# طراحی روش الایزای غیرمستقیم برای بررسی آنتی‌بادی‌های سرمی در گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکم

**دکتر هاشمی تبار غلامرضا[1]، دکتر نعیمی‌پور محسن[2]، دکتر نقیبی ابوالقاسم[1]**

*1- دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد.*

*2- دانشجوی دکترا بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد.*

## چکیده

امروزه الایزا بعنوان یکی از بهترین روشهای آزمایشگاهی- تحقیقاتی برای تشخیص بیماریها در جهان می‌باشد. این روش از حساسیت[1] و ویژگی[2] بسیار بالایی برخوردار است تا بدانجا که هم اکنون الایزا روش اصلی در زمینه های مختلف علوم حیاتی از شناسایی و تشخیص ویروسها، باکتریها و انگلهای پروتوزوا و متازوآ گرفته تا شناسایی مقادیر بسیار کم هورمونها و مولکولهای حیاتی در پزشکی بالینی و آزمونهای تحقیقاتی می‌باشد. دراین مطالعه تهیه وراه‌اندازی کیت الایزا جهت تشخیص دیکروسلیوم دندریتیکم درگوسفندان مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد 50 نمونه سرم گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکم که آلودگی آنها در بازرسی لاشه در کشتارگاه به اثبات رسیده بود، جمع آوری شد. همچنین تعداد 11 نمونه سرم غیرآلوده به دیکروسلیوم از بره های2 تا3 ماهه که در بازرسی لاشه علائمی از وجود دیکروسلیوم در کبد دیده نشد، جمع‌آوری شد. نمونه‌های سرمی با روش الایزا غیرمستقیم و با استفاده از آنتی‌ژن‌های ترشحی و سوماتیک مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که از تعداد 50 نمونه سرم آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکم، تعداد46 نمونه واجد جذب نوری مثبت واقعی بودند. همچنین در 11 نمونه سرمی منفی تعداد 9 نمونه واجد جذب نوری منفی واقعی بودند. با توجه به نتایج بدست آمده، حساسیت و ویژگی در این تست بترتیب 92% و81% بود که نشان داد تست الایزا یک تکنیک قابل اعتماد برای تشخیص عفونت با دیکروسلیوم دندریتیکم در گوسفندان آلوده به این انگل می‌باشد.

**کلمات کلیدی: الایزا،آنتی‌ژن‌های ترشحی و سوماتیک، دیکروسلیوم دندریتیکم**

## مقدمه

آلودگی به دیکروسلیوم دندریتیکم، انتشار جهانی داشته (اروپا،آسیا، آمریکا وآفریقای شمالی) و میزان آلودگی با توجه به آب و هوای منطقه و میزبانهای واسط متفاوت می‌باشد. در مناطقی از اروپا (اسپانیا) میزان آلودگی تا 63/6 درصدگزارش شده است. دیکروسلیوم یکی از ترماتودهای کبدی شایع حیوانات در ایران می‌باشد و سالیانه خسارتهای اقتصادی فراوانی به کشورهای مختلف وارد می نماید(3). آلودگی مزمن دامها به دیکروسلیوم دندریتیکم باعث سیروز کبدی پیشرونده و کاهش تولیدات دامی (پشم ،شیر) می‌شود. همچنین تعداد زیادی کبد آلوده ضبط و معدوم می شود که خسارت مالی زیادی وارد می‌کند(3).

تشخیص در دامهای زنده با مشاهده تخمهای قهوه ای کوچک در مدفوع انجام می‌گیرد. از آنجا که تعداد تخم در مدفوع نسبتا کم میباشد، بنابراین امکان تشخیص آلودگی با شدت کم مشکل و یا امکان پذیر نمی باشد. با تکوین تست الایزا و تشخیص زود هنگام آلودگی و درمان به موقع می‌توان از خسارات وارده جلوگیری نمود. همچنین روش الایزا به عنوان روش مناسب جهت مطالعات اپیدمیولوژیک تشخیصی مورد استفاده قرار میگیرد که در مدت زمان کم با دقت و کارایی بالایی میتوان تعداد زیادی نمونه را مورد آزمایش قرار دهد(2).

## مواد و روش کار

جداکردن کرمهای بالغ دیکروسلیوم از کبدهای آلوده به دیکروسلیوم، قراردادن در داخل PBS(فسفات بافرسالین)

به مدت یک ساعت در دمای اتاق، چندین بارشستشو با PBS ، هموژن کردن توسط دستگاه هموژنایزر، سونیکت کردن در مجاورت یخ در دستگاه سونیکاتور، اضافه کردن ممانعت کننده پروتئاز، سانتریفوژ با دور 10000rpm به مدت 30 دقیقه و برداشت مایع رویی ، محاسبه غلظت پروتئین‌ها و ذخیره سازی در 20- درجه(1).

جداکردن کرم‌های تازه و بالغ دیکروسلیوم از کبدهای آلوده به دیکروسلیوم ، قراردادن در داخل PBSبه مدت یک ساعت، شستشو با PBS غنی شده با جنتامایسین، کشت در محیط RPMI 1640 غنی‌شده ( Hepes، بی‌کربنات سدیم N- acetyl-l- alanine-L- glutumine، و جنتامایسین) انکوبه در دمای 37 درجه حاوی Co2 5% به مدت 48 ساعت ، اضافه کردن ممانعت کننده پروتئاز، سانتریفوژ با دور 10000rpm به مدت 30 دقیقه، عبور مایع رویی ازفیلترهای با قطر منافذ 0/22µm ، سانتریفوژ با دور 5000rpm به مدت 10 دقیقه و محاسبه غلظت پروتئینها(1).

## مراحل الایزا

1) پوشش دادن کف چاهک های الیزا با آنتی ژن : بر روی آنتی‌ژن های دیکروسلیوم عمل تیتراسیون صورت گرفت سپس 100 µl از آنتی ژن محلول در بافر پوششی (بافر کربناتCoating Buffer PH. 9/6) را به هر چاهک اضافه سپس پلیت الیزا بمدت 1ساعت در دمای 37 درجه وسپس در یخچال که دمای آن 4 ° C بود به مدت یک شب قرار داده شد. این کار به منظور اتصال بهتر آنتی ژن ها به کف چاهک انجام شد.

2) شستشوی چاهک ها با بافر شستشو: بعد از اینکه آنتی ژن در چاهک ها به مدت یک شب ماند، پلیت الایزا از یخچال خارج شد و چاهک ها را 5 بار و هر بار به مدت 5 دقیقه با بافر شستشو (بافر فسفات سالین به همراه0/05% توئین 20 PBST) به صورت دستی شستشو داده شد.

3) مرحله بلوک کردن: در این مرحله 200µl ازبافربلوکینگ (5درصد شیر بدون چربی محلول در فسفات بافر سالین به همراه توئین 0/05 درصد) به چاهک ها اضافه شد و بمدت 1ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد.

4) اضافه کردن سرم: سرم های مورد نظر را به نسبتهای 1/1.50/20و1/100 در محلول PBSTرقیق کرده و به مقدار 100µl به هر چاهک اضافه شد و بمدت 1ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد. در هر پلیت دو چاهک به عنوان بلانک (فاقد سرم)، 4چاهک به عنوان کنترل منفی (اضافه کردن سرم بره های

[1] Sensitivity
[2] Specificity

زیر یک هفته)، 4چاهک به عنوان کنترل مثبت (اضافه کردن سرم گوسفندان به شدت آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم وعدم آلودگی با سایر انگل ها در بازرسی کبدهای گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم ) و هر نمونه سرمی دردو چاهک ریخته شد.

5) مرحله شستشو: مانند مرحله شتشوی قبلی عمل شد.

6) اضافه کردن آنتی بادی ثانویه: آنتی بادی ثانویه به نسبتهای 1/1000، 1/2000 و 1/5000 رقیق شد و به مقدار 100µl به هر چاهک اضافه شد( بطوریکه هر رقت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت) و بمدت 1ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد.

7) مرحله شستشو: مانند مرحله شتشوی قبلی عمل شد.

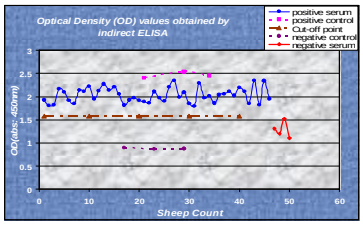
8) اضافه کردن سوبسترا کروموژن: مقدار 100µl محلول سوبسترا کروموژن که حاوی $TMB/H_2O_2$ می باشد به هر چاهک اضافه گردید سپس بمدت 20 دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار داده شد.

9) اضافه کردن محلول متوقف کننده: مقدار 100µl محلول متوقف کننده که حاوی اسید سولفوریک1نرمال می باشد به هر چاهک اضافه گردید.

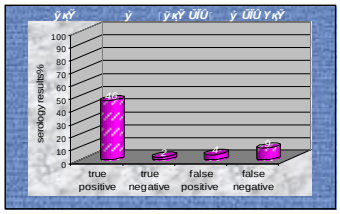
10) خواندن جذب نوری توسط الایزا ریدر: پس از متوقف شدن آزمایش، پلیت ها بلافاصله در جذب نوری 450 نانومتر قرائت گردید.

## نتایج و بحث

بهترین نتایج در توسعه و تکوین کیت با غلظت آنتی ژنی (پیکری و سوماتیک) 4µl/ml ، رقت سرمی 1/20 و رقت کنژوگه 1/5000 بدست آمد. در50 نمونه خون آلوده به دیکروسلیوم 46 عدد از سرمها در آزمایش الایزا مثبت ارزیابی شد و 4عدد منفی بود.Cut off point محاسبه شده برای آنتی‌ژنهای سوماتیک 1/576 و برای آنتی‌ژنهای ترشحی 1.658 بود که نشان داد میزان حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن ترشحی بیشتر است. حساسیت و ویژگی تست بترتیب 92% و81% بود. از بین روشهای سرولوژیکی روش الایزا به علت اینکه بطور همزمان ودر مدت کمی می تواند تعداد بسیار زیادی از نمونه را مورد آزمایش قرار دهد و از حساسیت بالایی در تشخیص زود هنگام بیماری برخوردار است، بیشتر مورد مطالعه قرارگرفته است. در مطالعه Sanchez-Andrade حساسیت و ویژگی آزمایش الایزای غیرمستقیم بترتیب 86% و 93% بود (5). در مطالعه Samisimsek و همکاران حساسیت تست نیز 86% برآورد شده است ولی ویژگی تست پایین بود (4). بر طبق تعداد زیادی از مطالعات الایزا یک تست موثر و دقیق در تشخیص زود هنگام دیکروسیلیوزیس می‌باشد(1،4،5).




شکل1: OD بدست‌آمده با روش الایزا غیرمستقیم




شکل2: مقادیر مثبت واقعی، منفی واقعی، مثبت کاذب، منفی کاذب

## References

1. Gonzalez-Lanza C., Manga-Gonzalez M.Y., Campo R., Del-Pozo P., Sandoval H., Oleaga A & Ramajo, V., (2000) IgG antibody response to ES or somatic antigens of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. Parasitol Res **86**: 472–479

2. John R. Crowther. The ELISA Guidebook (2002) *Humana press Totowa*. New Jersey **149**: 54-74

3. Manga-Gonzàlez M.Y., Gonzàlez-Lanza C & Del-Pozo-Carnero P., (1991) Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in porma basin (Leòn, Nw Spain). Ann Parasitol Hum Comp **66**: 57–61

4. Sami S., Ergun K & Armagan E., (2006) Application of Western Blotting and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* in Sheep Using Excretory Secretory (E/S) Antigens. Turk J Vet Anim Sci **30**: 113-119

5. Sanchez-Andrade R., Paz-Silva A., Surez J.L., Arias M., Lopez C., Morrando P & Scala A., (2003) Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep from Sardinia (Italy). Prev Vet Med **57**: 1-5

## Development of an indirect ELISA to survey Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep

**Hashemitabar, GH. R. Naeemipour, M. Naghibi, A.**
*Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.*

At the present time, ELISA is one of the best methods for detection of diseases in the world. This method has high specificity and sensitivity and at the moment is the main method for detection of viruses, bacteria and protozoa. Also by this method it is possible to detect a less amount of hormones and so on. In the present study, ELISA kit has been developed to diagnosis infected sheep with *Dicrocoelium dendriticum*. Sera were collected from 50 infected sheep with Dicroceliosis proven by inspection of *Dicrocoelium. dendriticum* in livers of the sheep slaughtered in abattoir of Mashhad. Also 11 sera were taken from three month years old healthy lambs which were not infected with *Dicrocoelium. dendriticum*. Sera were tested with indirect ELISA, in which somatic and excretory-secretory proteins form *Dicrocoelium. dendriticum* were used as antigen. The result showed that from 50 sera samples, 46 samples were positive absorbance. Also from 11 healthy samples, 9 of them showed negative absorbance value. The sensitivity and specificity of test were %92 and %81 respectively. It is concluded that ELISA test is an authentic test for diagnosis of infected sheep with *Dicrocoelium. dendriticum*.
**Keywords: ELISA, somatic and excretory-secretory antigens, *Dicrocoelium. Dendriticum*.**