مقایسه آنتی‌ژن‌های خام *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* به‌وسیله آزمایش الیزا

محمد مؤذنی*
شری نیواس شارما گائور

گروه پاتوبیولوژی

دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

چکیده

زمینه و هدف: تشخیص زودهنگام فاسیولوزیس در پیشگیری و کنترل بیماری اهمیت زیادی دارد. دو گونه مولد این بیماری یعنی *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* از نظر ریخت‌شناسی با یکدیگر شباهت‌های زیادی دارند اما در بعضی از ویژگی‌ها متفاوتند. در این مطالعه وجود یا عدم تشابه بین آنتی‌ژن‌های خام دفعی- ترشحی و سوماتیک دو گونه انگل با آزمایش الیزا بررسی شد. ***روش بررسی:*** آنتی‌ژن‌های خام هر دو گونه (اعم از دفعی- ترشحی و سوماتیک) تهیه و تا زمان استفاده در برودت ^{c}۲۰- نگهداری شد. در تهیه آنتی سرم، آنتی‌ژن‌ها با دوز افزایشی ml ۲/۵-۰/۵ در پنج نوبت و به‌فاصله هفت روز به خرگوش‌های آزمایشگاهی تزریق شد. ده روز پس از آخرین تزریق، خون‌گیری و نمونه‌های سرم پس از جداسازی، تا زمان استفاده در برودت ^{c}۲۰- نگهداری شد. واکنش آنتی‌ژن‌های خام هرگونه با آنتی‌سرم خود (همولوگ) و نیز آنتی‌سرم گونه دیگر (هترولوگ) با روش الیزا بررسی و مقادیر الیزا (OD) ثبت شد. ***یافته‌ها:*** مقادیر الیزا هنگام واکنش آنتی‌ژن‌های هرگونه با آنتی‌سرم گونه دیگر در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد که آنتی‌ژن‌های هر گونه با آنتی‌سرم گونه دیگر واکنش قوی نشان می‌دهد یعنی بسیاری از مواد آنتی‌ژنیک دو گونه مشابهند و در آزمایش الیزا واکنش متقاطع وجود دارد. از طرفی آنتی‌ژن‌های *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* با آنتی‌سرم خود واکنش قوی‌تری را در مقایسه با آنتی‌سرم یکدیگر نشان دادند و علی‌رغم وجود تشابه بین بسیاری از مواد آنتی‌ژنیک دو گونه، برخی از این مواد با یکدیگر متفاوتند. ***نتیجه‌گیری:*** تفاوت‌های موجود بین مواد آنتی ژنیک *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* در حدی نیست که مانع از واکنش متقاطع بین دوگونه انگل در آزمایش الیزا بشود و تحقیقات بیشتر برای شناسایی، جداسازی و تخلیص مواد آنتی‌ژنیک هرگونه توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: واکنش متقاطع، آنتی‌ژن *فاسیولا هپاتیکا*، *فاسیولا ژیگانتیکا*.

* نویسنده مسئول: شیراز، دانشکده دامپزشکی، گروه *پاتوبیولوژی*، بخش انگل شناسی، صندوق پستی: ۱۷۳۱
تلفن: ۲۲۸۶۹۵۰ داخلی (۸۶۸۷)
email: moazeni@shirazu.ac.ir

مقدمه

بیماری فاسیولیازیس (Fascioliasis) یکی از بیماری‌های نو پدید مشترک بین انسان و حیوانات است که در حال حاضر حدود ۲/۴ میلیون نفر در سراسر جهان به آن آلوده‌اند.[۱] امروزه آلودگی ناشی از انگل *فاسیولا (Fasciola)* به‌وسیله مواد غذایی اهمیت ویژه‌ای یافته است. تعداد افراد تحت مخاطره در جهان بیش از ۱۸۰ میلیون نفر برآورد می‌شود. بالاترین میزان آلودگی انسان از بولیوی، چین، اکوادور، مصر، فرانسه، ایران، پرو و پرتغال گزارش شده است.[۲] در سال ۱۹۸۸ میلادی موردی از شیوع بیماری در انسان در استان گیلان اتفاق افتاد که وسیع‌ترین مورد در جهان در نظر گرفته شد. بیماری در فوریه ۱۹۸۸ شروع شده، به‌مدت ۱۸ ماه به‌طول انجامید و حدود ۱۰۰۰۰ نفر را مبتلا ساخت.[۳] آلودگی انسان با این انگل با تخریب گسترده بافت کبد و مجاری صفراوی و همچنین خون‌ریزی و آتروفی عروق پورتال همراه است. علاوه بر آسیب‌های مکانیکی، در صورت حساس شدن میزبان در مقابل مواد متابولیکی مترشحه از انگل، واکنش‌های التهابی نیز اتفاق می‌افتد. علائم اولیه شامل سردرد شدید، کمر درد، احساس سرما و تب می‌باشد در موارد پیشرفته بیماری، کبد بزرگ و شکننده یا سیروزی می‌شود و فرد مبتلا اسهال و کم‌خونی دارد.[۴] تشخیص زودهنگام بیماری در کنترل و پیشگیری از آن اهمیت بسزایی دارد. آزمایش مدفوع قابل اعتمادترین راه تشخیص آلودگی به کرم‌های بالغ است اما با این روش نمی‌توان آلودگی به کرم‌های نابالغ مهاجر در پارانشیم کبد را تشخیص داد.[۵] آسیب‌رسانی کرم‌های نابالغ

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

دو هفته پس از آلودگی اتفاق می‌افتد درحالی‌که با آزمایش مدفوع، تشخیص تنها ۱۴-۱۰ هفته پس از آلودگی یعنی زمانی که تخم‌های انگل از طریق مدفوع خارج می‌شوند، امکان‌پذیر است.[۶] تشخیص زودهنگام بیماری فاسیولوزیس با استفاده از روش الیزا (Enzyme linked immunosorbent assay) در دام‌ها و انسان امکان‌پذیر است. در این صورت قبل از آسیب دیدن کبد، با درمان زودهنگام می‌توان آسیب‌های ناشی از بیماری را به حداقل رساند.[۷] الیزا روشی حساس و کاربردی برای تشخیص بیماری است. این آزمایش دو هفته پس از آلودگی‌مثبت و بعداز درمان منفی می‌شود.[۸] هر دوگونه *فاسیولا هپاتیکا (Fasciola hepatica)* و *فاسیولا ژیگانتیکا (F. gigantica)* در انسان شایع بوده و عفونت توأم دو گونه غیر متداول نیست.[۳] این دو گونه از نظر ریخت‌شناسی و چرخه زندگی با یکدیگر شباهت‌ها و تفاوت‌هایی دارند. با توجه به اهمیت روش الیزا در تشخیص زودهنگام بیماری فاسیولیازیس، هدف از انجام مطالعه حاضر مقایسه آنتی ژن‌های خام (Crude antigens) این دو گونه (اعم از آنتی ژن‌های سوماتیک و دفعی- ترشحی) با یکدیگر است به عبارت دیگر وجود یا عدم وجود واکنش متقاطع آنتی ژن بین دو گونه انگل با استفاده از روش الیزا مورد بررسی قرار گرفته است با توجه به متفاوت بودن روش انتقال و کنترل بیماری در دو گونه انگل، تشخیص تفریقی دو گونه از اهمیت زیادی برخوردار است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی آزمایشگاهی بود. پس از تولید آنتی سرم بر علیه آنتی ژن‌های خام هر دو گونه انگل در خرگوش‌های آزمایشگاهی، واکنش بین آنتی ژن‌های خام هر گونه با آنتی سرم تولید شده علیه گونه دیگر در آزمایش الیزا مورد بررسی قرار گرفته است. مراحل انجام کار به‌صورت خلاصه به‌شرح زیر می‌باشد: کرم‌های بالغ *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* از مجاری صفراوی گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه جمع‌آوری و در داخل سرم فیزیولوژی به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل شد. برای تهیه آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی (Excretory- secretory antigens)، کرم‌های زنده پس از آنکه چندین بار در محلول Phasphate Buffer Saline (PBS) (مولاریته ۰/۰۱ و PH=۷/۲) شستشو داده شدند، به‌مدت شش ساعت در حرارت ^{oc} ۳۷ در محلول PBS قرار گرفتند (۲۰ کرم در PBS ۴۰ml)، مایع به‌دست آمده که محتوی مواد دفعی- ترشحی کرم‌ها بود، به‌مدت ۳۵ دقیقه سانتریفوژ شد (۲۷۰۰۰g، ^{oc} ۴)، مایع رویی تا زمان استفاده در برودت ^{oc} ۲۰- نگهداری شد. برای تهیه آنتی ژن‌های سوماتیک (Somatic antigens)، کرم‌های تازه پس از شستشو ابتدا در هاون چینی کاملاً صلایه شده و در محلول PBS (یک کرم در سه میلی‌لیتر) به‌صورت هموژنیزه در آمدند، سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در شرایط سرد سونیکه شدند. محلول حاصله به‌مدت ۳۵ دقیقه سانتریفوژ شد (۲۷۰۰۰g، ^{oc} ۴) و مایع سطحی تا زمان استفاده در برودت ^{oc} ۲۰- نگهداری شد. پروتئین موجود در نمونه‌های آنتی ژنی به‌وسیله روش لوری و همکاران اندازه‌گیری شد.[۱۴] برای تهیه آنتی سرم از ۱۵ راس خرگوش سفید آزمایشگاهی سالم و به‌وزن ۲/۲-۲ کیلوگرم استفاده شد. ابتدا خرگوش‌ها به پنج گروه سه تایی تقسیم شدند. گروه‌های یک تا چهار به‌ترتیب جهت تهیه آنتی سرم بر علیه آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی و *سوماتیک فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* مورد استفاده قرار گرفتند و گروه پنج به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. آنتی ژن‌های مورد نظر با غلظت پروتئین دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر و به‌صورت زیر جلدی تزریق شدند. آنتی ژن‌ها با دوز افزایشی ۰/۵ تا ۲/۵ میلی‌لیتر در پنج نوبت و به‌فاصله هفت روز به هر خرگوش تزریق شدند. در تزریق اول همراه با آنتی ژن از ادجوان کامل فروند (Complete Ferund 's adjuvant،Difco Laboratories, USA) و در تزریق دوم از ادجوان غیر کامل فروند (Incomplete Freund's adjuvant) با حجم مساوی با حجم آنتی ژن استفاده شد.[۱۰و۱۱] ده روز پس از آخرین تزریق عمل خون‌گیری از قلب خرگوش‌ها انجام شد، پس از جدا سازی سرم در شرایط استریل، سرم‌ها تا زمان استفاده در برودت نگهداری شدند. سرم خرگوش‌های گروه پنج نیز به‌طور همزمان تهیه شد تا به‌عنوان کنترل منفی در آزمایشات مورد استفاده قرار گیرد. آزمایش الیزا با استفاده از پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای و با روش‌های Martinez، Hillyer، Fagbemi، Mbuh، Fagbemi، Ferre و همکاران و به‌شرح زیر انجام شد.[۷و۱۲-۱۵] از بافر کربنات بی‌کربنات با PH=۹/۶ به‌عنوان بافر پوشاننده Coating buffer استفاده شد. ابتدا غلظت پروتئین آنتی ژن‌ها با استفاده از این بافر به ۲۰µg/ml رسانده شد، سپس ۱۰۰ µl از آنتی ژن رقیق شده در هریک از حفرات پلیت‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به‌مدت یک ساعت در ^{oc} ۳۷ و سپس ۱۸ ساعت در ^{oc} ۴ قرار گرفتند. پس از تخلیه، شستشوی حفرات با

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

استفاده از PBS (۰/۰۱ مولار و PH=۷/۲) محتوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (Tween 20) در چهار نوبت انجام شد (در کلیه مراحل آزمایش عمل شستشو با همین محلول و در چهار نوبت انجام شد). عمل بلوکینگ با استفاده از محلول PBS/T محتوی یک در صد آلبومین سرم گاو (ICN Farmaceutical Inc) انجام شد. در این مرحله ۱۰۰µl از محلول بلوک‌کننده به‌داخل هر حفره ریخته شد و پلیت‌ها به‌مدت یک ساعت در ^{o}c ۳۷ قرار گرفتند. سپس عمل تخلیه و شستشوی حفرات انجام شد. ابتدا مخلوطی از سرم سه خرگوش ایمن شده در هر گروه تهیه شد. سرم‌های حاصله با استفاده از PBS/T به‌میزان ۱: ۴۰۰ رقیق شده و ۱۰۰µl از آن‌ها در هر حفره ریخته شد. پس از نگهداری پلیت‌ها در ^{o}c ۳۷ به‌مدت یک ساعت، عمل تخلیه و شستشوی حفرات انجام شد. مخلوطی از سرم سه خرگوش گروه پنج نیز به‌همین صورت رقیق شده و به‌عنوان کنترل منفی در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا آنتی بادی کونژوگه (Goat anti rabbit immunoglobulines conjugated horseradish peroxidase, Dako A/S, Denmark) در محلول PBS/T به‌میزان ۱: ۲۰۰۰ رقیق شده، سپس ۱۰۰µl از آن در حفرات مورد نظر ریخته شد. پس از یک ساعت نگهداری پلیت‌ها در ^{o}c ۳۷، تخلیه و شستشوی حفرات انجام شد. از پودر OPD (Orthophenylen diamine, Merck, Germany) به‌عنوان سوبستر استفاده شد، محلول سوبستر با حل کردن 5mg پودر OPD و ۲۵ میکرولیتر H_2O_2 (Merck, Germany) در ۱۲/5ml از PBS تهیه شد. ۱۰۰µl از این محلول به‌داخل هر حفره ریخته شد و پلیت‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اطاق و در محل تاریک قرار گرفتند. این عمل با افزودن ۵۰µl اسید سولفوریک ۱۲/۵ درصد (Merck, Germany) به‌داخل هر حفره انجام شد. Optical Density (OD) حفره‌ها به‌وسیله دستگاه قرائت الیزا (ELISA Reader, Dynatech, USA) در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد.

یافته‌ها

واکنش بین آنتی ژن‌های دفعی ترشحی و سوماتیک *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* با آنتی سرم‌های هومولوگ و هترولوگ آنان در آزمایش الیزا مورد آزمایش قرار گرفت. مقادیر OD در واکنش بین آنتی ژن‌ها و آنتی سرم‌ها در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است.

جدول-۱: مقادیر OD در واکنش بین آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی گونه‌های انگل *فاسیولا* با آنتی سرم‌های هومولوگ و هترولوگ آنان

آنتی ژن	آنتی سرم *فاسیولا هپاتیکا*	آنتی سرم *فاسیولا ژیگانتیکا*	کنترل منفی
فاسیولا هپاتیکا	۰/۷۹	۰/۶۷	۰/۰۲
فاسیولا ژیگانتیکا	۰/۵۶	۰/۷۲	۰/۰۱

جدول-۲: مقادیر OD در واکنش بین آنتی ژن‌های سوماتیک گونه‌های انگل *فاسیولا* با آنتی سرم‌های هومولوگ و هترولوگ آنان

آنتی ژن	آنتی سرم *فاسیولا هپاتیکا*	آنتی سرم *فاسیولا ژیگانتیکا*	کنترل منفی
فاسیولا هپاتیکا	۰/۹۴	۰/۶۶	۰/۰۳
فاسیولا ژیگانتیکا	۰/۸۲	۰/۹۵	۰/۰۲

بحث

جنس *فاسیولا* دارای دو گونه اصلی *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* می‌باشد. این دو گونه از نظر ریخت‌شناسی در بعضی از ویژگی‌ها مشابهند و در بعضی از ویژگی‌ها نیز با یکدیگر تفاوت دارند. با توجه به اهمیت روش‌های سرولوژیک در تشخیص زود هنگام بیماری فاسیولوزیس در این تحقیق تلاش شده تا آنتی ژن‌های خام دفعی- ترشحی و همچنین سوماتیک دو گونه انگل با یکدیگر مقایسه شود و وجود یا عدم وجود واکنش متقاطع بین آنتی ژن‌های یک گونه با آنتی سرم گونه دیگر در آزمایش الیزا مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱ آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی گونه *فاسیولا هپاتیکا* با آنتی سرم تهیه شده برعلیه آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی گونه *فاسیولا ژیگانتیکا* واکنش قوی نشان داده‌اند (۳۳/۵ بار قوی‌تر از واکنش با سرم کنترل منفی). آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی *فاسیولا ژیگانتیکا* نیز با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی *فاسیولا هپاتیکا* واکنش قوی داشته‌اند (۵۶ بار قوی‌تر از واکنش با سرم کنترل منفی). با توجه به جدول ۲ آنتی‌ژن‌های *سوماتیک فاسیولاهپاتیکا* با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی‌ژن‌های سوماتیک *فاسیولا ژیگانتیکا* واکنش قوی نشان داده است (۲۲ بار قوی‌تر از واکنش با سرم کنترل منفی). آنتی‌ژن‌های سوماتیک *فاسیولا ژیگانتیکا* نیز با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه آنتی‌ژن‌های سوماتیک *فاسیولا هپاتیکا* واکنش قوی نشان داده‌اند (۴۱ بار قوی از واکنش با سرم کنترل منفی). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مواد آنتی‌ژنیک *فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا* با یکدیگر تشابه زیادی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

دارند و در آزمایش الیزا با یکدیگر واکنش متقاطع نشان می‌دهند. به‌عبارت دیگر آنتی ژن‌های هر دو گونه را می‌توان برای تشخیص آنتی بادی ایجادشده در سرم خرگوش‌های ایمن شده بر علیه گونه دیگر به‌کار برد. این نتایج با نتایج تحقیق Huang همخوانی دارد، نامبردگان نیز وجود واکنش متقاطع بین آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی دو گونه انگل را در آزمایش الیزای نقطه‌ای گزارش کرده‌اند.[۱۶] با توجه به جدول ۱ آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی *فاسیولا هپاتیکا* با آنتی‌سرم همولوگ خود واکنش قوی‌تری را در مقایسه با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی *فاسیولا ژیگانتیکا* نشان داده‌اند (۰/۷۹ در برابر ۰/۶۷). آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی *فاسیولا ژیگانتیکا* نیز با آنتی‌سرم همولوگ خود واکنش قوی‌تری را در مقایسه با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی *فاسیولا هپاتیکا* داشته‌اند (۰/۷۲ در برابر ۰/۵۶) با توجه به جدول ۲ آنتی‌ژن‌های سوماتیک *فاسیولا* هپاتیکا با آنتی سرم همولوگ خود واکنش قوی‌تری را در مقایسه با آنتی‌سرم ضد آنتی ژن‌های سوماتیک *فاسیولا ژیگانتیکا* نشان داده‌اند (۰/۹۴ در برابر ۰/۶۶)، همچنین آنتی ژن‌های سوماتیک *فاسیولا ژیگانتیکا* با آنتی‌سرم همولوگ خود واکنش قوی‌تری را در مقایسه با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های سوماتیک *فاسیولا هپاتیکا* نشان داده‌اند (۰/۹۵ در برابر ۰/۸۲). نتایج مذکور نشان می‌دهد با وجود آنکه بسیاری از مواد آنتی ژنیک هر دو گونه انگل با یکدیگر مشابهند و تفاوت‌ها به حدی نیست که مانع از وقوع واکنش متقاطع بین آنتی ژن‌های دو گونه گردد. در انسان علاوه بر دشوار بودن تفریق دو انگل از نظر ریخت‌شناسی، تشخیص دوگونه با روش‌های بالینی، پاتولوژیکی، آزمایش مدفوع و ایمنی‌شناسی امکان‌پذیر نیست[۱۷] اگرچه Itagaki و Marcilla با استفاده از روش PCR وجود تفاوت‌های ژنتیکی را بین دو گونه انگل گزارش کرده‌اند[۱۸و۱۹] اما Agatsum وجود هیبریدیزاسیون متقاطع بین گونه را تأیید نمود.[۲۰] با توجه به نتایج این مطالعه، تحقیقات بیشتر برای شناسایی، جداسازی و تخلیص مواد آنتی ژنیک موجود در هرگونه که در گونه دیگر وجود ندارد توصیه می‌شود. در صورت دست‌یابی به این مواد می‌توان از روش‌های سرولوژیک برای تشخیص آلودگی انسان یا حیوانات به بیماری ناشی از هر گونه با درجه حساسیت و ویژگی بالاتری استفاده نمود.

References

1. Dalton JP. Human Fasciolosis. Wallingford, UK: CAB International Publishing: 1999.
2. Chen MG, Mott KE. Progress in assessment of morbidity due to Fasciola hepatica infection: a review of recent literature. Trop Dis Bull 1999; 87: 1-38.
۳. ذوقی اسماعیل، یوسفی وند جلیل، حاجی خانی رامین. فاسیولیازیس انسان در برخی از کشورهای منطقه مدیترانه شرقی. زئونوزهای نوپدید و بازپدید. انتشارات قلمستان هنر، ۱۳۸۳.
4. Bogitsh BJ, Cheng TC. Visceral flukes. Human Parasitology. 2nd ed. San Diego: Academic Press: 1998.
5. Itagaki T, Ohta N, Hosaka Y, Iso H, Konishi M, Chinone S, et al. Diagnosis of Fasciola sp. infections in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay. *Nippon Juigaku Zasshi* 1989; 51: 757-64.
6. Guobadia EE, Fagbemi BO. The isolation of Fasciola gigantica-specific antigens and their use in the serodiagnosis of fasciolosis in sheep by the detection of circulating antigens. *Vet Parasitol* 1997; 68: 269-82.
7. Hillyer GV, Soler de Galanes M, Buchón P, Bjorland J. Herd evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of Fasciola hepatica infection in sheep and cattle from the Altiplano of Bolivia. *Vet Parasitol* 1996; 61: 211-20.
8. Arora DR, Arora B. Trematodes or Flukes. Medical Parasitology. CBS publishers & distributers: 2002.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
10. Banerjee DP, Singh N. Serodiagnosis of experimental Fasciola hepatica infection in lambs. *Indian Journal of Animal Sciences* 1991; 61: 268-9.
11. Maisonnave J. Standardization of a dot immunoperoxidase assay for field diagnosis of Fasciola hepatica infected cattle. *Vet Parasitol* 1999; 85: 259-68.
12. Martínez A, Martínez-Cruz MS, Martínez FJ, Gutierrez PN, Hernández S. Detection of antibodies of Fasciola hepatica excretory: secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Vet Parasitol* 1996; 62: 247-52.
13. Mbuh JV, Fagbemi BO. Antibody and circulating antigen profiles before and after chemotherapy in goats infected with Fasciola gigantica. *Vet Parasitol* 1996; 66: 171-9.
14. Fagbemi BO, Aderibigbe OA, Guobadia EE. The use of monoclonal antibody for the immunodiagnosis of Fasciola gigantica infection in cattle. *Vet Parasitol* 1997; 69: 231-40.
15. Ferre I, Ortega-Mora LM, Rojo-Vázquez FA. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical Fasciola hepatica infection in sheep. *Vet Parasitol* 1997; 68: 261-7.
16. Huang W, Zhang W, Tian E, Huang, WY, Zhang WY. Analysis of *Fasciola gigantica* excretory-secretory antigens. *Journal of Gaunxi-Agricltural University* 1997; 16: 115-24.
17. Lotfy WM, Hillyer GV. Fasciola species in Egypt. *Exp Pathol Parasitol-Sofia* 2003; 6: 1-9.
18. Itagaki T, Tsutsumi KI, Sakamoto T, Tsutsumi Y, Itagaki H. Characterization of genetic divergence among species within the genus Fasciola by PCR-SSCP. *Japanese J of Parasitology* 1995; 44: 244-7.
19. Marcilla A, Bargues MD, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between Fasciola hepatica and Fasciola gigantica. *Mol Cell Probes* 2002; 16: 327-33.
20. Agatsuma T, Arakawa Y, Iwagami M, Honzako Y, Cahyaningsih U, Kang SY, et al. Molecular evidence of natural hybridization between Fasciola hepatica and F. gigantica. *Parasitol Int* 2000; 49: 231-8.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]

Tehran University Medical Journal; Vol. 65, No. 11, Feb 2008: 1-5

Crude antigens of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using ELISA test: a comparative study

Moazeni M. *
Gaur S.N.S.

Department of Pathobiology

School of Veterinary Medicine, Shiraz University

Abstract

Background: Fasciolosis is a worldwide disease with major economic and public health consequences. Early detection of the infection is important for the prevention and control of the disease. ELISA allows for early detection of fasciolosis in man and animals. Fasciolosis is caused by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in man and domestic animals respectively. These two species have many similar morphological characteristics. In this study, the crude antigens of these two species are investigated by ELISA test.

Methods: The excretory-secretory and somatic antigens of two species were prepared from adult flukes collected from the bile ducts of sheep and stored at -20^{oC}. For the preparation of the antisera, the antigens were injected to laboratory-bred rabbits. Each rabbit received five injections at intervals of seven days, starting with 0.5 ml and ending with 2.5 ml. Ten days after the last injection, the rabbits were bled, and serum samples separated and stored at -20^{oC}. The reaction between homologous and heterologous antigens and antisera was tested by ELISA and optical densities were recorded.

Results: Excretory- secretory and somatic antigens of each species showed a strong positive reaction with the antisera of the other species. In a homologous combination of antigens and antisera, a stronger reaction was observed compared to the heterologous combination, therefore many antigenic materials of both species are the same.

Conclusion: The differences of these crude antigenic materials of *F. hepatica* and *F. gigantica* are insufficient to prevent cross reaction of two species by ELISA. Further investigations are recommended for the identification, detection and purification of antigenic material of each species to improve the specificity of this assay.

Keywords: Cross reaction, antigen, *fasciola hepatica*, *fascioln gigantica*, ELISA.

* Corresponding author: Dept of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, P.O.Box-1731
Tel: +98-711-2286950
email: moazeni@shirazu.ac.ir

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06]