مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد21 (4) 2008

تقييم اختبارالامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم النقطي Dot-ELIZA لتشخيص مرض الأكياس المائية في الإنسان

وحيدة رشيد علي

قسم علوم الحياة، كلية التربية- ابن الهيثم ، جامعة بغداد

الخلاصة

تضمنت الدراسة فحص 42 مريضا ليبيا شخصت إصابتهم بمرض الأكياس المائية من الطبيب المختص عن طريق الفحص بالأشعة السينية X-rays والتصوير فوق الصوتيUltrasonography والتصوير الطبقي المحوري Computed Tomography (CT) scanning، وكان معدل الإصابة لكل من الإناث والذكور 69% و31% على التوالي، و الكبد هو العضوالاكثر إصابة بنسبة (69%) تليه الرئتين (23.8%) فالدماغ (4.8 %) والكليتن(2.4%).

جمعت 42 عينة مصل من مرضى الأكياس المائية الذين تأكدت إصابتهم بالمرض، و30عينة مصل لأشخاص مصابين بأمراض طفيلية غير الأكياس المائية، و 33 عينة مصل لأشخاص أصحاء لإجراء اختبار الامتزاز المناعي المرتبط بالآزيم النقطي Dot-ELIZA باستعمال المستضد B المعزول من سائل الكيس المائي للأغنام، وذلك بوضع مايكروليتر من المستضد B على أقراص ورق النتروسليلوز و100 مايكروليتر واحد من المصل المخفف بنسبة 800:1 والمقترن Conjugate بنسبة 100:1وأقصى مدة حضن كانت 45 دقيقة. بلغت حساسية وخصوصية الاختبار 97.7% و98.4% على التوالي لتشخيص الأكياس المائية ، و لم يظهر الاختبار أي تفاعل ايجابي لأمصال الأشخاص الأصحاء في حين لوحظ وجود تفاعل تصالبي Crossreactionواحد لمصل شخص مصاب بدودة البقر الشريطية *Taenia saginata*.

المقدمة

داء الأكياس المائية Hydatidosis من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان، ويتسبب المرض عن الطور اليرقي لطفيلي المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus*، ويستهدف الكبد بالدرجة الأولى تليه الرئتين ثم الأعضاء الأخرى من الجسم.

ينتشر المرض في أنحاء مختلفة من العالم، ويعد من مشاكل الصحة العامة إذ قدرت الإصابة به عالميا بحدود 220 اصابة /لكل 100000 شخص (1). ويتوطن المرض في أميركا الوسطى والجنوبية والهند واستراليا وروسيا والشرق الأوسط ومنطقة البحر الأبيض المتوسط وقارة أفريقيا ومنها الجماهيرية الليبية، إذ سجلت 180 إصابة بالمرض للأعوام 1971-1976 (2)، وفي الشمال الغربي من ليبيا شخصت 75 إصابة عند فحص 4103 شخص عن طريق التصوير فوق السمعي Ultrasonography (3)، وفي مدينة بنغازي كانت نسبة الإصابة42% (4).

يشخص مرض الأكياس المائية بالطرائق التصويرية مثل التصوير فوق السمعي، والتصوير الطبقي المحوريComputed Tomography (CT) scanning, وتصوير الرنين المغناطيسي Imagneticresonance (MRI) . ومن طرائق التشخيص المصل للمرض اختبار التلازن الدموي Hemagglutination الترحيل المناعي Immunoelectophoresis وفحص التبقع المناعيImmunoblot assay ، الامتزاز المناعي المرتبط بإنزيم الاليزا ELISA. وهذه الاختبارات تستند بصورة أساسية الى فحوصات يتم فيها تحضير المستضدات الخام crude antigen أو النقية من الطور اليرقي الكيسي، إذ يحتوي الكيس المائي على 23 مستضدا ، وأكثر هذه المستضدات شيوعا المستضد 4 أو B والمستضد 5 أو A (5) .

وفي اختبار الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم النقطي Dot. ELIZA يستعمل المستضد بكميات قليلة جدا ملتصقة على أوراق النتروسليلوز ، استخدم الاختبار لتشخيص الليشمانيا الاحشائية (6) وداء المقوسات (7) ، والأكياس المائية (8). ومن مميزات هذا الاختبار هو إمكانية قراءة النتائج عيانيا ولا يحتاج إلى جهاز اللاليزا الباهض الثمن وان التفاعل يحدث في مدى واسع من درجات الحرارة كما يمكن الاحتفاظ بالمستضد مدة

طويلة تصل إلى270 يوما أو أكثر (9) ، يمكن إجراؤه في المختبر وفي الظروف الحقلية.

تهدف الرسالة الى تقييم حساسية وخصوصية اختبار Dot- ELIZA باستعمال المستضد B المعزول من سائل الكيس المائي للأغنام، لتشخيص إصابة المرضى بداء الأكياس المائية في الجماهيرية الليبية.

المواد وطرائق العمل

جمعت 42 عينة مصل (29 من الإناث و13 من الذكور) المصابين بالأكياس المائية من عدد من مستشفيات الجماهيرية الليبية، والذين تأكدت إصابتهم بالمرض من الطبيب المختص عن طريق الأشعة السينية والتصوير فوق السمعي والتصوير الطبقي المحوري لإصابات الدماغ.

لأجل الدقة التشخيصية للاختبار (Dot. ELIZA) جمعت من مستشفى الثورة بمدينة البيضاء الليبية (30) عينة مصل موجب لأشخاص مصابين بطفيليات مختلفة مثل داء الاميبات Amoebiasis (العدد 6)، وداء المقوسات Toxoplasmosis (العدد 6)، ومن المختبرات التحليلية في جمهورية مصر جلبت عينات مصل لكل من داء الليشمانيا الاحشائية Visceral leshmaniasis (العدد 6)،وداء الشريطيات البقرية Taeniasis (العدد5)، وداء المنشقات المعوية Schistosomiasis (العدد7).

جمعت 33 عينة مصل لأشخاص أصحاء ليس لديهم أي تاريخ إصابة أو دلائل سريرية على إصابة محتملة بمرض الأكياس المائية أو أية حالة مرضية أخرى. حفظت عينات المصل لمجاميع الدراسة بدرجة -20 م لحين إجراء فحص Dot.ELIZA.

تم الحصول على الأكياس المائية من أكباد ورئات الأغنام المصابة من المجزرةالمركزية بمدينة بنغازي. وضعت العينات داخل حاوية مبردة ونقلت إلى المختبر، ووضعت في طبق وعقم السطح الخارجي لها بالكحول الاثيلي 70% وسحبت اكبر كمية من السائل الكيسي بمحقنة سعة 10 مل، ووضع السائل في أنابيب لإجراء النبذ المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة مدة 5دقائق. سحب الراشح ووضع في قنينة معقمة محكمة الغلق ليستعمل في تحضير المستضد B. ولتحديد حيوية الكيس المائي أضيف كمية من الدارئ الفسلجيNormal saline إلى الراسب المكون من عالق الرؤيسات الأولية

Protoscolices. سحب 10 مايكروليتر منه مع إضافة 10مايكروليتر من صبغة الايوسين المائية، وفحصت الرؤيسات تحت المجهر الضوئي، فالرؤيسات التي تصطبغ بلون احمر تعد ميتة والعكس صحيح، وأخذت ثلاثة مكررات لاستخراج التركيز النهائي لعدد الرؤيسات الحيوية وتقييم حيوية الكيس المائي.

استخدمت طريقة Willams *et al.* (5) لاستخلاص المستضد B من سائل الكيس المائي للأغنام وكما يأتي:-

1- وضع 500 مل من السائل الكيسي للأغنام في كيس الديلزة Dialysisbrane وغمر بمادة البولي اثيلين كلايكول بوزن جزئي2000 دالتون بدرجة 4م لتركيزه إلى حجم 100 مل بعدها غسل السطح الخارجي للكيس بالماء الجاري ثم بالماء المقطر للتخلص من أثار البولي اثيلين كلايكول.

2- إجراء عملية الفرز الغشائي Dialysis لحجم 100 مل يمن السائل الكيسي ضد دارئ الخلات Acetate buffer بحجم 500 مل عيارية 5ملي مول، وبأس هيدروجيني 5 مدة 24 ساعة بدرجة 4م مع تبديل الدارئ .

3- فصل الراسب بإجراء بالنبذ المركزي بسرعة 50000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة،و أهمل الراشح لاحتوائه على الألبومين والكلوبيولين غير النوعي للمضيف، وأذيب الراسب في30 مل من محلول دارئ الفوسفات Phosphate buffer solution (PBS) بعيارية 5مول وبأس هيدروجيني 8.

4- أضيف محلول مشبع من سلفات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ وبشكل تدريجي لحين الوصول إلى نسبة تشبع 40% ،وترك مدة 30 دقيقة بدرجة 4م .

5- إجراء النبذ المركزي بسرعة 50000 دورة / دقيقة مدة 60 دقيقة لفصل الراشح الحاوي على مستضدات الطفيلي، وأهمل الراسب لاحتوائه على الكلوبيولينات النوعية للمضيف.

7- استخلص المستضدB بغلي الراشح مدة 15 دقيقة، وإجراء النبذ المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة.

7- مرر الرشح بمرشح دقيق Millipore filter (0.22 مايكروليتر) لزيادة نقاوة المستضد B.

8- أضيف للمستضد B مادة الميرثولايت بتركيز 0.01% بوصفها مادة حافظة، وحسب تركيز بروتين المستضد (10)، وحفظ المستضد بدرجة -20م لحين الاستعمال.

اعتمدت طريقة Zimmerman and Nelson (11) لإجراء الاختبار وكما يأتي:-

1- جهزت مجموعة أقراص من أوراق الترشيح الدقيقة النتروسليلوز 0.22 مايكروميتر بقطر 5 مل مجهزة من شركة Milipore, Bedford باستعمال الثاقبة الورقية. وضع مايكروليتر واحد من المستضد B على كل قرص باستعمال محقنة هاملتون، وتركت العينات لتجف بالهواء وبدرجة حرارة الغرفة.

2 - وضعت الأقراص في حفر طبق المعايرة الدقيق ذي 96 حفرة مسطحة القعر Microtiter (Coster, Cambridge) plate

3- أضيف 100 مايكروليتر من دارئ الترس Tris buffer (TBS) solutionالمضاف إليه توين20 Tween (TBS/T20) بتركيز0.5% مع تحريك الطبق مدة دقيقة. يغطى الطبق ويترك مدة 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة لغلق أي ارتباط غير نوعي للأجسام المضادة.

4- سحب دارئ ترس وغسل الطبق ثلاث مرات مدة عشر دقائق لكل غسلة باستعمال محلول الغسيل Washin buffer المكون من T20 0.5% وTBS بنسبة حجم /حجم.

5- أضيف 100 مايكروليتر من المصل المخفف بنسبة 800:1 لمجموعة مرضى الأكياس المائية ومرضى الطفيليات المختلفة والسيطرة السالبة.

6- حفظ الطبق المغطى بدرجة حرارة الغرفة مدة 45 دقيقة، وغسل الطبق كما في الفقرة 4 أعلاه بعد سحب الأمصال من الحفر.

7- أضيف المقترن المضاد للمصل Conjugate وهو عبارة عن Goat anti human IgG والمرتبط بأنزيم Horse radish peroxidase (شركة Organon) بحجم 100 مايكروليتر وبعد تخفيفه بنسبة 1000:1 بمحلولTBS/T.

8- إعادة الفقرة 6 أعلاه بعد سحب المقترن من حفر الطبق.

9- أضيف إلى كل حفرة 100 مايكروليتر من مادة الأساس Chromogen diamino benzidin tetrahydrocholoride (Sigma) مع وضع الطبق في مكان مظلم بدرجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة.

10- تمت قراءة النتائج، إذ تكون النتيجة موجبة بظهور اللون البني الغامق مقارنة بالنتائج السالبة العديمة اللون أو ذي اللون البني الفاتح جدا.

اعتمدت الطريقة الموضحة من AL-Sorchee (12) لحساب حساسية وخصوصية الاختبار وكما يأتي:

$$\text{الحساسية} = \frac{a}{a+b}$$

a = مجموع العينات الموجبة المصابة بالأكياس المائية .

b= مجموع العينات السالبة المصابة بالأكياس المائية .

$$\text{الخصوصية} = \frac{d}{d+c}$$

c= مجموع العينات الموجبة غير المصابة بالأكياس المائية.

d= مجموع العينات السالبة غير المصابة بالأكياس المائية.

النتائج

من مجموع 24 مصابا بالأكياس المائية كان نسبة إصابة الكبد 61.9%، والرئتين 23.8% ، والدماغ 4.8%، والكليتين 2.4% جدول (1) ، وكانت نسبة إصابة الإناث 69% والذكور 31% ، وبأعمار تراوحت بين 9- 80 سنة.

من خلال فحص 42 مصلا الذين تأكدت إصابتهم بالمرض من الطبيب المختص شخصت 41 حالة موجبة (97.6%) باستخدام اختبار Do. ELISA، وكان أفضل تخفيف للمصل:8001 وللمقترن800:1 بمحلول TBS/T، وكانت مدة حضانة المستضد مع المصل 45 دقيقة.

يوضح الجدول (3) التفاعل التصالبي للاختبار مع أمصال مجموعة المرضى المصابين بطفيليات أخرى، إذ اظهر الاختبار وجود تفاعل تصالبي واحد عند استعمال أمصال داء التينيا البقرية Taeniasis ، ولم تظهر أمصال مجموعة السيطرة السالبة أي تفاعل ايجابي في هذا الاختبار.

بلغت حساسية وخصوصية اختبار Dot-ELIZA لتشخيص الإصابة بالأكياس المائية 97.6% و 98.4% على التوالي.

المناقشة

توزعت الإصابة بداء الأكياس المائية في أعضاء مختلفة من جسم الإنسان ومنها الكبد الذي يعد الموقع الأول للإصابة، ويرجع ذلك إلى طبيعة انتقال الطفيلي من بطانة الأمعاء عبر الدورة البوابية الكبدية إلى الكبد حيث يساعد هذا الترابط التشريحي والوظيفي للكبد بوصفه أحد ملحقات الجهاز الهضمي، وما يوفره الكبد من مكان مثالي لتغذية الطفيلي وملجا" له، وتحتل الرئتان المرتبة الثانية في نسبة الإصابة ويعزى إلى طبيعة تغذيتها الدموية واللمفاوية ودورها الوظيفي، وسجلت نسبة إصابة 4.8% للدماغ، و2.4% للكليتين وهما من الأعضاء المعرضة للإصابة بالمرض وهذا ما أكدته اغلب الدراسات (13).

شغلت إن حساسية جنس المضيف للإصابة بالمرض الباحثين ،وأظهرت معظم دراساتهم التي شملت الإنسان إن عدد الإصابات التي سجلت في الإناث تفوق تلك المسجلة في الذكور (4,2). ويرجع ذلك الى أسباب عديدة ومنها دور الهرمونات الاستروجينية في حدوث المرض وذلك بتأثيرها في عمل الحركيات الخلوية (Cytokinase) المفرزة من قبل الخلايا التائية التي هي محور التنظيم المناعي في الجسم ، كما توفر هذه الهرمونات بيئة مناسبة لاستقرار ونمو وتكاثر الطفيلي (14) ، وقد تعتمد نسبة الإصابة في كلا الجنسين على المناطق الجغرافية في العالم وعلى طبيعة الممارسات الحياتية والاجتماعية لكلا الجنسين.

تستخدم طرائق التشخيص المناعية المختلفة لتأكيد الإصابة بالمرض ، وفي الدراسة الحالية استخدم اختبار Dot. ELIZA لتقيم كفاية هذا الاختبار باستخدام المستضد B لأنه من المستضدات الأكثر تواجدا في السائل الكيسي وهو بروتين دهني مستقر Thermo- Stable lipoprotein بوزن جزيئي 160 كيلو دالتون، ويوجد المستضد في الرؤيسات الأولية Protoscolices ، ويتركز في السايتوبلازم البعيد والخلايا الحشوية لمحافظ الحضنة Prood capsules وجدارها وللمستضد حساسية وخصوصية نوعية(15).

أوضحت النتائج وجود تفاعل تصالبي واحد بين المستضد B والمصل الحاوي على أجسام مضادة ضد دودة البقر الشريطية *T. saginata* ، وهذا يتفق مع دراسة Nejerul *et al.* (16) التي أكدت ان عدد من المصابين بداء التينيا اظهر تفاعلات ايجابية في اختبار التراص الدموي غيرالمباشر باستعمال مستضدات سائل الكيس المائي الخام

Crude hydatid cyst ، وقد يعزى التفاعل التصالبي إلى اشتراك تلك الطفيليات التي تنتمي إلى نفسها العائلة (عائلة Taeniidae) ببعض المحددات المستضدية مع سائل الكيس المائي(17).

وفيما يتعلق بحساسية وخصوصية الاختبار التي كانت 97.6% و98.4% على التوالي فأنها جاءت متوافقة مع دراسة (9)، إذ سجل الاختبار حساسية 88.9% وخصوصية 95.9%، وهذا الفرق في التقييم قد يعزى الى نقاوة المستضد المحضر الذي يزيد من حساسية وخصوصية الاختبار المناعي مقارنة بمستضدات غير نقية (5).

يستنتج من ذلك إن اختبار Dot.ELIZA سريع وحساس وذو خصوصية عالية، وتستعمل فيه كميات قليلة من المستضد (مايكروليتر واحد) والمحاليل الأخرى، كما إن مدة التفاعل قصيرة لغرض التصاق المستضد على سطح أوراق النتروسليلوز ،وإمكانية الاحتفاظ بالمستضد والضد مدة طويلة (9)، وقراءة النتائج عيانيامن دون الحاجة إلى جهاز المقياس الضوئي الخاص لاختبار الاليزا الباهض الثمن، فهذه المعايير تسهل من إجراء المسح الوبائي المصلي للمرض.

المصادر

1.Dandan, I. S.and Soweid, A .M.(2002).Hydatid cysts.emedicine.com http://www.emedicine.com/ped/tipic.

2.Dar,E .K. and Taguri, S. (1978).Trans Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.,72: 313-314.

3.Shamesh, M. K.; Macpherson,C. N. L.;Beesley, W. N.; Guusbi,, A. and Elsonosi, T.(1992). cross-sectional ultrasound study. Ann. Trop. Med. Parasitol., 86: 381-386

4.Tashani, O. A.; Zhang, L .H.; Boufana, B.; Tegi, A .and McManus, D.P.(2002). Ann.Trop. Med. Parasitol., 96: 369-381.

5. Williams, J. F.; Perez-Esandi, M. V.; Oriol, R.(1971). Am. J. Trop. Med. Hgy., 20: 575-579.

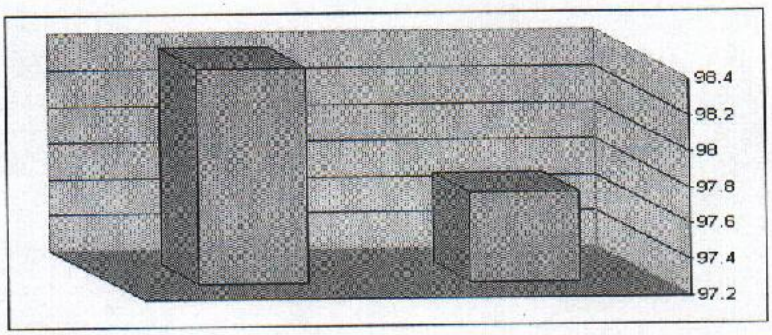
6. Pappas, M. G.; Hajkowski, R. and Hochmeyer, W. T (1983). rapid. J. Immunol. Method. 64: 205-214.

7. Pappas,M.G.;Lunde,M.N.; Hajkowski,R.and McMohan,J(1986). Vet. Paraiteol., 20: 31-42.

8. Romia S. A. ; Ussef ,M. E. ;Handoussa,A. E. Rizk, H. M. ; Sallam, S. M.(1992). Dot-ELIZA as a diagnostic tests in hydatid disease. J. Egypt Soc. Parasitol., 22 : 603-610.

9. Pappas, M.G.; Hajkowski ,R. and Hochmeyer, W. T. (1984). leshmaniasis Vet. Parasitol., 64: 239-249.

10.Whitaker, A.and Granum, M .L.(1980).. Ann. Biochem., 109: 156-159.
11.Zimmerman, G. I. and Nelson, M. J. (1985). Am .J. Vet . Res., 40: 861-869.
12. AL-Sorchee, S. M. (2005).Immunological study on Toxoplasmosis women with a history of abortion. M..Sc. Thesis, Colleg Education (Ibn -A- Haitham),Univ. Baghdad.
13-Col, C.; Col, M.and Lafe, H.(2003). Acta Med. Austrica., 30 :61-64.
14. Eshobedo,G.; Roberts, C .W.; Correro ,J. C. and Mora-Montor, J,C.(2005). Trends Parasitol.,21:588-593.
15. Sanchez, F. ; Garicia, J. ; March, F. ; Gardenosa, N.; Colli. P. C., Auladell, C. and Pyats, G.(1993). Parasite Immunol.,15: 441-447.
16.Nejeruh, F. M.; Gathuma, J. M.; Okelo,G.B.A.and Tumboth-Oeri, A. G.(1989). Ann. Trop. Med. Parasitol., 83: 299-203.
17. Joseph, N. K. (1979).Immunological and serological study in.M.Sc.Thesis,Coll. Med., Univ. f Baghdad.



شكل (1): يبين حساسية وخصوصية اختبار Dot- ELIZA لتشخيص الإصابة بالأكياس المائية.

جدول (1) توزيع مرضى الأكياس المائية وفقا لموقع الكيس المائي.

موقع الكيس المائي	الإنـــاث	الـــذكور	المجمـــــوع
	العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)
الكبد	(72.4)21	(61.5) 8	(69) 29
الرئتان	(20.7)6	(30.8) 4	(23.8) 10
الدماغ	(3.4) 1	(7.7) 1	(4.8) 2
الكليتان	(3.4)1	(0) 0	(2.4) 1
المجموع	(69)29	(31)13	(100)42

جدول (2): يبين التفاعل التصالبي لاختبار Dot. ELISA بين المستضد Bوأمصال مغايرة مضادة لمسببات مرضية مختلفة وأمصال السيطرة السالبة.

المجموعة	العدد	عدد التفاعل التصالبي
داء الأميبات	6	-
داء المقوسات	6	-
داء اللشمانيا الاحشائية	6	-
داء التينيا البقرية	6	1
داء المنشقات المعوية	6	-
السيطرة السالبة	30	-

Evaluation of a Dot -ELIZA for the Diagnosis of Human Hydatid Disease

W.R. Ali
Department of Biology, College of Education Ibn Al-Haitham,University of Baghdad

Abstract

Fourty –tow Libyan patients with hydatidosis, which were referred to by the physician for the detection of hydatid cyst by X - rays, Ultrasound and CT-Scan. The infection rate in females and males was(69%)and (31%)respectively .The highest rate 69% was in the liver, followed by the lung(23.8%), the brain (4.8%) and kidney (2.4%).

A total of 42 serum samples were gathered from Libyan patients infected with hydatidosis, 33 serum samples from patients cases with other parasitic diseases than hydatidosis and 30 serum samples from healthy normal controls and were tested by Dot-ELIZA utilizing antigen B from sheep hydatid fluid, dotted onto nitrocellulose filter discs.1μg of antigen B per dot, serum dilution of 1:800, dilution conjugate of 1:1000 and 45 minutes incubation were found optimal.

The sensitivity and specificity of the tests were 97.7% and 98.4%, respectively for detection hydatidosis. No false positive reaction was observed when 31 sera from healthy subjects were assayed. One case of cross-reactions was observe as for serum from a teaniasis person.