تشخیص کیست هیداتیک تجربی در گوسفند با بررسی وجود پادگن انگل در سرم و ادرار به روش کوآگلوتیناسیون

دکترمحمدحسین راضی جلالی[1] دکترمسعود قربانپور[1] دکترناصر حقوقی راد[1]* دکترصالح اسماعیل زاده[1] دکترلیلی نبوی[1] دکترعبداله رفیعی[2] دکترمحمدرحیم حاجی حاجیکلایی[1]

دریافت مقاله: ۲۲ تیرماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۱۰ آذرماه ۱۳۸۳

هدف: ارزیابی روش کوآگلوتیناسیون در تشخیص هیداتیدوزیس گوسفند با آزمایش سرم و ادرار.

نوع مطالعه: مطالعه تجربی.

حیوانات: ۲ قطعه خرگوش، ۳ قلاده سگ و ۱۹ رأس گوسفند.

روش: کبد و ریه‌های گوسفند دارای کیست هیداتیک از کشتارگاه اهواز تهیه شد. از مایع کیست هیداتیک سانتریفوژشده به دو قطعه خرگوش طی دو مرحله تزریق شد. پس از آن سرم هیپرایمن خرگوشها جمع‌آوری گردید. پروتواسکولکس‌های کیست‌ها پس از تعیین قدرت حیاتی به تعداد ۱۵/۰۰۰ به هر قلاده سگ خورانده شد. در عرض دو ماه کالبدگشایی سگها انجام شد و از روده باریک کرم‌های بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس جمع‌آوری و تخمها با له کردن بندهای بارور آزاد و شمارش شدند. به هر یک از ۱۳ رأس گوسفند مورد آزمایش تقریباً حدود ۲۰۰۰ تخم خورانده شد و ۶ رأس گوسفند دیگر بعنوان شاهد در شرایط کاملاً برابر با گوسفندان مورد آزمایش نگهداری شدند. هرهفته از تمام گوسفندان مورد آزمایش و شاهد خونگیری و هر دو هفته یکبار نمونه‌های ادرار تهیه شد. تمام نمونه‌ها پس از جمع‌آوری با روش کوآگلوتیناسیون مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: با انجام آزمایش کوآگلوتیناسیون معلوم شد که حساسیت این آزمایش در مورد سرم گوسفندان آلوده تا ۵ هفته صفر و از هفته ششم حدود ۲۳ درصد و در هفته‌های دوازدهم و سیزدهم ۱۰۰ درصد و در هفته‌های بعد به تدریج کاهش می‌یابد. ویژگی آزمایش ۱۰۰ درصد بوده است. آزمایش کوآگلوتیناسیون در روی ادرار گوسفندان فقط از هفته ششم در مورد برخی نمونه‌ها مثبت شد و به تدریج افزایش یافت تا آنکه در هفته ۱۲ به ۱۰۰ درصد رسید. سپس در هفته‌های بعد رو به کاهش نهاد. ویژگی این آزمایش روی ادرار گوسفندان شاهد نیز ۱۰۰ درصد بوده است.

نتیجه‌گیری: چنین به نظر می‌رسد که زمان ظهور و تشخیص پادگن‌های کیست هیداتیک در سرم و ادرار کم و بیش یکسان است. گرچه اخذ جواب مثبت ارزش بسیاری دارد ولی نتایج منفی نشانه عدم وجود کیست هیداتیک نمی‌باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۱۸-۲۱۳.

واژه‌های کلیدی: هیداتیدوزیس گوسفند، اکینوکوکوس گرانولوزوس، آزمایش کوآگلوتیناسیون.

بیماری کیست هیداتیک ناشی از اکینوکوکوس گرانولوزوس دارای انتشار جهانی است که هم از نظر بهداشتی و هم از جنبه اقتصادی حائز اهمیت فراوانی است (۳). در ایران نیز که به عنوان یکی از مناطق هیپرآندمیک معرفی شده است این

۱) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.
۲) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز - ایران.
*) نویسنده مسؤول: *hoghooghirad@yahoo.com*

Diagnosis of experimentally infected sheep hydatidosis through antigen detection in serum and urine, with coagglutination (Co.A) test

Razi Jalali, M.H.,[1] Ghorbanpoor, M.,[1] Hoghooghi Rad, N.,[1] Esmail Zadeh, S.,[1] Nabavi, L.,[1] Rafiei, A.,[2] Haji Hajikolaei, M.R.[3]

[1]Department of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahid Chamran, Ahwaz, Ahwaz-Iran. [2]Department of Mycology and Parasitology, Faculty of Medicine, University of Jundi-Shapur, Ahwaz, Ahwaz-Iran. [3]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahid Chamran, Ahwaz, Ahwaz-Iran.

Objective: To evaluate coagglutination test in the serum and urine of sheep for diagnosing of hydatidosis.

Design: Experimental study.

Animals: Two rabbits, three dogs and nineteen sheep.

Procedure: Ovine hydatid cysts from affected livers and lungs, were collected from Ahwaz abattoir (Khozestan province, Iran). The hydatid fluid (HF) and protoscolces were aseptically obtained in lab. Hydatid fluid was centrifuged and injected to rabbits in two steps. After then, rabbit hyperimmune sera were collected. Furthermore, each dog was given 15,000 viable protoscoleces. Less than two months later, dogs were autopsied after euthanasia and all *Echinococcus* granulosus worms were collected and their eggs were released. Almost, 2000 eggs were orally administred to each (N= 13). The six other sheep were kept as control. All sheep were bled each week and their urine samples were collected fortnight. All sera and urine samples were examined with coagglutination (Co.A) test.

Results: While sensitivity of coagglutination test, was nil during five weeks of post-infection (p.i.), its values showed a biphasic pattern. While, it increased up to 23% in the sixth week and after then up to 100% in the 12th and 13th week of p.i. it decreased in the following weeks. Specificity of test was 100% throughout the experiment. While examination of urine in the affected sheep resulted in positive reaction from 6th week of p.i, its sensitivity and the sensitivity gradually increased up to 100% at 12th week of p.i. Furthermore, specificity of the test for urine of non-infected sheep remained 100%.

Discussion: These results suggest that the time of appearance of hydatid antigens in serum and urine is approximately alike. While positive results are very valuable, negative ones do not rule out hydatidosis. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,3:213-218,2005.***

Keywords: sheep, hydatidosis, Echinococcus granulosus, coagglutination test.

Corresponding author's email:hoghooghirad@yahoo.com

بیماری هم در انسان و هم در حیوانات اهلی ضایعات و ضررهای بهداشتی و اقتصادی قابل توجهی بوجود می‌آورد (۱،۳). میزان آلودگی انسان در ایران ۱/۱۲ درصد هزار گزارش شده است (۱).

یکی از مسائل عمده بیماری هیداتیدوزیس تشخیص وجود کیست هیداتیک در انسان و حیوانات است. اگر چه تاکنون با انجام روشهای سرولژی متعدد نظیر هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA)(۱۸، ۱۵) الیزا (ELISA) و دات الیزا (ELISA Dot) و واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)(۷) که دارای حساسیت‌هایی بین ۸۵ تا ۹۵ درصد و ویژگی ۸۷ تا ۹۷ درصد می‌باشند با تعیین وجود پادتن متاسستد اکینوکوک در سرم افراد مبتلا و حیوانات موفق به تشخیص بیماری می‌شدند، اما کسب پاسخهای منفی کاذب در بیماران انسانی و حیوانی که حدوداً ۳ تا ۱۵ درصد است (۲۵، ۷، ۵) و حتی در منطقه شدیداً آلوده‌ای مانند تورکانا در کشور کنیا میزان آن به ۲۵ تا ۴۰ درصد می‌رسد (۶) محققین را بر آن داشت که برای تشخیص هیداتیدوزیس به مشخص کردن پادگن کیست هیداتیک نه تنها در سرم (۲۶، ۲۵، ۲۴، ۲۱، ۱۸، ۱۷، ۱۲، ۱۱، ۱۰، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴) بلکه در ادرار (۲۳، ۲۲، ۲۱) افراد مبتلا و حیوانات دارای هیداتیدوزیس با انجام روشهایی نظیر کوآگلوتیناسیون (۲۶، ۲۳، ۲۲، ۲۱) لاتکس آگلوتیناسیون (LAT)(۱۴، ۱۰) کانترایمنوالکتروفورزیس (CIEP)(۲۲، ۲۱) و دات الیزا (۲۷، ۱۸، ۶، ۵) اقدام نمایند. در مورد آلودگی به کرمهای دیگر نظیر متاسستد تنیا پی زیفرمیس با آزمایش سرم و مشخص کردن پادگن انگل به روش الیزا (۵) به تشخیص آلودگی دست می‌یابند. Ravinder و همکاران (۲۳) و Parija (۲۲، ۲۱) روش کوآگلوتیناسیون را با استفاده از استافیلوکوکوس اورئوس جهت شناسایی پادگن کیست هیداتیک در ادرار و سرم بیماران انسانی مبتلا به هیداتیدوزیس ابداع نمودند. براساس گزارش Ravinder و همکاران (۲۳) حساسیت این آزمایش در تشخیص پادگن کیست هیداتیک در ادرار بیمارانی که وجود کیست هیداتیک طی عمل جراحی به اثبات رسیده است ۴۳/۷۵ درصد و در سرم همین افراد ۸۱/۲۵ درصد بوده است. ویژگی آزمایش کوآگلوتیناسیون در مورد ادرار و سرم افرادی که سالم بودند به ترتیب از ۸۸ درصد تا ۱۰۰ درصد بوده است. Parija و همکاران در سال ۱۹۹۸ حساسیت این آزمایش را در تشخیص پادگن انگل در سرم بیماران دارای کیست هیداتیک ۹۵ درصد و ویژگی آنرا ۱۰۰ درصد گزارش کرده است (۲۲). دلیل اختلاف در تعیین حساسیت و ویژگی آزمایش کوآگلوتیناسیون را گات اشتین (۱۳) 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. از انجا که ارزیابی آزمایش کوآگلوتیناسیون در روی بیماران انسانی با محدودیت‌های فراوانی روبه رو است بدین جهت تصمیم گرفته شد مواد اولیه آزمایش مزبور تهیه و به آزمایش ادرار و سرم گوسفندانی که به‌طور تجربی به کیست هیداتیک آلوده می‌شوند اقدام گردد. بدیهی است که با اطلاع از شروع آلودگی و سیر رشد انگل در بدن گوسفند بهتر بتوان 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. سپس تعدادی کیست‌های هیداتیک کبد و ریه گوسفند از کشتارگاه اهواز جمع آوری و در آزمایشگاه مخلوط مایع و پروتواسکولکس‌های کیست در شرایط استریل جدا شد. سپس مخلوط مزبور سانتریفوژ شد تا مایع شفاف و روشن روی رسوب پروتواسکولکس‌ها در لوله‌های استریل ریخته شود. قدرت حیاتی پروتواسکولکس‌ها با استفاده از ائوزین ۱ درصد تعیین شد. پروتواسکولکس‌هایی که دارای قدرت حیاتی بیش از ۸۰ درصد بودند جدا و مطابق روش حسینی و همکاران به سگها خورانده شد(۲). پس از ۵ هفته آزمایش مدفوع سگها هر ۲ تا ۳ روز انجام می‌شد تا آنکه در هفته‌های ۶ و ۷ پس از آلودگی تخم تنیا در مدفوع مشاهده شد. در این زمان، سگها با تزریق دز بالایی از تیوپنتال سدیم آسان کشی شدند و سپس کالبدگشایی گردیدند. روده باریک سگها از لاشه‌ها جدا و با قیچی روده برباز شدند و در محلول نمکی هنکس به مدت ۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. کرمهای اکینوکوک آزاد شده در سرم فیزیولوژی نگهداری و سپس باله کردن بند بارور آنها تخمها آزاد گردیدند. شمارش تخمها انجام شد و تعداد تخم در هر میلی لیتر سرم فیزیولوژی تعیین شد.

۲- آلوده کردن گوسفندان: تعداد ۱۹ رأس گوسفند نژاد عرب از گروه دامپروری دانشکده کشاورزی واقع در ملاثانی اهواز که دارای سنین ۱۲-۶ ماه بودند خریداری شد. از این تعداد ۶ رأس بعنوان شاهد و ۱۳ رأس دیگر به عنوان گوسفندان مورد آزمایش در آغل‌های مجزا نگهداری شدند. به هر یک از گوسفندان مورد آزمایش تعداد ۲۰۰۰ تخم اکینوکوک با استفاده از لوله مری خورانده شد. گوسفندان مورد آزمایش و شاهد فقط تا ۱۶ هفته زنده نگه داشته شدند.

۳- نمونه برداری از گوسفندان: طی ۱۶ هفته نمونه‌های خون در گوسفندان شاهد و مورد آزمایش به‌طور هفتگی با استفاده از سرنگ دارای سرسوزن نمره ۱۸ از ورید وداج تهیه و سرم آنها جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. همزمان نمونه‌های ادرار همه گوسفندان به‌وسیله سوند ادرار هر دو هفته یکبار جمع آوری و در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

۴- تهیه سرم هیپرایمن از خرگوش: دو قطعه خرگوش بالغ انتخاب و به هر کدام یک میلی لیتر از مایع کیست هیداتیک جمع آوری شده مخلوط با یک میلی لیتر آدجوانت کامل فروند از راه عضلانی تزریق شد. شش هفته بعد یک میلی لیتر دیگر از مایع کیست هیداتیک این بار با یک میلی لیتر آدجوانت ناقص مخلوط و مانند دفعه قبل به هر خرگوش تزریق شد. عیار پادتن ضدمایع کیست هیداتیک در سرم خرگوش‌ها با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم تعیین می‌گردید(۱۵). زمانی که عیار پادتن به ۱/۲۰۴۸ رسید از خرگوش‌ها خونگیری شد و سرم جدا و با استفاده از سولفات آمونیوم خالص سازی شد. نمونه‌های سرمی خالص شده و سرم کامل خرگوش‌ها در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۵- تغلیظ ادرار: نمونه‌های ادرار اخذ شده از طریق ترسیب اتانل مطابق

روش Ravinder و همکاران (۲۰۰۰) تغلیظ گردیدند (۲۳).

۶ - **آزمایش کوآگلوتیناسیون:** مواد لازم برای انجام این آزمایش مطابق روش های Shariff و Parija، Parija و همکاران و Ravinder و همکاران بشرح زیر تهیه شد (۲۶، ۲۳، ۲۲):

الف- تهیه و جمع آوری باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای پروتئین A (SAPA): از سویه استاندارد این میکروب (Cowan's Strain 1) تحت عنوان SAPA در آگار مولر و هینتون کشت سفره‌ای به عمل آمد و پس از ۱۸ ساعت باکتری از سطح محیط کشت جمع آوری و در PBS سوسپانسیونی از آن تهیه که با دور ۳۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. رسوب سه بار با PBS محتوی ۰/۰۵ درصد آزید سدیم شستشو داده شد و سرانجام رسوب به‌دست آمده با فرمالدئید ۱/۵ درصد در PBS ثابت گردید و در دمای آزمایشگاه به مدت ۹۰ دقیقه نگهداری شد. پس از این مدت مجدداً سه بار شستشو داده شد و به ۱۰ برابر حجم رسوب از محلول PBS حاوی ۰/۰۵ درصد آزید سدیم اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. سپس دو بار شستشو انجام گردید و سرانجام با PBS حاوی ۰/۰۵ آزید سدیم سوسپانسیون ۱۰ درصد از SAPA تهیه گردید.

ب- حساس سازی میکروب SAPA: به ازای هر ده میلی لیتر از سوسپانسیون ۱۰ درصد باکتری یک میلی لیتر از سرم هیپرایمن خالص شده اضافه شد و مخلوط گردید. سپس به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و سپس با PBS یکبار شستشو داده و سرانجام سوسپانسیون ۲ درصد از باکتری در PBS محتوی ۰/۱ درصد آزید سدیم تهیه شد.

ج- روش انجام آزمایش: روی تعدادی از پلیت‌های شیشه ای که هریک دارای ۱۲ گودی می‌باشد آزمایش کوآگلوتیناسیون انجام می‌شد. درون هر گودی ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲ درصد SAPA حساس شده با سرم هیپرایمن خرگوش ریخته می‌شد و روی آن ۱۰ میکرولیتر از سرم گوسفند و یا ادرار تغلیظ شده ریخته و مخلوط می‌گردید. برای کنترل از سوسپانسیون ۲ درصد باکتری حساس نشده استفاده می‌گردید. در صورت مشاهده آگلوتیناسیون و تجمع ذرات در سوسپانسیون باکتری حساس شده تست مثبت تلقی می‌شد. در صورت ایجاد مایع یکنواخت نتیجه آزمایش منفی تلقی می‌شد.

نتایج

۱۳ گوسفند مورد آزمایش و ۶ گوسفند شاهد پس از ۱۶ هفته ذبح شدند. در گوسفندان مورد آزمایش کیست‌های متعددی بقطر چند میلیمتر تا حداکثر دو سانتیمتر عمدتاً در کبد و ندرتاً در ریه مشاهده شد که با نمونه برداری و تهیه مقاطع آسیب شناسی تشخیص کیست هیداتیک آنها محرز گردید. در هیچ یک از اعضای گوسفندان شاهد کیستی مشاهده نشد. با انجام آزمایش کوآگلوتیناسیون روی سرم گوسفندان دارای کیست هیداتیک معلوم شد که این آزمایش تا ۵ هفته پس از شروع آلودگی منفی است. سرم برخی از گوسفندان از هفته ششم به بعد مثبت گردیدند و فقط در هفته‌های دوازدهم و سیزدهم همه گوسفندان مورد آزمایش مثبت شدند (حساسیت ۱۰۰ درصد). از هفته چهاردهم به بعد از تعداد موارد مثبت کاسته شد به نحویکه در هفته شانزدهم فقط ۷۶ درصد گوسفندان مثبت شدند (جدول ۱).

جدول ۱ - نتایج آزمایش سرم گوسفندان دارای کیست هیداتیک باروش کوآگلوتیناسیون طی هفته‌ها پس از آلودگی

گوسفندان دارای کیست هیداتیک	هفته‌ها پس از آلودگی						
	۱ تا ۵	۶ تا ۷	۸ تا ۹	۱۰ تا ۱۱	۱۲ تا ۱۳	۱۴ تا ۱۵	۱۶
تعداد آزمایش شده	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳
تعداد موارد مثبت	۰	۳	۵	۱۲	۱۳	۱۲	۱۰
نسبت درصد (حساسیت آزمایش)	۰	۲۳	۳۸	۹۲	۱۰۰	۹۲	۷۶

جدول ۲ - نتایج آزمایش ادرار گوسفندان دارای کیست هیداتیک با روش کوآگلوتیناسیون طی هفته‌ها پس از آلودگی

گوسفندان دارای کیست هیداتیک	هفته‌ها پس از آلودگی						
	۲ تا ۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶
تعداد آزمایش شده	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳
تعداد موارد مثبت	۰	۳	۶	۱۲	۱۳	۱۲	۱۰
نسبت درصد	۰	۲۳	۴۶	۹۲	۱۰۰	۹۲	۷۶

آزمایش سرم خون گوسفندان شاهد، در تمام مدت بررسی مزبور (۱۶ هفته) منفی بوده است. به عبارت دیگر ویژگی این آزمایش ۱۰۰ درصد دیده شد.

آزمایش نمونه‌های ادرار گوسفندان دارای کیست هیداتیک با روش کوآگلوتیناسیون نشان داد که این آزمایش تا هفته چهارم و پنجم منفی است. از هفته ششم آزمایش برخی از نمونه‌های ادرار گوسفندان مثبت شد و در هفته دوازدهم آزمایش ادرار همه گوسفندان مورد آزمایش مثبت گردید (حساسیت ۱۰۰ درصد). سپس به تدریج موارد مثبت کاهش یافت به نحوی‌که در هفته شانزدهم ۷۶ درصد نمونه‌های ادرار گوسفندان مثبت گردید (جدول ۲). ضمناً ویژگی این آزمایش در مورد گوسفندان فاقد کیست هیداتیک (شاهد) ۱۰۰ درصد بوده است. بعبارت دیگر هیچ یک از نمونه‌های ادرار این گوسفندان طی ۱۶ هفته بررسی واکنش مثبت نشان نداد.

بحث

در هیچ یک از گزارشات موجود ارزیابی آزمایش کوآگلوتیناسیون در روی گوسفندان که به‌طور تجربی آلوده به کیست هیداتیک گردیده و زمان شروع آلودگی و دوره رشد متاسستد اکینوکوک مشخص باشد صورت نگرفته است. نتایج این آزمایش در روی سرم و ادرار چند بن گوسفندانی نشان داد که پادگن‌های متاسستد تقریباً همزمان در خون و ادرار حیوان ظاهر می‌شوند و قابل تشخیص‌اند. حساسیت آزمایش کوآگلوتیناسیون تا ۵ هفته اول چه در مورد سرم و چه در مورد ادرار صفر درصد است و بتدریج با رشد کیست‌ها در هفته ششم افزایش یافته و در هفته دوازدهم و سیزدهم ۱۰۰ درصد می‌گردد و سپس بتدریج

کاهش می‌یابد.

در کوآگلوتیناسیون میکروب استافیلوکوکوس اورئوس که حاوی پروتئین A می‌باشد به‌صورت ناقل پادتن‌های هیداتیک عمل می‌کند. پروتئین A به قسمت FCپادتن Gموجوددرسرم‌هیپرایمن خرگوش می‌چسبدوبدین ترتیب قسمتFabبرای چسبیدن به پادگن‌های متاسستداکینوکوک آزادهستند(۲۲).

Ravinder و همکاران (۲۳) حساسیت کوآگلوتیناسیون را در آزمایش سرم بیماران دارای کیست هیداتیک بمیزان ۸۱/۲۵ درصد و در آزمایش ادرار این افراد ۴۳/۷۵ درصد و Shariff و Parija (۲۶) حساسیت این تست را روی سرم افراد ۹۵ درصد و بالاخره Sadaka و همکاران (۲۴) حساسیت این آزمایش را روی ادرار کسانی که دارای کیست هیداتیک بودند ۱۰۰ درصد گزارش کرده‌اند. چنین بنظر می‌رسد که گزارش نسبت درصدهای متفاوتی از حساسیت این آزمایش مربوط به جمع آوری نمونه‌های خون و ادرار بیماران در زمانهای مختلف است، همان‌گونه که در بررسی حاضر در مورد گوسفندان دارای کیست هیداتیک مشاهده می‌شود. اساساً نتایج آزمایشات سرولوژی در تشخیص هیداتیدوزیس انسانی و حیوانی بخاطر عدم وجود علایم بالینی خاص و یا نشانه‌های اختصاصی اهمیت فراوانی دارند(۲۱).

عمده روشهای سرولوژی متداول بر مبنای مشخص کردن پادتن‌های متاسستد در سرم بیماران انسانی و یا حیوانات آلوده استوار است (۱۵، ۱۴، ۸، ۷) ولی در جایی‌که پاسخهای منفی کاذب به میزان ۳ تا ۱۵ و گاهی تا ۴۰ درصد وجود دارند (۸) جستجو برای مشخص کردن وجود پادگن‌های انگل در سرم و ادرار و بزاق افراد یا حیوانات مبتلا به هیداتیدوزیس احتمالا می تواند نقش واکنش‌های منفی کاذب را خنثی سازد (۲۷، ۲۵، ۲۰، ۱۸، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴). پادگن‌های انگل ناشی از مواد دفعی - ترشحی (ES) وقتی زیاد شوند با پادتن‌های اختصاصی تشکیل کمپلکس‌های ایمنی را می‌دهند که برای مدتی کوتاه در جریان خون باقی می‌مانند (۴) نتیجه آنکه آزمایشات حساس برای تشخیص پادتن متاسستد را منفی می‌سازند(۲۵). بنابراین شاید مشخص کردن کمپلکس‌های ایمنی و خصوصا پادگن‌های انگل در خون بتواند مشکل منفی‌های کاذب را حل کند بشرط آنکه پادتن وجود نداشته باشد (۸). Liu و همکارانش برعلیه پادگن‌های اختصاصی ۵ و B متاسستد اکینوکوکوس گرانولوزوس پادتن تک دودمانی (منوکلونال) تهیه کردند و سپس با روش الیزا برای تشخیص پادگن‌های موجود در خون افرادیکه دارای کیست هیداتیک بودند اقدام نمودند ولی تنها موفق به تشخیص ۱۹ درصد بیماران دارای کیست هیداتیک شدند. در نهایت محققین مزبور به این نتیجه رسیدند که وقتی می توان پادگن متاسستد را در سرم تشخیص داد که هم مقدار آن به‌اندازه قابل ملاحظه برسد و هم نوع آن قابل تشخیص باشد(۲۰). گات‌اشتین حتی مقدار پادگن متاسستد اکینوکوک موجود در سرم ۷ بیمار از ۲۱ بیمار دارای کیست هیداتیک به میزان ۶۸۰-۳۱۰ نانوگرم پروتئین در هر میلی لیتر سرم را مشخص کرد. وی مشاهده کرد که پس از عمل جراحی و برداشتن کیست‌ها مقدار پادگن موجود در سرم بشدت کاهش می‌یابد و نتیجه آزمایشات برای تشخیص پادگن‌های انگل منفی می‌شود و بدین ترتیب می‌توان از روی وجود یا عدم وجود پادگن‌های انگل نتیجه عمل جراحی را مورد ارزیابی قرارداد (۱۳).

ظهور پادگن‌های انگل بر حسب نوع انگل، میزبان و روش تشخیص آن متفاوت است. در خرگوشهایی که به‌طور تجربی به متاسستد تنیا پی زیفرمیس آلوده‌شدند پادگن‌های متاسستد ۴۸ ساعت پس از شروع آلودگی ظاهر و حداکثر تا دو هفته در خون قابل تشخیص بودند. کمپلکس‌های ایمنی زمانی در خون ظاهر شدند که پادتن‌های متاسستد در خون حضور داشتند. در عین حال پادتن‌های ضد انکوسفر و خصوصاً ضد متاسستد در خون پدیدار شدند و بتدریج از میزان پادگن‌های متاسستد کاسته شد (۵). Parija و همکاران(۲۲) با روش کانترایمونوالکتروفورزیس (CIEP) به تشخیص پادتن‌های کیست هیداتیک در ادرار بیماران پرداختند و توانستند حساسیت این آزمایش را در مورد بیماران دارای کیست هیداتیک ۴۳/۷۵ درصد و ویژگی آنرا بین ۹۲ تا ۱۰۰ درصد گزارش نمایند. Devi و Parija با استفاده از روش لاتکس آگلوتیناسیون (LAT) توانستند با تشخیص پادگن‌های موجود در مایع کیست هیداتیک با حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد کمک فراوان به جراحانی نمایند که با کشیدن مایع از درون کیست‌های موجود در اعضای مختلف بدن بیماران انسانی تردید آنها را در تشخیص کیست هیداتیک برطرف سازند(۱۰).

تشخیص کیست هیداتیک در انسان عمدتاً به‌وسیله روشهای تصویری نظیر رادیوگرافی، اولتراسونوگرافی و سی تی اسکن انجام می‌شود ولی حساسیت این روشها در ماههای ابتدایی تشکیل کیست کم بوده و از طرفی امکان اشتباه با سایر اختلالات نظیر آبسه و تومور همیشه در این روشها وجود دارد، از این رو انجام تستهای سرولوژی برای تشخیص سریعتر بیماری ضروری به نظر می‌رسد (۱۱، ۳). در بررسی حاضر صرف نظر از میزان حساسیت آزمایش کوآگلوتیناسیون در مراحل مختلف دوره رشد کیست هیداتیک در گوسفندان، میزان ویژگی آن ۱۰۰ درصد بوده است و همین امر ارزش تشخیص این آزمایش را افزایش می‌دهد. در مجموع در ایران تهیه مواد اولیه ارزان و انجام آن ساده و بسهولت توسط افرادی که حتی آموزش مختصری دیده باشند در مورد سرم و خصوصاً ادرار بیماران قابل اجرا است. در عین حال باید توجه داشت که بر اساس نتایج بررسی حاضر پاسخ منفی آن در آزمایش سرم و ادرار دلیل بر عدم وجود کیست نیست. بدین جهت توصیه می‌شود برای تشخیص قطعی کیست هیداتیک از مجموعه‌ای از آزمایشات سرولژی برای تشخیص پادگن‌ها، پادتن‌ها و حتی کمپلکس ایمنی در سرم و ادرار تهیه شده در نوبتهای مختلف استفاده کرد تا نتیجه قطعی عاید شود.

براساس تحقیقات انجام شده آزمایش‌های تشخیص پادگن‌های متاسستد و اکینوکوک وقتی مثبت می‌شوند که کیست هیداتیک فعال باشد چه در صورتی‌که کیست غیر فعال شود و یا با عمل جراحی برداشته شود نتیجه آزمایشات منفی خواهد بود(۲۲). متأسفانه در بررسی حاضر مدت نگهداری و آزمایش گوسفندان مورد آزمایش و شاهد فقط برای چهارماه (۱۶ هفته) برنامه ریزی شده بود چه در صورت نگهداری گوسفندان برای مدت طولانی، مشاهده تغییر حساسیت آزمایشات به هنگام غیر فعال شدن کیست به علت طبیعی و یا در نتیجه اثر مواد شیمیایی و جراحی و غیره امکانپذیر بود.

References

۱. اسلامی، ع. (۱۳۷۶): کرم شناسی دامپزشکی - سستدها - انتشارات دانشگاه تهران جلد دوم - شماره ۲۰۳۰/۲.

۲. حسینی، س. ح. (۱۳۷۴): تعیین سویه های اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایران. پایان نامه دکترای تخصصی انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره: ۲۷

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. Barbieri, M., Severi, M. A., Pirez, M. I., Battistoni, J., and Nieto, A. (1994): Use of specific antibody and circulating antigen serum level in the hydatid immunodiagnosis of asymptomatic population, Int. J.of Parasitol., 27, 7: 937-942.
5. Craig, P. S. (1984): Circulating antigens and antibodies and immune complexes in experimental Taenia pisiformis infections of rabbits. Parasitol., 89: 121-131.
6. Craig, P. S. (1986): Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. Para. Immunol., 8: 171-188.
7. Craig, P. S. (1997): Immunodiagnosis of *Echinococcus* granulosus and a comparison of techniques for diagnosis of canine ehinococcosis. Compendium on cystic echinococcosis Africa and in middle eastern countries with special reference to Morocco. Editor: F .L. Andersson. Brigham Young University, Provo, Ut. 84602, U. S. A.
8. Craig, P. S. and Nelson, G S. (1984): The detection of circulating antigen in human hydatid disease. Ann. Trop. Med. Parasitol., 78, 3: 219-227.
9. D'Amelio, R., De Rosa, F., Pontesilli, O., Dayal, R., Brighouse, G., Teggi, A., Barnet, M. and Lambert, P. H. (1989): Hydatid disease: analysis of parasite antigens in circulating immune complexes and in performed hydatid antigen-antibody complexes. Med. Microbiol. Immunol., 78: 177-186.
10. Devi, Chandsakesan, S., Parija, S. C. (2003): Latex-agglutination test (LAT) for antigen detection in the cystic fluid for the diagnosis of cystic echinococcosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 45, 2: 123-126.
11. Dottorini, S., Sparvoli, M., Bllucci, C. and Magnini, M. (1985): *Echinococcus* granulosus: diagnosis of hydatid disease in man.Ann.Trop.Med. Parastitol.,79,1:43-49.
12. El Zayyat, E. A., Ramzy, R. M., Abdel-Baki, M. H., Fahmi, I. A., Rifaat, M., Helmy, H.and Abdel Hameed, D.M. (1999): Human cystic ehinococcosis: diagnostic value of different antigenic fractions of hydatid cyst fluid with different specific immunoglobulin G subclasses blot. J. Egypt. Soc. Parasitol., 29, 3: 817-830.
13. Gottstein, B. (1984): An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 6: 1185-1191.
14. Hoghooghi, N., Sabbaghian, H., Ghadirian, E., Kagan, I.G. and Schiller, E. L. (1976): Evaluation of the slide - latex agglutination and intradermal (Casoni) tests for echinococcosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 35, 4: 660 - 661.
15. 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. Trop. Geogr. Med., 29, 2: 393 - 398.
16. Jenkins, P., Dixon, J. B., Rakha, N. K. and Carter, S. D. (1990): Regulation of Macrophagemediated larvicidal activity in *Echinococcus* granulosus and Mesocestoides corti (Cestoda) infection in mice. Parasitol., 100: 309-315.
17. Judson, D. G., Dixon, J. B., Clarkson, M. J. and Pritchard, J. (1985): Ovine hydatidosis: some immunological charactersitics of the seronegative host. Parasitol., 91: 349-357.
18. Kagan, I. G., Agosin, M. (1968): *Echinococcus* antigens. Bulletin of the World Health Organization (WHO)., 39: 13-24.
19. Kinder, A., Carter, S.D., Allan, J., Marshall-Clark, S. and Craig, P. S. (1992): Salivary and serum antibodies in experimental canine taeniasis. Vet.

Parasitol., 41: 321-327.

20. Liu, D., Rickard, M. D., Lightowlers, M. W. (1993): Assessment of monoclonal antibodies to *Echinococcus* granulosus Antigen 5 and Antigen B for detection of human hydatid antigens. Parasitol., 106: 75-81.
21. Parija, S. C. (1998): A review of some simple immunoassays in the serodiagnosis of cystic hydatid disease . Acta. Trop., 70: 17-24.
22. Parija, S. C., Ravinder, P. T. and Subba Rao, K. S. V. K. (1997): Detection of hydatid antigen in urine by countercurrent immunoelectrophoresis. J. Clin. Microbiol., 35, 6: 1571-1574.
23. Ravinder, P. T., Parija, S.C. and Subba Rao, K. S. V. K. (2000): Urinary hydatid antigen detection by coagglitination, a cost - effective and rapid test for diagnosis of cystic echinococcosis in a rural or field setting. J. Clin. Microbiol., 33,3: 2972-2974.
24. Sadaka, H. A., Khalifa, A. M., Eldein, S. Z., Taha, K. and Eldein, K. M. (2002): Urinary antigen detection for diagnosis of hydatid disease. J. Egypt. Soc. Parasitol., 32,1: 69-78.
25. Schantz, P. M. (1988): Circulating antigen and antibody in hydatid disease. N. Engl. J. Med., 318,22: 1469-1470.
26. Shariff, M., Parija, S. C. (1993): Co-agglictination (Co-A) test for circulating antigen in hydatid disease. J. Med. Microbiol., 38,6: 391-394.
27. Yang, Y., Zhang, J. Y.and Li, Y. G. (1993): Evaluation of detection of circulating antibody, circulating antigen and circulating immune complex in human hydatidosis. Chin. J. Para. Dis. 6,3: 195-197.