نمط جديد للتحري المصلي عن الاكياس المائية (العدرية) بأستخدام طريقة التراص الجسيمي

سعد خالد العكيدي
مركز ابن البيطار

لمياء يعقوب العاني
المعهد الفني - المنصور
قسم التحليلات المرضية

الخلاصة

استخدام طريقة مصلية جديدة للكشف عن الاصابة بطفيلي المشوكة الحبيبية **Echinococcus granulosus** باختيار تراص جسيمات الجلاتين **gelatin partical agglutination test** الذي يعتمد مبدأ فحص التراص غير المباشر **indirect agglutination** للتحري عن اضداد الطفيلي في مصول الاشخاص المصابين، وهي طريقة اقتصادية ذات نتائج دقيقة حيث اظهرت النتائج مطابقتها للعدة المستخدمة حالياً في الكشف عن المرض.

المقدمة

يعتبر مرض الاكياس المائية او العدرية (داء المشوكات) **Echinococcus** من الامراض المشتركة الشائعة الانتشار، ويعتبر من الامراض شديدة التوطن في العراق. (**AL-Jeboori, 1976; Babero, et al. 1963; Naizi, 1974; Nassir, 1979; AL-Abbassy et al, 1980; AL-Najar, 1981**). وينتج الخمج عن الاصابة بطفيلي المشوكة الحبيبية **Echinococcus granulosus** في طوره اليرقي، وتشخيص المرض يشكل معضلة رئيسية بسبب الاعراض السريرية غير الخصوصية التي يتصف بها، والتي تترافق مع تأثيرات ضغط الكيس العدري على اعضاء الجسم المجاورة، وهناك عدة طرق مستخدمة لتشخيص الاصابة، ومنها الصورة السريرية للمرض، الطرق الشعاعية، طرق استخدام اجهزة فائق الصوت، استخدام التفرس الومضاني، فحص كاسوني الجلدي واستخدام انماط مختلفة من طرق الفحص المناعية المصلية (**AL-Najar, 1981; Ameen, 1992**) لذا كان الهدف من هذه الدراسة هو ايجاد وسيلة تشخيصية مصلية تساعد في الكشف عن المرض بشكل اقتصادي ودقيق.

المواد وطرق العمل

لغرض تحضير مستضد سائل الكيس العدري (المائي) تم جمع اكياس مائية

عدرية من اشخاص مصابين وخلال اجراء العملية الجراحية لهم بدون حقنها بالفورمالين، نقلت الاكياس مباشرة الى المختبر في صندوق من الفلين العازل والحاوي على ثلج، ازيلت الانسجة المحيطة بالكيس وعقم السطح الخارجي لها بالكحول وسحب السائل بواسطة محقنة طبية وجمع السائل ورسبت الرؤيسات الاولية منه) (Protosciolices بعملية النبذ وبسرعة ٥٠٠ دورة بالدقيقة لمدة ١٠ دقائق، سحب الراشح وحفظ بدرجة (-٢٠م) لحين الاستعمال. ولتحضير مستضد الرؤيسات علق الراسب الحاوي عليها في محلول الملح الفسلجي المعقم وغسل ٣ مرات ثم علق راسب الرؤيسات بنفس المحلول وجفد (Lyohilyzation) وطحن بعد ذلك وحضر عالق منه ترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٣ ساعات ثم بدرجة حرارة الثلاجة ٤م لمدة ٤٨ ساعة ونبذ بسرعة ٥٠٠٠ دورة بالدقيقة لمدة ١٥ دقيقة بعدها جمع الراسب وعلق وحفظ بدرجة (-٢٠م) لحين الاستعمال (Kagan, et al. 1960). ثم قياس كمية البروتين في مستخلص مستضد السائل العدري ومستضد الرؤيسات بطريقة لاوري (Loury et at, 1951) ولاقران المستضدات بجيسيمات الجلاتين، تم تنشيط ودبغ ٥٪ من جسيمات الجلاتين (شركة Oxoid) بواسطة ٥ جزء بالمليون من حمض الدبغ (Tannic acid) في دارىء الفوسفات ١٥ر٠ مولر ذو اس هيدروجيني PH (7.2) ثم حضر عالق جسيمات الجلاتين المتحسسة (Sensitized Particals) بمستضد السائل العدري او مستضد الرؤيسات تركيز ٣٠٠ مايكروغرام بروتين/س٣ بمزج (حجم.حجم) من عالق جسيمات الجلاتين المنشطة مع عالق كل مستضد وبتراكيز مختلفة (٢,٥٪ , ١،٦٦٪ , ١,٢٥٪ , ٣،٣٪ , ٤٪) وايضا' تم تحضير عالق لجسيمات الجلاتين غير المتحسسة (Unsensitized partical) بنفس الخطوات السابقة باستثناء اضافة مستخلص المستضدات واستعمال دارئ فوسفات الملح الفسيولوجي بدلا عنها لتحضير نفس التراكيز من الجسيمات لاستخدامها كمسيطرة في الاختبار. حضرت مجموعة اخرى من جسيمات الجلاتين المحسسة وغير المحسسة بتلوينها بصبغة التريبان الزرقاء (٠,٥٪) باضافة ٠,٠٥ مايكروليتر/مايكروليتر لكل تركيز من جسيمات الجلاتين المستعملة.

اما المصول المستخدمة في العمل فجمعت من دم اشخاص مصابين بداء الاكياس المائية وتم التثبت من اصابتهم جراحيا ومختبريا وكذلك جمعت امصال سيطرة وحفظت بدرجة (-٢٠م) لحين الاستعمال، كذلك تم استعمال مصول سيطرة قياسية وسالبة (جهزت من قبل مختبر

جدول رقم (1) : صيغة طريقة عمل االفحص

خطوات العمل	رقم الحفرة Microtiter Plate					الملاحظات
١- المواد المضافة	5	4	3	2	1	مايكروليتر
دارىء الفوسفات	25	25	25	25	75	يهمل 25مايكروليتر من حفرة 5
نموذج المصل *	25	25	25	25	25	
تخفيف المصل	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	
عالق جسيمات جيلاتين المتحسسة**	25	25	25			مايكروليتر
عالق جسيمات جيلاتين غير المتحسسة				25		مايكروليتر
التخفيف النهائي للمصل	1/128	1/64	1/32	1/16		
٢- المزج	بواسطة Microtiter plate mixer لمدة 5 دقائق (خلاطة الصفيحة العيارية الدقيقة)					
٣- درجة حرارة الحضن	- بدرجة حرارة الغرفة. -بدرجة 37م لمدة ساعة ثم بدرجة حرارة الغرفة.					
٤- مدة الحضن	٤ ساعة - ٨ ساعة - ٢٤ ساعة					
٥- النتائج	موجبة (ظهور التراص) سالبة (عدم ظهوره)					

* المصول المستعملة هي- مصول قياسية موجبة وسالبة.

- مصول اشخاص مصابين موجبة .

- مصول اشخاص سيطرة.

** عالق جسيمات الجيلاتين- المحسسة بمستضد سائل الكيس العدري المصبوغة.

- المحسسة بمستضد سائل الكيس العدري غير المصبوغة.

- المحسسة بمستضد الرؤيسات المصبوغة.

- المحسسة بمستضد الرؤيسات غير المصبوغة.

الصحة العامة المركزي). ولاجراء الفحص اتبعت طريقة المعايرة الدقيقة **Microti-tration Method** حيث تمت اضافة المستضد المحمل على جسيمات الجلاتين الى المصل المخفف مضاعفة بدارئ الفوسفات للتفاعل معه بالحجوم المثبتة في جدول رقم (١)، تم اجراء التجارب الاولية بشكل مزدوج حضن النموذج الاول بدرجة حرارة الغرفة وسجلت النتائج بعد (٢ ,٨ , ٢٤ ساعة) اما النموذج الثاني فوضع بدرجة ٣٧م لمدة ساعة ثم بدرجة حرارة الغرفة وسجلت النتائج بعد (٢ , ٨ , ٢٤ ساعة) من اجراء التفاعل لتقدير تأثير درجات الحرارة على التفاعل وعلى الطريقة المستخدمة.

كررت التجارب عدة مرات باستخدام المصول الموجبة، مصول السيطرة، امصال السيطرة القياسية الموجبة والسالبة باستخدام عالق جسيمات الجلاتين المحسسة بمستضد سائل الكيس العدري او مستضد الرؤيسات وجسيمات الجلاتين غير المحسسة بالمستضدات (المصبوغة او غير المصبوغة).

واستعلمت نماذج سيطرة في التجارب وذلك بمعاملة جسيمات الجلاتين المحسسة وغير المحسسة مع دارئ الفوسفات فقط. وسجلت نتائج التفاعل الموجبة عند ظهور تراص الجسيمات عن السالبة بعدم ظهوره.

النتائج والمناقشة

بينت نتائج التجارب الاولية في استخدام نمط تراص جسيمات الجلاتين للكشف عن الاصابة بالاكياس المائية ان الحضن بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ساعة قد سرع من عملية التفاعل واعطى نتائج واضحة عند القراءة بمقارنة الحضن بدرجة حرارة الغرفة، لذا اعتمد هذا السياق في العمل.

ويوضح الشكلين ٢،١ نتائج فحص تراص الجلاتين باستخدام تراكيز مختلفة من الجسيمات المحسسة وغير المحسسة بمستضد سائل الكيس العدري او مستضد مستخلص الرؤيسات بصبغة التريبان الزرقاء، (حيث كانت قراءة النتائج افضل عن تفاعل المستضد مع المصول المختلفة مضاعفة).

قد اضهرت النتائج تطابق الصورة السريرية مع الكشف المختبري للمرضى باستخدام الطريقة الجديدة وكان تركيز جسيمات الجلاتين المستخدمة في تفاعل التراص ٣,٣٪ هو الافضل في الحصول على نتائج ملموسة لتفاعل النوعين من مستضد الطفيلي. وكذلك فأن اوضح تراص

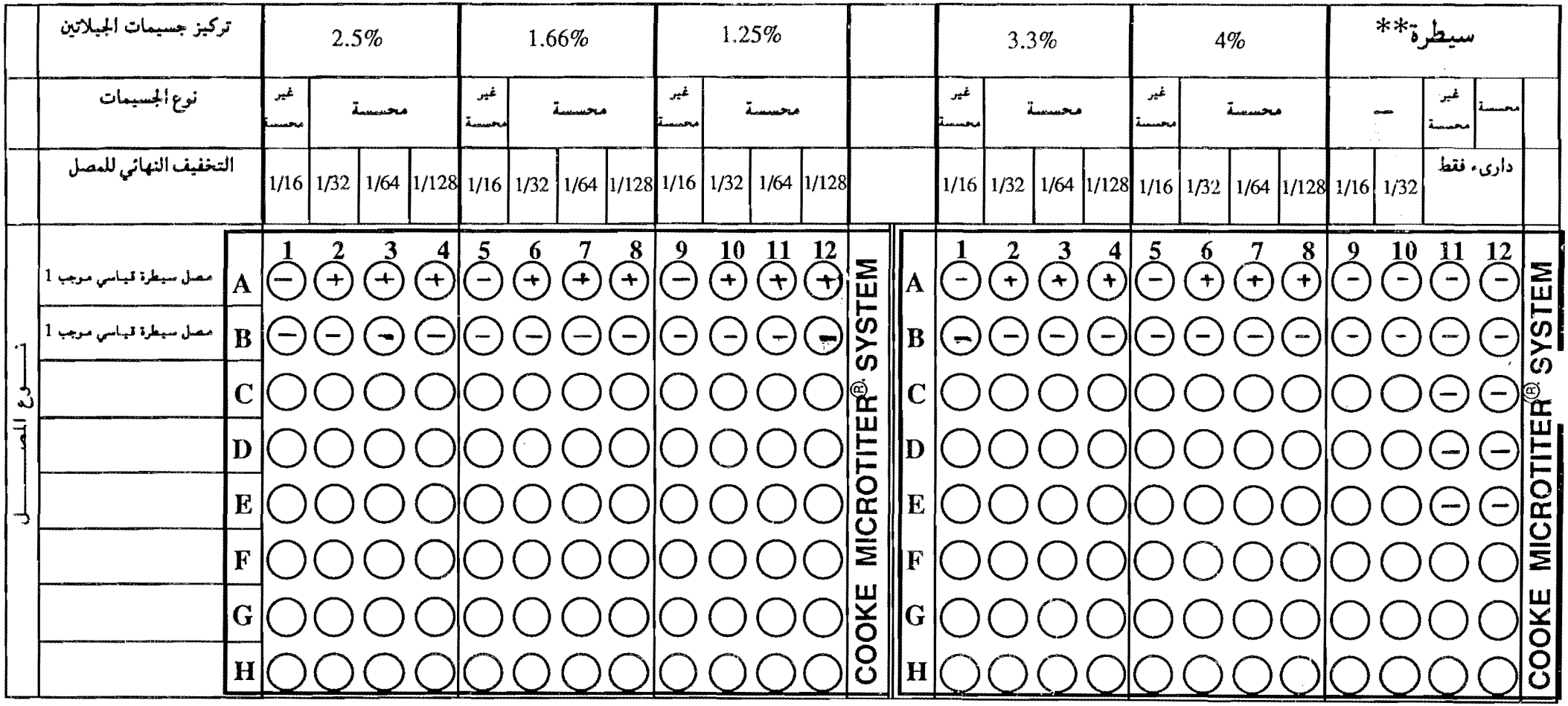
شكل رقم (1) : نتائج فحص تراص جسيمات الجيلاتين باستخدام مستضد السائل العدري*.

	تركيز جسيمات الجيلاتين	2.5%				1.66%				1.25%					3.3%				4%				سيطرة**				
	نوع الجسيمات	غير محسسة	محسسة			غير محسسة	محسسة			غير محسسة	محسسة				غير محسسة	محسسة			غير محسسة	محسسة			محسسة	غير محسسة	ـــــ		
	التخفيف النهائي للمصل	1/16	1/32	1/64	1/128	1/16	1/32	1/64	1/128	1/16	1/32	1/64	1/128		1/16	1/32	1/64	1/128	1/16	1/32	1/64	1/128	داري، فقط بدون مصل				
نوع المصل	مصل سيطرة قياسي موجب 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	COOKE MICROTITER® SYSTEM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	COOKE MICROTITER® SYSTEM
	مصل سيطرة قياسي موجب 2	A																									
	مصل سيطرة قياسي سالب 1	B																									
	مصل سيطرة قياسي سالب 2	C																									
	مصل شخص موجب 1	D																									
	مصل شخص موجب 2	E																									
	مصل شخص سيطرة 1	F																									
	مصل شخص سيطرة 2	G																									
		H																									

* عدد التجارب 7 بمكررين.

** استخدمت جميع تراكيز جسيمات الجيلاتين وعلى التوالي في الحفر من سطر A الى E.

شكل رقم (2) : نتائج فحص تراص جسيمات الجيلاتين باستخدام مستضد الرؤيسات*.



* عدد التجارب 3 بمكررين.

** استخدمت جميع تراكيز جسيمات الجيلاتين وعلى التوالي في الحفر من سطر A الى E.

امكن الحصول عليه كان عند تخفيف المصل النهائي هو ١/٣٢ و ١/٦٤ .

ان فحص التراص الجسيمي، يعتبر من الفحوصات التي يمكن اعتمادها في تقدير معيار الاجسام المضادة الجائلة في المصل ضد المشوكة الحبيبية التي تنتج عند الاصابة بها **(Matossian et al. 1976; Perez-Esand, 1970)** حيث يمكن اعتمادها كأحد الطرق المصلية المستخدمة للكشف عن المرض كما الحال في فحص تثبيت المتمم، الاختبار الجلدي، فحص تراص الدم غير المباشر، فحص تراص اللاتكس، فحص ندف البنتونايت، فحص الترحيل الكهربائي، فحص التألق المناعي، فحص ترسب الرؤيسات، فحص **ELIZA (Ameen, 1992)** حيث برهنت هذه الدراسة على نجاح هذه الطريقة التي تعتمد على مبدأ فحص التراص غير المباشر في الكشف عن الاكياس العدرية بطريقة سهلة واقتصادية ولاتحتاج الى اجهزة لقراءة النتائج.

ان هذه الدراسة تحتاج الى عينة اوسع وعلى المتبرعين سويين ومصابين لغرض التأكد من حساسية ونوعية هذه الطرقة.

شكر وتقدير

يسرنا في نهاية البحث ان نقدم خالص شكرنا وتقديرنا الى الآنسة عالية عصام / كلية العلوم الجامعة المستنصرية، لما أبدته من مساعدة في إنجاز البحث.

References

1- AL-Abbasst,, S. N., Altaif, K. I., Jawad, A. K. and AL-Saqur, I. M (1980). The prevalence of hydatid cysts in slaughtered animals in Iraq. Ann. Trop. Med. parasitol. 74:185-187.

2- AL-Jeboori, T I (1976). Hydatid disease: A study of records of Medical city hospital. J. Fac. Med. Baghdad. 18; 15- 75.

3- AL- Najar, S. (1981). Evaluation of hydatid fluid antigens in the serodiagnosis of hydatidosis with special refernce to casoni skin test. M. Sc. coli. Med. Univ. Baghdad.

4- Ameen, K., M. (1992). Biological and serological studies in hydatid cysts caused by larval stage of Echinococcus granulosus. M. Sc. theses sumbitted to coli of scin. AL-mustansiriya Univ.

5- Babero, B. B., AL-Dabagh, M. A., AL- Saffar, A. S. and Frozan,, M. A. (1963). The Zoonosis of animal parasites in Iraq,

9- Nassir, J. K. (1979). Immunological and serological studies in patients with hydatidosis. M. Sc. Theses Baghdad. Univercity.

10- Niazi, A. D. (1974). Hydatidosis in Iraq- Bull. Endem. Dias. 15; 37- 50.

11- Perez-Esandi, M. V. (1970). Isolation and characterization of antibodies from sera of humans infected with Echinococcus grauulous. J. parasitol., 56; 336-339

12- مجلس وزراء الصحة العرب، اتحاد الاطباء العرب، منظمة الصحة العالمية، المنظمة العربية للتربية والثقافة والعلوم (١٩٨٣). المعجم الطبي الموحد قاموس، انكليزي- عربي- فرنسي- الطبعة الثالثة / سويسرا.

VIII. Hhdatid disease. Ann. Trop Med. 57; 499-510.

6- Kagan, I. G., Norman, L. and Allain, D. S. (1960). Studies on Echinococcsis: Serology of Crude and Fractinonated antigens prepared from Echinococcus granulosus and Echinoccus multilocularis. AM. J. Top. Med. Hyg 9; 248 - 281.

7- Lowry, OH., Resebrough, N. J., Farr, A. I. and Randall. R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chemistry. 193; 265-275.

8- Matossian, R. M.; Alami, S. Y.; Salti, I. and Araj, G.F. (1976), Serum immunoglobulin levels in human hydatidosis Int. J. Parasitol. 6; 367-321.

Partical Agglution Test for Screening of Antibodies to Echinococcus Granulosus

A new serological test were developed using gelatin partical agglutination test based on the principle of indirect agglutination for detection of human antibodies toward hydatidosis.

The result showed that specific. Sensitive & reproducible. Thus the test should be useful for screening of Echinococcus granulosus antibodies.