Archive of SID

نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۸۷، تابستان ۱۳۸۹

ارزش روش های مختلف تشخیص هیداتیدوزیس در نشخوارکنندگان بزرگ

• **محمد یخچالی** (نویسنده مسئول)
دانشیار بخش انگل شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
• **احمد مرشدی**
دانشیار بخش ایمنی شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۹
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۴۶۳۹۵۹
Email: m.yakhchali@urmia.ac.ir.

چکیده

بیماری هیداتیدوز ناشی از رشد متاسستود *Echinococcus granulosus* در اندام های مختلف بدن میزبان های واسط است که انتشار جهانی دارد. ایران در گروه مناطق هیپراندمیک هیداتیدوزیس می باشد. براین اساس ارزیابی واکنش آنتی ژنی در مجاورت با آنتی سرم تهیه شده از گاو (۲۵۶راس) و گاومیش (۱۳۲راس) در مقایسه با یافته های کشتارگاهی و مولکولی انجام شد. آنتی ژن محلول از تغلیظ مایع کیست هیداتید و سونیکه کردن پروتواسکولکس ها تهیه شد. سرم ضدمایع کیست و پروتواسکولکس از ایمن سازی خرگوش تهیه گردید. استخراج DNA از پروتواسکولکس انجام شد و قطعه bp۶۸۸ از ژن nda۱ تکثیر گردید. در مشاهدات کشتارگاهی، ۱۸/۴درصد گاوها و ۸/۳درصد گاومیش ها آلوده به کیست هیداتید در کبد و ریه بودند. در صورتی که موارد مثبت آلودگی در روش مولکولی برای گاو ۲۶/۱درصد و برای گاومیش ۱۴/۳درصد بود. در روش دات الیزا موارد مثبت آلودگی برای گاو ۲۲/۷درصد و گاومیش ۱۱/۸درصد بود. در مقایسه با یافته های کشتارگاهی، حساسیت و ویژگی آزمون دات الیزا برای نمونه سرم های گاوی، به ترتیب، ۸۱/۰۱درصد و ۹۵درصد بود. در حالی که حساسیت و ویژگی آزمون برای نمونه سرم های گاومیش ۷۷/۱۲درصد و ۹۶/۳۲درصد تعیین گردید. در گاومیش، ارزش تشخیصی روش مولکولی با حساسیت ۹۱/۲درصد و ویژگی ۹۹درصد بود. در حالیکه حساسیت و ویژگی تشخیص مولکولی کیست هیداتید گاو به ترتیب ۹۷/۴درصد و ۹۹/۴ درصد بود. مقایسه یافته های آزمون سرمی به روش دات الیزا با روش تشخیص مولکولی نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمون دات الیزا کمتر می باشد ولی اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت ($P<0/05$). با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، تکنیک دات الیزا می تواند به عنوان یک روش غربالگری کیست هیداتید برای نمونه های سرمی گاو و گاومیش توصیه گردد.

کلمات کلیدی: کیست هیداتید، نشخوارکنندگان، کشتارگاه، دات الیزا، PCR.

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 87 pp: 64-71

Comparison of the validity of different diagnostic methods in determining hydatidosis in larg ruminants

By: Yakhchali, M. Associated Professor of Parasitology division, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia –Iran (Corresponding Author; Tel: +989144463939) and Morshedi, A. Associated Professor of Immunology Division, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia –Iran.

Hydatidosis is caused by the larval stage (metacestode) of the tapeworm *Echinococcus granulosus*. The disease has a worldwide distribution and Iran is in the hyperendemic region. In the present study, the efficacy of Dot-ELISA and PCR tests for detecting hydatid cysts was investigated. Blood samples and samples from liver and lung were collected from a number of 256 cattle and 132 water buffaloes. Soluble antigen was obtained from hydatid cyst fluids (HCFs) and protoscolices (Px) using concentration and sonication procedures. Anti HCFs and Px were provided from rabbits immunized with soluble antigens. For molecular analysis, DNA was extracted from tissue samples and a 688 bp fragment of nda1 gene was amplified. Necropsy findings indicated that lung and liver hydatid cyst infection was 18.4% for cattle and 8.3% for water buffaloes. Results of Dot-ELISA test showed that 22.7% of cattle and 11.8% of water buffaloes were seropositive for hydatid cysts. Infection rate using molecular detection were 26.1% in cattle and 14.3% in water buffaloes. Using necropsy findings as gold standard test, sensitivity and specificity of Dot-ELISA was 81.01% and 95% for cattle, respectively. Whereas sensitivity and specificity was 77.12% and 96.32% for water buffaloes. Sensitivity and specifity of PCR test was 97.4% and 99.4% for examined cattle while these indexes were 91.2% and 99% for examined water buffaloes. Data analysis showed that there is no significant difference between these two technique ($P<0.05$). Based on result of this study, Dot-ELISA technique can be considered as one of the useful methods in the screening of hydatid cyst in cattle and water buffalo.

Keywords: Hydatid cyst, Ruminant, Necropsy, Dot-ELISA, PCR.

مقدمه

بیماری هیداتیدوز ناشی از رشد مرحله قبل از بلوغ= شکل عفونت زا= متاسستود E.granulosus در کبد، ریه و سایر اندام های بدن انسان، گاو، گوسفند، خوک، شتر و سایر میزبان های واسط است. این انگل با مشخصات بیولوژیکی خاص خود، توانایی بقاء و گسترش در تمام مناطق دنیا را دارد و از این جهت یک بیماری جهانی محسوب می شود (۲). ایران نیز در گروه مناطق هیپراندمیک هیداتیدوزیس می با شد (۱۷). بیماری در انسان از نظر جغرافیایی اکثرا محدود به مناطقی است که تماس مداوم بین سگ سانان اهلی و وحشی و علفخواران با انسان وجود دارد. زندگی چادرنشینی و عشایری (به دلیل پایین بودن سطح بهداشت)، افزایش تعداد احشام و پرورش گوسفند به روش سنتی، دسترسی سگ ها به امعاء و احشاء آلوده گاوها و گوسفندان کشتار شده و تلف شده و شکار در حیات وحش چرخه زندگی انگل را مداوم می سازد(۱). در بررسی های انجام گرفته در ایران متوسط آلودگی گاو ۱۰/۸۴-۶ درصد و گاومیش ۵۷/۷۶ درصد تعیین شده است (۴). در مطالعه دلیمی اصل و همکاران (۳) در کشتارگاه سنندج، میزان آلودگی و گاو به کیست هیداتید ۹/۴۹درصد گزارش گردیده است. یخچالی و غرقی (۷) میزان شیوع هیداتیدوزیس را در گاو ۵/۶۹ درصد در شهرستان بانه گزارش کردند. میزان آلودگی گاو و گاومیش به کیست هیداتیک در کشتارگاه ارومیه، به ترتیب، ۰/۸۹درصد (۶) گزارش شده است.

با توجه به اینکه تهیه نمونه مستقیم از بافت های آلوده میزبان زنده به متاسستود *E.granulosus* به سادگی میسر نمی باشد و نیز روش تشخیصی مطمئنی برای تشخیص آلودگی به کیست هیداتید وجود ندارد، از روش های سرم شناسی مختلفی به واسطه بروز پاسخ ایمنی مناسب در میزبان و حساسیت بالایی که دارند، استفاده می شود (۱۸). از میان روش های مختلف بکار گرفته شده در تشخیص سرم شناسی کیست هیداتید، هنوز جستجوی پادتن ضد پادگن های انگل روش مطمئن تری محسوب می شود (۲۲). از جمله آنها استفاده از روش الیزا برای شناسایی انواع پادگن های انگل در تشخیص سرولوژیکی کیست هیداتید حیوانات استفاده می شود. در گوسفندان آلوده، پادتن های ضد پادگن کیست هیداتید را به وضوح می توان بعداز ۴ تا ۶ هفته از عفونت نشان داد. مطالعات نشان داده است که بین پادگن ها و پادتن های حیوان آلوده با پادگن همولوگوس ارتباط معنی داری وجود دارد. Kanwar و Vinayak (۱۶) در مطالعاتی حساسیت و ویژگی الیزا را در تعیین سطح سرمی IgG و مقایسه ترکیبات مایع کیست هیداتید از جمله پادگن B فرآوری شده از مایع نشان داده اند. به طوری که این ترکیبات حساسیت بالایی نسبت به الیزا داشته اند.

امروزه تکنیک های تشخیص ملکولی امکان تشخیص انگل ها از جمله کیست هیداتید را به طور غیر مستقیم فراهم نموده اند. عمده مزیت این روش ها آن است که با تغییرپذیری ناشی از میزبان و محیط تشخیص دچار اشتباه نمی شود. زیرا تکنیک های ملکولی با حساسیت بالایی که دارند قادر به تکثیر میزان کمی از ژن های انگل می باشند

www.SID.ir

Archive of SID

(۲۴). به عنوان مثال، با استفاده از روش PCR می توان به جستجوی DNA تخم انگل، پروتواسکولکس و لایه لامینار کیست هیداتیک و نیز کرم بالغ *E.granulosus* نمود (۱۲). در این ارتباط تنوع ژنتیکی ژنوم میتوکندریایی و ریبوزومی *E.granulosus* بررسی شده است. به طوری که تعیین توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن های ریبوزومی ITS و میتوکندریایی NADAH دهیدروژناز تحت واحد ۱ (nda۱) و سیتوکروم اکسیداز تحت واحد ۱ (cox۱) به روش PCR کارایی قابل توجهی داشته است (۱۰). در ایران مطالعات کمی در خصوص آنالیز ملکولی DNA هسته ای، ریبوزومی و میتوکندریایی کیست هیداتید صورت گرفته است (۲۳). از جمله در مطالعات ملکولی کیست هیداتید از ناحیه ITS۱ مربوط به ژنوم DNA ریبوزومی و cox۱ و nad۱ مربوط به ژنوم DNA میتوکندریایی استفاده گردید (۱۳/۸ درصد). هدف از این مطالعه ارزیابی و مقایسه روش های دات الیزا و واکنش زنجیره ای پلی مراز در مقایسه با یافته های کشتارگاهی برای تشخیص کیست هیداتید گاو و گاومیش بود تا بتوان با استفاده از آن روش تشخیصی مناسبی را پیشنهاد نمود.

مواد و روش کار

نمونه برداری

رای تهیه پادگن و آنتی سرم از ۲۵۶راس گاو و ۱۳۲راس گاومیش قبل از کشتار نمونه برداری شد. پس از کشتار ضمن مشاهده و ملامسه دقیق اعضا مشکوک به آلودگی با کیست هیداتید (کبد، ریه، قلب، طحال و کلیه) موارد مثبت ثبت شدند. از گاو و گاومیش های کشتار شده نمونه های مورد نیاز برای تشخیص مولکولی نیز همزمان تهیه گردیدند.

تهیه سرم

پس از علامت گذاری دام، ۵ میلی لیتر خون از ورید وداج دام گرفته و بلافاصله در لوله آزمایش ریخته شد تا به آزمایشگاه منتقل شود. نمونه های خون تهیه شده سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) گردیدند و سرم ها در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تهیه پادگن محلول

پس از ضدعفونی سطح کبد و ریه، محتویات کیست های هیداتید جداگانه جمع آوری و سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور به مدت ۸ دقیقه) شدند. کیست های بارور و استریل با استفاده از روش ائوزین ۱درصد و مشاهده فعالیت سلول های شعله از همدیگر متمایز گردیدند (یخچالی و غرقی، ۱۳۸۵). سپس به هر نمونه از مایع کیست هیداتید ماده آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید[1] به میزان ۵ میلی مول اضافه شد (۲۷) و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای تهیه پادگن محلول، ابتدا مایع کیست هیداتید سانتریفوژ شده (۸۰۰۰ دور ۱۰ دقیقه) و مایع کیست هیداتید از رسوب حاوی پروتواسکولکس جدا گردید. مایع کیست هیداتید با استفاده از کیسه دیالیز و جریان هوا در هود استریل تغلیظ و در۴+ سانتی گراد نگهداری شد. برای تهیه پادگن از پروتواسکولکس، ۱۵ بار منجمد-ذوب شدند. سپس مخلوط توسط دستگاه سونیکاتور ۱۷۰ وات (Hielscher, Germany) به مدت ۲۰ دقیقه با فاصله ۱۰ ثانیه روشن ۵ ثانیه خاموش سونیکه شدند و با استفاده از میکروسکوپ نوری همگن شدن نمونه های کنترل گردید (۲۰). برای اندازه گیری پروتئین تام نمونه ها، از روش بیوره استفاده شد (۲۹) (جدول ۱).

تهیه آنتی سرم مایع کیست و پروتواسکولکس در خرگوش

به این منظور ۶ عدد خرگوش آزمایشگاهی جوان نژاد نیوزیلندی سفید انتخاب و درقفسه هایی جداگانه به مدت یک ماه با تغذیه به میزان کافی از سبزیجات و مواد کنسانتره نگهداری شدند. پنج عدد از این خرگوش ها برای تزریق ۵ نمونه پادگن و خرگوش ششم نیز به عنوان کنترل منفی که پادگن دریافت نکرده است، انتخاب شدند. در روز صفر، به روش زیر جلدی و با استفاده از سرسوزن فیلتردار (۰/۲۲ µm) به تفکیک به خرگوش ها ۰/۵ میلی لیتر از پادگن استریل حاوی یک میلی گرم پروتئین در هر میلی لیتر (تهیه شده از مایع کیست هیداتید بارور و عقیم و پروتواسکولکس کبد و ریه گاو و گاومیش) و ۰/۵ میلی لیتر ادجوانت فروند کامل تزریق گردید. به هر خرگوش نیز آنتی بیوتیک های پنی سیلین استرپتومایسین برای جلوگیری از عفونت های ثانویه و احتمالی و نیز ویتامین ب۱۲ و ب کمپلکس به منظور تقویت آنها تزریق گردید. تزریق دوم در روز دهم با استفاده از ۰/۵ میلی لیتر از پادگن استریل و ۰/۵ میلی لیتر ادجوانت فروند ناکامل صورت گرفت. تزریق سوم در روز ۳۰ با استفاده از ۰/۵ میلی لیتر از پادگن استریل و ۰/۵ میلی لیتر ادجوانت فروند ناکامل نجام گردید. در روز ۴۰ از هر خرگوش خون در شرایط استریل تهیه گردید (۲۷) (جدول۲).

دات الیزا با سرم خرگوش

۲۰میکرولیتر ار پادگن محلول مایع کیست هیداتید و پروتواسکولکس به تفکیک هر نمونه (۵ نمونه پادگن) هر نمونه بر روی دیسک های ورقه ای نیتروسلولوز لکه گذاری گردیدند تا به طور کامل خشک شوند. برای حذف باندهای غیراختصاصی، ۱۰۰ میکرولیتر بافر تریس حاوی ۰/۵ درصد توین ۲۰ را به دیسک ها افزوده و با ۱۰ دقیقه تکان دادن شستشو داده شدند. به هر دیسک ۱۰ میکرولیتر از سرم یک درصد خرگوشی ضد ۵ نمونه پادگن به تفکیک اضافه شد. پس از سه بار شستشو، نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه باقی ماندند. به دیسک ها ۱۰ میکرولیتر کونژوگه پراکسیداز ضد خرگوش (ساخت شرکت Sigma) رقیق شده در بافر رقیق کننده تجارتی به هر دیسک افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند.

سپس مجددا با بافر توین ۲۰ هر نمونه سه بار شستشو می شد. ۱۰ میکرولیتر از سوبسترا[2] OPD (ساخت شرکت Sigma) در هر دیسک ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه گذاشته شدند. بعد از ۱۵ دقیقه برای پایان دادن به واکنش بین سوبسترا و آنزیم کونژوگه، اسید سولفوریک ۰/۳مولار به دیسک ها افزوده شد. نمونه های مثبت در مقایسه با سرم کنترل منفی، ارزیابی شده و ثبت گردیدند (۱۱، ۱۴، ۱۵).

دات الیزا با سرم گاو و گاومیش

سرم های تهیه شده از ۲۵۶ راس گاو و ۱۳۲ راس گاومیش با

www.SID.ir

Archive of SID

پادگن های محلول تایید شده (روش۴) و کونژوگه پراکسیداز ضد گاو، به روش دات الیزا ارزیابی شدند.

روش مولکولی

استخراج DNA

از کبد وریه دام ها تحت مطالعه نمونه برئاری شد و هضم اولیه انجام شد. استخراج DNA با استفاده از کیت DNG (ساخت شرکت سیناژن) انجام شد.

روش تکثیر ژن nda۱

تکثیر ژن nda۱ با استفاده از کیت PCR Master Kit (ساخت شرکت سیناژن) درحجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر و در حضور کنترل انجام شد. پرایمرها با استفاده از توالی ژن nda۱ *E.granulosus* در بانک ژن و با استفاده از نرم افزار AmplifX۵ طراحی گردیدند (F-P۱:۵'-GTT-TTA-GGG-GAG-CGT-AAG-G-'۳ و R-P۲:۵'-CCA-ACA-TAC-CGA-TAA-AAC-CG-'۳). الگوی دمایی مورد استفاده در دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲دقیقه، دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد در ۴۵ ثانیه، آنیلینگ در ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، امتداد ۷۲ دناتوراسیون در مدت ۵۰ ثانیه و امتداد نهایی در ۷۲ دناتوراسیون به مدت۲ دقیقه انجام شد. محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵درصد الکتروفورز گردید. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، اندازه قطعه تکثیر یافته در مقایسه با مارکر مشخص شد.

ارزیابی آماری

از آزمون آماری t با سطح اطمینان ۹۵درصد برای مقایسه نسبت ها میان روش های تشخیص دات الیزا و واکنش زنجیره ای پلی مراز با یافته های کشتارگاهی استفاده گردید (نرم افزار SPSS). حد معنی داری برای این آزمون $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

از ۲۵۶ راس گاو و ۱۳۲ راس گاومیش ۱۸/۴درصد از گاوها و ۸/۳درصد از گاومیش ها پس از کشتار آلوده به کیست هیداتید بودند (جدول۳). نتایج دات الیزا پادگن های مایع هیداتید و پروتواسکولکس با سرم خرگوشی ضد هیداتید در رقت های ۱ به ۵۰ و ۱ به ۱۰۰ سرمی واکنش سرمی مثبت به همراه داشت که نتایج در مورد هر دو رقت کاملاً یکسان بودند. موارد مثبت سرمی به روش دات الیزا برای گاو ۲۲/۷درصد و گاومیش ۱۱/۸درصد بود. با توجه به موارد مثبت کاذب ۴/۳درصد در نمونه های سرمی گاو و ۳/۵درصد در نمونه های سرمی گاومیش، ارزش تشخیصی روش دات الیزا با حساسیت ۸۱/۰۱درصد و ویژگی ۹۵درصد برای نمونه های سرمی گاو بود. ارزش این روش تشخیصی برای نمونه های سرمی گاومیش با حساسیت ۷۷/۱۲درصد و ویژگی ۹۶/۳۲درصد تعیین گردید(جدول ۴). در مطالعه مولکولی، برای ژن nda۱ در هر نوع دام مبتلا به هیداتیدوزیس باند مشترک ۶۸۸ bp بدست آمد (تصویر ۱). تعداد موارد مثبت آلودگی برای گاو ۲۶/۱ درصد و برای گاومیش ۱۴/۳درصد بود (جدول ۴). در گاومیش، ارزش تشخیصی روش مولکولی با حساسیت ۹۱/۲درصد و ویژگی ۹۹درصد بود. در حالیکه حساسیت و ویژگی تشخیص مولکولی کیست هیداتید گاو به ترتیب ۹۷/۴درصد و ۹۹/۴ درصد بود.

بحث

روش های مختلفی برای تشخیص کیست هیداتید بر اساس جستجوی پادتن ابداع شده است. در این ارتباط می توان به تست ثبوت عامل مکمل، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، لاتکس آگلوتیناسیون و الیزا اشاره نمود. از میان روش های سرم شناسی، روش الیزا دارای حساسیت بالایی بوده و برای جستجوی پادتن ضد کیست هیداتید روش غربالگری مناسبی گزارش شده است (۱۴، ۱۹، ۲۵). Rafiei و همکاران (۲۲) نیز روش الیزا را یکی از روش های مناسب برای تشخیص هیداتیدوزیس در مناطق اندمیک عنوان کردند. در این مطالعه، یافته های کشتارگاهی به عنوان آزمون استاندارد برای مقایسه واکنش زنجیره ای پلی مراز و آزمون سرمی دات الیزا در تشخیص کیست هیداتید گاو و گاومیش بود. به طوری که با توجه به یافته های کشتارگاهی در تکنیک مولکولی ۰/۸درصد گاومیش ها و ۰/۵درصدگاوها به اشتباه آلوده به کیست هیداتید گزارش شدند (مثبت کاذب) (جدول۳). این میزان برای آزمون دات الیزا در مقایسه با یافته های کشتارگاهی، ۴/۳ درصد گاو ها و ۳/۵درصد گاومیش ها آلوده ثبت شدند. حساسیت و ویژگی این روش ها تا حدودی با موارد گزارش شده همخوانی دارد. به طوری که Sibihi و همکاران (۲۶) با استفاده از این نوع پادگن ها حساسیت و ویژگی آزمون را به ترتیب ۹۵ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش کرده اند. Baba و همکاران (۹) نیز گزارش کرده اند که دات الیزا با حساسیت ۸۲/۹۵درصد نسبت به سایر روش های تشخیص کیست هیداتید حساس تر است. در گزارش Hadighi و همکاران (۱۴) حساسیت و ویژگی به ترتیب ۹۷ درصد و۹۷/۳۳ درصد بود. Dalimi-asl و همکاران (۱۱) نیز در بررسی مقایسه ای تکنیک های تشخیص کیست هیداتید میزان حساسیت الیزا را ۱۰۰ درصد و ویژگی آن را ۹۹/۵درصد گزارش کردند.Rafiei و همکاران (۲۲) حساسیت ۹۰/۲درصد را برای تشخیص پادتن ضد پادگن B به روش الیزا گزارش نمودند. تفاوت ۴/۳درصد سرم مثبت در گاو و گاومیش به روش دات الیزا نسبت به موارد کیست هیداتید مثبت کشتارگاهی ثبت گردید (مثبت کاذب). موارد مثبت کاذب عمدتا به دلیل آلودگی کرمی زیاد در بین جمعیت های دامی (۲۱) و واکنش های متقاطع با پادگن های سایر انگل ها به ویژه تنیاها می باشد که از عمده ترین مشکلات تشخیص سرم شناسی کیست هیداتید است (۲۸). در این مطالعه نیز واکنش های متقاطع به صورت واکنش رنگی ضعیف تری در دات الیزا مشاهده گردید. موسوی و همکاران (۵) در مطالعه سرولوژیک عفونت تجربی هیداتیدوزیس گوسفند، روش الیزا را با استفاده از مایع کیست هیداتید گاو نیز یک روش آزمایشگاهی سریع و حساس غربالگری گزارش نموده اند. البته حساسیت و ویژگی روش دات الیزا به ترکیب و غلظت پادگن جمع آوری شده بستگی دارد (۱۵). یافته های دات الیزا در آزمایشگاه های مختلف تا حدودی متفاوت بوده است. هر قدر پادگن مورد استفاده در دات الیزا خالص تر باشد، نتایج نیز اختصاصی تر خواهد

www.SID.ir

Archive of SID

جـدول ۱- مقادیـر پروتئین تام مایع کیسـت هیداتیـد و پروتواسـکولکس نمونه های مورد آزمایش

نمونه	عضوآلوده	پروتئین تام (mg/ml)	نوع دام
پروتواسکولکس	ریه	۱۴/۵	گاو
مایع هیداتید بارور	ریه	۱۵/۳	گاومیش
مایع هیداتید عقیم	ریه	۱۳/۲	گاومیش
مایع هیداتید بارور	کبد	۱۲/۸	گاو
مایع هیداتید عقیم	کبد	۱۴/۴	گاو

بـود (۱۱). روش تهیه پادگن، اختلافات سـویه ای انگل، محل تشـکیل کیسـت، وضعیت بالینی میزبان و نوع کیسـت مـی توانند در یافته های تشـخیصی هیداتیدوزیس موثر باشـند (۳۰). در مطالعه حاضر، مقایسه یافته های آزمون سـرمی به روش دات الیزا با روش تشـخیص مولکولی نشـان داد که حساسـیت و ویژگی آزمون دات الیزا کمتر می باشـد ولی اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت ($P<0/05$). البته علی رغم دقت بسـیار بالای روش های مولکولی هنوز هم این روش تشـخیصی به دلیل مشکلات تهیه نمونه های بافتی از دام زنده به ویژه به تعداد زیاد، نیاز به تجهیزات پیشـرفته و هزینه زیاد به صورت بالینی چندان کار بردی نمی باشـد. علاوه بر آن در مقایسه با روش تشخیص مولکولی، روش دات الیزا از محاسـن تکنیکی مختلفی برخوردار است. از جمله قابلیت اجرا در دام زنده، ماندگاری پادگن به مدت طولانی، آسانی روش و قابلیت انجام تعداد بیشـتری واکنش در مدت زمان کوتاه اسـت. همچنین دات الیزا به دلیل قابـل اجرا بودن در دمای محیط، در آزمـون های میدانی روش کاراتری نسـبت به روش های مولکولی می باشـد (۱۴). بنابراین با توجه به یافته های این مطالعه، می توان روش دات الیزا را برای تشـخیص موارد سرمی مشکوک و یا آشکار کردن پادتن ضد هیداتیدوزیس در گاو و گاومیش در درمانگاه و یا مزرعه به عنوان یک روش غربالگری توصیه نمود.

جدول ۲-تزریق پادگن های مایع کیست هیداتید گاو و گاومیش به خرگوش آزمایشگاهی برای تهیه آنتی سرم

زمان تزریق (روز)			شماره خرگوش	پادگن	عضو	دام
صفر۱	۲۱۰	۳۳۰	۱	پروتواسکولکس	ریه	گاو
صفر	۱۰	۳۰	۳	مایع هیداتید بارور	ریه	گاومیش
صفر	۱۰	۳۰	۴	مایع هیداتید بارور	کبد	گاو
صفر	۱۰	۳۰	۵	مایع هیداتید عقیم	ریه	گاومیش
صفر	۱۰	۳۰	۶	مایع هیداتید عقیم	کبد	گاو

۱ادجوانت فروند کامل ۲ ادجوانت فروند ناکامل

جدول ۳- یافته های کشتارگاهی گاو و گاومیش های خونگیری شده

نوع دام	تعداد دام (راس)	تعداد دام آلوده (راس)	عضو آلوده (درصد)		آلودگی توام (درصد)
			کبد	ریه	
گاو	۲۵۶	۴۷	۳۱	۱۴	۱۹
گاومیش	۱۳۲	۱۱	۷	۴	۵
جمع کل	۳۸۸	۵۸	۳۸	۱۸	۲۴

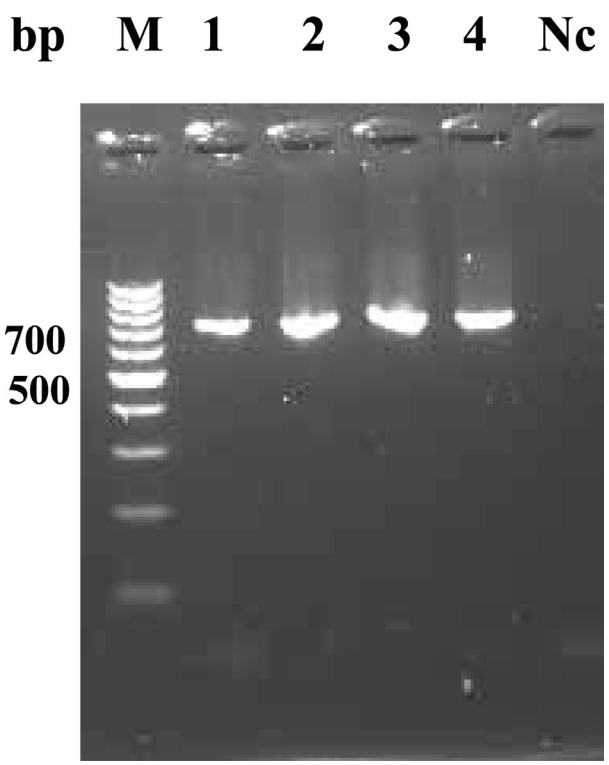
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- نتایج دات الیزا و تشخیص مولکولی در مقایسه با یافته های کشتارگاهی کیست هیداتید در گاو و گاومیش

نوع دام (راس)	دات الیزا(درصد)		مولکولی(درصد)		کشتارگاه (درصد)	
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
گاو (۲۵۶)	۲۲/۷	۷۷/۳	۱۸/۹	۸۱/۱	۱۸/۴	۸۱/۶
گاومیش (۱۳۲)	۱۱/۸	۸۸/۲	۹/۱	۹۰/۹	۸/۳	۹۱/۷

تصویر ۱- محصول PCR با تکثیر ژن nda۱ *E.granulosus* : گاو(۱ و ۲) و گاومیش(۳ و۴)، کنترل منفی (Nc) و مارکر bp plus ۱۰۰ (M).



www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه با کد ۸۵/د/۰۰۱ اجرا گردید. از همکاری آقای آقاپور و آقای فرهنگ پژوه کارشناسان گروه پاتوبیولوژی و آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه مراتب قدردانی و تشکر را داریم.

پاورقی ها

1- Phenylmeltyl sulforyl fluoride (PMSF)

2- O-Phenylendiamine dihydrocholovide

منابع مورد استفاده

۱- اسلامی علی؛ حسینی، ح. (۱۳۷۵). گزارش درباره آلودگی های کرمی لوله گوارش سگهای گله در ایران، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۳۳، صفحه ۸۵-۸۴.

۲- اسلامی، علی (۱۳۷۶). کرم شناسی دامپزشکی: سستودها، انتشارات دانشگاه تهران، جلد دوم، صفحه ۱۹۰-۱۵۰.

۳- دلیمی اصل، ع. ح.، قمری، ز. و قبله، ف. (۱۳۸۵). وضعیت اپیدمیولوژیکی اکینوکوکوزیس/ هیداتیدوزیس دامی در شهرستان ارومیه، مجله پژوهش و سازندگی، دوره ۱۹، شماره ۲ ، صفحه ۸۱-۷۶ .

۴- سعیدی، ف. (۱۳۷۰). درمان دارویی کیست هیداتیک در انسان . سمینار سراسری کیست هیداتیک در استان لرستان، صفحه ۳۶-۳۰ .

۵- موسوی، ط.، معتمدی، غ. ر.، اخویزادگان، م. ع.، ظریف فرد، م. ر. و اسدی، ن. (۱۳۸۴). تشخیص سرولوژیک عفونت تجربی هیداتیدوزیس در گوسفند با روش الایزا، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره۵، شماره۱، صفحه ۱۴۰-۱۹.

۶-قبادی، ک. و یخچالی، م. (۱۳۸۲). بررسی میزان آلودگی کرمی کبد گاومیش و خسارت اقتصادی حاصل از آن در کشتارگاه ارومیه، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره۵۸، شماره۱۹، صفحه۲۰-۱.

۷- یخچالی، م. و غرقی، ب. (۱۳۸۵). بررسی میزان شیوع هیداتیدوزیس در نشخوارکنندگان کشتار شده در شهرستان بانه (استان کردستان) در سال ۱۳۸۰، مجله دامپزشکی ایران، شماره۱۲، صفحه ۹۵ -۸۸.

8- Ahmadi, N. and Dalimi, A. (2006). Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. *Infect. Genet. Evol*. 6: 85–90.

9- Baba, H., Messedi, A., Masmodi, S., Zribi, M. and Sahnoun, Y. (1994). Diagnosis of human hydatidosis: comparision between imagery and six serologic techniques. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 50: 64-68.

10- Bowles, J., Blair, D. and MacManus, D.P. (1992). Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol*. 54:165–174.

11- Dalimi-asl, A., Madani, R., Ghorbankhani, D. and Salami, S. (2000). Comparative evaluation of serodiagnostic techniques in cystic hydatidosis. *Archives of Razi Institute*. 52: 43-49.

12- Dyachenko, V., Pantchev, N., Gawlowska, S., Globokar, M.V. and Bauer, Ch. (2008). *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Vet. Parasitol*. 157(3-4): 244-253.

13- Fasihi Harandi, M., Hobbs, R.P., Adams, P.J., Mobedi, I., Morgan-Ryan, U.M. and Thompson, R.C.A. (2002). Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. Parasitol. 125:367–373.

14- Hadighi, R., Mirhadi, F. and Rokni, M.B. (2003). Evaluation a dot-ELISA for the serodiagnosis of human hydatid disease. *Pak. J. Med. Sci*. 19 (4): 268-272.

15- Irabuena, O., Nieto, A., Ferriera, A.M., Batisstoni, J. and Ferragut, G. (2000). Charactrization and optimizing of bovine *Echinococcos granulosus* cyst fluid to be used in immunodiagnosis of hydatid disease by ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 42(5): 255-262.

16- Kanwar, J.R. and Vinayak, V.K. (1992). The significance free immune-complex hydatid specific antigen (s) as immunodiagnostic tool for human hydatidosis. *J. Med. Microbiol*. 37 (6): 396-403.

17- Mehrabani, D., Oryan, A., Sadjjadi, S.M. (1999). Prevalence of Echinococcus granulosus infection in stray dogs and herbivores in Shiraz, *Iran. Vet. Parasitol*. 86: 217–220.

18- Moro, P.L., Garcia, H.H., Gonzales, A.E, Bonilla, J.J., Verastegui, M. and Gilman, R.H. (2005). Screening for cystic echinococcosis in an endemic region of Peru using portable ultrsonography and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay. *Parasitol. Res*. 96 (4): 2442-246.

19- Motamedi, G.R., Abshar, N. and Paykari, H. (2001). Comparision of ELISA and Agar gel diffusion techniques in diagnosis human hydatidosis. *Archives of Razi Institute.* 51: 85-91.

20- Munoz, C., Nieto, A., Gaya, A., Martinez, J. and Vives, J. (1986). New experiments criteria for optimization of solid phase antigen concentration and satiability in ELISA. J. *Immunol. Methods*. 94: 137-144.

21- Njeruh, F.M. and Gathuma, J.M. (1987). Serodiagnosis of Hydatidosis in livestock by the indirect hemaglutination (IHA) and the enzyme-linled immunosorbant assay (ELISA). *Bulletin Animal health and Production Africa.* 35:124-129.

22- Rafiei, A., Jahanshahi, A. and Talaeizadeh, A. (2008). Evaluation of specific IgG antibody detection in diagnosis and post surgical monitoring of cystic echinococcosis. *Iranian J. Parasitol*. 3(2):10-14.

23- Rostami Nejad1, M., Nazemalhosseini Mojarad, E., Nochi1, Z., Fasihi Harandi, M. Cheraghipour, K. Mowlavi, G.R. and Zali, M.R. (2008). Echinococcus granulosus strain differentiation

www.SID.ir

Archive of SID

27- Taherkhani, H. and Rogan, M.T. (2000). General characterization of laminated layer of *Echinococcus granulosus. Iranian J. Med. Sci.* 25 (3-8): 95-104.

28- Taghipour, N., Bandepour, M., Pazoki, R., Haghighi, A., Nazari Pouya, M.R. and Kazemi, B. (2009). Subcloning and expression of recombinant *Echinococcus granulosus* antigen B, in Pqe-30 expression vector. *Iranian J. Parasitol.* 4(4):1-9.

29- Vrela-Diaz, V.M. and Coltorti, E.A. (1976). *Techniques for the immunodiagnosis of human hydatidosis.* Series of Scientific and Technical Monographs. Argentina. Pan American Zoonoses Centeral Publication. pp.: 554-557.

30- Zhang, W., Li, J. and McManus, D.P. (2003). Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin. Microbiol. Rev*. 16:18-36.

in Iran based on sequence heterogeneity in the mitochondrial 12SrRNA gene. *J. Helminthol*.4: 1–5.

24- Sharbatkhori, M., Kia, E.B., Fasihi Harandi, M., Jalalizand, N., Zahabiun, F. and Mirhendi, H. (2009) Comparison of five simple methods for DNA extraction from Echinococcus granulosus protoscolices for PCR amplification of ribosomal DNA. *Iranian J. Parasitol.* 4(2):54-60.

25- Sibihi, Y., Janssen, D. and Osuna, A. (1996). Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods. Diagn. *Microbiol. Infect. Dis*. 24 (4): 205-211.

26- Sibihi, Y., Rmiqui, A., Rodrigues, T.A. and Osuna, A. (2001). Comparative sensivity of six serological tests and diagnostic value of ELISA using purification antigen in hydatidosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 15 (1): 14-18.

www.SID.ir