مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۴، ۳۲۶-۳۱۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,4:319-326, 2013

تشخیص آلودگی دیروفیلاریا ایمیتیس در سگ‌های شهری و روستایی اهواز با روش کانترایمونوالکتروفورز

محمد حسین راضی جلالی[1*] مسعود قربانپور[1] بهمن مصلی نژاد[2] رضا آویزه[2] علیرضا البرزی[1] مریم رهروانی[3]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران
۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران
۳) دانش آموخته دکتری حرفه ای دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران

(دریافت مقاله: ۵ شهریور ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۲۰ آبان ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: دیروفیلاریا ایمیتیس نماتودی شایع در سگ‌ها می‌باشد و می‌تواند آلودگی انگلی، تحت عنوان دیروفیلاریوز را بوجود آورد. بیماری قابل انتقال به انسان بوده و از نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت است. **هدف:** هدف از انجام تحقیق حاضر، تشخیص آلودگی به دیروفیلاریا ایمیتیس در جمعیت سگ‌های شهری و روستایی اهواز، به روش کانترایمونوالکتروفورز و مقایسه آن با روش نات بود. **روش کار:** در مطالعه حاضر، سرم ۲۰۰ قلاده سگ (۸۰ قلاده سگ شهری و ۱۲۰ قلاده روستایی) جهت تشخیص دیروفیلاریوز به روش نات اصلاح شده و کانترایمونوالکتروفورز، در جنوب غرب ایران، اهواز، مورد ارزیابی قرار گرفتند. **نتایج:** با روش کانترایمونوالکتروفورز میزان آلودگی ۹/۵٪ (۱۹ مورد) و در روش نات اصلاح شده موارد مثبت ۸٪ (۱۶ مورد) تعیین گردید. که احتمالاً مربوط به آلودگی مخفی بوده‌اند، البته تفاوت بین ۲ روش آزمایشات مزبور معنی‌دار نبود ($p>0/05$). بر اساس نتایج آزمایش کانترایمونوالکتروفورز، در جمعیت سگ‌های شهری، ۶/۲۵٪ از سگ‌های نر و صفر درصد از ماده‌ها و در سگ‌های روستایی، ۱۳٪ از سگ‌های نر و ۷/۶٪ از ماده‌ها به ترتیب آلوده بودند. همچنین در در گروه سنی بالای ۶ سال، جمعیت سگ‌های شهری و روستایی، بیشترین میزان آلودگی به ترتیب ۲۳/۳٪ و ۱۴/۲۹٪ تعیین گردید. بررسی آماری، ارتباط معنی‌داری را بین میزان آلودگی و فاکتورهایی نظیر سن و جنس سگ‌های مورد مطالعه نشان نداد ($p>0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** پیشنهاد می‌گردد جهت تأیید تشخیص دیروفیلاریوز در کنار روش نات اصلاح شده، از روش کانترایمونوالکتروفورز به شکل همزمان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: کانترایمونوالکتروفورز، دیروفیلاریا ایمیتیس، سگ‌های شهری و روستایی

مقدمه

دیروفیلاریوز ناشی از نماتود دیروفیلاریا ایمیتیس، یکی از مهمترین بیماریهای انگلی سگ‌ها می‌باشد که عوارض قلبی عروقی و تنفسی شدیدی را در حیوان سبب می‌شود. این بیماری در سرتاسر جهان گسترده است و در مناطق آب و هوایی معتدل، گرمسیری و نیمه‌گرمسیری اندمیک می‌باشد. مهمترین نشانه‌های بالینی بیماری کرم قلب سرفه‌ی خشک، تنگی نفس و عدم تحمل ورزش و تمرین‌های بدنی است. انسان نیز مانند حیوانات از طریق نیش پشه‌های آلوده به میکروفیلر L3 آلوده می‌شود (۷). سگ‌ها پس از ابتلا به دیروفیلاریا ایمیتیس تا حدودی در برابر آن ایمن می‌شوند. جهت آزمایش‌های سرولوژیک، از برخی فراورده‌های کرم به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است (۳۱). با توجه به گسترش جهانی این بیماری و جنبه مشترک بودن بین انسان و دام، به‌عنوان یکی از معضلات مهم در زمینه بهداشت عمومی محسوب می‌شود، بنابراین مطالعه در زمینه تشخیص و شناسایی انسان و دام‌های مبتلا امری مهم به نظر می‌رسد. بررسی‌های به عمل آمده در مناطقی نظیر آذربایجان شرقی و اردبیل، بیانگر وقوع آلودگی به صورت اندمیک می‌باشد. همچنین طی بررسی‌های انجام شده در شهرستان اهواز، حضور انگل در منطقه و وجود دیروفیلاریوز مخفی گزارش شده است (۲۲). روش‌های اولیه جهت تشخیص دیروفیلاریوز، جستجوی آنتی‌بادی ضد دیروفیلاریا ایمیتیس بود ولی اخیراً روش‌هایی جهت جستجوی آنتی‌ژن به منظور کاهش احتمال واکنش‌های متقاطع طراحی شده است. ابتدا برای تهیه آنتی‌سرم، از روش ایمن‌سازی خرگوش با آنتی‌ژن استفاده می‌شد ولی اخیراً از آنتی‌بادی‌های تک دودمانی به عنوان معرف آزمایش استفاده می‌کنند که به نظر می‌رسد بسیار اختصاصی‌تر و حساس‌تر باشد (۹،۱۱،۱۲). جهت جستجوی آنتی‌ژن می‌توان از روش الایزا و لاتکس آگلوتیناسیون استفاده کرد (۱۱). در سال‌های اخیر تکنیک‌های الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلات در انگل‌شناسی استفاده شده‌اند. این روش‌ها مرحله جدیدی را در تشخیص سرم‌شناسی بوجود آورده‌اند که واکنش‌های متقاطع را بسیار کاهش داده و گام بسیار مهمی در تشخیص مراحل ابتدایی بیماری می‌باشند (۱۸). از آنجا که روش‌های تشخیصی مبنی بر حضور میکروفیلر، در مواردی که میکروفیلر در خون مشاهده نمی‌شود نظیر آلودگی استریل یا تک‌جنسی و یا در مراحل ابتدایی آلودگی (دوره پیش‌آشکاری)، کاربردی ندارند، طراحی روش‌های سرولوژیک مناسب و حساس جهت شناسایی ضروری به نظر می‌رسد. در میان تکنیک‌های مورد استفاده، کانترایمونوالکتروفورز، ابزار تشخیصی مفید و قابل

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۳۰۰۷۳ نمابر: ۰۶۱۱-۳۳۶۰۸۰۷ Email: mh.jalali@scu.ac.ir

اعتمادی جهت بررسی آلودگی با دیرو فیلاریا ایمیتیس می‌باشد، چون هم آنتی‌ژن و هم آنتی‌بادی را می‌تواند ردیابی کند و نسبت به ایمونوالکتروفورز و دیفوزیون دوتایی مراحل کار در زمان کوتاه‌تری انجام می‌شود و از سرعت عمل و دقت بیشتری برخوردار است (۲۸). این روش در مورد آنتی‌ژن‌هایی استفاده دارد که به علت دارابودن بار الکتریکی منفی، در ژل به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. کانترایمونوالکتروفورز نسبت به روش ایمونودیفوزیون اوختر لونی نیز از سرعت عمل و حساسیت بیشتری برخوردار است، زیرا کل آنتی‌ژن و آنتی‌بادی از طریق الکتریسیته به سمت یکدیگر رانده می‌شوند (۱۳). هدف از مطالعه حاضر تشخیص آلودگی به دیرو فیلاریا ایمیتیس در جمعیت سگ‌های شهری و روستایی اهواز، به روش کانترایمونوالکتروفورز بود و نتایج حاصل با روش نات اصلاح شده نیز مقایسه گردید. بدیهی است نتایج این بررسی می‌تواند در روشن شدن وضعیت اپیدمیولوژیک این بیماری، در سگ‌های منطقه کمک کننده باشد.

مواد و روش کار

نمونه برداری: در بررسی حاضر از تعداد ۲۰۰ قلاده سگ‌های گله و نگهبان در روستاها و شهر اهواز پس از ثبت مشخصات شامل سن، جنس، نژاد و نحوهٔ نگهداری از ورید سافن و یا سفالیک خون گیری بعمل آمد. قسمتی از نمونه در لوله‌های بدون ماده ضد انعقاد و قسمتی در مجاورت ماده ضد انعقاد سیترات سدیم به آزمایشگاه انگل شناسی منتقل گردیدند.

آزمایش نات تغییر یافته: آزمایش نات با استفاده از روش اسلامی در سال ۱۹۹۷ صورت گرفت (۱۱).

کانترایمونوالکتروفورز: ۱- تهیه آنتی‌ژن کرم بالغ دیرو فیلاریا ایمیتیس: ابتدا ۱۹۱ کرم بالغ دیرو فیلاریا ایمیتیس (۶ کرم نر و ۱۳ کرم ماده) از سگ‌های آلوده به روش کالبدگشایی جدا و سپس با فسفات بافر سالین شستشو داده شدند. کرم‌ها با هیپوکلریت سدیم ۰/۲۵٪ و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی پلیت شستشوی اولیه و در ادامه با آب مقطر استریل، شستشو داده شدند و تا زمان انجام مراحل بعدی، در فریزر $-70^{o}C$ نگهداری شدند. جهت جداسازی آنتی‌ژن‌های سطحی، کرم‌ها به مدت ۲ ساعت از فریزر خارج شده و با آب مقطر استریل، شستشو داده شدند. کوتیکول کرم‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ توسط تیغ اسکالپل ظریف برش داده شده و اندام‌های داخلی به وسیله قلم مو و پنس ظریف جدا گردیدند. در ادامه کوتیکول باقیمانده، با آب مقطر استریل شستشو داده شد. پوشش‌های کوتیکولی در ۲۰۰mL محلول سدیم دودسیل سولفات و ۲- مرکاپتواتانل به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و بقایای بافت‌های تفکیک شده زیر استریومیکروسکوپ حذف شدند. سپس پوشش‌های کوتیکولی به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردیده و مواد شناور شده در کیسه دیالیز در برابر PBS با pH= ۷/۶ و به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند. محلول باقیمانده توسط سرنگ و سوزن استریل آسپیره شده و به عنوان آنتی‌ژن در فریزر $-20^{o}C$ نگهداری شدند (۶،۸،۲۴،۲۶).

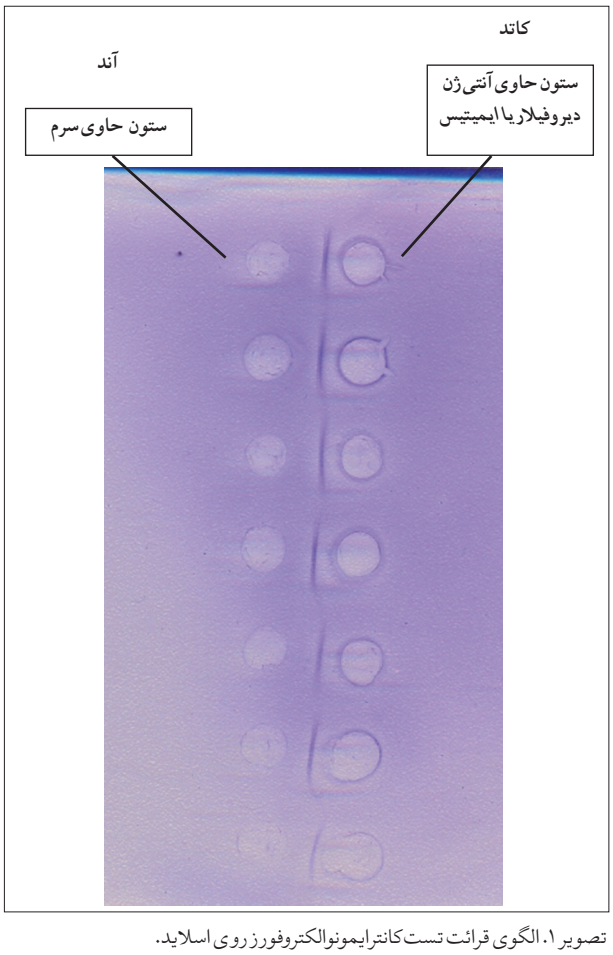
۲- تهیه اسلایدهای پوشیده از آگاروز ۱٪: شیشه‌هایی به ابعاد ۸Cm×۶/۵، قطر ۴ mm و به تعداد ۳۰ اسلاید بریده، ابتدا با آب معمولی و دترجنت شسته شده و سپس با آب مقطر آبکشی شدند. پس از خشک شدن، روی آن با آگاروز ۱٪ پوشیده شده و به مدت ۲۴ ساعت بی‌حرکت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا آب ژل تبخیر و لایه‌های نازک و خشک شده بر روی شیشه باقی بماند. ژل آگاروز ۱٪ گرم، به آرامی بر روی اسلایدهای پوشیده، به قطر حدود ۱mm ریخته شد. در تهیه اسلایدها، تراز بودن آنها به منظور یکنواختی ژل در نظر گرفته شد. پس از بستن ژل، به وسیله پانچ مخصوص طراحی شده، ۱۴ حفره روی ژل بطور موازی برش داده و به وسیله پمپ خلأ، حفره‌ها از ژل خالی شدند (۶).

۳- نحوه راندن آنتی‌ژن و آنتی‌بادی بر روی ژل: آنتی‌ژن و سرم مشکوک/مورد آزمایش، هر کدام جداگانه با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل به میزان ۰/۱ رقت سازی شده و در هر یک از حفره‌های سمت آند و کاتد، به میزان ۱۰ µL، به ترتیب سرم و آنتی‌ژن به میزان ۱۰ µL ریخته و در تانک افقی الکتروفورز در مجاورت بافر ورونال با pH=۸/۶ به مدت ۲ ساعت و با ولتاژ ۵۰ mv، عملیات راندن انجام شد (۶).

۶- شستشو، رنگ‌آمیزی و رنگبری ژل: به منظور شستشوی ژل، اسلاید با زاویه 45° در محلول شستشوی بوراکس و به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. به منظور رنگ‌آمیزی ژل، پس از مراحل شستشو و آبکشی، اسلاید در محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (۰/۰۵٪) و به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. برای تثبیت رنگ بر روی خطوط رسوبی پس از رنگ‌آمیزی، آبکشی با متانول انجام گردید. به منظور رنگبری، پس از تثبیت خطوط رسوبی توسط متانول، اسلاید در محلول رنگبر اسید الکل و به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد (۶).

۷- قرائت نتیجه: وجود خطوط رسوبی آبی رنگ بین حفره‌ی حاوی سرم و حفره‌ی حاوی آنتی‌ژن، نشانه مثبت بودن نمونه و عدم وجود آن، بیانگر منفی بودن آن بود. در هر اسلاید شیشه‌ای که واجد ۷ ردیف و در هر ردیف ۲ حفره وجود داشت، در سمت آند یک سرم کنترل مثبت، یک سرم کنترل منفی و ۵ نمونه سرم سگ قرار داده شدند. سرم کنترل مثبت از خون سگ آلوده‌ای تهیه شده بود که کرم دیرو فیلاریا ایمیتیس به منظور تهیه آنتی‌ژن از آن جدا شده بود. سرم کنترل منفی از سگ‌های خانگی زیر یک ماه تهیه گردید. در سمت کاتد آنتی‌ژن دیرو فیلاریا ایمیتیس قرار داده شد.

آزمون آماری: به منظور تعیین ارتباط معنی‌دار بین وقوع آلودگی به انگل دیرو فیلاریا ایمیتیس و عوامل سن و جنس سگ‌های مورد مطالعه و نیز مقایسه بین دو روش مذکور، از آزمون آماری k2 و آزمون دقیق فیشر توسط نرم افزار SPSS 16.0 استفاده گردید. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.



تصویر ۱. الگوی قرائت تست کانترایمونوالکتروفورز روی اسلاید.

نتایج

شیوع آلودگی در جمعیت سگ‌های شهری و روستایی شهرستان اهواز، به روش نات اصلاح شده ۸٪ (۱۶ مورد) بود، اما به روش کانترایمونوالکتروفورز ۹/۵٪ (۱۹ مورد) تعیین گردید. تفاوت در ۳ مورد، مشخص گردید که با روش نات اصلاح شده منفی، ولی با روش کانترایمونوالکتروفورز، نتیجه مثبت حاصل شده بود. علیرغم مشاهده شیوع بیشتر آلودگی به روش کانترایمونوالکتروفورز، بررسی‌های آماری تفاوت معنی‌داری را بین دو روش نشان نداد (p>۰/۰۵). بر اساس نتایج آزمایش کانترایمونوالکتروفورز، شیوع آلودگی در سگ‌های شهری مورد مطالعه ۶/۲۵٪ و در سگ‌های روستایی ۱۱/۶٪ تعیین گردید (جدول۱). بررسی‌های آماری ارتباط معنی‌داری را از لحاظ شیوع آلودگی بین دو گروه سگ‌های شهری و روستایی نشان نداد (p>۰/۰۵).

در جمعیت سگ‌های شهری ۶/۲۵٪ از سگ‌های نر و صفر درصد از ماده‌ها آلوده بودند (جدول ۲). ارتباط معنی‌داری بین شیوع آلودگی و جنسیت سگ‌های شهری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

در جمعیت سگ‌های روستایی، ۱۳٪ از سگ‌های نر و ۷/۶٪ از سگ‌های ماده آلوده بودند (جدول ۳). بررسی آماری ارتباط معنی‌داری را بین شیوع آلودگی و جنسیت سگ‌های روستایی نشان نداد (p>۰/۰۵).

در جمعیت سگ‌های شهری، بیشترین وقوع آلودگی در گروه سنی بالای ۶ سال (۱۴/۲۹٪) و کمترین میزان آن در گروه زیر یک سال و ۳-۱ سال (صفر درصد) تعیین گردید (جدول ۴). بررسی‌های آماری ارتباط معنی‌داری را بین شیوع آلودگی و سن سگ‌های مورد مطالعه نشان نداد (p>۰/۰۵).

در جمعیت سگ‌های روستایی بیشترین شیوع آلودگی در گروه سنی بالای ۶ سال (۲۳/۳ ٪) و کمترین میزان آن در گروه زیر یک سال (صفر درصد) تعیین گردید (جدول ۵). بررسی‌های آماری ارتباط معنی‌داری را بین شیوع آلودگی و سن سگ‌های مورد مطالعه نشان نداد (p>۰/۰۵).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که میزان شیوع آلودگی در سگ‌های شهرستان اهواز و به روش کانترایمونوالکتروفورز ۹/۵٪ می‌باشد، در حالیکه در روش نات اصلاح شده ۸٪ تعیین شده بود که این حاکی از کارایی بیشتر روش کانترایمونوالکتروفورز نسبت به نات اصلاح شده دارد. این تفاوت، احتمالاً مربوط به آلودگی مخفی، وجود یک جنس در بدن سگ و یا پاسخ محافظت کننده سیستم ایمنی است که نیاز به بررسی بر روی تعداد نمونه‌های مثبت بیشتر دارد، چرا که در تحقیق حاضر، بین دو روش فوق تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. از آنجا که روش معمول تشخیص، روش نات اصلاح شده می‌باشد، بنابراین موارد آلودگی مخفی با این روش قابل تشخیص نمی‌باشد. تاکنون چندین روش سرم‌شناسی جهت تشخیص ارائه شده‌اند، از آن جمله کیت ایمونوکروماتوگرافی (۲۷)، الایزا (۳۳،۳۲،۲۹،۲۳،۲۱،۱۹،۳)، دات الایزا (۱۶)، کانترایمونواکتروفورز (۳۱،۳۰،۲۸)، لاتکس آگلوتیناسیون (۱۱) و... می‌باشد. در سال‌های اخیر، تکنیک‌های وسترن بلات و SDS-PAGE نیز استفاده شده‌اند (۱۸). از آنجا که کیت‌های تشخیصی، وارداتی بوده و هزینه هنگفتی را در بر دارند، طراحی و ارزیابی روش‌های کاربردی، که با امکانات بومی راه اندازی شده باشد از اهمیت خاصی جهت تشخیص برخوردار هستند. با این وجود عمده روش‌های بکار گرفته شده توسط محققین مختلف بر پایه ردیابی آنتی‌ژن انگل استوار بوده ولی در این مطالعه حضور آنتی بادی ضد آنتی‌ژن دیرو فیلاریا ایمیتیس مورد ارزیابی قرار گرفت که باید معایب آن از قبیل احتمال واکنش‌های متقاطع را مد نظر داشت.

Tagawa و همکاران در سال ۱۹۸۳ با استفاده از روش کانترایمونوالکتروفورز، آنتی‌ژن‌های ضد دیرو فیلاریا ایمیتیس را در سگ‌های آلوده نشان دادند (۲۸). Weil و همکاران در سال ۱۹۸۴ آنتی‌ژن دیرو فیلاریا ایمیتیس را در سرم ۲۴ قلاده از ۲۴ سگ آلوده و به روش کانترایمونوالکتروفورز پیدا کردند. آنتی‌ژن انگل در سرم هیچکدام از سگ‌های سالم و یا آلوده به دیپتالونمارکوندیتوم یافت نشد، که حاکی از

جدول ۱. توزیع فراوانی مطلق و نسبی دیروفیلاریوز در جمعیت سگ‌های روستایی و شهری اهواز به روش کانترایمونوالکتروفورز.

نتایج کانترایمونوالکتروفورز / نوع نمونه	مثبت		منفی		جمع	
	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد
شهری	۵	۶/۲۵	۷۵	۹۳/۷۵	۸۰	۱۰۰
روستایی	۱۴	۱۱/۶۷	۱۰۶	۸۸/۳۳	۱۲۰	۱۰۰
جمع	۱۹	۹/۵	۱۸۱	۹۰/۵	۲۰۰	۱۰۰

جدول ۲. توزیع فراوانی مطلق و نسبی دیروفیلاریوز در جمعیت سگ‌های شهری اهواز به روش کانترایمونوالکتروفورز بر حسب جنس.

نتایج کانترایمونو الکتروفورز / جنسیت حیوان	مثبت		منفی		جمع	
	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد
نر	۵	۱۰	۴۵	۹۰	۵۰	۱۰۰
ماده	۰	۰	۳۰	۱۰۰	۳۰	۱۰۰
جمع	۵	۶/۲۵	۷۵	۹۳/۷۵	۸۰	۱۰۰

جدول ۳. توزیع فراوانی مطلق و نسبی دیروفیلاریوز در جمعیت سگ‌های روستایی اهواز به روش کانترایمونوالکتروفورز بر حسب جنس.

نتایج کانترایمونو الکتروفورز / جنسیت حیوان	مثبت		منفی		جمع	
	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد
نر	۱۲	۱۳/۰۴	۸۰	۸۶/۹۶	۹۲	۱۰۰
ماده	۲	۷/۱۴	۲۶	۹۲/۸۶	۲۸	۱۰۰
جمع	۱۴	۱۱/۶۷	۱۰۶	۸۸/۳۳	۱۲۰	۱۰۰

جدول ۴. توزیع فراوانی مطلق و نسبی دیروفیلاریوز در جمعیت سگ‌های شهری اهواز به روش کانترایمونوالکتروفورز بر حسب سن.

نتایج کانترایمونو الکتروفورز / سن بر حسب سال	مثبت		منفی		جمع	
	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد
<۱	۰	۰	۸	۱۰۰	۸	۱۰۰
۱-۳	۰	۰	۱۸	۱۰۰	۱۸	۱۰۰
۳-۶	۱	۳/۸۵	۲۵	۹۶/۱۵	۲۶	۱۰۰
۶<	۴	۱۴/۲۹	۲۴	۸۵/۷۱	۲۸	۱۰۰
جمع	۵	۶/۲۵	۷۵	۹۳/۷۵	۸۰	۱۰۰

جدول ۵. توزیع فراوانی مطلق و نسبی دیروفیلاریوز در جمعیت سگ‌های روستایی اهواز به روش کانترایمونوالکتروفورز بر حسب سن.

نتایج کانترایمونو الکتروفورز / سن بر حسب سال	مثبت		منفی		جمع	
	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد	تعداد	نسبت درصد
<۱	۰	۰	۲	۱۰۰	۲	۱۰۰
۱-۳	۱	۴/۳۵	۲۲	۹۵/۶۵	۲۳	۱۰۰
۳-۶	۳	۵/۷۷	۴۹	۹۴/۲۳	۵۲	۱۰۰
۶<	۱۰	۲۳/۲۶	۳۳	۷۶/۷۴	۴۳	۱۰۰
جمع	۱۴	۱۱/۶۷	۱۰۶	۸۸/۳۳	۱۲۰	۱۰۰

اختصاصی بودن این روش است. اولین زمان برای تعیین آنتی‌ژن انگل، در سگ‌های آلوده به شکل تجربی ۸/۵-۶/۵ ماه بعد از ایجاد عفونت برآورد گردیده است. نتایج این محققین، به شکل جالبی ارتباط معنی‌داری را بین مقدار آنتی‌ژن انگل در سرم و تعداد کرم‌های بالغ به هنگام کالبدگشایی نشان داد. بنابراین از مزایای کانترایمونوالکتروفورز، به منظور ردیابی آنتی‌ژن، این است که تنها روش شناخته شده‌ای است که تشخیص آلودگی با شدت آن ارتباط دارد و این نتایج در تست‌های دیگر دیده نمی شود (۳۰). همچنین Weil و همکاران در سال ۱۹۸۵ آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را به روش الایزا، جهت ردیابی آنتی‌ژن‌های انگل در ۴۵ مورد از ۴۶ قلاده سگ آلوده یافتند (۳۱). Matsumuraa و همکاران در سال ۱۹۸۸ با بکارگیری روش دات الایزا توانستند در ۲۴ مورد از ۲۵ قلاده سگ مبتلا، آنتی‌ژن‌های دیرو فیلاریا ایمیتیس را در گردش خون ردیابی کنند. همچنین در بررسی دیگری، توانستند با استفاده از ورق نیتروسلولز پوشیده شده با آنتی‌ژن، آنتی‌بادی‌های دیرو فیلاریا را در ۲۱ مورد از ۲۳ قلاده سگ مبتلا ردیابی کنند (۱۶). Patton و McCracken در سال ۱۹۹۱ شیوع دیرو فیلاریا ایمیتیس را در سگ‌های تنسی شرقی با بکارگیری روش نات برای ردیابی میکروفیلر و الایزا برای ردیابی آنتی‌ژن‌های انگل مذکور بررسی کردند. در جمعیت سگ‌ها ۵/۰۸٪ از نظر وجود میکروفیلر و ۱۳/۸۲٪ سگ‌ها از نظر آنتی‌ژن انگل مذکور مثبت بودند. در جمعیت سگ‌های روستایی ردیابی آنتی‌ژن انجام نشد ولی ۸/۲۱٪ از نظر وجود میکروفیلر مثبت بودند (۱۹). در ۱٪ از سگ‌های آلوده، دیروفیلاریوزیس مخفی با استفاده از کیت‌های تجاری آنیژن شناسایی شد (۲۳). Ranjbar-Bahadori و همکاران در سال ۱۳۸۶، نمونه‌های خون ۱۱۰ قلاده سگ در استان گلستان را با استفاده از روش نات اصلاح شده و کیت تجاری ردیابی آنتی‌ژن مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج حاصل با روش ردیابی آنتی‌ژن ۱۴/۵۴٪ و پس از کالبدگشایی ۱۲/۷۳٪ و بطور کلی ۱۸/۸٪ از سگ‌های مورد مطالعه مبتلا بودند (۲۱). برخی از محققین همچون Atkins در سال ۲۰۰۳ معتقدند که روش نات به خوبی تست ردیابی آنتی‌ژن نمی‌باشد (۲). Wang در سال ۱۹۹۸ به منظور مقایسه دو تست تجاری ردیابی آنتی‌ژن دیرو فیلاریا ایمیتیس در سگ‌ها که یکی بر اساس آگلوتیناسیون خون‌کامل و دیگری بر اساس الایزا بود، ۱۰۰ قلاده سگ روستایی از شمال تایوان را مورد بررسی قرار داد. از ۵۳ قلاده سگی که پس از کالبدگشایی حاوی انگل بودند، ۴۵ قلاده به روش آگلوتیناسیون خون کامل و ۴۷ قلاده به روش الایزا مثبت یافت شدند. تمامی موارد منفی کاذب، سگ‌هایی با بار انگلی خیلی پایین بودند. در موارد معمول، تفاوت اندکی بین دو روش وجود ندارد، اما در مواردی که ابتلا به دیرو فیلاریا ایمیتیس نادر است تست آگلوتیناسیون خون کامل، مناسب نمی‌باشد (۲۹). بر اساس بررسی‌های Brunner و همکاران در سال ۱۹۸۸، ردیابی آنتی‌ژن‌های در گردش خون ناشی از کرم ماده بالغ بوسیله آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، حساسیت و ویژگی بیشتری برای تشخیص دارد (۴). بنابراین ردیابی کردن آنتی‌ژن با روش الایزا در مقایسه با روش‌های هماتولوژیکی، ردیابی موارد مبتلا با بار انگلی کمتر را ممکن می‌سازد (۳،۱۵). Yaman و

همکاران در سال ۲۰۰۹ با بکارگیری روش نات اصلاح شده و الایزا دریافتند که از بین ۲۶ ٪ موارد مثبت، ۶۱/۴٪ از آن‌ها آلودگی مخفی داشتند و بیشترین شیوع در سگ‌های با سن بالاتر از ۴ سال مشاهده شد (۳۲). Ben-Mahdi و Madani در سال ۲۰۰۹ با روش نات اصلاح شده و ردیابی آنتی‌ژن با روش الایزا، درصد شیوع دیرو فیلاریا را به ترتیب ۱۸/۴۸ و ۲۴/۴۶٪ بدست آوردند (۳). این تفاوت بر اساس نظر Hoover و همکاران در سال ۱۹۹۶ با این حقیقت توجیه می‌شود که سگ‌های مبتلا به آلودگی مخفی یا آلودگی به صورت پیش‌آشکاری، فاقد میکروفیلر می‌باشند (۱۴). Ylidiz و همکاران در سال ۲۰۰۸ با بررسی شیوع دیرو فیلاریا ایمیتیس در سگ‌های کریکاله ترکیه به روش نات اصلاح شده و کیت تجاری الایزا، شیوع آلودگی مخفی را ۲۷/۴۶٪ گزارش کردند (۳۳).

مطابق گزارشات حاصل از Cringoli و همکاران در سال ۲۰۰۱، شیوع آلودگی به دیرو فیلاریا ایمیتیس در سگ‌های نر متداول‌تر از ماده است (۷). همچنین بنا بر نظر Song و همکاران در سال ۲۰۰۵، درصد شیوع بالاتر در سگ‌های نر به دلیل نگهداری سگ‌های نر بیشتر از سگ‌های ماده در محیط بیرون برای نگهبانی می‌باشد (۲۵). نتایج حاصله از این تحقیق مبنی بر شیوع بیشتر آلودگی در سگ‌های نر با گزارشات ارائه شده مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، در جمعیت سگ‌های شهری، شیوع به میزان ۶/۲۵٪ در سگ‌های نر دیده شد که به دلیل نگهداری آنها در محیط بیرون به‌عنوان سگ نگهبان است و با وجود آب‌های راکد، محیط مناسبی جهت تزاید پشه به عنوان میزبان واسط فراهم می‌شود.

Yildiz و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Atkins و همکاران در سال ۲۰۰۵، پیشنهاد کردند که سن سگ یک فاکتور خطر مهم برای ابتلا به انگل دیرو فیلاریا ایمیتیس می‌باشد (۲،۳۳). آلودگی در سگ‌های مسن‌تر بدلیل دوره طولانی قرار گرفتن در معرض گزش پشه در مناطق آندمیک شایع‌تر است. Duran-Struuck و همکاران در سال ۲۰۰۵ و سونگ و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند (۱۰،۲۵). Ciocan و همکاران در سال ۲۰۰۹ در بررسی شیوع دیروفیلاریوز به روش نات اصلاح شده، گزارش کردند که شیوع بیماری تحت تأثیر سن، جنس و نژاد نمی‌باشد (۵). در بررسی حاضر مشاهده گردید که با افزایش سن، میزان ابتلا به دیرو فیلاریا ایمیتیس افزایش می‌یابد. توجیه احتمالی آن می‌تواند در معرض قرارگیری طولانی‌تر سگ‌ها با پشه‌ها باشد (۱). در مقایسه شیوع دیرو فیلاریا ایمیتیس، بین سگ‌های شهری و روستایی و به روش کانترایمونوالکتروفورز در بررسی حاضر، شیوع این انگل در سگ‌های شهری (۶/۲۵ ٪) کمتر از سگ‌های روستایی (۱۱/۶٪) بود. سگ‌های شهری به دلیل قرارگرفتن در شرایط محیطی بهتر از نظر بهداشتی و مبارزه‌ی انسان با پشه‌ها به عنوان میزبان واسط، بیشتر از سگ‌های روستایی از گزش پشه در امان هستند. شرایط آب و هوایی بویژه دما، شرایط محیطی از قبیل وجود آب‌های راکد، حضور گونه‌های پشه ناقل، نحوه نگهداری سگ و طول مدتی که سگ‌ها در محیط آزاد و در معرض گزش پشه‌ها می‌باشند در شیوع آلودگی به انگل مذکور تعیین کننده می‌باشند. علاوه بر آلودگی استریل یا تک‌جنسی که هیچ میکروفیلری تولید نمی‌شود (آلودگی مخفی)، در موارد آلودگی به صورت پیش‌آشکاری، عقیم شدن کرم‌های بالغ ناشی از دارو و تأثیر ایمنی، تست‌های تشخیصی بر مبنای حضور میکروفیلر نمی‌توانند آلودگی را ردیابی کنند. بنابراین از آنجا که تجویز رژیم دارویی جهت سگ‌های مبتلا به آلودگی مخفی می‌تواند سبب واکنش شدید شود، بکارگیری روش‌های سرولوژیک مناسب جهت تشخیص از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به نتایج ارائه شده و اهمیت دیرو فیلاریوز از جنبه همه‌گیری‌شناسی، تشخیص، درمان و ژئونوتیک بودن آن و نیز با توجه به وجود آلودگی در سگ‌های منطقه و آلودگی مخفی، روش کانترایمونوالکتروفورز به عنوان روش کاربردی در کنار روش نات اصلاح شده توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز، در تامین هزینه پژوهشی در قالب پژوهانه (Grant) ابراز می‌دارند.

References

1. Atkins, C. (2005) Canine heartworm disease. In: Textbook of Canine and Feline Veterinary Internal Medicine. Etinger. S.J., Feldman, E.C. (eds). (6th ed.) St. Louis, Sanders. London, UK. p. 1118-1136.
2. Atkins, C.A. (2003) Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. J Am Vet Med Assoc. 222: 1221-1223.
3. Ben-Mahdi, M., Madani, M. (2009) Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria. Afr J Agric Res. 4: 1097-1100.
4. Brunner, C.J., Hendrix, C.M., Blagburn, B.L., Hanrahan, L.A. (1988) Comparison of serologic tests for detection of antigen in canine heartworm infections. J Am Vet Med Assoc. 192: 1423-1427.
5. Ciocan, R., Darabus, Gh., Ilie, M.S., Hotea, I., Imre, K., Morariu, S. (2009) Preliminary observations of an epidemiological survey in dirofilariosis of dogs from Timis county. Sci Paper Med Vet. 13: 109-115.
6. Collee, J.G., Dusguid, J.P., Frasar, A.G., Marimon, B.P. (1989) Mackie and McCartney Practical Medical

Microbiology. (13th ed.) Churchill Livingstone. London, UK.

7. Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G. (2001) A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of Souther Italy. Vet Parasitol. 102: 243-252.
8. Dekumyoy, P., Insun, D., Waikagul, J., Anantaphruti, M.T., Rongsriyam, Y., Coochote, W. (2000) IgG and IgG4 detected antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms for bancroftian filariasis by enzyme linked immunoelectrotransfer blot. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 31: 58-64.
9. Dhaliwal, G.V., Sani, R.A. (1993) The Prevalence of canine dirofilariosis in Kuala Lumpur and host risk factors. Trop Biomed. 10: 73-76.
10. Duran-Struuck, R., Jost, C., Hernandez, A.H. (2005) *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic)-June 2001. Vet Parasitol. 133: 323-327.
11. Eslami, A. (1997) Veterinary Helminthology. Nematoda and Acanthocephala. (1st ed.) Vol:3. Tehran University Publication. Tehran, Iran.
12. Eslami, A., Ranjbar-Bahadori, Sh. (2004) Diagnostic Helminth Iinfections. (1st ed.) Islamic Azad University Publication. Garmsar, Iran.
13. Hay, F.C., Westwood, O.M.R. (2002) Practical Immunology. (4th ed.) Blackwell Science. London, UK.
14. Hoover, J.P., Campbell, G.A., Fox, J.C., Claypool, P.L., Mullins S.B. (1996) Comparison of eight diagnostic blood tests for heartworm infection in dogs. Canine Pract. 21: 11-19.
15. Martini, M., Capelli, G., Poglayen, G., Bertotti, F., Turilli, C. (1996) The validity of some haematological and ELISA methods for the diagnosis of canine heartworm disease. Vet Res Commun. 20: 331-339.
16. Matsumuraa, K., Wakatsukia, S., Endoa, R., Tanakaa, K., Inoueb, T., Matsuda, H. (1988) A rapid detection of circulating antigens of *Dirofilaria immitis* in dogs by a dot enzyme-linked immunosorbent assay. FEMS Microbiol Immunol. 1: 145-149.
17. Narine, K., Brennan, B., Gilfillan, I., Hodge, A. (1999) Pulmonary presentation of *Dirofilaria immitis* (canine heartworm) in man. Europ J Cardio-Thoracic Surg. 16: 475-477.
18. Oge, H., Oge, S., Yildirim, A., Kircali, F., Kara, M. (2005) Immunoblotting analysis of somatic components of *Dirofilaria immitis*. Parasite. 12: 179-182.
19. Patton, Sh., McCracken, M. (1991) Prevalence of *Dirofilaria immitis* in cats and dogs in eastern Tennessee. J Vet Diagn Invest. 3: 79-80.
20. Ranjbar-Bahadori, Sh., Eslami, A. (2007) Prevalence of blood filaria in dogs in Golestan province (north of Iran) using modified knott;s method and determination of its periodicity. J Vet Res. 62: 11-14.
21. Ranjbar-Bahadori, Sh., Eslami, A., Bokaie, S. (2007) Evaluation of different methods for diagnosis of *Dirofilaria immitis*. Pakistan J Biol Sci. 10: 1938-1940.
22. Razi Jalali, M.H., Alborzi, A., Avizeh, R., Mosallanejad, B. (2009) Survey of prevalence of dirofilariosis in rural dogs in Ahvaz. Iran Vet J. 5: 81-88.
23. Razi jalali, M.H., Alborzi, A., Avizeh, R., Mosallanejad, B. (2010) A study on *Dirofilaria immitis* in healthy urban dogs from Ahvaz (Iran). Iran J Vet Res. 11: 357-362.
24. Riyong, D., Dekumyoy, P., Panasoponkul, C., Waikagul, J. (2005) Detection of IgG antibodies of Brugian filariasis with crude male and female antigens of *Dirofilaria immitis*. Souhteast Asian J Trop Med Public Health. 36: 80-85.
25. Song, K.H., Lee, S.E., Hayasaki, M., Shiramizu, K., Kim, D.H., Cho, K.W. (2003) Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. Vet Parasitol. 114: 231-236.
26. Soulsby, E.J.L. (1986) Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall Press. London, UK.
27. Sowza, N.F., Benigno, R.N.M., Figueiredo, M., Salim, S.K., Silva, D., Goncalves, R. (1997) Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in the city of Belm, Brasileria. Vet Parasitol. 6: 83-86.
28. Tagawa, M., Uematsu, K., Kurokawa, K., Tanaka, H.

(1983) Circulating Antigens and Antibodies of *Dirofilaria immitis* in dog detected by counterimmunoelectrophoresis. J Vet Sci. 45: 323-329.

29. Wang, L.C. (1998) Comparison of a whole blood test and an ELISA for the detection of the antigens of *Dirofilaria immitis* agglutination in dogs. Ann Trop Med Parasitol. 92: 73-77.
30. Weil, G.J., Malane, M.S., Powers, K.G. (1984) Detection of circulating parasite antigens in canine dirofilariasis by counterimmunoelectrophoresis. Am J Trop Med Hyg. 33: 425-430.
31. Weil, G.J., Malane, M.S., Powers, K.G., Blair, L.S. (1985) Monoclonal antibodies to parasite antigens found in the serum of *Dirofilaria immitis*-infected dogs. J Immunol. 134: 1185-1191.
32. Yaman, M., Guzel, M., Koltas, I.S., Demirkazik, M., Aktas, H. (2009) Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Hatay province. J Helminthol. 83: 255-260.
33. Yildiz, K., Yasaduru, S., Yagci, B., Ocal, N., Gazyagci, A. (2008) The Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Kirikkale. Turkiye Parasitol Derg. 32: 225-228.

Diagnosis of *Dirofilaria immitis* infection in urban and rural dogs in Ahvaz city by counterimmunoelectrophoresis

Razi Jalali, M.H.[1*], Ghorbanpoor, M.[1], Mosallanejad, B.[2], Avizeh, R.[2], Alborzi, A.R.[1], Rahrowani, M.[3]

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

[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran*

[3]*Graduated from theFaculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran*

(Received 28 August 2013 , Accepted 10 November 2013)

Abstract:

BACKGROUND: *Dirofilaria immitis* is a nematode that is highly prevalent in dogs and it can cause dirofilariosis. The disease is transmissible to human, so it is important in terms of public health. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to diagnose *Dirofilaria immitis* infection in the dog population of urban and rural areas of Ahvaz by counterimmunoelectrophoresis and compared with knott test. **METHODS:** In the present study, serum of 200 dogs (80 urban and 120 rural), were evaluated for detection of *Dirofilaria immitis* infection, in Ahvaz area, Southwestern Iran. Counterimmunoelectrophoresis and modified knott's test were conducted on all blood samples to trace the antibody and microfilariae. **RESULTS:** Using counterimmunoelectrophoresis test, 9.5 percent of dogs (19 cases) were infected, but in modified Knott test, positive cases were detected 8 percent (16 cases). Counterimmunoelectrophoresis test showed three more positive cases (one urban and two rural dogs) compared with the modified Knott test, which probably was due to occult infection. However, the difference was not significant ($p>0.05$). Based on the results of counterimmunoelectrophoresis test, 6.25 percent of male and zero percent of female dogs in urban areas and 13 percent of male and 7.6 percent of female dogs in rural areas were infected respectively. The highest prevalence of infection in 6 year-or-more age groups was 23.3 and 14.29 percent in urban and rural dogs respectively. Statistical analysis did not show any significant relationship between infection and factors such as age and sex of the studied dogs ($p>0.05$). **CONCLUSIONS:** It is proposed that for more accurate diagnosis of dirofilariosis, counterimmunoelectrophoresis test and the modified knott's test be used simultaneously.

Key words: counterimmunoelectrophoresis, *Dirofilaria immitis*, urban and rural dogs

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Pattern of reading counterimmunoelectrophoresis test on slide.

Table 1. Dirofilariosis relative frequency distribution in rural and urban dogs in Ahvaz by CCIE method.

Table 2. Dirofilariosis relative frequency distribution based on sex in urban dogs in Ahvaz by CCIE method.

Table 3. Dirofilariosis relative frequency distribution based on sex in rural dogs in Ahvaz by CCIE method.

Table 4. Dirofilariosis relative frequency distribution based on age in urban dogs in Ahvaz by CCIE method.

Table 5. Dirofilariosis relative frequency distribution based on age in rural dogs in Ahvaz by CCIE method.

***Corresponding author's email: mh.jalali@scu.ac.ir, Tel: 0611-3738388, Fax: 0611-3360807**