تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مقایسه روش معمول تشخیص ژیاریا لامبلیا و آنتاموبا هیستولیتیکا با روش های جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی در خون و مدفوع

محمد جواد غروی
استاد انگل شناسی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
مونا روزبهانی
دانشجوی دکترای انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
حسین بخشکار
کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: مونا روزبهانی

پست الکترونیک: mona.roozbehani@yahoo.com
تلفن : ۸۶۷۰۴۶۱۳-۰۲۱
آدرس: تهران، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

دریافت:۹۳/۲/۱٤
ویرایش پایانی: ۹۳/۳/۲۹
پذیرش: ۹۳/۳/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: *ژیاردیا لامبلیا و آنتاموبا هیستولیتیکا، شایع ترین تک یاخته های روده ای انسان در سراسر جهان می باشد. تظاهرات بالینی عفونت ژیاردیایی به صورت اسهال حاد، سندرم اسهال مزمن و سوءجذب می باشد. آنتاموبا هیستولیتیکا بدون ایجاد علائم بالینی به دیواره روده حمله ور می شود و می تواند به کبد و سایر ارگان های بدن نیز انتشار یابد. لذا به جهت اهمیت تشخیصی این دو تک یاخته در مطالعه ما روش های تشخیصی روتین و مدرن آن ها با یکدیگر مقایسه خواهد شد.*

روش بررسی: *طی یک مطالعه تحلیلی مقایسه ای در سال ۱۳۹۱، از ۱۰۲۵ بیمار مراجعه کننده به ۳ مرکز آزمایشگاهی واقع در تهران و کرج به روش تصادفی ساده، به مدت ۷ ماه نمونه گیری مدفوع و خون انجام گرفت. آزمایش تغلیظی فرمالین دترجنت بر روی تمامی نمونه ها انجام شد. نمونه های مثبت این روش مورد آزمایش های جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی در مدفوع به روش الایزا قرار گرفت. همچنین جهت بررسی آنتی بادی ژیاردیا و هیستولیتیکا در خون از بیماران مدفوع مثبت، نمونه سرمی گرفته شد.*

یافته ها: *از ۱۰۲۵ نمونه مدفوع ۷۶ مورد(۷/۴٪) ژیاردیا و ۱۹ مورد(۱/۸٪) آنتاموبا هیستولیتیکا با روش میکروسکوپیک فرمالین-دترجنت مثبت شدند. در روش سرولوژیک الایزا، کوپر و آنتی بادی ژیاردیا ۸۱ مورد(۷/۹٪)، کوپر و آنتی بادی آنتاموبا هیستولیتیکا۲۴ مورد(۲/۳٪)، کوپر و آنتی ژن ژیاردیا ۷۸ مورد(۷/۶٪) و کوپر و انتی ژن هیستولیتیکا ۵ مورد (۰/۴٪) شناسایی شده است. انتی بادی خون در آنتاموبا هیستولیتیکا در۲۲ مورد(۲/۱٪) اندازه گیری شده است.*

نتیجه گیری: *حساسیت روش میکروسکوپی نسبت به روش های سرولوژیک جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی در مدفوع به روش الایزا بالاتر از ۹۰ درصد می باشد. در نتیجه روش فرمالین-دترجنت به عنوان روش برتر میکروسکوپیک در آزمایش های مدفوع انتخاب شده است.*

واژه های کلیدی: *ژیاریا لامبلیا و آنتاموبا هیستولیتیکا، آنتی ژن مدفوع، آنتی بادی در خون و مدفوع*

آدرس مقاله
غروی م ج، روزبهانی م، بخشکار ح" مقایسه روش معمول تشخیص ژیاریا لامبلیا و آنتاموبا هیستولیتیکا با روش های جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی در خون و مدفوع" مجله علوم آزمایشگاهی، زمستان ۱۳۹۳، دوره هشتم (شماره ۵): ۹۷-۱۰۳

مقدمه

امروزه در بسیاری از نقاط جهان بیماری های عفونی مشکلات فراوانی را برای جوامع انسانی به وجود می‌آورد، این در حالی است که آسیب‌ها، صدمات و خسارات ناشی از این بیماری ها، کشورهای در حال توسعه را در مقایسه با کشورهای صنعتی بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد(۱). در این میان بیماری های انگلی با انتشاری گسترده به عللی از قبیل فقر، سوء تغذیه، بی‌سوادی، ازدیاد بی رویه جمعیت، فقدان‌تسهیلات بهداشتی و ده ها عامل دیگر بخش عمده‌ای از مشکلات را به خود اختصاص می‌دهد. به گونه‌ای که در برخی از مناطق جهان سهم بیماری های انگلی در ایجاد خسارات اجتماعی، اقتصادی با برخی بیماری ها نظیر سل، بیماری های مقاربتی، بیماری های قابل پیشگیری با واکسن و عفونت های حاد تنفسی برابری می‌کند(۲). با توجه همه جانبه به شرایط جوی و جغرافیایی کشور پهناور ما و خصوصیات زندگی، پایه‌های فرهنگی و بهداشتی مردم ما به خوبی آشکار است که انواع مختلف انگل ها خصوصاً گونه‌های بیماری زا می‌توانند در این کشور زیست کنند و می توان انتقال آلودگی را تحت تأثیر عوامل سرایت، شیوع و پراکندگی بیماری های انگلی در هر زمان و در هر منطقه تخمین زد(۳). از آنجایی که بیماری های انگلی اغلب دارای سیر مزمن بوده و کمتر با آثار و علایم بالینی همراه هستند، لذا افراد آلوده ممکن است بعد از بهبود ظاهری و بدون داشتن هر گونه علایم‌کلینیکی به صورت حاملین بیماری درآیند و خود نقش مخزن آلوده را برای افراد سالم به عهده بگیرند. به عبارت‌دیگر نظر به این که در افراد ناقل تعادل بیولوژیکی خاص بین انگل و میزبان به وجود می‌آید، لذا این گونه میزبان ها در حالی که از صدمات انگل محفوظ هستند در عین حال مخزن عامل بیماری می‌باشند. بدین جهت آگاهی از نقش بیماری های انگلی و راه های پیشگیری از آن ها از اهمیت خاصی برخوردار است(۴). از طرفی در بین عفونت های انگلی دستگاه گوارش، ژیاردیا از مهمترین و شایع ترین آن هاست. شیوع ابتلا به ژیاردیا جهانی است و شایع ترین انگل جدا شده از نمونه های مدفوع در آمریکا است. انگل مهم دیگر دستگاه گوارش آنتاموبا هیستولیتیکا است که به دیواره روده حمله ور می شود بدون آن که نشانه بالینی، اسهال و دیسانتری ایجاد کند(۵). این انگل می تواند از روده و کبد به سایر ارگان های بدن نیز انتشار یابد. لذا به جهت اهمیت تشخیصی این دو تک یاخته در مطالعه ما روش های تشخیصی روتین و مدرن آن ها با یکدیگر مقایسه خواهد شد. به نظر می رسد کار بر روی تکنیک های مختلف آزمایشگاهی در خصوص دو تک یاخته مهم روده ای جای فراوانی در تحقیقات پارازیتولوژی دارد. چه بسیار ممکن است یک روش معمول پاسخگوی قطعی تشخیص نباشد و آزمایشگاه ها ملزم باشند از تکنیک های مکمل یکدیگر و یا روش های تاییدی استفاده نمایند. در این پروژه ما ضمن مقایسه تکنیک های مختلف راه را برای تثبیت شناسایی تک یاخته ها به شیوه های غیر معمول نیز باز می کنیم و مسیر تشخیص این تک یاخته های مهم هموار و روش های مدرن به روش های معمول و روتین تبدیل می گردد.

روش بررسی

در این مطالعه تحلیلی مقایسه ای برای نمونه گیری از روش تصادفی ساده استفاده شد. طی ۷ ماه از اردیبهشت تا آبان ماه ۱۳۹۱ از ۱۰۲۵ بیمار مراجعه کننده به ۲ مرکز آزمایشگاهی تهران(آزمایشگاه تشخیص طبی فارابی و نور) و آزمایشگاه مرکزی فردیس کرج نمونه گیری مدفوع و خون انجام گرفت. آزمایش تغلیظی فرمالین دترجنت بر روی تمامی نمونه ها انجام شد. در لوله آزمایش معمولی حدود ۱۰ میلی‌لیتر محلول فرمل ـ دترجنت ریخته وحدود نیم گرم مدفوع به محلول اضافه و خوب بهم می زدیم. تنزیب دو لایه را در یک قیف قرار داده و مخلوط فوق را در یک لوله سانتریفیوژ صاف کردیم. با محلول فرمل ـ دترجنت تا بالای لوله سانتریفیوژ را پر کرده و به شدت تکان می دادیم. لوله فوق را به مدت ۲۴-۱۲ ساعت بدون حرکت در آزمایشگاه قرار داده. بعد از مدت فوق محتویات لوله را خالی نموده، از رسوب ته لوله یک نمونه مرطوب جهت آزمایش آماده می کردیم. با میکروسکوپ و عدسی ۴۰× به بررسی لام تهیه شده می پرداختیم. سپس نمونه های مثبت این روش مورد آزمایش های جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی در مدفوع به روش الایزا قرار گرفت(۶،۷). به این ترتیب که محلول شست شوی

آنتی ژن ها را به نسبت ۱ به ۹ با آب مقطر رقیق کرده، از هر نمونه حدود یک گرم برداشته با ۳ میلی لیتر از این محلول مخلوط کرده و سوسپانسیون حاصله مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه های فرمالینه در ظروف خود مخلوط شده و آزمایش شدند. نوار های میکروتیتر را در Strip holder قرار داده سه چاهک A1 برای سوبسترای بلانک، B1 برای کنترل منفی و C1 برای کنترل مثبت اختصاص داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کنترل منفی در چاهکB1 ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کنترل مثبت در چاهک C1 و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر نمونه به چاهک های دیگر اضافه شده سپس پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از این مدت محتوای چاهک ها را با الایزا واشر ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول مخصوص شست شوی آنتی ژن ها، شست شو داده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول شماره یک که حاوی آنتی بادی های پلی کلونال ضد ژیاردیا یا هیستولیتیکا گرفته شده از بز می باشد به تمام چاهک ها به استثنای A1 اضافه گردید. فویل را بر روی میکروپلیت پوشانده به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند. بعد از این مرحله عمل شست شو مانند مراحل قبل تکرار شد این مرحله برای محلول شماره ۲ که محتوی آنتی بادی های پلی کلونال کونژوگه شده با HRP (Horse Radish Proxidase) و بر ضد آنتی بادی های ژیاردیایی و یا هیستولیتیکایی بوده و از خرگوش گرفته شده تکرار گردید. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تترا متیل بنزیدین (TMB) که در اثر آنزیم پراکسیداز ایجاد رنگ می کند به تمام چاهک ها اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. بعد از این مدت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش ها که حاوی اسید سولفوریک می باشد به تمام چاهک ها اضافه شد. در این تکنیک یک پلی کلونال آنتی بادی ضد آنتی ژن های کیست و تروفوزوئیت ژیاردیا لامبلیا و یا آنتاموبا هیستولیتیکا در ته چاهک ها کوت شده هنگامی که سوسپانسیون مدفوع به چاهک ها اضافه شد. در صورتی که آنتی ژنی حتی در مقادیر جزئی در مدفوع موجود باشند با پلی کلونال آنتی بادی ته چاهک ها باند شده و مواد اضافی در مرحله شست شو خارج می شوند. در مرحله بعد معرف شماره یک که پلی کلونال آنتی بادی ضد انگل حاصل از بز می باشد اضافه گردید که با آنتی ژن های انگل باند شده، سپس مرحله شست شو تکرار گردیدند در مرحله سوم پلی کلونال آنتی بادی ضد بز کونژوگه شده با HRP افزوده شد سپس محلول رنگ زای ترا متیل بنزیدین افزوده شدکه تحت اثر آنزیم پراکسیداز در نمونه های مثبت رنگ آبی ایجاد می کند. در نهایت در اثر افزودن محلول متوقف کننده واکنش ها (محلول اسید سولفوریک رقیق شده) رنگ آبی نمونه های مثبت به رنگ زرد تبدیل شده و واکنش ها متوقف شد(۸،۹). کیت الایزای مورد استفاده در تحقیق برای کوپرو آنتی ژن و آنتی بادی ژیاردیا لامبلیا از شرکت DRG ساخت کشور آلمان و برای کوپرو آنتی ژن و آنتی بادی هیستولیتیکا کیت الایزای Generic assay کشور آلمان است. از کیت الایزای abcam کشور انگلستان برای اندازه گیری IgG آنتاموبا هیستولیتیکا استفاده شده است. همچنین جهت بررسی آنتی بادی ژیاردیا در خون و آمپیاز خارج روده ای(آنتی بادی آنتاموبا هیستولیتیکا در خون) از بیماران مدفوع مثبت، نمونه سرمی گرفته شد. برای حصول نتایج بهتر تعداد ۱۰۰ نمونه به صورت تصادفی که به روش پارازیتولوژی فرمالین دترجنت منفی بودند، مورد آزمایش های ۳ گانه سرولوژیک فوق (کوپروآنتی ژن، کوپروآنتی بادی و آنتی بادی خون) به روش الایزا قرار گرفتند(۱۰،۱۱).

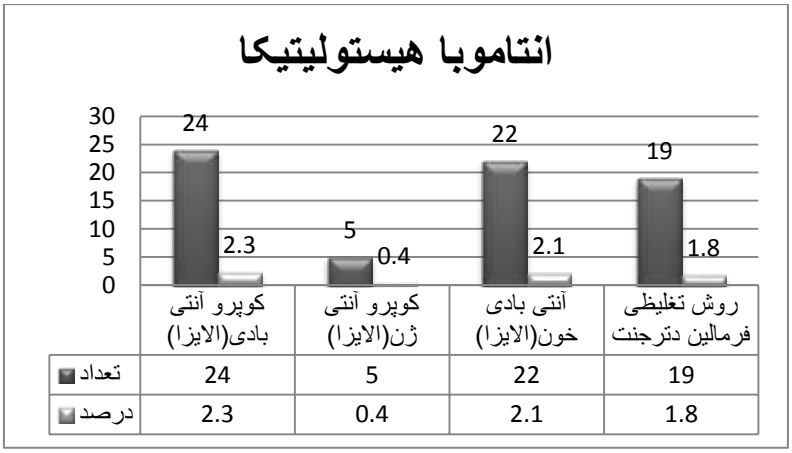
یافته ها

تعداد ۱۰۲۵ نمونه مدفوع به روش تصادفی ساده در ۳ مرکز آزمایشگاهی تهران و کرج(فارابی-نور-فردیس) جمع آوری و به روش میکروسکوپی فرمل-دترجنت مورد آزمایش قرار گرفت. مجموعا تعداد ۷۶ (۷/۴٪) نمونه از نظر ژیاردیا لامبلیا و ۱۹مورد (۱/۸٪) از نظر آنتاموبا هیستولیتیکا مثبت بودند(جدول۱). این تعداد نمونه های مثبت مورد آزمایش های جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی مدفوع و آنتی بادی خون قرار گرفت. برای حصول نتیجه بهتر و قضاوت منطقی تر نسبت به روش های سرولوژی تعداد ۱۰۰ نمونه که به روش پارازیتولوژی منفی بودند مورد آزمایشات ۳گانه سرولوژیک قرار گرفت. همان گونه که در جدول ذیل مشاهده می شود تعداد ۸۱(۷/۹٪) نمونه مثبت ژیاردیایی از نظر آنتی بادی

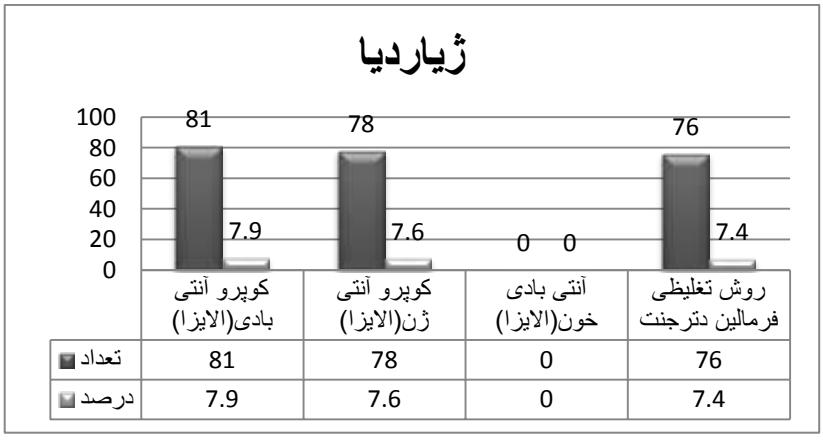
مثبت بود که ۷۴ نمونه آن از نظر انگلی نیز مثبت بود و ۷ نمونه از نمونه های منفی میکروسکوپیک نیز مثبت شد. از نظر کوپروآنتی ژن نیز ۷۳ مورد مثبت بودند و تعداد ۵ نمونه از نمونه های منفی آزمایش میکروسکوپی نیز مثبت شدند. در مورد آنتاموبا هیستولیتیکا از ۱۰۲۵ نمونه ۱۹ مورد به روش فرمالین-دترجنت مثبت بودند. تعداد ۲۴ (۲/۳٪) مورد از نظر کوپروآنتی بادی مثبت که ۱۸ مورد آن به نمونه های مثبت میکروسکوپی و ۶ مورد مربوط به نمونه های منفی بودند. بررسی آنتی ژن مدفوع در مورد هیستولیتیکا حاکی از تعداد فقط ۵ نمونه مثبت از میان موارد پارازیت مثبت می باشد(جدول۱). در حالی که بررسی آنتی بادی های سرمی هیستولیتیکا حاکی از ۲۲ (۲/۱٪)مورد مثبت است که ۱۸ مورد آن از افراد مدفوع مثبت و ۴ مورد مابقی از افراد مدفوع منفی بوده است(جدول۱).

جدول۱-توزیع فراوانی آلودگی به ژیاردیا و آمیب هیستولیتیکا برحسب نوع روش های تشخیصی

نام تک یاخته	تعداد نمونه	کوپروآنتی بادی الایزا	کوپر آنتی ژن الایزا	آنتی بادی خون الایزا	روش تغلیظ فرمالین-دترجنت
ژیاردیا	۱۰۲۵	۸۱ (٪۷/۹)	۷۸ (٪۷/۶)	-	**۷۶ (٪۷/٤)**
آنتاموباهیستولیتیکا	۱۰۲۵	۲۴ (٪۲/۳)	۵ (٪۰/۴)	۲۲ (٪۲/۱)	**۱۹ (٪۱/۸)**



نمودار۱- توزیع فراوانی آلودگی به آمیب هیستولیتیکا برحسب نوع روش های تشخیصی



نمودار۲- توزیع فراوانی آلودگی به ژیاردیا برحسب نوع روش های تشخیصی

بحث

ژیاردیازیس و آمیبیازیس از مهمترین بیماری های انگلی، روده ای و عفونی و از مشکلات بهداشتی بسیاری ازجوامع به ویژه کشور های در حال توسعه می باشد. مطالعات نشان می دهد، در ایران تا سال هایی نه چندان دور میزان شیوع ژیاردیا از ۱۹ تا ۲۲ درصد متغیر بوده است این درحالی است که شیوع انتاموبا هیستولیتیکا بسیار پایین تر می باشد(۴). هدف این مطالعه مقایسه تکنیک های معمول انگل شناسی با روش های سرولوژی جستجوی آنتی ژن در مدفوع و آنتی بادی در خون و همچنین مدفوع در تشخیص ژیاردیا و آنتاموبا هیستولیتیکا می باشد. نفوذ انگل به داخل بافت ها باعث تشکیل آنتی بادی ها در گردش خون می گردد ولی ظهور آنتی بادی های ترشحی موضعی نیازی به نفوذ بافتی انگل ندارند. وجود آنتی بادی های اختصاصی در مدفوع حاکی از وجود انگل در روده می باشد. این آنتی بادی ها احتمالا در نتیجه برخورد سیستم ایمنی مخاطی با انگل به وجود می آیند. ضمن اینکه وجود آنتی بادی های آنتاموبا هیستولیتیکا و ژیاردیا در داخل مدفوع(کوپروآنتی بادی) با استفاده از روش های سرولوژیک به کرات گزارش شده است و عمدتا از کلاس های IgA،IgG،IgM وIgE می باشند(۴). Selim و همکاران در سال ۲۰۰۹، برای تشخیص ژیاردیا، روش معمول فورمل- اتر را با روش کوپرو آنتی ژن الایزا در بیماران مقایسه نمودند. از ۹۰ نمونه مدفوع، ۴۶ مورد (۵۱/۱٪) با روش کوپروآنتی ژن الایزا و ۳۸ مورد (۴۲/۲٪) با روش فورمل-اتر مثبت شدند. نتایج نشان داد تکنیک الایزا کوپرو آنتی ژن، دارای حساسیت ۹۷/۳ درصد، ویژگی ۸۲/۶ درصد، ارزش اخباری مثبت ۸۰/۴ درصد و ارزش اخباری منفی ۹۷/۷ درصد است(۸). Vidal و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز روش کوپرو آنتی ژن الایزا را با روش های معمول در تشخیص ژیاردیا بر روی ۱۴۲ نمونه مدفوع مقایسه کردند که نتایجی مشابه Selim به دست آوردند(۱۲). Hamshary و همکاران در سال ۲۰۰۴، روش میکروسکوپی را با روش کوپروآنتی ژن الایزا در تشخیص آمیبیاز روده ای مقایسه نمودند. از ۹۳ نمونه مدفوع، ۵۱ مورد(۵۴/۸٪) با روش میکروسکوپی و ۴۹ مورد (۵۲/۷٪) با روش کوپرو آنتی ژن الایزا مثبت شد و حساسیت آن ۸۸/۲۴ درصد محاسبه گردید. در میان ۴۹ نمونه مثبت با الایزا، ۴ مورد با روش میکروسکوپی منفی بوده است، که ویژگی آن معادل ۹۰/۴۸ درصد می باشد. در نتیجه روش کوپرو آنتی ژن الایزا از حساسیت و ویژگی بیشتری نسبت به روش میکروسکوپی در تشخیص آنتاموبا هیستولیتیکا برخوردار است(۹) Aycan Kaya و همکاران در سال ۲۰۰۹ سه روش گسترش مستقیم میکروسکوپی، رنگ آمیزی تری کروم و الایزا کوپرو آنتی ژن را در ۶۰ بیمار مشکوک به آنتاموبا هیستولیتیکا مقایسه کردند. نتایج آزمایشات بر روی۶۰ نمونه نشان داد روش میکروسکوپی ۷ مورد (۱۱/۳٪)، رنگ آمیزی تری کروم ۶ مورد(۹/۷٪) و الایزا ۸ مورد(۱۲/۹٪) مثبت شد(۱۳). احمدی و همکاران در سال ۸۶ سه روش گسترش مستقیم، فرمالین اتر و فرمالین استون را بر روی ۶۰۰ نمونه مدفوع انجام داد.۶۰۰ لام نمونه مدفوع شامل ۱۵۰ لام تهیه شده از نمونه های بدون آلودگی(در هر روش۵۰ لام و ۴۵۰ لام تهیه شده از نمونه های با آلودگی به انگل های روده ای(هر روش ۱۵۰ لام) با ۳ روش گسترش مستقیم، فرمالین استون و فرمالین اتر بررسی شد. حساسیت این روش برای تشخیص انگل های روده ای در مجموع به ترتیب ۳۲، ۷۳/۳ و ۶۴/۷ درصد ارزش اخباری منفی آن ها به ترتیب ۳۲/۹، ۵۵/۶، ۴۸/۵ درصد و میزان خطای کاذب به ترتیب ۶۸، ۲۶/۷، ۳۵/۳ درصد محاسبه شد. با توجه به اینکه از لام های غیرآلوده، هیچ موردی با ۳ روش بالا برای انگل های روده ای مورد مطالعه مثبت گزارش نشد. بنابراین اختصاصیت هر ۳ روش مورد مطالعه ۱۰۰ درصد محاسبه شد(۱۴). شیرزاد فلاحی و همکاران در سال ۸۳ سه تکنیک گسترش مستقیم، تغلیظ فرمالین اتر و الایزا را از نظر آلودگی به ژیاردیا لامبلیا، در ۵۰۰ کودک ۶ تا ۱۲ ساله دختر و پسر مدارس ابتدایی شهرستان دلفان مقایسه کردند. در مجموع ۹۷ نفر از نظر آلودگی به ژیاردیا مثبت شناخته شدند (۱۹/۴٪) که از این تعداد ۶۸ نمونه (۷۰/۱ ٪) در تست گسترش مستقیم، ۸۸ نمونه (۹۰/۷۲ ٪) در تست تغلیظی فرمالین اتر و ۹۵ نمونه(۹۷/۹۳ ٪) با تکنیک الایزا مثبت شناخته شد. بر اساس نتایج حاصله تکنیک الایزا نسبت به روش های روتین انگل شناسی در تشخیص ژیاردیا بسیار دقیق

تر و سریع تر بوده است(۱۵). در این مطالعه ۱۰۲۵ نمونه مدفوع از نظر کوپروآنتی بادی و کوپروآنتی ژن و آنتی بادی در خون بیماران مشکوک به ژیاردیازیس و آمیبیازیس با روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۰۲۵ نمونه مدفوع ۷۶مورد(۷/۴٪)ژیاردیا و ۱۹مورد(۱/۸٪) آنتاموبا هیستولیتیکا با روش میکروسکوپیک فرمالین-دترجنت مثبت شدند. در روش سرولوژیک الایزا، کوپروآنتی بادی ژیاردیا۸۱ مورد(۷/۹٪)، کوپروانتی بادی آنتاموبا هیستولیتیکا۲۴ مورد(۲/۳٪)، کوپر و آنتی ژن ژیاردیا ۷۸ مورد(۷/۶٪) و کوپروانتی ژن هیستولیتیکا ۵ مورد (۰/۴٪) شناسایی شده است. آنتی بادی خون در آنتاموبا هیستولیتیکا در۲۲ مورد(۲/۱٪) اندازه گیری شده است. بر اساس مطالعات، روش فرمالین-دترجنت به عنوان روش معیار در نظر گرفته شد (۴). حساسیت و ویژگی روش کوپر و آنتی بادی الایزا به ترتیب ۹۷/۳ و ۹۳/۴ درصد و ارزش اخباری مثبت آن۹۱/۳ درصد و ارزش اخباری منفی۹۸ درصد محاسبه گردید و همچنین حساسیت روش کوپر و آنتی ژن الایزا ۹۶ درصد، ویژگی ۹۵/۲ درصد، درصد کارایی تشخیص این تست ۹۵/۵ درصد است به طوری که ارزش اخباری مثبت ۹۳/۵ درصد و ارزش اخباری منفی۹۷ درصد بود. روش میکروسکوپی نسبت به روش های سرولوژیک جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی در مدفوع به روش الایزا بالاتر از ۹۰ درصد می باشد که تقریبا هم خوانی قابل قبولی بین نتایج ، روش انگل شناسی (فرمالین-دترجنت) و نتایج سنجش آنتی بادی و آنتی ژن در مدفوع افراد ژیاردیایی دیده می شود. گو اینکه در مواردی نیز افرادی که از نظر جستجوی میکروسکوپی منفی هستند، نیز در روش های سنجش پادگن و پادتن های مدفوع مثبت هستند. ضمن اینکه بین دو روش سنجش آنتی ژن و آنتی بادی تفاوت معنی داری وجود ندارد. این همخوانی در مورد بررسی آنتی بادی های خون و مدفوع در مورد آنتاموبا هیستولیتیکا وجود دارد، اما اندازه گیری آنتی ژن مدفوع چندان قابل اعتماد نبوده و میزان آن بسیار کم تر از اندازه گیری پادتن ها در خون و مدفوع بوده است. بنابراین اختلاف معنی داری است و جستجوی آنتی ژن در مدفوع به روش الایزا توصیه نمی شود.

نتایج متفاوت روش الایزای کوپروآنتی ژن آنتاموباهیستولیتیکا با دیگر مطالعات ممکن است در نوع تولید کارخانه ها متفاوت باشد و اساسا روش الایزا یک روش Operator-dependedنیز می باشد. البته در شرایط فعلی اقتصادی تهیه کیت از منابع مختلف امکان پذیر نبوده و در این مطالعه از کیت الایزاGeneric assay استفاده شده است. روش فرمالین-دترجنت به عنوان روش برتر میکروسکوپیک در آزمایش های مدفوع انتخاب شده است. این روش با روش های جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی در مدفوع و خون بیماران مبتلا به انگل های ژیاردیا و آمیب هیستولیتیکا مورد مقایسه قرار گرفته و به علت هم خوانی اعلام می دارد، ضرورتی جهت انجام آزمایش آنتی ژن و آنتی بادی در مورد دو انگل مزبور نمی باشد و همچنان روش فرمالین دترجنت می تواند به عنوان روش مرجع در آزمایشگاه های تشخیص طبی به کار رود. بنابراین از نظر توجیه اقتصادی و علمی، روش جستجوی میکروسکوپیک مدفوع برای شناسایی تک یاختگان روده ای کفایت و کاربری لازم دارد. یاد آور می گردد روش جستجوی آنتی بادی در خون فقط برای جستجوی آمیبیاز خارج روده ای کاربری دارد.

نتیجه گیری

از آن جایی که تفاوت چندانی بین روش های سرولوژیک خون و مدفوع و روش برتر جستجوی انگل در مدفوع مشاهده نمی شود، با توجه به جنبه های اقتصادی و در دسترس بودن تکنیک های ساده تر پیشنهاد می شود، روش استاندارد جستجوی میکروسکوپیک انگل در مدفوع که همان روش فرمالین-دترجنت است به عنوان روش مرجع مورد استفاده آزمایشگاه های تشخیص طبی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین و همکاران محترم آزمایشگاه های نور تهران، فارابی تهران و مرکزی فردیس کرج به جهت مساعدت برای نمونه گیری و انجام آزمایش ها و از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به جهت تصویب و تامین اعتبار این پروژه با کد ۱۲۷۷۱ کمال تشکر و قدردانی را دارد.

References

1. Coordinating Office of the National Survey on the Important Human Parasitic Diseases. *A national survey on current status of the important parasitic diseases in human population.* Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2005; 23(5 Suppl): 332-40.

2. Gordis L. *Assessing the validity and reliability of diagnostic and screening test (ch.4), in epidemiology.* WB Saunders Company. 2nd ed. New York. 2002; 308.

3. World Health Organization. *Geneva: Geographical distribution and useful facts and stats*. 2006.

4. Gharavi MJ. *Textbook of Clinical Protozoology*. 4th ed. Iran: Mirmah. 2012; 304-330. [Persian]

5. Ashtiani M, Mahjob F, Kashi L. *Giardiasis and other parasitic infections in stool specimens, duodenal biopsy and duo-denal aspiration in children*. J Pediatric Infectious Disease. 2005; 14(1): 41-46.[Persian]

6. Gharavi MJ. *Clinical Parasitology Laboratory*. 2th ed. Iran: Temorzadeh novin. 2012; 9-65.[Persian]

7. Garcia LS. *Diagnostic Medical Parasitology*. 5Th ed. Washington DC, ASM press. 2007; 707-708.

8. Selim S, Nassef N, Sharaf S, Badra G, Abdel-Atty D. *Copro-antigen detection versus direct methods for the diagnosis of Giardia lamblia in patients from the National Liver Institute*. J Egypt Soc Parasitol. 2009; 39(2): 575-83.

9. el-Hamshary EM, el-Shewy KA, Hegazy MM, Zakaria H. *Diagnostic potentials of copro-antigen detection based* Egypt Soc Parasitol. 2004; 34(2): 601-10.

10. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(3): 511-32.

11. Garcia LS, Shimizu RY. *Detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum Antigens in Human Fecal Specimens Using the ColorPAC Combination Rapid Solid-Phase Qualitative Immunochromatographic Assay*. J Clin Microbiol. 2000; 38(3): 1267–1268.

12. Vidal A, Catapani W. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis*. Sao Paulo Med J. 2005; 123(6): 282-5.

13. Kaya O, Oguzturk H, Turtay M, Daldal U. *Detection of Entamoeba histolytica with different methods admitted to the emergency department in diarrheic patients*. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5(6): 731-733.

14. Ahmadi N, Ghachkar L, Pakdad K, Ahmadi O. *Wetmount ، Formalin-ether , Formalin-aceton method for diagnosis of parasitic infection*. Trop Med. 2008; 12(38): 43-48.[Persian]

15. Fllahi S, Gharavi M, Qara-gozlou B, Sepahvand A, Mahouti F. *A Comparative Evaluation of Giardiasis Prevalence by Rutine Parasitical Assays and Antigen Detection in Elementary school children in Delfan Town, Iran*. Yafteh. 2008; 9(4): 45-49.

Comparison of Routine Method with Antibody and Antigen Ones for Diagnosing Giardia-Entamoeba Histolytica in Stool and Blood

Gharavi, MJ. (PhD)
Professor of Medical Parasitology, Paramedical Faculty, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Roozbehani, M. (MSc)
PhD student in Medical Parasitology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Bakhshkar, H. (BSc)
BSc of Medical Laboratory Sciences, Paramedical Faculty, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author:
Roozbehani, M.

Email:
mona.roozbehani@yahoo.com

Received: 4 May 2014
Revised: 19 Jun 2014
Accepted: 21 Jun 2014

Abstract

Background and Objectives: Giardia lamblia and Entamoeba histolytica are the most prevalent human intestinal pathogenic protozoa, worldwide. The clinical features of Giardia infection are acute diarrhea, a chronic condition with continuous diarrhea and malabsorption. Entamoeba histolytica invade intestinal tract without any typical clinical indications, and it can involve liver and other organs too. Therefore, we aimed to study these protozoa by serological and parasitological methods.

Material and Methods: In this comparative study, the stool and blood specimens were collected from 1025 patients selected via simple random sampling in three different laboratories located in Tehran and Karaj, Iran (2012). Formalin Detergent test was performed on all samples. Both serum and stool positive samples of this method were analyzed for antigen and antibodies related to Giardia lamblia and Entamoeba histolytica, respectively.

Results: of 1025 stool specimens, 76 (4.7%) were positive for Giardia lamblia and 19 (1.8%) for Entamoeba histolytica using Formalin-detergent method. In ELISA, 81 (7.9%) coproantibodies to Giardia lamblia and 24 (2.3%) coproantibodies to Entamoeba histolytica, 78 (7.6%) corproantigen for Giardia lamblia, and 5 (0.4%) for Entamoeba histolytica were observed. circulatory antibodies to Entamoeba histlytica were detected in 22 cases (2.1%).

Conclusion: Sensitivity of microscopic method compared to serological methods is higher than 90%; therefore, Formalin-detergent method can be the best method for stool examination.

Key words: Giardia Lamblia and Entamoeba Histolytica, Coproantibody, Coproantigen, Blood Antibody

This paper should be cited as: Gharavi MJ, Roozbehani M, Bakhshkar H. [Comparison of Routine Method with Antibody and Antigen Ones for Diagnosing Giardia-Entamoeba Histolytica in Stool and Blood]. mljgoums. 2015; 8(5): 97-103[Article in Persian]