

مقایسه آنتی‌ژن‌های خام فاسیولا هیاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا به وسیله آزمایش الیزا

چکیده

محمد مؤذنی*

شری نیواس شارما گائور

گروه پاتوبیولوژی

دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

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

مقدمه

بیماری فاسیولیاژیس (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*) به وسیله 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، به مدت ۱۸ ماه به طول انجامید و حدود

زمینه و هدف: تشخیص زودهنگام فاسیولوزیس در پیشگیری و کنترل بیماری اهمیت زیادی دارد. دو گونه مولد این بیماری یعنی فاسیولا هیاتیکا 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 - ترشحي و سوماتیک دو گونه انگل با آزمایش الیزا بررسی شد. روش بررسی: آنتی‌ژن‌های خام هر دو گونه (اعم از دفعی - ترشحي و سوماتیک) تهیه و تا زمان استفاده در برودت 20°C - نگهداری شد. در تهیه آنتی سرم، آنتی‌ژن‌ها با دوز افزایشی ۲/۵-۰/۵ ml در پنج نوبت و به فاصله 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 20°C - نگهداری شد. واکنش آنتی‌ژن‌های خام هرگونه با آنتی سرم خود (همولوگ) و نیز آنتی سرم گونه دیگر (هترولوگ) با روش الیزا بررسی و مقادیر الیزا (OD) ثبت شد. یافته‌ها: مقادیر الیزا هنگام واکنش آنتی‌ژن‌های هرگونه با آنتی سرم گونه دیگر در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد که آنتی‌ژن‌های هرگونه با آنتی سرم 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 هیاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا با آنتی سرم خود واکنش قوی‌تری را در مقایسه با آنتی سرم 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 آنتی‌ژنیک فاسیولا هیاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا در حدی نیست که مانع از واکنش متقاطع بین دو گونه انگل در آزمایش الیزا بشود و تحقیقات بیشتر برای شناسایی، جداسازی و تخلیص مواد آنتی‌ژنیک هرگونه توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: واکنش متقاطع، آنتی‌ژن فاسیولا هیاتیکا، فاسیولا ژیگانتیکا.

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

مابع به دست آمده که محتوی مواد دفعی - ترشحي کرم‌ها بود، به مدت ۳۵ دقیقه سانتریفوژ شد (۲۷۰۰۰g، ۴°C)، مابیع رویی تا زمان استفاده در برودت ۲۰°C- نگهداری شد. برای تهیه آنتی ژن‌های سوماتیک (Somatic antigens)، کرم‌های تازه پس از شستشو ابتدا در هاون چینی کاملاً صلايه شده و در محلول PBS (یک کرم در سه میلی‌لیتر) به صورت هموژنیزه در آمدند، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط سرد سونیکه شدند. محلول حاصله به مدت ۳۵ دقیقه سانتریفوژ شد (۲۷۰۰۰g، ۴°C) و مابیع سطحی تا زمان استفاده در برودت ۲۰°C- نگهداری شد. پروتئین موجود در نمونه‌های آنتی ژنی به وسیله روش لوری و همکاران اندازه‌گیری شد.^{۱۴} برای تهیه آنتی سرم از ۱۵ راس خرگوش سفید آزمایشگاهی سالم و به وزن ۲-۲/۲ کیلوگرم استفاده شد. ابتدا خرگوش‌ها به پنج گروه سه تایی تقسیم شدند. گروه‌های یک تا چهار به ترتیب جهت تهیه آنتی سرم بر علیه آنتی ژن‌های دفعی - ترشحي و سوماتیک فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا تریگانتیکا مورد استفاده قرار گرفتند و گروه پنج به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. آنتی ژن‌های مورد نظر با غلظت پروتئین دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر و به صورت زیر جلدی تزریق شدند. آنتی ژن‌ها با دوز افزایشی ۰/۵ تا ۲/۵ میلی‌لیتر در پنج نوبت و به فاصله 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.^{۱۱} 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 به عنوان کنترل منفی در آزمایشات مورد استفاده قرار گیرد. آزمایش الیزا با استفاده از پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای و با روش‌های Ferre, Fagbemi, Mbuh, Fagbemi, Hillyer, Martinez و همکاران و به شرح زیر انجام شد.^{۱۵-۱۲} از بافر کربنات بی‌کربنات با PH=۹/۶ به عنوان بافر پوشاننده Coating buffer استفاده شد. ابتدا غلظت پروتئین آنتی ژن‌ها با استفاده از این بافر به ۲۰ μg/ml رسانده شد، سپس ۱۰۰ μl از آنتی ژن رقیق شده در هریک از حفرات پلیت‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷°C و سپس ۱۸ ساعت در ۴°C قرار گرفتند. پس از تخلیه، شستشوی حفرات با

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 آلودگی مثبت و بعد از درمان منفی می‌شود.^۸ هر دو گونه فاسیولا هپاتیکا (*Fasciola hepatica*) و فاسیولا تریگانتیکا (*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 فاسیولوزیس، هدف از انجام مطالعه حاضر مقایسه آنتی ژن‌های خام (Crude antigens) این دو گونه (اعم از آنتی ژن‌های سوماتیک و دفعی - ترشحي) 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 به صورت خلاصه به شرح زیر می‌باشد: کرم‌های بالغ فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا تریگانتیکا از مجاری صفراوی گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه جمع‌آوری و در داخل سرم فیزیولوژی به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل شد. برای تهیه آنتی ژن‌های دفعی - ترشحي (Excretory- secretory antigens)، کرم‌های زنده پس از آنکه چندین بار در محلول Phosphate Buffer Saline (PBS) (مولاریته ۰/۰۱ و PH=۷/۲) شستشو داده شدند، به مدت شش ساعت در حرارت ۳۷°C در محلول PBS قرار گرفتند (۲۰ کرم در ۴۰ ml PBS)،

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

آنتی ژن	آنتی سرم فاسیولا هیپاتیکا	آنتی سرم فاسیولا ژیکانتیکا	کنترل منفی
فاسیولا هیپاتیکا	۰/۷۹	۰/۶۷	۰/۰۲
فاسیولا ژیکانتیکا	۰/۵۶	۰/۷۲	۰/۰۱

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

آنتی ژن	آنتی سرم فاسیولا هیپاتیکا	آنتی سرم فاسیولا ژیکانتیکا	کنترل منفی
فاسیولا هیپاتیکا	۰/۹۴	۰/۶۶	۰/۰۳
فاسیولا ژیکانتیکا	۰/۸۲	۰/۹۵	۰/۰۲

بحث

جنس فاسیولا دارای دو گونه اصلی فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیکانتیکا 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 هیپاتیکا با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی گونه فاسیولا ژیکانتیکا واکنش قوی نشان داده‌اند (۳۳/۵) بار قوی‌تر از واکنش با سرم کنترل منفی). آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی فاسیولا ژیکانتیکا نیز با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی فاسیولا هیپاتیکا واکنش قوی داشته‌اند (۵۶) بار قوی‌تر از واکنش با سرم کنترل منفی). با توجه به جدول ۲ آنتی ژن‌های سوماتیک فاسیولا هیپاتیکا با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های سوماتیک فاسیولا ژیکانتیکا واکنش قوی نشان داده است (۲۲) بار قوی‌تر از واکنش با سرم کنترل منفی). آنتی ژن‌های سوماتیک فاسیولا ژیکانتیکا نیز با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های سوماتیک فاسیولا هیپاتیکا واکنش قوی نشان داده‌اند (۴۱) بار قوی از واکنش با سرم کنترل منفی). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مواد آنتی ژنیک فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیکانتیکا با یکدیگر تشابه زیادی

استفاده از PBS (۰/۰۱ مولار و $\text{PH}=7/2$) 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 $100\mu\text{l}$ از محلول بلوک‌کننده به داخل هر حفره ریخته شد و پلیت‌ها به مدت یک ساعت در 37°C 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 به میزان ۴۰۰:۱ رقیق شده و $100\mu\text{l}$ از آن‌ها در هر حفره ریخته شد. پس از نگهداری پلیت‌ها در 37°C به مدت یک ساعت، عمل تخلیه و شستشوی حفرات انجام شد. مخلوطی از سرم سه خرگوش گروه پنج نیز به همین صورت رقیق شده و به عنوان کنترل منفی در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا آنتی بادی کوزوگه (Goat anti rabbit immunoglobulines conjugated horseradish peroxidase, Dako A/S, Denmark) در محلول PBS/T به میزان ۲۰۰۰:۱ رقیق شده، سپس $100\mu\text{l}$ از آن در حفرات مورد نظر ریخته شد. پس از یک ساعت نگهداری پلیت‌ها در 37°C ، تخلیه و شستشوی حفرات انجام شد. از پودر OPD (Orthophenylen diamine, Merck, Germany) به عنوان سوبستر استفاده شد، محلول سوبستر با حل کردن 5mg پودر OPD و 25 میکرولیتر H_2O_2 (Merck, Germany) در $12/5\text{ml}$ از PBS تهیه شد. $100\mu\text{l}$ از این محلول به داخل هر حفره ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق و در محل تاریک قرار گرفتند. این عمل با افزودن $50\mu\text{l}$ اسید سولفوریک ۱۲/۵ درصد (Merck, Germany) به داخل هر حفره انجام شد. Optical Density (OD) حفره‌ها به وسیله دستگاه قرائت الیزا (ELISA Reader, Dynatech, USA) در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد.

یافته‌ها

واکنش بین آنتی ژن‌های دفعی ترشحی و سوماتیک فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیکانتیکا با آنتی سرم‌های همولوگ 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.

فاسیولا ژینگانتیکا با آنتی سرم همولوگ خود واکنش قوی تری را در مقایسه با آنتی سرم 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 دو گونه 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^{۱۸،۱۹} اما Agatsum وجود هیبریدزاسیون 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.

دارند و در آزمایش الیزا با یکدیگر واکنش متقاطع نشان می‌دهند. به عبارت دیگر آنتی ژنهای هر دو گونه را می‌توان برای تشخیص آنتی بادی ایجادشده در سرم خرگوش‌های ایمن شده بر علیه گونه دیگر به کار برد. این نتایج با نتایج تحقیق Huang همخوانی دارد، نامبردگان نیز وجود واکنش متقاطع بین آنتی‌ژنهای دفعی ترشچی دو گونه انگل را در آزمایش الیزای نقطه‌ای گزارش کرده‌اند.^{۱۶} با توجه به جدول ۱ آنتی ژنهای دفعی - ترشچی فاسیولا هپاتیکا با آنتی سرم همولوگ خود واکنش قوی تری را در مقایسه با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژنهای دفعی - ترشچی فاسیولا ژینگانتیکا نشان داده‌اند (۰/۷۹ در برابر ۰/۶۷). آنتی ژنهای دفعی - ترشچی فاسیولا ژینگانتیکا نیز با آنتی سرم همولوگ خود واکنش قوی تری را در مقایسه با آنتی سرم تهیه شده بر علیه آنتی ژنهای دفعی - ترشچی فاسیولا هپاتیکا داشته‌اند (۰/۷۲ در برابر ۰/۵۶) با توجه به جدول ۲ آنتی‌ژنهای سوماتیک فاسیولا هپاتیکا با آنتی سرم همولوگ خود واکنش قوی تری را در مقایسه با آنتی سرم ضد آنتی ژنهای سوماتیک فاسیولا ژینگانتیکا نشان داده‌اند (۰/۹۴ در برابر ۰/۶۶)، همچنین آنتی ژنهای سوماتیک

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. فاسیولیاژیس انسان در برخی از کشورهای منطقه مدیترانه شرقی. ژورنال‌های 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 & distributors: 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. Mbuu 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-Agricultural 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.

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°C . 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°C . 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