را افزایش دهد (۱۶، ۲۰). تست ایمونوالکتروفورز، از جمله تست‌هایی است که مراحل طولانی مدت و پیچیده‌ای را دارد (۱۷). تست کانترالکتروفورز، یک روش تشخیصی حساس و بسیار اختصاصی می‌باشد که قبل از عمل جراحی برای تشخیص کیست، می‌توان از آن استفاده کرد (۱). تست ایمونوبلاتینگ یکی از روش‌های بسیار دقیق در تعیین موارد کیست هیداتید می‌باشد. این تست به نسبت بقیه تست‌ها، سریع ترو کم‌هزینه‌تر می‌باشد. از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است و در صورت آماده سازی تست، می‌توان به صورت یک روش فیلدی هم از آن استفاده نمود (۲۶).

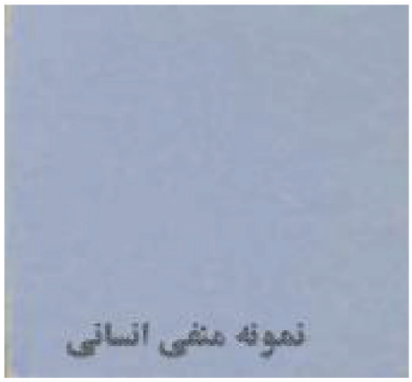
ایمونوبلات یکی از روش‌های سرولوژی با حساسیت و ویژگی بالا است که برای تشخیص بیماری کیست هیداتید بکار می‌رود. در این روش بیماران هیداتیدی با زیر واحدهای یک آنتی‌ژن اصلی اکینوکوکوس گرانولوزوس واکنش ایجاد کرده و تجزیه و تحلیل نتایج صورت گرفت. نتایج مطالعات در مورد ارزش تشخیصی آنتی‌ژن B مایع کیست هیداتید در تست‌های سرولوژیک و ایمونولوژیک نشان داد که حساسیت تشخیصی این آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژیک به مراتب بیشتر از تست‌های ایمونولوژیک می‌باشد (۲۱).

در سال ۲۰۰۹ با مطالعه انجام شده به روش الایزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی‌ژن B توانست ۹۴/۲ درصد حساسیت و ۸۱/۶ درصد نشان دهد (۲۲).

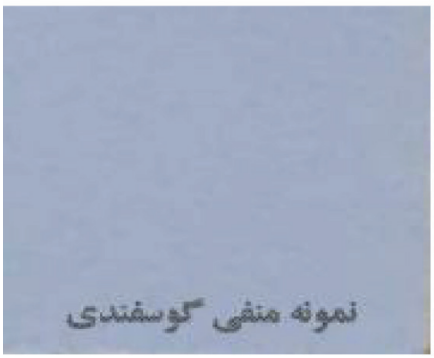
ویژگی‌های تشخیص ایمونولوژیک در مراحل اولیه بیماری و درمان بیماری هیداتیدوزیس مورد بحث قرار گرفت و تشخیص آزمایشگاهی کیست هیداتید، به عنوان مکمل تشخیصی بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بررسی سرولوژیک برای پیگیری بیماران تحت درمان با دارو

شکل ۱- نمونه مثبت انسانی تهیه شده از سرم با رقت ۱/۴

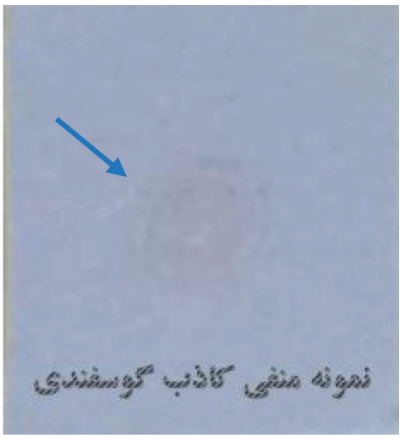
شکل ۲- نمونه مثبت گوسفندی تهیه شده از سرم با رقت ۱/۴



شکل ۳- نمونه منفی انسانی تهیه شده از سرم با رقت ۱/۴



شکل ۴- نمونه منفی گوسفندی تهیه شده از سرم با رقت ۱/۴



شکل ۵- نمونه منفی گوسفندی تهیه شده از سرم با رقت ۱/۴

شکل ۶- نمونه منفی کاذب انسانی تهیه شده از سرم با رقت ۱/۴

ضروری است. علیرغم عدم وجود استاندارد مناسب جهت تخلیص آنتی‌ژن‌ها، می‌توان *E. granulosus* و *E. multilocularis* را شناسایی کرد، اگر چه نتایج مثبت کاذب در سایر بیماری انگلی نظیر سیستی-سرکوزیس دیده می شود (۷).

با توجه به نیاز به امکانات تشخیصی، بایستی روشی از تشخیص در مناطق مختلف پیشنهاد داده شود که اولاً انجام روش آزمایش راحت باشد و تمامی افراد با یک آموزش ساده، بتواند این آزمایش را انجام دهند؛ ثانیاً دقیق و اختصاصی باشند و ثالثاً ارزان قیمت باشند. بیشتر ابزارهای موجود برای تشخیص، نظیر اولتراسونوگرافی، سونوگرافی و غیره گرچه می‌توانند مکان، اندازه و ظاهر فیزیکی (محتوای مایع یا آهکی شده) ضایعات توده‌ای را تعیین کنند، ولی قادر به تشخیص ماهیت دقیق این توده‌ها نمی‌باشند (۱۲). از طرف دیگر بعلت خطر نشت پروتواسکولکس‌ها و ایجاد کیست ثانویه یا آنافیلاکسی، بایستی از آسپیراسیون کیست‌ها اجتناب کرد (۳). بنابراین بدلیل وجود مشکلات مختلف در تشخیص نهایی توسط روش‌های ذکر شده، روش‌های سرولوژیک در تشخیص هیداتیدوز از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است.

حساسیت و ویژگی بالای روش ایمونوبلات در میان تست‌های سرولوژی، آن را بعنوان تست برتر و متمایز از سایر روش‌ها معرفی نموده و مخصوصاً در مناطقی که سایر بیماری‌های کرمی بصورت اندمیک هستند، بعنوان تست انتخابی برگزیده شده است. بخش عمده‌ای از پیشرفت تشخیص ایمونولوژیک هیداتیدوز، مرهون شناسایی آنتی‌ژن‌های انگل است. معرفی آنتی‌ژن‌های اختصاصی، قطعاً کارایی تشخیص ایمونولوژیک بیماری در انسان و حیوانات را گسترده‌تر خواهد کرد.

روش دات بلات با استفاده از آنتی‌ژن اختصاصی B مایع کیست هیداتید (که یک آنتی‌ژن بسیار مهم در بیماری کیست هیداتید با وزن مولکولی هشت کیلو دالتون است)، می‌تواند بعنوان یک روش کاربردی برای تشخیص زودرس بیماری و نیز انجام تست غربالگری استفاده شود. در این روش همانطور که اشاره شد، نتایج حاکی از دقت ۹۶٪ در موارد انسانی و ۹۲٪ در موارد دامی بوده است. و حساسیت ۹۲٪ در انسان و ۸۴٪ در گوسفند مشاهده شده است. همچنین ویژگی این تست معادل ۱۰۰٪ بوده است که تفاسیر بالا می‌تواند این روش را بعنوان یک روش فیلدی برای آزمایشات غربالگری در مناطق اندمیک پیشنهاد داد، چرا که تشخیص زودرس بیماری می‌تواند کمک بسیار زیادی در روند کاهش و جلوگیری از پیشرفت بیماری داشته باشد، که می‌توان بصورت زیر به آنها اشاره کرد:

الف) استفاده از تست تشخیص سریع که البته یک شاخص کیفی را در شناسایی مناطق اندمیک و طراحی پروتوکل‌های تشخیصی بیان می‌کند.

ب) شناسایی دام‌های آلوده و شروع به دارو درمانی (هرچند دارو درمانی در مورد بیماری زیاد موفق نبوده ولی حداقل روند بیماری را می‌تواند متوقف نماید) و جداسازی و درمان آنها.

ج) در انسان با تشخیص زودهنگام بیماری می‌توان دارو درمانی را شروع کرده و جهت ادامه معالجه قبل از اینکه بیماری خسارات جبران ناپذیری را وارد کند، به مراکز درمانی معرفی شده و درمان بیمار شروع شود. (در بدترین شرایط با تشخیص زودهنگام می‌توان با یک جراحی ساده نظیر لاپاراسکوپی بسته و برداشت کیست، بیمار درمان شود. به جای یک جراحی سنگین و برداشت قسمتی از یک اندام و یک کیست بسیار بزرگ)

د) هرچند که مراحل آماده‌سازی و تولید آنتی‌ژن B مایع کیست هیداتید

جدول ۱- نتایج تعداد موارد بررسی شده هیداتیدوز به وسیله دات بلات در انسان و گوسفند

	مثبت کاذب	منفی کاذب	تعداد
نمونه مثبت انسانی	۰	۴	۵۰
نمونه منفی انسانی	۰	۰	۵۰
نمونه مثبت گوسفندی	۰	۸	۵۰
نمونه منفی گوسفندی	۰	۰	۵۰

جدول ۲- نتایج ارزیابی آزمون دات بلات از نظر ویژگی، حساسیت و دقت

ویژگی	حساسیت	دقت	
٪ ۱۰۰	٪ ۹۲	٪ ۹۶	نمونه انسانی
٪ ۱۰۰	٪ ۸۴	٪ ۹۲	نمونه گوسفندی

دارای پیچیدگی‌های خاصی می‌باشد و تولید و نگهداری کیت دات بلات شاید سخت باشد، ولی می‌توان با رفع ایرادات ممکن در تولید، این روش را بعنوان یک روش کارآمد و دقیق در تشخیص اولیه بیماری بکار برد.

نتیجه‌گیری

روش ایمونوبلات، روش بسیار حساسی برای تشخیص هیداتیدوزیس می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده ناشی از دقت، حساسیت و ویژگی ناشی از این تست، مشخص می‌شود که دات بلات با استفاده از آنتی‌ژن B مایع کیست هیداتید، ارزش تشخیصی زیادی را دارد و استفاده از این آزمایش می‌تواند در تشخیص کیست هیداتید بصورت گسترده‌ای به خصوص در مناطق اندمیک جهت انجام تست غربالگری مورد استفاده واقع شود. روش دات بلات بر خلاف روش‌هایی نظیر ایمونوفلوروسنت و هماگلوتیناسیون غیر مستقیم، در شرایط ساده‌تری قابل انجام می‌باشد، به وسایل پیچیده‌ای نیاز ندارد و نتیجه واکنش هم با چشم غیرمسلح قابل مشاهده است.

علت تفاوت‌های موجود در مطالعات مختلف هم احتمالاً بعلت تفاوت در استرین‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس، خصوصیات بالینی بیماران، موقعیت قرارگیری کیست و غیره می‌باشد.

با توجه به سرعت و زمان بسیار کم برای انجام آزمایش دات بلات، می‌توان از این آزمایش علاوه بر تشخیص بیماری، بعنوان یک روش سریع و ارزان قیمت در غربالگری اولیه هم استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

1. Ananda, K.J., D'souza, P.E. 2015. Immunodiagnosis of Echinococcus granulosus infection in dogs by counter immunoelectrophoresis (CIEP). *Journal of parasitic disease*, 39: 654-657.

2. Arianpour, N. 2005. Medical Parasitology, First Edition, Tehran University Publishing, Tehran, 273-308. (In Persian)

3. Arizi, F., Haghpanah, B., Ghayour, Z., Mosavat, B. 2005. Diagnostic value of antigen B and protoscolex antigen of hydatid cyst using Dot-Bloting method. *Scientific Journal of Hamedan University of Medical Sciences and Health Services*, 4: 49-54. (In Persian)

4.. Asghari, M., Mohebali, M., Kia, E.B., Farahnak, A., Arianipour, M., Asadian, S., Rokni, M.B. 2013. Seroepidemiology of Human hydatidosis using AgB-ELISA test in Arak. *Iranian Journal Public Health*, 42: 391-396.

5. Aslan, M., Celik, D.G., Yuksel, S., Cakan, H., Bahar, H., Abdelkaream, A., Ziver, T., Yakar, H., Kocazeybek, B. 2012. The diagnostic role of indirect fluorescence antibody in cystic echinocossus and the role of western blot in following-up patients with cystic echinococcus after surgery. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 6432-6437.

6.Baratlo, A., Safari, S.2015. Definition and simple calculation of the sensitivity, specificity and accuracy of a test. *Journal of Iranian emergency medicine*, 2-2:105-107 (In Persian).

7. Biava M.F., Dao, A.S., Fortier, B. 2001. Laboratory diagnosis of cystic hydatic disease. *World Journal of Surgery*, 25: 10-14.

8. Eslami, E. 2006. Veterinary worma, Third Edition, Volume II, Tehran University Publishing, Tehran, 120-155. (In Persian)

9. Fotoohi, S., Hashemi Tabar, G.R., Borji, H. 2013. Serodiagnosis of human hydatidosis with an ELISA developed based on antigens derived from sheep hydatid cyst and comparison with a commercial human ELISA kit. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6: 723-727.

10. Ghaffarifar, F., Dalimiasl, A., Zavazan Hosseini, A., Jalousian, F., 2004. Antibody production against hydatid cyst antigens using Immunoblot method. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services Yazd*, 12: 33-36 (In Persian).

11. Harandi, M.F., Hobbs, R., Adams, P., Mobedi, I., Morgan-ryan, U., Thompson, R. 2002. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology Journal*, 125: 367-373.

12. Harris, K.M., Morris, D.L, Tudor, R. 1986. Clinical and radiological features of simple and hydatid cysts of liver. *British Journal of Surgery*, 73: 835-838.

13. Lissandrin, R., Tamarozzi, F., Piccoli, L., Tinelli, C., De Silvestri, A., Mariconti, M., Meroni, V., Genco, F., Brunetti, E. 2016. Factors influencing the serological response in hepatic *Echinococcus granulosus* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94: 166-171.

14. Maleki, F. 2007. Human and Parasitic Diseases, First Edition, Iranian Medical Science Publishing, Tehran, 127-143. (In Persian)

15. Menghi, C., Gatta, C., Arias, L. 2017. Human cystic and alveolar echinococcosis. *Current options in Infectious Disease*, 9: 210-222.

16. Mohammadzadeh, T., Sadjjadi, S.M., Sarkari, B., Ito, A. 2012. Comparison of the usefulness of hydatid cyst fluid, native antigen B recombinant antigen B8/1 for serological diagnosis of cystic echinococcosis. *Journal of Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106: 371-375.

17. Moro, P.L. 2016. Clinical manifestations and diagnosis of echinococcosis. Up to date, 1.

18. Nourjah, N., Sahba, G., Baniardalani, M., Chavshin, A. 2004. Study of 4850 operated hydatidosis cases in Iran. Southeast Asian *Journal Tropical Medical Public Health*, 35: 218-222.

19. Parija, S.C. 2008. Textbook of medicine parasitology, Protozoology & Helminthology. *SciELO Brasil.*

20. Rahimi, H., Sadjjadi, S., Sarkai, B. 2011. Performance of antigen B isolated from different hosts and cyst locations in diagnosis

of cystic echinococcosis. *Iranian Journal of Parasitology*, 6: 120.
21. Rokni, M. 2009. Echinococcosis/hydatidosis in Iran. Iranian Journal of Parasitology, 4: 1-
22. Sadjjadi, S.M., Abidi, H., Sarkari, B., Izadpanah, A., Kazemian, S. 2007. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay, utilizing native antigen B for serodiagnosis of human hydatidosis. *Iranian Journal of Immunology*, 4: 167-172.
23. Saebi, A. 2009. Iranian Parasitic Diseases, Second Edition, Volume II, Ayizh Publishing, Tehran, 147-169 (In Persian).
24. Shafiei, R., Teshnizi, S.H., Kalantar, K., Gholami, M., Mirzaee, G., Mirzaee, F. 2016. The seroprevalence of human cystic echinococcosis in Iran: a systematic review and meta-analysis study. *Journal of Parasitology Research*.
25. Sheeba, A., Sangaran, A., Latha, B. 2016. Diagnosis of cystic echinococcosis in buffaloes by native 8kDa antigen using latex agglutination test (LAT). *Journal of Parasitic Diseases,* 40: 1401-1405.
26.Zhang, W., Li, J., Jones, M.K., Zhang, Z., Zhao, L., Blair, D., McManus, D.P. 2010. The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLOS neglected tropical disease*, 4: e784.