مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۴، ۳۹۶-۳۹۱
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.126240.2312

ارزیابی آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس (LAT) و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA) جهت تشخیص دیکروسلیوز گوسفند

محمد حسین راضی جلالی[1*] مسعود قربانپور[1] فروزان جهانگیری نصر[2]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۳۰ تیر ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی:۲۱ شهریور ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: ترماتد دیژن دیکروسلیوم دندریتیکوم انگل کبد، مجاری صفراوی و کیسه‌ی صفرای پستانداران خصوصاً نشخوارکنندگان است که با استفاده از روش‌های ایمنی‌شناسی می‌توان به تشخیص زود هنگام آلودگی اقدام نمود. **هدف:** مقایسه آگلوتیناسیون لاتکس و هماگلوتیناسیون غیر مستقیم در تشخیص آنتی بادی ضددیکروسلیوم دندریتیکوم در سرم گوسفندان آلوده بود. **روش کار:** پس از جداسازی انگل‌های زنده از کبد گوسفندان آلوده، بخشی از انگل‌ها به منظور تهیه آنتی‌ژن پیکری با استفاده از سونیکاتور هموژن شدند و بخشی دیگر در شرایط استریل به محیط کشت انتقال یافتند تا از مواد ترشح شده از انگل به عنوان آنتی‌ژن دفعی‌ترشحی استفاده شود. از گوسفندان آلوده و بره‌های غیر آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم به منظور تهیه سرم‌های مثبت و منفی خونگیری به عمل آمد. جهت تست آگلوتیناسیون لاتکس روی ذرات لاتکس، آنتی‌ژن‌ها جداگانه اضافه و مخلوط شدند تا اتصال آنتی‌ژن به ذرات لاتکس برقرار شود. نمونه‌های سرم مثبت و منفی به لاتکس فوق اضافه و از نظر واکنش لاتکس آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم پس از رقت سازی سرم‌ها، به گلبول قرمز حساس شده، آنتی ژن اضافه و مخلوط گردید و از نظر ظهور واکنش هماگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** حساسیت و ویژگی روش لاتکس آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی‌ژن دفعی ترشحی به ترتیب ۸۴٪ و ۹۷/۶ ٪ و در استفاده از آنتی‌ژن پیکری ۹۶ ٪ و ۹۷/۶ ٪ محاسبه شد. حساسیت و ویژگی روش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم با استفاده از آنتی‌ژن دفعی ترشحی به ترتیب ۶۰ ٪ و ۹۲/۹ ٪ و در استفاده از آنتی‌ژن پیکری ۹۲ ٪ و ۶۶/۷ ٪ محاسبه شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به بررسی حاضر روش لاتکس آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی‌ژن دفعی‌ترشحی و سوماتیک از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است و روشی سریع و بدون نیاز به ابزارخاص در تشخیص دیکروسلیوزیس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: دیکروسلیوم دندریتیکوم، لاتکس آگلوتیناسیون، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، گوسفند

مقدمه

دیکروسلیوزیس بیماری انگلی کرمی ناشی از دیکروسلیوم دندریتیکوم از انواع ترماتودهای دیژنه‌آ است که بنا بر عقیده‌ی ولف، از دو منظر بهداشتی و اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای در دام‌های نشخوار کننده برخوردار است(۱۵). این انگل گسترش جهانی داشته و کرم بالغ در کیسه صفرا و مجاری صفراوی کبد پستانداران و بویژه نشخوارکنندگان زندگی می‌کند ولی انسان هم تصادفاً به آن مبتلا می‌شود (۱۶). در این مورد در سال‌های اخیر آلودگی انسان در عربستان، ترکیه، قرقیزستان و ایران گزارش شده است (۶،۸،۱۱،۲۳). به دلیل وقوع شکل تحت درمانگاهی دیکروسلیوزیس، در اغلب موارد بیماری به صورت بالینی و صرفاً از روی علائم تشخیص داده نشده و به همین دلیل است که تشخیص اساساً در ضمن بررسی‌های کشتارگاهی یا کالبدگشایی و جداسازی ترماتود بالغ از مجاری صفراوی و یا توسط آزمایش مدفوع با دیدن و شناسایی تخم کرم در دام زنده صورت می‌گیرد، اگرچه براساس گزارش Ambrosi در سال ۱۹۸۰، آزمایش مدفوع گوسفندان با کمتر از ۱۰۰ عدد کرم بالغ منفی خواهد بود (۱،۱۹). از طرفی در آزمون‌های مدفوعی نوع روش به کار گرفته شده، نوع محلول (های) شناورسازی مورد استفاده، سن و مدت زمان بعد از آلودگی نیز تأثیرگذار هستند (۳،۴،۱۷). بنابر نظر Campo و همکاران در سال ۲۰۰۰ و Senlik و همکاران در سال ۲۰۰۶ تعداد تخم دفع شده در یک دام نه تنها از یک روز به روز دیگر، بلکه در ساعات مختلف روز هم تغییر می‌کند (۲،۱۹). در ۳۰ سال گذشته روش‌های ایمنی‌شناسی پیشرفت قابل توجهی در تشخیص دیکروسلیوزیس داشته‌اند (۱۴). در این ارتباط روش‌های مختلفی نظیر رسوبی، هما گلوتیناسیون، ثبوت کمپلمان و الایزا مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۸). با توجه به طولانی بودن فاصله‌ی آلودگی و دفع تخم، این روش‌ها در تشخیص زود هنگام آلودگی ارزش زیادی دارند (۴). این ترماتود زمینه‌ساز سایر بیماری‌های عفونی کلستریدیایی در میزبان‌های آلوده و بیمار است و همچنین باعث خسارت اقتصادی بالایی می‌شود. کاهش تولیدات دام‌ها در آلودگی شدید دیده می‌شود(۸). تشخیص آلودگی در مراحل ابتدایی بیماری می‌تواند در کاهش خسارت نیزمؤثر باشد (۹). تاکنون روش‌های به کار برده شده برای کنترل آلودگی موفق نبوده است، بنابراین تشخیص دقیق اولیه اهمیت زیادی دارد (۴). با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی انگل و با توجه به نقاط ضعف آزمایش مدفوع در شناسایی آلودگی، دستیابی به روش‌های تشخیص که از کارایی لازم برخوردار هستند، در خور توجه و

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۰۰۷۳، نمابر: ۰۶۱-۳۳۳۶۰۸۰۷، Email: mh.jalali@scu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

اهمیت می‌باشند.تست‌های سرولوژیک باتوجه به دوره‌ی طولانی آلودگی دام‌ها به دیکروسلیوز، که گاهی سال‌ها طول می‌کشد، درتشخیص به موقع ودرمان بیماری، به‌منظورکاهش زیان‌های اقتصادی مفیدمی‌باشند(۱۳). Jithendran و همکاران در سال۱۹۹۶ از روش‌های ژل‌دیفوزیون، کانترایمونوالکتروفورز و هماگلوتیناسیون در تشخیص دیکروسلیوز گوسفند و بز استفاده نمودند (۱۰). Meshgi و Khodaveisi در سال ۲۰۱۴ آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی-ترشحی دیکروسلیوم دندریتیکوم را مورد مطالعه قرار داده و استفاده از آن‌ها یا قطعات ۲۷-۲۵ کیلودالتونی آن‌ها را برای آزمایش‌های سرولوژیک مناسب دانسته‌اند (۱۳). هدف از انجام این مطالعه ارزیابی قابلیت روش‌های سرم‌شناسی لاتکس آگلوتیناسیون و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم در تشخیص آلودگی گوسفندان به دیکروسلیوم دندریتیکوم بود.

مواد و روش کار

تهیه نمونه‌های سرم گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم: برای این منظور طی مراجعه تدریجی به کشتارگاه خرم‌آباد از۵۰گوسفند آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم که آلودگی آن‌ها در بازرسی پس از کشتار تأیید شده بود، خونگیری و در آزمایشگاه، سرم جدا و تا زمان آزمایش (۲ تا ۴ ماه بعد) در دمای ۲۰ °C- نگهداری شدند.

تهیه نمونه‌های سرم بره‌های غیر آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم: ۴۲ نمونه خون منفی، از بره‌های با سن ۱ هفته تا ۱ ماهه که احتمال آلودگی کمی داشتند درروستای دارتی شهرستان خرم آباد تهیه و در آزمایشگاه، سرم نمونه خون جدا و در دمای۲۰ °C- نگهداری شد. برای اطمینان بیشتر از عدم آلودگی نمونه‌ها به روش سرم‌شناسی کانترایمونوالکتروفورزیس تأیید گردیدند (۱۴).

تهیه آنتی‌ژن‌های پیکری:کبد گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم از کشتارگاه شهرستان خرم آباد جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه انگل‌های زنده جداسازی شده و جهت تهیه آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفتند. انگل‌های بالغ زنده در چند مرحله با PBS (۷/۴) شستشو داده شدند تا مواد زائد آن‌ها کاملاً خارج شود. انگل‌ها ۱۰ بار توسط دستگاه سونیکاتور (۸۰ پالس در دقیقه) در کنار یخ سونیکه شدند تا پروتئین‌های سوماتیک به حالت محلول درآمده و با دور ۷۰۰۰ گرادیان به مدت ۵ دقیقه در۴ °C سانتریفوژ گردید. مایع رویی برداشته و پس از عبور از فیلتر۰/۲ µm در فریزر۲۰ °C- تا زمان آزمایش نگه‌داری شد(۱۸).

تهیه آنتی ژن‌های دفعی - ترشحی: انگل‌های جمع آوری شده از کبدهای آلوده، چندین بار با PBS (pH=۷/۴) چندبار شستشو داده شدند تا مواد زائد آن‌ها جدا شود و در پایان با PBS حاوی جنتامایسین نیز شستشو شدند. پس از اطمینان از زنده بودن انگل‌ها، به محیط کشت RPMI غنی شده با Glutamax-HEPES- و حاوی جنتامایسین منتقل گردید. به ازای ۴ mM محیط کشت، حداقل ۴۰۰ انگل در نظر گرفته شد. محیط کشت حاوی انگل به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت حاوی مواد دفعی‌ترشحی انگل‌ها جداسازی شده و ۲ دقیقه با دور ۲۵۰۰ گرادیان در۴ °C سانتریفوژ گردید. مایع رویی را برداشته که پس از عبور از فیلتر۰/۲ µm، استریل شد(۱۸).

اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد: جهت تعیین میزان پروتئین آنتی‌ژن پیکری و دفعی - ترشحی از روش برادفورد استفاده شد وتوسط دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج۵۹۵ nm قرائت گردید (۱۲،۱۴).

روش انجام آزمون لاتکس آگلوتیناسیون: استانداردسازی روش لاتکس آگلوتیناسیون بااستفاده ازآنتی‌ژن‌های دفعی‌ترشحی وپیکری مطابق روش Javier و همکاران درسال ۱۹۹۱ صورت گرفت.

روی صفحه لاتکس، تمام نمونه‌های مثبت و منفی دیکروسلیوم دندریتیکوم هر کدام جداگانه یک بار به لاتکس حاوی آنتی‌ژن دفعی-ترشحی اضافه گردید و بار دیگر تمام نمونه‌های مثبت و منفی دیکروسلیوم دندریتیکوم نیز جداگانه به لاتکس حاوی آنتی‌ژن پیکری اضافه و وقوع آگلوتیناسیون زیرنور چراغ مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

استاندارد سازی روش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی و پیکری: بر اساس روش بکار رفته در مطالعه Jithendran و Bhat در سال ۱۹۹۶ صورت گرفت. رقت‌های +۱، +۲، +۳، +۴ به عنوان مثبت تلقی می‌شدند.به منظور ارزیابی واکنش‌های متقاطع دو سرم ازگوسفندان آلوده به کیست هیداتیک و دو سرم از گوسفندان آلوده به فاسیولا ژیگانتیکا که آلودگی آن‌ها پس از کشتار محرز شده بود، مورد آزمایش قرار گرفتند. حساسیت و ویژگی تست‌های آگلوتیناسیون لاتکس و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم محاسبه شدند (۲۰).

نتایج

غلظت پروتئین آنتی ژن پیکری با استفاده از روش برادفورد۱۵۱۲ µg/ml و آنتی ژن دفعی- ترشحی۴۵۰ µg/ml بود.

نتایج لاتکس آگلوتیناسیون و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم: در آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی‌ژن دفعی ترشحی، در مقایسه با یافته‌های پس از کشتار، از ۵۰ نمونه سرم گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم تعداد ۴۲ نمونه واکنش مثبت نشان دادند (حساسیت ۸۴ ٪). طی آزمایش مذکور از ۴۲ نمونه سرم گوسفندان غیر آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم تعداد ۴۱ نمونه واکنش منفی نشان دادند (ویژگی ۹۷/۶ ٪).

طی آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی‌ژن پیکری، در مقایسه با یافته‌های پس از کشتار، از ۵۰ نمونه سرم گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم تعداد ۴۸ نمونه واکنش مثبت نشان دادند (حساسیت ۹۶٪). طی آزمایش مذکور از ۴۲ نمونه سرم گوسفندان غیر

Archive of SID
www.SID.ir

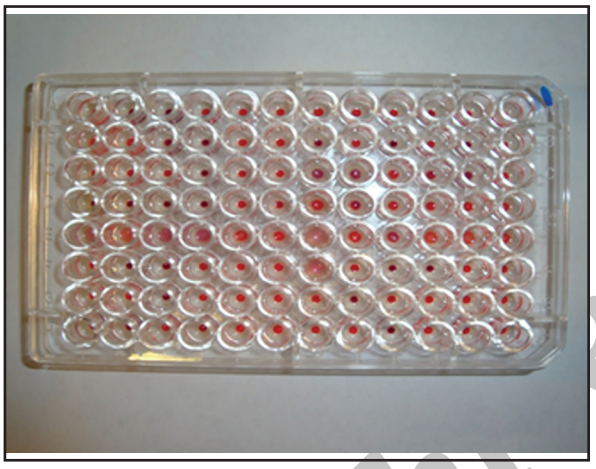
جدول ۱. حساسیت و ویژگی روش لاتکس آگلوتیناسیون در تشخیص دیکروسلیوز گوسفند.

نمونه سرم / نوع آنتی ژن	نمونه مثبت		نمونه منفی	
	واکنش مثبت	درصد حساسیت	واکنش منفی	درصد ویژگی
آنتی ژن پیکری	۴۸	۹۶	۴۱	۹۷/۶
آنتی ژن دفعی-ترشحی	۴۲	۸۴	۴۱	۹۷/۶
جمع کل	۵۰		۴۲	

جدول ۲. حساسیت و ویژگی روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم در تشخیص دیکروسلیوز گوسفند.

نمونه سرم / آنتی ژن	نمونه مثبت		نمونه منفی	
	واکنش مثبت	درصد حساسیت	واکنش منفی	درصد ویژگی
آنتی‌ژن پیکری	۴۶	۹۲	۲۸	۶۶/۷
آنتی‌ژن دفعی-ترشحی	۳۰	۶۰	۳۹	۹۲/۹
جمع کل	۵۰		۴۲	

تصویر ۱. قرائت تست آگلوتیناسیون لاتکس جهت تشخیص دیکروسلیوز گوسفند.



تصویر ۲. قرائت تست آگلوتیناسیون لاتکس جهت تشخیص دیکروسلیوز گوسفند.

آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم تعداد ۴۱ نمونه واکنش منفی نشان دادند (ویژگی ۹۷/۶ ٪)(جدول ۱).

در آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌ژن دفعی ترشحی از ۵۰ نمونه سرم گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم تعداد ۳۰ نمونه واکنش مثبت نشان دادند(حساسیت ۶۰ ٪). در این روش از ۴۲ نمونه سرم گوسفندان غیر آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم تعداد ۳۹ نمونه واکنش منفی نشان دادند (ویژگی ۹۲/۹ ٪).

در آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌ژن پیکری از ۵۰ نمونه سرم گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم تعداد ۴۶ نمونه واکنش مثبت نشان دادند (حساسیت ۹۲ ٪). از ۴۲ نمونه سرم گوسفندان غیر آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم تعداد ۲۸ نمونه واکنش منفی داشتند (ویژگی ۶۶/۷ ٪) (جدول ۲).

هیچ یک از نمونه‌های سرم گوسفندان آلوده به فاسیولاژیگانتیکا و کیست هیداتیک در مقایسه با یافته‌های پس از کشتار، با آنتی‌ژن‌های دیکروسیلوم دندریتیکوم در تست‌های مذکور واکنش مثبت نشان ندادند.

بحث

در سال‌های اخیر روش‌های ایمنی شناسی پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در تشخیص دیکروسلیوزیس داشته‌اند (۱۴). با توجه به طولانی بودن فاصله‌ی آلودگی تا دفع تخم، استفاده از روش‌های ایمنی شناسی می‌تواند به تشخیص زود هنگام آلودگی کمک کند. البته ایجاد واکنش‌های متقاطع با سایر انگل‌ها نظیر فاسیولا و پارامفیستوموم می‌تواند در کسب نتایج اختلال ایجاد کند (۲). از روش‌های تشخیص سرمی مورد استفاده جهت تشخیص دیکروسلیوزیس می‌توان به آزمایش ثبوت کمپلمان، هماگلوتیناسیون، الایزا، رسوبی، کانترایمونوالکتروفورزیس، ایمونوفلورسانس و لاتکس آگلوتیناسیون اشاره کرد (۹،۱۲). Wedrychowicz و همکاران در سال ۱۹۹۶ پاسخ آنتی بادی مخاطی علیه آنتی‌ژن‌های بدنی و دفعی ترشحی گاوهای آلوده دیکروسلیوم دندریتیکوم را مورد مطالعه قرار دادند (۲۲). Gonzalez-Lanza و همکاران در سال ۲۰۰۰ با مطالعه‌ای روی بره‌های

Archive of SID
www.SID.ir

آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم نشـان دادند روش الایزا ۲۰ روز زودتر از آزمایش مدفوع قادر به تشـخیص آلودگی است (۴). با توجه به ظهور آنتی بادی ضد دیکروسـلیوم دندریتیکوم در ۳۰ روز پـس از آلودگی، به منظور جلوگیری از افزایش خسارات اقتصادی می‌توان از روش‌های سرمی جهت تشـخیص زود هنگام بیماری اسـتفاده نمود. Thrusfieldدر سال ۱۹۹۷ طی ارزیابی روش الایزای غیرمسـتقیم در تشـخیص دیکروسلیوزیس در گوسفندان نشـان داد که حساسیت و ویژگی این آزمون به ترتیب ۸۶ ٪ و ۹۳٪ می‌باشد (۲۱).

در مطالعه حاضر هماگلوتیناسـیون غیر مستقیم با استفاده از آنتی‌ژن پیکری در مقایسـه با مطالعات انجام شده توسـط Jithendran در سال ۱۹۹۶ و Somvanshi در سـال ۱۹۹۳ از حساسیت بالاتری برخوردار بود (۹،۲۰).

Jithendran و همـکاران در سـال ۱۹۹۶در ارزیابـی مقایسـه‌ای، تسـت‌های آگار ژل پرسی‌پیتاسـیون، کانترایمونوالکتروفورزیـس و هماگلوتیناسیون غیر مستقیم با به کارگیری آنتی‌ژن بدنی جهت تشخیص دیکروسـلیوم دندریتیکـوم در گوسـفند و بز نشـان دادند که حساسـیت تسـت‌های مذکور به ترتیب ۲۳/۸ ٪، ۶۹/۸ ٪ و ۵۰ ٪ و ویژگی ۹۳/۳ ٪، ۸۴ ٪ و ۹۳/۳ ٪ می‌باشد (۱۲). در این بررسی هماگلوتیناسیون غیر مستقیم حساسیت بیشتری نسبت به تست آگار ژل پرسی‌پیتاسیون داشت. مطالعه مذکور نشان داد که تست کانترایمونوالکتروفورزیس با حساسیت و ویژگی قابل قبولی می‌تواند در تشخیص دیکروسلیوزیس گوسفند و بز مورد توجه باشـد. Somvanshi و همکاران در سـال ۱۹۹۳ با استفاده از تست‌های کانترایمونوالکتروفورزیس و هماگلوتیناسیون غیرمستقیمجهت تشخیص دیکروسلیوم‌دندریتیکوم‌دربز نشان‌دادند که‌تست کانترایمونوالکتروفورزیس حساسیت بالاتری نسبت به تست هماگلوتیناسیون غیر مستقیم داشته که با نتایج به دست آمده توسط Jithendranو همکاران در سال ۱۹۹۶ هم خوانی نشان داد (۹،۲۰).

Manas Almendors وهمکاران در سال ۱۹۸۰ با استفاده از تست لاتکس آگلوتیناسیون با به کارگیری آنتی‌ژن بدنی جهت تشخیص آلودگی به دیکروسلیوم دندریتیکوم در گوسفند نشان دادند که حساسیت و ویژگی تسـت لاتکس آگلوتیناسـیون به ترتیب ۹۲/۱۵٪ و ۷۵/۴٪ می‌باشد که با مطالعه حاضر از لحاظ حساسیت هم خوانی نسبی دارد (۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمون آگلوتیناسیون لاتکس با اسـتفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی و پیکری در تشخیص دیکروسـلیوزیس بیشتر از آزمون هماگلوتیناسـیون غیرمستقیم می‌باشد. روش لاتکس آگلوتیناسـیون روشی سریع و قابل اعتماد جهت تشخیص دیکروسلیوزیس گوسفندان می‌باشد. ولی پیشنهاد این روش در تشخیص دیکروسلیوزیس گوسفند نیازمند مطالعات میدانی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز بـه دلیل تأمین هزینه‌های این پژوهش در قالب گرنت تشـکر و قدردانی بعمل می‌آورند.

References

1. Ambrosi, M., Baldelli, B., PiergiliFioretti, D., Polidori, G.A. Girelloni, V., Moretti, A., Principato, M. (1980) Dicroceliosiovina: insorgenza e decorsodellainfezione da *Dicrocoelium dendriticum* studiati conmetodi parassitologic ieserologici(ELISA) in quattrogruppi di ovinitraccia. Riv Parassitol. 3: 299-307.
2. Campo, R., Mang-Gonzalez, M.Y., Gonzalez-Lanza, C. (2000) Relationship between egg output and parasitic burden in lambs experimentally infected with different doses of Dicrocoelium denderiticum (Digenea). Vet Parastiol. 87: 139-149.
3. Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A. (2004) The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of Mc Master technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strangles and Dicrocoelium denderiticum in sheep. Vet Parastiol. 123: 121-131.
4. Gonzalez-Lanza, C., Mang-Gonzalez, M.Y., Campo, R., Del-Pozo, P, Sandoval, H., Oleaga, A., Ramajo, V. (2000) IgG antibody response to ES or somatic antigens of Dicrocoelium denderiticum (Trematoda) in experimentally infected sheep. Parasitol Res. 86: 472-479.
5. Gonzalez-Lanza, C., Mang-Gonzalez, M.Y., Del-Pozo- Carnero, P. (1993) Coprological study of the Dicrocoelium denderiticum (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in Leon Province, Northwest Spain. Parasitol Res. 79: 488-491.
6. Helmy, M., Al-Mathal, E. (2003) Human infection with Dicrocoelium denderiticum in Riyadh district (Saudi Arabia). J Egyp Soc Parasitol. 33: 139.
7. Javier Gella, F., Serra, J., Gener, J. (1991) Latex agglutination procedures in Immunodiagnosis.

Archive of SID
www.SID.ir

Pure & App Chem. 63: 1131-1134.
8. Jeandron, A., Rinaldi, L., Abdyldaieva, G., Usubalieva, J., Steinmann, P., Cringoli, G., Utzinger, J. (2011) Human infections with Dicrocoelium dendriticum in Kyrgyzstan: the tip of the iceberg. 97: 1170-1172.
9. Jithendran, K., Bhat, T. (1996) Prevalence of dicrocoeliosis in sheep and goats in Himachal Pradesh, India. Vet Parasitol. 61: 265-271.
10. Jithendran, K.,Vaid, J., Krishna, L.(1996) Comparative evaluation of agar gel precipitation, counterimmunoelectrophoresis and passive haemagglutination tests for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infectionin sheep and goats. Vet Parasitol. 61: 151-156.
11. Karadag, B., Bilici, A., Doventas, A., Kantarci, F., Selcuk, D., Dincer, N., Oner, Y.A., Erdincler, D.S. (2005) An unusual case of biliary obstruction caused by Dicrocoelium dendriticum. Scand J Infect Dis. 37: 385-388.
12. Manas Almendros, I., Gomez Garcia, V., Campos Bueno, M., Lozano Maldonado, J., Rodriguez Osorio, M. (1980) Diagnosis of Dicrocoelium Infection in sheep by the latex agglutination test (In spanish). Rev Iber Parasitol. 40: 437-441.
13. Meshgi, B., Khodaveisi, M. (2014) Determination of Immunodominant Antigens of *Dicrocoelium dendriticum* by Hyperimmune Sera. Immunol And Infect Dis. 2: 4-8.
14. Otranto, D., Traversa, D. (2002) A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. Vet Parasitol. 107: 317-335.
15. Otranto, D., Traversa, D. (2003) Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. Trends Parasitol. 19: 12-15.
16. Rack, J., Adusu, E., Jelinek, T. (2004) Human infection with Dicrocoelium dendriticum.(Article in Germany) Dtsch Med Wochenschr. 129: 2538-40.
17. Rehbein, S., Kokott, S., Lindner, T. (1999) Evaluation of techniques for the enumeration of Dicrocoelium eggs in sheep faeces. J Vet Med. 46: 133-139.
18. Revilla-Nuin, B., Mang-Gonzalez, M.Y., Minambers, B., Gonzalez-Lanza, C. (2005) Partial characterization and isolation of 130kDa antigenic protein of Dicrocoelium dendriticum adults. Vet Parasitol. 134: 229-240.
19. Senlik, B., Cirak, V., Muz, M., Tinar, R. (2006) Changes in faecal egg counts at different hours of the day and relationship between faecal egg count and parasite burden in sheep naturally infection with Dicrocoelium dendriticum. Turk J Vet Anim Sic. 30: 107-111.
20. Somvanshi, R., Vaid, J., Biswas, J.C., Jithendran, K.P. (1993) Clinicopathological observations on dicrocoeliasis in goats. Indian J Vet Pathol. 16: 112-114.
21. Jithendran, K.,Vaid, J., Krishna, L. (1996) Comparative evaluation of agar gel precipitation, counterimmunoelectrophoresis and passive haemagglutination tests for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep and goats. Vet Parasitol. 61: 151-156.
22. Thrusfield, M. (1995) Veterinary Epidemiology, (2nd ed.). Black well, London, UK.
23. Wedrychowicz, H., Ducommun, D., Klockiewicz, M., Pfistre, K. (1996) Surface and ES antigens of adult Dicrocoelium dendriticum inducing bile antibody responses in naturally infected cattle. Order. Vet Parasitol. 53: 111-132.
24. Zali, M.R., Mehr, A.J, Rezaian, M., Meamar, A.R., Vaziri, S., Mohraz, M. (2004) Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-positive individuals in Iran. Jpn J Infect Dis. 57: 268-270.

Archive of SID

www.SID.ir

Latex agglutination (LAT) and indirect haemagglutination (IHA) evaluation techniques to detect sheep dicrocoeliosis

Razi jalali, M.H.[1*], Ghorbanpoor, M.[1], Jahangiri nasr, F.[2]

[1]*Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[2]*Graduated of Veterinary Parasitology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

(Received 21 July 2017, Accepted 12 September 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Dicrocoeliosis is caused by the small liver fluke *Dicrocoelium dendriticum* which lives in bile ducts and gall bladder of wild and domestic ruminant. Immunodiagnostic methods are useful for early diagnosis. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to evaluate agglutination latex (LAT) and indirect haemagglutination (IHA) tests for diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep. **METHODS:** Adult helminths were collected from infected livers of slaughtered sheep at Khoramabad abattoir. The excretory-secretory and somatic antigens were provided using homogenization and sonication techniques. To provide positive and negative sera, blood was taken from infected and non-infected sheep with *Dicrocoelium dendriticum*. Somatic and excretory-secretory antigens were added and blended to latex particles. All sera were added to latex and used for agglutination test.Sensitive RBC and somatic and ES antigens were added to IHA and blended to evaluate haemagglutination response. **RESULTS:** The sensitivity and specificity of LAT using excretory secretory and somatic antigens were 84%,97/6%,96% and 97/6% respectively. While the sensitivity and specificity in IHA using excretory secretory and somatic antigens were respectively 60%, 92/9%,92% and 66/7%. **CONCLUSIONS:** From the results of the present study, the LAT had the highest sensitivity and specificity, which recommends it being considered as a rapid diagnostic technique for sheep dicrocoeliosis.

Keyword: *Dicrocoelium dendriticum*, Latex agglutination, Indirect haemagglutination, Sheep

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sensitivity and specifity of LAT method in sheep dicrocoeliosis diagnosis.

Table 2. Sensitivity and specifity of IHAmethod in sheep dicrocoeliosis diagnosis.

Figure 1. Reading of LAT method for diagnosis of sheep dicrocoeliosis.

Figure 2. Reading of IHA method for diagnosis of sheep dicrocoeliosis.

***Corresponding author's email: mh.jalali@scu.ac.ir, Tel: 061-33330073, Fax: 061-33360807**

www.SID.ir