ارزیابی روش کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های پیکری گردشی *فاسیولا ژیگانتیکا* در سرم گاو

محمدحسین راضی‌جلالی[۱*]، مسعود قربانپور[۲]، مهدی پورمهدی‌بروجنی[۳] و وجیهه خدادادیان[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۸

خلاصه

تشخیص سرولوژیک فاسیولوز یا بر اساس جست و جوی پادتن ضد انگل یا بر پایه‌ی جست و جوی آنتی‌ژن انگل در سرم است. در صورت جست و جوی آنتی‌ژن تشخیص زود هنگام بیماری امکان‌پذیر می‌گردد. با روش کانترایمونوالکتروفورز می‌توان در کم‌تر از ۳ ساعت وجود پادتن یا آنتی‌ژن را مورد بررسی قرار داد. به منظور ارزیابی این روش برای جست و جوی آنتی‌ژن *فاسیولا ژیگانتیکا* در گاو مطالعه‌ی حاضر صورت گرفت. برای این منظور، تعدادی کبد گاو آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* از کشتارگاه تهیه شد و از انگل‌های جمع‌آوری شده، آنتی‌ژن‌های پیکری به روش اولدهام و ویلیامز تهیه گردید. آنتی‌ژن‌های مذکور برای ایمن‌سازی و تولید سرم هیپرایمون به ۲ قطعه خرگوش تزریق گردید. برای جمع‌آوری نمونه‌های مثبت و منفی، کبد گاوان کشتار شده در کشتارگاه اهواز از نظر آلودگی به *فاسیولا ژیگانتیکا* مورد بررسی قرار گرفت و ۱۰۰ نمونه خون از گاوان آلوده و ۶۰ نمونه خون از گاوان غیرآلوده اخذ گردید و نمونه‌های سرم، از نظر حضور آنتی‌ژن‌های گردشی *فاسیولا ژیگانتیکا* به روش کانترایمونوالکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. از ۱۰۰ نمونه سرم گاوان آلوده در کانترایمنوالکتروفورز ۹۲ نمونه مثبت بودند و ۶۰ نمونه سرم گاوان غیرآلوده منفی بودند. حساسیت و ویژگی این آزمایش به ترتیب ۹۲ و ۱۰۰ درصد محاسبه گردید. با توجه به حساسیت و ویژگی قابل قبول، سرعت بالای این روش، برای تشخیص زود هنگام آلودگی به *فاسیولا ژیگانتیکا* می‌تواند مورد توجه باشد.

کلمات کلیدی: کانترایمونوالکتروفورز، *فاسیولا ژیگانتیکا*، گاو

مقدمه

آلودگی کبد حیوانات اهلی به *فاسیولا هپاتیکا*[۱] و *فاسیولا ژیگانتیکا*[۲] انتشار جهانی دارد و باعث بیماری فاسیولوزیس می‌شود که از نظر اقتصادی موجب خسارات قابل توجهی می‌گردد. خساراتی که به صورت مستقیم و غیرمستقیم زیان‌های زیادی به صنعت دامپروری کشور وارد می‌کند. ابتلا به *فاسیولا* موجب تلفات، ضبط لاشه‌ها، ضبط کبدهای آلوده، کاهش وزن، کاهش پشم، کاهش باروری، مرگ زودرس جنین، کاهش شیر و غیره می‌شود (اسلامی ۱۳۷۷، Molina et al. 2005, Paz-Silva et al. 2004).

فاسیولا هپاتیکا در نواحی معتدل، سردسیر، مرتفع و در مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری وجود دارد ولی *فاسیولا ژیگانتیکا* بیش‌تر در مناطق گرمسیری آلودگی ایجاد می‌کند (شاددل ۱۳۷۷).

[۱*] دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز (نویسنده‌ی مسئول) E-mail: mh.jalali@scu.ac.ir

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۴] دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز

1- *Fasciola hepatica*
2- *Fasciola gigantica*

برای تشخیص این بیماری می‌توان از علایم درمانگاهی، یافته‌های آزمایشگاهی، تغییرات فصلی آلودگی، تاریخچه قبلی بیماری و کالبدگشایی استفاده کرد. برای تشخیص بیماری در گاو، می‌توان از آزمایش مدفوع برای مشاهده‌ی تخم کرم و آزمایش خون برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها بهره برد. یکی از روش‌ها، اندازه‌گیری آنزیم‌های موجود در پلاسما به‌ویژه دو آنزیم آزاد شده در پلاسما توسط یاخته‌های آسیب دیده کبدی است. میزان گلوتامیت دهیدروژناز پلاسما به هنگام مهاجرت انگل در پارانشیم کبد و ضایعات وارده به آن، در چند هفته‌ی اول آلودگی افزایش می‌یابد (Dalton 1998). برای تشخیص فاسیولوزیس می‌توان از آزمایش‌هایی نظیر ثبوت- کمپلمان، آگلوتیناسیون پاسیو، پرسی پپتاسیون، ایمنودیفیوژن مضاعف، کانترایمنوالکتروفورزیس و الایزا استفاده کرد. این روش‌ها برای تشخیص بیماری قبل از ظهور تخم در مدفوع به ویژه در انسان از اهمیت زیادی برخوردار است (اسلامی ۱۳۷۷، Soulsby 1982).

با توجه به این که روش‌های معمول تشخیص آلودگی عمدتاً پس از استقرار کرم در مجاری صفراوی و با آزمایش مدفوع و دیدن تخم امکان تشخیص را فراهم می‌سازند، توسعه‌ی روش‌هایی برای تشخیص سریع و درمان به موقع ضروری به نظر می‌رسد. از روش‌های ایمونولوژیک جهت تشخیص فاسیولوز در انسان و دام استفاده می‌شود (Awad et al. 2009). معمولاً این روش‌ها بر پایه‌ی نشان دادن آنتی‌بادی ضد فاسیولا می‌باشند (Swarup et al. 1987)؛ اما روش‌های نشان دادن آنتی‌ژن در خون انسان و دام‌های آلوده در مطالعات مختلفی مورد سنجش وارزیابی قرار گرفته‌اند (Paz-Silva et al. 2004, Velusamy et al. 2003). بررسی فعلی، تلاشی است جهت تشخیص زودرس آلودگی به *فاسیولا ژیگانتیکا* با روش کانترایمونوالکتروفورز، که با توجه به زئونوز بودن بیماری در صورت داشتن حساسیت و ویژگی مورد قبول، قابل ارزیابی در پزشکی نیز خواهد بود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری انگل

تعدادی کبد گاو آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* از کشتارگاه تهیه و به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل گردیدند. تعداد ۳۰ انگل بالغ برای تهیه‌ی آنتی‌ژن‌های پیکری جدا شد؛ برای این کار انگل‌ها جدا و برای مرحله‌ی بعد آماده شدند (Anderson et al. 1999).

تهیه‌ی آنتی‌ژن‌های پیکری از انگل بالغ *فاسیولا ژیگانتیکا*

از انگل‌های جمع‌آوری شده طبق روش Oldham و Williams در سال ۱۹۸۵ آنتی‌ژن‌های پیکری تهیه گردید. برای این منظور انگل‌های جمع‌آوری شده، ۳ بار با PBS شست و شو شد و کاملاً آبکشی گردید؛ سپس انگل‌ها، خشک شد و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. انگل‌های خشک شده در هاون به صورت پودر در آمده، پودر حاصل در PBS هوموژن و با مخلوط کن برقی به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد یخچال نگهداری گردید. پس از این مدت، مایع رویی داخل لوله‌های استریل ریخته شد و رسوب با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع حاصل از سانتریفیوژ با فیلتر ۰/۲ میکرونی فیلتر شده، مایع فیلتر شده تا هنگام استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. میزان پروتئین به روش برادفورد اندازه‌گیری شد. برای انجام این آزمایش، از آنتی‌ژن‌های با میزان پروتئین ۶۰۰ تا ۶۵۰ میکروگرم در دسی‌لیتر استفاده شد.

ایمن‌سازی خرگوش

تعداد دو قطعه خرگوش به ظاهر سالم جهت ایمن‌سازی و تولید سرم هیپرایمون طبق روش Fagbemi و همکاران در سال ۱۹۹۵ با برخی تغییرات به کار گرفته شدند. خرگوش‌ها به مدت یک هفته برای سازگاری با

محیط در داخل قفس در اتاق نگهداری حیوانات در آزمایشگاه انگل‌شناسی نگهداری شدند. برای ایمن کردن، ۰/۵ سی‌سی ادجوانت کامل فروند با ۱/۵ سی‌سی آنتی‌ژن خام تهیه شده از *فاسیولا ژیگانتیکا* مخلوط شد و (به طور کلی میزان آنتی‌ژن تزریقی به هر خرگوش ۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) پشت عضله ران خرگوش‌ها تزریق گردید. به فاصله‌ی دو هفته، تزریق دوم آنتی‌ژن به میزان ۱/۵ سی‌سی همراه با ۰/۵ سی‌سی ادجوانت ناقص فروند صورت گرفت. ۴ هفته بعد از تزریق دوم، از قلب خرگوش‌ها خونگیری به عمل آمد و سرم آن‌ها به وسیله‌ی سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی و در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

جمع‌آوری سرم گاوان آلوده و غیرآلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا*

نمونه‌های کبد و سرم از گاوان کشتار شده در کشتارگاه اهواز جمع‌آوری گردید و کبدها از نظر آلودگی به *فاسیولا ژیگانتیکا* مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی سرم از گاوانی که آلودگی آن‌ها محرز شده و ۶۰ نمونه‌ی سرم از گاوان غیرآلوده جمع‌آوری گردید. سرم نمونه‌های آلوده و غیرآلوده توسط سانتریفیوژ جدا و در میکروتیوب‌های استریل در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. تأیید عدم آلوده بودن نمونه‌های منفی با تکه تکه کردن کبد به قطعات ۱ سانتی‌متری و شست و شوی آن‌ها صورت گرفت. برای این منظور، نمونه‌های منفی از گوساله‌های کشتار شده که در بازرسی کشتارگاهی، آلودگی در کبد آن‌ها مشاهده نشده بود، انتخاب می‌گردید؛ سپس هم نمونه‌ی خون و هم کل کبد به آزمایشگاه فرستاده می‌شد. در آزمایشگاه کل کبد به قطعات ریز ۱ سانتی‌متری تکه تکه شده و روی الک ۱۴ شست و شو با آب انجام می‌گردید. پس از جدا کردن تکه‌های درشت کبد، مواد روی الک به دقت زیر استریو میکروسکوپ مورد مشاهده قرار می‌گرفت؛ چنانچه هر گونه آلودگی به مراحل نوزادی (حتی ۱ میلی‌متری) *فاسیولاژیگانتیکا* مشاهده می‌شد، نمونه‌ی خون آن حذف می‌گردید؛ در غیر این صورت، به عنوان نمونه‌ی کنترل منفی در آزمایش مورد استفاده قرار می‌گرفت.

انجام کانترایمونوالکتروفورز

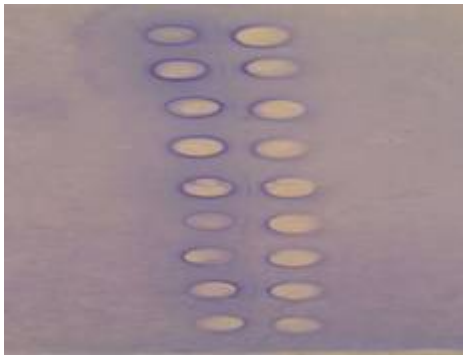
برای انجام کانترایمونوالکتروفورز مطابق روش Arafa و همکاران در سال ۱۹۹۹ تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی سرم گاو آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* و ۶۰ نمونه‌ی سرم غیرآلوده به کار رفت. در هر اسلاید تعداد ۹ زوج حفره وجود داشت که در تمام حفرات یک طرف مقدار ۱۰ میکرولیتر سرم هیپرایمیون خرگوش و در طرف مقابل مقدار ۱۰ میکرولیتر از سرم‌های شاهد و نمونه‌های مورد مطالعه ریخته شد. اسلایدهای آماده طوری داخل تانک قرار گرفت که سرم هیپرایمیون خرگوش در سمت آند و سرم‌های مورد بررسی (برای جست و جوی آنتی‌ژن) در سمت کاتد تانک قرار گیرند. برای برقراری جریان الکتریسته، دو طرف ژل توسط دو قطعه کاغذ آغشته به بافر به محفظه‌های آندی و کاتدی بافر متصل می‌گردید. الکتروفورز با جریان ۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۲ ساعت انجام می‌شد؛ بعد از ۲ ساعت جریان الکتریسته قطع می‌گردید. به منظور شست و شو، اسلاید ژل با زاویه‌ی ۴۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت در ظرف محتوی بوراکس به طوری که در محلول غوطه‌ور گردد، قرار داده می‌شد. به منظور رنگ‌آمیزی، اسلاید به آرامی برداشته شده و به مدت ۱۰ دقیقه داخل ظرف حاوی رنگ کوماسی بلو ۵ ٪ قرار می‌گرفت. به منظور رنگ‌بری اسلایدها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول رنگ‌بر قرار داده شده و نهایتاً اسلایدها از نظر خطوط رسوبی مورد بررسی قرار گرفته، نمونه‌های مثبت شده به صورت خطوط رسوبی در بین حفره‌ها مشاهده می‌شد (Arafa et al. 1999).

آزمون آماری

بررسی توصیفی و تحلیلی داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ انجام گرفت و مقادیر P کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

در این مطالعه که روی ۱۰۰ نمونه‌ی سرم گاو آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* و ۶۰ نمونه‌ی سرم غیرآلوده، جمع‌آوری شده از کشتارگاه شهر اهواز انجام گرفت، کانترایمونوالکتروفورز ۱۰۰ نمونه‌ی سرم آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* در ۹۲ نمونه‌ی مثبت و در تمام ۶۰ نمونه‌ی سرم غیرآلوده منفی بود (تصویر ۱). حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی آزمایش کانترایمونوالکتروفورز برای تشخیص دام‌های آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا*، به ترتیب ۹۲، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۸۸/۲ درصد محاسبه گردید (جدول ۱). آماره کاپا برابر با ۰/۹ بود (p<۰/۰۰۱).



تصویر ۱: نتایج آزمایش کانترایمونوالکتروفورز ۸ نمونه‌ی سرم گاوان آلوده و غیرآلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا*

جدول ۱: نتیجه‌ی کانترایمونوالکتروفورز، برای جست و جوی آنتی‌ژن *فاسیولا ژیگانتیکا* ***در ۱۶۰ نمونه‌ی سرم گاوی***

حضور انگل در کبد / کانترایمونوالکتروفورز	مثبت	منفی	جمع
سرم مثبت	۹۲	۰	۹۲
سرم منفی	۸	۶۰	۶۸
جمع	۱۰۰	۶۰	۱۶۰

بحث

آلودگی *فاسیولا ژیگانتیکا* در گاو و گاومیش‌های کشتار شده در ایران، در سال‌های مختلف از ۹۱-۱۷ درصد متفاوت گزارش شده است که نشان می‌دهد خسارات زیادی در اثر این بیماری به صنعت دامپروری کشور وارد می‌شود (اسلامی ۱۳۷۷). تشخیص سرولوژیک فاسیولوز به طور معمول با تشخیص وجود پادتن ضد انگل در سرم خون صورت می‌گیرد که لازمه، آن گذشت حدود ۲ هفته از آغاز آلودگی است؛ اما در صورتی که بتوان با تأیید وجود آنتی‌ژن انگل در سرم خون به تشخیص رسید، امکان تشخیص آلودگی در روزهای اولیه‌ی آلودگی وجود خواهد داشت و به طبع، با انجام درمان بیماری در مراحل اولیه، از خسارات ناشی از بیماری به نحو بهتری می‌توان جلوگیری کرد. مطالعه حاضر برای ارزیابی کانترایمونوالکتروفورز به منظور جست و جوی آنتی‌ژن پیکری *فاسیولا ژیگانتیکا* در سرم گاو صورت گرفت، که بررسی منابع نشان داد ظاهراً تا کنون این مهم انجام نگرفته است. اما از این روش برای جست و جوی آنتی‌بادی ضد *فاسیولا* استفاده شده است که در ادامه به مواردی از آن‌ها اشاره می‌شود.

در مطالعات Arafa و همکاران در سال ۱۹۹۹ آزمایش کانترایمونوالکتروفورز برای تشخیص زود هنگام فاسیولوز با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی *فاسیولا ژیگانتیکا* ارزیابی شده است. حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۳۸/۷ و ۱۰۰ درصد گزارش گردیده است که ویژگی آن با مطالعه‌ی حاضر همخوانی کامل داشته، اما حساسیت آن بسیار کم‌تر از مطالعه‌ی فعلی است و به نظر می‌رسد این اختلاف زیاد ناشی از تفاوت آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در این دو مطالعه باشد. Swarup و همکاران در سال۱۹۸۷ از سه آزمایش AGPT CIEP و IHA جهت ارزیابی تشخیص آلودگی *فاسیولا ژیگانتیکا* در گاومیش استفاده کرده‌اند که حساسیت روش‌های مذکور به ترتیب ۵۷/۴، ۶۸/۳۷، ۷۶/۰۶ درصد محاسبه شده است که همگی

حساسیت کم‌تری در تشخیص آنتی‌ژن پیکری گردشی در خون به روش کانترایمونوالکتروفورز داشته‌اند، که این امر احتمالاً به دلیل حساسیت مختلف روش‌ها و یا تفاوت دام مورد مطالعه است.

مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به منظور ارزیابی روش کانترایمونوالکتروفورز برای تشخیص آنتی‌ژن‌های در گردش *فاسیولا ژیگانتیکا* در گاوان آلوده صورت گرفت.

البته از کانترایمونوالکتروفورز برای جست و جوی آنتی‌ژن بهره‌گیری شده است؛ ولی نه در سرم، بلکه در مدفوع و آن مطالعه‌ی Youssef و همکاران در سال ۱۹۹۱ است که با بررسی حضور کوپرآنتی‌ژن‌های *فاسیولا ژیگانتیکا* در نمونه‌های مدفوع انسانی وجود خط رسوبی را در کانترایمونوالکتروفورز نشان داده‌اند و اعلام نموده‌اند می‌توان از این روش نیز برای تشخیص فاسیولوز بهره‌گیری کرد؛ اما آن را ارزیابی ننموده‌اند.

Dalimi و همکاران در سال ۲۰۰۴ از آنتی‌ژن‌های *فاسیولا ژیگانتیکای* بالغ برای تشخیص فاسیولوز انسانی با استفاده از دات الایزا استفاده کرده‌اند که حساسیت و ویژگی آن را به ترتیب ۹۴/۲۳ و ۹۹/۳۶ درصد اعلام نموده‌اند که این حساسیت در مقایسه با مطالعه‌ی حاضر کمی بیش‌تر بوده ولی ویژگی آن تقریباً با آن هم‌خوانی دارد که این تفاوت در حساسیت احتمالاً ناشی از اختلاف در ماهیت این دو آزمایش است (Dalton 1998, Dalimi et al. 2004, Ibarra et al. 1998). در مطالعه‌ی پایکاری و همکاران در سال ۱۳۸۵ در آلودگی تجربی گوسفند با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی *فاسیولا ژیگانتیکا* در روش الایزا مشخص شده است که از هفته‌ی سوم پس از آلودگی تجربی، بیماری قابل تشخیص می‌باشد. بالاترین حساسیت و ویژگی در مطالعه‌ی مذکور در هفته‌ی سوم پس از آلودگی، به ترتیب با ۹۶ و ۸۳/۷ درصد بوده است. نتایج مطالعه‌ی مذکور با نتایج بررسی Awad و همکاران در سال ۲۰۰۹ که آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی را جهت استفاده در آزمایش‌های تشخیصی فاسیولوز مناسب دانسته‌اند، هم‌خوانی دارد. موذنی و شارماگائو در سال ۱۳۸۶ آزمایش با الایزا آنتی‌ژن‌های خام *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* را با هم مقایسه کردند و اعلام نمودند تفاوت‌های موجود بین مواد آنتی‌ژنیک *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* در حدی نیست که مانع از واکنش متقاطع بین دو گونه انگل در آزمایش الایزا شود و تحقیقات بیش‌تری برای شناسایی، جداسازی و تخلیص مواد آنتی‌ژنیک این انگل‌ها توصیه نمودند که این امر لزوم مطالعه‌ای تجربی برای تشخیص فاسیولوز ناشی از عوامل مختلف را نشان می‌دهد (موذنی و شارماگائو ۱۳۸۶، Guobadia and Fagbemi 1996, Velusamy et al. 2003).

تشخیص متداول فاسیولوز بر مبنای مشاهده‌ی حضور تخم انگل در مدفوع است که در مراحل پیشرفته‌ی بیماری پس از بالغ شدن انگل در کبد امکان‌پذیر می‌شود. در این مرحله انگل ضایعات زیادی نیز به کبد وارد ساخته و خسارات اقتصادی زیادی را باعث می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر حساسیت و ویژگی آزمایش کانترایمونوالکتروفورز برای تشخیص دام‌های آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* به ترتیب ۹۲ و ۱۰۰ درصد محاسبه‌ی گردید و محاسبه آماره کاپا نشان داد که توافق کامل بین روش کانترایمونوالکتروفورز و روش جست و جوی انگل در کبد وجود دارد. باید توجه داشت که آزمایش‌هایی که بر مبنای تشخیص آنتی‌بادی هستند، اغلب به دلیل واکنش متقاطع ویژگی پایینی دارند؛ اما روش‌های مبتنی بر تشخیص آنتی‌ژن از ویژگی بالاتری برخوردار هستند. بنابراین در بررسی حاضر ویژگی آزمایش مذکور ، ۱۰۰ درصد برآورد شده است. با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، نشان دادن آلودگی در اوایل عفونت با استفاده از کانترایمونوالکتروفورز که روشی نسبتاً سریع، آسان و ارزان است (Kreder and Bozic 2002, Dauchy et al. 2006, Mikhail et al. 1990) می‌توان از آن در تشخیص و درمان به موقع بیماری استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه‌ی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز، در تأمین هزینه‌ی پژوهشی در قالب پژوهانه (Grant) ابراز می‌دارند.

منابع

اسلامی، علی (۱۳۷۷). کرم‌شناسی دامپزشکی. جلد اول (ترماتودا)، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۸۶–۴۵.

پایکاری، حبیب‌الله؛ آبشار، نسرین؛ معتمدی، غلامرضا؛ درخشان‌فر، مریم و کریمی، غلامرضا (۱۳۸۵). تشخیص زود هنگام فاسیولوزیس در گوسفند با استفاده از الایزا. مجله‌ی دامپزشکی ایران، شماره‌ی ۲، صفحات ۷۳-۶۴.

شاددل، فضل‌الله (۱۳۷۷). انگل‌شناسی دامپزشکی. تألیف: آرکورات، آرمور، دونکان، دون وجنینگر. چاپ اول، انتشارات دانشگاه شیراز، صفحه‌ی ۲۶۵.

مؤذنی، محمد و شارماگائوی، شری‌نیواس (۱۳۸۶). مقایسه‌ی آنتی‌ژن‌های خام *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* به وسیله‌ی آزمایش‌الیزا. مجله‌ی دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره‌ی ۱۱، صفحات ۵–۱.

Anderson, N.; Luong, T.T.; Vo, N.G.; Bui, K.L.; Smooker, P.M. and Spithill, T.W. (1999). The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle, Veterinary Parasitology, 83: 15–24.

Arafa, M.S; Abaza, S.M.; El-Shewy, K.A.; Mohareb, E.W. and El-Moamly, A.A. (1999). Detection of *Fasciola*-specific excretory/ secretory (E/S) protein fraction band (49.5 kDa) and its utilization in diagnosis of early fascioliasis using different diagnostic techniques.Veterinary Parasitology, 58, (3), 235-246.

Awad, W.S., Ibrahim, A.K. and Salib, F.A. (2009). Using indirect ELISA to assess different antigens for the serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle, sheep and dokeys. Research in Veterinary Science, 86: 466-471.

Dalimi, A.; Hadighi, R. and Madani, R. (2004). Partially purified fraction (PPF) antigen from adult *Fasciola gigantica* for the serodiagnosis of human fascioliasis using Dot-ELISA technique. Annals of Saudi Medicine; 24(1): 18-20.

Dalton, J.P. (1998). Fasciolosis. British Library, London, UK. pp: 17-46.

Fagbemi, B.O.; Obarisiagbon, I.O. and Mbuh, J.V. (2000). Detection of circulating antigen in sera of *Fasciola gigantic* infected cattle with antibodies reactive with a *Fasciola*-specific 88-kDa antigen. Veterinary Parasitology, 58(3): 235-246.

Dauchy, F.A.; Vincendeau, P. and Lifermann, F. (2006). Eight cases of fascioliasis: clinical and microbiological features. Medical Malpractice Infection, 36(1): 42-46.

Guobadia, E.E. and Fagbemi, B.O. (1996). Detection of circulating *Fasciola gigantica* antigen in experimental and natural infections of sheep with fasciolosis. Veterinary Parasitology. 15; 65(1-2): 29-39.

Ibarra, F.; Montenegro, N.; Vera, Y.; Boulard, C.; Quiroz, H.; Flores, J. et al. (1998). Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. Veterinary Parasitology, 77: 229-236.

Kveder, T. and Bozic, B. (2002). Counterimmunoelectrophoresis: fast, easy and cost- effective method for the detection of autoantibodies to intracellular antigens. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 40(4): 428-9.

Mikhail, E.M.; Farid, Z.; Youssef, F.G. and Mansour, N.S. (1990). Counterimmunoelectrophoresis for the rapid and specific diagnosis of acute fascioliasis and schistosomiasis Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 84(3): 400-401.

Molina, E.C. and Skerratt, L.F. (2005). Cellular and humoral responses in liver of Cahle and buffaloes infected with a single dose of Fasciola gigantica. Veterinary Parasitology 131: 157-163.

Oldham, G. and Williams, L. (1985). Cell mediated immunity to liver fluke antigens during experimental *Fasciola hepatica* infection of cattle, Parasite Immunology, 7: 503-516.

Paz-Silva, A.; Hillyer, G.V.; Sanchez-Andrade, R.; Rodriguez-Medina, J.R.; Arias, M., Morrondo, P. et al. (2004). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9 kDa recombinant protein for the diagnosis of bovine fasciolosis. Parasitology Research 95: 129-135.

Soulsby, E.J.L. (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.7th ed. Bailliere Tindall. London. pp: 40-53.

Swarup, D.; Pachauri, S.P.; Sharma, B. and Bandhopadhyay, S.K. (1987). Serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in buffaloes. Veterinary Parasitology, 24(1-2): 67-74.

Velusamy, B.; Singh, B.P.; Sharma, R.L. and Chandra, D. (2003). Detection of circulating 54 kDa antigen in sera of bovine calves experimentally infected with *F. gigantica* . Veterinary Parasitology, 119 (2-3): 187-195.

Youssef, F.G.; mansour, N.S. and Aziz, A.G. (1991). Early diagnosis of human Fascioliasis by the detection copro-antigens using counterimmunoelectrophoresis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 85(3): 383-384.

Evaluation of counterimmunoelectrophoresis method for detection of somatic circulating antigen of *Fasciola gigantica* in bovine sera

Razi Jalali, M.H.[1]; Ghorbanpoor, M.[2]; Pourmahdi Borujeni, M.[3] and Khodadadian, V.[4]

Received: 15.01.2013 Accepted: 18.06.2013

Abstract

Diagnosis of fasciolosis is based on antibody or antigen detection in serum. Antigen detection provides early diagnosis of infection. With counterimmunoelectrophoresis (CIEP) antibody or antigen existence can be detected in less than 3 hours. This study assessed this test for diagnosis of *Fasciola gigantica* antigen in cattle. For this purpose *Fasciola gigantica* were collected from liver of infected slaughtered cattle. Somatic antigen was prepeared from collected parasites and was injected into 2 healthy rabbits for production of hyperimmuniune sera. For evalution of CIEP totally 60 negative and 100 positive sera were collected from slaughtered cattle. All sera were evaluated for diagnosis of fasciollosis by CIEP for detection of circulating antigen of *Fasciola gigantica*. 92 from 100 infected cattle sera were positive and 60 uninfected cattle sera were negative in CIEP. Sensitivity and specifity of CIEP for detection of *Fasciola gigantica* antigen were 100% and 92% respectively. It is concluded that CIEP has acceptable sensitivity and specifity for rapid and early diagnosis of *Fasciola gigantica*.

Key words: Counterimmunoelectrophoresis, *Fasciola gigantica*, cattle

1- Associate professor, Department of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
4- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Razi Jalali, M.H., E-mail: mh.jalali@scu.ac.ir