به کارگیری و ارزیابی الایزای نقطه‌ای در تشخیص فاسیولیازیس تجربی در گوسفند

رامتین حدیقی[1] دکتر عبدالحسین دلیمی‌اصل[1] دکتر رسول مدنی[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۱، ۶۳-۶۱، (۱۳۸۰)

در این تحقیق از پادگن نیمه تخلیص‌شده *فاسیولا ژیگانتیکا* برای آزمایش الایزای نقطه‌ای جهت تشخیص فاسیولیازیس تجربی در گوسفند استفاده شد. ۴۷ سرم گوسفند آلوده‌شده به‌طور تجربی (موارد بیمار) و ۴۶ گوسفند سالم (گروه شاهد) با آزمایش الایزای نقطه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که در رقت ۱:۸۰۰ سرم گوسفندان تحت مطالعه، حساسیت آزمایش برابر با ۱۰۰ درصد و ویژگی آن برابر با ۹۱/۳۰ درصد بوده است. لذا آزمون الایزای نقطه‌ای به‌عنوان یک آزمون دقیق، ساده، ارزان و سریع برای تشخیص فاسیولیازیس گوسفندی توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی : *فاسیولا ژیگانتیکا*، فاسیولیازیس تجربی، الایزای نقطه‌ای.

فاسیولا یکی از ترماتودهای کبدی مشترک بین انسان و چهارپایان علفخوار است و بیماری ناشی از آن فاسیولیازیس یا دیستوماتوزیس نام دارد. هر دو گونه *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* در ایران وجود دارند که درصد بالایی از دامهای کشور بخصوص در مناطق جنوبی به *فاسیولا ژیگانتیکا* آلوده می‌باشند. تشخیص این بیماری براساس جداسازی تخم انگل از مدفوع اغلب مناسب نمی‌باشد زیرا زودتر از هفته‌های ۸-۶ پس از آلودگی تخم را نمی‌توان در مدفوع مشاهده کرد. همچنین بعد از ظاهرشدن تخم در مدفوع گاهی اوقات به‌علت کم‌بودن تعداد تخمها نمی‌توان آلودگی را تشخیص داد. روشهای سرولوژیک معایب فوق را نداشته ولی واکنشهای متقاطع فراوانی برای تشخیص فاسیولیازیس در این روشها دیده می‌شود. تاکنون از روشهای مختلفی برای تشخیص سرولوژیک فاسیولیازیس استفاده شده است (۶). روش ELISA یکی از بهترین روشهای تشخیص فاسیولیازیس می‌باشد. این روش دقیق بوده و سریع انجام می‌گیرد. ولی به‌دلیل استفاده از دستگاه قرائت‌گر نتایج (ELISA reader) و میکروپلیت هزینه هر آزمایش گران می‌گردد. روش الایزای نقطه‌ای (Dot-ELISA) ضمن داشتن محاسن روش الایزا نیاز به دستگاه نداشته و بسیار مقرون به صرفه است. اولین بار Zimrnerman و همکارانش در سال ۱۹۸۵ این روش را برای تشخیص فاسیولیازیس گوسفندی مورد استفاده قرار دادند (۹). Shaheen و همکاران این روش را در سال ۱۹۸۹ برای تشخیص فاسیولیازیس انسانی به‌کار گرفتند (۷). De Morilla و همکاران در همان سال سه روش الایزای نقطه‌ای، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و TIA را برای تشخیص آلودگی طبیعی یا تجربی گوسفند به *فاسیولا هپاتیکا* مورد مقایسه قرار دادند (۱). Youssef و همکاران در سال ۱۹۹۱ با استفاده از آنتی‌ژن نیمه تخلیص شده *فاسیولا ژیگانتیکا* فاسیولیازیس انسانی را با روش الایزا تشخیص دادند (۸). در سال ۱۹۹۵ کاربرد الایزای نقطه‌ای برای جداسازی آنتی‌بادیهای ضدآنتی‌ژنهای *فاسیولا هپاتیکا* در سرم لاما توسط Rickard مورد بررسی قرار گرفت (۵). با مقایسه روشهای سرولوژیک رایج جهت تشخیص فاسیولیازیس دامی و انسانی در می‌یابیم که روش الایزای نقطه‌ای به‌دلیل سرعت، دقت و ارزان‌بودن، روش مناسبی برای این منظور می‌باشد. هدف از این تحقیق به‌کارگیری و ارزیابی الایزای نقطه‌ای با استفاده از آنتی‌ژن نیمه‌تخلیص‌شده *فاسیولا ژیگانتیکا* برای تشخیص فاسیولیازیس تجربی در گوسفند بوده است.

مواد و روش کار

تهیه پادگن : *فاسیولا ژیگانتیکای* بالغ از مجاری صفراوی کبدهای آلوده گوسفندان ذبح‌شده در کشتارگاه جدا شد، ابتدا سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو گردید. سپس محلول هموژنه از آنها تهیه شد و در ۴ درجه سانتیگراد به‌مدت یک ساعت با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. میزان پروتئین مایع رویی (پس از لیپیدزدایی) با روش لوری (۳) اندازه‌گیری شد. ۳۰ میلی‌گرم از پادگن محلول فاسیولا روی یک ستون سفادکس G-200 (به ابعاد ۲۰×۱/۵ سانتیمتر) لودگردیدوسپس بافر ۰/۱ مولار PBS (pH=۷/۴) به ستون اضافه شد. ۴ میلی‌لیتر ازبخش‌به‌دست‌آمده جمع‌آوری و میزان جذب آن در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

براساس مطالعات قبلی (۴) بخشهای اوج II و III جمع‌آوری و در ۴ درجه سانتیگراد با TBS دیالیز شد. سپس میزان پروتئین محلول پادگنی مجدداً اندازه‌گیری شد. این پادگن نیمه‌تخلیص‌شده *فاسیولا ژیگانتیکا* تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه نگهداری گردید.

سرم : در ارزیابی الایزای نقطه‌ای برای تشخیص فاسیولیازیس تجربی در گوسفند ۹۳ نمونه سرم از دو گروه از گوسفندان مورد استفاده قرار گرفت : گروه اول شامل ۴۷ رأس گوسفند سه ماهه آلوده بودند که با ۲۰۰-۱۵۰ متاسرکر *فاسیولا ژیگانتیکای* قرار گرفته در کپسول ژلاتینی به‌صورت خوراکی آلوده شده بودند (گروه تحت مطالعه). آلودگی در این گوسفندان با کالبدگشایی آنها و مشاهده و جداکردن کرم بالغ از کبدشان در پایان مطالعه تأییدگردید. گروه دوم شامل ۴۶ رأس گوسفند سه ماهه سالم بودند که داروهای ضدکرمی وسیع‌الطیف دریافت داشتند (گروه شاهد). در کبد هیچ‌یک از این گوسفندان پس از کالبدگشایی فاسیولای بالغ مشاهده نگردید. نمونه‌های خون در هفته چهارم پس از آلودگی از ورید گردنی حیوانات (بدون ماده ضدانعقاد) گرفته شد و پس از سانتریفوژ، سرم آنها جدا گردید. همه‌نمونه سرمها پس از جمع‌آوری تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. مدت نگهداری نمونه‌ها حداکثر ۴۵ روز بود.

روش انجام آزمایش : پس از انتخاب غلظت مناسب پادگن از طریق آزمایشهای مکرر با سرمهای شاهد مثبت و منفی، ابتدا کاغذ نیتروسلولز را در ابعاد ۱×۱ سانتیمتر برش داده، به میزان یک میکرولیتر از پادگن نیمه‌تخلیص‌شده فاسیولا در وسط کاغذ قرار داده شد. این کاغذها در دمای اتاق (۳۰-۲۰ درجه سانتیگراد) خشک شدند و سپس برای جلوگیری از واکنشهای غیراختصاصی در بافر تریس (حاوی Tween 20 به میزان ۰/۵ درصد) به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس کاغذها را در رقتهای مختلف سرم (۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ...، ۱:۲۵۶۰۰) به‌مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از انکوباسیون در سرم، سه مرحله شستشو، هر مرحله به‌مدت ۵ دقیقه با بافر تریس صورت گرفت. تمام مراحل انکوباسیون و شستشو برروی دستگاه روتاتور صورت پذیرفت. مرحله بعدی ۴۵ دقیقه انکوباسیون با کونژوگه بود که از آنتی ایمونوگلوبولین گوسفندی کونژوگه‌شده با پراکسیداز استفاده گردید. سپس عملیات شستشو مانند دفعه قبل تکرار گردید. پس از شستشو کاغذها، در شرایط تاریک با سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین (DAB) به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. در همه آزمایشهای انجام‌شده، از سرمهای شاهد مثبت و منفی استاندارد به‌عنوان کنترل استفاده گردید. پس از پایان این مراحل، در صورت وجود پادتن علیه پادگنهای *فاسیولا* در سرم، برروی کاغذ نیتروسلولز لکه زرد مایل به قهوه‌ای ظاهر می‌گردد که برای پایدارماندن لکه می‌توان کاغذها را آبکشی کرد.

۱) گروه آموزشی انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.
۲) بخش بیوتکنولوژی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، کرج - ایران.

جدول ۱ - فراوانی مطلق و نسبی آخرین رقت مثبت سرمی گوسفندان آلوده و غیرآلوده به فاسیولیازیس در آزمایش الایزای نقطه‌ای

نوع نمونه (تعداد)	فراوانی رقت سرم																	
	۱:۱۰۰		۱:۲۰۰		۱:۴۰۰		۱:۸۰۰		۱:۱۶۰۰		۱:۳۲۰۰		۱:۶۴۰۰		۱:۱۲۸۰۰		۱:۲۵۶۰۰	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
گوسفندان آلوده (۴۷ مورد)	۴۷	۱۰۰	۴۷	۱۰۰	۴۷	۱۰۰	۴۷	۱۰۰	۴۷	۱۰۰	۴۲	۹۱/۳	۱۲	۲۶/۰۹	۱	۲/۱۷	۰	۰
گوسفندان سالم (۴۶ مورد)	۴۶	۱۰۰	۴۴	۹۶/۶۵	۳۵	۷۶/۰۹	۴	۸/۶۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۲ - حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری و نسبتهای کاذب آزمایش Dot-ELISA در تشخیص فاسیولیازیس گوسفندی

رقت سرم	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	ارزش اخباری مثبت (درصد)	ارزش اخباری منفی (درصد)	نسبت مثبت کاذب (درصد)	نسبت منفی کاذب (درصد)
۱:۱۰۰	۱۰۰	۰	۵۰/۵۴	۰	۱۰۰	۰
۱:۲۰۰	۱۰۰	۴/۳۵	۵۱/۶۵	۱۰۰	۹۵/۶۵	۰
۱:۴۰۰	۱۰۰	۲۳/۹۱	۵۷/۳۲	۱۰۰	۷۶/۰۹	۰
۱:۸۰۰	۱۰۰	۹۱/۳۰	۹۲/۱۶	۱۰۰	۸/۷۰	۰
۱:۱۶۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰
۱:۳۲۰۰	۸۹/۳۶	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۲۰	۰	۱۰/۶۴
۱:۶۴۰۰	۲۵/۵۳	۱۰۰	۱۰۰	۵۶/۷۹	۰	۷۴/۴۷
۱:۱۲۸۰۰	۲/۱۲	۱۰۰	۱۰۰	۵۰	۰	۹۷/۸۷
۱:۲۵۶۰۰	۰	۱۰۰	۰	۴۹/۴۶	۰	۱۰۰

نتایج

نمودار ۱ پادگن نیمه‌تخلیص‌شده *فاسیولا ژیگانتیکا* پس از عبور از ستون سفادکس G-200 می‌باشد که ۴ اوج کاملاً مشخص را نشان می‌دهد.

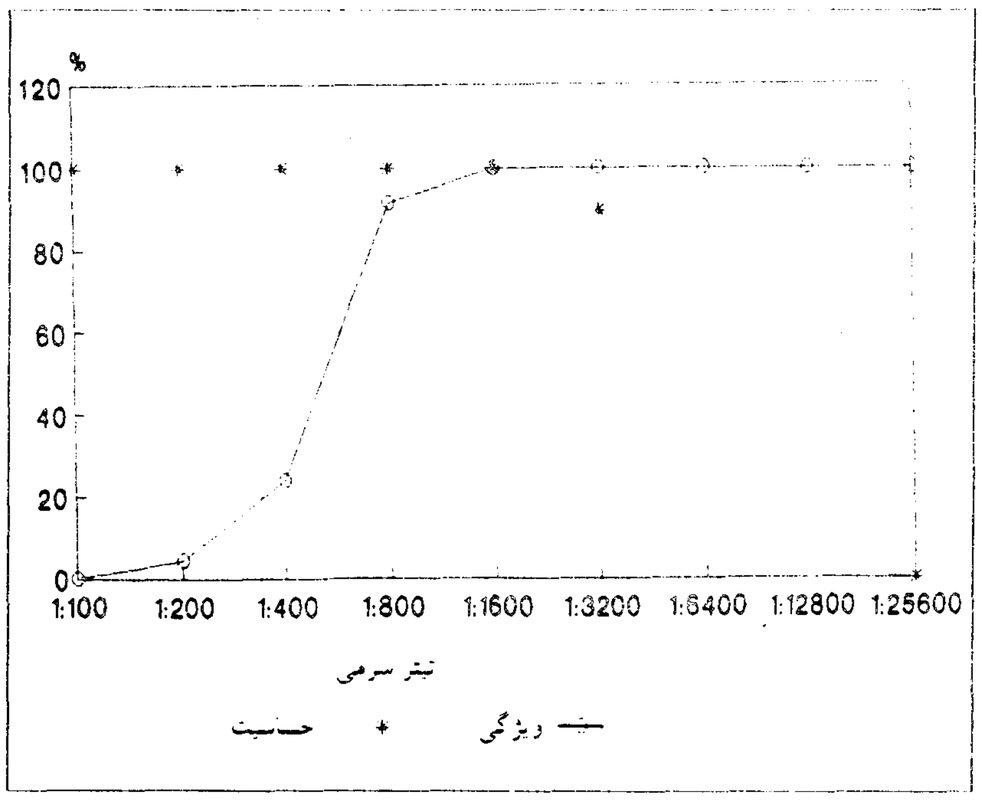
جدول ۱ فراوانی مطلق و نسبی آخرین رقت مثبت سرمی گوسفندان آلوده و غیرآلوده به فاسیولیازیس را در آزمایش الایزای نقطه‌ای را نشان می‌دهد. آخرین رقت مثبت سرمی گوسفندان مبتلا به فاسیولا ۱:۱۲۸۰۰ می‌باشد، در حالی‌که این میزان برای گوسفندان سالم ۱:۸۰۰ است.

برطبق نتایج به‌دست آمده از جدول ۲ با افزایش رقت سرم، موارد مثبت کاذب کاهش می‌یابند. حساسیت آزمایش تا رقت ۱:۱۶۰۰ برابر با ۱۰۰ درصد می‌باشد و پس از آن کاهش می‌یابد و در رقت ۱:۲۵۶۰۰ به حداقل خود می‌رسد. ویژگی آزمایش در رقت ۱:۱۰۰ کمترین مقدار را داراست و با افزایش رقت بتدریج زیاد گشته و در رقت ۱:۱۶۰۰ به حداکثر خود می‌رسد (۱۰۰ درصد) و تا انتها به همین میزان باقی می‌ماند. در رقت سرمی ۱:۸۰۰ حساسیت آزمایش برابر ۱۰۰ درصد و ویژگی آن برابر ۹۱/۳۰ درصد می‌باشد. نمودار ۲ حساسیت و ویژگی الایزای نقطه‌ای در تشخیص فاسیولیازیس تجربی را نشان می‌دهد.

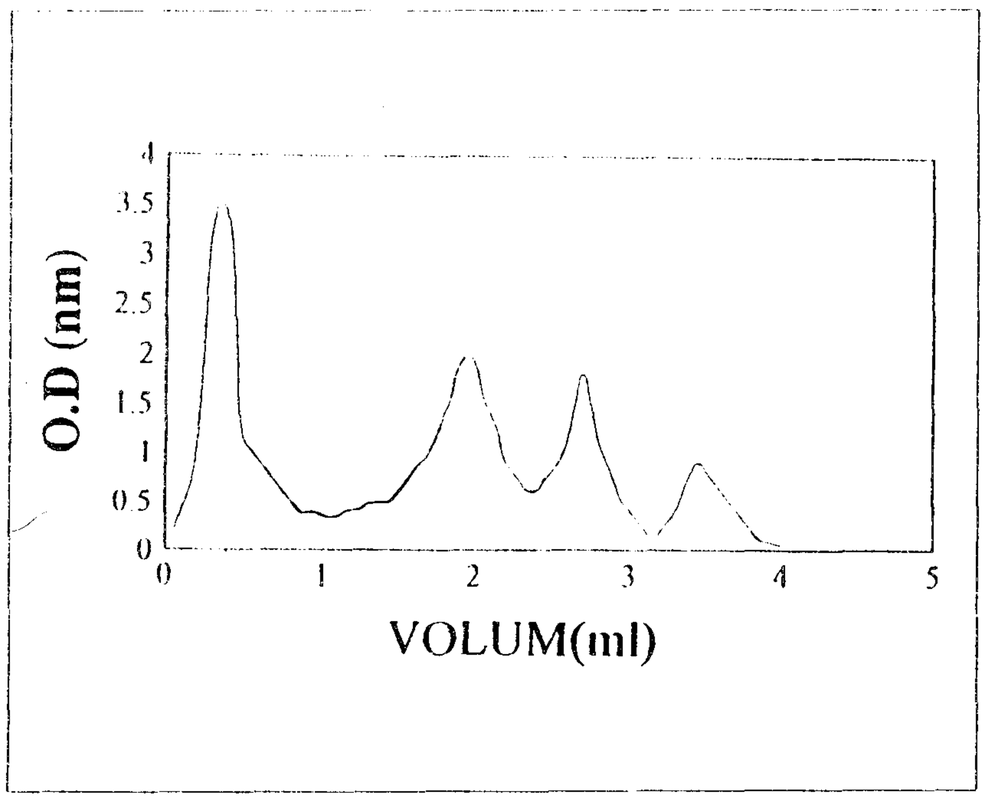
بحث

فاسیولا ژیگانتیکای هموژن‌شده پس از عبور از ستون سفادکس G-200، چهار اوج پروتئینی نزدیک به هم را پدید می‌آورد. برطبق مطالعات گذشته (۴) اوجهای II و III دارای پادگنهای مهم این کرم می‌باشند که پس از جداسازی الکتروفورتیک توسط SDS PAGE وزن ملکولی‌ای بین ۱۰ تا ۶۶ کیلودالتون را نشان می‌دهند (۸). این پادگنها هنگامی که با روش کانترایمونوالکتروفورز (CIEP) برای تشخیص فاسیولیازیس انسانی به‌کار رفتند، هیچ واکنش متقاطعی را نشان نداده و حساسیت و ویژگی آزمون برابر با ۱۰۰ درصد بوده است (۴). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهند که با به‌کارگیری پادگن نیمه‌تخلیص‌شده *فاسیولا ژیگانتیکا* در آزمایش الایزای نقطه‌ای، حساسیت آزمایش در تشخیص فاسیولیازیس گوسفندی در رقت سرمی ۱:۸۰۰ برابر با ۱۰۰ درصد و ویژگی آن برابر با ۹۱/۳۰ می‌باشد که به‌عنوان تیتر cut-off تعیین گردید. با خالص‌سازی بیشتر پادگن می‌توان cut-off بهتری به‌دست آورد، اما از نظر اقتصادی به صرفه نیست و موجب افزایش بهای تمام‌شده به ازاء هر آزمایش می‌شود. در صورت وجود آلودگیهایی نظیر ابتلا به *شیستوزوما*، *ارنیتوبیلارزیا* و کیست هیداتیک ویژگی بالای این آزمایش کاهش خواهد یافت زیرا این آلودگیها واکنش متقاطع بالایی را با فاسیولیازیس نشان می‌دهند. میانگین تیتر سرمی ۱:۳۸۳ برای گوسفندان سالم نیز نشان می‌دهد که وجود احتمالی آلودگیهایی غیر از فاسیولیازیس می‌تواند واکنشهای متقاطعی را پدید آورد. در مطالعه منصور و همکاران (۱۹۸۳) حساسیت و ویژگی آزمایش CIEP با استفاده از پادگن نیمه‌تخلیص‌شده *فاسیولا ژیگانتیکا* برای تشخیص فاسیولیازیس برابر با ۱۰۰ درصد بوده است (۴). در مطالعه شاهین و همکاران (۱۹۸۹) حساسیت و ویژگی الایزای نقطه‌ای برای تشخیص فاسیولیازیس به‌ترتیب برابر با ۱۰۰ و ۹۷/۸ درصد گزارش گردید (۷). در مطالعه یوسف و همکاران (۱۹۹۱) حساسیت و ویژگی الایزا برای تشخیص فاسیولیازیس به‌ترتیب ۱۰۰ و ۹۰ درصد تعیین شده بود (۸) و بالاخره ایبار و همکاران (۱۹۹۸) سه روش مختلف الایزا (DIG ELISA, DOT ELISA, ELISA) را برای تشخیص فاسیولیازیس گوسفندی مقایسه نمودند و نتیجه گرفتند که هر سه این تستها به میزان بالایی حساس و ویژه می‌باشند (۲). علت تفاوت نتایج این مطالعات با تحقیق حاضر علاوه‌بر واکنشهای متقاطع، استفاده از روشهای مختلف می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق و مقایسه آن با مطالعات دیگر محققان (۸، ۷، ۵، ۴، ۲) می‌توان ادعا نمود آزمایش الایزای نقطه‌ای دارای ارزشی معادل الایزای استاندارد است ولی از جنبه سرعت، ارزانی و عدم نیاز به قرائت‌گر الایزا و امکان انجام‌یافتن آزمایش در هر مکان می‌توان گفت که الایزای



نمودار ۲ – حساسیت و ویژگی الایزای نقطه‌ای در تشخیص فاسیولیازیس تجربی در گوسفند.



نمودار ۱ – فراکشنهای حاصل از عبور **فاسیولا ژیگانتیکای** هموژنیزه‌شده از ستون کروماتوگرافی سفادکس G-200.

نقطه‌ای حتی برتر از الایزای استاندارد است. با در نظرگرفتن آلودگی نسبتاً بالای دامهای کشور به *فاسیولا ژیگانتیکا*، مرحله بعدی این تحقیق می‌تواند طراحی کیت تشخیصی فاسیولیازیس دامی با روش الایزای نقطه‌ای باشد که امید است در آینده نزدیک کیت فوق تهیه و در سطح کشور از آن استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات آقای دکتر پایکاری و خانم گلچین‌فر از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی که در انجام این تحقیق صمیمانه همکاری داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. De Morilla, C.A., Paniogua, R., Ruiznavarrete, A., Bautista, C.R. and Morilla, A. Comparison of dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot - ELISA), passive haemagglutination test (PHT) and thin layer immunoassay (TIA) in the diagnosis of natural or experimental Fasciola hepatica infection in sheep. Vet. Parasitol., 30: 197-203, (1989).
2. Ibarra, F., Montenegro, N., Vera, Y., Boulard, C., Quiraz, H., Flores, J. and Ochoa, P. Comparison of three ELISA test for seroepidemiology of bovine fascioliasis. Vet. Parasitol 77: 229-236, (1998).
3. Lowry, F., Rosebrough, N.I., Farr, A.L. and Randoll, R.J. Protein measurment with folin phenol reagent. J. Bio. Chem. 193: 265-275, (1951).
4. Mansour, N.S., Youssef, F.G., Mikkail, E.M. and Boctor, F.N. Use of partially purified Fasciola gigantica worm antigen in the serological diagnosis of human fascioliasis in Egypt. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32: 550-554, (1983).
5. Rickard, L.G. Development and application of a Dot-ELISA test for the detection of serum antibodies to Fasciola hepatica antigens in llamas. Vet. Parasitol. 58: 9-15, (1995).
6. Santiago, N. and Hillyer, G.V. Isolation of potential serodiagnostic Fasciola hepatica antigens by electroelution from polyacrylamide gels. Am. J.Trop. Med. Hyg, (1986).
7. Shaheen, H.I., Kamal, K.A., Farid, Z., Mansour, N., Boctor, F.N. and Woody, J.N. Dot enzyme linked immunosorbent assay (Dto-ELISA) for the rapid diagnosis of human fascioliasis. J. Parasitol., 75(4): 549-552, (1989).
8. Yousef, F.G. and Mansour, N.S. A purified Fasciola gigantica antigen for serodiagnosis of fascioliasis. Trans. Roy. Trop. Med. Hyg., 85: 535-537, (1991).
9. Zimmerman, G.L., Nelson, M.J. and Clark, C.R.B. Diagnosis of ovine fascioliasis by a lot enzyme linked immunosorbent assay: A rapid microdiagnostic technique. Am. J. Vet. Res., 46(7): 1513-1515, (1985).

Application and evaluation of Dot-ELISA for diagnosis of experimental fascioliasis

Hadighi, R.[1], Dalimi Asl, A.H.[1], Madani, R.[2]
[1]*Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran - Iran.* [2]*Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj - Iran.*

In present study, Fasciola gigantica partially purified antigen (PPF) isolated from sheep's liver fluke, was prepared and evaluated for the diagnosis of fascioliasis in sheep sera. Serum samples were collected from two groups of animals: 46 healthy sheep as negative control and 47 experimentally infected sheep with Fasciola gigantica as cases, confirmed by finding adult fluk in their liver at autopsy. By appointing 1:800 sera dilution as cut-off titre, sensitvity of the Dot-ELISA test in diagnosis of experimental sheep fascioliasis was 100% and specificity was 91:30%. Dot-ELISA was found very sensitive, specific, economical and fast for serodiagnosis of sheep fascioliasis.

Key words: *Fasciola gigantica,* Experimental fascioliasis, Dot-ELISA.