ارزیابی آزمایش الایزای خانگی برای تشخیص آنتی بادی ضد *اوستروس اویس* در گوسفند

علیرضا البرزی [۱*]، مسعود قربانپور [۲]، زینب یوسفوند [۳]

۱- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
۳- دانش آموخته، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران

چکیده

استروس اویس از عوامل زئونوتیک با پراکندگی جهانی است. لاروهای آن سبب ایجاد میاز در انسان و گوسفند می‌شود. این مطالعه برای اولین بار در ایران و به‌منظور ارزیابی الایزا برای تشخیص آلودگی *استروس اویس* در گوسفندان منطقه با استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکری (S) و دفعی_ترشحی (ES) لاروهای مرحله دوم و سوم (L۲، L۳) انگل انجام گرفت. آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی- ترشحی لاروهای انگل با هموژنیزه کردن با سونیکاتور و کشت در محیط RPMI-1640 به‌دست آمد. پس از تعیین رقت‌های مناسب آنتی‌ژن‌ها، کنژوگه و سرم، تعداد ۷۱ نمونه سرم مثبت و ۶۱ سرم منفی سنجش شد و نتایج با بررسی کشتارگاهی مقایسه گردیدند. نتایج رقت‌های مناسب آنتی‌ژن‌های **SL۲** و **SL۳** به ترتیب (۱:۴۶) و (۱:۳۰) ، رقت کنژوگه و سرم‌های مثبت و منفی نیز به ترتیب (۱:۸۰۰۰) و (۱:۱۰) درحالی‌که رقت **ESL۳** ، **ESL۲** به ترتیب (۱:۹) و (۱:۶) و رقت کنژوگه و سرم‌های مثبت منفی (۱:۴۰۰۰) و (۱:۵) تعیین گردید. حساسیت، ویژگی آزمایش با **SL۲** و **SL۳** به ترتیب ۹۰/۱٪ و ۸۹/۱٪، و نیز ۵۴/۹٪ و ۹۶/۹٪، درحالی‌که با **ESL۲** و **ESL۳** به ترتیب ۷۴/۶٪، ۹۳/۸٪ و نیز ۷۴/۶٪، ۷۳/۴٪ به دست آمد. ارزش پیش‌گویی مثبت و منفی آزمایش الایزا با **SL۲** و **SL۳** به ترتیب ۹۰/۱٪، ۹۵/۱٪ و ۸۹/۱٪، ۶۶٪ درصورتی‌که با **ESL۲** و **ESL۳** به ترتیب۹۳/۰٪، ۷۵/۷٪ و ۷۶/۹٪، ۷۲/۳٪ به دست آمد. با توجه به این‌که حساسیت **SL۲** نسبت به**SL۳** نسبتاً بالا و بیشتر است، می‌توان از آنتی‌ژن‌های آن در تشخیص سرولوژیک و مطالعات اپیدمیولوژی آلودگی گوسفندان به *استروس اویس* استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: *استروس اویس*، آنتی‌ژن، گوسفند، الایزا

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: Email: alirezaalborzi@yahoo.com

مقدمه

استروس اویس از مگس‌های با پراکندگی جهانی است و ازنظر اقتصادی اهمیت زیادی دارد زیرا می‌تواند با کاهش رشد و تولید (شیر و پشم) سبب خسارات قابل‌توجهی به دام‌پروری کشور شود. مگس ماده حین لارو گذاری با ایجاد وحشت و اضطراب سبب اختلال در تغذیه گوسفندان و کاهش وزن و ضعف بره‌ها می‌شوند (۲۰ و ۲۳). لاروهای آن عامل میاز بینی یا رنیت انگلی با ترشحات موکوسی، تغییرات اپی‌تلیوم و پاسخ ایمنی میزبان است که گاهی با آلودگی ثانویه باکتریایی، درگیری مغزی و تلفات همراه است (۲۳). علاوه بر این *استروس اویس* به‌عنوان یکی از عوامل زئونوتیک (مشترک بین انسان و دام) است و لاروهای آن می‌تواند در گوش، حلق و بینی انسان موجب ضایعات،جراحات و گرفتاری شدید شود(۷، ۱۰، ۱۱، ۱۵، ۱۶،۱۷و ۱۸).

به دلیل مواجهه سیستم ایمنی میزبان با مواد دفعی ترشحی و پیکری انگل‌ها ازجمله استروس اویس و اهمیت این مواد، مطالعات قابل‌توجهی در خصوص یافتن آنتی‌ژن-های مربوطه و استفاده از آنها در روش‌های متخلف ایمونولوژیکی انجام گرفته است(۲، ۲۲).

مطالعاتی که تاکنون در ایران روی شیوع این انگل در گوسفند انجام‌شده عمدتاً به‌صورت بررسی‌های کشتارگاهی بوده است (۱و ۱۴). بر اساس اطلاعات در دسترس، روش-های ایمونوسرولوژیکی که بتواند میزان شیوع آلودگی به *استروس اویس* را در دام زنده به‌ویژه گوسفندان منطقه و ایران مشخص کند مورد ارزیابی و آزمایش قرار نگرفته است؛ بنابراین هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی روش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی (ES) (Excretory-Secretory) و پیکری (Somatic) (S) لاروهای اوستروس اویس جداشده از گوسفندان منطقه بود که با ردیابی آنتی‌بادی‌های ناشی از پاسخ ایمنی میزبان برای تشخیص آلودگی به این انگل در گوسفندان انجام گرفت.

مواد و روش کار

روش تهیه سرم مثبت و منفی

برای تهیه سرم‌های مثبت، با مراجعه به کشتارگاه، گوسفندان شاخ‌دار (عمدتاً نژاد عربی) انتخاب و با نصب گیره به گوش آن‌ها، علامت‌گذاری شدند. هنگام ذبح، خون‌گیری با لوله‌آزمایش از حیوانات به عمل آمد. با برش شاخ کله‌های علامت‌گذاری شده و مشاهده لارو در هر کله، نمونه خون آن به‌عنوان آلوده یا مثبت در نظر گرفته می‌شد.

نمونه‌های خون جمع‌آوری‌شده به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی اهواز انتقال داده و پس از سانتریفوژ، سرم خون‌ها در میکرو تیوب شماره‌گذاری شده ریخته و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. درمجموع ۷۱ نمونه سرم از گوسفندان آلوده به لارو استروس اویس جمع‌آوری گردید. سرم¬های منفی از بره‌های حدود ۳-۴ماهه که در زمستان به دنیا آمده و در معرض آلودگی به این انگل قرار نگرفته (ایندور) تهیه شد. درمجموع ۶۱ نمونه سرم گوسفند (بره) غیر آلوده که در بررسی سر آنها لارو انگل مشاهده نشده بود نیز جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

روش تهیه آنتی‌ژن‌های پیکری لاروهای *استروس اویس*

لاروهای *استروس اویس* از کشتارگاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل‌شناسی انتقال داده شدند. نوع لاروها با استفاده از استریو میکروسکوپ و بررسی‌های مرفولوژیکی تشخیص داده شد (۲۴). لاروهای مرحله دوم (L۲) و مرحله سوم (L۳) هرکدام به‌طور جداگانه در محلول سرم نمکی بافردار فسفاتی (PBS) نگه‌داری شدند. تهیه آنتی-ژن پیکری با اقتباس از روش Alcaide و همکاران، Bauer و همکاران به شرح زیر انجام شد (۳و ۵). تعداد ۱۰ عدد لارو L۲ انتخاب و ۴ بار با PBS آنتی‌بیوتیک‌دار شست‌وشو داده شد. ابتدا لاروها با اسکالپل تکه تکه و مقدار ۵ میلی‌لیتر PBS به آنها اضافه شد، سپس با سونیکاتور (Bandelin- آلمان) همگن گردید، پس سانتریفوژ کردن محلول همگن در دمای ۴- درجه سانتی گراد ، مایع رویی آن جمع‌آوری و با فیلتر ۰/۲ میکرون صاف شد. غلظت پروتئین مایع به‌دست‌آمده به روش برادفورد (Bradford) روش برادفورد سنجیده شد و در میکرو تیوب‌های مشخص و در دمای ۲۰-درجه سانتی گراد نگه‌داری شد. برای تهیه آنتی‌ژن از لاروهای L ۳ به ترتیب بالا عمل کرده با این تفاوت که ۱۰ لارو را به‌طور جداگانه و در هر مرحله یک لارو با ۵ میلی‌لیتر PBS

مخلوط گردید و مانند مراحل بالا، مایع در میکرو تیوپ ریخته و در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

روش تهیه آنتی‌ژن‌های دفعی–ترشحی لاروهای *استروس اویس*

برای تهیه آنتی‌ژن دفعی‌ترشحی پس از ۴ بار شستشوی لاروهای L۲ و L۳ با PBS آنتی‌بیوتیک‌دار (پنی‌سیلین/ استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ واحد/میکروگرم در میلی‌لیتر) به ازای ۵لارو L۲ مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت (RPMI-1640) داخل ظرف مخصوص ریخته و در انکوباتور CO2 دار به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری گردید سپس لاروها از محیط کشت خارج و مایع آن با فیلتر۰/۲ میکرون پالایش شد. غلظت پروتئین مایع به روش برادفورد سنجیده و داخل میکروتیوب‌های مشخص در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای تهیه آنتی‌ژن دفعی–ترشحی از لارو ۳ L ، به ازای هر ۵ لارو مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت اضافه شد و بقیه مراحل مشابه لارو L۲ صورت گرفت.

روش به‌دست آوردن رقت‌های مناسب آنتی‌ژن، سرم و کنژوگه در آزمایش الایزا

در این مرحله با استفاده از چندین سرم مثبت قطعی (آلوده به لارو *استروس اویس*) و چندین سرم منفی قطعی (غیر آلوده به لارو *استروس اویس*) و که با روش دات الایزا نیز منفی شده بودند، به شرح زیر رقت‌های مناسب تعیین گردید.

ابتدا آنتی‌ژن‌های تهیه‌شده از لاروهای *استروس اویس* و بر اساس میزان پروتئین آن‌ها با رقت‌های مختلف، مورد آزمایش الایزا قرارگرفته و بهترین رقت آنتی¬ژن برای آزمایش الایزا به دست آمد. آنتی‌ژن پیکری L۲ با رقت‌های ۱:۴۶، ۱:۹۲، ۱:۱۸۴و ۱:۳۶۸ و آنتی‌ژن پیکری L۳ با رقت‌های ۱:۳۰، ۱:۶۰، ۱:۱۲۰ و ۱:۲۴۰ مورد آزمایش قرارگرفته و بهترین رقت آنتی‌ژن پیکری برایL۲ و L۳ تعیین گردید. در این مرحله از رقت ثابت ۱:۳۰ سرم‌های مثبت و منفی و از رقت ثابت ۱:۴۰۰۰ کنژوگه استفاده شد. برای آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لارو L۲ با رقت های ۱:۹، ۱:۱۸، ۱:۳۶ و ۱:۷۲ و آنتی‌ژن دفعی-ترشحی لارو L۳ با رقت‌های ۱:۶، ۱:۱۲، ۱:۲۴ و ۱:۴۸ مورد آزمایش قرار گرفت و بهترین رقت این آنتی‌ژن‌ها نیز برای آزمایش الایزا معین شد. در این مرحله از رقت ثابت ۱:۵ سرم‌های مثبت و منفی و از رقت ثابت ۱:۴۰۰۰ کنژوگه استفاده شد. آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin) و شیرخشک بدون چربی ۵ درصد (۲/۵ گرم پودر شیر خشک با ۵۰ میلی‌لیتر PBS) به عنوان بلوک‌کننده مورد آزمایش قرارگرفته که هر دو برای آزمایش مناسب بودند اما به خاطر دسترسی راحت‌تر، از شیرخشک به‌عنوان بلوک کننده انتخابی استفاده شد. در آزمایش الایزا رقت‌های مختلف سرم‌های شاهد مثبت و منفی، با رقت ۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۲۰ با رقت ثابت کنژوگه مورد آزمایش قرار گرفت و بهترین رقت سرم، در مورد آنتی‌ژن پیکری L۲ وL3 ونیز آنتی‌ژن‌های دفعی–ترشحی آن‌ها تعیین گردید.

در آخرین مرحله با اطلاع از رقت‌های مناسب آنتی‌ژن و سرم، رقت مناسب کنژوگه محاسبه گردید برای این کار کنژوگه پراکسیداز ضد IgG گوسفندی، با رقت‌های ۱:۲۰۰۰، ۱:۳۰۰۰، ۱:۴۰۰۰، ۱:۵۰۰۰، ۱:۶۰۰۰، ۱:۷۰۰۰، ۱:۸۰۰۰ و ۱:۹۰۰۰ مورد آزمایش قرار گرفت که بهترین رقت کنژوگه برای آزمایش الایزا در مورد آنتی‌ژن-های پیکری و آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی آن‌ها مشخص شد.

روش آزمایش الایزای نمونه‌ها

آزمایش الایزای طراحی‌شده جهت جستجوی پادتن ضد *استروس اویس* در گوسفند روی ۷۱ نمونه سرم آلوده (مثبت) و ۶۱ سرم غیر آلوده (منفی) از گوسفندان منطقه به‌صورت زیر انجام گرفت. ابتدا با رقت‌های مناسب آنتی‌ژن پیکری و دفعی ترشحی L2 و L۳ در بافر پوشاننده (۵/۳ گرم کربنات سدیم + ۴/۲ گرم بی کربنات سدیم در ۱ لیتر آب مقطر با pH =۹/۶) و در پلیت‌های (*Nunc*- دانمارک) جداگانه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن در هر چاهک، پوشانندگی (کوتینگ) انجام شد.

پلیت‌ها با پارافیلم پوشانده شده و داخل یک کیسه نایلون به مدت ۱۸ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس‌ازآن محتویات پلیت‌ها کاملاً تخلیه و ۳ مرتبه با PBS مورد شستشو قرار گرفت. برای بلوک-کردن چاهک‌های پلیت، به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر از محلول شیرخشک بدون چربی ۵ درصد اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، محتویات پلیت‌ها تخلیه شده و ۳ مرتبه با PBS شست‌وشو شدند.

سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ازسرم‌های(مثبت، منفی و مجهول) با رقت مناسب اضافه شده، پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محتویات پلیت‌ها تخلیه شده و ۳ مرتبه با PBS شست‌وشو شدند. در مرحله بعد کنژوگه پراکسیداز ضد IgG گوسفندی با رقت مناسب و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردیده، به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند، سپس محتویات پلیت‌ها تخلیه و با محلول PBS، ۳ مرتبه شستشو صورت گرفت. در مرحله بعد محلول کروموژن- سوبسترا (تترا متیل بنزیدین + آب‌اکسیژنه) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به تمام چاهک‌ها اضافه و واکنش پس از ۱۵ دقیقه با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ نرمال متوقف شد. پلیت با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا (Dynatech MR5000- هلند) در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر مورد قرائت قرار گرفت.

روش تعیین نقطه برش (cut off) و شاخص‌های آزمایش الایزا

برای به‌دست آوردن نقطه برش در هر پلیت میانگین و انحراف معیار دانسیته نوری تعداد ۲۰ نمونه منفی محاسبه و میانگین به‌اضافه ۲ برابر انحراف معیار ($\bar{X} \pm ۲SD$) به‌عنوان نقطه برش در نظر گرفته شد. سرم‌های با دانسیته نوری بیش از نقطه برش مثبت و کمتر از آن به‌عنوان منفی در نظر گرفته شدند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، شاخص‌های دقت، حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی مثبت و منفی آزمایش با استفاده از فرمول های زیر محاسبه گردید.(۲۲،۴).

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب + مثبت حقیقی}} \qquad \text{ویژگی} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{مثبت کاذب + منفی حقیقی}}$$

$$\text{ارزش پیشگویی مثبت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{مثبت کاذب + مثبت حقیقی}}$$

$$\text{ارزش پیشگویی منفی} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{منفی کاذب + منفی حقیقی}}$$

$$\text{دقت} = \frac{\text{منفی حقیقی + مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب + مثبت کاذب + منفی حقیقی + مثبت حقیقی}}$$

نتایج

نتایج غلظت پروتئین لاروهای *استروس اویس*، رقت‌های مناسب آنتی‌ژن، سرم و کنژوگه در آزمایش الایزا

در آزمایش الایزا و با استفاده از چندین سرم مثبت و سرم منفی قطعی رقت‌های مناسب آنتی‌ژن، سرم و کنژوگه برای هر یک از آنتی‌ژن‌های پیکری و دفعی- ترشحی لاروهای L۲ و L۳ *استروس اویس* به دست آمد که نتایج آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج ارزیابی الایزای طراحی‌شده

با استفاده از رقت‌های مناسب تعیین‌شده، آزمایش الایزای طراحی شده جهت جستجوی پادتن ضد *استروس اویس* در گوسفند روی ۷۱ نمونه سرم آلوده و ۶۱ سرم غیر آلوده از گوسفندان منطقه (نژاد عربی)صورت گرفت و با یافته‌های آن حساسیت، ویژگی، دقت و ارزش‌های پیشگویی مثبت و منفی این آزمایش محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده‌شده است حساسیت الایزای طراحی‌شده با آنتی‌ژن پیکری L۲ بیشتر از L۳ است.

جدول ۱- .نتایج غلظت پروتئین لاروهای *استروس اویس*، رقت‌های مناسب آنتی‌ژن، سرم و کنژوگه در آزمایش الایزا

مرحله لاروی	نوع آنتی‌ژن	غلظت آنتی‌ژن (میکروگرم در میلی‌لیتر)	رقت		
			آنتی‌ژن	سرم	کنژوگه
L۲	دفعی‌ترشحی (ES)	۸۶/۸	۱/۹	۱/۵	۱/۴۰۰۰
	پیکری (S)	۴۶۰	۱/۴۶	۱/۱۰	۱/۸۰۰۰
L۳	دفعی‌ترشحی (ES)	۶۵/۵	۱/۶	۱/۵	۱/۴۰۰۰
	پیکری (S)	۳۰۰	۱/۳۰	۱/۱۰	۱/۸۰۰۰

نسخه پیش نویس

جدول ۲- شاخص‌های آزمایش الایزا برای تشخیص آلودگی *استروس اویس* در گوسفند با آنتی‌ژن‌های مراحل لاروی انگل

مرحله لاروی	نوع آنتی‌ژن	حساسیت	ویژگی	ارزش پیشگویی		دقت
				مثبت	منفی	
L۲	پیکری(S)	۹۰/۱	۸۹/۱	۹۰/۱	۸۹/۱	۸۹/۶
	دفعی‌ترشحی (ES)	۷۴/۶	۹۳/۸	۹۳/۰	۷۶/۹	۸۳/۷
L۳	پیکری (S)	۵۴/۹	۹۶/۹	۹۵/۱	۶۶/۰	۷۴/۸
	دفعی‌ترشحی (ES)	۷۴/۶	۷۳/۴	۷۵/۷	۷۲/۳	۷۴/۱

بحث

برای تشخیص آلودگی‌های انگلی از معاینات بالینی (درمانگاهی)، کالبدگشایی و روش‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شود. بسیاری از آلودگی‌های انگلی داخلی با معاینات بالینی قابل‌تشخیص نیستند. روش کالبدگشایی به دلیل مشکل و هزینه‌بر بودن، در سطح گله به‌خصوص گله‌های داشتی (گوسفند، بز و غیره) قابل‌اجرا نبوده و استفاده از روش‌هایی همچون آزمایش‌های سرولوژی به‌ویژه در مورد مطالعات گسترده و اپیدمیولوژیک آلودگی‌های انگلی ضروری است. روش الایزا یکی از مهم-ترین روش‌های تشخیصی سرمی است که برای تشخیص آلودگی به برخی از انگل‌ها به‌طور مثال در انسان(۱۳) و حیوان (۸) و به‌صورت کیت تجاری استفاده می‌شود. روش مذکور به دلیل دقیق، راحت، سریع و ارزان بودن، برای به دست آوردن کیت تشخیصی با حساسیت و ویژگی قابل‌قبول و به‌کارگیری در تشخیص آلودگی‌های انگلی با استفاده از آنتی‌ژن‌های آن‌ها در میزبان‌های مختلف، همواره ارزیابی می‌شود. در بررسی حاضر آزمایش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکری لاروهای L۲ و L۳ *استروس اویس* و سرم‌های گوسفندان آلوده و غیر آلوده مشخص کرد که گوسفندان به لاروهای L۲ نسبت به لاروهای L۳ پاسخ‌های بهتری نشان می‌دهند. استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکری لارو L۲ در طراحی الایزا با حساسیت و ویژگی حدود ۹۰٪ و ۸۹٪ همراه بود، درصورتی‌که حساسیت و ویژگی الایزا با آنتی‌ژن‌های لارو L۳ *استروس اویس* به ترتیب حدود ۵۵٪ و ۹۸٪ برآورد گردید. به‌طورکلی حساسیت الایزا بالارو L۳ پایین‌تر از حساسیت الایزای با لارو L۲ بود. آزمایش الایزا با آنتی-ژن‌های پیکری لارو L۳ ویژگی بالاتری نسبت به الایزای با لارو L۲ داشت. Suarez و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه پاسخ‌های ایمنی هومورال به *استروس اویس* در گوسفند، رابطه معنی‌داری بین تعداد لاروهای مرحله ۱ و میزان IgM و بین لاروهای مرحله دوم (L۲) و جذب نوری IgG مشاهده کردند. در مطالعه Alborzi و همکاران در سال ۲۰۱۴ پاسخ ایمنی هومورال به پروتئین‌های پیکری و دفعی-ترشحی لاروهای مرحله‌ی دوم (L۲) و سوم (L۳) *استروس اویس* در گوسفندان منطقه خوزستان و ایمنی‌زا بودن آنتی‌ژن‌های آنها به روش ایمونوبلاتینگ نشان داده است(۲). نتایج آزمایش الایزای مطالعه حاضر با آنتی‌ژن‌های پیکری لاروهای L۲ و L۳ *استروس اویس* نشان داد که گوسفندان به لاروهای L۲ نسبت به لاروهای L۳ پاسخ‌های بهتری نشان می-دهند. استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکری لارو L۲ در الایزا با حساسیت و ویژگی حدود ۹۰٪ و ۸۹٪ همراه بود، درصورتی‌که الایزا با آنتی‌ژن‌های لاروL۳ *استروس اویس* گرچه با ویژگی بالاتری(۹۸٪) همراه بود اما حساسیت کمی (حدود ۵۵٪) را نشان داد.. Suarezو همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه پاسخ‌های ایمنی هومورال به *استروس اویس* در گوسفند، رابطه معنی‌داری بین تعداد لاروهای مرحله دوم (L۲) و جذب نوری IgG مشاهده کردند (۲). Tabouret و همکاران در سال ۲۰۰۱ حساسیت و ویژگی آزمون الایزا در تشخیص آلودگی *استروس اویس* در گوسفند را با استفاده از عصاره خام

نسخه پیش نویس

(پیکری) لارو L۲ و تعیین نقطه برش آزمون با میانگین جذب نوری سرم‌های منفی به‌علاوه ۳ انحراف استاندارد، حساسیت آزمون را ۸۸-۷۵ درصد و ویژگی آن را ۶۶-۱۵ درصد مشخص کردند (۲۲).

Angulo-Valadez و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ با مطالعه پاسخ آنتی‌بادی IgG گوسفندان آلوده به *استروس اویس* با استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکریL۲ و تعیین نقطه برش میانگین جذب نوری سرم‌های منفی به‌علاوه ۲ انحراف استاندارد، حساسیت آنتی‌ژن پیکری L۲ را ۹۵٪ و ویژگی آن را حدود ۴۵٪ اعلام کرده‌اند (۴).مقایسه نتایج مطالعات مذکور با مطالعه حاضرکه در آن حساسیت و ویژگی آزمون الایزا با تعیین نقطه برش میانگین جذب نوری سرم‌های منفی به‌علاوه ۲ انحراف استاندارد به ترتیب مقادیر ۹۰٪ و ۸۹٪ تعیین گردید، نشان داد که حساسیت آزمون الایزا با نتایج مطالعه آن‌ها هم‌خوانی زیادی دارد اما ویژگی به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر به‌مراتب بالاتر از مطالعات مذکور است که این تفاوت ممکن است به رقت‌های مورداستفاده سرم، تهیه سرم‌های منفی (از بره)، نوع کنژوگه و تفاوت در واکنش‌های میزبانی (گوسفندان منطقه) مربوط باشد. در مطالعه Jacquiet و همکاران در سال ۲۰۰۵، وجود مثبت کاذب (دارای تیترهای بالایی آنتی‌بادی اختصاصی IgG علیه *اوستروس اویس*) در نمونه‌های سرم منفی را به علت ایجاد واکنش‌های غیراختصاصی، وجود لاروها غیرقابل ردیابی در حفرات بینی در حیواناتی که در سینوس‌های آن‌ها لاروی مشاهده نشده، آلوده بودن قبلی حیوانات و خروج لاروها پیش از زمان نمونه‌گیری بیان کردند زیرا میزان بالای آنتی‌بادیIgG اختصاصی می‌تواند بعد از خارج شدن لاروهای بالغ موجود یا بعد از درمان ضد لاروی باقی بماند (۱۲). Goddard و همکاران در سال ۱۹۹۹، در ارزیابی الایزا برای تشخیص سرمی اوستروزیس در گوسفند، با استفاده از آنتی‌ژن پیکری لاروهای مرحله ۱، حساسیت و ویژگی آزمایش را با استفاده از نقطه برش آن بر اساس ۳۵ درصد باند شدن یک سرم کنترل مثبت رفرنس به ترتیب ۹۷/۴ و ۹۷/۶ مشخص کردند (۹). در مطالعه حاضر از لارو L۱ در ارزیابی روش الایزای غیرمستقیم به دلایلی ازجمله مشکلات تهیه آن استفاده نشد. بااین‌حال گرچه پس از آلودگی با لارو L۱ در گوسفند و بز وجود IgG را می‌توان تشخیص داد اما مشخص‌شده که لاروهای L۱ نسبت به لاروهای L۲ و L۳ به علت کوچک بودن و تغذیه کمتر، سیستم ایمنی میزبان را کمتر تحریک می‌کند درصورتی‌که با رشد و تکامل لاروهای L۲ و L۳ در گوسفند و بز میزان IgG اختصاصی افزایش می‌یابد (۴، ۶، ۱۹و۲۱). بااینکه اثر آنتی‌بادی‌ها روی *اوستروس اویس* ناشناخته است اما به‌هرحال پاسخ‌های مثبت ایمونوگلوبولین سیستمیک (عمومی) در تعیین کینتیک آنتی‌بادی، تشخیص آنتی‌ژن و تشخیص سرمی انگل سودمند است. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات بیانگر آن است که نوع لارو و آنتی‌ژن استفاده‌شده و چگونگی تعیین نقطه برش در تفاوت در حساسیت و ویژگی آزمون الایزا نقش دارد و بنابراین بهتر است آزمایشات الایزا بصورت منطقه‌ای و باتوجه نوع دام و تفاوت‌های ایمونولوژیک احتمالی آنها مورد ارزیابی قرار گیرد. بطورکلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که می‌توان از آزمایش الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌ژن‌های پیکری لارو L۲ *استروس اویس* به‌عنوان روشی قابل‌قبول در تشخیص سرولوژیک و مطالعات اپیدمیولوژی آلودگی گوسفندان به *استروس اویس* و به‌منظور درمان و کنترل انگل استفاده کرد.

قدردانی و تشکر

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

منابع

۱- توسلی، موسی؛ تاجیک، حسین؛ ملکی فرد، فرناز؛ سلیمانزاده، علی و مردانی، کریم؛ بررسی آلودگی فصلی گوسفندان به نوزاد *استروس اویس* در کشتارگاه شهرستان ارومیه، مجله دامپزشکی ایران؛ ۱۳۹۰؛ ۴(۷): ۷۸-۷۳.

2-Alborzi, A.R; Jolodar, A; Seyfi Abad Shapouri, M, and Bagherian pour, E; Isolation and identification of excretory-secretory and somatic

نسخه پیش نویس

10-Hakimi, R; and Yazdi, I; Oral mucosa myiasis caused by *Oestrus ovis*. Arch. Iran. Med; 2002; 5(3): 194-196.

11- Hall, M; and Wall, R; Myiasis of humans and domestic animals. Adv. Parasitol; 1995; (35): 257–334.

12-Jacquiet, P; Tran Thi Ngoc, T; Nouvel, X; Prevot, F; Grisez, C; Yacob, H.T; Bergeaud, J.P; Hoste, H; Dorchies, P. and Tabouret, G; Regulations of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) populations in previously exposed and naıve sheep. Vet. Immunol. Immunop; 2005; 105: 95–103.

13- Jacquier, P; Gottstein, B; Stingelin, Y, and Eckert, J; Immunodiagnosis of Toxocarosis in Humans: Evaluation of a New Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kit. J. Clin. Micro; 1991; 29(9): 1831-1835.

14-Jafari, S; Negahban, SH; Tamadon, A. and Behzadi, M;Prevalence and intensity of *Oestrus ovis* in sheep of Shiraz, Southern Iran.Trop. Anim. Health. Prod; 2009; 41:1259–1262.

.

15- Lucientes, J; Clavel, A; Ferrer-Dufol, M; Valles, H; Peribanez, M. A; Gracia-Salinas, M. J. and Castillo, J. A; Short report: one case of nasal human myiasis caused by third stage instarlarvae of *Oestrus ovis*. Am. J. Trop. Med. Hyg; 1997; 56:608-609.

16-Masoodi, M; and Hosseini, k; External ophthalmomyiasis caused by sheep bot fly. Arch.Iran. Med; 2004; 7(2): 136-139.

17-Neres-abdo, E; Sette-Dias, A.C; Comunian, C.R; Dutra, C.E. and Aguair E, G;Oral myiasis: A case report. Med Oral Patol Oral Cir Bucal; 2006; 11:E130-131.

antigens from the *Oestrus ovis* larvae by SDS-PAGE and immunoblotting.V. R.F; 2014; 5 (4):307 – 311.

3-Alcaide, M; Reina, D; Frontera, E. and Navarrete, I; Epidemiology of *Oestrus ovis* (Linneo, 1761) Infestaion in goats in Spin. Vet. Parasitol; 2005; 130(3):277-284.

4-Angulo-Valadez C. E; Cepeda-Palacios, R; Ascencio, F; Jacquiet, p; Dorchies, p; Ramirez-Orduna, I. M, and Lopez, M. A; IgG antibody response against salivary gland antigens from *Oestrus ovis* larvae in.experimentally and naturally infected goats. Vet. Parasitol; 2009; 161: 356-359.

5-Bauer, C; Steng, G; and Prevot, Dorchies, F. P; Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in southwestern Germany. Vet. Parasitol; 2002; 110: 137–143.

6- Dorchies, P,and Yilma, J.M; Current knowledge in immunology of *Oestrus ovis* infection. Acta. Parasitologica Turcica; 1996; 20:563–580.

7-Dost, T; and Dayanir, V; A case of naso-opthalmic myiasis. Vet. Rec, 2008; 371-373.

8-Glor, S. B; Edelhofer, R; Grimm, F; Deplazes, P. and Basso, W; Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum,plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep.Parasites & Vector; 2013; 6: 85; doi: 10.1186/1756-3305-6-85. PubMed PMID: 23561035.

9-Goddard, P; Bates, P. and Webster, K, A; Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infections in sheep. Vet. Rec; 1999; 144:497–501.

نسخه پیش نویس

18-Pandey, A; Madan, M; Asthana, A.K; and Das, A;Kumar, S. and Jain, K; External ophthalmomyiasis caused by *Oestrus ovis*: a rare case report from India. Korean J Parasitol; 2009; 47(1): 57-59.

19-Romero, J.A; Arias, M.S; Suarez, J.L; Paz-Silva, A;Francisco, I; Alonso, F; Cortiñas, F. J; Dacal, V; Romasanta, A; Morrondo, P; Díez-Baños, P; Scala, A. and Sánchez-Andrade, R; Application of the analysis of serum antibodies (immunoglobulins M and G) to estimate the seroprevalence of ovine oestrosis and to evaluate the effect of chemotherapy. J Med Entomol; 2010; 47(3): 477–481.

20-Soulsby, E.J.L; Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated Animals; 7th.Ed. Bailliere Tindal London, 1982; pp: 430-431.

21- Suarez, J.L; Scala, A; Romero, J.A; Paz-Silva, A; Pedreira, J; Arias, M; Diaz, P; Morrondo, P; Diez-Banos, P. and Sanchez-Andrade, R; Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. Vet Parasitol; 2005; 134(1-2):153-158.

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

23-Wall, R. and Shearer, D; Veterinary Ectoparasites, Biology, Pathology and Control. 2nd Ed. Blackwell Science, 2001; pp: 121-122.

24-Zumpt, F; Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworth London, 1965; pp: 267-270.

نسخه پیش نویس

Evaluation of an in-house enzyme linked immuonosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Oestrus ovis* antibodies in sheep

Alborzi, A. R[1*]; Ghorbanpour, M[2]; Yoosef Vand, Z[3]

[*]1. Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz -Iran.
2. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz -Iran.
3. Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz -Iran.

نسخه پیش نویس

Summary

Oestrus ovis is a fly with cosmopolitan dispersion and one of zoonotic agents. The larvae are a common cause of myiasis in human and sheep. This study was conducted in first time in Iran to evaluate an ELISA for diagnosis of *Oestrus ovis* infection in sheep by using somatic (S) and excretory-secretory (ES) antigens from the second and third stage larvae of the parasite (L2, L3) collected of the study area. Somatic/excretory-secretory antigens were prepared by homogenization and culturing the larvae in RRMI-1640 respectively. After determination of appropriate dilutions of the antigens, serum, conjugate. evaluation of ELISA for diagnosis of anti-*Oestrus ovis* antibodies in infected sheep were examined with the antigens, 71 positive and 61 negative (from indoor lambs) serum samples. The results of this study revealed appropriate dilutions of the SL2 and SL3 1:46, 1:30, conjugate (1:8000) and sera (1:10) and also of ESL2 and ESL3, 1:9, 1:6, conjugate (1:4000) and sera (1:5) respectively. The sensitivity and specificity rates of the assay with the SL2 and SL3 were 90.1%, 89.1%; 54.9%, 96.9% and with ESL2 and ESL3, 74.6%, 93.8%; and 74.6%, 73.4% respectively. Positive / negative predictive values of the test with the SL2 and SL3 were 90.1%, 95.1% and 89.1%, 66.0% while with the ESL2 and ESL3 were 93.0%, 75.7% and 76.9%, 72.3% respectively. According to the results**,** L2 was better than L3, and somatic antigens compared with excretory-secretory antigens revealed better results, thus it can be used for serodiagnosis and epidemiological studies of oestrosis in sheep.

Keywords**:** *Oestrus ovis*, antigens, sheep, ELISA.

[*]Corresponding Author E-mail: alirezaalborzi@yahoo.com

نسخه پیش نویس