مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۷، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۱(شماره پی در پی ۱۵۱)

تشخیص کوپروآنتی ژن‌های فاسیولا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا

سمانه عبدالهی خبیصی[1*]، بهادر سرکاری[2]

[1] گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران، [2] گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۰۶/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: روش‌های پارازیتولوژیک جهت تشخیص فاسیولیازیس دارای محدودیت‌هایی از جمله؛ دفع متناوب تخم انگل، طولانی بودن مرحله حضور تخم انگل در مدفوع می‌باشند. هم‌چنین روش‌های سرولوژی بر پایه شناسایی آنتی بادی‌های ضدانگل، قادر به تشخیص عفونت‌های گذشته از عفونت‌های جدید نیستند، لذا تشخیص کوپرو آنتی‌ژن‌های انگل در مقایسه با سایر روش‌های تشخیصی قابل اعتمادتر می‌باشند. بنابراین هدف از این مطالعه تعیین و تشخیص کوپروآنتی ژن‌های فاسیولا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۶- ۱۳۹۵ انجام شد، کرم‌های بالغ فاسیولا از کبد دام‌های آلوده جمع‌آوری شدند و با روش مولکولی هضم آنزیمی تعیین گونه شدند. آنتی‌ژن دفعی- ترشحی از هر دو گونه فاسیولا تهیه گردید. به منظور تولید آنتی‌بادی پلی کلونال ۲ خرگوش برای هر آنتی‌ژن ایمیونیز شدند. آنتی‌بادی IgG تولید شده با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی تخلیص و با آنزیم پراکسیداز کونژوگه گردیدند. کوپروآنتی‌ژن‌ها از ۹۹ نمونه مدفوع دامی شامل؛ ۳۰ نمونه آلوده به فاسیولا، ۳۹ نمونه مبتلا به سایر بیماری‌های انگلی و ۳۰ نمونه سالم تهیه گردیدند. در این مطالعه ۲ سیستم ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی کلونال تولید شده جهت شناسایی کوپرو آنتی‌ژن فاسیولا طراحی و ارزیابی شدند. ویژگی‌های آماری تست‌ها با استفاده از نرم‌افزار مدیکال کلکلتور ۳، ٤، ١٦ محاسبه گردیدند. ضریب کاپا و بررسی هم‌خوانی بین تست‌های ساندویچ الیزا محاسبه شد.

یافته‌ها: تست ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا به ترتیب حساسیت و ویژگی ۹٦/٦٧، ۸۹/۸٦ درصد و ۹٦/٦٧، ۹۱/۳ درصد را نشان دادند. هم‌چنین توافق بالایی(۰/۹< ضریب کاپا) بین آنتی‌بادی‌های پلی کلونال تولید شده بر علیه هر دو گونه فاسیولا جهت تشخیص فاسیولیازیس مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در مجموع یافته‌ها نشان دادند که آنتی بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن‌دفعی - ترشحی هر دو گونه فاسیولا دارای کارایی مناسبی جهت شناسایی کوپرو آنتی‌ژن‌های فاسیولا و تشخیص فاسیولیازیس می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: کوپرو آنتی‌ژن، فاسیولا، آنتی‌ژن دفعی- ترشحی

*نویسنده مسئول: **سمانه عبدالهی خبیصی**، زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی زاهدان، گروه انگل و قارچ شناسی

Email:samanekhabisi@gmail.com

مقدمه

فاسیولیازیس جزء بیماری‌های فراموش شده انگلی است و دو گونه فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا، متعلق به زیر خانواده فاسیولینه، عوامل اصلی این بیماری در انسان و دام ها می‌باشند. فاسیولیازیس نه تنها به عنوان یک معضل مهم بهداشتی در حیوانات مطرح می باشد، بلکه از نظر بهداشتی برای انسان‌ها نیز حایز اهمیت است. افزایش فاسیولیازیس انسانی در بسیاری از مناطق مختلف جهان شامل؛ قسمتی از آفریقا، مدیترانه و آمریکای جنوبی و آسیای جنوب شرقی گزارش گردیده است و حدود ۲/٦ میلیون نفر در سراسر دنیا به این انگل آلوده می‌باشند(۳ـ۱). تشخیص زود هنگام فاسیولیازیس به منظور درمان سریع و کاهش آسیب‌های وارده به کبد ضروری می‌باشد. روش‌های پارازیتولوژیک جهت تشخیص مرحله حاد بیماری که حدود ۸ تا ۱۰ هفته به طول می‌انجامد و انگل هنوز بالغ نشده و توانایی تولید تخم را ندارد، چندان کارآمد نیستند ، از طرفی در مرحله بلوغ انگل دفع تخم کم شده و به صورت متناوب انجام می‌شود. مجموع موارد ذکر شده، کاهش حساسیت روش تشخیصی میکروسکوپی را به دنبال خواهند داشت(٤ـ۲). روش‌های سرولوژیک با جستجوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضدانگل و یا آنتی‌ژن‌های آن در سرم و یا مدفوع، جهت تشخیص به موقع بیماری مناسب‌تر هستند. تا کنون از روش‌های سرولوژیک مختلفی جهت شناسایی آنتی‌بادی اختصاصی ضد فاسیولا و تشخیص بیماری استفاده شده است(۷ـ۵) در بین روش‌های مختلف، روش الیزا در شکل‌های متفاوت و با استفاده از آنتی‌ژن‌های مختلف دارای بالاترین حساسیت و ویژگی بوده‌اند. از دیگر روش‌های سرولوژی، تشخیص آنتی‌ژن‌های اختصاصی انگل فاسیولا در سرم و یا مدفوع و با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و یا پلی‌کلونال بوده که این روش‌ها در مقایسه با روش‌های دیگر از این جهت که توانایی افتراق عفونت جدید از قدیم را دارند، بسیار حایز اهمیت می‌باشند(۹ـ۷). تا کنون پژوهش‌های زیادی به منظور تشخیص کوپرو آنتی‌ژن‌های فاسیولا، با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال انجام شده است که دارای حساسیت و ویژگی بالایی بوده‌اند(۱۲ـ۱۰) از مزایای استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در تست‌های تشخیصی در مقایسه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌توان به مواردی از جمله تولید راحت و مقرون به صرفه آن و همچنین به توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های بیشتری از آنتی ژن‌های انگل اشاره نمود که در نتیجه افزایش حساسیت تست تشخیصی را به دنبال خواهند داشت. جستجوی کوپرو آنتی‌ژن‌ها در مدفوع درمقایسه با آنتی‌ژن‌های در حال گردش در سرم دارای مزایایی می باشد، از جمله این که این آنتی‌ژن‌ها کمتر تحت تأثیر کمپلکس‌های ایمنی قرار می‌گیرند، در نتیجه میزان آنها کمتر دستخوش تغییر می‌شود. در این میان روش‌های مبتنی بر شناسایی آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی قادر به تشخیص بیماری در مرحله

حاد و مزمن می‌باشند. به علاوه این روش‌های تشخیصی عمدتاً غیر تهاجمی می‌باشند(۱۰). با توجه به دلایل اشاره شده راه‌اندازی یک تست تشخیصی قابل اعتماد و کارآمد ضروری به نظر می‌رسد. در همین راستا این مطالعه با هدف تعیین و تشخیص کوپروآنتی ژن‌های فاسیولا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵انجام شد، پس از هماهنگی با کشتارگاه صنعتی فارس تعدادی کبد آلوده به فاسیولا به آزمایشگاه ارسال گردید. در آزمایشگاه، کرم‌ها با دقت زیاد از مجاری صفراوی کبدهای آلوده خارج گردیدند تا آسیبی به آنها وارد نشود. کرم‌ها سه تا چهار بار در بافر فسفات سالین(PBS) به منظور جداسازی کامل محتویات مجاری صفراوی از سطح شان شستشه شدند. از هر کبد آلوده تعدادی کرم به منظور بررسی مولکولی و تعیین گونه انگل جدا و پس از شستشو با PBS به الکل ۷۰ درصد منتقل گردیدند. همچنین بقیه کرم‌های جدا شده از کبد به بافر فسفات سالین برای تهیه آنتی‌ژن منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام کارهای مولکولی در یخچال نگهداری شدند.

استخراج DNA با روش دستی فنل کلروفروم و از قسمت قدامی کرم، فاصله بین ناحیه بادکش دهانی و بادکش شکمی، انجام گردید(۱۵). در ادامه ناحیه ITS1 با روش PCR و به شرح ذیل تکثیر گردید.

مسترمیکس با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X) ، ۰/۵ میکرولیتر دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۰/۵ میکرولیتر Forward primer (5- TTGCGCTGATTACGTCCCTG- 3) و ۰/۵ میکرولیتر Reverse primer (5- TTGGCTGCGCTCTTCATCGAC- 3) (هر کدام با غلظت ۱۰ پیکومول) و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. قطعه مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر و با استفاده از تنظیم برنامه دمایی ۹٤ درجه به مدت ۱۸۰ ثانیه به دنبال آن ۳۰ سیکل ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر شد. پس از اتمام برنامه ترموسایکلر، حدود ۵ میکرولیتر محصول PCR با ۱میکرولیتر رتگ لودینگ و ژل رد بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. سپس با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت بیوداکت از آن عکس‌برداری شد. در صورت مناسب بودن باند مربوط به تکثیر قطعه مورد نظر، محصول PCR برای روش مولکولی هضم آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه از آنزیم برش دهنده سریع اثر *Rsal* استفاده شد. سپس مسترمیکس با استفاده از ۱ میکرولیتر آنزیم با شماره کاتالوگ : اف دی ۱۱۲٤، ۲

میکرولیتر بافر سبز رنگ با غلظت X ۱۰، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۱۷ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز و در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر تهیه گردید. پس از تهیه مسترمیکس در میکرتیوپ ۰/۲ میکرولیتری، آن را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده و قطعات حاصل از برش آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده گردید.

کرم‌های سالم پس از جمع‌آوری از مجاری صفراوی دام، سه تا چهار مرتبه با PBS شسته شدند. سپس هر ده عدد کرم در شرایط استریل به فلاسک کشت ۲۵سانتی متر مربع حاوی ۵ میلی‌لیتر RPMI 1640و پنی‌سیلین- استرپتومایسین ۱ درصد منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند. در ادامه تمام محیط کشت به داخل لوله فالکون منتقل و با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به فالکون جدید منتقل و تا زمان دیالیز شدن در فریز ۲۰- نگهداری شد. سپس آنتی‌ژن‌های تهیه شده در برابر بافرPBS دیالیز گردید و در نهایت در دستگاه لیوفیلیزر در شرایط دمای ٤٥- درجه سانتی‌گراد و فشار خلا ٦٠ سانتی‌متر جیوه به مدت ٢٤ ساعت به پودر تبدیل شد. غلظت آنتی‌ژن غلیظ شده با روش برادفورد اندازه‌گیری شد(١٦). جهت بررسی باندهای پروتئینی دو آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا، از الکتروفورز عمودی به روش اس دی اس پیج بر روی ژل ۱۲/۵ درصد استفاده گردید.

به منظور تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا ٤ خرگوش ماده(دو خرگوش برای آنتی‌ژن‌های هر گونه) با وزن حدود ۲ کیلوگرم در نظر گرفته شدند. قبل از تزریق آنتی‌ژن از خرگوش‌ها خون‌گیری شد و از سرم آنها به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. برای هر خرگوش، شش تزریق انجام گردید. در هر تزریق از ۵۰۰ میکروگرم آنتی‌ژن و هم حجم آن ادجوانت فروند استفاده گردید. لازم به ذکر است که تزریق اول با ادجوانت کامل فروند(سیگما، شماره کاتالوگ: اف ۵۸۸۱) و بقیه تزریق‌ها با ادجوانت ناقص فروند(سیگما، شماره کاتالوگ: اف ٥٥٠٦) و با فاصله یک هفته از یکدیگر انجام شدند. تزریق‌ها به صورت زیر جلدی و در ناحیه پشت و ران خرگوش‌ها انجام شدند. یک هفته پس از آخرین تزریق از خرگوش‌ها خون‌گیری شد و سرم آنها با استفاده از تست الیزای غیرمستقیم مورد بررسی قرار گرفت. آنتی‌بادی IgG تولید شده بر علیه هر دو گونه فاسیولا با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی و با استفاده از پروتئین G تخلیص و با روش اس دی اس پیج مورد تأیید قرار گرفتند.

پس از حل نمودن ٤ میلی‌گرم آنزیم پراکسیداز در یک میلی‌لیتر آب مقطر، ۲۰۰ میکرولیتر سدیم متا پریودات ۰/۱ مولار به آن اضافه نموده و به مدت۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. در ادامه این محلول در بافر استات سدیم یک میلی‌مولار با pH:٤/٤ به مدت١٦ تا ١٨ ساعت و در دمای ٤ درجه

سانتی‌گراد دیالیز گردید. در مرحله بعدی ۸ میلی‌گرم از آنتی بادی پلی‌کلونال تخلیص شده در بافر سدیم کربنات ـ بی کربنات ۵۰ میلی مولار با pH: ۹/۵ به مدت ۱٦ تا ۱۸ ساعت و در درمای ٤ درجه سانتی‌گراد دیالیز گردید. سپس pH آنزیم پراکسیداز دیالیز شده با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر بافر سدیم کربنات، بی‌کربنات ۰/۲ مولار به ۵/ ۹ افزایش یافت. در ادامه ٤ میلی‌گرم آنزیم پراکسیداز دیالیز شده، به ۸ میلی‌گرم آنتی‌بادی پلی‌کلونال تخلیص شده اضافه گردید و این مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر بروهیدرید تازه تهیه شده با غلظت ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به محلول فوق اضافه و به مدت ۲ ساعت روی شیکر در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در انتها این محلول در برابر PBS به مدت ۱٦ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد دیالیز گردید. سپس آنتی‌بادی کونژوگه شده تا زمان استفاده در ۲۰ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

در مطالعه حاضر در مجموع ۹۹ نمونه مدفوع از گاو، گوسفند و بز جمع‌آوری گردید، ۳۰ نمونه مدفوع دام آلوده به فاسیولا که با روش میکروسکوپی (فرمالین–اتر و تلمن) مورد تأیید قرار گرفتند و تخم انگل در آنها مشاهده گردید، ۳۰ نمونه مدفوع دام سالم که در بررسی با روش میکروسکوپی(مستقیم و فرمالین ـ اتر) هیچ گونه آلودگی انگلی در آنها مشاهده نگردید و ۳۹ نمونه مدفوع دام مبتلا به سایر بیماری‌های انگلی شامل ۹ مورد آلودگی به انگل‌های خانواده تریکواسترونژیلیده، ۹ مورد آلودگی به آمیب، ۹ مورد آلودگی به آیمریا، ۳ مورد آلودگی به تریکیوریس، ۵ مورد آلودگی توام آیمریا و کریپتوسپوریدیوم، ۲ مورد آلودگی توام آیمریا و تریکیوریس و ۲ مورد آلودگی توام آیمریا و تریکواسترونژیلیده که با روش میکروسکوپی (مستقیم، فرمالین‌ـ اتر، رنگ‌آمیزی تری‌کروم و یا اسید فاست) مورد تأیید قرار گرفتند، تهیه گردید. میزان ۰/۵ گرم مدفوع بز، گوسفند و یا گاو را در ۲ سی‌سی بافر PBS کاملاً مخلوط و با دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس مایع رویی (حاوی کوپرو آنتی ژن) پس از فیلتر شدن به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

آنتی‌بادی پلی‌کلونال(IgG تخلیص شده) ضدآنتی ژن فاسیولا هپاتیکا و یا فاسیولا ژیگانتیکا با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر کوت کننده (کربنات ـ بی‌کربنات با pH حدود ۹/۵) تهیه و به هر چاهک پلیت الیزا ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه گردیدند. پس از ۵ بار شستشوی پلیت‌های الیزا با بافر شستشو ،۱۰۰ میکرولیتر بافر بلوکه کننده ۵ درصد به هر چاهک اضافه گردید و به مدت یک ساعت و نیم در دمای اتاق نگهداری شد. پس از شستشو مانند مرحله قبل، ۱۰۰ میکرولیتر کوپروآنتی‌ژن‌های تهیه شده از ۳۰ نمونه مدفوع آلوده به تخم فاسیولا، ۳۰ نمونه مدفوع دام بدون هر گونه آلودگی و ۳۹ نمونه مدفوع دام با سایر آلودگی‌های

انگلی بدون تهیه رقت و به صورت خالص به پلیت‌ها اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از شستشو همانند مراحل قبلی، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی IgG تخلیص شده ضدآنتی‌ژن فاسیولا هپاتیکا و یا فاسیولا ژیگانتیکا(با رقت ۱:۵۰۰) که با آنزیم HRP کونژوگه شده بود به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای آنزیم حاوی ۰/۰۳ درصد آب اکسیژنه به هر چاهک اضافه گردید و پس از اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده، جذب نوری پلیت ها در طول موج ٤٥٠ و ٦٣٠ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

پس از تهیه کوپرو آنتی‌ژن از نمونه‌های مدفوع دامی، ۹۹ نمونه ذکر شده در بالا با کیت تجاری Bio-X Bovine Fasciola (Bach No.: FASA15G27, Belgium) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ویژگی‌های آماری تست‌ها با استفاده از نرم‌افزار مدیکال کلکلتور ۳، ٤، ١٦ محاسبه گردیدند. ضریب کاپا و بررسی هم‌خوانی بین تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های تولید شده با نرم‌افزار SPSS محاسبه شد.

یافته‌ها

آنزیم *Rsal* بر روی محصول PCR به دست آمده از پرایمر ITS1 در فاسیولا ژیگانتیکا ۲ محل برش داشته و قطعات ٦٠، ١٧٠ و ٣٦٠ و در فاسیولا هپاتیکا قطعات ٦٠، ١٠٠ و ٣٦٠ را ایجاد نمود. شکل ۱ نتایج حاصل از RFLP بر روی نمونه‌های مورد نظر در این مطالعه و بر روی ژل آگارز ۲ درصد را نشان می‌دهد.

از بین ۳۰ نمونه مدفوع دام آلوده به فاسیولا یک مورد(۳/۳ درصد) منفی و بقیه موارد (٩٦/٧ درصد) مثبت بودند. از بین ۳۰ نمونه مدفوع دام سالم همه موارد(۱۰۰ درصد) منفی بودند. هم‌چنین از بین ۳۹ نمونه مدفوع دام مبتلا به سایر بیماری‌های انگلی ۳۲ مورد(۸۲/۱ درصد) منفی و ۷ مورد(۱۷/۹ درصد) مثبت بوده که موارد مثبت شامل؛ ۳ مورد(٨/٤٢ درصد) آلودگی به تریکواسترونژیلیده، ۲ مورد(٦/٢٨ درصد) آلودگی به آمیب، ۱ مورد(٣/١٤ درصد) آلودگی به آیمریا و ۱ مورد(٣/١٤ درصد) آلودگی توأم آیمریا و تریکیوریس بودند. در مجموع میزان حساسیت روش ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال(IgG) تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی ترشحی فاسیولا هپاتیکا جهت تشخیص فاسیولیازیس ٩٦/٦٧ درصد (٩٩/٩٢-٨٢/٧٨ درصد:CI ٩٥ درصد) و ویژگی آن ٨٩/٨٦ درصد(٩٥/٨٢- ٨٠/٢١ درصد :CI ٩٥ درصد) محاسبه گردید. سطح زیر منحنی(AUC)[1] به منظور بررسی تفاوت بین نمونه‌های آلوده به فاسیولا و غیرآلوده به فاسیولا معنی‌دار بود(p<۰/۰۰۰۱، AUC=۰/۹۷). نمودار ۱ پراکندگی میزان جذب نوری نمونه‌های مورد بررسی با آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن

1-Area Under Curve (AUC)

دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و با روش ساندویچ الیزا را نشان می‌دهد.

از بین ۳۰ نمونه مدفوع دام مبتلا به فاسیولا ۲۹ مورد (۹٦/۷ درصد) مثبت و یک مورد (۳/۳ درصد) منفی بودند. هم‌چنین از بین ۳۰ نمونه مدفوع دام سالم همه موارد(۱۰۰ درصد) منفی بودند. از بین ۳۹ نمونه مدفوع دام مبتلا به سایر بیماری‌های انگلی ۳۳ مورد(۸٤/٦ درصد) منفی و ٦ مورد (۱۵/٤ درصد) مثبت بودند که موارد مثبت ٤ مورد(۱۰/۲ درصد) آلودگی به تریکواسترونژیلیده، ۱ مورد(۲/٦ درصد) آلودگی به آمیب و ۱ مورد(۲/٦ درصد) آلودگی توأم به آیمریا و کریپتوسپوریدیوم داشتند. در مجموع میزان حساسیت روش ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال(IgG) تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا ژیگانتیکا جهت تشخیص فاسیولیازیس ۹٦/٦۷ درصد(۹۹/۹۲- ۸۲/۷۸درصد CI: ۹۵ درصد) و ویژگی آن ۹۱/۳ درصد(۹٦/۷٤- ۸۲/۰۳درصد CI: ۹۵درصد) محاسبه گردید. سطح زیر منحنی(AUC) به منظور بررسی تفاوت بین نمونه‌های آلوده به فاسیولا و غیرآلوده به فاسیولا معنی‌دار بود(p<۰/۰۰۰۱، AUC=۰/۹٦).

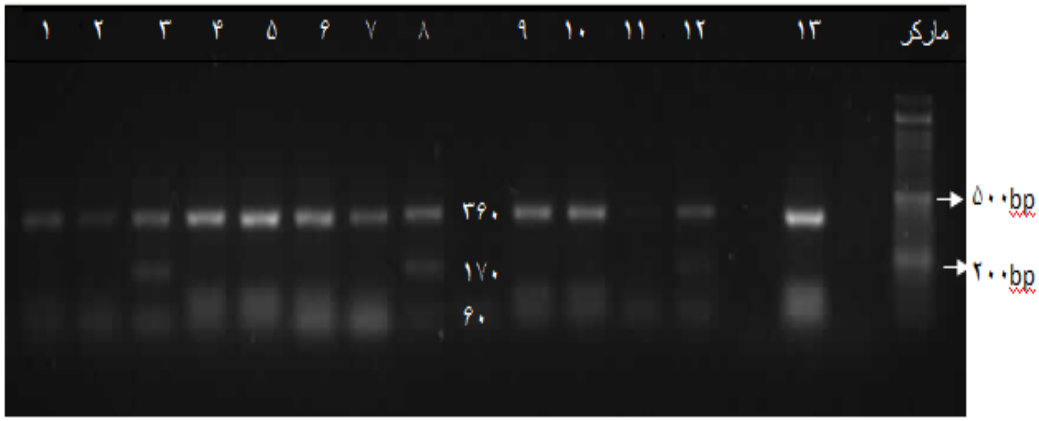
در بررسی بین تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا هم‌خوانی بالای (κ= ۰/۹۰) مشاهده شد.

نمودار ۲ پراکندگی میزان جذب نوری نمونه‌های مورد بررسی با آنتی بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا ژیگانتیکا در سیستم ساندویچ الیزا را نشان می‌دهد.

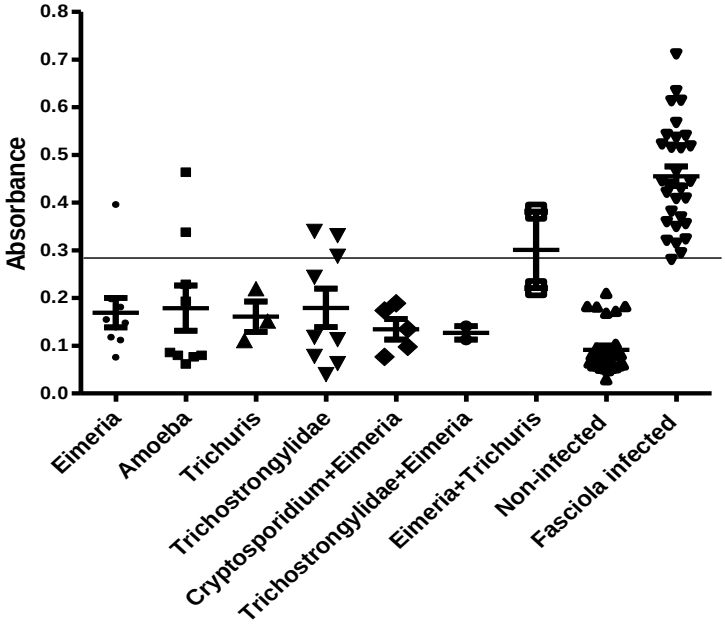
از بین ۳۰ نمونه مدفوع دام مبتلا به فاسیولا ۲۹مورد(۹٦/۷ درصد) مثبت و ۱ مورد(۳/۳ درصد) منفی و از بین ۳۰ نمونه مدفوع دام سالم همه موارد(۱۰۰ درصد) منفی بودند. هم‌چنین همه ۳۹ نمونه (۱۰۰ درصد) مدفوع دام مبتلا به سایر بیماری‌های انگلی با این روش منفی بودند. در مجموع میزان حساسیت کیت تجاری مورد استفاده جهت تشخیص فاسیولیازیس(۹۹/۹۲- ۸۲/۷۸ درصد CI: ۹۵درصد) ۹٦/٦۷درصد و ویژگی آن (۱۰۰- ۹٤/٤۸درصد CI: ۹۵درصد) ۱۰۰درصد محاسبه گردید. سطح زیر منحنی به منظور بررسی تفاوت بین نمونه‌های آلوده به فاسیولا و غیرآلوده به فاسیولا معنی‌دار بود(p<۰/۰۰۰۱ ، AUC=۱/۰۰). در بررسی بین تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا، فاسیولا ژیگانتیکا و تست ساندویچ الیزا با استفاده از کیت تجاری بیوکا ۲۰۱ هم‌خوانی بالایی(κ= ۰/۹۰) مشاهده شد.

بحث

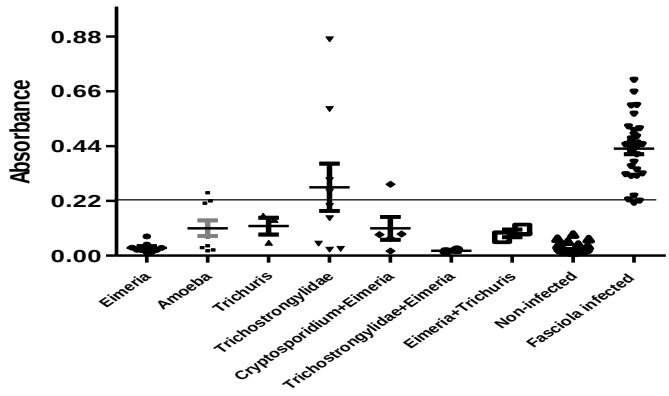
با توجه به این که در طی دو دهه گذشته بیشتر پژوهش‌های تشخیصی فاسیولیازیس بر روی شناسایی آنتی‌ژن‌های انگل در نمونه سرم و یا مدفوع متمرکز شده‌اند(۱۳) لذا هدف از این مطالعه تعیین و تشخیص کوپروآنتی ژن‌های فاسیولا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا بود.



شکل۱: الگوی RFLP محصولات PCR فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا با استفاده از آنزیم *Rsal*، ستون‌های ۳، ۸ و ۱۲ فاسیولا ژیگانتیکا و سایر ستون‌ها فاسیولا هپاتیکا



نمودار ۱: پراکندگی میزان جذب نوری نمونه‌های مدفوع آلوده به فاسیولا، آلوده به سایر بیماری‌های انگلی و دام‌های سالم با آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا در سیستم ساندویچ الیزا



نمودار۲: پراکندگی میزان جذب نوری نمونه‌های مدفوع آلوده به فاسیولا، آلوده به سایر بیماری‌های انگلی(به جز فاسیولا) و دام‌های سالم با آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا ژیگانتیکا در سیستم ساندویچ الیزا

در مطالعه حاضر آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا، جهت شناسایی کوپرو آنتی‌ژن‌های فاسیولا حساسیت(۹۶/۷درصد)، ویژگی(۸۹/۸۶ و ۹۱/۳ درصد) و هم‌خوانی بالایی(K= ۰/۹۰) نشان دادند. که از این نظر با پژوهش‌هایی از جمله؛ مطالعه آلام و همکاران جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های فاسیولا در نمونه مدفوع و سرم انسان و با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی ژن پروتئینی متصل شونده به اسید چرب و مطالعه الامیر و همکاران جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی فاسیولا در نمونه‌های مدفوع و سرم گوسفند و با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا ژیگانتیکا هم‌خوانی نشان داد(۱۵ و ۱٤). در مطالعه‌ای که به وسیله ابوالحکام و همکاران جهت تشخیص فاسیولیازیس در گاو با استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن پارامیوزین فاسیولا ژیگانتیکا و با روش ساندویچ الیزا صورت گرفت، حساسیت ۹۷/۳۳ درصد و ویژگی ۹۵درصد جهت شناسایی این آنتی‌ژن گزارش گردید(۱٦).

اتاالله و همکاران با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی - ترشحی فاسیولا ژیگانتیکا(۲۷ کیلودالتون) در روش ساندویچ الیزا به منظور تشخیص آنتی ژن ۲۷ کیلو دالتونی در حال گردش فاسیولا، حساسیت ۹۳/۳ درصد و ویژگی ۹۵درصد را گزارش کردند(۱۷). در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی تست ساندویچ الیزا با استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی - ترشحی فاسیولا ژیگانتیکا با دو مطالعه ابوالحکام و اتاالله هم‌خوانی نشان داد. تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا

حساسیتی یکسان و ویژگی پایین‌تری را در مقایسه با کیت تجاری BIOK 201 جهت تشخیص فاسیولیازیس نشان دادند. در کیت تجاری از آنتی‌بادی مونوکلونال جهت تشخیص کوپرو آنتی‌ژن‌های انگل استفاده شده است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال توانایی شناسایی یک اپی‌توپ از آنتی‌ژن را دارا هستند که این مساله منجر به افزایش ویژگی بالاتر آنها در تست‌های تشخیصی می‌شود. هم‌چنین استاندارسازی و بهینه کردن در طراحی کیت‌های تشخیصی بسیار مورد توجه شرکت‌های سازنده می‌باشد که این امر منجر به افزایش کارایی و اعتبار کیت‌های تشخیصی شده است. در پژوهش‌های مشابه دیگری استفاده از کیت‌های تجاری در مقایسه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های فاسیولا ویژگی بالاتری نشان داده‌اند(۱۹ و ۱۸، ۱۱). استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا در مطالعه شهاب و همکاران با روش ساندویچ الیزا، جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های در حال گردش انگل در افراد آلوده به فاسیولیازیس حاد و مزمن به ترتیب حساسیت ۱۰۰ و ۷۰ درصد را نشان داد(۲۰). فاسیولیازیس دارای دو فاز حاد و مزمن می‌باشد. زمانی که انگل ساکن مجاری صفراوی باشد تخم انگل به صورت متناوب در مدفوع دفع می‌شود. در مطالعه حاضر تمامی نمونه‌های مدفوع تهیه شده از دام‌های آلوده به فاسیولا از نظر میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند و از نظر حضور تخم مثبت ارزیابی شدند. بنابراین دام‌هایی که در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفتند به دلیل دفع تخم در مدفوع در مرحله مزمن بیماری قرار داشتند. در مطالعه حاضر استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های انگل در نمونه مدفوع دام‌هایی که در مرحله مزمن بیماری قرار گرفته بودند در مقایسه با مطالعه ذکر شده حساسیت بیشتری نشان داد. در مرحله مزمن احتمال حضور آنتی‌ژن‌های انگل در نمونه مدفوع بیشتر از نمونه‌های دیگر از جمله سرم می‌باشد. شاید استفاده از نمونه مدفوع به جای نمونه سرم در مرحله مزمن بیماری مناسب‌تر باشد و احتمال تشخیص بیماری و حساسیت تشخیصی تست را افزایش دهد. در مطالعه حاضر تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا با تعدادی از نمونه‌های آلوده به انگل‌های خانواده تریکواسترونژیلوئیده و تعدادی از نمونه‌های دارای آلودگی‌های آمیبی و آیمریا نیز واکنش متقاطع داشتند. این احتمال مطرح است که اپی‌توپ‌های مشترک بین این انگل‌ها و فاسیولا وجود داشته باشند. وجود اپی‌توپ‌های مشترک می‌تواند سبب کاهش ویژگی تست تشخیصی گردد. از آنجایی که آنتی‌بادی‌های پلی کلونال بر علیه تعداد زیادی اپی‌توپ انگل تولید می‌شوند، و وجود اپی‌توپی‌های مشترک بین انگل‌های مختلف محتمل می‌باشد، بنابراین ویژگی تست‌های الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در مقایسه

با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال پایین تر است(۱۸). هم‌چنین در مطالعه مشابه دیگری جهت تشخیص کوپرو آنتی‌ژن‌های فاسیولا، نتایج مثبت کاذب در نمونه‌های آلوده به کوکسیدیا و انگلهای نماتودی گزارش گردید(۱۹). در مطالعه حاضر حساسیت یکسان و ویژگی تقریباً مشابهی در بررسی تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی ـ ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا مشاهده گردید. در پژوهش‌های دیگر در بررسی الگوی پروتئینی آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی دو گونه هپاتیکا و ژیگانتیکا با روش SDS-PAGE تشابه زیادی مشاهده گردیده است. باندهای ۱٤، ۱۵، ۱۸ ،۲۷، ۲۹، ٤۸ و ۷۲ کیلو دالتونی به صورت مشترک در هر دو گونه و باندهای ۱۹، ٤۵ و ۵۸ تنها در آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا گزارش شده‌اند(۲۲-۲۱). این تشابه آنتی‌ژنی می‌تواند دلیل نتایج مشابه تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا باشد.

در این مطالعه جهت تولید آنتی بادی پلی‌کلونال، اکثر مواد و محلول‌های مورد استفاده از شرکت سیگما تهیه شدند، با توجه به تحریم‌های موجود، تهیه این مواد نیازمند زمان و هزینه زیادی بودند. هم‌چنین برای ارزیابی تست‌های الیزای طراحی شده به علت محدودیت تهیه نمونه‌های انسانی از نمونه‌های دامی استفاده گردید. زیرا تهیه نمونه‌های مدفوع انسانی آلوده به فاسیولیازیس حاوی تخم انگل بسیار سخت و می‌باشد. از دیگر محدودیت‌های مهم این مطالعه کار با حیوانات آزمایشگاهی بود که مرگ و میر و تلف شدن آنها در طی کار مشکلاتی را به دنبال داشت.

هم‌چنین ارزیابی تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی ـ ترشحی فاسیولا جهت تشخیص فاسیولیازیس بر روی تعداد نمونه‌های بیشتر آلوده به فاسیولا از مناطق مختلف کشور و ارزیابی تست‌های ساندویچ الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی ـ ترشحی فاسیولا بر روی نمونه‌های آلوده به سایر بیماری‌های انگلی با تنوع و تعداد بیشتر جهت پژوهش‌های آینده پیشنهاد می‌شوند.

نتیجه‌گیری

در مجموع یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان دادند که آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه آنتی‌ژن دفعی- ترشحی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا دارای کارایی مناسبی جهت شناسایی کوپرو آنتی‌ژن‌های فاسیولا و تشخیص فاسیولیازیس با استفاده از سیستم ساندویچ الیزا می‌باشند. همچنین به منظور بررسی دقیق کارایی سیستم ساندویچ الیزای طراحی شده برای تشخیص فاسیولیازیس انسانی، نمونه‌های مدفوع انسانی آلوده

به فاسیولا به تعداد مناسب بایستی مورد ارزیابی قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری تخصصی رشته انگل‌شناسی پزشکی با کد ۹۲-۶۸۰۸ از دانشگاه علوم پزشکی شیراز می‌باشد. محققین این مطالعه از معاونت تحقیقات و فناوری به سبب حمایت‌های مالی تشکر و قردانی می‌نمایند.

REFERENCES

1.Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, et al. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. Microb Pathog 2017; 109: 253-262.
2.Fürst T, Keiser J, Utzinger J. Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2012; 12 (3): 210-21.
3.Webb CM, Cabada MM. Recent developments in the epidemiology, diagnosis, and treatment of Fasciola infection. *Curr Opin Infect Dis* 2018; 31(5): 409-414.
4.Cwiklinski K, Dalton JP. Advances in fasciola hepatica research using 'omics' technologies. Int J Parasitol 2018; 48 (5): 321-31.
5.Ghosh S, Rawat P, Velusamy R, Joseph D, Gupta SC, Singh BP. 27 kDa fasciola gigantica glycoprotein for the diagnosis of prepatent fasciolosis in cattle. Vet Res Commun 2005; 29 (2): 123-35.
6.Kumar N, Ghosh S, Gupta SC. Early detection of Fasciola gigantica infection in buffaloes by enzyme-linked immunosorbent assay and dot enzyme-linked immunosorbent assay. Parasitol Res 2008; 103 (1): 141-50.
7.Rokni MB, Massoud J, O'Neill SM, Parkinson M, Dalton JP. Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44(2): 175-9.
8.Anuracpreeda P, Wanichanon C, Chawengkirtikul R, Chaithirayanon K, Sobhon P. Fasciola gigantica: immunodiagnosis of fasciolosis by detection of circulating 28.5 kDa tegumental antigen. Exp Parasitol 2009; 123 (4): 334-40.
9.Velusamy R, Singh BP, Sharma RL, Chandra D. Detection of circulating 54 kDa antigen in sera of bovine calves experimentally infected with F. Vet Parasitol 2004; 119 (2-3): 187-95.
10.Demerdash ZA, Diab TM, Aly IR, Mohamed SH, Mahmoud FS, Zoheiry MK, et al. Diagnostic efficacy of monoclonal antibody based sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Fasciola gigantica excretory/secretory antigens in both serum and stool. Parasit Vectors 2011; 4: 176.
11.Calvani NED, George SD, Windsor PA, Bush RD, Šlapeta J. Comparison of early detection of Fasciola hepatica in experimentally infected Merino sheep by real-time PCR, coproantigen ELISA and sedimentation. Vet Parasitol 2018; 251: 85-9.
12.Valero MA, Ubeira FM, Khoubbane M, Artigas P, Muiño L, Mezo M, et al. MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with Fasciola hepatica and F. Vet Parasitol 2009; 22: 159(1): 77-81.
13.Hotez PJ, Savioli L, Fenwick A. Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(2): e1475.
14.El Amir A, Rabee I, Kamal N, El Deeb S. Evaluation of the diagnostic potential of different immunological techniques using polyclonal antibodies against Fasciola gigantica excretory/secretory antigens in sheep. Egypt J Immunol 2008; 15(1): 65-74.
15.Allam G, Bauomy IR, Hemyeda ZM, Sakran TF. Evaluation of a 14.5 kDa-Fasciola gigantica fatty acid binding protein as a diagnostic antigen for human fascioliasis. Parasitol Res 2012; 110(5): 1863-71.
16.Abou-Elhakam HM, Bauomy IR, El Deeb SO, El Amir AM. Immunodiagnosis of fascioliasis using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Fasciola gigantica paramyosin antigen. Trop Parasitol 2013; 3 (1): 44-52.
17. Attallah AM, Bughdadi FA, El-Shazly AM, Ismail H. Immunodetection of Fasciola gigantica circulating antigen in sera of infected individuals for laboratory diagnosis of human fascioliasis. Clin Vaccine Immunol 2013; 20(10): 1569-77.
18.Abdolahi Khabisi S, Sarkari B, Moshfe A, Jalali S. Production of monoclonal antibody against excretory-secretory antigen of fasciola hepatica and evaluation of its efficacy in the diagnosis of fascioliasis. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 2017; 36(1): 8-14.
19.Kajugu PE, Hanna RE, Edgar HW, McMahon C, Cooper M, Gordon A, et al. Fasciola hepatica: Specificity of a coproantigen ELISA test for diagnosis of fasciolosis in faecal samples from cattle and sheep concurrently infected with gastrointestinal nematodes, coccidians and/or rumen flukes (paramphistomes), under field conditions. Vet Parasitol 2015; 212(3-4): 181-7.

20.Shehab AY, Hassan EM, Basha LM, Omar EA, Helmy MH, El-Morshedy HN, et al. Detection of circulating E/S antigens in the sera of patients with fascioliasis by IELISA: a tool of serodiagnosis and assessment of cure. Trop Med Int Health 1999; 4(10): 686-90.
21.Sabry M, Taher E, Farag Allah N, Mahgoub A. Diagnosis of f*asciola* infection by SDS–PAGE eluted excretory secretory(ES) protein fractions using dot-ELISA. Int J Vet Sci 2014; 2(2): 130-5.
22.Abdolahi Khabisi S, Sarkari B. Detection of *fasciola hepatica* and *fasciola gigantica* common and uncommon antigens, using rabbit hyper immune serum raised against their excretory-secretory and somatic antigens. J Parasit Dis 2016; 40(4): 1552-7.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Detection of *Fasciola* Coproantigens Using Polyclonal Antibodies Produced Against *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Secretory Excretory Antigens

Abdollahi Khabisi S[1]*, Sarkari B[2]

[1]Department of Parasitology and Mycology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran, [2]Department of Parasitology and Mycology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 24 Aug 2021 Accepted: 14 Des 2021

Abstract:

Background & aim: Parasitological methods for diagnosing fascioliasis have limitations such as; Intermittent excretion of parasite eggs is the long stage of presence of parasite eggs in the feces. Also, serological methods based on the detection of antiparasitic antibodies are not able to distinguish past infections from new infections, so the detection of parasitic co-antigens is more reliable than other diagnostic methods. Therefore, the aim of the present study was to determine and detect *Fasciola* coproantigens using polyclonal antibodies produced against *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* secretory excretory antigens.

Methods: In the present experimental study conducted in 2016-2017, adult *Fasciola* worms were collected from the livers of infected animals and species were determined by molecular method of enzymatic digestion. Excretory-secretory antigen was prepared from both *Fasciola* species. In order to produce polyclonal antibodies, 2 rabbits were immunized for each antigen. IgG antibodies produced were purified by affinity chromatography and conjugated with peroxidase enzyme. Coproantigens from 99 animal fecal samples included; 30 samples infected with *Fasciola*, 39 samples with other parasitic diseases and 30 healthy samples were prepared. In the present study, two ELISA sandwich systems were designed and evaluated using polyclonal antibodies produced to identify *Fasciola* co-antigen. Statistical characteristics of the tests were calculated using Medical Collector 16.4.3 software. Kappa coefficient and consistency check between ELISA sandwich tests were calculated using SPSS software version 20.

Results: Sandwich ELISA test using polyclonal antibodies produced against *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* secretory antigens showed 96.67%, 89.86% and 96.67% and 91.3%, respectively. Moreover, a high agreement (kappa coefficient <0.9) was observed between polyclonal antibodies produced against both *Fasciola* species for the diagnosis of fascioliasis.

Conclusion: Overall, the findings indicated that polyclonal antibodies produced against excretory-secretory antigens of both *Fasciola* species have good efficacy for detection of *Fasciola* co-antigens and diagnosis of fascioliasis.

Keywords: Coproantigen, *Fasciola*, Excretory-secretory antigen

***Corresponding Author: Abdollahi Khabisi S,** Department of Parasitology and Mycology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
Email: samanekhabisi@gmail.com

Please cite this article as follows: Abdollahi Khabisi S, Sarkari B. Detection of *Fasciola* Coproantigens Using Polyclonal Antibodies Produced Against *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Secretory Excretory Antigens. Armaghane-danesh 2022; 27(2):170-184.