جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ارزیابی تست ژل دیفوزیون جهت تشخیص کیست هیداتیک تک‌حفره‌ای در گوسفندان تجربی آلوده شده

محمدحسین راضی جلالی*[۱]، مسعود قربانپور نجف آبادی*[۲] و ناصر حقوقی راد*[۳]

خلاصه

کیست هیداتیک یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و دام بوده که همه ساله خسارات فراوانی به جمعیت‌های انسانی و دامی وارد می‌کند. یکی از مسائل عمده بیماری هیداتیدوز تشخیص وجود کیست در انسان و حیوانات است. تا کنون توسط روش‌های سرولوژی متعدد با تعیین وجود پادتن ضد پادگنهای کیست هیداتیک در سرم افراد و حیوانات مبتلا موفق به تشخیص بیماری شده‌اند، لیکن تفاوت‌های آشکاری در توانایی تست‌های مختلف ایمونولوژیک نشان داده شده است. از آنجایی که ارزیابی آزمایشات سرولوژیک در انسان با محدودیت‌های فراوانی روبروست تصمیم گرفته شد در گوسفندانی که بطور تجربی به کیست هیداتیک آلوده شده‌اند این ارزیابی صورت گیرد. در این مطالعه روند ظهور پادتن در سرم بوسیله تست ژل دیفوزیون که از ویژگی بالایی در تشخیص هیداتیدوز برخوردار است مورد بررسی قرار گرفته شد. پروتواسکولکس‌های زنده کیست‌های هیداتیک به تعداد ۱۵/۰۰۰ به هر قلاده سگ خورانده شد. بعد از دو ماه با مشاهده تخم تنیا در مدفوع پس از آسان کشی، کالبد گشائی سگ‌ها انجام شد و از روده باریک کرم‌های بالغ *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در سرم فیزیولوژی جمع‌آوری و تخم‌ها با له کردن بندهای بارور آزاد و شمارش شدند. به هر یک از ۱۳ رأس گوسفند مورد آزمایش حدود ۲۰۰۰ تخم خورانده شد و ٦ رأس گوسفند دیگر بعنوان شاهد در شرایط کاملاً برابر با گوسفندان مورد آزمایش نگهداری و به جای تخم سرم فیزیولوژی خورانده شد. هرهفته از تمام گوسفندان مورد آزمایش و شاهد خونگیری بعمل آمده، سرم آنها جدا و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام نمونه‌ها پس از جمع‌آوری با روش ژل دیفوزیون مورد آزمایش قرار گرفتند. با انجام آزمایش ژل دیفوزیون برای تشخیص پادتن ضد کیست در سرم گوسفندان آلوده، مشخص گردید که حساسیت این آزمایش در مورد گوسفندان آلوده تا ۵ هفته پس از آلودگی صفر و در هفته ششم به ۱۵ درصد می‌رسد سپس بتدریج افزایش یافته و در هفته چهاردهم به ٦۹ درصد می‌رسد در هفته‌های بعد میزان حساسیت بتدریج کاهش می‌یابد. ویژگی یا اختصاصیت آزمایش در تمام هفته‌ها ۱۰۰ درصد بود. چنین به نظر می‌رسد که توانایی تشخیص پادتن ضد کیست هیداتیک بستگی به مرحله رشد کیست داشته و گرچه اخذ جواب مثبت ارزش بسیاری دارد ولی نتایج منفی نشانه عدم وجود کیست هیداتیک نبوده و انجام آزمایشات سرولوژیک دیگر با حساسیت بالا جهت تشخیص ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: هیداتیدوزیس گوسفند، *اکینوکوکوس گرانولوزوس*، ژل دیفوزیون

مقدمه

بیماری کیست هیداتیک ناشی از آلودگی با مرحله نوزادی *اکینوکوکوس گرانولوزوس*، دارای انتشار جهانی است که از نظر بهداشتی و اقتصادی حائز اهمیت فراوانی است (۳). ایران نیز به عنوان یکی از مناطق هیپرآندمیک معرفی شده است. این بیماری در انسان و حیوانات اهلی ضایعات بهداشتی و ضررهای اقتصادی قابل توجهی بوجود می‌آورد (۱ و ۳). در ایران از تمام استان‌ها گزارش شده است. بالاترین میزان آلودگی در انسان (٤/٤٥ درصد هزار) مربوط به استان خراسان و کمترین میزان آن (۰/۱ درصد هزار) مربوط به استان هرمزگان بود و میانگین شدت آلودگی برای کل کشور ۱/۱۲ درصد هزار گزارش شده است (۱).

*[۱] استادیار بخش انگل شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران
*[۲] دانشیار بخش میکروب شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران
*[۳] استاد بخش انگل شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

یکی از مسائل عمده بیماری هیداتیدوز تشخیص کیست هیداتیک در انسان و حیوانات است. چنانچه کیست هیداتیک در بدن انسان دارای نشتی باشد و یا آنکه پاره شده باشد به سبب بروز واکنش‌های آنافیلاکتیک توأم با ائوزینوفیلی و افزایش سرم می‌توان به تشخیص بیماری پی برد. در غیر اینصورت تشخیص بیماری ساده نمی‌باشد. بنابراین ضروری است که تاریخچه بیماری، چگونگی ارتباط بیمار با سگ، اطلاعات اپیدمیولوژیک، مشاهدات بالینی، وضعیت پاتولوژیکی کیست، تصویربرداری (رادیوگرافی، توموگرافی، سی‌تی‌اسکن، ام. آر. آی[1]) و تست‌های سرولوژیک (تست کازونی، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و ...) را جمعاً مورد ارزیابی قرار داد (۱۲).

کیست‌های هیداتیک ریوی به وسیله رادیوگرافی تشخیص داده شده، لیکن معمولاً در سایر اعضا تنها کیست‌های آهکی شده قابل شناسایی هستند. خارج کردن مایع کیست هیداتیک به دلیل احتمال عفونت ثانوی و شوک آنافیلاکسی توصیه نمی‌شود (۳). پاسخ ایمنی به موضع ابتلا، شدت آلودگی، سالم بودن کیست و عمر کیست بستگی دارد. حساسیت آزمایشات در مورد کیست‌های سالم کمتر است. متاستدهای سالم سطح کمی از تحریک پادگنی را موجب می‌گردند. هر گونه شکاف یا پارگی کیست افزایش سریع پادتن‌ها را در سرم میزبان به دنبال دارد (۲۰) اختلاف ژنتیکی سویه‌های انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* و نیز طیف وسیع میزبان‌های واسط بر شدت و نحوه پاسخ ایمنی تأثیر فراوان دارد (۵).

گرچه تاکنون با انجام روش‌های سرولوژی متعدد با تعیین وجود پادتن متاستد در سرم افراد مبتلا و حیوانات موفق به تشخیص بیماری شده‌اند، اما کسب پاسخ‌ها و نتایج مختلف از یک تست در یک بیمار بخصوص در زمان‌های مختلف پرسش‌های بسیاری در زمینه پاسخ ایمنی و روند ظهور پادتن‌ها در بیماری کیست هیداتیک بوجود آورد (۳). به عنوان مثال حساسیت تست هماگلوتیناسیون غیر مستقیم از ٤٤ درصد تا ۱۰۰ درصد و حساسیت تست ژل دیفوزیون از ۲۰ درصد تا ٥٤ درصد در تشخیص کیست هیداتیک متغیر بوده است (۱۱ و ۱٦).

دلیل اختلاف در تعیین حساسیت و ویژگی آزمایشات مختلف سرولوژیک را Gottstein (۱۹۸٤) به خاطر تغییرات کمی پادگن‌های کیست هیداتیک بر حسب مکان کیست، ساختمان دیواره کیست، نوع رشد و سرعت آن و احتمالاً آزاد شدن فاکتورهای دیگر در خون می‌داند (۹). از آنجا که ارزیابی آزمایش ژل دیفوزیون روی بیماران انسانی با محدودیت‌های فراوانی روبروست بدین جهت تصمیم گرفته شد از سرم گوسفندانی که به طور تجربی آلوده شده‌اند برای تست استفاده گردد. بدیهی است که با اطلاع از شروع آلودگی و سیر رشد انگل در بدن گوسفند بهتر می‌توان به ارزیابی آزمایش مزبور پرداخت.

مواد و روش کار

۱- *آلوده کردن سگ:* سه قلاده سگ شش ماهه انتخاب شد. ابتدا داروی ضدانگلی به همه سگ‌ها داده شد. جهت اطمینان از عدم آلودگی تا ١٤ روز پس از درمان آزمایش مدفوع انجام شد. سپس تعدادی کیست‌های هیداتیک کبد و ریه گوسفند از کشتارگاه اهواز جمع‌آوری و مایع کیست هیداتیک جدا گردید. برای بدست آوردن پروتواسکولکس، مایع کیست هیداتیک سانتریفوژ گردید. قدرت حیاتی پروتواسکولکس‌ها با استفاده از ائوزین ۱ درصد تعیین شد (۲). پروتواسکولکس‌هائی که دارای قدرت حیاتی بیش از ۸۰ درصد بودند جدا و به سگ‌ها خورانده شد. پس از ٥ هفته آزمایش مدفوع سگ‌ها هر ۲ تا ۳ روز انجام شد تا آن که در هفته‌های ٦ و ۷ پس از آلودگی تخم تنیا در مدفوع مشاهده گردید. در این زمان، سگ‌ها با تزریق مقدار بالائی از تیوپنتال سدیم آسان کشی شدند و سپس

1- Magnetic Resonance Images

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کالبدگشایی گردیدند. روده باریک سگ‌ها از لاشه‌ها جدا و با قیچی روده‌بر باز شد و در محلول نمکی هانکس به مدت ۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کرم‌های اکینوکوک آزاد شده در سرم فیزیولوژی نگهداری و سپس با له کردن بند بارور آنها تخم‌ها آزاد گردیدند. شمارش تخم‌ها انجام شد و تعداد تخم در هر میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تعیین گردید (۲).

۲- *آلوده کردن گوسفندان:* تعداد ۱۹ رأس گوسفند عربی دارای سنین ٦-۱۲ ماه خریداری شد. از این تعداد ٦ رأس به عنوان شاهد و ۱۳ رأس دیگر به عنوان گوسفندان گروه آزمایش در آغل‌های مجزا نگهداری شدند. به هریک از گوسفندان گروه آزمایش تعداد ۲۰۰۰ تخم اکینوکوک با استفاده از لوله مری خورانده شد. به گوسفندان گروه شاهد سرم فیزیولوژی داده شد. گوسفندان گروه آزمایش و شاهد فقط تا ١٦ هفته نگهداری و سپس کشتار و کالبدگشایی شدند.

۳- *نمونه‌برداری از گوسفندان:* طی ١٦ هفته نمونه‌های خون در گوسفندان گروه شاهد و آلوده بطور هفتگی از ورید وداج تهیه و سرم آنها جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

٤- *آزمایش ژل دیفوزیون:* مواد لازم برای انجام این آزمایش مطابق روش Mercado و همکاران (۱۹۸۹) به شرح زیر تهیه شد (١٦):

الف) تهیه اسلایدهای پوشیده: شیشه‌هایی به ابعاد ٦/٥×٨ سانتی‌متر تهیه و ابتدا با آب معمولی و دترجنت شسته شده و سپس با آب مقطر آب‌کشی شدند. اسلایدها ابتدا در آگاروز ۱ درصد مذاب قرار گرفته و پس از خشک شدن لایه آگار روی اسلاید در سطح تراز آگاروز ۱ درصد ریخته شد تا لایه نازک و یکنواختی از آگار فیکس شود.

ب) تهیه پادگن: برای تهیه پادگن از روش Kagan و همکاران (۱۹۵۹) استفاده شد (۱۳). کبد و ریه‌های آلوده به کیست هیداتیک از کشتارگاه اهواز جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردیدند. مایع کیست با استفاده از سرنگ، و سوزن و در کنار شعله و زیر هود کشیده و به لوله‌های استریل منتقل شد. قطره‌ای از محتویات سرنگ روی لام منتقل و وجود پروتواسکولکس با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار می‌گرفت. در این مطالعه به منظور بالا بردن توان پادگنی تنها از کیست‌های بارور استفاده شد. برای این منظور لوله‌های حاوی مایع کیست به مدت ۲ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شده و مایع رویی به لوله استریل دیگر منتقل گردید. مایع کیست‌های مختلف از نظر میزان پروتئین به وسیله روش رفراکتومتری مورد سنجش قرار گرفت و تنها مایعاتی استفاده شدند که میزان پروتئین آنها از ٦۰۰μg در دسی‌لیتر بالاتر بود. مایع به کیسه دیالیز منتقل و به مدت ٢٤ ساعت در برابر آب مقطر دیالیز صورت گرفت. به منظور تغلیظ پادگن کیسه دیالیز حاوی مایع کیست مقابل یک بادبزن برقی قرار داده می‌شد تا حجم آن به $\frac{1}{3}$ حجم اولیه برسد. سپس مایع بوسیله سرنگ استریل ازکیسه خارج و به لوله استریل منتقل می‌گردید. به منظور ته نشین شدن ناخالصی‌های احتمالی، لوله‌های حاوی مایع به مدت ٥ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. به منظور ایزوتونیک کردن مایع کیست هیداتیک از محلول نمک کلرید سدیم ۱۰ درصد استفاده شد، به این نحو که ۲/۳ میلی‌لیتر پادگن با ۰/۲ میلی‌لیتر محلول کلریدسدیم ۱۰ درصد مخلوط گردید. به منظور جلوگیری از رشد میکرب‌ها، از محلول ۰/۰٥ درصد آزید سدیم استفاده شد؛ به این نحو که به ازای هر ۱۰ سی‌سی از پادگن ۱ سی‌سی از محلول ۰/۰٥ درصد آزید سدیم اضافه شد. پادگن تهیه شده به میکروتیوب‌های استریل شده منتقل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۳).

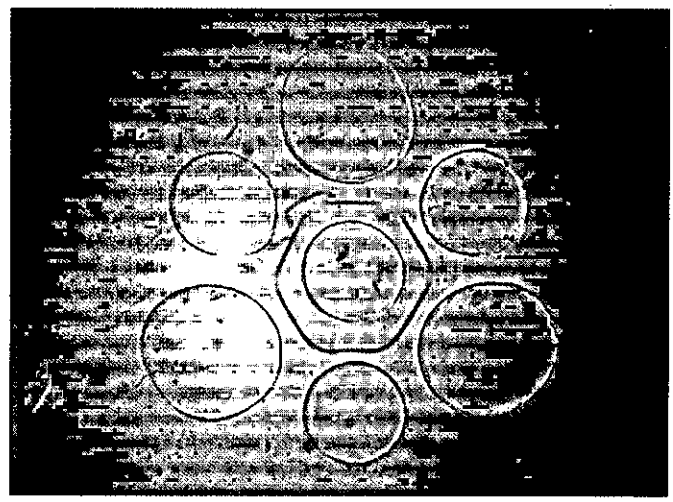
ج) روش انجام آزمایش: پس از بستن ژل بوسیله پانچ‌های مخصوص حفراتی روی ژل تعبیه شد. درحفره وسط ۱۰ میکرولیتر پادگن و در گوده‌های اطرافی، سرم گوسفندان مختلف ریخته شد. سپس اسلاید در اتاقک

مرطوب به مدت ٤٨ ساعت نگهداری شد. به منظور شستشوی ژل پس از ٤٨ ساعت اسلاید با زاویه ٤٥ درجه در محلول شستشوی بوراکس (بوراکس ٤ گرم، کلرید سدیم ٤ گرم، آب مقطر ١٠٠٠ میلی‌لیتر) به مدت ٢٤ ساعت قرار داده شد. پس از این مدت آب‌کشی با آب معمولی و سپس آب مقطر انجام شد. به منظور رنگ‌آمیزی ژل پس از مراحل شستشو اسلاید در محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (رنگ کوماسی بریلیانت بلو ١ گرم، اتانل خالص ٩٠٠ میلی‌لیتر، اسید استیک گلاسیال ٢٠٠ میلی‌لیتر) به مدت ١٠ دقیقه قرار داده شد. به منظور رنگ‌بری پس از تثبیت خطوط رسوبی به وسیله متانل، اسلاید در محلول رنگ‌بر (اتانل خالص ٩٠٠ میلی‌لیتر، اسید استیک گلاسیال ٢٠٠ میلی‌لیتر، آب مقطر ٩٠٠ میلی‌لیتر) به مدت ٣٠ دقیقه قرار داده شده تا خطوط رسوبی نمایان گردند. وجود خط رسوبی آبی رنگ بین گودی پادگن و پادتن نشانه مثبت بودن تست بود. در هر سری پنج‌تایی که بوسیله پانچ ایجاد شده بود یک نمونه کنترل مثبت قرار داده می‌شد (١٦).

نتایج و بحث

در هیچ یک از منابع موجود ارزیابی آزمایش ژل دیفوزیون بر روی گوسفندانی که بطور تجربی آلوده شده‌اند و یا زمان شروع آلودگی و دوره رشد متاسستد اکینوکوک مشخص باشد، صورت نگرفته است. نتایج این آزمایش روی چنین گوسفندانی نشان داد که پادتن‌های ضدپادگن‌های متاسستد در خون حیوان ظاهر شده و قابل تشخیص‌اند. حساسیت آزمایش ژل دیفوزیون تا ٥ هفته اول صفر درصد است و به تدریج با رشد کیست‌ها در هفته ششم افزایش یافته و در هفته چهاردهم به ٦٩ درصد می‌رسد و سپس به تدریج کاهش می‌یابد. اساساً نتایج آزمایشات سرولوژی در تشخیص هیداتیدوز انسانی و حیوانی به خاطر عدم وجود علایم بالینی خاص یا نشانه‌های اختصاصی اهمیت فراوانی دارند، با وجود این گزارشات متفاوتی از حساسیت تست‌های مختلف وجود دارد (١٢ و ٢٠).

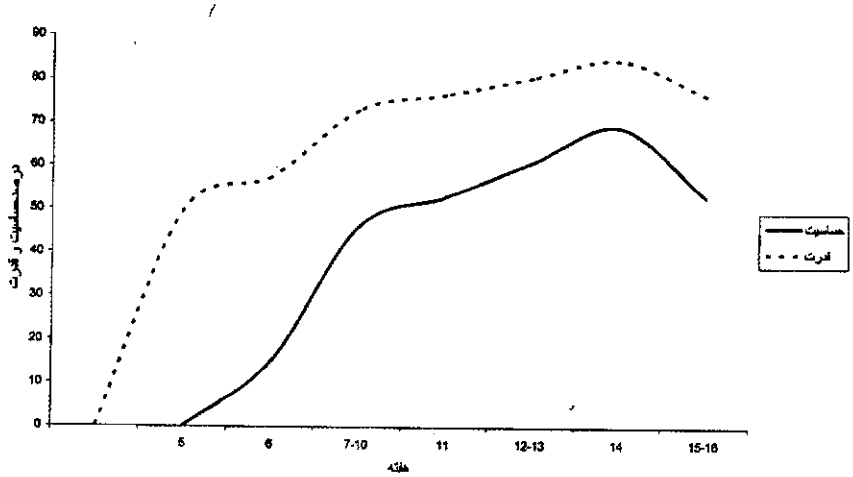
در مطالعه حاضر تمام گوسفندان گروه بیمار و شاهد پس از ١٦ هفته ذبح و کالبدگشایی شدند. در تمامی گوسفندان گروه آزمایش کیست‌های متعددی به قطر چند میلی‌متر عمدتاً در کبد و ندرتاً در ریه مشاهده شد که با نمونه‌برداری و تهیه مقاطع آسیب‌شناسی تشخیص کیست هیداتیک آنها محرز گردید. در هیچ یک از اعضاء گوسفندان شاهد کیستی مشاهده نشد. با انجام آزمایش ژل دیفوزیون روی سرم گوسفندان دارای کیست هیداتیک معلوم شد که این آزمایش تا ٥ هفته پس از شروع آلودگی منفی است. سرم برخی از گوسفندان از هفته ششم به بعد مثبت گردیدند و در هفته چهاردهم ٩ رأس گوسفند گروه آزمایش مثبت شدند (تصویر ١). از هفته پانزدهم به بعد از تعداد موارد مثبت کاسته شد به نحوی که در هفته شانزدهم فقط ٥٣ درصد گوسفندان مثبت شدند. آزمایش سرم خون گوسفندان شاهد در تمام مدت بررسی مزبور (١٦ هفته) منفی بوده است. به عبارت دیگر ویژگی این آزمایش ١٠٠ درصد برآورد شد. با بدست آوردن حساسیت و ویژگی، قدرت تست نیز محاسبه گردید (منحنی ١). نسبت درصد مثبت کاذب، منفی کاذب، ارزش پیشگویی مثبت و ارزش پیشگویی منفی با استفاده از جدول چهار سلولی محاسبه شد که نتایج آن در جدول ١ آمده است.



تصویر ۱: پاسخ مثبت تست ژل دیفوزیون و ایجاد خط رسوبی؛ گوده وسط حاوی پادگن و گوده‌های اطراف حاوی سرم گوسفندان آلوده می‌باشد

جدول ۱: موارد مثبت کاذب، منفی کاذب، ارزش پیشگویی مثبت و ارزش پیشگویی منفی تست ژل دیفوزیون طی هفته‌ها پس ازآلودگی به کیست هیداتیک

گوسفندان دارای کیست هیداتیک	هفته‌ها پس از آلودگی						
	۱ تا ۵	٦	۷ تا ۱۰	۱۱	۱۲ تا ۱۳	١٤	۱۵ تا ١٦
تعداد آزمایش شده	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳
تعداد موارد مثبت	۰	۲	٦	۷	۸	۹	۷
نسبت درصد مثبت کاذب	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نسبت درصد منفی کاذب	۱۰۰	۸٤	۵۳	۵۰	٤۵	٤۰	۵۰
نسبت درصد ارزش پیشگویی مثبت	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
نسبت درصد ارزش پیشگویی منفی	۳۱	۳۵	٤٦	۵۰	۵٤	٦۰	۵۰



منحنی ۱: نتایج آزمایش سرم گوسفندان گروه آزمایش بوسیله روش ژل دیفوزیون طی هفته‌ها پس از آلودگی به کیست هیداتیک

رفیعی و همکاران (۲۰۰٤) روش الایزا را به منظور تشخیص بیماری کیست هیداتیک با اندازه‌گیری IgG سرم بیماران به مدت ۲۸ ماه پس از عمل جراحی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی مزبور نشان داد که تیتر پادتن در بسیاری از بیماران تا مدت‌ها پس از جراحی پائین نمی‌آید. حتی در برخی موارد پس از عمل جراحی تیتر پادتن افزایش می‌یابد (۱۸).

Gadea و همکاران(۲۰۰۰) از روش ایمونوالکتروترانسفر به منظور تشخیص عود کیست هیداتیک در بیماران با حساسیت ۹۲/٥٤ درصد استفاده کردند (۷). روش و سترون بلوتینگ حساسیت بالایی در تشخیص هیداتیدوزیس داشته ولی نتیجه تست بستگی زیادی به جداسازی صحیح پادتن‌ها دارد. اخیراً روش مذکور بعنوان روشی مطمئن جهت مونیتورینگ بیماران پس از عمل جراحی به کار رفته است (٤).

تست الایزا در مطالعات سرواپیدمیولوژیک بسیار مفید می‌باشد. انجام آزمایش الایزا با استفاده از پادگن B خالص حساسیت ۹۷ درصد و ویژگی ۹۹ درصد را نشان داده است (۱۲).

Luka و همکاران (۲۰۰٤) طی یک بررسی سرواپیدمیولوژیک به روش الایزا در گوسفندان نیجریه پیش از کشتار و مقایسه نتایج آن با یافته‌های پس از کشتار شیوع بیماری را ۳٥/۹ درصد گزارش کردند (١٤).

Gatti و همکاران (۲۰۰٤) در آلودگی تجربی گوسفندان به کیست هیداتیک سرم آنها را به مدت یکسال از نظر وجود پادتن IgG بوسیله روش الایزا مورد بررسی قرار دادند. پادگن‌های بکار رفته در بررسی مزبور شامل مایع کامل یکست هیداتیک، قطعات خالص شده مایع یکست هیداتیک و پادگن B بودند. حساسیت با پادگن‌های فوق به ترتیب ۸۷، ۹۷/۸ و ۹٦/۳ درصد و ویژگی به ترتیب ۹۲/۷، ۹٤/٤ و ۹۳/٤ درصد نشان داده شد (۸).

انجام تست ژل دیفوزیون با پادگن قوس ٥ عمدتاً دارای ویژگی نزدیک به ۱۰۰ درصد می‌باشد ولی در بیشتر مطالعات انجام شده حساسیت آن به ندرت به ٥۰ درصد رسیده است، این در حالی است که در مطالعه حاضر حساسیت تست در برخی هفته‌ها از ٦۰ درصد بالاتر بود (١٦). با این وجود حساسیت برخی تست‌ها نظیر هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و الایزا بالای ۹۰ درصد گزارش شده است ولی ویژگی در مورد تست‌های مذکور بویژه هماگلوتیناسیون غیرمستقیم از سطح پائینی برخوردار است (۱۷ و ۲۰)، این امر احتمالاً مربوط به واکنش‌های متقاطع بین پادتن‌های ضدکیست هیداتیک و بسیاری از پادتن‌های انگلی دیگر نظیر *سیستی‌سرکوس‌بوویس*، *سیستی‌سرکوس‌سلولوزه*، *انتروبیوس‌درمیکولاریس*، *فاسیولاهپاتیکا*، *اکینوکوکوس‌مولتی‌لوکولاریس*، شیستوزومیاز و تریشینیوز می‌باشد (٦، ۱۰ و ۱۹). Doiz و همکاران (۲۰۰۱) علت واکنش‌های متقاطع را وجود فسفوریل کولین موجود در آنتی‌ژن قوس ٥ بعنوان اپی‌توپ شایع می‌دانند (٤). مطالعات محققین مختلف در گذشته نشان داده که ویژگی در آزمایش ژل دیفوزیون نزدیک به ۱۰۰ درصد می‌باشد (١٦ و ۲۰) همچنانکه در مطالعه حاضر ویژگی در تمام هفته ۱۰۰ درصد نشان داده شد. برخلاف ویژگی تست ژل دیفوزیون، حساسیت آن چندان قابل اعتماد نبوده چرا که فقط در ٦ هفته از مطالعه حاضر حساسیت تست مذکور بالای ٥۰ درصد نشان داده شد. چنین به نظر می‌رسد که گزارش نسبت درصدهای متفاوت آزمایشات سرولوژیک مربوط به جمع‌آوری نمونه‌های خون بیماران در زمان‌های مختلف است. همانگونه که در بررسی حاضر در مورد گوسفندان آلوده مشاهده می‌شود.

در مجموع تهیه مواد اولیه تست ژل دیفوزیون ارزان و انجام آن ساده و به سهولت توسط افرادی که حتی آموزش مختصری دیده باشند قابل اجرا است. در عین حال باید توجه داشت که بر اساس نتایج بررسی حاضر پاسخ منفی در آزمایش سرم دلیل بر عدم وجود کیست

نیست، بدین جهت توصیه می‌شود برای تشخیص قطعی کیست هیداتیک از مجموعه‌ای از آزمایشات سرولوژی و روش‌های تصویری نظیر رادیوگرافی، اولتراسونوگرافی و سی‌تی‌اسکن در نوبت‌های مختلف استفاده کرد تا نتیجه قطعی عاید شود.

متأسفانه در بررسی حاضر مدت نگهداری و آزمایش گوسفندان مورد آزمایش و شاهد فقط برای چهار ماه (١٦ هفته) برنامه‌ریزی شده بود چه در صورت نگهداری گوسفندان برای مدت طولانی، مشاهده تغییر حساسیت آزمایش به هنگام غیر فعال شدن کیست به علت طبیعی و یا در نتیجه اثر مواد شیمیایی و جراحی و غیره امکان‌پذیر بود. در پایان توصیه می‌شود جهت تشخیص دقیق بیماری هیداتیدوزیس، بایستی در ابتدا از یک تست تشخیصی با حساسیت بالا مانند الایزا (با حساسیت ٩٥ درصد) استفاده کرد و موارد مثبت را با تست ژل دیفوزیون آزمایش کرد. بدین وسیله موارد مثبت با ٩٥ درصد حساسیت و ١٠٠ درصد ویژگی شناخته می‌شود.

منابع

١- اسلامی، علی. (١٣٧٦): کرم شناسی دامپزشکی ـ سستدها ـ انتشارات دانشگاه تهران جلد دوم ـ شماره ٢٠٣٠/٢، صفحات ١٥٦-١١٨ .

٢- حسینی ـ سید حسین. (١٣٧٤): «تعیین سویه‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در ایران»، پایان‌نامه دکتری تخصصی انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران»، شماره ٢٧ ، صفحات ١٠٢-٨٥ .

3- Anderson, F. L., (1997). Introduction to cystic echinococcosis and description of cooperative research project in Morocco. Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special references to Morocco. Editor: Ferron L. Anderson. Brigham Young University, Provo, U.S.A., pp: 1-17.

4- Doiz, O.; Benito, R.; Sbihi, Y.; Osuna, A.; Clavel, A. and Gomez – Lus R. (2001). Western blot applied to the diagnosis and Post – treatment monitoring of human hydatidosis , Diagn. Microbol. Infect Dis.,3: No: 41, pp: 139-142 .

5- Dottorini, S.; Sparvoli, M.; Bllucci, C. and Magnini, M. (1985). Echinococcus granulosus: diagnosis of hydatid disease in man. Annals of Tropical Medicine and Pavasitology, 79,1:43-49.

6- Force, L.; Torres, J.M.; Carillo, A. and Busca, J. (1992). Evaluation of eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow–up, Clinical Infectious Disease, No: 15, pp: 473- 480.

7- Gadea, I.; Ayala, G.; Diago, M.T.; Gunat, A. and Garcia de Lomas, J. (2000). Immunological diagnosis of human hydatid cyst relaps: utility of the enzyme – linked immunoelectrotransfer blot and discriminate analysis, Clincal Diagnosis Laboratory Immunology, 4: No:7, pp: 549-552 .

8- Gatti, A.; Larrieau, E.; Mancini, S.; Biggatti, R.; Chiosso, C.; Araya, D.; Costa, M.; Herrero, E. and Santillan, G. (2004). Analysis of the immune response and diagnosis of cystic echinococcosis in ovines by means of an immunoenzymatic assay. 21th International Congress of Hydatidology, in Nairobi- Kenya, Vol: 35, pp: 68 .

9- Gottstein, B. (1984). An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis , American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 6: No: 33, pp: 1185-1191 .

10- Guisantes, J.A.; Rubio, M.F. and Diaz, R. (1981). Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to the diagnosis of human hydatidosis., Bulletin of Pan American Health Organization , 15:260-266 .

11- Hoghooghi, N.; Kagan, I.G.; Schiller, E.L. and Aminzadeh, M. (1977). Evaluation of the indirect-haemagglutination and intradermal tests on hydatid and non-hydatid cases. Tropical and Geographical Medicine, Vol. 29, 393-398.

12- Ibrahem, M.M.; Rafiei, A.; Dar, F.K; Azwai, S.M.; Carter, S.D. and Craig, P.S. (2002). Serodiagnosis of cystic echinococcosis in naturally infected camels , Parasitology ,3: No: 125 , pp: 245-251 .

13- Kagan, I.G.; Allain, D.S. and Norman, L. (1959). An evaluation of the hemagglutination and floculation tests in the diagnosis of Echinococcus disease. American Journal of Medicine and Hygiene, 8:51-55 .

14- Luka, S.A.; Ajogi, J.; Nock, I.H. Umoh J.U. and Kudi, A. (2004). Serological diagnosis of hydatidosis in domestic animals slanghtered in the Kano abattoir, northern Nigeria. 21th International Congress of Hydatidology, in Nairobi-Kenia, Vol: 35, pp: 69 .

15- McManus, D.P. and Macpherson, C.N.L. (1984). Strain characterization in the hydatid organism, Echinococcus granulosus : current status and new perspective. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 78:193-198 .

16- Mercado, R.; Atias, A; A., Astorga, B. and Lorca, M. (1989). Hydatidosis diagnosis by double diffusion in agar with arc 5 detection. Bulletin of Pan American Health Organization, 23: 295-298 .

17- Paul, M. and Stefaniak, J. (2001). Comprarsion of dot immunobinding assay and two enzyme – linked immunosorbent assay kits for the diagnosis of liver cystic echinococcosis, Hepatology Research, No:21, pp:14-26 .

18- Rafiei, A.; Jahanshahi, A.B. and Talaeizadeh A.H. (2004). Serological diagnosis and post-operative evaluation of specific IgG against cyst fluid antigen in human hydatid disease. 21 st International congress of Hydatidology, in Nairobi-kenya, Vol: 35pp: 51 .

19- Sjolander, A.; Guisantes, J.A.; Torres – Rodriguez, J.M. and Schroder, H. (1989). The diagnosis of human hydatidosis by measurment of specific IgE antibody by enzyme immunoassay, Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 21: 213-218 .

20- Zarzosa, M.P.; Domingo, A.O.; Gutierrez, P.; Alonso, P.; Cuervo, M.; Drado, A.; Bratos, M.A.; Garcia–Yuste, M.; Ramos, G. and Torres, A.R. (1999). Evaluation of six serological tests in diagnosis and pestoperative control of Pulmonary hydatid disease patients, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease., No:35, pp: 255-262.

 (Short Paper)

Evaluation of gel diffusion test for diagnosis of unilocullar hydatid cyst in experimentally infected sheep

Razi Jalali, M.H.[1*]; *Ghorbanpoor, M.*[2*]; *and Hoghooghi Rad, N.*[3*]

Abstract

Hydatid cyst is one of the zoonotic disease which has losses on animal and human populations. One of the most important problems in hydatidosis is the diagnosis of the disease in human and animals.Various assays have been developed and used for the detection of specific antibodies in human and animals sera with variable results. Since the evaluation of serological tests in human have restriction, this study was carried out in experimentally sheep hydatidosis. In this study, periods of antibodies appearance were surveyed by Gel Diffusion test which has high specificity in hydatid cyst diagnosis. The hydatid fluid (HF) and protoscolces were aseptically obtained in laboratory. Each dog was given 15,000 viable protoscoleces. About two months later, as soon as the taenid eggs were observed in the dogs stools, the dogs were autopsied after euthanasia. The small intestines were opened and *Echinococcus granulosus* were collected and placed in physiologic saline. The gravid proglottids were crushed and the eggs were released and counted. About 2000 eggs were orally administred to each of 13 sheep. Six other sheep were kept as controls and physiological saline were fed to them. All sheep were bleeded each week. And all sera were kept in -200c until use. All sera samples were then examined with Gel Diffusion test. The sensitivity of Gel Diffusion test, in detecting antibodies in the sera of infected sheep was nil during five weeks of post- infection (P.i). The sensitivity increased to 15% in the sixth week and reached its maximum (69%) only in the 14th week of p.i. then it decreased in the following weeks. However, the specificity of the test was 100% by examining the non-infected sheep sera throught the experiment. It seems that the capability of diagnosis of antiydatid antibody depends on cyst growth stage. Although positive results are very valuable, the negative results are not indicative of the absence hydatid cyst in sheep, and doing other serologic tests is necessary with high sensitivity for hydatid cyst diagnosis.

Key words: Sheep hydatidosis, Echinococcus granulosus, Gel diffusion

[1*] Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

[2*] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

[3*] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran