

تهیه و خالص‌سازی آنتی‌ژن‌های کرم بالغ فاسیولاهپاتیکا جهت تشخیص فاسیولیازیس

چکیده

زمینه و هدف: فاسیولیازیس، یکی از بیماری‌های مهم انگلی انسان و دام است که توسط گونه‌های فاسیولا در میزبان ایجاد می‌شود. تقریباً ۲/۴ میلیون نفر در جهان به این انگل مبتلا هستند و ۱۸۰ میلیون نفر، در معرض خطر ابتلا هستند. تشخیص موقع و درمان سریع آن، از بروز عوارض بیماری در مبتلایان بطور چشمگیری جلوگیری می‌نماید. به همین جهت در مطالعه حاضر نسبت به جداسازی، خالص‌سازی و ارزیابی آنتی‌ژن مناسب و بکارگیری آن در روش‌های سرولوژیک حساس و اختصاصی اقدام شد.

روش بررسی: در این مطالعه، ابتدا کرم‌های سالم جمع‌آوری شدند، سپس کوتیکول و سایر ارگان‌های آنها تفکیک شده، آنگاه به صورت جدأگانه، هموژنیزه و سونیکه شدند. میزان پروتئین آنها به روش برادفورد اندازه‌گیری شده و کلیه نمونه‌ها، تغليظ شدند و بر روی ستمون ژل کروماتوگرافی (سفارکس G₂₀₀) برده شدند. برای هر قسمت، ۴ جزء آنتی‌ژنیک دریافت شد. آنگاه با اولترافیلتراسیون پروتئین، نمونه‌ها به میزان مناسب رسانده شدند. با آنتی‌ژن بدست آمده، راس خرگوش مخصوص شدند، آنتی سرم بدست آمده از خرگوش‌ها به همراه ۲۰ نمونه سرم انسان مشکوک به ابتلاء به فاسیولیازیس، به روش (CIEP) Counterimmuno-electrophoresis داشتند. آنتی سرم آنرا در تست CIEP نشان داد. آنگاه آنتی‌ژن مذکور با روش فاسیولا هپاتیکا، حساسیت ۹۰/۹٪ و اختصاصیت ۴/۹٪ از آن را تشخیص داد. آنگاه آنتی‌ژن مذکور با روش SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacryl amide) شناسایی شد که تنها یک باند مشخص ۶۰ کیلو Daltonی داشت؛ در طول ژل، باند دیگری مشخص نگردید؛ این آنتی‌ژن، با روش الیزا مورد آزمایش قرار گرفت. در این روش، آنتی‌بادی در نمونه سرم ۲۶ نفر از ۳۰ انسان و همه ۳۶ راس خرگوش، قابل تشخیص و اندازه‌گیری 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.

یافته‌ها: در مجموع با روش CIEP، از مجموع ۶۶ نمونه سرم (۲۰ نمونه سرم انسان و ۳۶ نمونه سرم خرگوش)، در ۶۰ مورد آنتی‌ژن حاصل از کوتیکول فاسیولا هپاتیکا) واکنش رسوبی مثبت مشاهده گردید، در حالی که با روش الیزا، ۶۲ نمونه سرم از ۶۶ نمونه، جواب مثبت داشته است.

نتیجه‌گیری: بنابراین استفاده از آنتی‌ژن ۶۰ کیلو Daltonی کوتیکول کرم فاسیولا به عنوان آنتی‌ژن خالص، در تست‌های سرولوژیک CIEP و الیزا توصیه می‌شود. نتایج حاصل، بیانگر حساسیت بالای روش الیزا نسبت به روش CIEP می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱ - خالص‌سازی ۲ - آنتی‌ژن ۳ - فاسیولا هپاتیکا ۴ - فاسیولیازیس

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

مقدمه

فاسیولیازیس، یکی از بیماری‌های مهم انگلی انسان و دام تقریباً ۲/۴ میلیون نفر در جهان به این انگل مبتلا هستند و ۱۸۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا هستند.^(۱) است که توسط گونه‌های فاسیولا در میزبان ایجاد می‌شود.

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

روشهای ایمونولوژیکی کانتراایمونوالکتروفورز و الایزا، می‌تواند به درمان سریع آن کمک نماید.

روش بررسی

در این مطالعه، کبدی‌های 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 صفراء، خارج و به داخل سرم فیزیولوژی منتقل شده و چندین بار با PBS سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. سپس کرم‌ها با $1\text{--}0/0$ مولار phosphate buffered saline (PBS) با $\text{PH}=8/2$ چندین بار شستشو داده شدند. بعد از خشک کردن کرم‌ها توسط کاغذ خشککن، به فریزر -20°C 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 $10\text{--}15$ دقیقه و با شدت ۵۰ کیلو هرتز، عمل سونیکاکسیون روی نمونه‌ها انجام گرفت، بطوری که کلیه سلولها، متلاشی شده و ماکرومولکولها، آزاد گردیدند.^(۱) آنگاه برای خارج کردن چربی، آنها را در دکانتور با 3 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 2 لوله تخیله، 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 $1377\text{--}78$ 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 آلوگی، شدیداً دچار اختلالات متابولیسمی و کبدی می‌شوند و بازدهی اقتصادی نخواهند داشت.^(۲)

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، چنان 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 فاسیولیازیس هرساله 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 پلی‌اکریل‌آمید و

بررسی آنتیژن‌ها با روش‌های کانترايمونوالکتروفورز انجام شد.^(۱۰) تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها به روش دودسیل سولفات پلی‌آکریل‌آمیدرژال‌الکتروفورز انجام شد.^(۱۱) از تست ELISA (Enzyme linked Immuno sorbent assay) برای تشخیص و تیتراسیون آنتیژن‌های کوتیکول و سایر ارگان‌های فاسیولولاپاتیکا استفاده شد.^(۱۲) آنگاه برای ارزیابی آنتیژن‌های تهیه شده، اقدام به تهیه سرمه‌های 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 عالیم بالینی، مشکوک به فاسیولولاپودن و در آزمایش مدفوع تعدادی از آنها، تخم کرم مشاهده شده بود.^(۱۲)

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.

نتایج

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

جزء یک کوتیکول فاسیولولاپاتیکا 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 کوتیکول فاسیولولاپاتیکا با ۲۸ نمونه(٪/۹۳/۳) سرم افراد مشکوک به ابتلا به فاسیولیازیس 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 کوتیکول فاسیولولاپاتیکا 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 موردنظر 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.

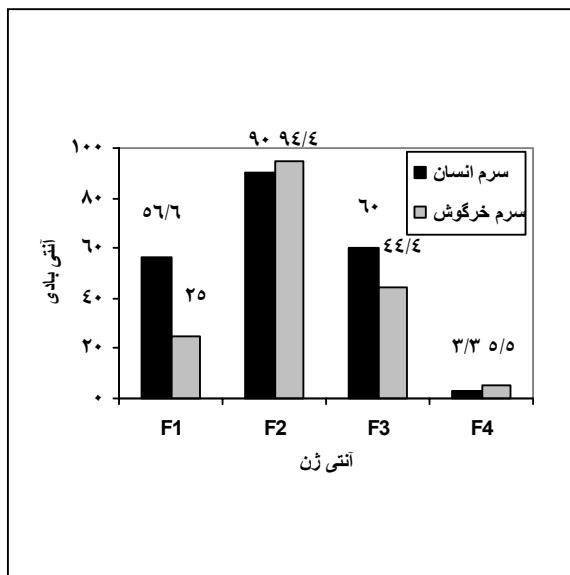
نمونه‌ها با فیلتر دارای پورسایز ۱۰، ۲۰ و ۱۰۰ کیلو دالتون، فیلتر شدند. برای کوتیکول فاسیولولاپاتیکا، چهار جزء آنتیژنی، و برای سایر اندام‌ها نیز، ۴ جزء آنتیژنی بدست آمد. میزان پروتئین اجزای بدست آمده پس از تخلیص، اندازه‌گیری و برای مراحل بعدی، در یخچال نگهداری شد.^(۸) سپس خالص‌سازی نسبی آنتیژن‌ها با استفاده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

برای تهیه سرم هیبرایمیون، ۴ 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 کوتیکول و گروه دوم، با آنتیژن سایر ارگان‌های فاسیولولاپاتیکا 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 قرارداده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰RPM سانتریفیوژ 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(۳/۲٪) از نمونه سرم انسان واکنش داشته و با ۲ مورد(۵/۵٪) سرم خرگوش‌های مصنون، واکنش بسیار ضعیف داشته است(نمودار شماره ۲).

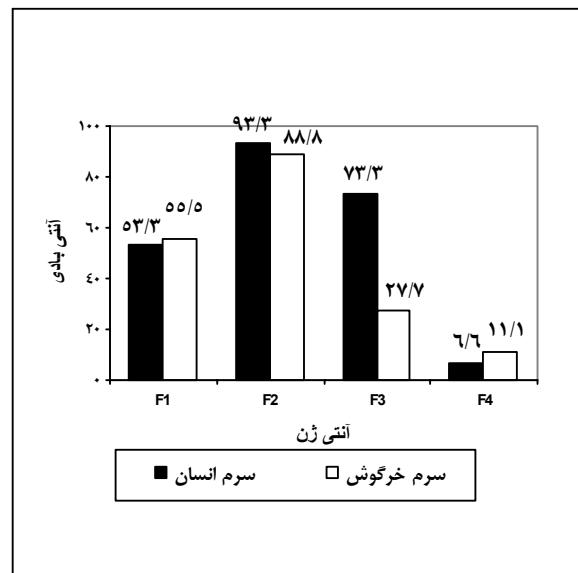


نمودار شماره ۲- ارزیابی آنتی‌ژن ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا با روش کانتر ایمونو الکتروفورز

در نمونه‌های سرم تهیه شده، ۱۵ روز بعد از آخرین تزریق، هیچ‌گونه واکنش رسوی به روش CIEP وجود نیامد، ضمناً کلیه نمونه‌های تهیه شده از خرگوش‌ها قبل از تزریق آنتی‌ژن‌های آماده شده، با آنتی‌ژن‌های مورد آزمایش، هیچ‌گونه واکنش رسوی نداشته‌اند(نمودار شماره ۲). همچنین جهت تعیین میزان حساسیت روش CIEP رقت‌های سریال دوتایی ۱:۸، ۱:۶، ۱:۴، 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 رسوی مثبت بوده است. البته بهترین قوس رسوی در رقت ۱:۱۶ بدست گرفته شده در این آزمایش، اجزا خالص شده فاسیولا هپاتیکا بوده است. آمد(شکل شماره ۱).

خرگوش‌های مصنون 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 ایمونو الکتروفورز

جزء یک سایر ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا در ۱۷ مورد(۵/۶٪) از ۳۰ نمونه سرم بیماران مشکوک به ابتلا و ۹ مورد(۲۵٪) سرم خرگوش از ۳۶ نمونه، واکنش رسوی مثبت داشته است و این آنتی‌ژن با ۶ نمونه سرم گروه شاهد، واکنش مثبت کاذب داشته است.

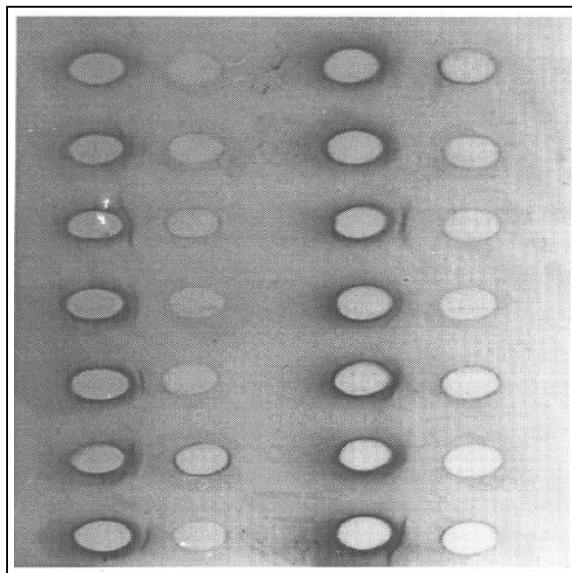
جزء دو سایر ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا با ۲۷ نمونه(۹۰٪) سرم افراد مشکوک به ابتلا و ۳۴ نمونه(۹۴/۴٪) سرم خرگوش‌های مصنون از ۳۶ مورد، واکنش رسوی مثبت داشته و در ۵ مورد، واکنش مثبت کاذب با سرم گروه شاهد داشته است.

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، $\frac{90}{9}$ % و اختصاصیت آن، $\frac{94}{4}$ % نشان داده شد. جزء سوم آنتی ژن کوتیکول فاسیولاهپاتیکا از ارزش اخباری مثبت $\frac{88}{8}$ % و ارزش اخباری منفی $\frac{48}{4}$ % برخوردار بود. جزء چهارم آنتی ژن کوتیکول فاسیولاهپاتیکا با حساسیت $\frac{90}{9}$ %؛ قادر ارزش آنتی ژنیک در تست سرولوژیک CIEP بوده است.

نتایج نشان می دهد که در آنتی ژن های سایر اندام های Fasیولاهپاتیکا که به وسیله ژل کروماتوگرافی G₂₀₀ جداسازی شده بودند، بهترین نتایج را جزء ۲(F.2) داشته است که حساسیت آن، $\frac{92}{4}$ % و اختصاصیت آن، $\frac{86}{1}$ % بوده است. البته در محاسبات آماری بعدی، ارزش اخباری منفی آن نسبتاً مناسب بوده و رقمی برابر $\frac{86}{1}$ % را نشان می دهد و ارزش اخباری مثبت این جزء، بالا و برابر $\frac{92}{4}$ % بود که برای تست های CIEP دارای ارزش می باشد.

جزء یک سایر اندام های کرم Fasیولاهپاتیکا نیز نتایج خوبی نداشته است و ارزش اخباری منفی آن، $\frac{42}{8}$ % بوده است. جزء سه سایر اندام های کرم Fasیولاهپاتیکا نیز دارای ارزش اخباری منفی $\frac{50}{7}$ % بوده است. جزء چهارم سایر اندام های کرم Fasیولاهپاتیکا نیز با ارزش اخباری منفی $\frac{36}{6}$ % و حساسیت $\frac{4}{5}$ %؛ قادر 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 کانترايمونوكتروفورز

با توجه به محاسبات آماری، ارزش اخباری مثبت (F.1) Positive Predictive Value=PPV) جزء یک کوتیکول با حساسیت $\frac{54}{5}$ % و اختصاصیت $\frac{86}{1}$ % و علی رغم داشتن ارزش اخباری مثبت بالا برابر $\frac{87}{8}$ %؛ از ارزش اخباری منفی (Negative predictive value=NPV) پایین برابر $\frac{8}{50}$ % برخوردار بود. جزء دوم کوتیکول Fasیولاهپاتیکا نیز از ارزش اخباری مثبت $\frac{96}{7}$ % و ارزش اخباری منفی $\frac{85}{8}$ %

جدول شماره ۱- ارزیابی Fasیولاهپاتیکا با روش کانترايمونوكتروفورز از نظر حساسیت و اختصاصیت

نتیجه آزمایش	سرم آلووده انسان								نتیجه آزمایش
	سرم کنترل خرگوش		سرم این خرگوش		سرم آلووده انسان		سرم کنترل خرگوش		
مثبت	مثبت	-	+	-	+	-	+	-	+
آنتی ژن کوتیکول Fasیولاهپاتیک(۱)	۳۶	۲۱	۵	۱۶	۲۰	۱۴	۱۶	۱۶	۱۶
آنتی ژن کوتیکول Fasیولاهپاتیک(۲)	۶۰	۲۴	۲	۴	۲۲	۲	۲۸	۲	۲۸
آنتی ژن کوتیکول Fasیولاهپاتیک(۳)	۲۲	۲۲	۴	۲۶	۱۰	۸	۲۲	۸	۲۲
آنتی ژن کوتیکول Fasیولاهپاتیک(۴)	۶	۳۶	۰	۳۲	۴	۲۸	۲	۲	۲۸
آنتی ژن ارگان Fasیولاهپاتیک(۱)	۲۶	۲۰	۶	۲۷	۹	۱۳	۱۷	۱۷	۱۷
آنتی ژن ارگان Fasیولاهپاتیک(۲)	۶	۲۱	۵	۲	۳۴	۳	۲۷	۳	۲۷
آنتی ژن ارگان Fasیولاهپاتیک(۳)	۳۴	۲۳	۲	۲۰	۱۶	۱۲	۱۸	۱۲	۱۸
آنتی ژن ارگان Fasیولاهپاتیک(۴)	۳	۳۶	۰	۳۴	۲	۲۹	۱	۱	۲۹

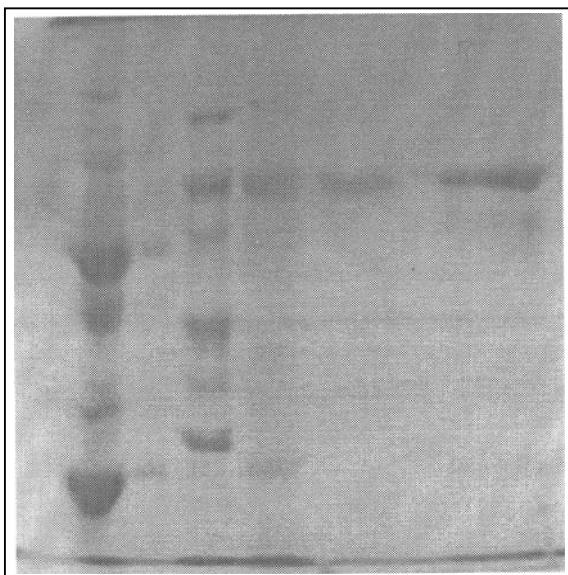
ادامه جدول شماره ۱

نتیجه آزمایش	منفی کاذب	منفی واقعی	مثبت کاذب	حساسیت	اختصاصیت	Pvalue منفی	Pvalue مثبت
آنتیژن کوتیکول فاسیولولا فراکشن(۱)	۳۰	۲۱	۵	.۵۴/۵	.۸۷/۱	.۵۰/۸	.۸۷/۸
آنتیژن کوتیکول فاسیولولا فراکشن(۲)	۶	۳۴	۲	.۹۰/۹	.۹۴/۴	.۸۵	.۹۶/۷
آنتیژن کوتیکول فاسیولولا فراکشن(۳)	۳۴	۲۲	۴	.۴۸/۴	.۸۸/۸	.۴۸/۴	.۸۸/۸
آنتیژن کوتیکول فاسیولولا فراکشن(۴)	۶۰	۳۶	۰	.۱۰۰	.۱۰۰	.۳۷/۵	.۱۰۰
آنتیژن ارگان فاسیولولا فراکشن(۱)	۴۰	۳۰	۶	.۴۲/۸	.۸۳/۳	.۸۶/۱	.۸۱/۲
آنتیژن ارگان فاسیولولا فراکشن(۲)	۵	۲۱	۰	.۸۶/۱	.۸۷/۱	.۹۲/۴	.۹۲/۴
آنتیژن ارگان فاسیولولا فراکشن(۳)	۲۲	۲۳	۲	.۹۱/۶	.۵۱/۵	.۵۰/۷	.۹۱/۸
آنتیژن ارگان فاسیولولا فراکشن(۴)	۶۳	۳۶	۰	.۳۶/۶	.۱۰۰	.۱۰۰	.۱۰۰

R: Real حقيقة P: Positive مثبت Sens: Sensitivity حساسیت

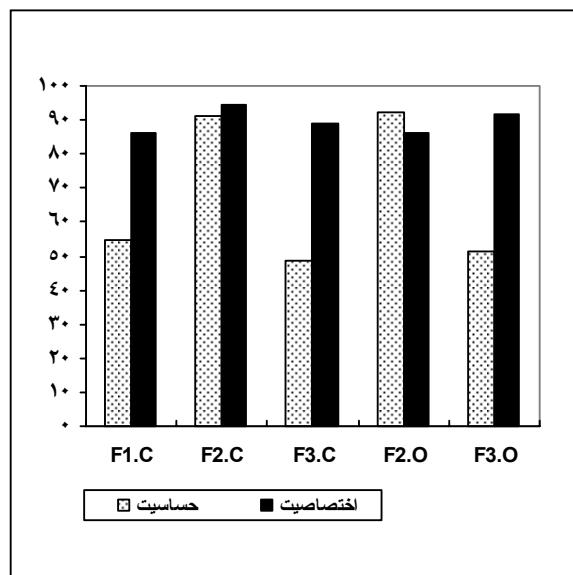
F: False کاذب N: Negative منفی Spec: Specificity اختصاصیت

نتایج حاصل از انتقال آنتیژن های خالص شده فاسیولولا هپاتیکا روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز در حضور سدیم دودسیل سولفات در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



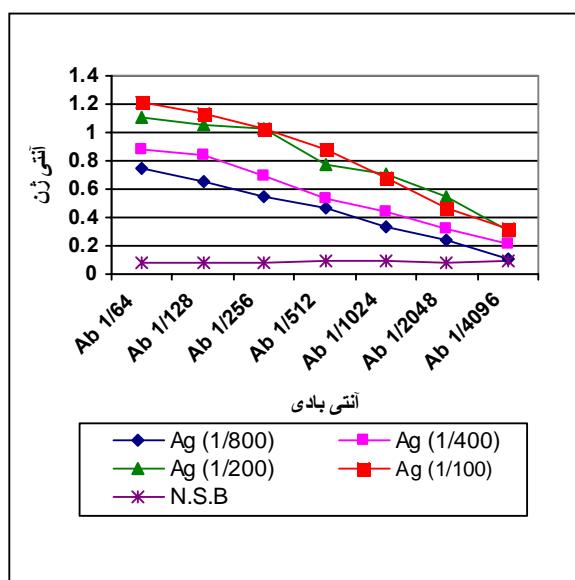
شکل شماره ۲- الکتروفورز اجزای مختلف آنتیژنیک فاسیولولا هپاتیکا با روش SDS-PAGE

همانطوری که مشاهده می شود، جزء (۱) آنتیژن های حاصل از ژل کروماتوگرافی با سفادکس G_{200} با در نظر گرفتن منحنی استاندارد، در سه نقطه، به ترتیب در موقعیت ۱۷، ۴۳ و ۱۴ کیلو دالتون، باند رسوبی تشکیل دادند. ضمناً موقعیت این باندها در مورد کوتیکول و سایر اندام های کرم فاسیولولا هپاتیکا کاملاً شبیه به هم است. جزء (۲)



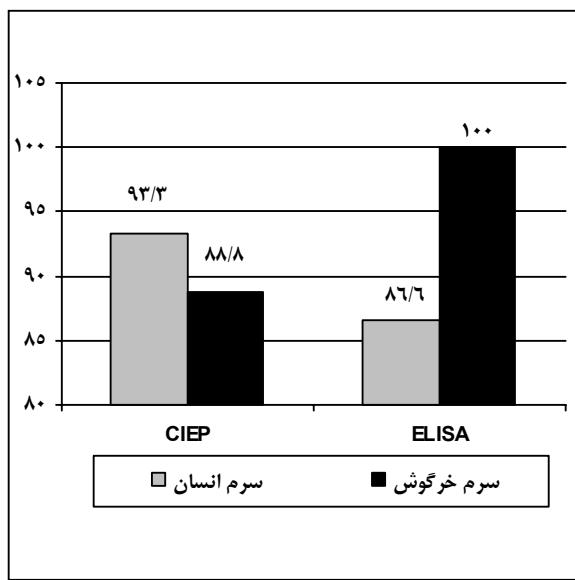
نمودار شماره ۳- ارزیابی فاسیولولا هپاتیکا با روش کانتر ایمونوالکتروفورز از نظر حساسیت و اختصاصیت

این آزمایش نشان می دهد که نتایج جزء ۲ کوتیکول و سایر ارگان های فاسیولولا هپاتیکا، اختلاف معنی دار آماری نشان نمی دهدند. به دنبال دستیابی به نتایج بسیار مطلوب، اجزاء آنتیژنیک خالص شده کوتیکول فاسیولولا هپاتیکا در آزمایش CIEP و اختصاصیت و حساسیت بسیار بالای این آنتیژنها در تشخیص و اندازه گیری آنتی بادی در سرم خرگوش های مصنون شده و سرم بیماران مشکوک به ابتلاء به فاسیولیازیس، به همراه آنتیژن سایر ارگان های حاصله از ژل کروماتوگرافی ستونی (G_{200})، جهت تعیین وزن مولکولی و تعیین خلوص، مورد آزمایش قرار گرفتند.



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

نتایج مقایسه روش الایزا 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 الایزا با روش کانترایمونوالکتروفورز

کوتیکول و سایر ارگان‌های فاسیولا هپاتیکا در موقعیت ۶۰ کیلو دالتون یعنی بین دو وزن مولکولی نمونه استاندارد ۴۲ 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 فاسیولا هپاتیکا باندهای ضعیف در موقعیت ۴ و ۱۲ کیلودالتون داشتند.

با استفاده از الکتروفورز و بکارگیری پلی آکریل آمید 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 $\text{pH} = ۹$ 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 اپتیمم برای رقت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به ترتیب ذیل عمل شد: آنتی‌ژن با رقت‌های ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰ و ۱:۸۰۰ تهیه شد و سرم انسانی نیز با رقت‌های ۱:۶۴، ۱:۱۲۸، ۱:۲۵۶، ۱:۵۱۲، ۱:۱۰۲۴، ۱:۲۰۴۸ و ۱:۴۰۹۶ مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایش فوق توسط دستگاه الایزا 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 (Optical density) OD 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 الایزا می‌توانند کاربرد داشته باشند.

از تعداد ۲۰ نمونه سرم مربوط به انسان، تعداد ۲۶ مورد با روش الایزا و با آنتی‌ژن جزء ۲ کوتیکول فاسیولا هپاتیکا و ۳۶ سرم مربوط به خرگوش‌های مصنوع شده با این آنتی‌ژن، جواب مثبت داشتند.

بحث

امکان دستیابی به آنتی‌بادی اختصاصی در کلیه خرگوش‌های مصون شده، بوده است، در حالی که نمونه سرم همین خرگوش‌ها قبل از تزریق نمونه آنتی‌ژن با همین روشها، هیچ گونه واکنش مثبت نداشته‌اند. رایموند نیز میزان حساسیت این روشها را با آنتی‌ژن جزء ۲ حاصل از ژل کروماتوگرافی با سفادکس G₂₀₀، ۹۰٪ اعلام نموده است.^(۱۸ و ۱۹)

روش ELISA بکار گرفته شده در طی مراحل انجام کار و ماحصل آن، روشنی است که با coat نمودن آنتی‌ژن در هر چاهک و استفاده از آنتی‌بادی اولیه ایجاد شده در خرگوش و مقادیر آنتی‌ژنیک مشخص، به صورت غیر مستقیم انجام گرفته است و در مطالعات متعددی از این روش استفاده شده است که شماهی کلی آن مشابه روش انجام عمل در این تحقیق می‌باشد.^(۱۹ و ۲۰)

یافته‌های حاصل از این پژوهش در کمک به بهبود وضعیت بهداشتی کشور در تشخیص بموقع فاسیولیازیس انسانی می‌تواند قابل استفاده باشد. علی‌رغم اینکه جمع‌آوری نمونه‌های آلوده از کشتارگاه‌ها و تهیه سرم انسان‌های بیمار می‌تواند محدودیت‌هایی را در پژوهش ایجاد نماید.

نتیجه‌گیری

بنابراین استفاده از آنتی‌ژن ۶۰ کیلوالتونی کوتیکول کرم فاسیولا به عنوان آنتی‌ژن خالص در تست‌های سرولوژیک CIEP و الیزا توصیه می‌شود و نتایج حاصله، بیانگر حساسیت بالای روش الیزا نسبت به روش CIEP می‌باشد.

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 نویسندها مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که در روش ژل کروماتوگرافی، ۴ جزء آنتی‌ژنیک برای کوتیکول و سایر اندام‌های کرم فاسیولا هپاتیکا جمع‌آوری شده است که جزء ۲ کوتیکول فاسیولا هپاتیکا، بهترین نتایج را از نظر اختصاصیت و حساسیت داشته است و این فرآکشن نسبت به فرآکشن ۳ نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌داری 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 اندازه‌گیری آنتی‌بادی با روش‌های کانتراایمونوکتروفورز و الیزا، به عنوان آنتی‌ژن خالص معرفی نمودند.^(۲۱ و ۲۲)

در مطالعه‌ای توسط سدرار، جزء ۲ به عنوان یک آنتی‌ژن خالص معرفی شده است^(۲۳)، که بررسی اخیر نیز این نتیجه را به همراه دارد. یافته دیگر این تحقیق بیانگر این مطلب است که جزء ۲ (فرآکشن ۲) با وزن مولکولی حدود ۶۰ کیلو دالتون در الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۳٪ در حضور دودسیل سولفات، ضمن داشتن حساسیت بالا، بیش از ۹۴/۴٪ اختصاصیت داشته که بررسی پتری سیا و دژورگولاس نیز آنتی‌ژن‌هایی با وزن مولکولی بالای ۵۵ و کمتر از ۶۰ کیلو دالتون را که عموماً در فرآکشن ۲ ژل کروماتوگرافی جمع‌آوری می‌شوند، به عنوان بهترین آنتی‌ژن از نظر داشتن اختصاصیت و حساسیت بالا معرفی نمودند.^(۲۴ و ۲۵)

همچنین بعضی از محققین نیز در بررسی‌های انجام شده، روش الیزا را دارای حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۳٪ ذکر نموده‌اند.^(۲۶) تحقیقات ملونگ و همکاران نیز حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی این تست را به ترتیب ۹۸/۲٪، ۹۷/۴٪ و ۹۷/۹٪ گزارش نمودند.^(۲۷)

در این تحقیق، آزمایش آنتی‌ژن‌ها 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، بیشتر است و توانایی تحریک سیستم ایمنی توسط آنتی‌ژن کوتیکول، از سایر اندام‌ها بیشتر 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 identification 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* copro-antigen in 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 circulating 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.
- 1- مسعود جعفر، وضعیت آلوگی های کرمی در ایران، سومین کنگره سراسری انگلشناسی 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 Egyption 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 hepatica*, 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 rabbits. 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*

/
*F. Maleki, PhD//
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.