مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۲، ۱۱۹- ۱۱۳
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,2:113-119, 2013

طراحی یک روش سریع برای تشخیص کیست هیداتیک در گوسفند

صدیقه جعفری بهنام مشگی* فاطمه جالوسیان
گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ آذر ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۲۸ فروردین ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: استفاده از یک آزمون سریع و مقرون بصرفه برای تشخیص هیداتیدوز بعنوان بیماری مشترک بین انسان و حیوان می تواند بسیار مفید باشد. **هدف:** هدف از بررسی حاضر طراحی و بکارگیری نوعی روش سریع در تشخیص هداتیدوز بوده است. **روش کار:** دو نوع آنتی ژن مایع خام و آنتی ژن هموژنیزه پروتواسکولکس تهیه و الگوی الکتروفورتیک آنها توسط الکتروفورز با سدیم دودسیل سولفات تعیین شد. برای تهیه سرم هیپرایمیون از خرگوش بعنوان حیوان آزمایشگاهی استفاده گردید. سرم های ایمن بعد از تهیه توسط الایزا نقطه ای آزمایش شدند. جهت انجام روش Dipstick از کاغذ نیتروسلولز بعنوان بستر استقرار آنتی ژن ها استفاده شد و لکه گذاری آنتی ژن در بخش بالایی نوارهای کاغذی انجام گرفت. از فسفات بافرسالین و سرم خرگوش بترتیب بعنوان کنترل منفی و نرمال استفاده شد. هر نوار بطور مجزا در سرم تحت آزمایش (به نسبت ۱/۱۰۰) بمدت هفت دقیقه قرار گرفت و بعد از شست و شو برای هفت دقیقه به آنتی بادی گونژوکه انتقال یافت. در پایان نوار برای ۲ دقیقه به سوبسترای دی آمینوبنزیدین منتقل شد و نتیجه با رنگی شدن محل استقرار آنتی ژن مشخص گردید. **نتایج:** بررسی نتایج الگوی الکتروفورتیک دو آنتی ژن تهیه شده از کیست هیداتیک نشان داد در آنتی ژن مایع خام کیست ۱۵ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۹kDa تا ۱۳۰ و در الکتروفورز آنتی ژن پروتواسکولکس ۹ باند با وزن مولکولی ۲۵kDa تا ۹۰ وجود دارد. در طراحی روش سریع برای شناسایی سرم های ایمن بهترین نتیجه با رقت سرمی ۱/۱۰۰ و از نظر آنتی ژن غلظت ۱/۱۰ برای آنتی ژن پروتواسکولکس و غلظت ۱/۲۰ برای آنتی ژن مایع دیده شد. **نتیجه گیری نهایی:** می توان از آزمون سریع Dipstick بعنوان یک روش ایمونولوژیک مناسب در تشخیص بیماری هیداتید استفاده کرد، با این وجود بمنظور افزایش ویژگی آزمون تحقیقات بیشتری در مورد بهره گیری از آنتی ژن های اختصاصی باید انجام پذیرد.

واژه های کلیدی: کیست هیداتیک، روش Dipstick، آنتی ژن مایع، آنتی ژن پروتواسکولکس

مقدمه

یکی از مهمترین معظلات هیداتیدوز نبود علائم کلینیکی واضح و در نتیجه پیچیدگی های خاص در تشخیص مبتلایان است. اگر چه روش های سرمی مختلف نظیر: الایزا، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، ایمونوبلات، رادیوایمونواسی، ایمونوالکتروفور، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و لاتکس آگلوتیناسیون جهت تشخیص کیست هیداتیک مورد استفاده قرار می گیرد (۸،۱۰،۱۱)، ولی تعدد و تنوع آنتی ژن های کیست هیداتیک که حداقل شامل مایع، دیواره و پروتواسکولکس (بدون در نظر گرفتن آنتی ژن های دفعی ترشحی و آنتی ژن های مربوط به انکوسفر و کرم بالغ) هستند، از طرفی وجود سویه های مختلف کیست هیداتیک سبب شده است تا سیمایی مختلف، بخصوص از جنبه های اپیدمیولوژی، علائم و تشخیص بیماری را شاهد باشیم و در نتیجه هر روشی از مزایا و معایبی مختص به خود برخوردار خواهد بود (۵). اگر چه در انسان دو نوع رهیافت تشخیص شامل روش های پرتونگاری و روش های سرمی مورد استفاده قرار می گیرند ولی در دام ها روش های کشتارگاهی و در مرحله بعد سرولوژیک بیشتر استفاده می شوند (۴).

در انتخاب یک آزمون برای تشخیص هیداتیدوز باید یک سری نکات مورد توجه قرار گیرد. از جمله حساسیت و ویژگی آزمون، سهولت دسترسی به آن، هزینه های مربوط به آزمایش و موارد مثبت و منفی کاذب، مسائلی از قبیل تنوع در به کارگیری آزمون، کیفیت آنتی ژن، مشخصات جمعیت بیمار و ابتلا به سایر بیماریها باعث پیدایش تغییراتی در حساسیت و ویژگی آزمون می شود. برخی آزمون ها از جمله الایزا، لاتکس آگلوتیناسیون، ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم در تشخیص آنتی بادی های ضد ۱کینوکوکوس از حساسیت بالایی برخوردارهستند (۴،۸).

از طرفی یک بیمار اعم از انسان یا حیوان ممکن است با یک آزمون منفی و با آزمونی دیگر مثبت تلقی گردد. پس برای افزایش حساسیت باید از چندین روش تشخیصی استفاده کرد. در تشخیص هیداتیدوز، آزمون هایی که بر پایه شناسایی آنتی بادی می باشند نسبت به آزمون هایی که مبنای تشخیص آنها شناسایی آنتی ژن هایی مثل آنتی ژن ۵ است از حساسیت بیشتری برخوردارند (۵).

تشخیص سریع و اولیه عفونت در انسان اهمیت زیادی دارد، زیرا مداخله سریع علاوه بر اینکه باعث پیشرفت اساسی در کنترل و درمان بیماری می شود، می تواند حتی میزان شیوع را کاهش دهد. در سال های اخیر تلاش های بسیار زیادی جهت پیشگیری و کنترل بیماری انجام گرفته

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۷۰-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: bmeshgi@ut.ac.ir

است و در این میان دستیابی به روش‌های دقیق تشخیص ایمونولوژیک از اهمیت زیادی برخوردار بوده است، به‌خصوص که تشخیص این بیماری با روش‌های انگل‌شناسی به علت عدم دسترسی به عناصر انگلی عملی نمی‌باشد، همچنین یافتن روشی مناسب جهت پیشگیری از ابتلای دام‌ها منجر به کاهش کلی بیماری در میزبان‌های واسط و نهایی شده و شرایط را برای کنترل آن مهیا می‌سازد (۵،۱۸).

با توجه به استفاده از آزمون‌های سریع (Rapid test) در تشخیص بیماریها، که بطور روزافزونی در حال تکامل و پیشرفت هستند، در این پژوهش سعی گردید، یکی از روش‌های سرمی سریع برای تشخیص هیداتیدوز که به جرات یک معضل بهداشتی توصیف می‌گردد طرح‌ریزی شود و بدین منظور دو آنتی‌ژن مایع و پروتواسکولکس کیست هیداتیک در روش Dipstick تحت ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

بررسی حاضر با هدف بکارگیری روش Dipstick در تشخیص هیداتیدوز و استفاده از دو آنتی‌ژن مختلف در چندین مرحله به‌شرح زیر انجام گرفت:

تهیه آنتی‌ژن: جهت تهیه آنتی‌ژن از کیست هیداتیک گوسفند که در بازرسی کشتارگاهی تهیه شده بود استفاده گردید، بدین منظور بعد از انتقال کیست‌ها به آزمایشگاه مایع آنها استخراج شد و به منظور جداسازی پروتواسکولکس، به مدت ۵ دقیقه در ۴/۰۰۰ دور تحت سانتریفوژ قرار گرفت.

آنتی‌ژن مایع خام بعد از دیالیز مایع کیست توسط کیسه دیالیز (ساخت سیگما) تهیه شد. آنتی‌ژن هموژنیزه پرتواسکولکس با فریز و ذوب کردن و سونیکه کردن (۱۵۰W و۱۰ثانیه) پرتواسکولکس‌ها و سپس سانتریفوژ نمونه در ۱۳/۰۰۰ دور برای ۲۰ دقیقه در $4^{o}C$ و برداشت مایع رویی به عنوان آنتی‌ژن، پس از ۱۸ساعت در $4^{o}C$ تهیه شد.

همه آنتی‌ژن‌های تهیه شده بعد از تعیین غلظت به‌روش برادفورد به میزان ۵۰µL در هر میکروتیوب و جهت استفاده در مراحل بعدی در فریز $-20^{o}C$ تحت نگهداری قرار گرفت (۶).

تعیین الگوی پروتئینی آنتی‌ژن‌ها: به‌منظور تعیین الگوی پروتئینی آنتی‌ژن‌های تهیه شده از SDS-PAGE براساس روش لاملی استفاده گردید (۱۲).

تهیه سرم هیپرایمیون: از پنج خرگوش که برای تهیه سرم هیپرایمیون استفاده شد، دو خرگوش با آنتی‌ژن مایع و ۲ خرگوش با آنتی‌ژن پروتواسکولکس کیست هیداتیک تحت تزریق زیر جلدی قرار گرفتند. تزریق اول با غلظت ۰/۵mg/mL به همراه ادجوانت کامل فروند و تزریق دیگر در فاصله زمانی ۱۰ روز و با غلظت ۵۰٪ با ادجوانت ناقص انجام گرفت. به یک خرگوش هم بعنوان کنترل آب مقطر استریل تزریق شد. در پایان از حیوانات تحت تجربه خونگیری بعمل آمد و سرم مربوط بعد از تهیه تا زمان استفاده در $-20^{o}C$ نگهداری گردید.

الایزای نقطه‌ای: برای انجام آزمون الایزا نقطه‌ای غشا نیتروسلولز به اندازه ۱×۱cm بریده شد و ۲µL از دو نوع آنتی‌ژن تهیه شده به همراه کنترل شامل آنتی‌ژن تیلریا آنولاتا بر روی هر گوشه کاغذ انتقال یافت. مرحله مسدودسازی با شیر خشک بدون چربی ۳٪ در محلول فسفات‌بافرسالین حاوی ۰/۵٪ توئین ۲۰ بمدت ۱ ساعت انجام گرفت. پس از ۳ بار شست‌وشوی غشا آنرا بمدت ۱ ساعت در آنتی بادی اولیه و بعد از شست‌وشوی مجدد (در ۳ نوبت و هر بار ۱۰ دقیقه) برای ۱ ساعت به آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی گونژوکه با پراکسیداز به نسبت ۱ به ۱۰۰۰) انتقال داده و پس از شست‌وشوی نهایی از سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین به همراه ۱۰µL پراکسیدهیدروژن ۳۰ ٪ جهت مشخص شدن لکه رنگی در محل واکنش استفاده گردید.

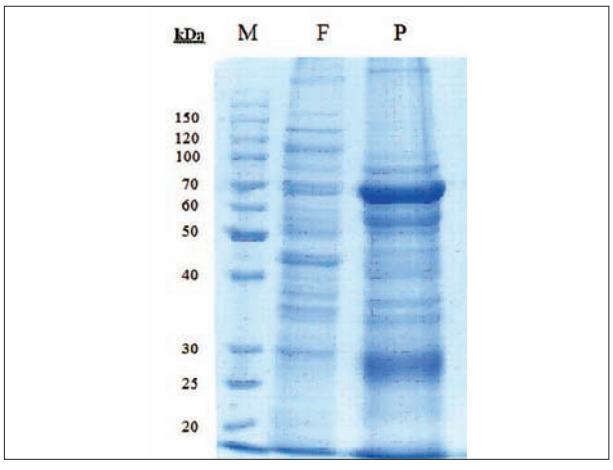
بکارگیری روش Dipstick: برای بکارگیری روش سریع از دو آنتی‌ژن مایع و پروتواسکولکس استفاده گردید. در روش Dipstick کاغذ نیتروسلولز بصورت نوار مانند در ابعاد ۶cm×۰/۶ تهیه شد و در قسمت بالایی کاغذ آنتی‌ژن مورد نظر به میزان ۱µL لکه‌گذاری گردید، در بخش پایینی از فسفات‌بافرسالین بعنوان کنترل منفی و از سرم گوسفند عاری از آلودگی بعنوان کنترل مثبت استفاده شد و بر روی کاغذ مستقر گردید. نوارهایی که بدین طریق تهیه شدند بعد از خشک شدن در حرارت آزمایشگاه هر نوار بطور مجزا در سرم تحت آزمایش (به نسبت ۱/۱۰۰) بمدت هفت دقیقه قرار گرفت و بعد از ۵ بار شست‌وشو در PBS حاوی توئین ۲۰، برای هفت دقیقه به آنتی‌بادی گونژوکه گوسفند (ساخت سیگما به نسبت ۱/۱۰۰۰) انتقال یافت. در مرحله پایانی بعد از شست‌وشوی نهایی، نوار به مدت ۲ دقیقه به سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین منتقل شد. قرائت نتایج با رنگی شدن محل استقرار آنتی‌ژن مشخص گردید.

نتایج

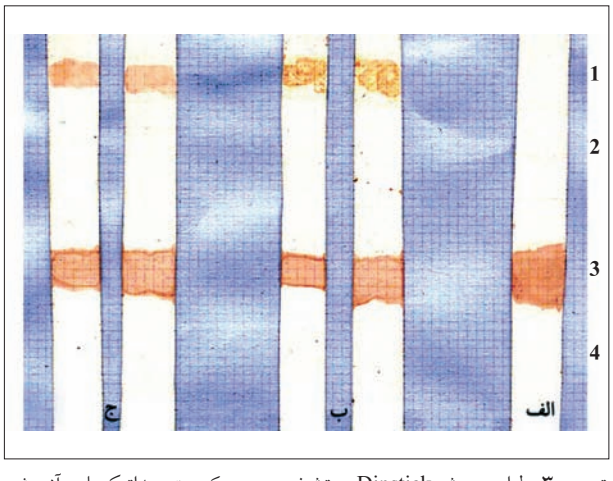
در تصویر ۱ الگوی پروتئینی دو آنتی‌ژن تهیه شده از کیست هیداتیک نشان داده شده است. در بررسی الگوی الکتروفورتیک آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک که توسط روش SDS-PAGE انجام گرفت حدود ۱۵ باند پروتئینی در محدوده ۲۹ kDa تا ۱۳۰ وجود داشت (ستون F).

در ستون P (تصویر ۱) الگوی پروتئینی آنتی‌ژن پروتواسکولکس ملاحظه می‌شود که شامل ۹ باند با وزن مولکولی ۲۵kDa تا ۹۰ است.

بمنظور بررسی وضعیت ایمن‌سازی خرگوش‌ها از روش الایزانقطه‌ای استفاده گردید. اگر چه این آزمون در غلظت‌های مختلف هر دو آنتی‌ژن و هر دو سرم هیپرایمیون با توجه به تیتراسیون سرمی و همچنین در مورد سرم کنترل انجام گرفت ولی در این باب به تصویر مربوط به آزمایش آنتی‌ژن پروتواسکولکس در رقت‌های مختلف سرم ایمن اکتفا می‌شود که در تصویر ۲ قابل مشاهده است.



تصویر ۱. الگوی الکتروفورتیک آنتی‌ژن‌های مایع (F) و پروتواسکولکس (p) کیست هیداتیک و استاندارد وزن مولکولی (M).



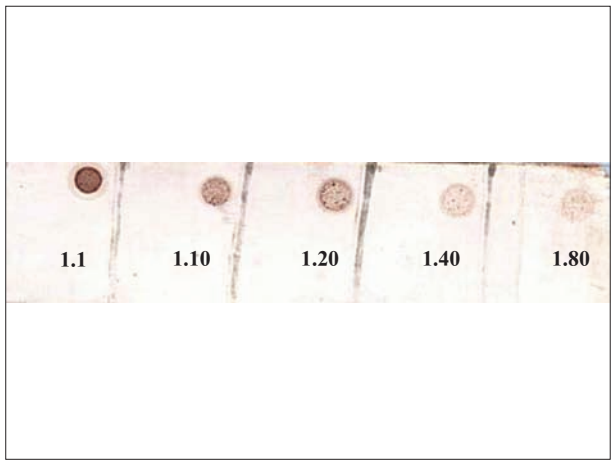
تصویر ۳. طراحی روش Dipstick در تشخیص سریع کیست هیداتیک با دو آنتی‌ژن مایع (ج) و پروتواسکولکس (ب) در برابر سرم هیپرایمیون و کنترل (الف)، ۱: آنتی‌ژن مایع، ۲: آنتی ژن پروتواسکولکس، ۳: کنترل مثبت، ۴: کنترل منفی.

قرائت نتایج آزمون الایزا نقطه‌ای که با رنگی شدن محل استقرار آنتی‌ژن‌ها قابل مشاهده است، نشان می‌دهد که در مدل حیوانی تحت تجربه به‌نحو مطلوبی علیه آنتی‌ژن‌های تزریقی آنتی‌بادی مربوط ساخته شده است و لذا می‌توان از این نمونه‌های سرمی در آزمون‌های بعدی استفاده کرد.

بهترین پاسخ در رقت ۱/۱۰۰ سرم هیپرایمیون دیده شد، در مورد آنتی‌ژن‌ها، غلظت ۱/۱۰ آنتی‌ژن پروتواسکولکس و ۱/۲۰ آنتی‌ژن مایع برای ادامه بررسی و استفاده در روش Dipstick در نظر گرفته شد.

روش Dipstick: همانطور که در روش کار هم توضیح داده شد، در بررسی حاضر از روش Dipstick بعنوان یک روش سریع برای تشخیص کیست هیداتیک استفاده گردید و قرائت نتایج براساس ایجاد واکنش رنگی مایل به قهوه‌ای در محل قرارگیری آنتی‌ژن صورت گرفت. در تصویر ۳ چگونگی بکارگیری و قرائت نتایج در این روش نشان داده شده است.

همانطور که در تصویر ۳ ملاحظه می‌شود، در قسمت ج در بالای نوار



تصویر ۲. آزمایش الایزانقطه‌ای با استفاده از غلظت‌های مختلف آنتی ژن پروتواسکولکس در مجاورت سرم هیپرایمیون (۱ به ۱۰۰).

آنتی‌ژن مایع (با غلظت ۱/۲۰) و به‌ترتیب در زیر آن از سرم نرمال خرگوش بعنوان کنترل مثبت و در پایین نوار از PBS بعنوان کنترل منفی تست استفاده شده است. قسمت ب همانند بخش قبلی است ولی آنتی‌ژن پروتواسکولکس در بالای نوار قرار گرفته است. نتیجه آزمایش در این دو بخش با سرم مربوط و با حضور واکنش کاملاً مشخص در محل استقرار آنتی‌ژن (همچنین کنترل مثبت) همراه است. در این روش بمنظور کنترل سرمی از سرم خرگوش نرمال استفاده شده است که نتایج آن در قسمت الف مشاهده می‌شود. قابل ذکر است که در این قسمت نمونه‌های ۱ و ۲ به‌ترتیب آنتی‌ژن مایع و پروتواسکولکس و نمونه‌های ۳ و ۴ کنترل مثبت و منفی تست می‌باشند و مشخص است که در نمونه کنترل سرمی با آنتی‌ژن واکنشی صورت نگرفته است.

بحث

بنابر اعتقاد Tsang و Wilkins در سال ۱۹۹۱ بدون تردید یکی از مهمترین معضلات برنامه‌های کنترلی بیماریهای انگلی، که از مرگ و میر و ابتلا بالایی برخوردارند، محدود بودن ابزار، مواد و روش کار برای تشخیص زودرس، سریع و مؤثر است که به موازات آن برنامه‌های درمانی هم از توانمندی لازم برخوردار نخواهند بود (۱۹)، علاوه بر موارد فوق Mamuti و همکاران در سال ۲۰۰۲ از دیگر دلایل عدم توفیق این برنامه‌ها را تأخیر بین جمع‌آوری و آزمایش نمونه‌ها می‌دانند، لذا در کل باید مجموعه‌ای از عوامل مدیریت بهداشتی، نمونه‌گیری، آزمایشگاهی، تشخیصی و ... را مسبب این رخداد مهم دانست (۱۳). بر این اساس در بررسی حاضر با استفاده از سرم هیپرایمیون خرگوش، طراحی یک روش آسان و سریع در تشخیص این بیماری تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

این تحقیق اگر چه در آنتی‌ژن مایع خام کیست هیداتیک ۱۵ باند پروتئینی وجود داشت ولی پنج باند با وزن مولکولی kDa ۷۰،۴۵،۳۵،۲۹ و ۱۱۵ مشخص‌تر بودند. Simsek و Koroglu در سال ۲۰۰۴ در بررسی مایع

کیست هیداتیک ۶ باند با وزن مولکولی kDa ۹۸،۶۸،۵۸،۴۵،۲۹ و ۱۱۶ را شناسایی کردند که حداقل در ۴ باند (با وزن مولکولی ۴۵،۲۹ و حدود kDa ۷۰ و ۱۱۵) با این بررسی مشترک هستند (۱۷). در این مورد اگر چه اساس استفاده از مایع کیست هیداتیک در تشخیص هیداتیدوز وجود دو آنتی‌ژن B و ۵ است ولی پلی‌مورفیسم بالایی که در آنتی ژن B دیده می‌شود، ممکن است استفاده از آن را برای تشخیص هیداتیدوز پیچیده سازد (۷).

اگر چه یکی از شایع‌ترین منابع آنتی‌ژنی برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد هیداتیک استفاده از آنتی‌ژن مایع است ولی Swarna و Parija در سال ۲۰۰۸ در ارزیابی آنتی‌ژن‌های مایع، پروتواسکولکس و دیواره کیست هیداتیک برای تشخیص هیداتیدوز انسانی توسط روش الایزانقطه‌ای، استفاده از آنتی‌ژن پروتواسکولکس و دیواره کیست را هم مناسب دانستند (۱۸). در بررسی حاضر در الکتروفورز آنتی‌ژن پروتواسکولکس ۹ باند پروتئینی با وزن مولکولی بیش از kDa ۲۵ تا ۹۰ وجود داشت.

در ادامه این تحقیق بمنظور طراحی یک آزمون سریع در تشخیص کیست هیداتیک از روش Dipstick استفاده شد. این روش شباهت زیادی به الایزا نقطه‌ای دارد و همانند آن اساس آزمایش بر ایجاد واکنش رنگی استوار است، ولی برای انجام این روش فقط به ۲۰-۱۵ دقیقه (در برابر ۵-۴ ساعت در روش معمول الایزا نقطه‌ای) زمان نیاز است. اولین بار این روش توسط Pappas در سال ۱۹۸۶ به‌عنوان یک روش تغییر یافته و اصلاح شده‌ای از الایزا نقطه‌ای که بر پایه استقرار آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی بر یک بستر جامد است، استفاده شد (۱۴). بعد از آن Allan و همکاران در سال ۱۹۹۳ از آن برای تشخیص آنتی‌ژن‌های مدفوعی در آلودگی با گونه‌های مختلف تنیا استفاده کردند (۱).

Rogan و همکاران در سال ۱۹۹۱ حساسیت ۹۴٪ و ویژگی ۹۰/۵٪ را برای الایزا نقطه‌ای به عنوان یک روش مزرعه‌ای (فیلد) گزارش کرد (۱۵)، همچنین بنا بر مطالعه Romia و همکاران در سال ۱۹۹۲ حساسیت و ویژگی این روش در تشخیص هیداتیک به ترتیب ۸۸/۹٪ و ۹۶/۹٪ می‌باشد. البته براساس این تحقیقات روش الایزا نقطه‌ای برای تشخیص آنتی‌ژن‌های جاری در خون از حساسیت کمی (۵۵/۶٪) برخوردار بوده که می‌تواند به علت حجم کم این آنتی‌ژن‌ها در خون یا سرم باشد (۱۶).

روش مورد استفاده در این بررسی بعد از تحقیقات PaPas در سال ۱۹۸۶ و Alan و همکاران در سال ۱۹۹۳ توسط Van Etten و همکاران در سال ۱۹۹۴ برای شناسایی آنتی‌ژن شیستوزوما در ادرار مبتلایان به شیستوزومیاز و سپس توسط Sherbiny در سال ۱۹۹۶ جهت تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی در گونه‌های شیستوزوما تحت بررسی و ارزیابی قرار گرفت (۱،۲،۱۴،۲۰)، ولی Sherbiny و همکاران در سال ۲۰۰۴ از این روش برای تشخیص تریشینوز و هیداتیدوز انسانی استفاده کردند (۳). محققین اخیراً حساسیت و ویژگی روش Dipstick را برای تشخیص هیداتیدوز انسانی ۱۰۰٪ و ۹۱/۴٪ گزارش کردند. در خصوص وجود اختلاف در یافته‌های بدست آمده بویژه در میزان حساسیت باید به دو عامل اصلی توجه داشت که بررسی Sherbiny و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی سرم‌های انسانی صورت گرفته است و از سویی در تحقیق آنها از آنتی‌ژن مایع خام کیست هیداتیک شتر استفاده شده است (۳).

در بررسی پیش‌رو از خرگوش بمنظور تامین سرم هیپرایمن استفاده شد، آزمایش سرم‌های بدست آمده توسط روش الایزا نقطه‌ای موید تیتر بالای سرمی از حیث آنتی‌بادی‌های ضدهیداتید بود. در ادامه دو سرم ایمن برای آنتی‌ژن مایع و دو سرم برای آنتی‌ژن پروتواسکولکس و یک سرم کنترل برای انجام آزمون در نظر گرفته شد. باید توجه داشت که در آزمون الایزا نقطه‌ای مشخص شد که غلظت ۱/۲۰ آنتی‌ژن پروتواسکولکس و ۱/۴۰ آنتی‌ژن مایع با بهترین پاسخ همراهند، ولی هنگامی که این غلظت‌های آنتی‌ژنی در روش سریع مورد استفاده قرار گرفت، نتایج قابل قرائت نبود، لذا از غلظت ۱/۱۰ آنتی‌ژن پرتواسکولکس و غلظت ۱/۲۰ آنتی‌ژن مایع استفاده شد که براحتی هم نتایج قابل ارزیابی بود.

در هیداتیدوز انسانی پاسخ مثبت کاذب در افرادی ایجاد می‌شود که مبتلا به کیست نبوده ولی در آزمون مثبت تشخیص داده می‌شوند. این مشکل عمدتاً در روش‌هایی دیده می‌شود که از پادگن کامل مایع کیست استفاده می‌کنند همچنین در موارد آلودگی به سایر بیماریهای انگلی، بعضی سرطان‌ها، سیروز کبدی، کیست‌های غیرانگلی و حالاتی که سیستم ایمنی دچار دگرگونی شده است نیز رخ می‌دهد. غیراختصاصی بودن آزمون نیز ممکن است باعث پاسخ مثبت کاذب شود (۵،۶).

در مواردی ممکن است سرم آلوده در ضمن آزمایش شناسایی نشود که تحت عنوان پاسخ منفی کاذب مطرح است و هنگامی پدید می‌آید که در بیمار، آنتی‌بادی قابل تشخیص وجود نداشته باشد. عواملی نظیر محل کیست، کامل بودن و سالم بودن آن در پیدایش پاسخ منفی کاذب موثرند. در انسان تنها حدود ۶۶ ٪ بیماران مبتلا به کیست هیداتیک از نظر آنتی‌ژن ۵ مثبت هستند و این مقدار در بیمارانی که دارای کیست ریوی از نوع هیالن می‌باشند، کمتر از ۵۰٪ است. به طور کلی کیست‌های کبدی پاسخ ایمنی بیشتری را نسبت به سایر اندام‌های مبتلا ایجاد می‌کنند و کیست‌های ریوی هیالن موجب کمترین حساسیت آزمون در تشخیص می‌شوند. کیست‌های کاملاً سالم کمترین واکنش ایمنی را موجب می‌شوند و افراد مبتلا به این نوع کیست‌ها از نظر سرمی منفی خواهند بود. کیست‌های مسن، کلسیفیه شده و کیست‌های نابود شده باعث منفی شدن پاسخ آزمون‌های سرمی می‌شوند. کیست‌های موجود در مغز و طحال مانند کیست‌های ریوی، تحریک ایمنی کمتری را باعث می‌شوند. سوراخ یا پاره شدن کیست موجب تحریک دستگاه ایمنی و افزایش ترشح آنتی‌بادی‌ها می‌شود. برخی گزارشات حاکی از آن است که حساسیت سرمی در کودکان کمتر از بزرگسالان است. تفاوت در ارتباط بین میزبان و سویه انگل نیز در پاسخ ایمنی و تشخیص سرمی مؤثر است. مثلاً

سویه وحشی شمالی اکینوکوکوس گرانولوزوس اغلب در ریه قرار می‌گیرد و رشد کمتری نسبت به سویه معمولی اهلی دارد و در نتیجه پاسخ ایمنی آن نیز کمتر است (۶،۹).

در پایان خاطر نشان می‌سازد که اگر چه روش مورد استفاده در بررسی حاضر سریع و بدون نیاز به تجهیزات خاص آزمایشگاهی و مواد اختصاصی، قابلیت انجام در شرایط غیر آزمایشگاهی (فیلد) را هم دارد ولی لازم است که اولاً این روش با نمونه‌های سرمی میزبان‌های با آلودگی طبیعی در دام و انسان آزمایش شود، همچنین با توجه به اهمیت آنتی‌ژن B در تشخیص هیداتیدوز بجای بهره‌گیری از آنتی‌ژن خام و به منظور افزایش کارایی آزمون این آنتی‌ژن خالص‌سازی شده و مورد استفاده قرار گیرد و در ادامه بررسی‌های تکمیلی از زیرواحدهای این آنتی‌ژن با اولویت پروتئین‌های با وزن مولکولی ۸kDa و ۱۶ استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از قطب علمی "بوم سازگان و تغییرات ساختاری کرم‌ها" بدلیل حمایت‌های علمی و مالی که در جهت انجام پژوهش مورد نیاز بوده است، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Allan, J.C., Mencos, F., Garcia, J., Sarti, E., Flisser, A., Wang, et al. (1993) Dipstick dot ELISA for the detection of Taenia coproantigen in humans. Parasitology. 107: 79-85.
2. Al Sherbiny, M. (1996) Field applicable method for detection of antibodies to schistosoma species and genus specific antigens using dipstick. J Egypt Soc Zool. 20: 81-97.
3. Al Sherbiny, M., Abd-Al Farrag, M.K., Fayad Mohamed, H., Makled Mohamed, K., Tawfeek Gihan, M., Ali Nehad, M.S. (2004) Application and assessment of a dipstick assay in the diagnosis of hydatidosis and trichinosis. Parasitol Res. 93: 87-95.
4. Biava, M.F., Annedao, M.D. (2000) Laboratory diagnosis of cystic hydatic disease. World J Surg. 25: 10-14.
5. Bouree, P. (2001) Hydatidosis: dynamics of transmission. World J Surg. 25: 4-9.
6. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the qiantitation of microgram quantitive protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
7. Carmena, D., Martinez, J., Bentio, A., Ouisantes, J.A. (2004) Characterization of excretory-secretory products from protoscolecs of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. Parasitology. 129: 371-378.
8. Doiz, O., Benito, R., Sbihi, Y., Osuna, A., Clavel, A., Gomez-Lus, R. (2001) Western blot applied to the diagnosis and post-treatment monitoring of human hydatidosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 41: 139-142.
9. Eckert, J., Deplazes, P. (2004) Biological, epidemiological and clinical aspects of echinococ-cosis, a zoonosis of increasing concern. Clin Microbiol Rev. 17: 107-135.
10. Kilic, S., Babur, C., Taylan, O.A. (2007) Comparison of the results of indirect hemagglutinatin and ELISA methods for the cases prediagnosed as hydatid cyst disease. Microbiol Bull. 41: 571-577.
11. Kittelberger, R., Reichel, M.P., Okeele, J.S. (2002) Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies in sheep infected with *Echinococcus granulosus*. Vet Parasitol. 110: 57-76.
12. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
13. Mamuti, W., Yamasaki, H., Saka, Y., Nakao, M., Lightowlers, M.W., Ito, A. (2002) Usefulness of hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic echinococcosis in human. Clin Lab Immunol. 9: 573-576.
14. Pappas, M.G. (1986) Rapid serodiagnosis of parasitic infections by Dot-ELISA using dipsticks. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 80: 1006.
15. Rogan, M.T., Craig, P.S., Zeyhle, E. (1991) Evaluation a rapid of Dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 85: 773-777.
16. Romia, S.A., Youssef, M.E., Handoussa, A.E. (1992) Dot-ELISA as a diagnostic test in hydatid disease. J Egypt Soc Parasitol. 22: 603-610.
17. Simsek, S., Koroglu, E. (2004) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid disease in sheep. Acta Trop. 92: 17-24.
18. Swarna, S.R., Parija, S.C. (2008) DOT-ELISA for evaluation of hydatid cyst wall, protoscoleces and hydatid cyst fluid antigens in the serodiagnosis of

cystic echinicoccosis. Rev Inst Med Trop Sant Paulo. 50: 233-236.
19. Tsang, V.C.W., Wilkins, P.P. (1991) Immunodiagnosis of schistosomiasis screen with FAST-ELISA and confirm with immunublot .Clin Lab Med. 11: 1029-1039.
20. Van Etten, L., Floman, C.C., Eggelte, T.A., Kremsner, P.G., Deelder, A.M. (1994) Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip. J Clin Microbiol. 32: 2404-2406.

Designing a rapid test to diagnose the ovine hydatid cyst

Jafari, S., Meshgi, B.*, Jalousian, F.

Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,University of Tehran, Tehran-Iran

(Received 8 December 2012 , Accepted 16 April 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Using a rapid and cost benefote test for diagnosing of hydatidosis, a zoonotic, can be beneficial as a diagnostic. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to design and assess the performance of a dipstick method for diagnosting of cystic echinococcosis. **METHODS:** Hydatid cyst fluid antigens and homogenized antigens of protoscolex were prepared and its electrophoretic pattern was determined by SDS-PAGE. Afterthen, for providing the hyperimmune serum, rabbits were injected by hydatid cyst fluid and protoscolex antigens along with complete freund adjuant and then incomplete freund adjuant. The immune sera were evaluated by dot ELISA. Dipstick was prepared based on nitrocellulose paper as solid phase and coated with antigens which were dotted in the upper surface of the nitrocellulose strip. PBS was used as negative control and rabbit sera non-infected were used as positive control. As a negative control the lower part of the strip was coated by PBS. Each strip was floated in the serum (1:100 dilution) for 7min, washed for 7min and floated in the second antibody 7min. Afterthen, they were washed and incubated in chromogen/substrate diaminobenzidin for 2min to show the coloured band at the site of coated antigen. **RESULTS:** Our findings revealed 15 protein fractions in fluid antigens and 9 protein band in protoscolex antigens at the range of 29-130 kDa and 25-90 kDa, respectively. Meanwhile, the protoscolex antigens at in 1:10 dilution and fluid antigens at in 1:20 dilution showed the best results to diagnose hyper immune serum of 1:10 dilution. **CONCLUSIONS:** This rapid Dipstick assay test can be considered as a suitable immunodiagnostic test for hydatid cyst disease; however further investigations should be done to improve its specificity through preparing highly purified antigens.

Key words: hydatid cyst, Dipstick, fluid antigen, protoscolex antigen

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Electrophoretic pattern of fluid (F) and protoscolex (P) antigens of hydatid cyst.

Figure 2. Dot-Elisa test by different concentrations of protoscolex antigen against hyperimmun serum (1:100 dilution).

Figure 3. Dipstick method for rapid diagnosis of hydatid cyst using fluid (c) and protoscolex (b) antigens against hyperimmun serum and negative control (a), 1- fluid antigen, 2- protoscolex antigen, 3- positive control, 4- negative control.

***Corresponding author's email: bmeshgi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117070, Fax: 021-66933222**