

بررسی سرواپیدمیولوژی هیداتیدوز در شمالغرب ایران با استفاده از روش ایمنوفلورسنت غیر مستقیم

احمد نعمت الهی^{۱*}، رسول جمالی^۲، غلامعلی مقدم^۳

چکیده

این بررسی به منظور مطالعه سرواپیدمیولوژی بیماری کیست هیداتیک در منطقه شمالغرب کشور انجام پذیرفت. در مجموع تعداد ۸۵۲ نمونه خون از افراد ساکن مناطق اطراف شهرستان های سراب، مشکین شهر، مغان و اورمیه اخذ شد و سرم آنها جدا گردید. جهت تهیه آنتی ژن، کبد و ریه های مبتلا به کیست هیداتیک از گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه صنعتی تبریز جمع آوری گردید. پروتواسکولکس از کیست هیداتیک جدا و به روش ساندویچ در دیافراگم خرگوش تزریق شد. سپس با دستگاه کرایوکات برش هایی از آن تهیه و بر روی لام تثبیت گردید. مقاطع بدست آمده با استفاده از آنتی هیومن گلوبولین نشان دار و رنگ شده با اوانس بلو به روش IFA مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا حساسیت و ویژگی این تست بر روی نمونه های سرم ۵۸ بیمار مبتلا به کیست هیداتیک بستری شده در بیمارستان و ۷۰ سرم سالم ارزیابی گردید و حساسیت آن ۸۸٪ و ویژگی آن ۹۸٪ ارزیابی شد. در طی این بررسی، تیر بالای یک دهم به عنوان نمونه مثبت تلقی گردید. از بین ۸۵۲ نفر مورد آزمایش ۳۰ نفر (۳/۵۲٪) آلوده تشخیص داده شد. میزان آلودگی در جنس مذکر بیشتر از جنس مؤنث بود. بیشترین میزان آلودگی متعلق به مشکین شهر (۳/۵٪) بود و مقاطع سنی ۴۰-۲۰ سال بیشترین میزان آلودگی را نشان دادند.

مجله علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، ۱۳۸۶، دوره ۱، شماره ۱، ۳۹-۳۵.
کلمات کلیدی: سرواپیدمیولوژی، هیداتیدوز، ایمنوفلورسنت غیر مستقیم

مقدمه

هیداتیدوز یکی از آلودگی های انگلی مشترک انسان، علفخواران و گوشتخواران اهلی و وحشی است که از لحاظ اقتصادی و بهداشتی حائز اهمیت می باشد. این بیماری در اثر آلودگی به مرحله لاروی سستود اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می گردد و عبارت است از استقرار کیسه هایی پر از مایع بنام کیست هیداتیک در نسوج مختلف بدن (۵). سگ سانان به عنوان میزبان اصلی انگل با دفع تخم انگل همراه با مدفوع در مزارع سبب آلودگی علوفه، سبزیجات و آب می شوند و انسان

Seroepidemiologic survey of Hydatidosis in northwest Iran by Indirect Immunofluorescent Test

Nematollahi, A¹., Jamali, R²., Moghaddam, Gh³.

1-Department of Pathobiology, Veterinary Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2-Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran.

3-Department of Clinical Science, Veterinary Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

This survey was conducted to study the seroepidemiology of hydatidosis in northwest of Iran. Totally 852 blood samples from rural inhabitants of Sarab, Meshkin shahr, Moghan and Urmia were collected and their sera were separated. For antigen preparation, the livers and lungs of sheep infected with hydatid cyst and slaughtered at Tabriz abattoir were collected. The protoscolex was separated from the hydatid cyst and injected into the rabbit diaphragm using the sandwich technique. Then sections of the diaphragm were cut using the cryocut apparatus and fixed onto slides. The prepared sections were examined using marked antihuman globulin stained with Evan's blue by IFA test. Initially sensitivity and specificity of this test was evaluated on sera of 58 hospitalized hydatidosis patients and 70 healthy persons. The sensitivity and specificity of the test were estimated 88% and 98/6% respectively. In this survey the titers over 1:10 were considered positive. Among 852 tested samples, 30(3/52%) were infected. Infection rate in males was higher than females. The highest infection rate was from Meshkin shahr (3.5%) and the age group of 20-40 years was the highest infected category.

J. Spe. Vet. Sci. Islam. Azad. Uni. Tabriz, 1, 1: 35-39, 2007.

Key words: Seroepidemiology, hydatidosis, indirect immunofluorescent test

Corresponding author's email: anematollahi@yahoo.com

در اثر تماس نزدیک با سگ و مصرف سبزیجات و علفخواران با خوردن علوفه آلوده به تخم انگل به بیماری مبتلا می شوند (۳). هیداتیدوزیس به عنوان بیماری مشترک انسان و دام، از لحاظ بهداشت عمومی و جنبه های اقتصادی وهمچنین در تمام قاره های جهان دارای اهمیت می باشد. در انسان از آنجا که روش درمانی اصلی این بیماری جراحی می باشد و نیز به علت معضلات عمده بهداشتی، هزینه ها و عوارض خطرناک عمل جراحی و در حیوانات به علت زیان های اقتصادی ناشی از ضبط اعضا آلوده، این بیماری اهمیت دارد (۶).

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲. گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: anematollahi@yahoo.com

کیست هیداتیک ریه و کبد از گوسفندان آلوده تهیه گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تبریز، ابتدا سطح فوقانی کیست ها استریل گردید و با استفاده از سرنگ محتویات کیست ها تخلیه و در محلول PBS شستشو داده شدند. شستشو و تغلیظ پروتواسکولکس ها با استفاده از سه بار سانتریفوژ کردن آنها با محلول بافر فسفات (PH=7/2) در دور 1000 به مدت 5 دقیقه انجام پذیرفت. این پروتواسکولکس ها تا زمان استفاده منجمد گردیدند.

جهت تثبیت این پروتواسکولکس ها بر روی لام از روش ساندویچ استفاده شد. بدین منظور دیافراگم یک خرگوش در آزمایشگاه بعد از تشریح و کالبد گشائی از بدن خارج گردید و پس از شستشو با محلول PBS به طور منظم به دور یک مفتول فلزی پیچانده شد و در فریزر نگهداری گردید. بعد از 24 ساعت مفتول فلزی از داخل دیافراگم در آورده شد. در این حالت یک مجرای لوله مانند در داخل دیافراگم بوجود آمد. پروتواسکولکس های شسته شده بعد از ذوب شدن توسط سرنگ شماره 50 به داخل دیافراگم تزریق گردیدند. ساندویچ تهیه شده در دمای 20- درجه سانتی گراد منجمد گردید و سپس با استفاده از دستگاه کرایوکات (Cryocut) برش های 5 میکرونی از بافت دیافراگم حاوی اسکولکس ها تهیه گردید و بر روی لام گسترش داده شد. لام های تهیه شده به مدت 40-10 دقیقه با غوطه وری در استن تثبیت گردیدند.

روش انجام آزمایش

از افراد مورد بررسی 3 میلی لیتر خون وریدی اخذ و سرم آن جدا گردید. رقت هایی با تیتراژ 1/10 میکرولیتر از سرم افراد مورد آزمایش تهیه گردید و 100 میکرولیتر از آن بر روی لام حاوی آنتی ژن ریخته شد. یک لام کنترل مثبت و منفی نیز تهیه گردید. انتقال لام ها به تانک مرطوب انجام پذیرفت و به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس شستشوی لام ها با بافر فسفات سه بار، هر بار به مدت 5 دقیقه

برای شناسائی هیداتیدوز در انسان و حیوانات روش های مختلفی وجود دارد که از آن جمله می توان به روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم اشاره کرد. این روش نسبتاً آسان و سریع بوده و با حساسیت و ویژگی قابل توجه می توان آن را در مطالعات سرواپیدمیولوژیکی و بیماریابی بکار برد (4). این بررسی جهت مطالعه سرواپیدمیولوژی بیماری هیداتیدوز در منطقه شمالغرب کشور با استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

جمعیت مورد بررسی

بررسی حاضر بر روی 3 گروه از افراد انجام پذیرفت:

1- جهت تعیین حساسیت و ویژگی تست مورد استفاده، نمونه های سرمی 58 بیمار مبتلا به کیست هیداتیک بستری در بیمارستان امام خمینی تبریز مورد مطالعه قرار گرفت. این افراد از مناطق مختلف آذربایجان بودند.

2- گروه کنترل: تعداد 70 مورد به عنوان کنترل انتخاب شدند. این گروه از میان افراد سالم انتخاب شدند. این افراد از بین دانشجویان و کارکنان بیمارستان انتخاب گردیدند.

3- جمعیت مورد بررسی: هدف اصلی این بررسی تعیین میزان آلودگی در مناطق مختلف شمالغرب کشور بود. بدین منظور به روش تصادفی نمونه های خونی (سرمی) از 200 نفر در 10 روستای اطراف سراب، 300 نفر در 4 روستای اطراف اورمیه، 200 نفر در روستاهای اطراف مشکین شهر و 152 نفر در پارس آباد مغان تهیه گردید. مشخصات افراد مورد بررسی در فرم های مخصوص ثبت گردید که در این فرم ها میزان تحصیلات، شغل و تماس با حیوان قید گردیده بود.

روش تهیه آنتی ژن

در این بررسی از آنتی ژن های تثبیت شده بر روی لام استفاده شد. بدین منظور با مراجعه به کشتارگاه صنعتی تبریز

جدول ۱- تعداد و ترکیب جنسی جمعیت مورد مطالعه به روش IFA در شمالغرب کشور

ترکیب جنسی افراد آلوده	تیترا بالای ۱/۱۰ (درصد)	ترکیب جنسی جمعیت مورد مطالعه		جمعیت مورد مطالعه (نفر)	مناطق مورد بررسی
		مرد	زن		
مرد ۷ زن ۵	۱۲ (٪۶)	۱۰۴	۹۶	۲۰۰	سراب
مرد ۳ زن ۴	۷ (٪۳/۵)	۸۸	۱۱۲	۲۰۰	مشکین شهر
مرد ۴ زن ۲	۶ (٪۳/۹)	۷۶	۷۶	۱۵۲	مغان
مرد ۳ زن ۲	۵ (٪۱/۶)	۱۱۱	۱۸۹	۳۰۰	اورمیه
مرد ۱۷ (٪۵۶/۵)	۳۰ (٪۳/۵۲)	۳۷۹	۴۷۳	۸۵۲	جمع

انجام پذیرفت. پس از خشک کردن لام ها، از رقت ۱/۳۰ آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده، که همراه با رنگ اوانس بلو تهیه شده بود به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به روی لام ها منتقل شد. بعد از انکوباسیون و خشک کردن، لام ها در زیر میکروسکوپ ایمونوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در بررسی الگوی ایمونوفلورسانس، فقط پروتو اسکولکس ها که فلورسانس گردیدند، مورد توجه واقع شدند و ارتو اسکولکس ها و سایر اشکال مشابه مورد توجه قرار نگرفتند.

نتایج

با توجه به جدول ۱، مشخص است که از مجموع ۸۵۲ فرد مورد مطالعه، ۳۰ نفر (٪۳/۵۲) تیترا سرمی بالای ۱/۱۰ داشته اند که در این بین سراب با ۱۲ نمونه مثبت (٪۶) و اورمیه با ۵ نمونه مثبت (٪۱/۶) به ترتیب بیشترین و کمترین میزان را داشته اند. همچنین از میان ۳۰ نفر با تیترا بالای ۱/۱۰، مردان با ۱۷ مورد (٪۵۶/۵) نسبت بیشتری در مقایسه با زنان با ۱۳ مورد (٪۴۳/۵) داشته اند. با توجه به تفاوت ترکیب سنی جمعیت مورد مطالعه، جهت بررسی افراد، گروه های سنی در نظر گرفته شد. جدول ۲ فراوانی و درصد ترکیب سنی افراد مورد مطالعه و افراد با تیترا بالای ۱/۱۰ را نشان می دهد. با توجه به جدول ۲ مشخص است که در شهرستان سراب، گروه سنی ۳۰-۲۱ سال، در مشکین شهر و مغان گروه سنی ۴۰-۳۱ سال، در اورمیه گروه سنی ۲۰-۱۱ سال، بیشترین موارد مثبت را به خود اختصاص داده اند. با مراجعه به تاریخچه و سوابق افراد مورد مطالعه مشخص گردید که تعدادی از آنان از اختلالات عضوی رنج می برده اند. جدول ۳ میزان فراوانی اختلالات عضوی را در افراد آلوده نشان می دهد.

در روش ساندریچ کردن پروتواسکولکس ها در عضله دیافراگم خرگوش، با استفاده از بررسی بر روی ۵۸ بیمار مبتلا به کیست هیداتیک و ۷۰ مورد کنترل، میزان حساسیت تست ایمونوفلورسانس ۸۸ درصد و ویژگی آن ۹۸/۶ درصد به دست آمد. میزان حساسیت بالای این تست به خاطر سهولت در دسترسی به آنتی ژن های سوماتیک می باشد. این حساسیت و ویژگی در آنالیز آماری به روش مربع کای معنی دار بود ($P < 0/001$). همچنین حساسیت تست برای شناسایی کیست های کبدی و ریوی به ترتیب ۹۴/۵ درصد و ۸۲/۴ درصد بود. در طی این بررسی در مجموع ۸۵۲ نمونه سرمی مورد بررسی قرار گرفت و تیترا بالای ۱/۱۰ به عنوان نمونه های مثبت تلقی گردید. جدول ۱ تعداد و ترکیب جنسی جمعیت مورد مطالعه و فراوانی و درصد افراد با تیترا بالای ۱/۱۰ را نشان می دهد.

جدول ۲- فراوانی و درصد ترکیب سنی افراد مورد مطالعه و افراد با تیترا بالای ۱/۱۰ به روش IFA در شمالغرب کشور

مناطق مورد مطالعه	سراب		مشکین شهر		مغان		اورمیه		جمع	
	تعداد موارد مثبت (درصد)	جمعیت مورد مطالعه	تعداد موارد مثبت (درصد)	جمعیت مورد مطالعه	تعداد موارد مثبت (درصد)	جمعیت مورد مطالعه	تعداد موارد مثبت (درصد)	جمعیت مورد مطالعه	تعداد موارد مثبت (درصد)	جمعیت مورد مطالعه
۰-۱۰	۱ (٪۴/۳۴)	۲۳	-	۲۱	-	۵۵	-	۸	۱۰۷	۱ (٪۰/۹۳)
۱۱-۲۰	-	۲۹	-	۱۷	-	۴۲	-	۵۲	۱۴۰	۲ (٪۱/۴۲)
۲۱-۳۰	۴ (٪۸/۱۶)	۴۹	۲ (٪۶/۶)	۳۰	۱ (٪۴/۵)	۲۲	۲ (٪۲/۶۶)	۷۵	۱۷۶	۹ (٪۵/۱۱)
۳۱-۴۰	۳ (٪۱۰/۷۱)	۲۸	۴ (٪۸/۶۹)	۴۶	۳ (٪۸/۱)	۳۷	۱ (٪۸/۳۳)	۱۲	۱۲۳	۱۱ (٪۸/۹۴)
۴۱-۵۰	۲ (٪۶/۴۵)	۳۱	۱ (٪۲)	۵۰	۱ (٪۳/۵)	۲۸	-	۷	۱۱۶	۴ (٪۳/۴۴)
۵۱-۶۰	۱ (٪۴/۷۶)	۲۱	-	۳۶	۱ (٪۳/۳)	۳۰	-	۷	۹۴	۲ (٪۲/۱۲)
۶۱-۷۰	۱ (٪۵/۲۶)	۱۹	-	۳۸	-	۳۶	-	۳	۹۶	۱ (٪۱/۰۴)

جدول ۳- میزان فراوانی اختلالات عضوی در افراد آلوده مورد بررسی به روش IFA در شمالغرب کشور

مناطق مورد مطالعه	ناراحتی مزمن در شکم	تهوع و استفراغ	درگیری تنفسی	بدون علامت
سراب	۴	۲	-	۶
مشکین شهر	۴	-	۲	۱
مغان	۲	۱	۲	۱
اورمیه	۲	-	۱	۲
جمع	۱۲	۳	۵	۱۰

بحث

با توجه به این که کیست هیداتیک در نقاط مختلف بدن انسان ایجاد ضایعه می کند، بنابراین سیستم دفاعی بدن در برابر آن آنتی بادی تولید می کند که این آنتی بادی ها را می توان با روش های سرولوژیک شناسایی کرد. تست ایمونوفلورسانس غیر مستقیم روشی حساس با ویژگی بالا در شناسایی کیست هیداتیک است. در بررسی انجام شده در دانشکده بهداشت دانشگاه تهران بر روی ۲۳۵ بیمار هیداتیدی، حساسیت این تست ۷۶/۱ درصد و ویژگی آن ۹۸/۴ درصد گزارش شده است (۸). در بررسی دیگر حساسیت و ویژگی این تست ۱۰۰ درصد

بعدی درگیری های تنفسی بیشترین میزان را به خود نسبت می دهد که با توجه به اینکه کیست هیداتیک کبدی و ریوی بیشترین موارد آلودگی های انسانی را به خود اختصاص می دهد، این یافته با آمارهای قبلی در این زمینه مطابقت دارد (۱).

با توجه به آندمیک بودن بیماری در کشور ما و گزارشات متعدد از آلودگی زیاد دام ها و سگ ها با اکیونوکوکوس گرانولوزوس در منطقه (۲) بایستی بر روش های پیشگیری از این بیماری شامل درمان سگ های گله، معدوم نمودن سگ های ولگرد، کشتار دام ها در کشتارگاه های بهداشتی و دادن آموزش های حرفه ای و همگانی در مورد نحوه شستشوی سبزیجات و مواد غذایی تاکید نمود.

فهرست منابع

- ۱- اسلامی، ع. (۱۳۷۰): اپیدمیولوژی اکیونوکوکوس گرانولوزوس در ایران، سمینار سراسری کیست هیداتیک، لرستان، صفحه: ۴۴-۳۷.
- ۲- شفیعی زاده، ف. (۱۳۷۰): بررسی وضعیت آلودگی انسان به کیست هیداتیک در استان لرستان، سمینار سراسری کیست هیداتیک، لرستان، صفحه: ۱۳-۱۰.
- 3- Agosin, M. (1988): Biochemistry and physiology of Echinococcus. Bull. Wld. Hlth. Org. 39:115-120.
- 4- Calvin, M. (1988): Epidemiology of Echinococcus. Bull. Wld. Hlth. Org. 39:131-135.
- 5- Carig, P. and Pawlowski, Z. (2002): Cestode zoonoses: Echinococcus and Cysticercosis. IOS press, pp: 1-2.
- 6- Harold, F., Neva, A. and Brown, W. (1983): Basic Clinical Parasitology, pp: 72, 191-197.
- 7- Kagan, G.A. (1988): A review of serological test for the diagnosis of hydatid disease. Bull. Wld. Hlth. Org. 39:25-37.
- 8- Lomheh, F. (1977): Immunofluorescence in the serodiagnosis of human hydatidosis. Acta. Med. Iran. 20(1-2):27-35.
- 9- Molan, A.L. (1993): Epidemiology hydatidosis in Iraq. J. Med. Sci. 46:29-35.

گزارش شده است (۷). گزارش مشابهی میزان حساسیت این تست را که بر روی ۸۵ بیمار هیداتیدی انجام گرفته است ۹۴ درصد ذکر نموده است (۹). در طی این بررسی از روش ساندریج کردن پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در عضله دیافراگم خرگوش استفاده شد. در این روش حساسیت تست ۸۸ درصد و ویژگی آن ۹۸/۶ درصد به دست آمد. میزان حساسیت بالای این تست به خاطر راحتی در دسترس قرار گرفتن آنتی ژن های سوماتیک می باشد. این حساسیت و ویژگی در آنالیز آماری به روش مربع کای معنی دار بود ($P < 0/001$). همچنین حساسیت تست برای شناسایی کیست های کبدی و ریوی به ترتیب ۹۴/۵ درصد و ۸۲/۴ درصد بود. علت حساسیت پایین تست در مورد کیست های ریوی احتمالاً به خاطر تحریک کمتر سیستم ایمنی در تولید آنتی بادی است.

در این بررسی مشخص گردید که از مجموع ۸۵۲ نفر مورد مطالعه، ۳۰ نفر (۳/۵۲ درصد) تیترا سرمی بالای ۱/۱۰ داشته اند، که در این میان آلودگی در سراب با ۱۲ مورد (۶ درصد) حداکثر و در اورمی به ۵ نفر (۱/۶ درصد) حداقل بود. متأسفانه به علت نبود آمارهای مشابه در میان جمعیت های اقلیم های دیگر ایران امکان مقایسه اطلاعات وجود نداشت.

آلودگی در مردان نسبت به زنان بیشتر بود. ابتلای جنس مونث در مجموع ۴۳/۵ درصد و در جنس مذکر ۵۶/۵ درصد گزارش می شود. این نتایج با بررسی مشابهی که در عراق انجام پذیرفته و در آن ابتلاء زنان را نسبت به مردان بیشتر اعلام نموده، مطابقت ندارد (۹).

با توجه به جدول ۲ مشخص است که آلودگی در گروه سنی ۲۱-۳۰ سال و ۴۰-۳۱ سال نسبت به گروه های دیگر سنی بالاتر می باشد که این را می توان به نحوه کار و تماس مستقیم این افراد با فاکتور های خطر این بیماری از قبیل تماس با حیوانات به خصوص سگ و حرفه مربوطه نسبت داد. با توجه به جدول ۳ مشخص است که ناراحتی های مزمن شکم در بین افراد آلوده مشخص ترین نمود بالینی این بیماری می باشد و در درجه

