

تهیه و خالص سازی آنتی ژن های کرم بالغ فاسیولایاتیکا جهت تشخیص فاسیولایازیس

چکیده

زمینه و هدف: فاسیولایازیس، یکی از بیماری های مهم انگلی انسان و دام است که توسط گونه های فاسیولا در میزبان ایجاد می شود. تقریباً ۲/۴ میلیون نفر در جهان به این انگل مبتلا هستند و ۱۸۰ میلیون نفر، در معرض خطر ابتلا هستند. تشخیص بموقع و درمان سریع آن، از بروز عوارض بیماری در مبتلایان بطور چشمگیری جلوگیری می نماید. به همین جهت در مطالعه حاضر نسبت به جداسازی، خالص سازی و ارزیابی آنتی ژن مناسب و بکارگیری آن در روشهای سرولوژیک حساس و اختصاصی اقدام شد.

روش بررسی: در این مطالعه، ابتدا کرمهای سالم جمع آوری شدند، سپس کوتیکول و سایر ارگان های آنها تفکیک شده، آنگاه به صورت جداگانه، هموژنیزه و سونیکه شدند. میزان پروتئین آنها به روش برادفورد اندازه گیری شده و کلیه نمونه ها، تغلیظ شدند و بر روی ستون ژل کروماتوگرافی (سفادکس G₂₀₀) برده شدند. برای هر قسمت، ۴ جزء آنتی ژنیک دریافت شد. آنگاه با اولترافیلتراسیون پروتئین، نمونه ها به میزان مناسب رسانده شدند. با آنتی ژن بدست آمده، ۳۶ راس خرگوش مصون شدند، آنتی سرم بدست آمده از خرگوش ها به همراه ۳۰ نمونه سرم انسان مشکوک به ابتلا به فاسیولایازیس، به روش CIEP (Counterimmuno-electrophoresis) آزمایش شدند. در این مطالعه، آنتی ژن جزء ۲ (Fraction 2) کوتیکول فاسیولا هیاتیکا، حساسیت ۹۰/۹٪ و اختصاصیت ۹۴/۴٪ را در تست CIEP نشان داد. آنگاه آنتی ژن مذکور با روش SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacryl amide) شناسایی شد که تنها یک باند مشخص ۶۰ کیلودالتونی داشت؛ در طول ژل، باند دیگری مشخص نگردید؛ این آنتی ژن، با روش الایزا مورد آزمایش قرار گرفت. در این روش، آنتی بادی در نمونه سرم ۲۶ نفر از ۳۰ انسان و همه ۳۶ راس خرگوش، قابل تشخیص و اندازه گیری بود. نوع مطالعه، راه اندازی یک روش یا سیستم علمی بود که تجزیه و تحلیل اطلاعات آن با استفاده از آزمون همبستگی به روش SPSS انجام شد.

یافته ها: در مجموع با روش CIEP، از مجموع ۶۶ نمونه سرم (۳۰ نمونه سرم انسان و ۳۶ نمونه سرم خرگوش)، در ۶۰ مورد (آنتی ژن حاصل از کوتیکول فاسیولا هیاتیکا) واکنش رسوبی مثبت مشاهده گردید، در حالی که با روش الایزا، ۶۲ نمونه سرم از ۶۶ نمونه، جواب مثبت داشته است.

نتیجه گیری: بنابراین استفاده از آنتی ژن ۶۰ کیلودالتونی کوتیکول کرم فاسیولا به عنوان آنتی ژن خالص، در تستهای سرولوژیک CIEP و الایزا توصیه می شود. نتایج حاصل، بیانگر حساسیت بالای روش الایزا نسبت به روش CIEP می باشد.

کلیدواژه ها: ۱- خالص سازی ۲- آنتی ژن ۳- فاسیولا هیاتیکا ۴- فاسیولایازیس

*دکتر فاطمه ملکی I

صفورا صادق حسنی II

تاریخ دریافت: ۸۵/۱/۳۰، تاریخ پذیرش: ۸۵/۵/۲۱

مقدمه

فاسیولایازیس، یکی از بیماری های مهم انگلی انسان و دام است که توسط گونه های فاسیولا در میزبان ایجاد می شود. تقریباً ۲/۴ میلیون نفر در جهان به این انگل مبتلا هستند و ۱۸۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا هستند.^(۱)

(I) دانشیار انگل شناسی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (* مؤلف مسؤول).
(II) مربی انگل شناسی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

روشهای ایمنولوژیکی کانترایمونوالکتروفورز و الایزا، می‌تواند به درمان سریع آن کمک نماید.

روش بررسی

در این مطالعه، کبدهای آلوده به کرم بالغ فاسیولا هپاتیکای جمع‌آوری شده از کشتارگاه‌ها و سرم انسان و حیوان آلوده و سالم، جهت بررسی مراحل مختلف کار مورد استفاده قرار گرفتند.

در آزمایشگاه، کلیه کرمهای سالم از مجاری صفراوی، خارج و به داخل سرم فیزیولوژی منتقل شده و چندین بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. سپس کرمها با PBS ۰/۱ مولار (phosphate buffered saline) با $PH=8/2$ چندین بار شستشو داده شدند. بعد از خشک کردن کرمها توسط کاغذ خشک‌کن، به فریزر -20 درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شدند. کرمهای فریز شده برای جداسازی قسمتهای مختلف بدن، از فریزر خارج شدند، ابتدا با تیغ پیستوری، کوتیکول آنها، جدا و در بشر حاوی PBS جمع‌آوری شد، سپس سایر اندامها نیز در بشر دیگری که حاوی PBS بود، نگهداری شدند.

نمونه‌ها به وسیله هموژنیزاتور، هموژنیزه شدند و با استفاده از سونیکاتور، سه مرتبه و هر بار به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با شدت ۵۰ کیلو هرتز، عمل سونیکاسیون روی نمونه‌ها انجام گرفت، بطوری که کلیه سلولها، متلاشی شده و ماکرومولکولها، آزاد گردیدند.^(۶) آنگاه برای خارج کردن چربی، آنها را در دکانتور با ۳ برابر حجم نمونه، اتر قرار داده درب دکانتور بسته و چندین بار آن را محکم به هم زده و برای خارج شدن گاز از دکانتور شیر آن را چند بار باز و بسته نموده سپس آن را به مدت نیم ساعت در یخچال قرار داده تا دو فاز تشکیل گردد. فاز پایینی که نمونه بود، از آن خارج شد. آنگاه نمونه در ارلن مایر مجهز به ۲ لوله تخلیه، وارد و به پمپ خلاء وصل شد تا اتر کلیه نمونه‌ها خارج گردد.^(۷)

از روش برادفورد که روشی ساده، دقیق، سریع و حساس بوده، جهت تعیین میزان پروتئین نمونه‌ها استفاده شد. آنگاه

در ایران اکثراً به صورت آندمیک در استان گیلان بویژه بندرانزلی و لاهیجان دیده می‌شود و گاهی به صورت اپیدمی گزارش شده است که آخرین اپیدمی گزارش شده در این منطقه، در حدود سالهای ۷۸-۱۳۷۷ بوده است.^(۱)

در کشورهای فرانسه، مصر و برزیل هم اپیدمی با این انگل گزارش شده است^(۲) از نظر دامپزشکی هم بسیاری از دامهای اهلی علفخوار، به دلیل آلوده‌شدن به این انگل، خسارت جبران‌ناپذیر اقتصادی به بار می‌آورند، زیرا دامها پس از آلودگی، شدیداً دچار اختلالات متابولیسمی و کبدی می‌شوند و بازدهی اقتصادی نخواهند داشت.^(۳)

آلودگی دامهای کشورمان هم به این انگل بسیار زیاد است. نظر به اینکه این بیماری به عنوان یک بیماری مشترک بین دام و انسان از طریق علوفه و سبزیجات به میزبانان منتقل می‌شود و در انسان خطرات جدی ایجاد می‌نماید، به عنوان یک معضل بهداشتی جوامع بشری مطرح است.^(۴) از طرفی دستیابی به تخم انگل در مدفوع افراد مشکوک، چندان آسان نیست و در صورت تشخیص بیماری، در این مرحله نیز مشکلات فراوانی در درمان بیماران بروز خواهد کرد، بنابراین با توجه به لزوم تشخیص سریع و زود هنگام این بیماری، امروزه از تکنیک‌های پیشرفته‌تری علاوه بر روشهای پارازیتولوژیکی استفاده می‌شود؛ این روشها آلودگی را در کمتر از یک هفته پس از ورود عامل بیماری تشخیص می‌دهند، تا با درمان بموقع، از عوارض خطرناک آن جلوگیری شود.^(۵)

از آنجایی که فاسیولیاژیس هر ساله ضایعات جبران‌ناپذیری را ایجاد می‌کند، هدف از این مطالعه، تهیه آنتی‌ژن‌های خالص فاسیولا و استاندارد نمودن آن می‌باشد. این بیماری در برخی نواحی ایران، آندمیک می‌باشد و کنترل و درمان آن با مشکل همراه است. تشخیص بیماری با تهیه و خالص‌سازی آنتی‌ژن‌های کرم بالغ توسط روشهای بیوشیمیایی اولترافیلتراسیون، ژل کروماتوگرافی و الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید و

بررسی آنتی‌ژن‌ها با روش‌های کانترایمونوالکتروفورز انجام شد.^(۱۰) تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها به روش دودسیل سولفات پلی‌آکریل‌آمید ژل‌الکتروفورز انجام شد.^(۱۱) از تست ELISA (Enzyme linked Immuno sorbent assay) برای تشخیص و تیتراسیون آنتی‌ژن‌های کویتیکول و سایر ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا استفاده شد.^(۱۲) آنگاه برای ارزیابی آنتی‌ژن‌های تهیه شده، اقدام به تهیه سرم‌های انسانی و حیوانی شد. در ۴ نوبت از خرگوش‌ها خونگیری بعمل آمد و سرم آنها جهت مراحل آزمایش نگهداری شد. ۳۰ نمونه سرم انسانی از بیمارانی که عمدتاً در شمال ایران زندگی می‌کردند، تهیه شد. این بیماران از نظر علایم بالینی، مشکوک به فاسیولا بودند و در آزمایش مدفوع تعدادی از آنها، تخم کرم مشاهده شده بود.^(۱۲)

نوع مطالعه، راه‌اندازی یک روش یا سیستم علمی بود که تجزیه و تحلیل اطلاعات آن با استفاده از آزمون همبستگی به روش SPSS انجام شد.

نتایج

در این تحقیق، تعدادی اجزاء آنتی‌ژنیک برای کویتیکول و سایر اندام‌های فاسیولا هپاتیکا در روش ژل‌کروماتوگرافی با سفادکس G200 بدست آمد که بررسی هر کدام از آنها در ذیل آمده است:

جزء یک کویتیکول فاسیولا هپاتیکا با ۱۶ نمونه (۵۳/۳٪) سرم انسانی از ۳۰ نمونه و با ۲۰ مورد (۵۵/۵٪) از ۳۶ نمونه سرم خرگوش، واکنش رسوبی مثبت داشته و در ۵ مورد، با سرم کنترل، واکنش مثبت کاذب داشته است.

جزء دو کویتیکول فاسیولا هپاتیکا با ۲۸ نمونه (۹۳/۳٪) سرم افراد مشکوک به ابتلا به فاسیولیاژیس و با ۳۲ نمونه (۸۸/۸٪) سرم خرگوش از ۳۶ نمونه، واکنش مثبت داشته و در ۲ مورد، واکنش مثبت کاذب با سرم گروه کنترل داشته است.

جز سه کویتیکول فاسیولا هپاتیکا با ۲۲ مورد (۷۳/۳٪) از ۳۰ نمونه سرم انسانی و با ۱۰ مورد (۲۷/۷٪) سرم

نمونه‌ها برای سیستم اولترافیلتر آماده شدند و عمل فیلتراسیون تا زمانی که سطح مایع داخل محفظه به اندازه مورد نظر برسد، ادامه پیدا کرد. سپس خروجی اولترافیلتراسیون، در ظروف استریل جمع‌آوری گردیدند. بعد از اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌ها، آنها در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد برای مراحل بعدی نگهداری شدند.

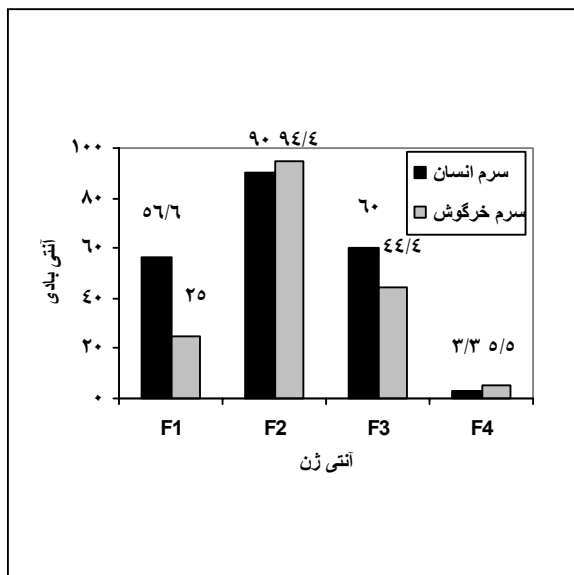
نمونه‌ها با فیلتر دارای پورسایز ۱۰، ۲۰ و ۱۰۰ کیلو دالتون، فیلتر شدند. برای کویتیکول فاسیولا هپاتیکا، چهار جزء آنتی‌ژنی، و برای سایر اندام‌ها نیز، ۴ جزء آنتی‌ژنی بدست آمد. میزان پروتئین اجزای بدست آمده پس از تغلیظ، اندازه‌گیری و برای مراحل بعدی، در یخچال نگهداری شد.^(۸) سپس خالص‌سازی نسبی آنتی‌ژن‌ها با استفاده از روش ژل کروماتوگرافی انجام گرفت و کلیه نمونه‌ها در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد تا بررسی نتایج آنها، نگهداری گردیدند. در هر مرحله برای تغلیظ نمونه‌ها، از کیسه دیالیز استفاده شد.^(۷)

برای تهیه سرم هیپرایمیون، ۴۰ سر خرگوش جوان انتخاب شدند. از تمامی خرگوش‌ها قبل از هر گونه تزریق آنتی‌ژن، خونگیری بعمل آمد، ۴ سر از آنها، واکنش مثبت با آنتی‌ژن نشان دادند، که در نتیجه ۳۶ سر خرگوش استفاده شدند. آنها به ۲ گروه ۱۸ تایی تقسیم شدند و گروه اول، با آنتی‌ژن کویتیکول و گروه دوم، با آنتی‌ژن سایر ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا ایمن شدند. طول دوره ایمن‌سازی حدوداً ۲ ماه بطول انجامید و هیچ یک از خرگوش‌ها تلف نشدند. در طی روزهای ایمن‌سازی یعنی ۱۵ روز بعد از اولین تزریق، ۳۰ روز بعد از اولین تزریق و ۴۵ روز بعد از اولین تزریق، از ورید مارژینال گوش خرگوش‌ها خونگیری انجام شد.^(۹)

ابتدا خون به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ RPM سانتریفوژ شد، پس از آن، سرم کاملاً شفاف جهت آزمایشات بعدی در لوله‌های آزمایش به اندازه ۱۰۰ لاند، تقسیم شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده مراحل بعدی نگهداری شد.^(۹)

خرگوش، واکنش مثبت داشته و با ۳ مورد سرم نرمال، واکنش مثبت کاذب داشته است.

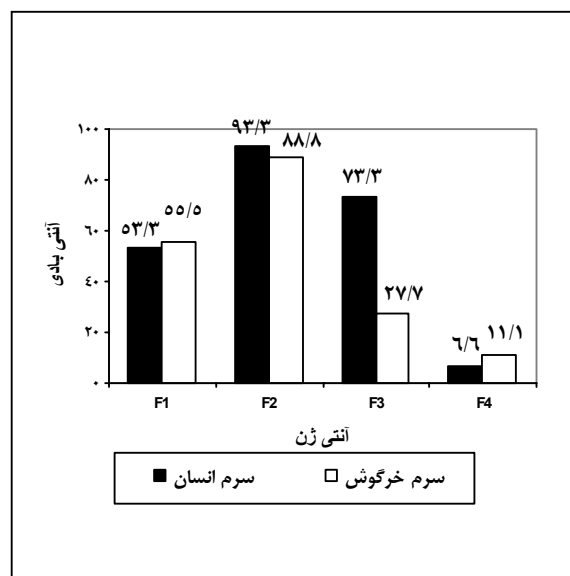
جزء چهار سایر ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا، با یک مورد (۳/۳٪) از نمونه سرم انسان واکنش داشته و با ۲ مورد (۵/۵٪) سرم خرگوش‌های مصون، واکنش بسیار ضعیف داشته است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- ارزیابی آنتی‌ژن ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا با روش کانتر ایمنوالکتروفورز

خرگوش‌های مصون شده از ۳۶ نمونه، واکنش مثبت داشته است و تنها در ۴ مورد، با سرم خرگوش گروه کنترل، واکنش مثبت کاذب داشته است.

جزء چهار کوتیکول فاسیولا هپاتیکا، واکنش ضعیف داشته و فاقد ارزش آنتی‌ژنیک بوده و با ۲ مورد (۶/۶٪) از سرم انسانی و ۴ مورد از سرم خرگوش (۱۱/۱٪)، واکنش مثبت داشته است (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- ارزیابی آنتی‌ژن کوتیکول فاسیولا هپاتیکا با روش کانتر ایمنوالکتروفورز

در نمونه‌های سرم تهیه شده، ۱۵ روز بعد از آخرین تزریق، هیچ‌گونه واکنش رسوبی به روش CIEP بوجود نیامد، ضمناً کلیه نمونه‌های تهیه شده از خرگوش‌ها قبل از تزریق آنتی‌ژن‌های آماده شده، با آنتی‌ژن‌های مورد آزمایش، هیچ‌گونه واکنش رسوبی نداشته‌اند (نمودار شماره ۲).

همچنین جهت تعیین میزان حساسیت روش CIEP، رقت‌های سریال دوتایی ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴، ۱:۱۲۸ و ۱:۲۵۶ تهیه شدند که با این روش، تنها تا رقت ۱:۶۴ سرم‌ها، جوابها مثبت بوده است و از رقت ۱:۱۲۸ به بالا، قوس رسوبی قابل توجه و مشاهده، بوجود نیامد. آنتی‌ژن بکار گرفته شده در این آزمایش، اجزا خالص شده فاسیولا هپاتیکا بوده است. البته بهترین قوس رسوبی در رقت ۱:۱۶ بدست آمد (شکل شماره ۱).

جزء یک سایر ارگان‌های فاسیولاهپاتیکا در ۱۷ مورد (۵۶/۶٪) از ۳۰ نمونه سرم بیماران مشکوک به ابتلا و ۹ مورد (۲۵٪) سرم خرگوش از ۳۶ نمونه، واکنش رسوبی مثبت داشته است و این آنتی‌ژن با ۶ نمونه سرم گروه شاهد، واکنش مثبت کاذب داشته است.

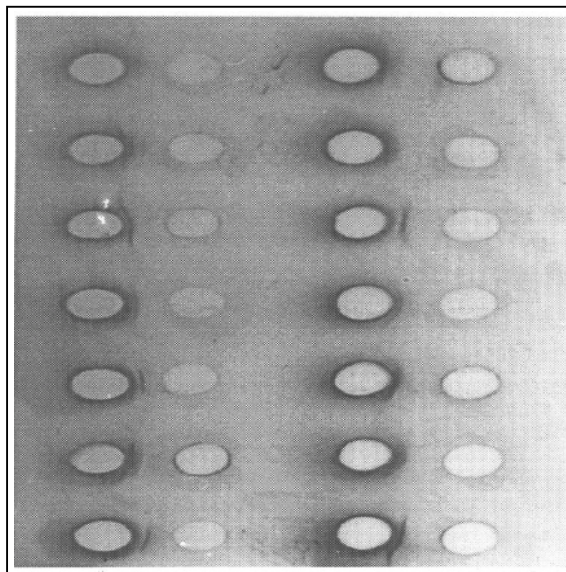
جزء دو سایر ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا با ۲۷ نمونه (۹۰٪) سرم افراد مشکوک به ابتلا و ۳۴ نمونه (۹۴/۴٪) سرم خرگوش‌های مصون از ۳۶ مورد، واکنش رسوبی مثبت داشته و در ۵ مورد، واکنش مثبت کاذب با سرم گروه شاهد داشته است.

جزء سه سایر ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا با ۱۸ نمونه (۶۰٪) سرم افراد مشکوک و ۱۶ نمونه (۴۴/۴٪) سرم

برخوردار بود که با روش CIEP میزان حساسیت آن، ۹۰/۹٪ و اختصاصیت آن، ۹۴/۴٪ نشان داده شد. جزء سوم آنتی ژن کوتیکول فاسیولا هپاتیکا از ارزش اخباری مثبت ۸۸/۸٪ و ارزش اخباری منفی ۴۸/۴٪ برخوردار بود. جزء چهارم آنتی ژن کوتیکول فاسیولا هپاتیکا با حساسیت ۹۰/۹٪، فاقد ارزش آنتی ژنیک در تست سرولوژیک CIEP بوده است.

نتایج نشان می دهد که در آنتی ژن های سایر اندام های فاسیولا هپاتیکا که به وسیله ژل کروماتوگرافی G₂₀₀ جداسازی شده بودند، بهترین نتایج را جزء ۲ (F.2) داشته است که حساسیت آن، ۹۲/۴٪ و اختصاصیت آن، ۸۶/۱٪ بوده است. البته در محاسبات آماری بعدی، ارزش اخباری منفی آن نسبتاً مناسب بوده و رقمی برابر ۸۶/۱٪ را نشان می دهد و ارزش اخباری مثبت این جزء، بالا و برابر ۹۲/۴٪ بود که برای تست های CIEP دارای ارزش می باشد.

جزء یک سایر اندام های کرم فاسیولا هپاتیکا نیز نتایج خوبی نداشته است و ارزش اخباری منفی آن، ۴۲/۸٪ بوده است. جزء سه سایر اندام های کرم فاسیولا هپاتیکا نیز دارای ارزش اخباری منفی ۵۰/۷٪ بوده است. جزء چهارم سایر اندام های کرم فاسیولا هپاتیکا نیز با ارزش اخباری منفی ۳۶/۶٪ و حساسیت ۴/۵٪، فاقد ارزش آنتی ژنیک برای تست های سرولوژیک مثل CIEP می باشد (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۳).



شکل شماره ۱- نمایش نتایج مثبت و منفی آزمایش کانترایمونوالکتروفورز

با توجه به محاسبات آماری، ارزش اخباری مثبت با جزء یک کوتیکول (Positive Predictive Value=PPV) با حساسیت ۵۴/۵٪ و اختصاصیت ۸۶/۱٪ و علی رغم داشتن ارزش اخباری مثبت بالا برابر ۸۷/۸٪، از ارزش اخباری منفی (Negative predictive value=NPV) پایین برابر ۵۰/۸٪ برخوردار بود. جزء دوم کوتیکول فاسیولا هپاتیکا نیز از ارزش اخباری مثبت ۹۶/۷٪ و ارزش اخباری منفی ۸۵٪

جدول شماره ۱- ارزیابی فاسیولاهپاتیکا با روش کانتر ایمونوالکتروفورز از نظر حساسیت و اختصاصیت

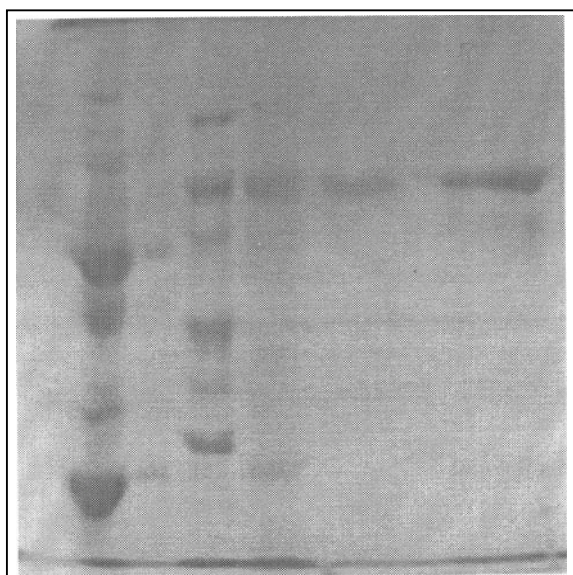
نتیجه آزمایش	سرم آلوده انسان		سرم ایمن خرگوش		سرم کنترل خرگوش		مثبت واقعی
	-	+	-	+	-	+	
آنتی ژن کوتیکول فاسیولا فراکشن (۱)	۱۴	۱۶	۱۶	۲۰	۵	۲۱	۳۶
آنتی ژن کوتیکول فاسیولا فراکشن (۲)	۲	۲۸	۴	۳۲	۲	۳۴	۶۰
آنتی ژن کوتیکول فاسیولا فراکشن (۳)	۸	۲۲	۲۶	۱۰	۴	۳۲	۳۲
آنتی ژن کوتیکول فاسیولا فراکشن (۴)	۲۸	۲	۳۲	۴	۰	۳۶	۶
آنتی ژن ارگان فاسیولا فراکشن (۱)	۱۳	۱۷	۲۷	۹	۶	۳۰	۲۶
آنتی ژن ارگان فاسیولا فراکشن (۲)	۳	۲۷	۲	۳۴	۵	۳۱	۶
آنتی ژن ارگان فاسیولا فراکشن (۳)	۱۲	۱۸	۲۰	۱۶	۳	۳۳	۳۴
آنتی ژن ارگان فاسیولا فراکشن (۴)	۲۹	۱	۳۴	۲	۰	۳۶	۳

ادامه جدول شماره ۱

نتیجه آزمایش	منفی کاذب	منفی واقعی	مثبت کاذب	حساسیت	اختصاصیت	Pvalue منفی	Pvalue مثبت
آنتی ژن کوتیکول فاسیولا فراکشن (۱)	۳۰	۳۱	۵	۵۴/۵	۸۶/۱	۵۰/۸	۸۷/۸
آنتی ژن کوتیکول فاسیولا فراکشن (۲)	۶	۳۴	۲	۹۰/۹	۹۴/۴	۸۵	۹۶/۷
آنتی ژن کوتیکول فاسیولا فراکشن (۳)	۳۴	۳۲	۴	۴۸/۴	۸۸/۸	۴۸/۴	۸۸/۸
آنتی ژن کوتیکول فاسیولا فراکشن (۴)	۶۰	۳۶	۰	۹/۰۹	۱۰۰	۳۷/۵	۱۰۰
آنتی ژن ارگان فاسیولا فراکشن (۱)	۴۰	۳۰	۶	۳۹/۳	۸۳/۳	۴۲/۸	۸۱/۲
آنتی ژن ارگان فاسیولا فراکشن (۲)	۵	۳۱	۵	۹۲/۴	۸۶/۱	۸۶/۱	۹۲/۴
آنتی ژن ارگان فاسیولا فراکشن (۳)	۳۲	۳۳	۳	۵۱/۵	۹۱/۶	۵۰/۷	۹۱/۸
آنتی ژن ارگان فاسیولا فراکشن (۴)	۶۳	۳۶	۰	۴/۵	۱۰۰	۳۶/۶	۱۰۰

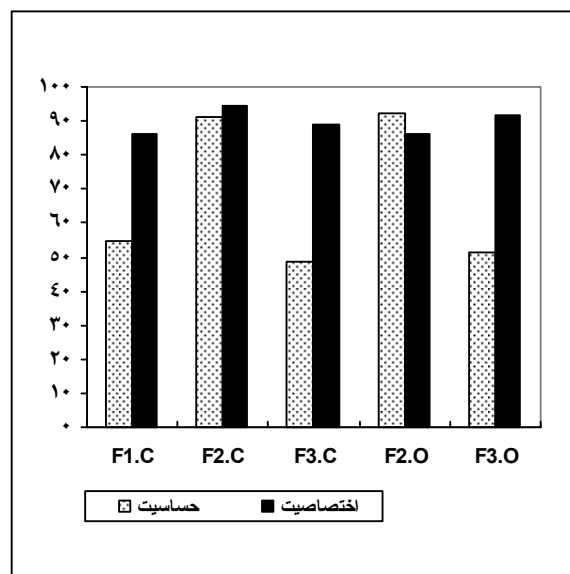
R: Real حساسیت P: Positive مثبت
F: False کاذب N: Negative منفی Spec: Specificity اختصاصیت

نتایج حاصل از انتقال آنتی ژن های خالص شده فاسیولا هپاتیکا روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز در حضور سدیم دوسیل سولفات در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



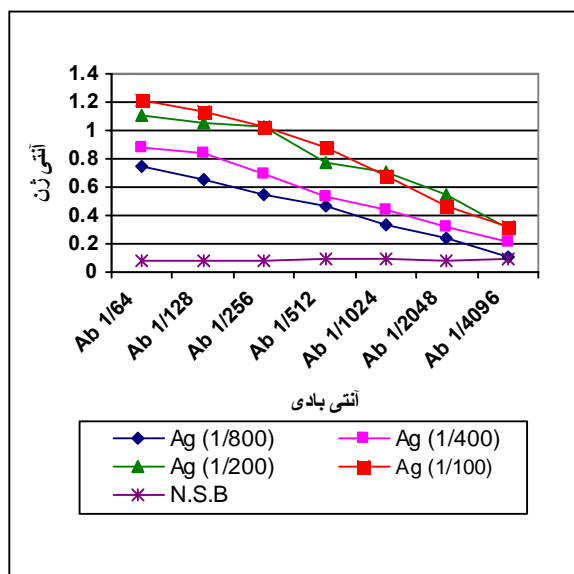
شکل شماره ۲- الکتروفورز اجزای مختلف آنتی ژنیک فاسیولا هپاتیکا با روش SDS-PAGE

همانطوری که مشاهده می شود، جزء ۱ (F.1) آنتی ژن های حاصل از ژل کروماتوگرافی با سفادکس G₂₀₀ با در نظر گرفتن منحنی استاندارد، در سه نقطه، به ترتیب در موقعیت ۶۷، ۴۳ و ۱۴ کیلو دالتون، باند رسوبی تشکیل دادند. ضمناً موقعیت این باندها در مورد کوتیکول و سایر اندام های کرم فاسیولا هپاتیکا کاملاً شبیه به هم است. جزء ۲ (F.2)



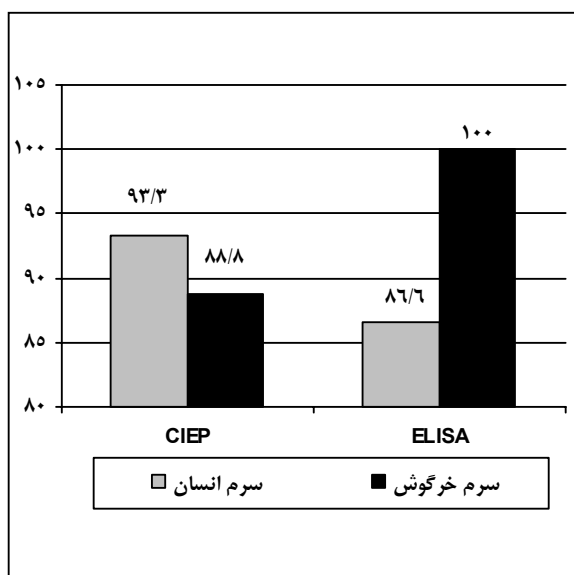
نمودار شماره ۳- ارزیابی فاسیولا هپاتیکا با روش کانتر ایمونوالکتروفورز از نظر حساسیت و اختصاصیت

این آزمایش نشان می دهد که نتایج جزء ۲ کوتیکول و سایر ارگان های فاسیولا هپاتیکا، اختلاف معنی دار آماری نشان نمی دهند. به دنبال دستیابی به نتایج بسیار مطلوب، اجزاء آنتی ژنیک خالص شده کوتیکول فاسیولا هپاتیکا در آزمایش CIEP و اختصاصیت و حساسیت بسیار بالای این آنتی ژن ها در تشخیص و اندازه گیری آنتی بادی در سرم خرگوش های مصون شده و سرم بیماران مشکوک به ابتلا به فاسیولیاژیس، به همراه آنتی ژن سایر ارگان های حاصله از ژل کروماتوگرافی ستونی (G₂₀₀)، جهت تعیین وزن مولکولی و تعیین خلوص، مورد آزمایش قرار گرفتند.



نمودار شماره ۴- آزمایش ایلیزا جهت دستیابی به نقطه مطلوب غلظت آنتی‌ژن

نتایج مقایسه روش ایلیزا با روش کانترایمونوالکتروفورز، بیانگر حساسیت بالای این روش است که می‌تواند به عنوان یک تست کاملاً اختصاصی و حساس در تشخیص و اندازه‌گیری آنتی‌بادی موجود در سرم افراد آلوده و حیوان آزمایشگاهی باشد (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵- مقایسه روش ایلیزا با روش کانتر ایمونوالکتروفورز

کوتیکول و سایر ارگان‌های فاسیولا‌هیپاتیکا در موقعیت ۶۰ کیلو دالتون یعنی بین دو وزن مولکولی نمونه استاندارد ۴۳ و ۶۷ کیلو دالتون، باند رسوبی تشکیل دادند و مشخصاً در تمام طول ژل تنها یک باند مشخص داشتند. جزء ۳ کوتیکول و سایر اندام‌های فاسیولا‌هیپاتیکا باندهای ضعیف در موقعیت ۴۰ و ۱۲ کیلو دالتون داشتند.

با استفاده از الکتروفورز و بکارگیری پلی‌آکریل‌آمید ژل الکتروفورز در حضور سدیم دودسیل سولفات، از خالص بودن آنتی‌ژن‌های جزء ۲ کوتیکول، اطمینان حاصل شد و با توجه به نتایج بسیار خوب آنها در روش CIEP، اقدام به پوشش دادن آنتی‌ژن فوق در سطح میکروپلیت‌های پلی‌استیرنی گردید. آنتی‌ژن فوق در مدت ۲۴ ساعت و به مقدار ۵۰ میکرولیتر با استفاده از بافر کربناته ۰/۰۶ مولار با PH=۹ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، خشک شده و پوشش داده شد. پس از اطمینان از عملیات مربوط به پوشش دادن و گرفتن نتیجه مطلوب، جهت تعیین نقطه اپتیم برای رقت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به ترتیب ذیل عمل شد: آنتی‌ژن با رقت‌های ۱:۸۰۰، ۱:۴۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:۱۰۰، ۱:۵۰، ۱:۲۵، ۱:۱۲٫۵ و ۱:۶٫۲۵؛ سرم انسانی نیز با رقت‌های ۱:۲۵۶، ۱:۱۲۸، ۱:۶۴، ۱:۳۲، ۱:۱۶، ۱:۸، ۱:۴، ۱:۲، ۱:۱، ۱:۰٫۵، ۱:۰٫۲۵، ۱:۰٫۱۲۵ و ۱:۰٫۰۶۲۵ مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایش فوق توسط دستگاه ایلیزا در ۴۹۲ نانومتر و بر مبنای رنگ ایجاد شده بدست آمد (نمودار شماره ۴).

این آزمایش حتی با رقت ۱:۸۰۰ آنتی‌ژن، در مقابل آخرین رقت آنتی‌بادی یعنی ۱:۴۰۹۶، جواب مثبت داشت و میزان OD (Optical density) خوانده شده توسط دستگاه، حدود ۲ برابر cut off دستگاه بوده و عدد بدست آمده از OD کمپلکس‌های غیر اختصاصی، بسیار بالاتر بود. بنابراین آنتی‌ژن‌های حاصله به عنوان یک آنتی‌ژن حساس در روش ایلیزا می‌توانند کاربرد داشته باشند.

از تعداد ۳۰ نمونه سرم مربوط به انسان، تعداد ۲۶ مورد با روش ایلیزا و با آنتی‌ژن جزء ۲ کوتیکول فاسیولا‌هیپاتیکا و ۳۶ سرم مربوط به خرگوش‌های مصون شده با این آنتی‌ژن، جواب مثبت داشتند.

ELISA امکان دستیابی به آنتی بادی اختصاصی در کلیه خرگوش های مصون شده، بوده است، در حالی که نمونه سرم همین خرگوش ها قبل از تزریق نمونه آنتی ژن با همین روشها، هیچ گونه واکنش مثبت نداشته اند. رایموند نیز میزان حساسیت این روشها را با آنتی ژن جزء ۲ حاصل از ژل کروماتوگرافی با سفادکس G₂₀₀، ۹۰٪ اعلام نموده است.^(۱۸ و ۱۰)

روش ELISA بکار گرفته شده در طی مراحل انجام کار و ماحصل آن، روشی است که با coat نمودن آنتی ژن در هر چاهک و استفاده از آنتی بادی اولیه ایجاد شده در خرگوش و مقادیر آنتی ژنیک مشخص، به صورت غیر مستقیم انجام گرفته است و در مطالعات متعددی از این روش استفاده شده است که شمای کلی آن مشابه روش انجام عمل در این تحقیق می باشد.^(۱۹ و ۱۲)

یافته های حاصل از این پژوهش در کمک به بهبود وضعیت بهداشتی کشور در تشخیص بموقع فاسیولیا زیس انسانی می تواند قابل استفاده باشد. علی رغم اینکه جمع آوری نمونه های آلوده از کشتارگاهها و تهیه سرم انسان های بیمار می تواند محدودیت هایی را در پژوهش ایجاد نماید.

نتیجه گیری

بنابراین استفاده از آنتی ژن ۶۰ کیلودالتونی کوتیکول کرم فاسیولا به عنوان آنتی ژن خالص در تستهای سرولوژیک CIEP و الایزا توصیه می شود و نتایج حاصله، بیانگر حساسیت بالای روش الایزا نسبت به روش CIEP می باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ثبت: ۴۸۳) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز ابراز می دارند.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که در روش ژل کروماتوگرافی، ۴ جزء آنتی ژنیک برای کوتیکول و سایر اندام های کرم فاسیولا هیاتیکا جمع آوری شده است که جزء ۲ کوتیکول فاسیولا هیاتیکا، بهترین نتایج را از نظر اختصاصیت و حساسیت داشته است و این فراکشن نسبت به فراکشن ۳ نیز از نظر آماری اختلاف معنی داری در دادن جوابهای مثبت نداشته است.

هایلیر و یوسف نیز طی یک مطالعه، جزء ۲ و ۳ حاصل از ژل کروماتوگرافی را، در بررسی و اندازه گیری آنتی بادی با روشهای کانترایمونوالکتروفورز و الایزا، به عنوان آنتی ژن خالص معرفی نمودند.^(۱۳ و ۸)

در مطالعه ای توسط سندرا، جزء ۲ به عنوان یک آنتی ژن خالص معرفی شده است^(۱)، که بررسی اخیر نیز این نتیجه را به همراه دارد. یافته دیگر این تحقیق بیانگر این مطلب است که جزء ۲ (فراکشن ۲) با وزن مولکولی حدود ۶۰ کیلو دالتون در الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید ۱۳٪ در حضور دودسیل سولفات، ضمن داشتن حساسیت بالا، بیش از ۹۴/۴٪ اختصاصیت داشته که بررسی پتری سیا و دژورگولاس نیز آنتی ژن هایی با وزن مولکولی بالای ۵۵ و کمتر از ۶۰ کیلو دالتون را که عموماً در فراکشن ۲ ژل کروماتوگرافی جمع آوری می شوند، به عنوان بهترین آنتی ژن از نظر داشتن اختصاصیت و حساسیت بالا معرفی نمودند.^(۱۵ و ۱۴)

همچنین بعضی از محققین نیز در بررسی های انجام شده، روش الایزا را دارای حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۳٪ ذکر نموده اند.^(۱۶) تحقیقات ملونگ و همکاران نیز حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی این تست را به ترتیب ۹۸/۲٪، ۱۰۰٪، ۹۷/۴٪ و ۷۶/۹٪ گزارش نمودند.^(۱۷)

در این تحقیق، آزمایش آنتی ژن ها با روش CIEP و ELISA کاملاً به هم نزدیک بوده و مشخص شد که پروتئین موجود در کوتیکول کرم، از پروتئین موجود در سایر اندامها، بیش تر است و توانایی تحریک سیستم ایمنی توسط آنتی ژن کوتیکول، از سایر اندامها بیش تر است که با روشهای سرولوژیک حساس و اختصاصی مثل CIEP و

فهرست منابع

- 13- Hillyer GV, Soler M, Garcia Mi. Immunodiagnosis of human and animal Fascioliasis. J CAB international 1999; 7: 1201-10.
- 14- Gorgolas De, Torres M, Verdejo RA. Fasciola hepatica infestation biopathology and new diagnostic and therapeutic aspects. Enfem- Infec- Microbiol-clin 1996; 10(9):514-9.
- 15- Patricia B, Carlos F, Carmona C. Fasciola hepatica: Parasite secreted proteinases determination of the specific cleavage sites and idenfication of the immunoglobulin fragments produced .Experimental parasitology 2000; 94: 99-100.
- 16- Hagab Mm, Moustafa N. Role of ELISA in early detection of Fasciola hepatica cepro-antigen hn experimentally infected animals. J Egypt Soc Parasitol 2003; 28(2): 379-87.
- 17- Maleewong w, Nateeworanart S. Immunodiagnosis of human fascioliasis using an antigen of fascioliasis adult worm. J Trop med public healt 2003; 34(4): 713-17.
- 18-Raymond J, Landley F, Ana M. Detection of criculating parasite Antigen in Murine fascioliasis by two-site Enzyme- linked immuno sorbent assays. Am J Trop Med Hyg 1989; 41(4): 472-8.
- 19- Ibarra F, Jaime J, Fores J. Comparison of three ELISA Tests for seroepidemiology of bovine fascioliasis. Veterinary Parasitology 1998; 77: 229-36.
- ۱- مسعود جعفر، وضعیت آلودگی های کرمی در ایران، سومین کنگره سراسری انگل شناسی پزشکی ایران، ۹-۱۱ اسفند ۱۳۷۹، دانشگاه مازندران، صفحه: ۱۴.
- 2- WHO.control of food borne trematode infection. WHO tec Repser 2002; Geneva 128: 54-60.
- 3- Pachauri Sp, Dalton J. Fascioliasis. 1st ed. J CAB international 2004; 4: 34-40.
- 4- Sandra MO, Neill A, Michael P. Immunodiagnosis of human Fascioliasis using recombinant F.hepatica cathepsin L1 Cysteine proteinase. Am J Trope Med Hyg Go 1999; 5: 749-51.
- 5- Rokni MB, Massoud J. Diagnosis of human Fascioliasis in the Gilan Province of Northern Iran: Application of cathepsin L_ELISA. Acta Tropica 2002; 3: 46-50.
- 6- Shaker A, Demerdash Z. Evaluation of specific Fasciola antigen in the immunodiagnosis of human Fascioliasis in Egypt. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 1998; 24: 463-7.
- 7- Espino AM, Marcet R, Finaly CM. Fasciola hepatica: detection of antigen emia and coproantigens in experimentally infected rats. Exp-parasitology 1997; 85(2): 117-20.
- 8- Youssef FG, Mansour NS. A purified Fasciola gigantica worm antigen for the serodiagnosis of human Fascioliasis. Tran-Roy-Soc-Trop-Med-Hyg 1994; 90(4): 535-9.
- 9- Shehab Ay, Shabrawi El. Evaluation of Fasciola E/S product in diagnosis of acute human Fascioliasis by IgM ELISA. Am-J-Trop- Med parasitol 1995; 46(2): 115-8.
- 10- Hillyer GV, Cornovi M, Laurel A. Crossed immunoelectrophoresis and affinity chromatography for the purification of a parasite antigen. J Immunological method 1994; 30: 385-90.
- 11- Rickard LG, Iwata H, Inoue T. Development and application of a dot- ELISA test for the detection of serum antibodies to Fasciola heptica, antigens in Hamester. Vet-parasitology 1995; 58(1-2): 9-15.
- 12- Donald M, Levine GV, Hillyer SL. Comparison of counter electrophoresis the ELISA and kato fecal examination for the diagnosis infected mice and rabbites. Am-J Trop Med Hyg 1994; 34(4): 602-8.

Preparation and Purification of Mature Fasciola Hepatica Worm's Antigens for the Diagnosis of Fascioliasis

^I
**F. Maleki, PhD*

^{II}
S. Sadegh Hassani, MS

Abstract

Background & Aim: Fascioliasis as a zoonosis is one of the important parasitic diseases which is caused when fasciola species enter the host's body. Approximately 2.4 million people throughout the world are infected with this parasite and 180 million people are vulnerable to it. On time diagnosis and rapid treatment of the disease can substantially prevent the harmful effects of the infection on patients. In the present study, we have tried to separate, purify and assess a useful antigen and apply it as a sensitive and specific serologic method.

Material & Method: In this experiment, first healthy worms were collected and then cuticles and the other organs of them were detached, homogenized and sonicated separately. Their levels of protein were measured by Bradford method. Then, all the samples were thickened and put on chromatography gel column (G200 sephadex). Four antigenic reactions for each part were observed. By using ultrafiltration method, the protein level of the samples was adjusted to a suitable level so that the obtained antigen could be used to immunize 36 rabbits. The antibodies taken from the rabbits as well as 30 samples of human sera with fascioliasis were tested with CIEP method. In the present study, fraction 2 antigen of fasciola hepatica's cuticles showed 90.9% sensitivity and 94.4% specificity in CIEP test. The above-mentioned antigen which was identified by SDS-PAGE method had one distinct band of 60 K_D, and no other band was recognized along the gel. This antigen, then, went under experiment by ELISA method which revealed that the antibody in 26 out of 30 samples of human sera and all 36 rabbits was detectable and measurable.

Results: Altogether, 60 samples out of 66 including 30 human sera and 36 rabbit sera showed positive sedimentary reaction in CIEP method whereas 62 samples did so in ELISA method.

Conclusion: Therefore, it is suggested that 60 K_D antigen of fasciola worm's cuticles be used as a pure antigen in serologic tests such as ELISA and CIEP. However, the results indicate high sensitivity of ELISA method to CIEP method.

Key Words: 1) Purification 2) Antigen 3) Fasciola Hepatica 4) Fascioliasis

^{I)} Associate Professor of Parasitology. Faculty of Paramedical Sciences. Shahid Hemmat Highway. Shahid Chamran Crossroad. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)

^{II)} MS in Parasitology. Instructor. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.