

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
بَدَأَ خَلْقَ الْإِنسَانِ مِنْ
تَلْحُمٍ أَكْفَرًا
لِئَلَّامُنْذِرًا
فَلْيَتَذَكَّرِ الْإِنسَانُ
وَمَا كُنَّا بِعَبْدٍ لَكَ
مُعْتَدِينَ
لَقَدْ عَلَّمْنَاهُ الْأَقْبَابَ
وَمَا كُنَّا بِعَبْدٍ لَكَ
مُعْتَدِينَ
لَقَدْ عَلَّمْنَاهُ الْأَقْبَابَ
وَمَا كُنَّا بِعَبْدٍ لَكَ
مُعْتَدِينَ



Diagnosis of fasciolosis

MB Rokni

A decorative graphic consisting of several parallel white lines of varying lengths, slanted upwards from left to right, located in the bottom right corner of the slide.

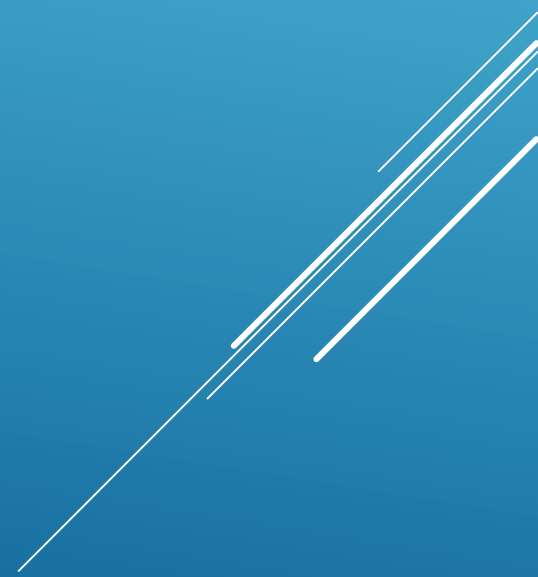
Methods

- ▶ **Stool exam**
- ▶ **ELISA**
- ▶ **Fast-ELISA**
- ▶ **Dig-ELISA**
- ▶ **IFA**
- ▶ **EITB or Western Blot**
- ▶ **CIEP**
- ▶ **DOT-ELISA**
- ▶ **IHA**
- ▶ **And so on.....**



Egg

- ✓ تخم در محیط مرطوب مثل مدفوع ۲ تا ۳ ماه باقی میماند.
- ✓ در خشکی در عرض چند ساعت می میرد.



تشخیص

تشخیص قطعی آلودگی معمولاً "با دیدن تخم انگل در مدفوع تحقق می پذیرد اما این روش بدلائل زیر از حساسیت کافی برخوردار نیست :

دوره کمون الودگی

کمبود تخم در مدفوع و متناوب بودن دفع تخم توسط انگل

آلودگی ترانزیت

جهت آزمایش مدفوع بیمار حداقل ۵ روز نباید جگر مصرف کرده باشد

عنوان نشریه: مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان : پاییز و زمستان ۱۳۷۹ , دوره ۹ , شماره ۳۶-۳۵ ; از صفحه ۱ تا صفحه ۵ .

عنوان مقاله: مقایسه دو روش انگل شناسی (فرمالین- اتر و کاتو) در تشخیص فاسیولیازیس انسانی

نویسندگان: فرقان پرست کامبیز, اشرفی کیهان

نمونه مدفوع 184 بیمار مشکوک به فاسیولیازیس یکبار و 69
نفر سه بار آزمایش شد:
الف: به روش فرمالین اتر
ب: به روش کاتو

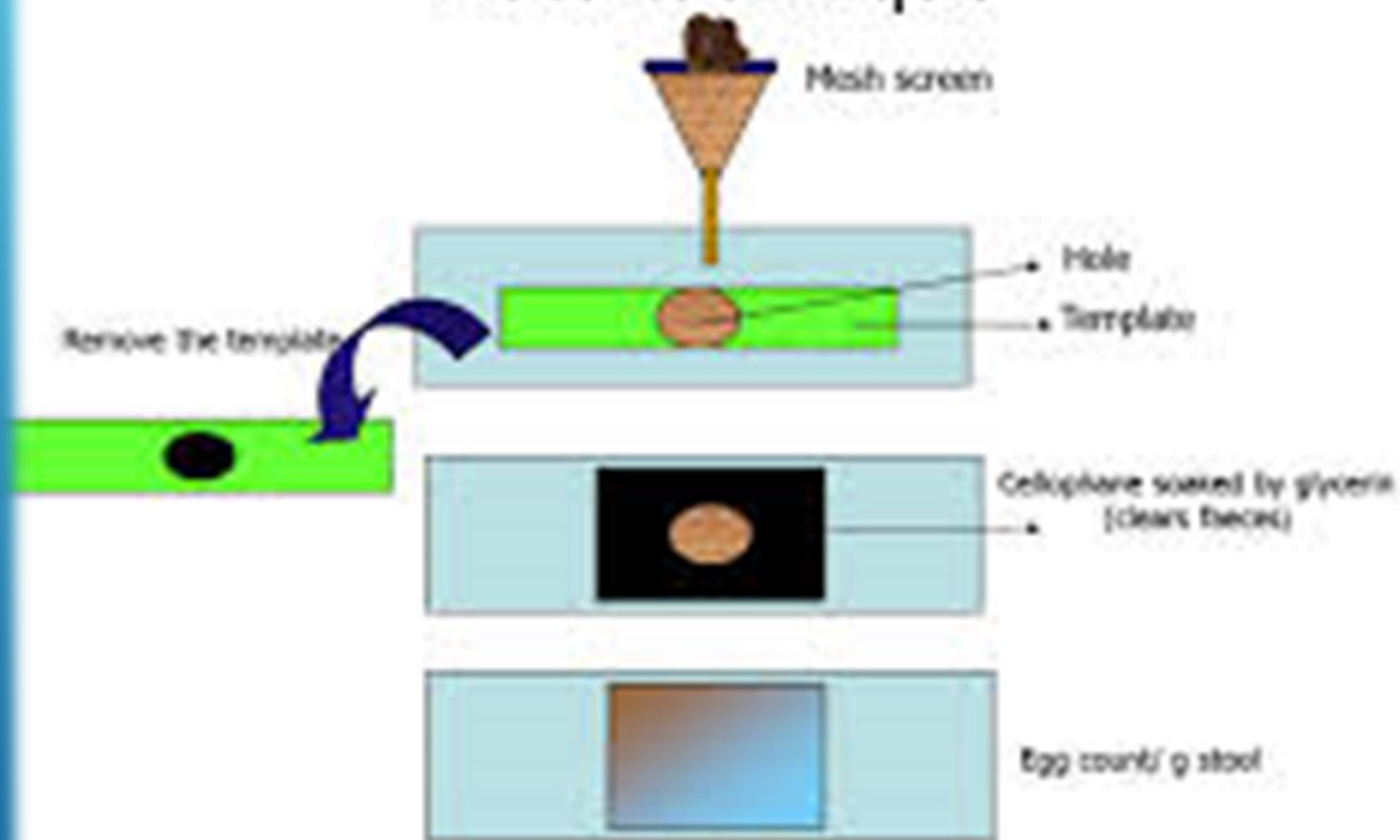
میزان توافق دو روش در مورد 184 نمونه 0.78 (بسیار خوب)
در بخش دوم میزان توافق به 0.98 (عالی) افزایش یافت.

روش کاتو

- ✓ یک گسترش ۵۰ میلیگرم از مدفوع تازه بر روی یک لام قرار گرفته و با یک نوار سلوفان رطوبت‌پذیر ۲۲ در ۳۰ میلیمتری پوشانده می‌شود.
- ✓ این نوار بمدت ۲۴ ساعت در ۱۰۰ میلی لیتر گلیسرین-مالاشیت گرین خالص و ۱۰۰ میلیلیتر آب خیس خورده است.
- ✓ با وارونه کردن لام آنقدر به سطح آن فشار وارد می‌شود تا تمام نمونه سطح لام را بپوشاند.
- ✓ گسترش بمدت یک ساعت به حال خود رها می‌شود تا شفاف شود

STOOL EXAMINATION

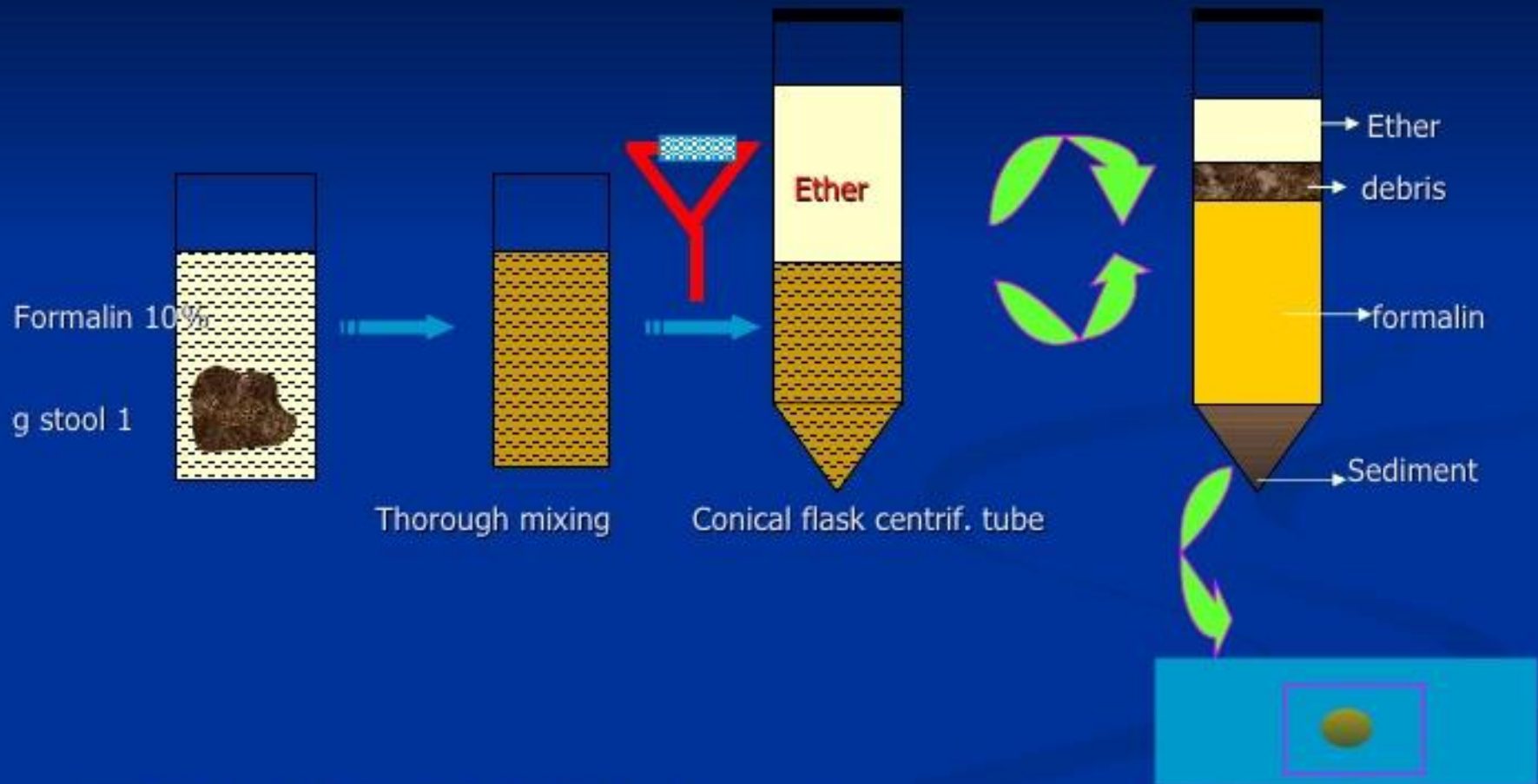
Kato technique



Egg count of: Ascari, T. trich, Hookworms, S. mansoni

STOOL EXAMINATION

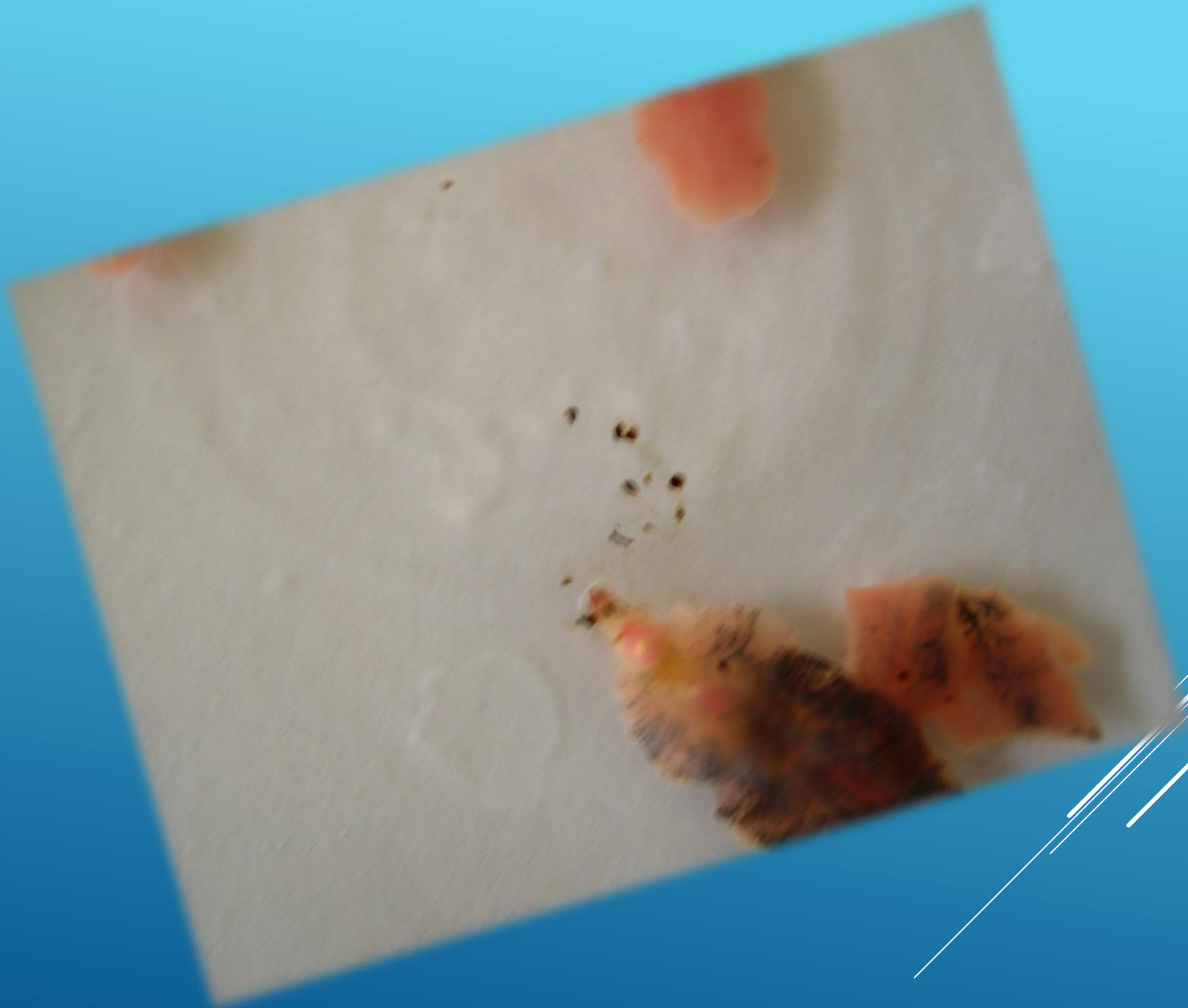
. Formol Ether Sed. Conc



- Ether adsorbs fecal debris & floats.
- Formalin fixes & preserves the specimen.

KINDS OF *FASCIOLA* ANTIGENS

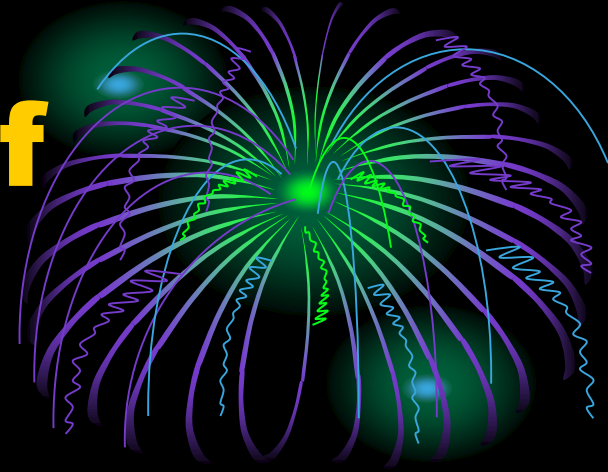
- ✓ Homogenate- Crude-Figurate- Somatic
- ✓ Excretory-Secretory (E-S)
- ✓ Semi purified
- ✓ Cysteine proteinase
- ✓ Cathepsin L1
- ✓ Peptide
- ✓ Recombinant
- ✓ Circulating antigens



ELISA



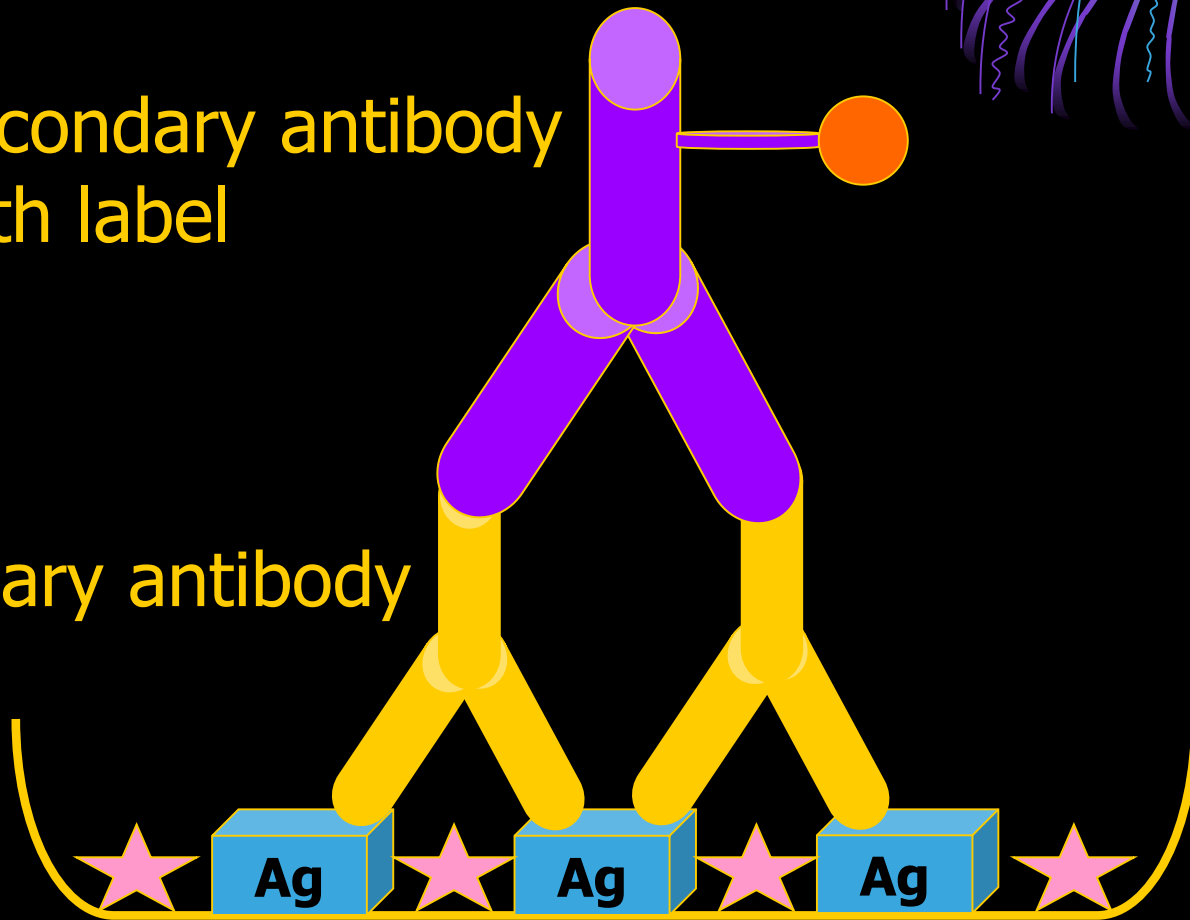
Basic principles of ELISA.



Secondary antibody with label

Primary antibody

Antigen



Microtitre plate well

Block unbound sites



	Sensitivity	Specificity
Somatic	100%	97%
E/S	100%	98.5%
CP	100%	98.5%
CL1	100%	99%

FASCIOLA HEPATICA
Rokni et al

	Sensitivity	Specificity
Somatic	100%	96.4%
CP	100%	97.2%
CL1	100%	98.1%

FASCIOLA GIGANTICA

Rokni et al

	Sensitivity	Specificity
E/S	100%	98%

Khalili et al

- ▶ **Fas2-ELISA exhibited 95% sensitivity and 100% specificity.**
- ▶ **The high antigenicity of Fas2 is suggested by the fact that antibodies to Fas2 rise rapidly by 1-2 weeks of infection.**

FAS2-ELISA IN THE DETECTION OF HUMAN INFECTION BY FASCIOLA HEPATICA.

- ▶ ELISA: sensitivity =100%
- ▶ No cross-reaction was seen

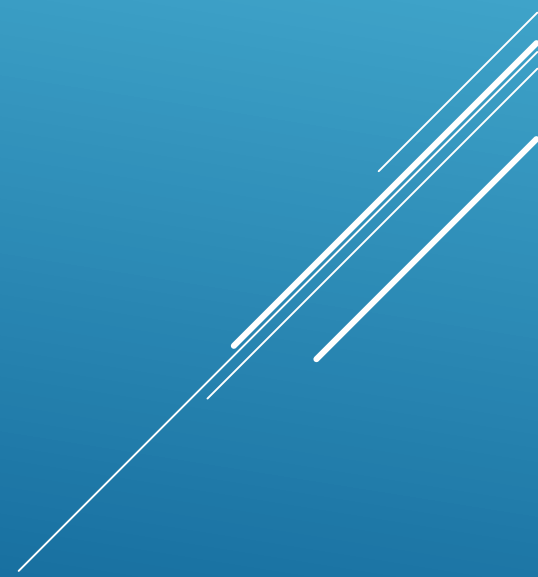
- ▶ Espino (61)


KESMAT MAHER (92)

ELISA (HOMOGENATE AG)

	IgG1	IGg4
Sensitivity	100%	100%
Specificity	56.2%	97%

Fast-ELISA



- ▶ **FAST-ELISA from Cajamarca, Peru.**
 - ▶ **Four children negative parasitologically were negative by FAST-ELISA. All 13 children found positive parasitologically were also positive by FAST-ELISA for 100% sensitivity.**
 - ▶ **Twelve of the 13 infected children seroreverted 4 months post therapy showing lower antibody levels as compared with the pretreatment sample.**
- 

آزمایش IFA



تاریخچه:

- ❖ در سال 1964 برای اولین بار تکنیک ایمونوفلورسانس در تشخیص کیست هیداتید به کار گرفته شد.
- ❖ امبروز -توماس از آنتی ژن فیگوره در عضله مخطط حیوانات آزمایشگاهی جهت تکنیک فوق استفاده نمود.
- ❖ و بالاخره جنبه های بالینی بیماری در اوایل قرن بیستم روشن گردید و تحقیقات وسیع اپیدمیولوژیک پارازیتولوژیک ایمونولوژیک و ژنتیک و... روی بیماری آغاز گردیده و ادامه دارد. حساسیت این روش 96- 76% و ویژگی آن 85-75% گزارش شده است

روش تهیه آنتی ژن فیگوره



- تهیه ساندویچ عضله خرگوش و پروتو اسکولکس

- تهیه برش با دستگاه میکرو توم

- انتقال برشها به روی لامها

- قرار دادن لامها در فریزر $^{\circ}20-$

مرحله اول انجام آزمایش IFA



رقیق کردن سرماها به رقت 10/1 با بافر فسفات $pbs=7.2$

- ❖ بیرون آوردن لامها و شماره گذاری آنها
- ❖ قرار دادن لامها درون استن 10 دقیقه
- ❖ قرار دادن لامها در محفظه مرطوب
- ❖ اضافه نمودن سرماها به نمونه های بافتی روی لام
- ❖ انکوبه کردن در 37 درجه به مدت 30 دقیقه
- ❖ بیرون آوردن لامها و دو بار شستشوی آنها
- ❖ در انتهای این مرحله چنانچه آنتی بادی در سرم موجود باشد بر روی بافت متصل شده و در مراحل شستشو از بین نمی رود

مرحله دوم آزمایش



رفیق کردن کنژوگه به میزان 10/1 با بافر و اضافه نمودن 4 قطره اوانس بلو به ازاء هر قطره

لامها را مجددا در محفظه مرطوب قرار میدهیم

اضافه نمودن کنژوگه بر روی بافتها

انکوبه کردن به مدت 30 دقیقه در 37 درجه

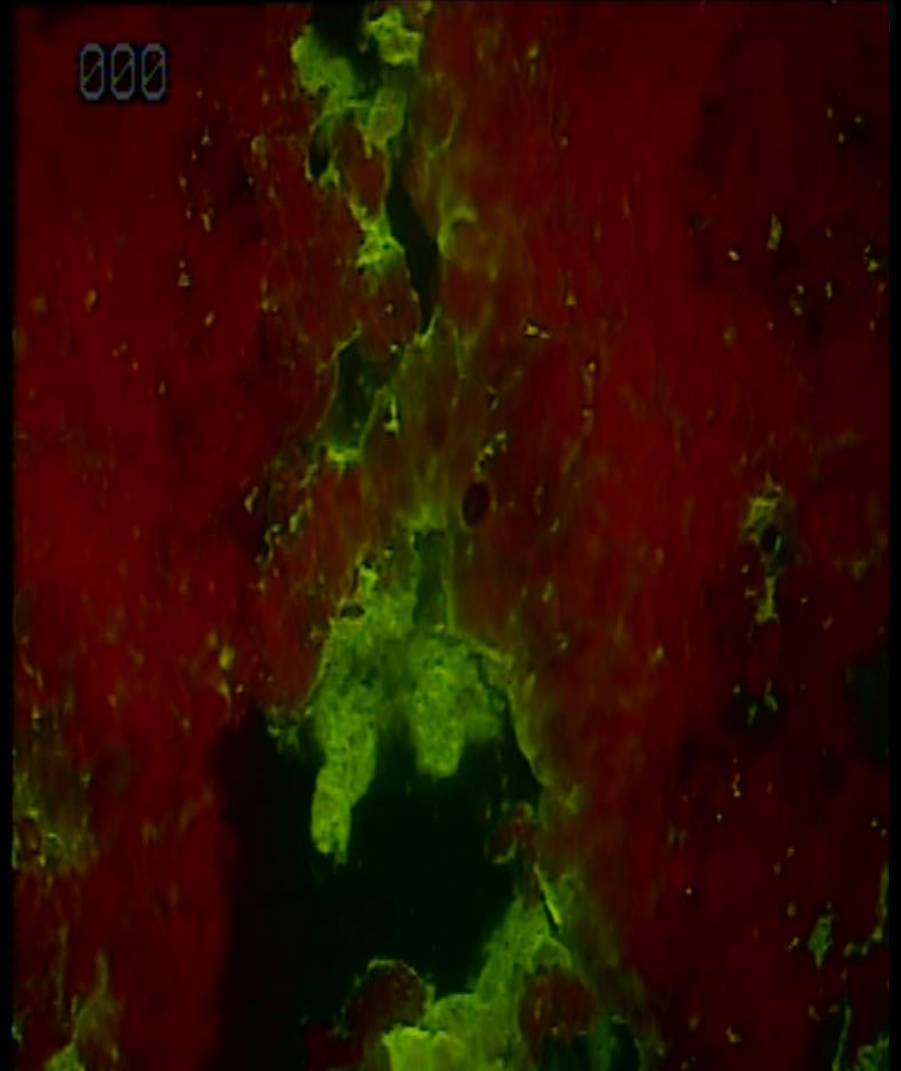
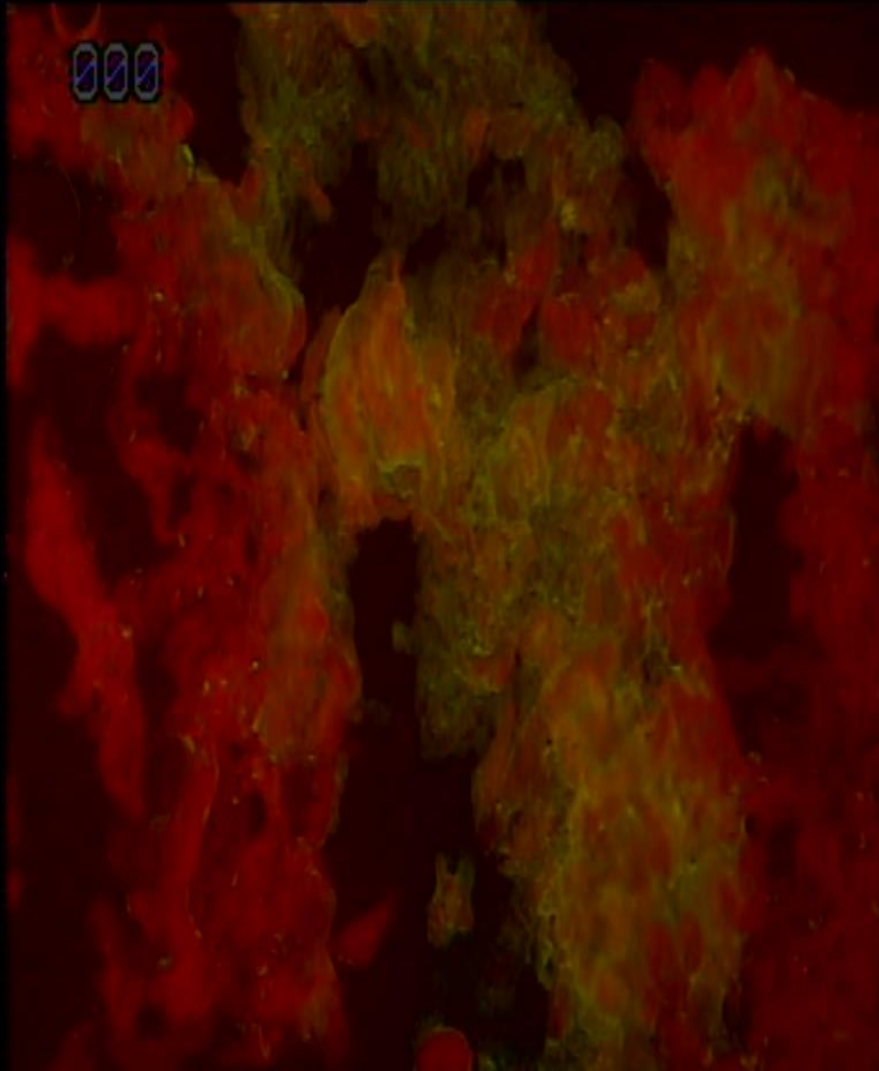
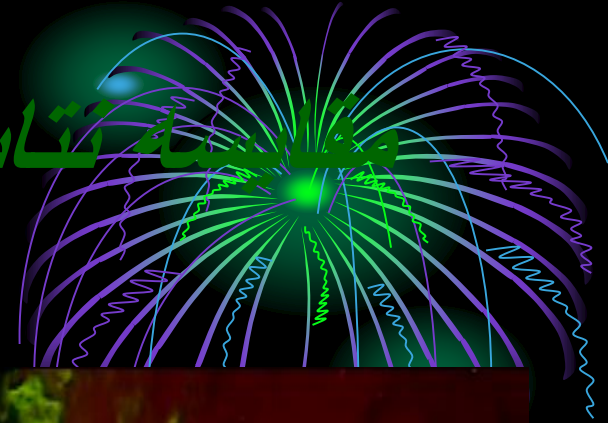
شستشوی لامها دو بار و در مجموع 15 دقیقه

خشک کردن لامها

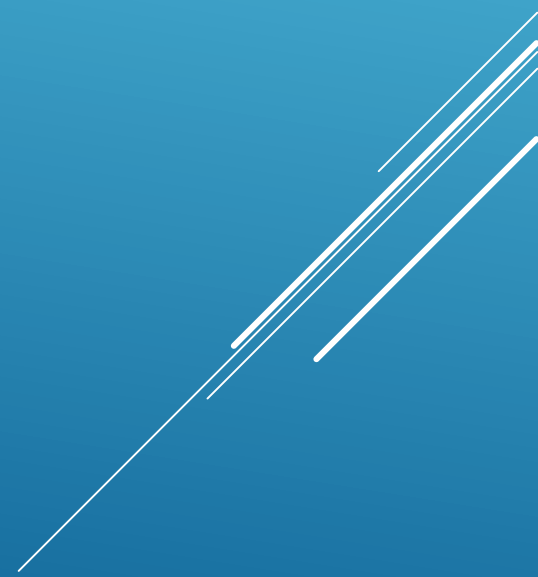
❖ اضافه نمودن یک قطره گلگیرین تامپونه بر روی بافتها و قرار دادن لامل بر روی آنها
بعد از 3-4 ساعت لامها را بررسی می نماییم

در صورت وجود آنتی بادی رنگ سبز فلورسانت زیر میکروسکوپ فلورسانت مشاهده می گردد

مقایسه نتایج مثبت و منفی آزمون IFA



CIEP

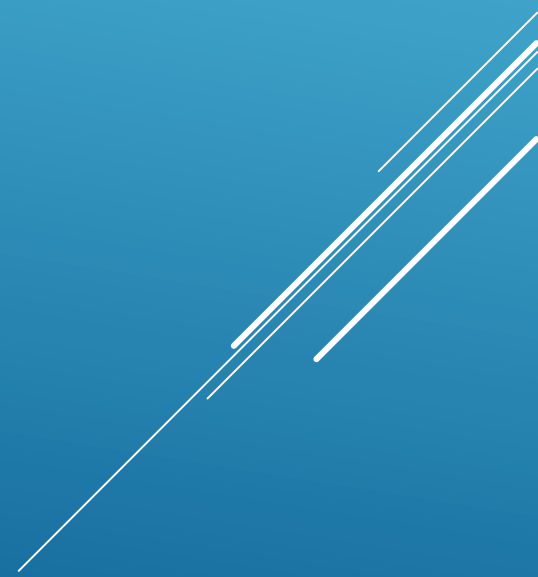


- ▶ Arc2 from homogenate Ag
- ▶ Specificity= high
- ▶ Sensitivity= so so

▶ (43)

CIEP

Dot-ELISA



- ▶ Fasciola gigantica partially purified fraction antigen (PPF).
Results: With a 1:800 sera dilution as the cut-off titer the sensitivity of the Dot-ELISA test in diagnosis of human fascioliasis was 94.23% and the specificity was 99.36%.

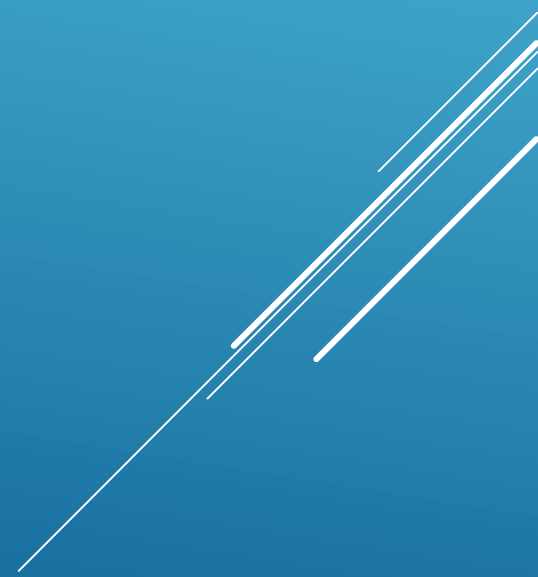
DALIMI, A.

A decorative graphic consisting of several parallel white lines of varying lengths, slanted diagonally from the bottom right towards the top right, set against a blue background.

Antigen	Sensitivity	Specificity
Semi purified	100%	99.36%

Sedighi et al

Recombinant antigens



- ▶ The sensitivity and specificity of the rproCL1-ELISA were 100%.
- ▶ We also assessed the ability to detect antibodies in sera from 10 experimentally infected sheep, obtaining preliminary results that shown a response since the third week post infection in all the studied animals.

IMMUNODIAGNOSIS OF FASCIOSIS USING RECOMBINANT PROCATHEPSIN L CYSTEIN PROTEINASE

- ▶ Recombinant CL1 using ELISA
 - ▶ Sensitivity = 100%
 - ▶ Specificity= 100%
-
- ▶ *O'Neill (114)*

EITB

(Western Blot)

- ▶ Using (EITB), Fasciola-specific E/ S protein fraction band (49.5 kDa) was determined and electroeluted.
- ▶ The sensitivity, specificity and diagnostic accuracy of EITB were 45.2%, 100% and 70.7%, respectively,
- ▶ while those of CIEP were 38.7%, 100% and 67.2%, respectively.

DETECTION OF FASCIOLA-SPECIFIC EXCRETORY/ SECRETORY (E/S) PROTEIN FRACTION BAND (49.5 KDA)

Evaluation of Enzyme-linked Immunotransfer Blot for the Immunodiagnosis of Human Fascioliasis Using Cysteine Proteinase Antigen

	Cysteine protease
Sensitivity	97.5%
Specificity	98.8%
Positive predictive value	98.7%
Negative predictive value	97.7%

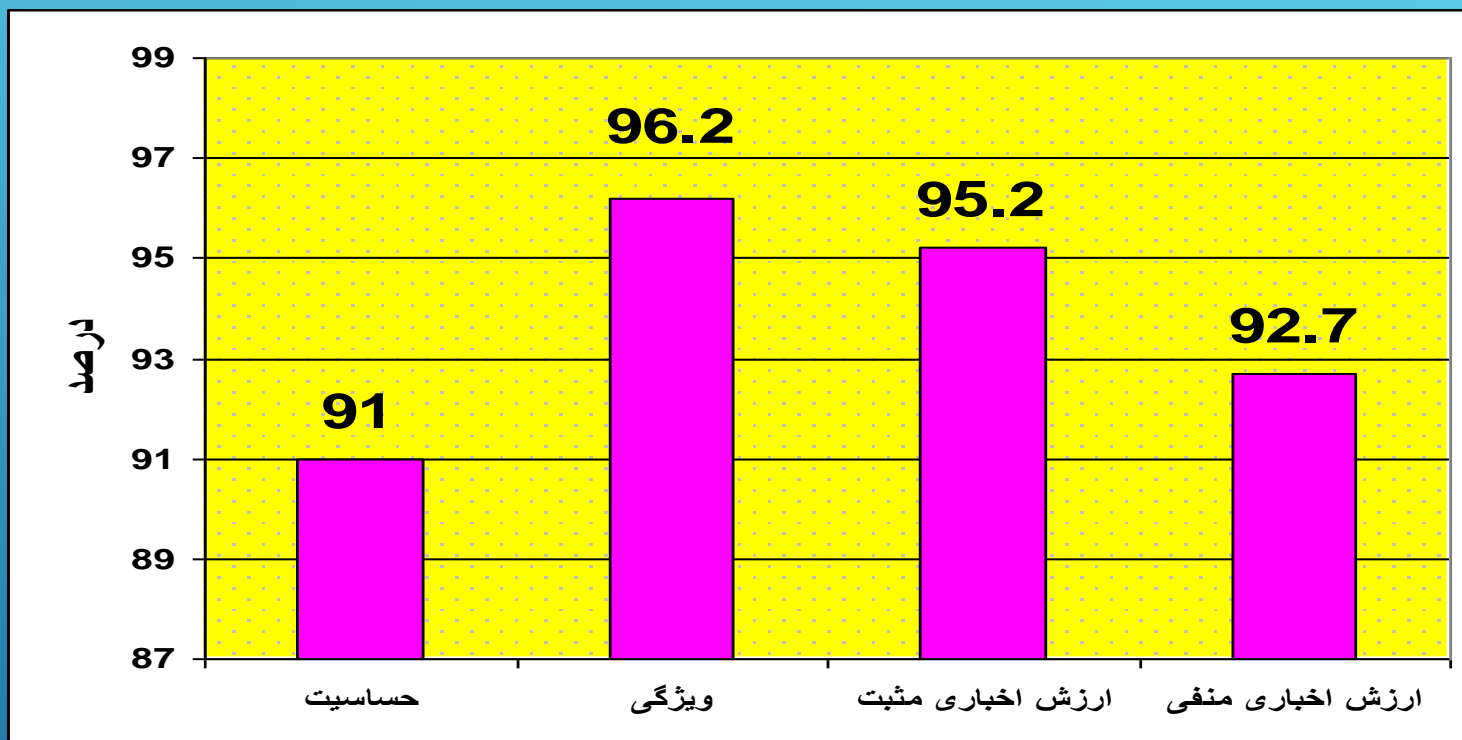
موارد کراس راکسیون و منفی های کاذب در مورد آنتی ژن سوماتیک فاسیولا روش وسترن بلات

مشخصات	تعداد	منفی کاذب	مثبت کاذب
فاسیولوزیس	۴۰	۴	-
هیداتیدوز	۱۰	-	۱
توکساکاریازیز	۱۰	-	۱
آمیبیازیس	۵	-	-
استرنژیلویدوزیس	۵	-	-
تریکو استرنژیلویدوزیس	۱	-	-
گروه سالم	۲۰	-	-

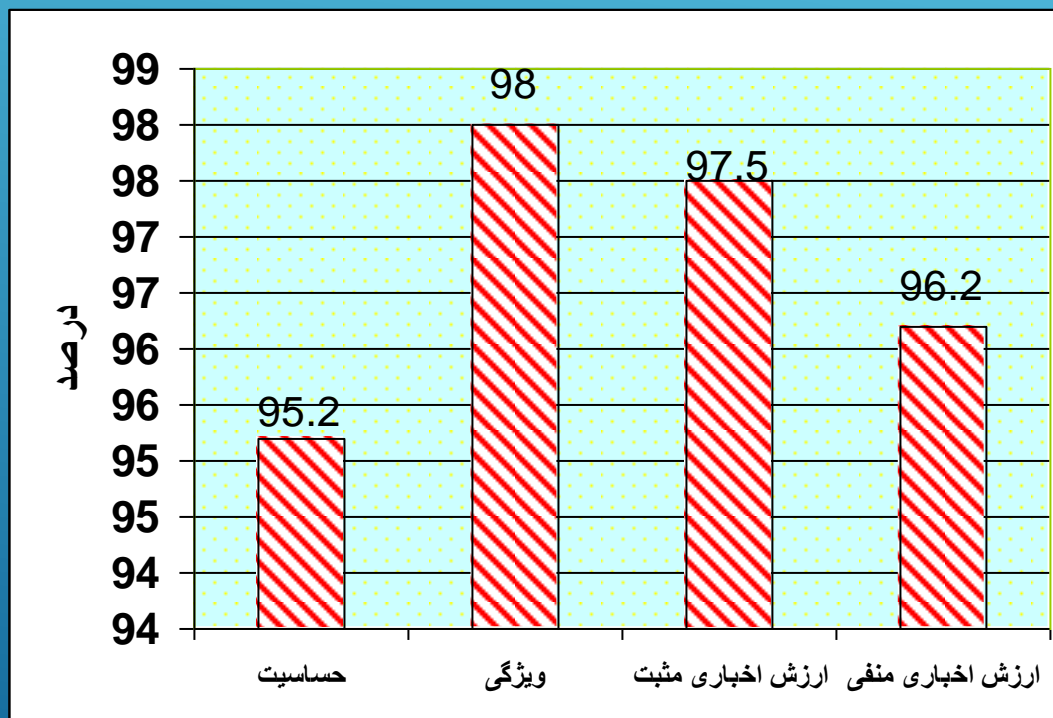
موارد کراس راکسیون و منفی های کاذب در مورد آنتی ژن ES فاسیول روش وسترن بلات

مشخصات	تعداد	منفی کاذب	مثبت کاذب
فاسیولوزیس	۴۰	2	-
هیداتیدوز	۱۰	-	-
توکساکاریازیز	۱۰	-	۱
آمیبیازیس	۵	-	-
استرنژیلویدوزیس	۵	-	-
تریکو استرنژیلویدوزیس	۱	-	-
گروه سالم	۲۰	-	-

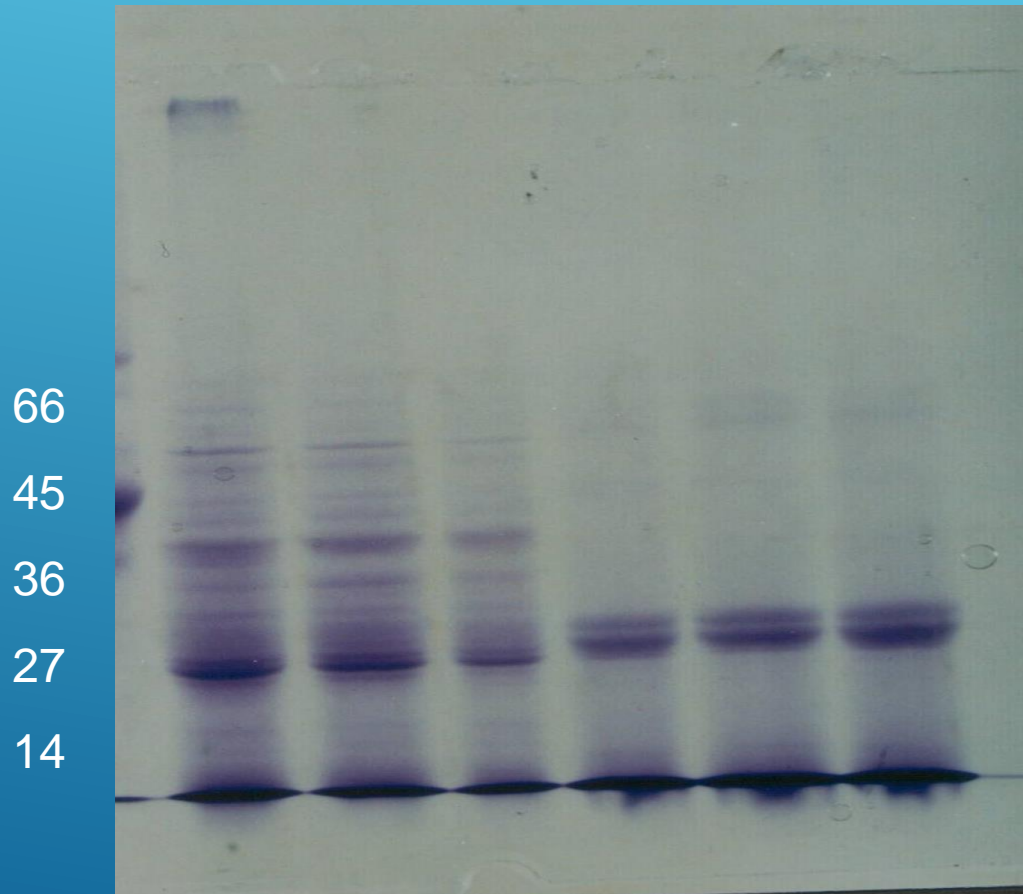
درصد حساسیت و ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی ایمونوبلات با استفاده از آنتی ژن سوماتیک



درصد حساسیت و ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی ایمونوبلات با استفاده از آنتی ژن دفعی ترشعی



SDS-PAGE analysis of somatic and ES antigens of *F.hepatica*



- ▶ **Sensitivity: 100%**
- ▶ **Specificity: 98%**
- ▶ **P.P.Value: 66.7%**
- ▶ **N.P.Value: 100%**

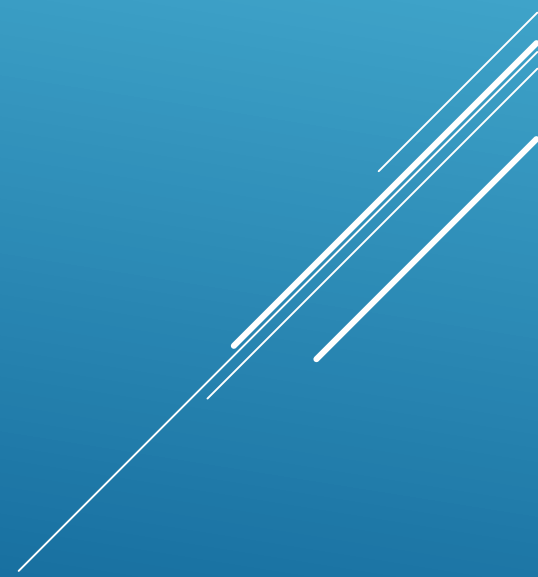
- ▶ *Pew Pan M Intapan et al*

EITB USING E/S AG FOR 27KDA BAND

Bands (kDa)	Antigen	Ref.
25-27	E/S	Sampaivosilva
14-29	E/S	Fredas
26	E-S	El bahi

Serologic follow up

after treatment



- ▶ Sandwich ELISA using Monoclonal Ab
- ▶ Sensitivity = 100%
- ▶ No cross-reaction

▶ *Espino (61)*

ارزیابی پس از درمان

▶ **Guobadia** آلودگی فاسیولا ژیکانتیکا را در گوسفند یک هفته پس از آلودگی تجربی با استفاده از تست دایرکت الایزا تعیین آنتی ژن چرخشی ۱۷ کیلو دالتون در سرم گوسفندان توانسته است تشخیص دهد. این گوسفندان پس از درمان ، ۲ هفته بعد تست آنها منفی بود. اما در مورد آنتی ژن ۶۹ کیلو دالتون ۳ هفته بعد تست منفی بود (72) .

▶ بنا به گزارش **Hillyer** سطح آنتی بادی بر علیه مواد دفعی - ترشحات فاسیولا بطور یکسان تا سالها در خون افراد بیمار بالا باقی میماند. ایشان گزارش میکنند که ۲ بیمار بعد از ۸۳ و ۱۴۷ هفته فاقد تغییر در سطح آنتی بادی بوده اند. هم چنین یکی از افراد به مدت ۶ سال پیگیری پس از درمان شده و سطح آنتی بادی وی بر علیه فاسیولا هیپاتیکا باقی مانده است (84) .

▶ دريك بررسي آنتي ژن هاي چرخشي توسط الايزا ي
مستقيم ، يك هفته پس از آلودگي تست مثبت بود در
حاليكه 4 هفته پس از درمان تست منفي گرديد . (14)

ارزيابي درمان

آزمایشگاه رفرنس تشخیص فاسیولوز
تهران- ضلع شمالی دانشگاه تهران- خیابان پورسینا-
درب دانشکده بهداشت- طبقه اول شرقی- آزمایشگاه
سرولوژی بیماریهای گرمی- دکتر محمد باقررکنی-
خانم مژگان آریایی پور
09122390309 دکتررکنی
09123130364 خانم آریایی پور

برمردگان خویش نظر میکنیم با
طرح خنده ای
ونوبت خود را انتظار میکشیم
بی هیچ خنده ای
شاملو

