طراحی و ارزیابی الایزای غیر مستقیم برای تشخیص آلودگی به *لینگواتولا سراتا* در گوسفند

علیرضا البرزی[۱*]، مسعود قربانپور[۲]، حسین حمیدی‌نجات[۳]، مهدی پورمهدی‌بروجنی[۴] و امین مهدی‌زاده[۵]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۲۴

چکیده

لینگواتولا سراتا انگلی با گسترش جهانی و از بیماری‌های زئونوتیک است. انگل بالغ در مجاری بینی سگسانان (میزبان اصلی) و مراحل لاروی آن در کبد، ریه و گره‌های لنفی مزانتری نشخوارکنندگان (میزبان واسط) زندگی می‌کند. انسان با خوردن تخم یا نوچه آن مبتلا می‌شود. آلودگی آن در میزبان واسط فاقد نشانه بالینی است. تا کنون روش سرولوژیکی برای تشخیص آن در دام‌ها به ویژه علفخواران ارائه نشده است، بنابراین هدف از این مطالعه که برای اولین بار انجام شده است، طراحی و ارزیابی الایزا برای تشخیص آلودگی *لینگواتولا سراتا* در گوسفند و با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی و پیکری نوچه‌ی انگل بود. آنتی‌ژن پیکری از نوچه‌های جمع‌آوری شده از گره‌های لنفی مزانتر گوسفند و هموژنیزه کردن ۲۵۰ نوچه در ۱۰ میلی‌لیتر PBS- RPMI-1640 و آنتی‌ژن دفعی ترشحی نیز با کشت ۲۰۰ نوچه در ۱۰میلی‌لیتر RPMI-1640 به دست آمد. رقت‌های مناسب سرم، کنژوگه ضد IgG گوسفند، آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی ترشحی به ترتیب ۱:۱۰۰، ۱:۵۰۰۰، ۱:۴۰ و ۱:۴ تعیین شد. برای ارزیابی الایزا، ۷۳ نمونه سرم مثبت از گوسفندان آلوده به نوچه‌ی انگل و ۴۸ نمونه‌ی سرم منفی بره‌های ۳-۲ ماهه از گله‌های فاقد سگ (در مجموع ۱۲۱ نمونه) استفاده شد. حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت، ارزش پیشگویی منفی و دقت آزمون الایزا با آنتی‌ژن پیکری به ترتیب ۹۰/۴ درصد، ۷۵ درصد، ۸۴/۶ درصد، ۸۳/۷ درصد و ۸۴/۲ درصد، با آنتی‌ژن دفعی ترشحی نیز به ترتیب ۸۹ درصد، ۹۳/۸ درصد، ۹۵/۶ درصد، ۸۴/۹ درصد و ۹۰/۹ درصد برآورد گردید. آنالیز داده‌ها با SPSS و آزمون مک نمار نشان داد که آنتی‌ژن دفعی ترشحی انگل برای ردیابی آنتی‌بادی ضد آن در گوسفند بر آنتی‌ژن پیکری برتری دارد. بنابراین، آزمون الایزا با به کارگیری آنتی‌ژن دفعی ترشحی نوچه‌های *لینگواتولا سراتا* می‌تواند برای پایش آلودگی در گوسفند به ویژه در مطالعات همه‌گیری‌شناسی و سایر میزبانان نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *لینگواتولا سراتا*، گوسفند، آنتی‌ژن پیکری، آنتی‌ژن دفعی ترشحی، الایزا

مقدمه

لینگواتولا سراتا انگلی با گسترش جهانی است به طوری که، آلودگی به این انگل در آسیا، خاورمیانه، آمریکا، اروپا و آفریقا گزارش و اثبات شده است. انگل بالغ در بینی و مجاری هوایی سگسانان و به ندرت انسان یافت می‌شود. میزبانان واسط حساس آن نشخوارکنندگان و گاهی انسان می‌باشند (Soulsby 1982). این انگل یکی از عوامل زئونوتیک محسوب می‌شود و آلودگی انسان به مرحله تخم انگل سبب لینگواتولوز احشائی می‌گردد که ضایعات ناشی از آن به ویژه در ریه می‌تواند با ضایعات سل و تومورهای بدخیم اشتباه شود (Tappe and Buttner 2009). مواردی هم از وجود نوچه‌ی انگل در چشم انسان گزارش شده است (Koehsler et al. 2011, Pal et al. 2011). آلودگی به مرحله‌ی نوچه‌ای متعاقب خوردن احشاء آلوده‌ی خام یا نیم‌پز نشخوارکنندگان سبب

[۱*] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: Alirezaalborzi@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۴] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۵] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

ایجاد سندرم هالزون یا لینگواتولوز نازوفارنژیال می‌شود. موارد آلودگی انسان از کشورهای مختلف جهان گزارش شده است (Morsy et al. 1999, Tappe and Buttner 2009, Yilmaz et al. 2011). در ایران نیز گزارش‌هایی از آلودگی انسان وجود دارد (Anaraki et al. 2008, Maleky 2001, Sadjjadi et al. 1998, Siavashi et al. 2002) آلودگی سگ به فرم بالغ انگل ممکن است فاقد و یا با نشانه‌های درمانگاهی، عطسه، سرفه مداوم و ترشحات موکوسی اغلب خون‌آلود از بینی همراه باشد (Soulsby 1982). در نشخوارکنندگان، انگل می‌تواند باعث تغییرات پاتولوژیک کبد و ریه شود (نعمت‌الهی و همکاران ۱۳۸۳، Saiyari et al. 1996) . آلودگی در گوسفند و سایر میزبان‌های واسط آن فاقد نشانه‌های بالینی بوده و اثرات آن روی تولید دام، نامحسوس و خسارات اقتصادی آن نامعلوم است. تشخیص آلودگی و مطالعات شیوع انگل در مناطق مختلف ایران و جهان در این حیوانات با بررسی‌های کشتارگاهی، کالبدگشائی، لاپاراتومی اکتشافی، بیوپسی و آزمایشات هیستوپاتولوژی صورت می‌گیرد (Alborzi et al. 2013, Esmaeilzadeh et al. 2008, Nourollahi Fard et al. 2011, Oryan et al. 2011, Razavi et al. 2004, Tajik and Jalali 2010). براساس اطلاعات در دسترس، تاکنون روش سرمی الایزا برای ردیابی *لینگواتولا سراتا* در میزبان‌های واسط از جمله گوسفند استفاده نشده است. مطالعه‌ی Jones و Riley در سال ۱۹۹۱ تنها موردی است که در کاربرد الایزا برای ردیابی آلودگی *پوروسفالوس کروتالی* (پتاستومید) در موش‌های صحرایی آزمایشگاهی انجام گرفته است. استفاده از آزمایش تست پوستی در تشخیص آلودگی گوسفند به نوچه‌ی *لینگواتولا سراتا*، نیز با موفقیت کامل همراه نبوده است (کافی احمدی و همکاران ۱۳۸۳). با توجه به این که برنامه‌های درمانی، کنترل و پیش‌گیری هر انگلی نیازمند آگاهی از همه‌گیری‌شناسی و به ویژه شناسایی آن در دام‌های منطقه می‌باشد؛ بنابراین هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، طراحی و ارزیابی آزمون الایزا برای تشخیص آلودگی به *لینگواتولا سراتا* در گوسفند به عنوان یکی از میزبان‌های واسط مهم آن و با استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی- ترشحی مرحله‌ی نوچه‌ای این انگل، جهت ردیابی و شناسائی آلودگی به این انگل (*لینگواتولا سراتا*) در دام‌های زنده بود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ی خون و تهیه‌ی سرم آلوده و غیرآلوده

جمع‌آوری سرم از گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه دام شهرستان بروجرد انجام گرفت. ابتدا قبل از ذبح، تعدادی از گوسفندان با گیره‌های مخصوص شماره‌گذاری می‌شدند، سپس در هنگام ذبح خون هر یک از آن‌ها در یک لوله‌ی استریل مشخص (شماره‌گذاری شده) جمع‌آوری می‌گردید. پس از طی مراحل آماده‌سازی لاشه برای بازرسی، تعدادی گره‌ی لنفی مزانتر (بین ۲۰ تا ۳۰ گرم) از همان گوسفند جمع‌آوری می‌شد و در کیسه‌ی پلاستیکی مشخص به آزمایشگاه منتقل می‌گردید.

در آزمایشگاه، خون‌های اخذ شده سانتریفوژ (۲۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) گردیدند و سرم آن‌ها به طور جداگانه در میکروتیوب‌های شماره‌گذاری شده، در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تعیین آلودگی به نوچه‌ی لینگواتولا، هر یک از نمونه‌های گره‌ی لنفاوی، جداگانه و براساس شماره با استفاده از استریومیکروسکوپ و یا هضم در اسید - پپسین مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت مشاهده تعدادی نوچه‌ی انگل، سرم آن به عنوان آلوده (سرم مثبت) در نظر گرفته می‌شد. با این روش تعداد ۷۳ نمونه سرم مثبت از گوسفندان آلوده به مراحل نوچه‌ای انگل جمع‌آوری شد. تعداد ۴۸ نمونه سرم منفی نیز از بره‌های شیر خوار ۳-۲ ماهه که در زمستان به دنیا آمده و کم‌تر در معرض آلودگی میزبان اصلی انگل (سگ‌ها) قرار گرفته بودند، تهیه گردید.

تهیه‌ی آنتی‌ژن پیکری نوچه *لینگواتولا سراتا*

برای تهیه‌ی آنتی‌ژن پیکری، گره‌های لنفی تعداد زیادی از گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه، طی چندین مرحله نمونه‌گیری به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی اهواز انتقال داده شد. به طور مستقیم و یا با استفاده از استریومیکروسکوپ، با قلم مو نوچه‌های زنده جمع‌آوری و به یک پتری دیش حاوی محلول بافر نمکی (PBS) انتقال داده شد. نوچه‌های زنده جمع‌آوری شده، ۲ بار با PBS معمولی و ۳ بار با PBS آنتی‌بیوتیک‌دار شستشو داده شدند. تعدادی از نوچه‌ها، برای تهیه‌ی آنتی‌ژن دفعی ترشحی جدا نگهداری شدند. برای تهیه‌ی آنتی‌ژن پیکری، تعداد حدود ۲۵۰ نوچه در ۱۰ میلی‌لیتر محلول به نسبت مساوی PBS و RPMI-1640 قرار داده شد و ابتدا در زیر هود با اسکالپل استریل تکه‌تکه شدند و سپس با دستگاه سونیکاتور (بندلین، آلمان) با قدرت ۱۰ سیکل و هر سیکل به مدت ۱۵ ثانیه در ولتاژ ۸۰ سونیکه و همگن‌سازی شدند. بعد از آن، محلول حاصل، سانتریفوژ (۲۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) گردید و مایع روئی جمع‌آوری و با فیلتر ۰/۲ میکرون پالایش شد. غلظت پروتئین مایع جمع‌آوری شده، به روش برادفورد اندازه‌گیری گردید. آنتی‌ژن حاصله در تعدادی میکروتیوب توزیع و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه‌ی آنتی‌ژن دفعی - ترشحی نوچه‌های *لینگواتولا سراتا*

برای تهیه‌ی آنتی‌ژن دفعی- ترشحی، تعداد ۲۰۰ نوچه‌ی زنده در ۱۰ میلی‌لیتر RPMI-1640 آنتی‌بیوتیک‌دار، در داخل ظرف کشت قرار داده شد و در انکوباتور CO_2 دار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم-خانه‌گذاری شد؛ سپس نوچه‌ها از محلول (محیط کشت) جدا و مایع باقی‌مانده با فیلتر ۰/۲ پالایش و غلظت پروتئین آن به روش برادفورد اندازه‌گیری و به عنوان آنتی‌ژن دفعی- ترشحی در تعدادی میکروتیوب توزیع و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمایش دات الایزا

برای ارزیابی اولیه نمونه‌های مثبت و منفی و به دست آوردن سرم‌های مثبت و منفی مطمئن از روش دات الایزا استفاده شد. در این آزمایش ۳ نمونه مثبت و ۳ نمونه‌ی منفی به صورت تصادفی از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، انتخاب و به ازاء هر یک از نمونه‌ها روی کاغذ نیتروسلولز در سه نقطه‌ی ۱ میکرولیتر از آنتی‌ژن پیکری با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ریخته شد. پس از خشک شدن به مدت ۴۵ دقیقه در محیط شیر پس چرخ در دمای اتاق گذاشته شد. پس از شستشوی کاغذها با PBS هر یک در ظروف مجزا و در رقت‌های مختلف سرم (۵۰ :۱، ۱:۲۵، ۱۲/۵: ۱) قرار گرفته و به مدت ۴۵ دقیقه، روی دستگاه شیکر قرار داده شدند. بعد از آن سه بار شستشو در PBS معمولی هر بار به مدت یک دقیقه انجام شد، سپس در رقت ثابت (۲۰۰۰ :۱) کنژوگه (ضد IgG گوسفندی) (سیگما، امریکا) غوطه‌ور شدند و بعد از ۴۵ دقیقه و سه بار شستشو با PBS، کاغذها در محلول کروموژن - سوبسترا (کلرونفتول و آب اکسیژنه) (مرک، آلمان) قرار داده شد و نتیجه خوانده شد. با این روش و براساس شدت رنگ ایجاد شده در محل بارگذاری آنتی-ژن، سرم‌های با درجات مختلف مثبت قوی، متوسط، ضعیف و منفی و برای آزمایش الایزا به دست آمد.

تعیین رقت‌های مناسب آنتی‌ژن، کنژوگه و سرم جهت آزمایش الایزا

با استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی- ترشحی نوچه‌ها، سرم‌های مثبت و منفی تهیه شده، رقت‌های مناسب اجزای آزمون الایزا به شرح ذیل تعیین شد:

بهترین رقت آنتی‌ژن برای پوشش‌دهی و بهترین رقت سرم و کنژوگه در آزمون الایزا به طور جداگانه برای هر یک از آنتی‌ژن‌ها، توسط روش تیتراسیون جدول متقاطع (چکر بورد) تعیین گردید. برای آنتی‌ژن پیکری با میزان پروتئین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، با بافر پوشاننده (۱/۷

گرم کربنات سدیم و ۲/۸۶ گرم بیکربنات با آب مقطر در حجم یک لیتر) ۴ رقت شامل: ۱:۲۰، ۱:۴۰، ۱:۸۰ و ۱:۱۶۰ و برای کنژوگه ضد IgG گوسفندی ۲ رقت ۱:۳۰۰۰ و ۱:۵۰۰۰ آزمایش شدند. رقت‌های مختلف ارزیابی شده‌ی سرم‌های مثبت و منفی مطمئن شامل رقت‌های ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰ بودند. برای آنتی‌ژن دفعی ترشحی با توجه به میزان پروتئین آن (۲۶ میکروگرم در میلی‌لیتر)، رقت‌های ۱:۴، ۱:۸ و ۱:۱۶ ارزیابی شدند. برای تعیین بهترین بلوک کننده نیز شیر پس چرخ ۵ ، ۸ و ۱۰ درصد مورد آزمایش قرار گرفت.

ارزیابی نمونه‌های سرم جمع‌آوری شده با آزمون الایزای طراحی شده

پس از برآورد مناسب‌ترین رقت کنژوگه، آنتی‌ژن، سرم و بلوک‌کننده‌ی مناسب، در مجموع ۱۲۱ نمونه سرم جمع‌آوری شده (تعداد ۷۳ نمونه سرم مثبت از گوسفندان آلوده به مراحل نوچه‌ای انگل و تعداد ۴۸ نمونه منفی از بره‌های ۳-۲ ماهه با آزمون الایزای طراحی شده به شرح ذیل مورد آزمایش قرار گرفتند:

برای این کار، از رقت مناسب هر آنتی‌ژن (پیکری ۱:۴۰ و دفعی ترشحی ۱:۴)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک پلیت (Nunc، دانمارک) اضافه شد و پلیت با پارافیلم پوشانده شد و یک شب در یخچال (۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس یک مرحله شستشو با PBS انجام گرفت. در مرحله‌ی بلوکینگ ۲۵۰ میکرولیتر محلول شیر بدون چربی ۸ درصد به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه گذاشته شد. در مرحله‌ی بعد، پس از یک مرحله شستشو با PBS، سرم‌ها نیز با محلول رقیق کننده (PBS حاوی ۸ درصد شیر بدون چربی) در رقت مناسب تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر سرم رقیق شده، در هر چاهک پلیت ریخته شد و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. پس از ۵ بار شستشو (۳ بار با PBS توئین و ۲ بار با PBS)، به همه‌ی چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کنژوگه (سیگما، امریکا) با رقت ۱:۵۰۰۰ در PBS حاوی ۸ درصد شیر بدون چربی اضافه و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، پس از ۵ بار شستشو (همانند مرحله‌ی قبل)، کروموژن - سوبسترا (تترامتیل بنزیدین یا MTB + آب اکسیژنه، N Biotech، کره‌ی جنوبی) به میزان ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت در محلی تاریک به مدت، ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. در آخرین مرحله با افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول اسید سولفوریک ۲ نرمال واکنش متوقف و دانسیته‌ی نوری چاهک‌های پلیت در دستگاه خوانشگر الایزا (Dynatech، هلند) در طول موج ۴۵۰ نانومتر، خوانده و ثبت شد.

تعیین نقطه‌ی برش و شاخص‌های ارزیابی آزمون الایزا

برای محاسبه‌ی نقطه‌ی برش (Cut off) و تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون مک نمار (Mc Nemar) و نسخه‌ی ۱۶ نرم‌افزار SPSS استفاده شد. با استفاده از داده‌های به دست آمده از بررسی ۷۳ نمونه‌ی سرم مثبت (آلوده به *لینگواتولا سراتا*) و ۴۸ نمونه‌ی منفی از بره‌های غیر آلوده، شاخص‌های ارزیابی: حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت، ارزش پیشگویی منفی و دقت برای تشخیص آلودگی به این انگل در گوسفندان به روش الایزا با استفاده از فرمول‌های مربوطه تعیین گردید.

نتایج

رقت مناسب آنتی‌ژن، کنژوگه و سرم

نتایج اندازگیری غلظت پروتئین آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی- ترشحی نوچه *لینگواتولا سراتا*، به ترتیب ۱۰۰ و ۲۶ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. از بین ۴ رقت آنتی‌ژن پیکری آزمایش شده، رقت ۱:۴۰ (۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) و برای آنتی‌ژن دفعی- ترشحی رقت ۱:۴ (۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) بهترین رقت تعیین شدند.

هم‌چنین از ۲ رقت ۱:۳۰۰۰ و ۱:۵۰۰۰ کنژوگه، رقت ۱:۵۰۰۰ بهترین رقت نشان داده شد. بهترین رقت سرم‌های گوسفندان مورد آزمایش ۱:۱۰۰ تعیین گردید. از ۳ رقت ۵، ۸ و ۱۰ درصد بلوک کننده (شیر پس چرخ) آزمایش شده نیز بهترین رقت ۸ درصد تعیین شد.

نتایج آزمایش الایزا نمونه‌های سرم

از کل ۱۲۱ نمونه سرمی (۷۳ نمونه مثبت و ۴۸ نمونه منفی) پس از تعیین میزان نقطه برش، با استفاده از موارد نمونه‌های مثبتی که نوچه‌ی انگل در بررسی گره‌ی لنفی آن‌ها مشاهده شده بود (به عنوان استاندارد طلایی) و هم-چنین آزمون مک نمار، نتایج آزمون الایزای طراحی شده برای تشخیص آلودگی *لینگواتولا سراتا* در گوسفندان با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی و پیکری نوچه‌ی انگل به دست آمد که در جداول ۱ و ۲ خلاصه شده است.

جدول ۱: نتایج آزمون الایزا با آنتی‌ژن دفعی ترشحی نوچه‌ی انگل برای تشخیص آلودگی سرمی به *لینگواتولا سراتا* در ۱۲۱ سرم گوسفند

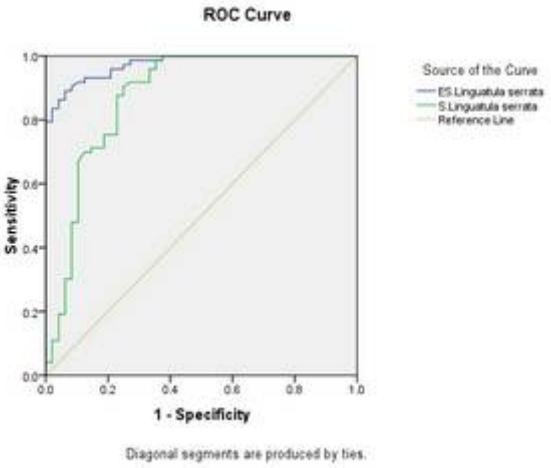
نتیجه‌ی الایزا	تشخیص (واقعیت)		جمع
	آلوده	غیرآلوده	
مثبت	۶۵	۳	۶۸
منفی	۸	۴۵	۵۳
جمع	۷۳	۴۸	۱۲۱

جدول ۲: نتایج آزمون الایزا با آنتی‌ژن پیکری نوچه انگل برای تشخیص آلودگی سرمی به *لینگواتولا سراتا* در ۱۲۱ سرم گوسفند

نتیجه‌ی آزمون	تشخیص (واقعیت)		جمع
	آلوده	غیر آلوده	
مثبت	۶۶	۱۲	۷۸
منفی	۷	۳۶	۴۳
جمع	۷۳	۴۸	۱۲۱

شاخص‌های ارزیابی کیت الایزای طراحی شده

در جدول ۳، شاخص‌هایی چون: حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی مثبت و منفی و دقت آزمون الایزا طراحی شده در برابر بررسی آلودگی به صورت کالبدگشایی و دیدن نوچه‌ی انگل (به عنوان استاندارد طلایی) نشان داده شده است.



شکل ۱: منحنی راک[1] (ROC)، سطح زیر منحنی نشان‌دهنده‌ی حساسیت و ویژگی آزمون الایزای طراحی شده برای تشخیص آلودگی *لینگوتولا سراتا* در گوسفند با آنتی‌ژن دفعی – ترشحی (ES) و پیکری (S) مرحله‌ی نوچه‌ای انگل

با توجه به شکل ۱ (منحنی راک ROC)، سطح زیر منحنی آزمون‌های انجام شده با آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی و پیکری با مقایسه‌ی آماری مقادیر حساسیت و ویژگی هر آزمون در نقطه‌ی برش به دست آمده توسط آزمون مک نمار با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد (در سطح معنی‌داری ۰/۰۵=آلفا) کمی تفاوت دارند. به طوری که برای آنتی‌ژن دفعی- ترشحی سطح زیر منحنی با برآورد فاصله‌ای ۰/۹۹۶-۰/۹۵۳ و برآورد نقطه‌ای ۰/۹۷۴ و با سطح زیر منحنی برای آنتی‌ژن پیکری با برآورد فاصله‌ای ۰/۹۴۶-۰/۸۰۰ و برآورد نقطه‌ای ۰/۸۷۳ به دست آمد.

1- Receiver Operating Characteristic (ROC)

منحنی راک، مقادیر مثبت حقیقی (حساسیت) و مثبت کاذب (ویژگی) را در تمام نقاط برش ممکن نشان داد. بهترین نقطه‌ی برش که حساسیت و ویژگی در آن با آنتی‌ژن دفعی ترشحی حداکثر می‌باشد، ۰/۳ و برای آنتی‌ژن پیکری، ۰/۴۸ تعیین شد.

جدول ۳: شاخص‌های آزمون الایزای طراحی شده برای تشخیص آلودگی به *لینگواتولا سراتا* در گوسفندان با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی و پیکری نوچه‌ی انگل

نوع آنتی‌ژن	حساسیت	ویژگی	ارزش پیشگویی مثبت	ارزش پیشگویی منفی	دقت
پیکری	۹۰/۴	۷۵	۸۴/۶	۸۳/۷	۸۴/۲
دفعی ترشحی	۸۹/۰۴	۹۳/۷۵	۹۵/۵۸	۸۴/۹	۹۰/۹

بحث

مطالعات کشتارگاهی با بررسی گره‌های لنفی حیوانات و جداسازی نوچه *لینگواتولا سراتا* در برخی مناطق ایران (یاسوج، خرم‌آباد، بروجرد، اهواز، آذربایجان شرقی، تبریز، ارومیه، شیراز، کرمان و نجف‌آباد، بابل و مازندران) حاکی از شیوع قابل توجه از ۰/۳۸ تا ۵۲/۵ درصدی لینگواتولوز نشخوارکنندگان در مناطق فوق می‌باشد، به طوری که شیوع آلودگی به *لینگواتولا سراتا* در گوسفندان از ۱۱ تا ۵۲/۵ درصد (البرزی و درخشنده ۱۳۸۷، البرزی و همکاران ۱۳۹۱.آ، البرزی و همکاران ۱۳۹۱.ب، Esmail-Nia et al. 2000، Nourollahi Fard et al. 2011، Rezaei et al. 2011، Shekarforoush et al. 2004، Tavassoli et al. 2007a) در بزها از ۲۷/۱ تا ۵۰/۷۵ درصد (البرزی و درخشنده ۱۳۸۶، Garedaghi 2011، Razavi et al. 2004، Rezaei et al. 2011، Tavassoli et al. 2007b) در گاوها از ۰/۲۵ درصد تا ۴۴ درصد (Alborzi et al. 2013, Hami et al. 2009, Razavi et al. 2004, Tajik et al. 2006, Youssef and Hadizadeh-Moalem 2010) در گاومیش‌ها از ۰/۵ درصد تا ۲۶/۶ درصد (Alborzi et al. 2013, Hami et al. 2009, Rezaei et al. 2011, Tajik et al. 2008, Tajik and Jalali 2010) و هم‌چنین شترها از ۱۲/۹ تا ۲۱ درصد گزارش شده است (Haddadzadeh et al. 2010, Oryan et al. 2011, Radfar et al. 2010, Shakerian et al. 2008, Tajik et al. 2007). شیوع این انگل در سگ‌ها به عنوان میزبان اصلی نیز چشمگیر و از ۲۷/۸۳ تا ۷۶/۵ درصد بوده است (Meshki and Asgarian 2003, Oryan et al. 2007, Rezaei et al. 2011) که در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بیماری در کل ایران شایع بوده و با توجه به استقرار و اثرات انگل در گره‌های لنفی، کبد و ریه، احتمال دارد خسارت‌های اقتصادی ناپیدایی را به دامپروری کشور وارد سازد که بی‌تردید نیازمند بررسی و مطالعه‌ی همه جانبه است. علاوه بر این، موارد متعددی از ابتلای انسان به این انگل در ایران نیز گزارش شده است (Anaraki et al. 2008, Maleky 2001, Sadjjadi et al. 1998, Siavashi et al. 2002).

به رغم این که در تشخیص بیماری‌های انگلی می‌توان از روش‌های بالینی، آزمایشگاهی و یا کالبدگشایی استفاده نمود ولی در آلودگی حیوانات میزبان واسط به *لینگواتولا سراتا* نمی‌توان از این امکانات استفاده کرد، زیرا آلودگی به *لینگواتولا سراتا* در نشخوارکنندگان از جمله گوسفند فاقد نشانه‌های درمانگاهی است. روش کالبدگشائی نیز به علت پرهزینه بودن، کاربرد چندانی ندارد. با روش‌های معمول آزمایشگاهی هم نمی‌توان آلودگی به این انگل را تشخیص داد و تا کنون نیز روش سرولوژیکی مناسبی که بتوان با آن آلودگی به *لینگواتولا سراتا* را در حیوانات میزبان واسط و یا اصلی تشخیص و یا ردیابی کرد ارائه نشده است. بنابراین، معرفی یک روش تشخیصی سریع و دقیق می‌تواند به بررسی‌های همه‌گیری‌شناسی و پایش

آلودگی به این انگل در گله‌ها کمک نموده و برای کنترل و پیش‌گیری مورد استفاده قرار گیرد. به همین دلیل در مطالعه‌ی حاضر آزمون الایزای غیر مستقیم به عنوان یکی از روش‌های سرولوژی حساس و دقیق که کاربرد بسیار گسترده‌ای در تشخیص بیماری‌های عفونی دارد (Goddard et al. 1999, Morsy et al. 1999, Webster et al. 1997)، به منظور تشخیص سرمی آلودگی به *لینگواتولا سراتا* در گوسفند و با استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی – ترشحی مرحله‌ی نوچه‌ای انگل ارزیابی شد. با توجه به نتایج به دست آمده، دو فاکتور اصلی اعتبار آزمون الایزای طراحی شده، یعنی حساسیت و ویژگی، به ترتیب در مورد آنتی‌ژن‌های پیکری ۹۰/۴ و ۷۵ درصد و در مورد آنتی‌ژن دفعی ترشحی به ترتیب ۸۹/۰ و ۹۳/۸ درصد برآورد گردید. برای ارزیابی کارایی آزمون‌های تشخیصی، سطح زیر منحنی راک آن‌ها مورد توجه قرار می‌گیرد و اگر سطح زیر منحنی بین ۰/۷– ۰/۵ باشد، نتیجه‌گیری می‌شود، درستی درمانگاهی (بالینی) آزمایش، پایین است. اما اگر سطح زیر منحنی بین ۰/۹–۰/۷ باشد، بیانگر درستی درمانگاهی (بالینی) متوسط است و سطح زیر منحنی بالاتر از ۰/۹ نیز نشان‌دهنده درستی بالینی بالای یک آزمون تشخیصی می‌باشد. بنابراین با توجه به حدود سطح زیر منحنی ۰/۹۷۴ برای آنتی‌ژن دفعی ترشحی و ۰/۸۷۳ برای آنتی‌ژن پیکری به ترتیب درستی درمانگاهی بالا و متوسط برای آن‌ها مشخص گردید که نتیجه‌گیری می‌شود طراحی الایزا با آنتی‌ژن دفعی ترشحی ارجح است. آزمون مک نمار نیز نشان داد تفاوتی بین الایزای طراحی شده با آنتی-ژن دفعی ترشحی و استاندارد طلایی (کالبدگشایی و دیدن نوچه‌ی انگل) وجود ندارد ($p>۰/۰۵$) زیرا آماره کاپا به میزان ۰/۸۱۳ با $p<۰/۰۰۱$ به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی توافق بین دو روش می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که از آزمون الایزای طراحی شده می‌توان برای تشخیص سرمی آلودگی به *لینگواتولا سراتا* یا لینگواتولوز گوسفندی استفاده کرد. اگرچه Jones و Riley در سال ۱۹۹۱ مطالعه‌ای در مورد کاربرد الایزا برای ردیابی آلودگی به نوعی پتاستومید به نام *پوروسفالوس کروتالی* در موش‌های صحرایی آزمایشگاهی انجام داده‌اند، ولی جستجوی گسترده در منابع اطلاعاتی علمی در دسترس حکایت از عدم وجود مطالعه‌ای مشابه با آزمون الایزای حاضر در مورد *لینگواتولا سراتا*، بود. بنابراین نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر را نمی‌توان با نتایج مشابهی مقایسه کرد. کافی‌احمدی و همکاران در سال ۱۳۸۳ با آزمایش تست پوستی برای تشخیص آلودگی گوسفند به نوچه‌ی *لینگواتولا سراتا*، نشان دادند که این تست ویژگی بالا ولی حساسیت کمی داشته و برای تشخیص دام‌های آلوده کارایی مناسبی ندارد. بنابراین، با توجه به مشکلات مربوط به انجام تست‌های پوستی در گله و شاخص‌های اعتبار آن و در مقایسه با سهولت آزمایش الایزا و نیز شاخص‌های حساسیت و ویژگی بالای الایزای طراحی شده می‌توان به این نتیجه رسید که استفاده از الایزا ارجح می‌باشد. در مجموع نتیجه‌گیری می‌شود که می‌توان از الایزا (با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی نوچه‌ی انگل) به عنوان روشی مطمئن و سریع در تشخیص و مطالعات همه‌گیری‌شناسی در گوسفندان مناطق کشور و نیز سایر کشورها و به منظور درمان و کنترل لینگواتولوز استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران به خاطر تأمین هزینه‌ی اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

البرزی، علیرضا؛ پروانه، جهانبخش و مهدی‌زاده، امین (۱۳۹۱.آ). مقایسه شیوع آلودگی گوسفندان شهر خرم‌آباد به نوچه *لینگوآتولا سراتا* با دو روش مشاهده چشمی و روش هضمی. اولین کنگره جهانی و هشتمین کنگره ملی انگل‌شناسی، کرمان.

البرزی، علیرضا و درخشنده، تیمور (۱۳۸۶). بررسی میزان آلودگی به نوچه *لینگواتولا سراتا* در بزهای ذبح شده در کشتارگاه شهرستان یاسوج. پنجمین کنگره ملی بیماری‌های مشترک انسان و حیوانات (زئونوزها)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج. صفحه ۸۶.

البرزی، علیرضا و درخشنده، تیمور (۱۳۸۷). بررسی میزان آلودگی به نوچه *لینگواتولا سراتا* در گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه شهرستان یاسوج. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۴، شماره ۱. صفحات ۱۰۹-۱۰۳.

البرزی، علیرضا؛ مهدی‌زاده، امین و پروانه، جهانبخش (۱۳۹۱.ب). مقایسه شیوع آلودگی گوسفندان شهر بروجرد به نوچه *لینگوآتولا سراتا* با دو روش مشاهده چشمی و روش هضمی. اولین کنگره ملی علوم آزمایشگاهی، سمنان.

کافی‌احمدی، علیرضا؛ دلیرنقده، بهرام و توسلی، موسی (۱۳۸۳). بررسی ارزش استفاده از تست جلدی آلرژیک در تشخیص آلودگی عقده‌های لنفاوی مزانتریک گوسفند به نوچه *لینگواتولا سراتا*. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۶۰، صفحات ۳۷۸- ۳۷۵.

نعمت‌الهی، احمد؛ کریمی، حمید و نیازپور، فرزاد (۱۳۸۳). بررسی میزان آلودگی و ضایعات هیستوپاتولوژیک کبد و ریه دام‌های کشتارشده در کشتارگاه‌های استان آذربایجان شرقی در اثر آلودگی به نوچه *لینگواتولا سراتا* در فصول مختلف سال. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۶۰، صفحات ۱۶۵-۱۶۱.

Alborzi, A.; HaddadMolayan, P. and Akbari, M. (2013). Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in mesenteric lymph nodes of cattle and buffaloes slaughtered in Ahvaz abattoir, Iran. Iranian Journal of Parasitology, 8(2): 327-332.

Anaraki Mohammadi, G.; Mobedi, I.; Ariaiepour, M.; Pourmohammadi, Z. and Zare Bidaki, M. (2008). A case report of nasopharyngeal Linguatuliasis in Tehran, Iran and Characterization of the isolated *Linguatula serrata*. Iranian Journal of Parasitology. 3(1): 53-55.

Esmail-Nia, K.; Hadizadeh-Moalem, S.; Derakhshanfa, A. and Moatamedi, G. (2000). A study on the prevalence of *Linguatula serrata* infestation in small ruminants of Mazandaran Province in Babol abattoir. Pajouhesh and Sazandegi, 54: 94-95.

Esmaeilzadeh, S.; Mohammadian, B. and Rezaei, A. (2008). *Linguatula serrata* nymph in a cat. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 9 (4): 387-389.

Garedaghi, Y. (2011). Prevalence of *Linguatula serrata* nymph in goat in Tabriz, North-West of Iran. Veterinary Research Forum, 2 (2):129-133.

Goddard, P.; Bates, P. and Webster, K.A. (1999). Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Osterus ovis* infection in sheep. Veterinary Record, 12(144): 497-501.

Haddadzadeh, H.R.; Athari, S.; Abedini, R.; Khazraii Nia, S.; Khazraii Nia, P.; Nabian, S. and Haji-Mohamadi, B. (2010). One-humped camel (*Camelus dromedaries*) infestation with *Linguatula serrata* in Tabriz, Iran. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases, 47: 54-59.

Hami, M.; Naddaf, S.R.; Mobedi, I.; Zare-Bidaki, M.; Athari, S.S.; Hajimohammadi, B. and Anaraki Mohammadi, G. (2009). Prevalence of *Linguatula serrata* infection in domestic bovids slaughtered in Tabriz abattoir, Iran. Iranian Journal of Parasitoltology, 4(3): 25-31.

Jones, D.A.C. and Riley, J. (1991). An ELISA for the detection of pentastomid infections in the rat. Parasitology, 103: 331-337.

Koehsler, M.; Walochnik, J.; Georgopoulos, M.; Pruente, C.; Boeckeler, W.; Auer, H. el al. (2011). *Linguatula serrata* tongue worm in human eye, Austria. Emerging Infectious Diseases. 17(5): 870-872.

Maleky, F. (2001). A case report of *Linguatula serrata* in human throat from Tehran, central Iran. Indian Journal of Medicine Science, 55: 439-441.

Meshki, B. and Asgarian, O. (2003). Prevalence of *Linguatula serrata* infestation in stray dogs of Shahrekord, Iran. Journal of Veterinary Medicine Series B. 50 (9): 466-467.

Morsy, T.A.; Farrag, A.M.; Mazyad, S.A. and Abou-Gamra, M.M (1999). Evaluation of ELISA kit hypodermosis in serodiagnosis of *Przhevalskiana silenus* in goats and *Cephalopenia titillator* in camels. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 29(3): 709-719.

Nourollahi Fard, S.R.; Kheirandish, R.; Nourouzi-Asl, E. and Fathi, S. (2011). Mesenteric and mediastinal lymph node infection with *Linguatula serrata* nymphs in sheep slaughtered in Kerman slaughterhouse, Southeast Iran. Tropical Animal Health and Production, 43: 1-3.

Oryan, A.; Khordadmehr, M. and Ranjbar, V.R. (2011). Prevalence, biology, pathology, and public health importance of linguatulosis of camel in Iran. Tropical Animal Health and Production, 43: 1225-1231.

Oryan, A.; Sadjjadi, S.; Mehrabani, D. and Rezaei, M. (2007). The status of *Linguatula serrata* infection of stray dogs in Shiraz, Iran. Springer-verlag London Published online, 55-60.

Pal, S.S.; Bhargava, M.; Kumar, A.; Mahajan, N.; Das, S.; Nandi, K. et al. (2011). An unusual intraocular tongue worm in anterior chamber: a case report, Ocular Immunology and Inflammation, 19: 442-443.

Radfar, M.H.; Fathi, S.; Nezhad, H.A. and Norouzi Asl, E.V. (2010). Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in One-Humped camel (*Camelus dromedaries*) in Southeast of Iran. Scientia Parasitologica, 11: 199-202.

Razavi, S.M.; Shekarforoush, S.S. and Izadi, M. (2004). Prevalence of *Linguatula serrata* nymph in goats in Shiraz, Iran. Small Ruminant Research, 54: 213-217.

Rezaei, F.; Tavassoli, M. and Mahmoudian, A. (2011). Prevalence of *Linguatula serrata* infection among dogs (definitive host) and domestic ruminants (intermediate host) in the North West of Iran. Veterinarni Medicina. 56, (11): 561-567.

Sadjjadi, S.M.; Ardehali, S.M. and Shojaei, A. (1998). A case report of *Linguatula serrata* in human pharynx from Shiraz, Southern Iran. Medical Journal of Islamic Republic of Iran,12: 193-194.

Saiyari, M.; Mohammadian, B. and Sharma, R.N. (1996). *Linguatula serrata* (Forlich 1789) nymphs in lungs of goats in Iran. Tropical Animal Health and Production, 28: 312-314.

Shakerian, A.; Shekarforoush, S.S. and Ghafari Rad, H. (2008). Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in one-humped camel (*Camelus dromedarius*) in Najaf-Abad, lranian Research Veterinary Science, 84: 243-245.

Shekarforoush, S.S.; Razavi, S.M. and Izadi, M. (2004). Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in sheep in Shiraz, Iran. Small Ruminant Research, 52: 99-101.

Siavashi, M.R.; Assmar, M. and Vatankhah, A. (2002). Nasopharyngeal pentastomiasis (Halzoun): report of 3 cases. Iranian Journal of Medical Sciences, 27(4): 191-192.

Soulsby, E.J.L. (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated Animals, the 7 edition printed by Bailliere Tindal in London, 497-498.

Tajik, H.; Tavassoli, M.; Dalirnaghadeh, B. and Danehloipour, M. (2006). Mesenteric lymph nodes infection with *Linguatula serrata* nymphs in cattle. Iranian Journal of Veterinary Research, 7: 82-85.

Tajik, H.; Tavassoli, M.; Khani, H. and Javadi, S. (2007). Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in slaughtered camels of Iran. Journal of Camel Practice and Research, 14: 69–71.

Tajik, H.; Tavassoli, M.; Javadi, S. and Baghebani, H. (2008). The prevalence rate of *Linguatula serrata* nymphs in Iranian river buffaloes. Asian Journal of Animal and Veterinary Advance, 3: 174-178.

Tajik, H. and Jalali, F.S.S. (2010). *Linguatula serrata* prevalence and morphometrical features: an abattoir survey on water buffaloes in Iran. Italian Journal of Animal Science, 9: 348-351.

Tappe, D. and Buttner, D.W. (2009). Diagnosis of human visceral pentastomiasis. PLoS Neglected Tropical Diseases, 3 (2): 320.

Tavassoli, M.; Tajik, H.; Dalir-Naghadeh, B. and Hariri, F. (2007a). Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs and gross changes of infected mesenteric lymph nodes in sheep in Urmia, Iran. Small Ruminant Research, 72: 73-76.

Tavassoli, M.; Tajik, H.; Dalir-Naghadeh, B. and Lotfi, H. (2007b). Study of *Linguatula serrata* infestation in mesenteric lymph nodes of goats in slaughterhouse of Urmia, Iran. Iranian Veterinary Journal, 3: 85-90.

Webster, K.A.; Giles, M. and Dawson, C. (1997). A competitive ELISA for the serodiagnosis of hypodermosis. Veterinary Parasitology, 68: 155-164.

Yilmaz, H.; Cengiz, Z.T.; Cicek, M. and Dulger, A.C. (2011). A nasopharyngeal human infestation caused by *Linguatula serrata* nymphs in Van province: a case report. Acta Parazitologica Turcica,, 35: 47-49.

Youssef, M.R. and Hadizadeh-Moalem, S.H. (2010). Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in cattle in Babol slaughterhouse. North of Iran. World Journal of Zoology, 5: 197-199.

Development and evaluation of an indirect ELISA test for serodiagnosis of *Linguatula serrata* infection in sheep

Alborzi¸ A.R.[1]; Ghorbanpoor, M.[2]; Hamidinejat¸ H.[3]; Poormehdi Boroujeni, M.[4] and Mehdizadeh, A.[5]

Received: 06.04.2014 Accepted: 15.07.2014

Abstract

Linguatula serrata as a cosmopolitan parasite is one of the parasitic zoonoses. The adult parasites live in the nasal airways or frontal sinuses of canids as the definitive hosts and larval stages in the liver¸ lung and mesenteric lymph nodes of ruminants as intermediate hosts. Humans may be infected by eating eggs or nymphs of the parasite. All intermediate hosts may be infected without showing any clinical signs. No serological methods presented for detection of the infection in herbivorous animals. In this study, for the first time, an indirect ELISA test was developed for the detection of *Linguatula serrata* infection in sheep by using somatic and excretory-secretory antigens, isolated from nymphs of the parasite. Nymphs of the parasite were collected from mesenteric lymph nodes of infected sheep and used for preparation of somatic antigens by sonication (250 nymphs/10ml, PBS- RPMI1640). The excretory-secretory antigens were prepared by incubation of the larvae (200 nymphs/10ml) in RPMI-1640 media for 24 h. Appropriate dilutions of sera, anti-Sheep IgG conjugate, somatic and excretory-secretory antigens were determined as 1:100, 1:5000, 1:40 and 1:4 respectively. Evaluation of the ELISA was performed by 121 sera (73 positive and 48 negative). The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy of the ELISA for somatic antigen were 90.4%, 75.0%, 84.6%, 83.7%, 84.2% and those for excretory-secretory antigen were 89.0%, 93.8%, 95.6%, 84.9% and 90.9%, respectively. Data analysis of the present study by SPSS software and Mac Nemar Test showed that excretory-secretory antigens are better than somatic antigens for detecting of the infection in sheep. Therefore the ELISA test using excretory-secretory antigen of nymphs of *Linguatula serrata* can be used for detection of infection in sheep, especially in epidemiologic studies and developed for other hosts.

Key words: *Linguatula serrata*, Somatic antigen, Excretory/secretory antigen, Sheep, ELISA

1- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
4- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
5- MSc Graduated of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Alborzi¸ A.R., E-mail: Alirezaalborzi@yahoo.com