Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.13, No.4, Winter 2013, Pages 388-397

Evaluation of Humoral Immune Response against Somatic and Excretory-Secretory Antigens of *Dicrocoelium Dendriticum* in Infected Sheep by Western Blot

Razi Jalali MH, Bahrami S*, Jafari A

Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Corresponding Author. Tel: +986113738636 Fax: +986113360807 E-mail: s.bahrami@scu.ac.ir

Received: 7 Mar 2013 Accepted: 4 Aug 2013

ABSTRACT

Introduction and objective: *Dicrocoelium dendriticum* is a worldwide spread parasite of liver, bile ducts and gallbladder of especially ruminants and humans as well. Identification of specific antigens is useful for early diagnosis of the infection. The goal of this study was the isolation and identification of excretory-secretory and somatic antigens from *D. dendriticum* by sodium dodecyl sulphate (SDS)-PAGE and evaluation of humoral immune response against these antigens.

Methods: The parasites were collected and washed by phosphate buffered saline (PBS) and supplemented by antibiotic for several times. For preparing somatic antigens, parasites were sonicated and centrifuged prior to collect supernatant. For preparing excretory-secretory antigens the viable parasites were transferred to the sterile medium. The samples were centrifuged and supernatants were collected. The sera of infected sheep with different infection degrees were collected too. Somatic and excretory-secretory proteins were isolated with SDS PAGE and stained with coomassie blue. Immunogenicity properties of the resulting proteins were determined using western blot analysis.

Results: The total extract of somatic antigens analyzed by SDS-PAGE revealed 21 proteins. In mild infection, bands of 130 KDa were immune dominant. In moderate infections 48, 80 and 130 KDa and in heavy infections 48, 60, 80, 130 KDa were detected as immune dominant bands. In excretory- secretory antigens seven bands of protein were detected. In mild infection 130 KDa, in moderate infection 100, 120 and 130 KDa and in heavy infection 45, 80, 85, 100, 120 and 130 KDa were immune dominant bands.

Conclusion: Probably the most immunogenic protein band during different degrees of infection was 130KDa that can be used for vaccination and inducing immunity.

Keywords: *Dicrocoelium Dendriticum*; Excretory-Secretory Antigens; Somatic Antigens; Western Blot

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال ضد آنتی ژنهای پیکری و دفعی ترشحی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* در گوسفندان آلوده به روش وسترن بلات

محمد حسین راضی جلالی، سمیه بهرامی*، آرش جعفری

گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

*نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱۱۳۷۳۸۶۳۶ فاکس: ۰۶۱۱۳۳۶۰۸۰۷ پست الکترونیک: s.bahrami@scu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *دیکروسلیوم دندریتیکوم* انگلی با انتشار جهانی است که در کبد، مجاری صفراوی و کیسه‌ی صفرای پستانداران خصوصا" نشخوارکنندگان و همچنین انسان یافت می‌شود. با شناسایی آنتی‌ژن‌های اختصاصی می‌توان به تشخیص زود هنگام بیماری کمک نمود. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و شناسایی آنتی‌ژن‌های دفعی _ترشحی و سوماتیک کرم بالغ *دیکروسلیوم دندریتیکوم* با روش SDS-PAGE و ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال ضد این آنتی ژن‌ها به روش وسترن بلات در گوسفند می‌باشد.

روش کار: پس از جداسازی انگل‌های زنده، بخشی از انگل‌ها به‌منظور تهیه‌ی آنتی‌ژن‌های پیکری با استفاده از سونیکاتور هموژن شدند و بخش دیگر در شرایط استریل به محیط کشت انتقال یافتند تا از مواد ترشح شده از انگل به‌عنوان آنتی‌ژن دفعی- ترشحی استفاده شود. از گوسفندان آلوده با درجات مختلف آلودگی به دیکروسلیوم خونگیری به عمل آمد. پروتئین‌های پیکری و دفعی ـ ترشحی با روش سدیم دو دسیل سولفات جداسازی و با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و همچنین خاصیت ایمنی‌زایی پروتئین‌های حاصله با روش وسترن بلات مشخص گردید.

یافته‌ها: در مطالعه‌ی حاضر پس از انجام الکتروفورز آنتی‌ژن‌های سوماتیک ۲۱ باند پروتئینی دیده شد که در سرم گوسفندی با شدت آلودگی کم باند ۱۳۰، در شدت آلودگی متوسط باندهای ۱۳۰-۸۰-۴۸ و در شدت آلودگی زیاد باندهای ۱۳۰-۸۰-۶۰-۴۸ کیلودالتون با روش وسترن بلات ایمونوژن بودند. در SDS-PAGE آنتی‌ژن‌های دفعی ـ ترشحی ۷ باند پروتئینی دیده شد که در سرم گوسفندی با شدت آلودگی کم باند ۱۳۰ کیلودالتون، در شدت آلودگی متوسط باندهای ۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰ کیلودالتون و در شدت آلودگی زیاد باندهای ۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۸۵-۸۰ و ۴۵ کیلودالتون باعث تحریک سیستم ایمنی شده بودند.

نتیجه‌گیری: در تمامی شدت‌های آلودگی ایمونوژن‌ترین باند آنتی‌ژن حدودا" ۱۳۰ کیلودالتونی است که در آنتی‌ژن دفعی ترشحی و سوماتیک وجود دارد. از این آنتی ژن در زمینه واکسیناسیون و ایمنی زایی می‌توان استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *دیکروسلیوم دندریتیکوم*؛ آنتی‌ژن دفعی- ترشحی؛ آنتی‌ژن سوماتیک؛ وسترن بلات

دریافت: ۹۱/۱۲/۱۷ **پذیرش:** ۹۲/۵/۱۳

مقدمه

دیکروسلیازیس بیماری انگلی کرمی ناشی از *دیکروسلیوم دندریتیکوم* از انواع ترماتودهای دیژنه-آ است که بنا بر عقیده‌ی ولف، از دو منظر بهداشتی و اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱و۲]. کرم بالغ در کیسه صفرا و مجاری صفراوی کبد پستانداران و بویژه نشخوارکنندگان زندگی می‌کند [۳]. انسان نیز می‌تواند میزبان تصادفی این انگل باشد. در این زمینه در سال‌های اخیر آلودگی انسانی از عربستان [٤]، ترکیه [۵]، قرقیزستان [۶] و ایران [۷] گزارش شده است. میزان شیوع بالا و خسارات اقتصادی زیاد ناشی از دیکروسلیازیس باعث شده آن را یکی از شش آلودگی کرمی مهم نشخوارکنندگان دنیا بدانند [۸].

آلودگی مزمن دام‌ها به دیکروسلیوم باعث سیروز کبدی پیشرونده و کاهش تولیدات دامی می‌شود.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

آثار هیستوپاتولوژیکی دیکروسیلیازیس در کبد به صورت نکروز و پرولیفراسیون مجاری صفراوی، کلسیفیکاسیون و فیبروز کبدی مورد تائید قرار گرفته است [۹]. این ترماتود زمینه ساز سایر بیماری-های عفونی در میزبان‌های آلوده می‌باشد. در گوسفندان منطقه مدیترانه ۶۶ درصد و در بزها ۱۸ درصد تولید شیر را کاهش می‌دهد [۱۰]. در انسان نیز ابتلای به این ترماتود باعث اسهال، درد شکم و کاهش وزن می‌گردد [۱۱]. بنابراین تشخیص آلودگی در مراحل ابتدایی بیماری می‌تواند در کاهش خسارات مؤثر باشد. تنوع میزبان‌های اصلی، عدم ایجاد ایمنی حفاظت کننده در برابر آلودگی، مقاومت بسیار زیاد تخم در برابر شرایط بد محیطی، عدم وجود داروی مناسب جهت درمان کامل و عدم امکان تشخیص دقیق در حیوانات زنده باعث پراکندگی انگل در سراسر دنیا شده است [۱۲]. در آزمایشات معمول انگل شناسی، عوامل زیادی از جمله ساعت نمونه‌گیری [۱۳]، محلول‌های مورد استفاده [۱٤]، سن [۹] و مدت زمان بعد از آلودگی [۱۵] در حضور تخم در مدفوع دخالت دارند. در ۳۰ سال گذشته روش‌های ایمنی‌شناسی پیشرفت قابل توجهی در تشخیص دیکروسلیازیس داشته‌اند [۱۶]. با توجه به طولانی بودن فاصله‌ی زمانی آلوده شدن تا دفع تخم این آزمون‌ها عملکرد مناسبی در تشخیص زود هنگام آلودگی دارند. در گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های سوماتیک و دفعی ترشحی دیده شده است. IgG و IgA در مجاری صفراوی گاوهای آلوده شده به دیکروسلیوم افزایش داشته و دیده شده که IgA مانع از اتصال انگل به مخاط می‌شود و در رشد و تغذیه و تولید مثل انگل اختلال ایجاد می‌کند [۱۷]. با در نظر گرفتن اهمیت اقتصادی و بهداشتی انگل و با توجه به نقاط ضعف آزمایش مدفوع در شناسایی آلودگی، دستیابی به روش‌های تشخیص که از کارایی لازم برخوردار هستند، حائز اهمیت می‌باشد. در این راستا شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی جهت تشخیص سرولوژیک آلودگی ضروری می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و شناسایی آنتی‌ژن‌های دفعی _ترشحی و سوماتیک کرم بالغ *دیکروسلیوم دندریتیکوم* با روش SDS-PAGE و ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال ضد این آنتی ژن‌ها به روش وسترن بلات در گوسفند می‌باشد.

روش کار

نمونه‌گیری

برای تهیه‌ی نمونه‌های سرم گوسفندان آلوده به *دیکروسلیوم دندریتیکوم* طی مراجعه تدریجی به کشتارگاه به مدت ۳ ماه از گوسفندان کشتار شده نمونه خون اخذ گردید و پس از پیگیری خط کشتار، خون گوسفندان آلوده به *دیکروسلیوم دندریتیکوم* نگهداری و بقیه دور ریخته شد. علاوه بر نمونه خون گوسفندان آلوده، کبد ضبط شده آن‌ها نیز به منظور تعیین شدت آلودگی اخذ گردید. در خط کشتار امکان اختلال در پیگیری نمونه های خون جهت انتخاب موارد مثبت وجود داشت که در اینصورت نمونه‌های مذکور حذف می‌گردیدند و تنها نمونه هایی که قطعا" مثبت بودند در نظر گرفته شدند.

تعداد انگل‌های موجود در کبدهای آلوده به روش آندرسون و همکاران شمارش گردید [۱۸] و بر آن اساس نمونه سرم‌های مربوط به گوسفندان آلوده در یکی از سه گروه با آلودگی شدید (بیش از ۱۰۰۰ کرم در کبد)، آلودگی متوسط (۱۰۰۰- ۵۰۰ کرم در کبد) و آلودگی خفیف (کمتر از ۵۰۰ کرم در کبد) قرار داده شدند. نمونه‌گیری از گوسفندان تا رسیدن به ۱۰ نمونه از هر گروه شدت آلودگی و جمعاً ۳۰ نمونه ادامه یافت. همچنین انگل‌های زنده جدا سازی شده و جهت استخراج آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

تهیه‌ی آنتی‌ژن‌های سوماتیک و دفعی ترشحی

جهت تهیه‌ی آنتی‌ژن سوماتیک، انگل‌های بالغ زنده با PBS (pH= 7/4) حاوی آنتی بیوتیک (جنتامایسین) در چندین مرحله شسته شدند تا مواد زائد آن‌ها کاملاً خارج گردد. انگل‌ها دو بار در کنار یخ سونیکه شدند و محلول بدست آمده با دور ۷۰۰۰ گرادیان به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی برداشته و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تهیه‌ی آنتی ژن دفعی- ترشحی، انگل‌های شستشو داده شده به محیط کشت RPMI غنی شده با ($NaHCO_3$ـ HEPESـ Glutamax) و حاوی جنتامایسین منتقل گردیدند. محیط کشت حاوی انگل به مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. پس از ٤٨ ساعت محیط کشت حاوی مواد دفعی ترشحی انگل جداسازی شده و سانتریفوژ گردید. مایع رویی با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/٤٥ میکرون استریل و با استفاده از کیسه دیالیز و دمیدن گاز نیتروژن آنتی ژن دفعی ترشحی تخلیص و تغلیظ گردید. جهت تعیین میزان پروتئین آنتی‌ژن دفعی-ترشحی و سوماتیک از روش برادفورد استفاده شد.

تزریق آنتی‌ژن‌ها به خرگوش و تهیه‌ی آنتی-بادی

جهت تهیه‌ی آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های سوماتیک و دفعی ترشحی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* در خرگوش، ۳ سر خرگوش تهیه شد و پس از علامت گذاری خرگوش‌ها یکی برای تزریق آنتی‌ژن سوماتیک و یکی برای آنتی‌ژن دفعی ترشحی و دیگری هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. به‌منظور تحریک سیستم ایمنی خرگوش‌ها ۳ مرحله تزریق انجام شد و هر مرحله از ۲ میلی‌گرم آنتی‌ژن جهت تزریق استفاده گردید. در مرحله اول تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر آدجوانت کامل و ۰/۵ میلی‌لیتر جنتامایسین به صورت عضلانی تزریق شد. در مرحله بعدی از آدجوانت ناقص استفاده گردید و در مرحله سوم بدون آدجوانت تزریق انجام گرفت [۱۹].

فاصله بین تزریق‌ها حدود ۲ هفته بود. یک هفته پس از تزریق آخر خون‌گیری از خرگوش‌ها انجام شد و به‌عنوان آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی دیکروسلیوم در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهدای شدند.

تعیین الگوی الکتروفورتیک و وسترن بلاتینگ

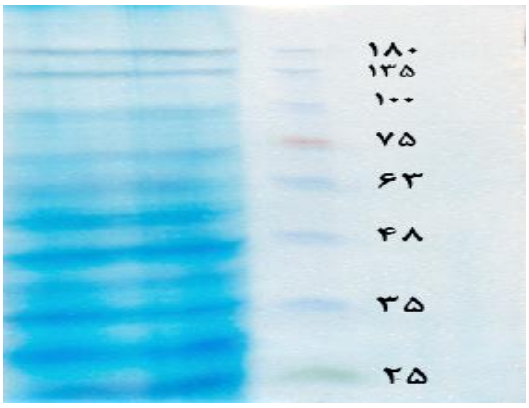
برای تعیین الگوی الکتروفورتیک آنتی‌ژن‌ها، از روش سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریل آمید ژل الکتروفورزیس (SDS- PAGE) استفاده شد. نمونه-ها به نسبت ۱ به ۲ با بافر اختصاصی مخلوط شدند و بعد از حرارت دادن مورد استفاده قرار گرفتند. الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۱۱۰ ولت انجام شد. پس از پایان آزمایش، ژلها با کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و در انتها برای آشکار شدن باندهای پروتئین از محلول رنگبر (اسید استیک گلاسیال و متانول) استفاده شد. برای بررسی پاسخ ایمنی دامهای آلوده از وسترن بلاتینگ استفاده گردید. پس از پایان الکتروفورز، پروتئین از روی ژل با روش مرطوب به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. پس از بلوکه کردن جایگاه‌های غیر اختصاصی با شیر پس چرب، نوارهای نیتروسلولزی حاوی آنتی‌ژن با سرم-های گوسفندان و خرگوش‌های آلوده، با رقت ۱/۱۰ و به مدت ۱ ساعت مجاور گردیدند. پس از شستشو، نوارها با آنتی بادی Anti-rabbit IgG و-Anti sheep IgG متصل به HRP به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند و نهایتا" واکنش از طریق مجاورت نوارها با سوبسترای کروموژن آشکارسازی گردید. همچنین از سرم بره‌های آغوز نخورده به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

یافته‌ها

پروفایل پروتئینی حاصل از آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم دندریتیکوم*

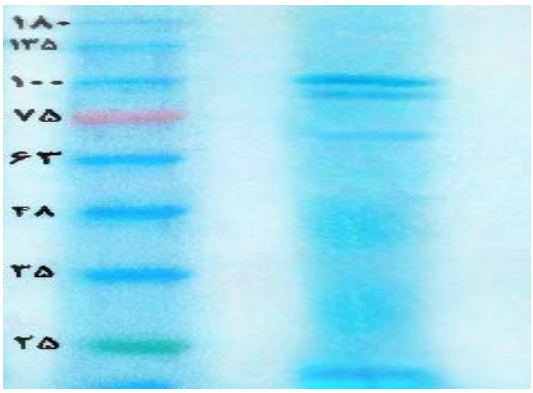
در آنتی‌ژن‌های سوماتیک در محدوده‌ی وزنی ۲۵ تا ۱۸۰ کیلو دالتون، ۲۱ باند پروتئینی وجود داشت که باندهایی با وزن‌های حدوداً ۱۸۰-۱۳۵-۹۰-۷۰-۶۳-۵۵-۴۵-۴۰-۳۵-۳۰ و۲۵ کیلو دالتون باندهای قوی‌تری را تشکیل داده بودند.



تصویر ۱. نتایج تعیین هویت آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم دندریتیکوم*

پروفایل پروتئینی حاصل از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی دیکروسلیوم دندریتیکوم

در آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی در محدوده‌ی وزنی۲۵ تا۱۸۰ کیلو دالتون ۷ باند پروتئینی وجود داشت که باندهایی با وزن‌های حدودا ۱۰۰-۹۰-۲۰ کیلودالتون باندهای قوی‌تری را تشکیل داده بودند.



تصویر ۲. نتایج تعیین هویت آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی *دیکروسلیوم دندریتیکوم*

نتایج وسترن بلات آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم دندریتیکوم*

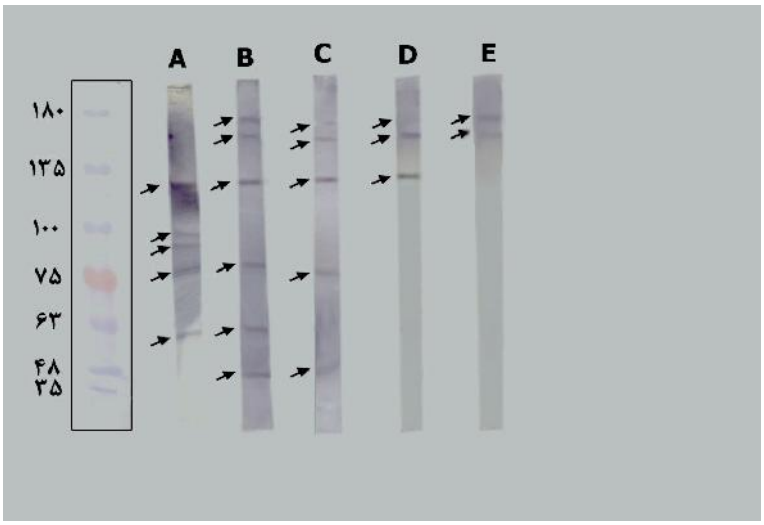
وسترن بلات آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم دندریتیکوم* با استفاده از سرم خرگوش و گوسفندان در شدت آلودگی‌های مختلف انجام شد و نتایج آن به این صورت بود: که در سرم‌های گوسفندی با شدت آلودگی کم سه باند با وزن‌های حدوداً ۱۶۵-۱۶۰- ۱۳۰ کیلودالتونی دیده شد. در شدت آلودگی متوسط پنج باند با وزن‌های حدوداً ۱۶۵-۱۶۰-۱۳۰-۸۰-۴۸ کیلودالتونی مشخص بود و در شدت آلودگی زیاد شش باند با وزن‌های حدودا ۱۶۵-۱۶۰-۱۳۰-۸۰-۶۰-۴۸ کیلودالتونی مشاهده گردید. در نمونه های کنترل منفی نیز باندهایی در حدود ۱۶۵-۱۶۰ مشاهده گردید. بنابراین این باندها اختصاصی آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم دندریتیکوم* نمی‌باشند. در نتایج حاصل از وسترن بلات سرم خرگوش آلوده به آنتی‌ژن سوماتیک پنج باند با وزن‌های حدوداً ۱۳۰-۱۰۰-۹۰-۷۵-۶۰ کیلودالتون نمایان بود. نتایج به صورت خلاصه در جدول ۱ آورده شده است.

با استفاده از سرم گوسفندان با شدت آلودگی کم یک باند با وزن حدوداً ۱۳۰ کیلودالتون دیده شد. البته در دو مورد علاوه بر باند ۱۳۰ دو باند دیگر با وزن‌های حدودا ۱۳۵ و ٤٥ کیلودالتونی نیز دیده شد. در شدت آلودگی متوسط در محدوده وزنی۱۲۰تا ٤٠ کیلودالتون ٤ باند با وزن‌های حدوداً ۱۳۵-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰ کیلو دالتونی دیده شد که باندهای ۱۳۰ و ۱۰۰ کیلودالتونی باندهای قوی‌تری بودند. درشدت آلودگی زیاد در محدوده وزنی۱٤۰ تا ٤٠ کیلودالتون ۷ باند با وزن‌های حدوداً ۱۳۵-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۸۵-۸۰-٤٥ کیلو دالتونی دیده شدند که باندهای ۱۳۰-۱۰۰-۸۵، ۸۰ و ٤٥ کیلودالتونی باندهای قوی‌تری بودند. در نمونه سرم بره‌های آغوز نخورده نیز یک باند با وزن حدود ۱۳۵ کیلودالتونی مشاهده گردید. بنابراین نتایج نشان

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

جدول ۱. نتایج وسترن بلات آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم دندریتیکوم*

نوع سرم	وزن باندهای مشاهده شده (کیلودالتون)
سرم گوسفندی با شدت آلودگی کم	۱۶۵- ۱۶۰ -۱۳۰
سرم گوسفندی با شدت آلودگی متوسط	۱۶۵-۱۶۰-۱۳۰-۸۰-۴۸
سرم گوسفندی با شدت آلودگی زیاد	۱۶۵-۱۶۰-۱۳۰-۸۰-۶۰-۴۸
سرم بره‌های آغوز نخورده	۱۶۵-۱۶۰
سرم خرگوش	۱۳۰-۱۰۰-۹۰-۷۵-۶۰



تصویر ۳. نتایج وسترن بلات آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم دندریتیکوم*

A : سرم خرگوش که ۵ باند با وزن‌های حدوداً ۱۳۰-۱۰۰-۹۰-۷۵-۶۰ کیلودالتون در آن مشاهده گردید. B: سرم گوسفندی با شدت آلودگی زیاد که ۶ باند با وزن‌های حدودا ۱۶۵-۱۶۰-۱۳۰-۸۰-۶۰- ۴۸ کیلودالتونی در آن مشاهده گردید. C : سرم گوسفندی با شدت آلودگی متوسط که در آن ۵ باند با وزن‌های حدوداً ۱۶۵-۱۶۰-۱۳۰-۸۰-۴۸ کیلودالتونی دیده شد. D : سرم گوسفندی با شدت آلودگی کم که ۳ باند با وزن‌های حدوداً ۱۶۵- ۱۶۰- ۱۳۰ کیلودالتونی دیده شد. E: نمونه های کنترل منفی که باندهایی در حدود ۱۶۵-۱۶۰ مشاهده گردید.

می‌دهد که باند حدود ۱۳۵ باند غیر اختصاصی می‌باشد. در نتایج حاصل از وسترن بلات سرم خرگوش آلوده به آنتی‌ژن دفعی ترشحی ۹ باند با وزن‌های حدودا ۱۸۰-۱۵۰-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۹۰-۷۰-۵۰ و ۴۵ کیلو دالتونی نمایان بود. در جدول ۲ نتایج به صورت خلاصه ذکر گردیده است.

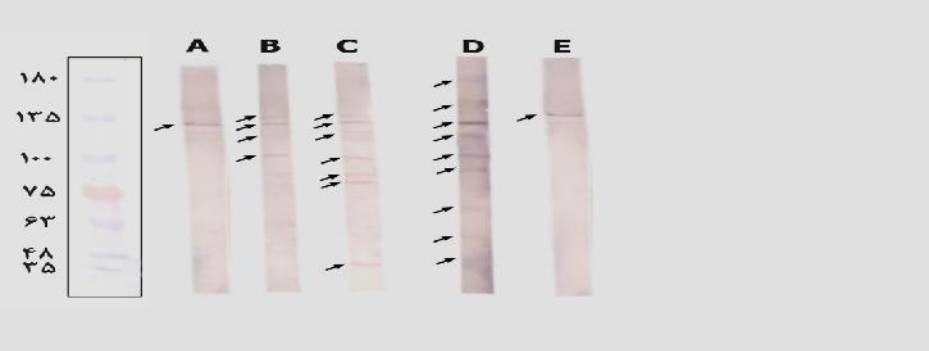
بحث

در طی سال‌های اخیر ایمنی‌شناسی پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در تشخیص دیکروسلیازیس داشته است [۱۶]. با توجه به طولانی بودن فاصله‌ی آلودگی تا دفع تخم، استفاده از روش‌های ایمنی‌شناسی می‌تواند به تشخیص زود هنگام آلودگی کمک کند. البته ایجاد

جدول۲. نتایج وسترن بلات آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی *دیکروسلیوم دندریتیکوم*

نوع سرم	وزن باندهای مشاهده شده (کیلودالتون)
سرم گوسفندی با شدت آلودگی کم	۱۳۰
سرم گوسفندی با شدت آلودگی متوسط	۱۳۵-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰
سرم گوسفندی با شدت آلودگی زیاد	۱۳۵-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۸۵-۸۰-۴۵
سرم بره‌های آغوز نخورده	۱۳۵
سرم خرگوش	۱۸۰-۱۵۰-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۹۰-۷۰-۵۰ و۴۵

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]



تصویر ٤. نتایج وسترن بلات آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی *دیکروسلیوم دندریتیکوم*

A: سرم گوسفندی با شدت آلودگی کم که در آن یک باند با وزن حدوداً ۱۳۰ کیلودالتون دیده شد. B: سرم گوسفندی با شدت آلودگی متوسط که ٤ باند با وزن‌های حدوداً ۱۳۵-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰ کیلو دالتونی در آن دیده شد. C: سرم گوسفندی با شدت آلودگی زیاد که ۷ باند با وزن‌های حدوداً ۱۳۵-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۸۵-۸۰-٤۵ کیلودالتونی دیده شد. D: سرم خرگوش که در آن ۹ باند با وزن‌های حدوداً ۱۸۰-۱۵۰-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۹۰-۷۰-۵۰ و٤۵ کیلو دالتونی دیده شد. E: نمونه های کنترل منفی که باندی در حدود ۱۳۵ مشاهده گردید.

واکنش‌های متقاطع با سایر انگل‌ها نظیر *فاسیولا* و *پارامفیستوموم* می‌تواند در کسب نتایج اختلال ایجاد کند [۱۷]. با توجه به ظهور آنتی‌بادی ضد *دیکروسلیوم دندریتیکوم* در ۳۰ روز پس از آلودگی، بمنظور جلوگیری از افزایش خسارات اقتصادی می‌توان از روش‌های سرمی جهت تشخیص زود هنگام بیماری استفاده نمود [۱۶]. گنزالز لانزا و همکاران با مطالعه‌ای بر روی بره‌های آلوده نشان دادند روش الایزا ۲۰ روز زودتر از آزمایش مدفوع قادر به تشخیص آلودگی است [۱۷]. در مطالعه‌ی حاضر پس از انجام SDS-PAGE آنتی‌ژن‌های سوماتیک ۲۱ باند پروتئینی دیده شد که در شدت آلودگی کم باند ۱۳۰، در شدت آلودگی متوسط باندهای ۱۳۰-۸۰-٤۸ و در شدت آلودگی زیاد باندهای ۱۳۰-۸۰-۶۰-٤۸ کیلودالتون ایمونوژن بودند. همچنین در ایمنوبلات با استفاده از سرم خرگوش آلوده ایمن شده با آنتی‌ژن سوماتیک، باند-هایی با وزنهای حدوداً ۱۳۰-۱۰۰-۹۰-۷۵-۶۰ کیلو دالتون به عنوان پروتئین ایمونوژن دیده شدند. در SDS-PAGE آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی ۷ باند پروتئینی دیده شد که در سرم گوسفندی با شدت آلودگی کم باندهای ۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰ کیلو دالتون، در شدت آلودگی متوسط باندهای۱۳۵-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰ کیلو دالتون و در شدت آلودگی زیاد باندهای ۱۳۵-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۸۵-۸۰ و٤۵ کیلو دالتون باعث تحریک سیستم ایمنی شده بودند. همچنین با استفاده از سرم خرگوش آلوده به آنتی‌ژن دفعی- ترشحی باندهای ۱۸۰-۱۵۰-۱۳۰-۱۲۰-۱۰۰-۹۰-۷۰-۵۰ و ٤۵ کیلو دالتون در آزمایش ایمنوبلات مثبت بودند. در نتایج ایمنوبلات آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی در خرگوش ۳ باند با وزنهای ۱۸۰،۱۵۰،۹۰ کیلو دالتونی دیده شد که در هیچ کدام از شدتهای آلودگی گوسفندی دیده نشد. این تفاوت میتواند به علت تفاوت در نوع حیوان آزمایشگاهی و نیز تفاوت در نوع تحریک سیستم ایمنی باشد. زیرا گوسفند به شکل طبیعی آلوده شده و میزبان با مراحل مختلف انگل در تماس بوده است، در حالی که در خرگوش ایمنی به صورت تجربی و ناشی از تزریق آنتی‌ژن بوده است. آنتی‌ژن ۱۳۰ کیلودالتونی در تمام شدت‌های آلودگی و در هر دو حیوان مورد مطالعه، در آزمایش ایمنوبلات مثبت بود و ایمونوژن‌ترین باند پروتئین طی همه‌ی مراحل این مطالعه بوده است.

سیمسک[1] و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی مشابهی دربین ١٤ باند دیده شده در آنتی‌ژن‌های دفعی

[1] Simsek

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

ترشحی که وزنی بین ۶ تا ۲۰۵ کیلو دالتون داشتند، باند پروتئینی با وزن ملکولی ۲۰۵ کیلودالتون را بعنوان پروتئین اختصاصی در گوسفندان معرفی کردند [۲۰].

بایگان و طایفی (۲۰۱۰) در مقایسه‌ی آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم* و *فاسیولا* که از گاو جدا کردند در آنتی‌ژن‌های سوماتیک *دیکروسلیوم* در گستره‌ی ٤/١٤ تا ١١٦ کیلودالتون، ١٨ باند پروتئینی مشاهده کردند [۲۱]. فکور و مشکی (۲۰۱۱) در الکتروفورز آنتی‌ژن‌های بدنی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* بیش از ۱۵ باند پروتئینی در محدوده وزنی ۲۵ تا ۱۵۰ کیلودالتون و در آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی ۸ باند پروتئین مشاهده کردند و باند ۱۳۰ کیلودالتونی را به‌عنوان پروتئین ایمونوژن در گوسفند معرفی کردند [۲۲]. ودریچوویکز[1] و همکاران ۸ باند پلی‌پپتیدی (١٢٤ تا ٢٨ کیلودالتون) در عصاره سوماتیک و ۸ باند (۱۵۸-۲۱ کیلودالتون) در محصولات دفعی ترشحی دیکروسلیوم مشاهده کردند [۲۳]. رویلانوئین[2] و همکاران با وسترن بلاتینگ آنتی‌ژن‌های سوماتیک و دفعی ترشحی این ترماتود پروتئینی با وزن ۱۳۰ کیلودالتون را به‌عنوان پروتئین اختصاصی در گوسفندان معرفی کردند [٢٤]. اگر چه اختلاف زیادی بین نتایج سیمسک و همکاران (۲۰۰۶) و مطالعات دیگر وجود دارد [۲۰] اما در نتایج رویلانوئین و همکاران (۲۰۰۵) و فکور و مشکی (۲۰۱۱) و مطالعه‌ی حاضر شباهت زیادی وجود دارد و پروتئین ۱۳۰ کیلودالتونی به‌عنوان آنتی‌ژن اختصاصی معرفی شده است. وجود اختلافات درسایر باندها احتمالاً به علت نوع روش و غلظت پروتئین می‌باشد [۲۲،٢٤].

نتیجه گیری

بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، باند ۱۳۰ کیلودالتونی در هر دو آنتی‌ژن سوماتیک و دفعی ترشحی به عنوان باند اختصاصی معرفی می‌شود. امید است در آینده با جمع‌آوری نمونه‌های انسانی مطالعه ی مشابهی بر روی سرم های مثبت انسانی نیز صورت گیرد و بتوان نتایج آن را با نتایج مطالعه حاضر مقایسه کرد و از یافته ها برای طراحی تست‌های تشخیصی، تولید پروتئین به صورت نوترکیب و استفاده از آن در واکسیناسیون برای دام و با توجه به وقوع موارد متعدد انسانی در دنیا و در ایران برای انسان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌ی این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه کرد پایان نامه‌های دانشجویان تحصیلات تکمیلی (پایان نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند اعلام می‌دارند.

[1] Wedrychowicz
[2] Revilla-Nuin

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

References

1- Otranto D, Traversa D. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. Trends Parasitol. 2003 Jan; 19(1): 12-15.
2- Wolff K, Hauser B, Wild P. Dicrocoeliose des Schafes: Untersuschungenzur pathogenese und zur regeneration des lebernach therapie. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1984 Jan; 97 (1): 378-387. (Fulltext in German)
3- Rack J, Adusu E, Jelinek T. Human infection with *Dicrocoelium dendriticum*. Deutsche medizinische Wochenschrift. 2004 Nov; 129 (47): 25-38. (Fulltext in German)
4- Helmy M, Al-Mathal E. Human infection with *Dicrocoelium dendriticum* in Riyadh district (Saudi Arabia). J Egypt Soc Parasitol. 2003 Apr; 33 (1): 139.
5- Karadag B, Bilici A, Doventas A, Kantarci F, Selcuk D, Dincer N, et al. An unusual case of biliary obstruction caused by *Dicrocoelium dentriticum*. Scand J Infect Dis. 2005 May; 37 (5): 385-388.
6- Jeandron A, Rinaldi L, Abdyldaieva G, Usubalieva J, Steinmann P, Cringoli G, et al. Human infections with *Dicrocoelium dendriticum* in Kyrgyzstan: the tip of the iceberg. J Parasitol. 2011 Dec; 97 (6): 1170-1172.
7- Zali MR, Mehr AJ, Rezaian M, Meamar AR, Vaziri S, Mohraz M. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-positive individuals in Iran. Jpn J Infect Dis. 2004 Dec; 57 (6): 268-270.
8- Hiepe T. Helminth control in sheep and goat flocks. Tierarztlishe Praxis. 1994 Feb; 22 (1): 29-34.
9- Gonzalez-Lanza C, Manga-González MY, Del-Pozo-Carnero P. Coprological study of the Dicrocoelium dendriticum (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in León Province, Northwest Spain. Parasitol Res. 1993 Mar; 79 (6): 488-491.
10- Pandya A, Ghodke K. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. Small Ruminant Res. 2007 Mar; 68 (1-2): 193-206.
11- Cengiz ZT, Yilmaz H, Dulger AC, Cicek M. Human infection with Dicrocoelium dendriticum in Turkey. Ann Saudi Med. 2010 Mar-Apr; 30(2): 159-161.
12- Eslami A, Firoozvand Y, Bokaie S, Ronaghi H. Study on the relationship between adult burden and egg per gram of feces in naturally infected sheep with *Dicrocoelium dendriticum*. J Vet Med Lab. 2009 Sep. 1 (1): 9 -16.
13- Senlik BG, Vel k, Muz M, Tinar R. Changes in faecal egg counts at different hours of the day and relationship between faecal egg count and parasite burden in sheep naturally infected with Dicrocoelium dendriticum. Turk J Vet Anim Sci. 2006 May; 30 (1): 107-111
14- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Malone J. A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. Vet Parasitol. 2002 Sep; 108 (2): 137-143.
15- Kopp H. Studies on the egg excertion of Fasciola hepatica and Dicrocoelium dendriticum in sheep and cattle in the course of a year [PhD dissertation]. Munich University, Munch, 1975.
16- Otranto D, Traversa D. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. Vet Parasitol. 2002 Aug; 107 (4): 317-335.
17- Gonzalez-Lanza C, Manga-Gonzalez MY, Campo R, Del-Pozo P, Sandoval H, Oleaga A, et al. IgG antibody response to ES or somatic antigens of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. Parasitol Res. 2000 Dec; 86 (6): 472-479.
18- Anderson N, Luong TT, Vo NG, Bui KL, Smooker PM. The sensitivity and specificity of two methods for detecting Fasciola infections in cattle. Vet Parasitol. 1999 Jun; 83 (1): 15-24.
19- Bagherian Pur E. Isolation and characterization of excretory secretory and somatic antigens of Oestrus ovis larvae by western blot and immunoblotting [dissertation]. Ahvaz: Shahid Chamran University; 2011.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]

20- Simsek S, Koroglu E, Utuk AE. Application of western blotting and enzyme linked immunosorbent sssay (ELISA) for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* in sheep using excretory secretory (E/S) antigens. Turk J Vet Anim Sci. 2006 May; 30 (1): 113-119.
21- Baygan A, Taiefi Nasrabadi N. Differential Diagnosis of Fasciolosis and Dicrocoeliosis by using Somatic Protein Bands. J Vet Clin Res. 2010 Dec; 1(1): 75-80. (Full text in Persian).
22- Fakour S, Meshki B. Determination of specific antigens of Dicrocoelium dendriticum in naturally infected sheep. J Vet Res. 2011 May; 66(1): 61-64. (Full text in Persian).
23- Wedrychowicz H, Ducommum D, Klockiewicz M, Pfistre K. Surface and ES antigens of adult *Dicrocoelium dendriticum* inducing bile antibody responses in naturally infected cattle. Acta Parasitologica. 1996 Sep; 41(3): 139-144.
24- Revilla-Nuin B, Manga-González MY, Minambres B, Gonzalez-Lanza C. Partial characterization and isolation of 130 kDa antigenic protein of *Dicrocoelium dendriticum* adults. Vet Parasitol. 2005 Jul; 134 (3-4): 229-240.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10]