DOI: 10.22055/IVJ.2023.378594.2539

ارزیابی روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA) با آنتی‌ژن‌های لاروی برای تشخیص سرمی آلودگی *استروس اویس* در بزها

علیرضا البرزی[۱*]، لیلا خراطی[۲]، مسعود قربانپور[۳] و محمدحسین راضی‌جلالی[۴]

[۱] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز،اهواز، ایران
[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۴] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۶

چکیده

استروس اویس (مگس بینی گوسفند) یکی از انگل‌های مشترک انسان و دام (زئونوز) مهم در نشخوارکنندگان کوچک است. میاز چشمی-حلقی‌بینی انسان ناشی از لاروهای *استروس اویس* در ایران و کشورهای دیگر گزارش شده است. در این مطالعه، آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی (ES) و پیکری (S) لاروهای *استروس اویس* برای تشخیص‌سرمی آلودگی آن در بزها به روش IHA ارزیابی گردید. پس از برچسب‌گذاری و خون‌گیری از بزها در کشتارگاه، مراحل دوم و سوم لاروی *استروس اویس* (L3/L2) از شاخ‌های بریده شده آن‌ها جمع‌آوری شد. برای تهیه آنتی‌ژن‌های S، لاروها در لوله آزمایش جداگانه با هموژنایزر همگن سپس سانتریفیوژ شده و مایع‌رویی جمع‌آوری شد. برای تهیه آنتی‌ژن‌های پیکری (ESL2/ESL3)، لاروها جداگانه در محیط RPMI آنتی‌بیوتیک‌دار به مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه نگهداری شدند. با استفاده از ۳۰ سرم مثبت (از بزهای آلوده)، ۳۰ سرم منفی (از بزغاله) و آنتی‌ژن‌ها، روش IHA برای تشخیص آلودگی به *استروس اویس* بزها مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس آزمایش‌های IHA انجام شده با آنتی‌ژن‌های ESL2 و SL2، میزان حساسیت و ویژگی به ترتیب ۹۱ درصد، ۸۵ درصد و ۸۲ درصد، ۹۶ درصد بود. بر اساس نتایج IHA با آنتی‌ژن‌های Sl3 و ESL3، حساسیت و ویژگی به ترتیب ۸۶ درصد، ۱۰۰ درصد و ۲۳ درصد، ۹۲ درصد بود. در مجموع ۲۰۶ نمونه سرم از بزهای بهبهان (خوزستان) برای تشخیص سرمی آلودگی *استروس اویس* با IHA و آنتی‌ژن‌های ESL2 و ESL3 آزمایش شد. نتایج IHA با آنتی‌ژن‌های ESL2 و ESL3، شیوع سرمی آلودگی به *استروس اویس* را در حیوانات به ترتیب ۵۹/۷ درصد و ۴۳/۲ درصد نشان داد. نتایج IHA با آنتی‌ژن‌های ESL2 و ESL3، شیوع سرمی آلودگی به *استروس اویس* را در حیوانات به ترتیب ۵۹/۷ درصد و ۴۳/۲ درصد نشان داد. بر اساس نتایج این مطالعه، IHA با آنتی‌ژن ESL2 و ESL3 را می‌توان به عنوان یک روش تشخیص سریع و ارزان به ویژه در بزها برای درمان، کنترل و به حداقل رساندن خسارات اقتصادی آن‌ها و همچنین کاهش میاز در انسان استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *استروس اویس*، بز، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، IHA، خوزستان

مقدمه

لارو مگس‌های خانواده استریده که شامل چندین جنس می‌باشد باعث ایجاد میازهای اجباری در تک سمی‌ها و نشخوارکنندگان می‌شوند. استریدها اختصاصی میزبان هستند. جنس *استروس* و گونه با اهمیت آن *استروس*

*نویسنده مسئول : علیرضا البرزی، استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: a.alborzi@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

اویس به مگس بینی گوسفند معروف است. لاروهای مرحله یک (L1) توسط مگس ماده بالغ به طور مستقیم به سوراخ‌های بینی میزبان تلقیح می‌شوند، در مجاری بینی و سینوس‌ها رشد و تکامل یافته به لارو مرحله دو (L2) و سپس لارو مرحله سه (L3) تبدیل شده از بینی میزبان خارج می‌شوند (Alcaid et al, 2005). مگس *استروس اویس*، عامل میاز بینی و یکی از انگل‌های مهم با گسترش جهانی است که می‌تواند خسارت‌های اقتصادی شدیدی با کاهش تولید گوشت و شیر و پشم در گوسفند و بز ایجاد کند (Ahaduzzaman et al, 2019).

این انگل با ایجاد آماس بینی همراه با سینوزیت مزمن، سبب ناراحتی و سلب آسایش حیوان می‌شود و دام به دلیل عدم تغذیه مناسب لاغر و ضعیف می‌گردد. لاروهای مرده در داخل سینوس‌ها موجب واکنش‌های آلرژیک و پاسخ-های التهابی و متعاقب آن عفونت‌های باکتریایی ثانویه و در نهایت مرگ میزبان و خسارات اقتصادی می‌شوند (Tavasoli et al, 2012). *استروس اویس* یکی از انگل‌های زئونوز محسوب شده و موارد متعددی از ایجاد میاز و بیماری‌زایی آن در انسان در ایران و کشورهای دیگر گزارش شده است (Goddard et al, 1999; Janbakhsh et al, 1997; Pupić-Bakrač et al, 2020). اگر چه برآورد دقیقی از میزان خسارت اقتصادی ناشی از *استروس اویس* در انسان و دام‌ها وجود ندارد، ولی آلودگی به این انگل در گوسفندان با کاهش وزن ۱ تا ۴/۵ کیلوگرمی، کاهش پشم تا ۵۰۰ گرم و کاهش شیر تا ۱۰ درصد گزارش شده است (Wall and Shearer, 2001).

اگر چه حضور این انگل در بدن دام ضرورتاً به معنای ایجاد بیماری مشخص و واضح نمی‌باشد، با این حال با توجه به نقش پر اهمیت آلودگی به این انگل در کاهش تولیدات دامی و به مخاطره انداختن بهداشت عمومی، تعیین آلودگی در گله اهمیت دارد. تشخیص آلودگی به این انگل عمدتاً بر پایه کالبدگشایی و یا بررسی‌های کشتارگاهی استوار است. تا کنون روش آزمایشگاهی مشخص و متداولی برای تشخیص آلودگی به این انگل معرفی نشده است. چندین مطالعه سرولوژیکی انجام شده بر روی پروفایل پروتئینی انگل، نشان‌گر حضور پروتئین‌های آنتی-ژنی متعدد، متفاوت و تا حدی هم مشابه در سیر تکاملی و مراحل لاروی *استروس اویس* است (Alborzi et al, 2014; Mot, 2012; Tabouret et al, 2001). علاوه بر این، در مطالعاتی روش الایزا برای تشخیص سرمی *استروس اویس* در گوسفند با آنتی‌ژن‌های مراحل لاروی مورد ارزیابی قرار گرفته است که با نتایج مناسبی همراه بوده است (Alborzi et al, 2020; Alborzi et al, 2018; Alcaide et al, 2005; Angulo-Valadez et al, 2009).

به هر حال یافتن روشی سریع، راحت و کم هزینه که بتواند آلودگی به این انگل (*استروس اویس*) را در دام‌های (میزبانان) زنده شناسایی نماید، ضروری به نظر می‌رسد. هماگلوتیناسیون یکی از روش‌های ساده سرولوژی بر مبنای واکنش‌های اختصاصی آنتی‌ژن – آنتی‌بادی است که در آن از گلبول‌های قرمز (به عنوان آنتی‌ژن یا پایه آنتی‌ژن) استفاده می‌گردد (Hay et al, 2002). از این روش برای تشخیص و ردیابی آنتی‌بادی ناشی از آلودگی برخی از انگل‌ها در انسان و حیوانات استفاده شده است (Akhtar et al, 2006; Bahrami, 2006; Budiono et al, 2020; Cornelissen et al, 1992; Dhanalakshmi et al, 2016; Gathuma and Waiyaki 1980; Hinz et al, 2017; Krupp, 1974; Vatankhah et al, 2004). بنابراین هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی و مقایسه آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی و پیکری لاروهای *استروس اویس* برای تشخیص آلودگی به این انگل در بزها با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم می-باشد.

مواد و روش کار

برای تهیه نمونه سرم مثبت بز (آلوده به *استروس اویس*)، با مراجعه تدریجی به کشتارگاه بهبهان هر بار تعدادی از بزها شماره‌گذاری شده و سپس در هنگام کشتار مورد خون‌گیری قرار گرفتند، پس از کشتار، کله بزهای کشتار شده در حین شاخ زنی بازرسی شد و نمونه‌هایی که در آن‌ها لارو *استروس اویس* مشاهده شد به عنوان نمونه مثبت

در نظر گرفته شدند. پس از انتقال نمونه‌های خون به آزمایشگاه، سرم آن‌ها با استفاده از سانتریفوژ جداسازی و در میکروتیوب‌های مشخص توزیع و تا زمان آزمایش در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مجموع ۳۰ نمونه سرم مثبت از بزهای آلوده تهیه شد.

برای تهیه نمونه‌های سرم منفی (غیرآلوده به *استروس اویس*)، از بزغاله‌های با سن کم‌تر از ۴ ماه که در زمستان به دنیا آمده بودند و به چرا نرفته بودند (ایندور) خون‌گیری به عمل آمد. در آزمایشگاه سرم آن‌ها جدا و در میکروتیوب-های مشخص توزیع و تا زمان آزمایش در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مجموع ۳۰ نمونه سرم منفی از بزغاله‌ها تهیه گردید.

جهت تهیه آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی- ترشحی لاروها، با مراجعه به کشتارگاه در حین بریدن شاخ‌های بزهای کشتار شده، لاروهای استروس اویس جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در زیر استریومیکروسکوپ بر اساس کلید تشخیصی (Zumpt, 1965) لاروهای زنده مرحله دوم (L2) و سوم (L3) شناسایی و از هم جداسازی شدند.

برای تهیه آنتی ژن پیکری (S) لاروها به طور جداگانه چندین بار در محلول نمکی بافردار یا PBS (pH = ۷/۲) آنتی‌بیوتیک‌دار (استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) شستشو داده شدند. لاروها به تعداد ۲ لارو L3 و ۱۰ لارو L2 ابتدا به روش دستی با اسکالپل تکه تکه و سپس به طور جداگانه در ۵ میلی‌لیتر بافر با دستگاه سونیکاتور با قدرت ۱۰ سیکل و هر سیکل به مدت ۱۵ ثانیه در ولتاژ ۸۰ همگن گردیدند. مخلوط همگن در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد با دور (g)۲۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع‌رویی جمع‌آوری شد. پس از سنجش غلظت پروتئین آن‌ها (مایع‌رویی) به روش برادفورد (Bradford, 1976) و انتقال به میکروتیوب‌های مشخص در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به عنوان آنتی‌ژن‌های پیکری (SL2 و SL3) نگهداری شدند (Cepeda-Palacios et al, 2000).

برای تهیه آنتی‌ژن دفعی ترشحی (ES)، پس از ۵-۴ بار شستشوی لاروها در PBS آنتی‌بیوتیک‌دار، تعداد ۵ لارو L3 و ۱۲ لارو L2 زنده به طور جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI- 1640، آنتی‌بیوتیک‌دار (استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) در داخل ظرف کشت قرار داده شد و به مدت حدود ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در حضور ۵ درصد گاز کربنیک (CO_2) گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از آن لاروها از محیط خارج و پس از سنجش غلظت پروتئین و انتقال به میکروتیوب‌های مشخص به عنوان آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی (ESL2، ESL3) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA)

تهیه گلبول قرمز گوسفند

با رعایت شرایط استریلیتی مقداری خون گوسفند از ورید وداج گرفته شد و به لوله استریل حاوی محلول سیترات دو سود منتقل گردید. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از خون سیتراته ۳ بار با ۱۰ برابر حجم از PBS مخلوط شد و در دور (g) ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید تا مایع رویی شفاف شود. با مخلوط کردن ۰/۵ میلی‌لیتر از رسوب گلبول‌های قرمز شسته شده با ۲۰ میلی‌لیتر از PBS، سوسپانسیون ۲/۵ درصد گلبول قرمز تهیه شد.

حساس کردن گلبول قرمز و افزودن آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی و پیکری

مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۲/۵ درصد گلبول قرمز با ۲۰ میلی‌لیتر محلول $\frac{۱}{۲۰۰۰۰}$ اسید تانیک به آرامی مخلوط گردید. مخلوط ۳۰ دقیقه در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و هر ۱۰ دقیقه یک بار به آرامی مخلوط شد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۷۰۰ سانتریفوژ گردید، و محلول رویی خارج و رسوب آن دو بار با PBS (pH = ۷/۲) شستشو داده شد. در ۴ لوله فالکن مقدار ۲۰ میلی‌لیتر گلبول قرمز ۲/۵ درصد حساس شده با

اسید تانیک ریخته شد و به هر لوله به طور جداگانه مقدار ۲ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی (ESL2، ESL3) یا آنتی‌ژن‌های پیکری (SL2 و SL3) اضافه و مخلوط گردید. لوله‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و هر ۱۵ دقیقه یک بار به آرامی مخلوط و پس از آن یک شب در یخچال نگهداری شدند. در ادامه، لوله‌های حاوی گلبول‌های قرمز حساس شده با آنتی‌ژن‌ها ابتدا به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس هرکدام ۲ بار با PBS شستشو شدند. به ۱ میلی‌لیتر از رسوب گلبول‌های قرمز حساس شده با آنتی‌ژن‌ها، ۹۹ میلی‌لیتر از بافر PBS حاوی ۰/۱ درصد سرم آلبومین گاوی (BSA) اضافه گردید. در نهایت از آن گلبول‌ها جهت آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم استفاده شد (Hay et al, 2002).

روش انجام آزمون هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA)

برای غیرفعال کردن کمپلمان، نمونه‌های سرم به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری در حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در انجام IHA از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای U شکل مخصوص هماگلوتیناسیون استفاده شد. ابتدا از نمونه‌های سرم در چاهک‌های پلیت با بافر فسفات (PBS)، رقت‌های متوالی دو برابر (۱:۲ تا ۱:۳۲) تهیه گردید. به طور خلاصه در مرحله اول در هر گوده، ۵۰ میکرولیتر بافر PBS ریخته و سپس در گودهای ردیف اول، ۵۰ میکرولیتر سرم اضافه شد که بعد از مخلوط کردن هر ردیف، ۵۰ میکرولیتر از مخلوط به ردیف بعدی منتقل و در نهایت بعد از رقت آخر، ۵۰ میکرولیتر از گوده آخر خارج شد. در مرحله دوم به هر یک از گوده‌های حاوی سرم، ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز حساس شده با آنتی‌ژن‌ها (دفعی – ترشحی و یا پیکری لاروهای L2 یا L3) اضافه گردید. هر نمونه از سرم یک بار نیز با گلبول قرمز حساس شده با BSA و فاقد آنتی‌ژن انگل آزمایش شد تا واکنش‌های غیراختصاصی سرم با گلبول سنجش شود.

برای مخلوط شدن محتویات چاهک‌ها، پلیت به مدت ۲ دقیقه شیکر و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه بی‌حرکت گذاشته شد. بعد از آن چنان چه رسوب به صورت تکمه (●) و یا به اشکال (⏺، ⭘، ○ و ○) بود نتیجه به ترتیب: منفی، +۱، +۲، +۳ و +۴ تلقی می‌شدند. عکس آخرین رقتی از سرم که حداقل ۵۰ درصد (+۲) آگلوتیناسیون داشت به عنوان عیار پادتن ضد آنتی‌ژن مورد استفاده ثبت می‌شد (Hay et al, 2002).

به این ترتیب تعداد ۳۰ نمونه سرم مثبت از بزهای آلوده به *استروس اویس* و ۳۰ نمونه سرم منفی از بزغاله‌ها با آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی (ESL2، ESL3) و آنتی‌ژن‌های پیکری (SL2 و SL3) لاروهای انگل مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی روش IHA برای تشخیص آلودگی به *استروس اویس* در بز با توجه با نتایج و تعیین حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت و منفی آن‌ها با هریک از ۴ آنتی‌ژن انجام شد (Trevethan et al, 2017).

پس از بررسی روش IHA و تعیین بهترین آنتی‌ژن‌ها برای تشخیص آلودگی *استروس اویس*، تعداد ۲۰۶ نمونه سرم از گله‌های بز منطقه بهبهان با بهترین آنتی‌ژن لاروهای L2 و L3 به صورت جداگانه مورد آزمایش قرار گرفتند و میزان شیوع سرمی آلودگی *استروس اویس* در بزان منطقه با آنتی‌ژن‌های فوق تعیین گردید.

نتایج

چنانچه در Table 1 نتایج غلظت پروتئین آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی و پیکری لاروهای L2 و L3 نشان داده شده است، بیش‌ترین غلظت مربوط به پروتئین‌های پیکری است.

Table 1: Protein concentrations of excretory-secretory (ES) and somatic (S) antigens *O. ovis* larvae

Type of antigens	Protein concentration (µg/ml)
ESL2	83
SL2	590
ESL3	72
SL3	301

نتایج آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA)

نتایج آزمایش IHA با استفاده از ۳۰ نمونه مثبت (آلوده به انگل) و ۳۰ نمونه منفی (غیرآلوده به انگل) و با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی و پیکری لاروهای L2 و L3 به طور جداگانه انجام شد. گرچه نتایج نشان دهنده وجود آنتی‌بادی ضد برخی از آنتی‌ژن‌ها، در تعدادی از نمونه‌های منفی بود اما تنها تعداد ۲۶ سرم نسبت به دو آنتی‌ژن (دفعی ترشحی و پیکری) واکنش نداشتند که در محاسبه ویژگی آزمون مورد استناد قرار گرفتند. در نمونه‌های مثبت نیز با این که نتایج نشان دهنده عدم وجود آنتی‌بادی ضد برخی از آنتی‌ژن‌ها، در تعدادی از نمونه‌ها بود ولی فقط تعداد ۲۲ سرم نسبت به دو آنتی‌ژن واکنش داشتند که در محاسبه حساسیت آزمون مورد استناد قرار گرفتند. بنابراین با مشخص شدن تعداد مثبت واقعی و کاذب و نیز تعداد منفی واقعی و کاذب، شاخص‌های آزمون (حساسیت، ویژگی و ....) با فرمول‌های زیر محاسبه شد که نتایج آن در Table 2 & 3 نشان داده است.

Sensitivity = [a / (a + c)] × 100
Specificity = [d / (b + d)] × 100
Positive predictive value = [a / (a + b)] × 100
Negative predictive value = [d / (c + d)] × 100

Table 2: The results of detecting anti-*Oetreus ovis* antibodies in 48 goat serum (26 non-ifected and 22 infected) samples by using the IHA method, excretory-secretory (ES), and somatic (S) antigens of larvae (L2, L3).

Type of antigens	True positives(a)	False positives(b)	True negatives(d)	False negatives(c)	Total
ESL2	20	4	22	2	48
SL2	18	1	25	4	48
ESL3	19	0	26	3	48
SL3	5	2	24	17	48

Table 3: IHA test indicators using excretory-secretory (ES) and somatic (S) antigens from L2 and L3 larvae to detect anti-*Oestrus ovis* antibodies in goat sera.

Type of antigens	Sensitivity%	Specificity %	Positive predictive value%	negative predictive value%
ESL2	91	85	83	92
SL2	82	96	95	86
ESL3	86	100	100	90
SL3	23	92	71	59

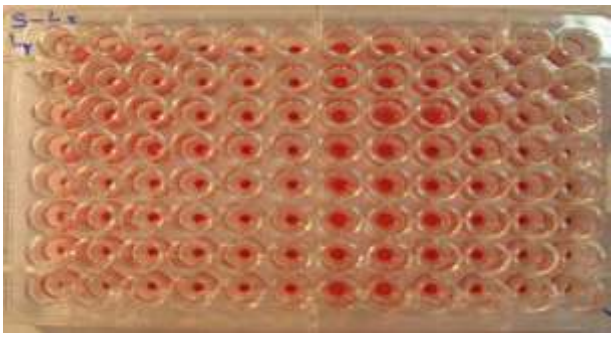

Figure 1: Indirect hemagglutination test for detection of anti- *O. ovis* (somatic antigen of L2 larvae) antibodies in goat sera.

نتایج شیوع سرمی آلودگی به *استروس اویس* در بزان منطقه بهبهان با IHA

نتایج آزمایش تعداد ۲۰۶ نمونه سرم تهیه شده از بزان منطقه بهبهان با استفاده از روش IHA با آنتی‌ژن دفعی- ترشحی لاروهای L2 و L3 به طور جداگانه و باهم مورد آزمایش قرار گرفتند و میزان شیوع سرمی آلودگی بزان منطقه بهبهان به *استروس اویس* تعیین گردید (Table 4).

همان گونه که در Table 4 مشاهده می‌شود، بزهای بیش‌تری نسبت به آنتی‌ژن دفعی- ترشحی L2 واکنش نشان داده‌اند و استفاده از این آنتی‌ژن در آزمون‌های سرمی ارجح ارزیابی می‌گردد. نتایج نشان داد که در ۷۵ نمونه سرم بز آنتی‌بادی ضد هر دو آنتی‌ژن وجود دارد که نشان دهنده وجود حداقل ۳۶/۴ درصد شیوع سرمی آلودگی *استروس اویس* در بزهای منطقه بهبهان است.

Table 4: The seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in goats of the Behbahan by IHA method using excretory-secretory antigens of L2 and L3 larvae

Type of antigens	Number of sera	Infected animals (positives%)	Uninfected animals (negatives%)
ESL2	206	123 (59.7%)	83 (40.3%)
ESL3	206	89 (43.2%)	117 (56.8%)
ESL2 and ESL3	206	75 (36.4%)	131 (63.6%)

بحث

چنانچه در مقدمه اشاره شد در تحقیقات متعددی از روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA) برای تشخیص و ردیابی آنتی‌بادی ناشی از آلودگی انواع متفاوتی از انگل‌ها در انسان و حیوانات استفاده شده است که با نتایج متفاوتی همراه بوده است. از این روش (IHA) در مقایسه با الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی در برابر آمیبیاز کبدی (Dhanalakshmi et al, 2016) و نیز بیماری هیداتید انسان با آنتی‌ژن‌های B و خام کیست هیداتید استفاده شده است. نتایج آن نشان داده است که IHA با آنتی‌ژن B (با حساسیت ۹۳/۷۵ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد) بهتر از آنتی‌ژن خام (با حساسیت ۶۵ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد) است و به عنوان روش سرولوژیکی با کارایی بالا برای تشخیص سرمی هیداتیدوز ارزشمند و مفید است (Vatankhah et al, 2004). در مطالعه‌ای با مقایسه روش الایزا و IHA با آنتی‌ژن‌های پیکری (S) و دفعی ترشحی (ES) برای تشخیص *فاسیولا هپاتیکا* در گوسفند، ویژگی روش الایزا با آنتی‌ژن‌های S یا ES، به ترتیب ۹۸ درصد یا ۹۵ درصد و برای روش IHA، ۸۶ درصد بوده است (Cornelissen et al, 1992). در مطالعه دیگری برای تشخیص آلودگی *سیستی‌سرکوس بویس* در گاو از آزمایش IHA با سه جزء پروتئینی (F1، F2 و F3) کرم بالغ *تنیا ساجیناتا* استفاده شده است. نتایج آزمایش با جزء F1، حساسیت ۸۸/۱ درصد و ویژگی ۸۷/۶ درصد و با آنتی‌ژن خام آن به ترتیب ۷۱/۲ درصد و ۸۰/۵ درصد را نشان داده است (Gathuma and Waiyaki, 1980). مطالعه‌ای هم با استفاده از روش IHA و آنتی‌ژن‌های محلول تخم *شیستوزوما ژاپونیکوم* برای ردیابی وجود آنتی‌بادی IgG در نمونه‌های خون در برابر آنتی‌ژن‌های محلول تخم *شیستوزوما ژاپونیکوم* در حیوانات اهلی اندونزی انجام شده است. نتایج حساسیت و ویژگی آن به ترتیب، ۸۸/۲۴ درصد و ۴۱/۳۷ درصد گزارش شده است (Budiono et al, 2020). آزمایش IHA برای تشخیص پاسخ ایمنی هومورال طیور واکسینه شده در برابر کوکسیدیوز نیز استفاده می‌شود (Akhtar et al, 2001; Bahrami et al, 2006). در مطالعه حاضر شاخص‌های ارزیابی آزمون IHA، حساسیت و ویژگی، برای آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لاروهای L2 *استروس اویس* در بزها به ترتیب ۸۳ درصد و ۸۵ درصد، و برای آنتی‌ژن پیکری آن به ترتیب ۸۲ درصد و ۹۵ درصد به دست آمد. همچنین حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن دفعی-ترشحی برای لاروهای L3 این انگل به ترتیب ۸۶ درصد و ۱۰۰ درصد و برای

آنتی‌ژن پیکری آن به ترتیب ۲۳ درصد و ۹۲ درصد به دست آمد.

مقایسه نتایج حساسیت و ویژگی به دست آمده از چهار نوع آنتی‌ژن مورد آزمایش نشان می‌دهد که اگرچه آنتی‌ژن-های پیکری لاروهای L2 و L3 دارای ویژگی نسبتاً مناسبی است، اما حساسیت آن در حد مناسبی به ویژه برای لارو-های L3 نیست. به طور کلی آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی نسبت به آنتی‌ژن پیکری از حساسیت و ویژگی نسبتاً بالاتری برخوردار می‌باشند. این موضوع ممکن است به دلیل سیر تکاملی انگل، تا حدود زیادی مربوط به نقش مواد دفعی-ترشحی در تغذیه لاروها و اختصاصی بودن این مواد باشد که حسب نیاز و طی زمان نسبتاً طولانی استقرار آن‌ها در حفره بینی و سینوس‌ها آزاد شده و احتمالاً پاسخ ایمنی بیش‌تری را بر می‌انگیزند.

چنان که در مطالعه‌ای با مقایسه ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی و پیکری (L2 و L3) *استروس اویس* در گوسفند به روش ایمونوبلاتینگ، به ایمنی‌زایی بیش‌تر مواد دفعی – ترشحی اشاره شده است (Alborzi et al, 2014).

در مطالعه دیگری با استفاده از روش ایمنودیفیوژن مضاعف با آنتی‌ژن پیکری (S) هر سه مرحله لاروی *اوستروس اویس* و نمونه‌های سرم گوسفند، میزان حساسیت برای لاروهای L1 (۴۲ درصد)، L2 (۵۹ درصد) و L3 (۱۸ درصد)، به دست آمده است. اما با روش IHA و آنتی‌ژن پیکری (S) هر سه مرحله لاروی انگل، میزان حساسیت برای لاروهای L1 و L2 (۱۰۰ درصد) و برای L3 (۹۷/۷ درصد)، گزارش شده است (Bautista et al, 1998). علت تفاوت میزان حساسیت روش IHA پژوهش فوق با نتایج مطالعه حاضر ممکن است با نوع میزبان و تفاوت روش کار مرتبط باشد. مقایسه نتایج روش‌های IHA و PCR در شناسایی حیوانات آلوده به *استروس اویس* نشان داده است که روش IHA برتری بیش‌تری نسبت به روش PCR باحساسیت (۲۶ درصد) و ویژگی (۱۰۰ درصد) دارد (Bello et al, 2022). با این حال در ارزیابی روش الایزا برای تشخیص *اوستروس اویس* در گوسفند (Alborzi et al, 2021) با توجه به حساسیت و ویژگی بیش‌تر آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی ترشحی لاروهای L2 (ESL2، SL2) نسبت به لاروهای L3، استفاده از آنتی‌ژن-های L2 به ویژه آنتی‌ژن پیکری به دلیل سهولت تهیه آن، برای تشخیص سرمی آلودگی به انگل توصیه شده است.

اغلب مطالعات انجام شده بر روی آلودگی به *استروس اویس*، در مناطق مختلف ایران و سایر کشورها، بر اساس یافته‌های کشتارگاهی و یا کالبدگشایی بوده است که با بررسی آلودگی به انگل در میزبان اصلی (گوسفند و بز) و یا میزبان تصادفی (انسان) انجام گرفته است (Jafari Shoorijeh el al, 2009; Jafari Shoorijeh el al, 2011; Abo-Shehada et al, 2003; Tavassoli et al, 2012; Dehghani et al, 2012; Biu et al, 1998). در بررسی‌های یاد شده، میزان آلودگی از ۱۳/۱ تا ۵۳/۸ متفاوت گزارش شده است.

مقایسه نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که میزان شیوع آلودگی به این انگل و مراحل لاروی آن می‌تواند بر اساس نوع حیوان، منطقه جغرافیایی، فصل، روش مطالعه (کشتارگاهی یا سرولوژی) متفاوت باشد. به طوری که در مطالعه حاضر میزان آلودگی بزان منطقه بهبهان با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم بر اساس آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی لاروهای L2 و L3 به ترتیب ۵۹/۷ درصد و ۴۳/۲ درصد و بر اساس موارد مثبت با هر دو آنتی‌ژن که ویژگی بالاتری دارد، ۳۶/۴ درصد برآورد گردید. با این حال میزان شیوع سرمی آلودگی به *استروس اویس* در گوسفندان ایلام و خوزستان با آزمون الایزا و آنتی‌ژن‌های پیکری L2، به ترتیب ۴۷/۴ درصد و ۴۴/۲ درصد و بر اساس فصول مختلف، متفاوت گزارش شده است (Alborzi et al, 2018) که با نتایج مطالعه حاضر نسبتاً همخوانی دارد. در مطالعه‌ای با روش الایزا و آنتی‌ژن L2 میانگین شیوع سرمی *استروس اویس* در گوسفندان جنوب غربی اسپانیا را ۴۶/۰۴ درصد گزارش کرده‌اند (Alcaide et al, 2005). حتی در مطالعه‌ای با روش الایزا و آنتی‌ژن غدد بزاقی لارو L3/*استروس اویس*، شیوع سرمی سالیانه استروزیس در بزهای منطقه‌ای از

مکزیک را ۷۳/۹ درصد تعیین نموده‌اند (Angulo-Valadez et al, 2009).

به طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر و اهمیت بهداشتی آن، وجود آلودگی بالای *اوستروس اویس* در بزان منطقه بیان‌گر اثرات و بیماری‌زایی آن در دام‌ها و همچنین اثرات چشمی، حلقی و بیماری‌زایی آن در انسان است. بنابراین می‌توان از آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی لاروهای L2 و L3 *استروس اویس* و روش IHA که روشی سریع و ارزان و بدون نیاز به کنژوگه‌های ضد آنتی‌بادی‌ها و دستگاه خاص است، برای تشخیص آلودگی در دام زنده (بز) به ویژه در گله‌های پرجمعیت دام و برای درمان، کنترل و کاهش خسارات ناشی از انگل در دام‌ها و نیز کاهش میاز استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همه کسانی که در روند اجرای این تحقیق یاری و مساعدت کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌ی این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

منابع

Abo-Shehada, M. N., Batainah, T., Abuharfeil, N., & Torgerson, P. R. (2003). *Oestrus ovis* larval myiasis among goats in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, *59*(1-2), 13-19.

Ahaduzzaman, M. (2019). The global and regional prevalence of oestrosis in sheep and goats: a systematic review of articles and meta-analysis. *Parasites & vectors*, *12*(1), 1-17.

Akhtar, M., & Ishaq, H.M. (2006). Effect of coccidiosis on the humoral response of chickens vaccinated against hydropericardium syndrome. *Online Journal of Veterinary Research*, *10*(1), 1-6.

Alborzi, A. R., Sharifi, H., Ghorbanpoor, M., & Pourmahdi Borujeni, M. (2018). Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in Southwest of Iran. *Iranian Journal of Ruminants Health Research*, *3*(1), 35-46.

Alborzi, A., Jolodar, A., Bagherian pour, E., & Shapouri, M. S. A. (2014). Isolation and identification of excretory-secretory and somatic antigens from the *Oestrus ovis* larvae by SDS-PAGE and immunoblotting. In *Veterinary Research Forum*, *5*(4), 307 - 311.

Alborzi, A.R, Ghorbanpour Najafabadi, M., & Yoosefvand, Z. (2021). Evaluation of an in-house enzyme linked immuonosorbent assay (ELISA) for detection of anti-Oestrus ovis antibodies in sheep. *Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences*, *14*(2): 67-76.

Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., & Navarrete, I. (2005). Analysis of larval antigens of *Oestrus ovis* for the diagnosis of oestrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Medical and veterinary entomology*, *19*(2), 151-157.

Angulo-Valadez, C. E., Cepeda-Palacios, R., Ascencio, F., Jacquiet, P., Dorchies, P., & Ramírez-Orduña, J. M. (2009). Relationships of systemic IgG antibody response and lesions caused by *Oestrus ovis* larvae (Diptera: Oestridae) in infected goats. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, *10*(11), 1-13.

Bahrami, A. M., & Bahrami, A. (2006). Immune response of chicken to an experimental sonicated coccidia oocyst vaccine. *Archives of Razi Institute*, *61*(1), 48-53.

Bautista-Garfias., C. R., Angulo-Conteras, R. M., & Garay-Garzon, E. (1988). Serologic diagnosis of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in naturally infested sheep. *Medical and Veterinary Entomology*, *2*(4), 351-355.

Bello, H. J. S., Lins, J. G. G., da Silva, N. M. M., de Albuquerque, A. C. A., Amarante, M. R. V., Neto, V. A. K., & Amarante, A. F. (2022). Diagnosis of Oestrus ovis infestation in sheep by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, *310*, 109789.

Biu, A. A., & Nwosu, C. O. (1999). Incidence of *Oestrus ovis* infestation in Borno-White Sahel goats in the semi-arid zone of Nigeria. *Veterinary research*, *30*(1), 109-112.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.

Budiono, N. G., Murtini, S., Satrija, F., Ridwan, Y., & Handharyani, E. (2020). Humoral responses to Schistosoma japonicum soluble egg antigens in domestic animals in Lindu Subdistrict, Central Sulawesi Province, Indonesia. *International Journal of One Health*, *6*, 99-108.

Cepeda-Palacios, R., Frugère, S., & Dorchies, P. (2000). Expected effects of reducing *Oestrus ovis* L. mature larval weight on adult populations. *Veterinary Parasitology*, *90*(3), 239-246.

Cornelissen, J. B. W. J., De Leeuw, W. A., & Van der Heijden, P. J. (1992). Comparison of an indirect haemagglutination assay and an ELISA for diagnosing *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected sheep. *Veterinary Quarterly*, *14*(4), 152-156.

Dehghani, R., Sedaghat, M. M., Esmaeli, N., & Ghasemi, A. (2012). Myiasis among slaughtered animals in Kashan, Iran: descriptive a veterinary entomological problem in the tropics. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, *4*(1), 19-28.

Dhanalakshmi, S., Meenachi, C., & Parija, S. C. (2016). Indirect haemagglutination test in comparison with ELISA for detection of antibodies against invasive amoebiasis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, *10*(8), 5-8.

Gathuma, J. M., & Waiyaki, P. G. (1980). Evaluation of the indirect haemagglutination test (IHA) in diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis (*Cysticercus bovis*) infection in cattle. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, *28*(3), 173-189.

Goddard, P., Bates, P., & Webster, K. A. (1999). Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infections in sheep. *Veterinary record*, *144*(18), 497-501.

Hay Frank, C., & Westwood Olwyn, M. R. (2002). Practical immunology (4th Edition) Oxford: Blackwell scientific publications. *PP*, 102-108.

Krupp, I. M. (1974). Haemagglutination test for the detection of antibodies specific for *Ascaris* and *Toxocara* antigens in patients with suspected visceral larva migrans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *23*(3), 378-384.

Moţ, D. (2012). The Antigenic structure characterization of *Oestrus ovis* larvae. *Animal Science and Biotechnology*, 45(1), 314-318.

Pirouz, M. S., Tirgari, S., & AghaMohammadi, A. (1977). A case of ophthalmomyiasis in man by *Oestrus ovis* Linncacus in Tehran (Insecta Diptcra, Oestridae). *Acta Medica Iranica*, 19-26.

Pupić-Bakrač, A., Pupić-Bakrač, J., Škara Kolega, M., & Beck, R. (2020). Human ophthalmomyiasis caused by *Oestrus ovis*—first report from Croatia and review on cases from Mediterranean countries. *Parasitology research*, *119*(3), 783-793.

Shoorijeh, S. J., Negahban, S., Tamadon, A., & Behzadi, M. A. (2009 a). Prevalence and intensity of *Oestrus ovis* in sheep of Shiraz, southern Iran. *Tropical Animal Health and Production*, *41*(7), 1259-1262.

Shoorijeh, J. S., Tamadon, A., Negahban, S. H., & Behzadi, M. (2011b). Prevalence of *Oestrus ovis* in goats of Shiraz, southern Iran. *Veterinarski arhiv*, *81*(1), 43-49.

Tabouret, G., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Dorchies, P., & Jacquiet, P. (2001). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDa antigen complex from second and third instar larvae. *Veterinary Parasitology*, *101*(1), 53-66.

Tavassoli, M., Tajik, H., Malekifard, F., Soleimanzadeh, A., & Mardani, K. (2012). Seasonal infestation of *Oestrus ovis* larvae in slaughtered sheep in Urmia, Iran. *Iranian Veterinary Journal*, *7*(4): 73-78.

Trevethan, R. (2017). Sensitivity, specificity, and predictive values: foundations, pliabilities, and pitfalls in research and practice. *Frontiers in public health*, *5*, 307.

Vatankhah, A., Assmar, M., Shokrgozar, M. A., Hoseini, S. T., & Rastaghi, A. E. (2004). Introduction of an indirect haemagglutination test as a rapid diagnostic method in comparison with elisa using antigen b for diagnosis of human hydatid disease. *Iranian Journal of Public Health*, *33*(4), 16-25.

Zumpt, F. (1965). Myiasis in man and animals in the Old World. A textbook for physicians, veterinarians and zoologists. *Myiasis in Man and Animals in the Old World. A Textbook for Physicians, Veterinarians and Zoologists.PP*, 267-270.

Received: 02.01.2023
Accepted: 07.03.2023

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2023.378594.2539

Evaluation of an indirect hemagglutination method (IHA) with larval antigens for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infestations in goats

Alireza Alborzi[1*], Leila Kharrati[2], Masoud Ghorbanpoor[3] and Mohammad Hossein Razi Jalali[4]

[1] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Msc. Graduated, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 02.01.2023 Accepted: 07.03.2023

Abstract

Oestrus ovis (sheep nasal bot-fly) is one of the important zoonotic parasites of small ruminants. Human ophtalmo- nasopharyngeal myiasis caused by *O. ovis* larvae have been reported in Iran and other countries. In this study, excretory-secretory (ES) and somatic (S) antigens of *O. ovis* larvae were evaluated for serodiagnosis of the infestation in goats by indirect haemagglutination (IHA). After tagging and blood sampling of goats in the slaughterhouse, the third and second larval stages of *O. ovis* (L2 and L3) were collected from their cut horns. For the preparation of somatic antigens (SL2 and SL3), the larvae were homogenized separately in test tube with a homogenizer, then centrifuged and the supernatant was collected. For the preparation of ES-antigens (ESL2/ESL3), the larvae were separately incubated in RPMI media with antibiotics for 48 hours. With 30 positive sera (from infested goats), 30 negative sera (from kids) and the antigens, the IHA method was evaluated for diagnosis of *O. ovis* infestation in goats. Based on IHA tests performed on ESL2 and SL2 antigens, sensitivity and specificity rates were 91% and 85%, and 82% and 96%, respectively. Based on the IHA results, using Sl3 and ESL3 antigens, the sensitivity and specificity were 86% and 100%, and 23% and 92%, respectively. A total of 206 sera samples from goats in Behbahan (Khuzestan) were tested for serodiagnosis of *O. ovis* infestations by IHA using ESL2 and ESL3 antigens. Results of IHA using ESL2 and ESL3 showed seroprevalences of *O.ovis* infestation in the animals at 59.7% and 43.2% respectively. According to the results of this study, IHA with ESL2 and ESL3 antigens can be used with indirect hemagglutination as a rapid, inexpensive detection method, especially in goats for treatment and control, minimizing their economic losses, as well as in humans for reducing myiasis.

Key words: *Oestrus ovis*, Goats, Indirect haemagglutination, IHA, Khuzestan

[*] **Corresponding Author**: Alireza Alborzi, Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: a.alborzi@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).