بررسی مقدماتی پیرامون ایمن‌سازی گوساله گاومیش با استفاده از پادگن‌های تخم و *آنکوسفرا کینوکوکوس گرانولوزوس*

دکتر شاهرخ نویدپور[1]* دکتر ناصر حقوقی‌راد[2] دکتر حبیب‌اله پایکاری[3]

تاریخ دریافت: ۳۰ آذرماه ۱۳۸۱
تاریخ پذیرش: ۱۷ اسفندماه ۱۳۸۱

هدف: مقایسه تأثیر پادگن‌های استخراج شده از تخم وانکوسفر فعال *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با منشأ گاومیش در جلوگیری از تشکیل و رشد کیست هیداتیک در گاومیشهای مورد مطالعه.

طرح: کارآزمایی بالینی.

حیوانات: نه رأس گوساله گاومیش نر ۸-۷ ماهه

روش: تهیه *اکینوکوکوس گرانولوزوس* از سگ متعاقب خورانیدن کیست هیداتیک گاومیش، جدا کردن تخم از بند بارور کرمها، کشت آزمایشگاهی تخم و تهیه انکوسفر فعال، سونیکه کردن تخم و انکوسفر فعال و تهیه پادگن هموژن از آنها، تزریق عضلانی یک میلی‌لیتر از پادگن‌های فوق همراه با یاورفروند به گاومیشها و تکرار تزریق با همان مقادیر قبلی ۶ هفته بعد به صورت زیرجلدی، آلوده کردن تجربی گاومیشها با ۵۰۰ عدد تخم *اکینوکوکوس گرانولوزوس* و کشتار گاومیشها و بررسی امعا و احشا آنها ۱۰ ماه پس از آلودگی تجربی.

تجزیه و تحلیل آماری: تقسیم‌بندی گاومیشهای مورد مطالعه در سه گروه ۳ رأسی با کمک جدول تصادفی و مقایسه نتایج به دست آمده با استفاده از روش توکی و با درجه اطمینان ۹۹ درصد.

نتایج: تعداد کیستهای هیداتیک کبد و ریه در گاومیشهای ایمن شده با پادگن به طور معنی‌داری کمتر از گاومیشهای گروه شاهد بود ($P<0/01$). محافظت روده‌ای حاصل از تزریق پادگن ۸۴/۵ درصد و در مورد پادگن انکوسفر ۸۹ درصد به دست آمد و محافظت ایجاد شده در محل استقرار کیست (کبد و ریه) در مورد پادگن تخم ۴۵/۳ درصد و در مورد پادگن انکوسفر ۵۳/۳۷ درصد بود که در هر مورد اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($P<0/01$). ایمنی حفاظتی حاصل از تزریق پادگن تخم ۷۶/۷ درصد و در مورد پادگن انکوسفر ۸۳/۵ درصد به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دادند که پادگن‌های تخم و انکوسفر فعال توانایی ایجاد محافظت را علیه استقرار و رشد کیست هیداتیک در گاومیش داشته و توانایی پادگن انکوسفر فعال در این خصوص بیشتر از پادگن تخم است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۲، ۱۹۱-۱۸۷.

واژه‌های کلیدی: پادگن تخم، پادگن انکوسفر، گاومیش، *اکینوکوکوس گرانولوزوس*، ایمنی‌زایی.

کیست هیداتیک که در اثر خوردن تخم *(Echinococcus gramlosus)* ایجاد می‌شود یکی از بیماریهای عفونی مهم با انتشار جهانی و پراکندگی جغرافیایی متفاوت است. اهمیت بهداشتی بیماری در جوامع بشری، هزینه‌های فراوان درمان و کنترل دارویی و همچنین خسارات اقتصادی ناشی از کاهش محصولات دامی حیوانات آلوده، که بنا بر برخی گزارشها بالغ بر میلیونها دلار است، باعث گردیده که محققین نقاط مختلف جهان توجه ویژه‌ای به آلودگی پیدا نمایند و تحقیقات عدیده‌ای را در راستای پیشگیری و کنترل مؤثر آن انجام دهند (۳). مطالعات انجام شده درخصوص کیست هیداتیک در گاومیش نشان می‌دهد در بنگلادش، هند، پاکستان و عراق به‌ترتیب ۶۹/۶ درصد، ۴۸/۶ درصد، ۴۹ درصد و ۸/۸ درصد گاومیشها آلوده به کیست هیداتیک می‌باشند (۳).

در ایران مطالعات نشان می‌دهد که ۹/۶ و ۸/۵ درصد گاومیشهای ارومیه، ۱/۵۴ درصد گاومیشهای خوی، ۲۵/۰۱ و ۵۷/۷۶ درصد گاومیشهای اهواز، ۷/۳۲ درصد گاومیشهای تبریز و ۸-۴ درصد گاومیشهای شیراز آلوده به کیست هیداتیک می‌باشند (۲،۳). به این ترتیب با توجه به اهمیت ابتلا دامهای مختلف به مراحل نوزادی سستودهای انگلی تحقیقات عدیده‌ای در جهت دستیابی به روشهای مؤثر در ایمن کردن دامها به انجام رسیده است به گونه‌ای که براساس برخی گزارشهای پادگن های تهیه شده از تخم و انکوسفر سستودهای انگلی ۱۰۰-۹۰ درصد محافظت را در دامهای مورد آزمایش ایجاد نموده است (۶،۱۳،۱۴).

نتایج به دست آمده از مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف درخصوص ایمنی‌زایی علیه کیست هیداتیک به شرح فوق می باشد:

۱) گروه انگل شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اهواز، اهواز - ایران.
۲) گروه آموزشی انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.
۳) گروه انگل شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج، کرج - ایران.
*) نویسنده مسؤول Navidpour@37.com

Perliminary study on immunisation of buffalo calf using the egg and oncosphere antigens of *Echinococcus granulosus*

Navidpoor, S.,[1] Hoghooghi-Rad, N.,[2] Paaykari, H.[3]

[1]*Department of Parasitology, Razi Serum and Vaccine Research Institue Ahwas, Ahwaz - Iran.* [2]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid-Chamran University of Ahwaz, Ahwaz - Iran.* [3]*Department of Parasitology, Razi Serum and Vaccine Research Institue Hesarake Karaj, Karaj - Iran.*

Objective: Comparison of the effects of buffalo-originated *Echinococcus granulosus* egg and onchosphere antigens in preventing the establishment and development of hydatid cysts in buffalo.

Design: Clinical trial.

Animals: Nine male buffalo calves, 7-8 months of age.

Procedure: Collection of *E.granulosus* from dogs, orally infected with buffalo-originated viable protoscoleces, separation of eggs from the gravid proglottids, culture of eggs and collection of activated onchospheres, sonication the eggs and onchospheres and preparation their homogenized antigens, intramuscularly injection of each of these antigens, mixed with complete Freund's adjuvant (CFA) to two groups of 3 buffaloes, first injection of PBS plus CFA to controls, second injection,with the same materials to the cases and controls, after 6 weeks, challenging each case and control with 500 *E.granulosus* eggs and slaughtering all buffaloes after 10 months.

Statistical analysis: Analysis of variance, tukey test.

Results: The numbers of liver and lung hydatid cysts were significantly smaller than those of controls. Intestinal protection due to egg and onchosphere antigens were 84.5% and 89% respectively. Site protection of liver and lung against hydatid cyst establishment, achieved by the egg and onchosphere antigens were 45.3% and 53.37% respectively. Immunological protection due to egg and onchosphere antigens were 76.7% and 83.5% respectively, too.

Conclusion: Antigens derived from the *E. granulosus* eggs and onchosphere are able to protect buffaloes against hydatidosis, although the protection potential of activated onchosphere antigen is much higher than the egg antigen. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 2: 187-191, 2003.***

Key words: Egg antigen, Onchosphere antigen, Buffalo, *Echinococcus granulosus*, Immunisation.

corresponding author email:Navidpour@37.com

مطالعات Gemmel در سال ۱۹۶۶، Osborn و Heath در سال ۱۹۸۲، Dempster و همکاران در سال ۱۹۹۱ که نشان دادند استفاده از پادگن‌های تخم و انکوسفر فعال تأثیر قابل توجهی در ایمن کردن حیوانات مورد آزمایش علیه کیست هیداتیک را دارند. براساس این مطالعات Lightowlers و همکاران در سال ۱۹۹۶ واکسنی به نام EG95 را تهیه نمودند که در مطالعات انجام شده در گوسفندان نیوزلند، آرژانتین و استرالیا ۹۶ تا ۱۰۰ درصد ایمنی را نشان داد (۹).

تنها گزارش موجود در مورد گاومیش شامل مطالعه‌ای است که طی آن Singh در سال ۱۹۹۷ از پادگن‌های دفعی-ترشحی برای ایمن کردن گوساله گاومیش استفاده نموده و ایمنی قابل توجهی را به دست آورده است (۸۶ تا ۹۰ درصد) و هیچ مطالعه‌ای درخصوص تأثیر پادگن‌های تخم و انکوسفر در ایمن کردن گاومیش یافت نشد. لذا با توجه به اهمیت گاومیش در استان خوزستان به عنوان یکی از اولویت‌های تحقیقاتی و همچنین قابل توجه بودن درصد آلودگی به کیست هیداتیک در گاومیشهای خوزستان مطالعه حاضر انجام گردید.

مواد و روش کار

الف) تهیه *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با منشأ گاومیش و پادگن‌های تخم و انکوسفر: پس از هماهنگی با کشتارگاههای استان خوزستان، کیستهای هیداتیک گاومیش جمع‌آوری و از نظر استریل یا غیراستریل بودن بررسی شدند، به این ترتیب که با سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری و سرسوزن ۱۴ مایع داخل کیست با دقت خارج شده و در یک ظرف استریل ریخته شده سپس تعداد پروتواسکولکسها در حجم معینی شمارش شده و با کمک مطالعه حرکت سلولهای شعله و رنگ‌آمیزی با ائوزین یک درصد، درصد پروتواسکولکسهای فعال مشخص شدند (۱). در مرحله بعدی سه قلاده سگ ۴ ماهه را در شرایط تحت کنترل قرار داده و پس از عادت به شرایط قفس با استفاده از پرازیکوانتل و لوامیزول هر کدام به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به فاصله سه روز از یکدیگر اقدام به درمان سگها شد و مدفوع سگها تا ۷۲ ساعت بعد از تجویز دارو به دقت جمع‌آوری و معدوم می‌شد. سپس هر یک از سگها از راه دهان با ۱۵-۱۰ عدد پروتواسکولکس آلوده شدند و پس از اطمینان از آلودگی به *اکینوکوکوس گرانولوزوس* (مشاهده تخم در مدفوع)، با تزریق وریدی ۲۰ میلیگرم فنوباریتیال سدیم به ازای هر کیلو وزن بدن مرگ در حالت بیهوشی انجام شد و پس از خارج کردن روده از محوطه بطنی کرمهای بالغ از روده جدا گردیدند. به منظور جدا کردن موکوس چسبیده به جدار کرمها، آنها را دوبار با سدیم بی کربنات شسته سپس بندهای بارور جدا شده و با استفاده از هاون چینی و همزن برقی آنها را خرد نموده و تخمها پس از عبور از الکهای شماره ۳۰۰ و ۶۲۵ جدا شدند. سپس تخمها با محلول نمکی استریل شسته شده و در سرم فیزیولوژی استریل حاوی بنزیل پنی‌سیلین و استرپتومایسین سولفات و نیستاتین ریخته شدند و تا قبل از استفاده در یخچال نگهداری گردیدند (۱۱).

به منظور تهیه انکوسفر فعال ابتدا شیره مصنوعی معده و شیره مصنوعی روده تهیه شد. برای محلول اول سرم فیزیولوژی نمکی استریل به علاوه یک درصد پپسین و یک درصد اسیدکلریدریک غلیظ و برای محلول دوم آب مقطر استریل به علاوه یک درصد پانکراتین (خوکی) و یک درصد بی کربنات سدیم به اضافه ۵ درصد صفرای گوسفند (به صورت استریل از کیسه صفرای گوسفند ذبح شده در کشتارگاه) استفاده گردید.

به منظور فعال کردن انکوسفر ابتدا سرم فیزیولوژی نمکی حاوی تخم برای مدت سه دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد سپس مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب انتهایی در یک لوله درپیچدار شیره مصنوعی معده اضافه گردید. سپس به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب انتهایی شیره مصنوعی روده اضافه گردید و بلافاصله درب لوله‌ها بسته شد. مدت زمان مرحله دوم (در معرض شیره روده) بین ۶۰-۳۰ دقیقه بود که پس از نمونه‌برداری و اطمینان از آزاد شدن جنین شش‌قلاب از داخل تخم، عملیات هضم روده‌ای متوقف گردید (۱۱).

مرحله بعد خرد کردن تخم و انکوسفر فعال بود که برای این کار پس از چند بار فریز و آب کردن محلولهای حاوی تخم و انکوسفر با استفاده از سونیکاتور با پراب ۶ میلیمتری شش بار و هر بار برای مدت یک دقیقه عمل سونیکه کردن در حضور یخ انجام و به منظور جلوگیری از فعالیت آنزیم پروتئاز آزاد شده از سلولها، به لوله‌ها بافر مهار کننده پروتئاز که حاوی EDTA بود اضافه شد. سپس نمونه‌ها غلظت‌سنجی شده (با روش برادفورد) و در شرایط ۳۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند (۶).

ب) ایمن کردن گوساله‌گاومیشها: برای این مرحله از تحقیق ابتدا ۹ رأس گوساله گاومیش نر ۸-۷ ماهه از گاومیش داریهای اطراف شهرستان دزفول خریداری شد و پس از ثبت مشخصات و وزن‌کشی، شماره‌گذاری گردن و گوش انجام شد. سپس در جایگاه های واحد مستقر شدند و عملیات درمانی علیه کرمهای روده‌ای، واکسیناسیون علیه طاعون، پاستورلوز، بروسلوز و تب برفکی و همچنین تست سل انجام شد. سپس گوساله‌های گاومیش با کمک جدول تصادفی به سه گروه تقسیم شدند و عملیات ایمن کردن به شرح ذیل به اجرا درآمد.

ایمنی‌سازی در دو مرحله و به فاصله زمانی ۶ هفته انجام شد. در مرحله اول یک میلی لیتر از پادگن خام تخم (حاوی ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پادگن-اندازه‌گیری شده با روش برادفورد) با حجم مساوی یاور فروند کامل با کمک همزن برقی به صورت سوسپانسیون یکنواخت و خمیری درآمد و داخل عضلانی در دو طرف کپل سه رأس گوساله گاومیش تزریق شد و همین عمل در مورد پادگن انکوسفر (با غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) انجام گردید (در گروه دوم) و به عنوان کنترل به گاومیشهای گروه سوم فقط یاور فروند به علاوه محلول سرم فیزیولوژی استریل داخل عضلانی تزریق گردید. ۶ هفته بعد همین مقادیر پادگن به علاوه یاور ناقص فروند زیرپوستی در دو طرف قفسه سینه و روی دنده‌ها در گروه اول و دوم تزریق شد. در مورد گروه سوم (کنترل) یاور فروند به علاوه سرم فیزیولوژی تزریق گردید.

سه هفته بعد از دومین تزریق پادگن هر ۹ رأس گاومیش (در سه گروه) از راه دهانی به وسیله ۵۰۰ عدد تخم ا. گرانولوزوس با منشأ گاومیش (که در مرحله قبل تهیه شده بود) آلوده شدند.

ج) ذبح گاومیشها و انجام مطالعات بافت‌شناسی: ۱۰ ماه پس از آلودگی تجربی، گاومیشها ذبح شدند و اندامهای داخلی شامل کبد، ریه، طحال، کلیه‌ها، قلب، مغز و زبان به طور مجزا بررسی شد و کیستهای هیداتیک مشاهده شده از بافت جدا شده و در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس برای اطمینان از تشخیص برخی از کیستهای مشکوک نمونه‌های لازم جهت تهیه مقاطع آسیب‌شناسی به بخش آسیب‌شناسی مؤسسه رازی کرج ارسال گردید.

به منظور تعیین میزان درصد ایمنی حاصله در سطح روده‌ای و محل

جدول ۱ - میانگین، تعداد، درصد و جمع کل کیستهای فعال و غیرفعال جمع آوری شده از کبد و ریه گاومیشهای موردمطالعه، ۱۰ ماه پس از آلودگی تجربی با تخم *اکینوکوکوس گرانولوزوس*.

	شماره گاومیش	کبد					ریه					جمع کل کیستهای ریه و کبد
		تعداد کیستهای فعال و غیرفعال	کیست فعال		کیست غیرفعال		تعداد کیستهای فعال و غیرفعال	کیست فعال		کیست غیرفعال		
			تعداد	درصد	تعداد	درصد		تعداد	درصد	تعداد	درصد	
گروه اول	۲۴۵	۴	۱	۲۵	۳	۷۵	۳	۱	۳۳/۳	۲	۶۶/۷	۷
	۲۴۷	۳	۱	۳۳/۳	۲	۶۶/۷	۴	۲	۵۰	۲	۵۰	۷
	۲۴۴	۱	۰	۰	۱	۱۰۰	۲	۰	۰	۲	۱۰۰	۳
	جمع کل	۸	۲	۲۵	۶	۷۵	۹	۳	۳۳/۳	۶	۶۶/۷	۱۷
	$\bar{X}$±SD	۲/۶۷ ± ۱/۵۳	۰/۶۷ ± ۰/۵۸		۲ ± ۱		۳ ± ۱	۱ ± ۱		۲ ± ۰		۵/۶۷ ± ۲/۵۳
گروه دوم	۲۶۱	۲	۰	۰	۲	۱۰۰	۳	۰	۰	۳	۱۰۰	۵
	۲۹۸	۳	۱	۳۳/۳	۲	۶۶/۷	۲	۱	۵۰	۱	۵۰	۵
	۲۵۰	۲	۱	۵۰	۱	۵۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲
	جمع کل	۷	۲	۲۸/۵۷	۵	۷۱/۴۳	۵	۱	۲۰	۴	۸۰	۱۲
	$\bar{X}$±SD	۲/۳۳ ± ۰/۵۸	۰/۶۷ ± ۰/۵۸		۰/۶۷ ± ۰/۵۸		۱/۶۷ ± ۱/۵۳	۰/۳۳ ± ۰/۵۸		۱/۳۳ ± ۱/۵۳		۴ ± ۲/۱۱
گروه سوم	۲۳۱	۱۶	۱۰	۶۲/۵	۶	۳۷/۵	۱۸	۹	۵۰	۹	۵۰	۳۴
	۲۴۶	۲۴	۸	۳۳/۳	۱۶	۶۶/۷	۱۵	۱۲	۸۰	۳	۲۰	۳۹
	۲۷۰*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	جمع کل	۴۰	۱۸	۴۵	۲۲	۵۵	۳۳	۲۱	۶۳/۶	۱۲	۳۶/۴	۷۳
	$\bar{X}$±SD	۲۰ ± ۵/۶۶	۹ ± ۱/۴۱		۱۱ ± ۷/۰۷		۱۶/۵ ± ۲/۱۲	۱۶/۵ ± ۲/۱۲	۱۰/۵ ± ۲/۱۲	۶ ± ۴/۲۴		۳۶/۵ ± ۷/۷۸

*گاومیش شماره ۲۷۰ دو ماه پس از شروع مطالعه به دلیل سپتی سمی باکتریایی تلف شد.

جدول ۲- ویژگی کیستهای مورد مطالعه در گاومیشهای واکسینه با پادگن تخم و انکوسفر و گروه شاهد ۱۰ ماه پس از آلودگی تجربی با تخم *اکینوکوکوس گرانولوزوس*.

گروه مورد مطالعه	میانگین قطر کیست (میلی متر)		تعداد کیست فعال	تعداد کیست غیرفعال	جمع کل کیست	درصد کیست زنده	درصدکیست غیرفعال
	کبد	ریه					
اول (پادگن تخم)	*۳/۵ ± ۱/۵	۴/۹ ± ۲/۱	۵	۱۲	۱۷	۲۹/۳	۷۰/۶
دوم (پادگن انکوسفر)	*۳/۳ ± ۱	۵/۴ ± ۲/۴	۳	۹	۱۲	۲۵	۷۵
سوم (شاهد)	*۵/۱ ± ۱/۳	۸/۳ ± ۴/۷	۳۹	۳۴	۷۳	۵۳/۴	۴۶/۴

* انحراف معیار(SD).

جدول ۳- متوسط تعداد کیستهای هیداتیک فعال و غیرفعال و مجموع کیست‌های جمع‌آوری شده به ازاء هر رأس گاومیش مورد مطالعه.

	متوسط تعداد کیست فعال به ازاء هر حیوان	متوسط تعداد کیست غیرفعال به ازاء هر حیوان	متوسط تعداد کیستهای فعال و غیرفعال به ازاء هر حیوان
اول (پادگن تخم)	۱/۶۶	۴	۵/۶۶
دوم (پادگن انکوسفر)	۱	۳	۴
سوم (شاهد)	۱۹/۵	۱۷	۳۶/۵

استقرار کیست در بدن گاومیشهای مورد مطالعه در تحقیق از فرمولهای زیر استفاده شد (۵).

$$\text{درصد ایمنی حاصله در سطح روده‌ای} = \left(1 - \frac{Nt+Vt}{Nc+Vc}\right) \times 100$$

$$\text{درصد ایمنی حاصله در محل استقرار کیست} = \left[\frac{\frac{Nt}{Nt+Vt} - \frac{Nc}{Nc+Vc}}{1 - \frac{Nc}{Nc+Vc}}\right] \times 100$$

Nt = تعداد کیستهای غیرفعال برای هر حیوان در گروه مورد مطالعه، Nc = تعداد کیستهای غیرفعال برای هر حیوان در گروه شاهد، Vt = تعداد کیستهای فعال هر حیوان در گروه مورد مطالعه، Vc = تعداد کیستهای فعال هر حیوان در گروه شاهد.

محافظت ایجاد شده در گاومیشها با استفاده از فرمول زیر در دو گروه ایمن شده با پادگن تخم و پادگن انکوسفر محاسبه گردید (۴).

$$\text{درصد محافظت ایجاد شده در گروه های تحت مطالعه} = \left(1 - \frac{\text{میانگین تعداد کیست در گروه مورد مطالعه}}{\text{میانگین تعداد کیست در گروه شاهد}}\right) \times 100$$

درنهایت نتایج به دست آمده از بررسی کیست های هیداتیک تشکیل شده در اندامهای آلوده با استفاده از روش آماری Tukey و با درجه اطمینان ۹۹ درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

نتیجه گیری و بحث

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که پادگن‌های خام تخم و انکوسفر فعال *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با منشأ گاومیش توانایی ایجاد ایمنی حفاظتی قابل توجه علیه تخمهای خورانیده شده از راه دهان دارد هر دو پادگن بیشترین فعالیت را علیه مراحل قبل از تشکیل کیست نشان دادند و یک کاهش معنی‌دار ($P< ۰/۰۱$) بین میانگین تعداد کیستهای تشکیل شده در کبد و ریه گاومیشهای ایمن (با پادگن‌های تخم و انکوسفر) در مقایسه با گاومیشهای کنترل مشاهده گردید (جداول ۱ و ۲).

با بررسی نتایج جدول ۳ و قرار دادن نتایج مندرج در جدول ۲ در فرمول گمل، محافظت روده‌ای حاصل از تزریق پادگن تخم ۸۴/۵ درصد و در مورد

پادگن انکوسفر ۸۹ درصد بدست آمد و محافظت ایجاد شده در محل استقرار کیست (در کبد و ریه) در مورد پادگن تخم ۴۵/۳ درصد و در مورد پادگن انکوسفر ۵۳/۳۷ درصد بود که هر دو مورد اختلاف میان پادگن تخم و انکوسفر معنی‌دار بودند ($P<0/01$).

مطالعات انجام شده توسط Heath و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان می‌دهد که سطح خارجی انکوسفر *اکینوکوکوس گرانولوزوس* حاوی تعدادی پروتئین اختصاصی است که پس از ورود به بدن میزبان واسط از واکنش با پادتن اختصاصی ضد این پروتئینها در حضور کمپلمان توانایی ایجاد آسیبهای جدی و شدید را به غشأ پلاسمایی انکوسفرهای خارج شده از تخم دارند و استفاده از پادگن‌های انکوسفر ۹۱ در آلودگی تجربی با تخم انگل مقاومتی برابر ۹۱ درصد ایجاد می‌نماید.

در مطالعه‌ای که Dempster و همکاران در سال ۱۹۹۲ در گوسفند انجام دادند مشخص شد که استفاده از پادگن‌های انکوسفر *اکینوکوکوس گرانولوزوس* که با سدیم دودسیل سولفات تهیه شده‌اند توانایی ایجاد محافظت علیه آلودگی تجربی را تا ۹۱ درصد دارد که در مقایسه با سایر ترکیبات استفاده شده کرم بالغ و کیست اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد به گونه‌ای که این مقاومت در هنگامی که از مایع کیست، مواد استخراجی از کرم بالغ، برود کپسول و پروتواسکولکس به عنوان پادگن استفاده می‌شوند به‌ترتیب ۳، ۵۷، ۴۴، ۷۸ درصد می‌باشد.

Osborn و Heath در سال ۱۹۸۲ نشان دادند که پادگن‌های استخراج شده از محیط کشت انکوسفر در شرایط آزمایشگاهی پس از تزریق به بره‌های جوان به میزان قابل توجهی سطح آنتی‌بادی سرمی را بالا برده به گونه‌ای که سرم گوسفندان ایمن شده قادر به از بین بردن ۹۸ درصد انکوسفرها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

همچنین Singh در سال ۱۹۹۷ طی تحقیقی که در گاومیش انجام داد به این نتیجه رسید که سرم گاومیشهای مورد مطالعه پس از تزریق پادگن دفعی-ترشحی استخراج شده از انکوسفر (در شرایط آزمایشگاهی) ۹۴ درصد انکوسفرها را از بین می‌برد.

Gemmel در سال ۱۹۶۶ نشان داد که پادگن‌های تخم و انکوسفر فعال *اکینوکوکوس گرانولوزوس* هر دو توانایی ایجاد واکنش ایمنی به میزان تقریباً یکسان را در گوسفند داشته و این واکنش برای مدت طولانی باقی خواهد ماند.

اختلاف معنی‌دار موجود بین نتایج مندرج در جداول ۱ و ۲ مربوط به گروه‌های اول و دوم با گروه کنترل در بررسی حاضر نشان می‌دهد که کاهش معنی‌دار تعداد کیستهای فعال و قطر کیستهای هیداتیک تشکیل شده ناشی از بالا بودن توان پادگن‌های مورد استفاده در ایجاد ایمنی حفاظتی در موضع استقرار کیست است. بدین ترتیب علاوه بر ایمنی ایجاد شده در سطح روده‌ای که منجر به کاهش کلی در تعداد کیستهای تشکیل شده در اندامهای می‌شود، این مکانیسم (ایمنی در محل استقرار) باعث عدم رشد و یا کاهش رشد کیستهای جوان خواهد شد و در نتیجه تعداد کیستهای فعال و زنده در گاومیشهای ایمن در مقایسه با گاومیشهای گروه کنترل به طور قابل توجهی کمتر می‌باشد و از طرفی آن دسته از کیستها که از بین نرفته و قادر به ادامه رشد می‌باشند دارای رشد بطئی و بسیار کندتری در مقایسه با کیستهای فعال گروه کنترل می‌باشند. در تأیید این مطلب Gemmel در سال ۱۹۶۶ طی تحقیقی که انجام داد نشان داد که ایمنی در سطح روده‌ای و همچنین ایمنی در محل استقرار کیست در گوسفندانی که با پادگن‌های تخم و انکوسفر فعال *اکینوکوکوس گرانولوزوس* ایمن شده‌اند، در مقایسه با گروه کنترل ۱۰۰-۹۰ درصد محافظت را نشان می‌دهد و این مقادیر در بین گروه های ایمن شده با دو پادگن فوق تفاوت معنی‌داری ندارد درصورتی که در گروه کنترل به طور معنی‌داری کمتر است. به علاوه تعداد کیستهای فعال تشکیل شده در گوسفندان ایمن در مقایسه با گوسفندان شاهد به طور معنی‌داری کمتر است.

درنهایت می‌توان نتیجه گرفت که پادگن تخم و انکوسفر فعال، تهیه شده از تخم *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با منشأ گاومیش دارای توان ایمنی‌زایی و ایجاد ایمنی حفاظتی در گاومیش می‌باشد و درصورت انجام مطالعات تکمیلی شامل شناسایی، جداسازی و خالص نمودن باندهای پروتئینی ایمنی‌زا و محافظت کننده از پادگن های مزبور می‌توان میزان این ایمنی حفاظتی را تا حد قابل توجهی بالا برد و حتی در گامهای بعدی اقدام به تهیه واکسن نوترکیب (مشابه EG95 در گوسفند) نمود.

References

۱. حسینی، س.ح. (۷۴-۱۳۷۳): تعیین سویه‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در ایران، پایان‌نامه دکترای تخصصی انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی تهران- شماره ۲۷.

۲. صاکی، ع. (۱۳۷۸): بررسی میزان آلودگی گاومیشهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز به کیست هیداتیک، پژوهش و سازندگی، شماره ۴۰، ۴۱ و ۴۲، صفحه: ۱۳۳-۱۳۱.

۳. موبدی، ا، دلیمی‌اصل، ع. (۱۳۷۳): اپی دمیولوژی کیست هیداتیک در ایران و جهان، انتشارات مقدم.

4. Dempster, R.P., Berridge, M.V., Harrison, G.B.L. and Heath, DD. (1991): *Echinococcus granulosus*: Development of an intermediat host mouse model for use in vaccination studies. Int. J. Parasit. 21: 549-554.
5. Gemmel, M.A. (1966): Immunological response of the mammalian host against tapeworm infections, IV. Species specifity of hexacant embryos in protecting sheep against *E. granulosus*. Immunology, 11: 325-335.
6. Heath, DD. and Holcman, B. (1997): Vaccination against *Echinococcus* in perspective. Acta Tropica. 67: 37-41.
7. Heath, DD. and Lightowlers, M.W. (1995): Successful development of a recombinant vaccine against hydatid disease. 16th International Congress of Hydatology. 77-78.
8. Heath, DD. and lawrence, SB. (1981): *E. granulosus* cysts: Early development in vitro in the presence of serum from infected sheep. Int. J. Parasit. 11: 261-266.
9. Lightowlers, M.W., gensen, O., Fernandez, E., Iriate, J.A., Woollard, D.J., Gauci, C.G., Jenkins, D. and Heath, DD. (1999): Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. Int. J. Parasitol. 29: 531-534.
10. Lightowlers, M.W., Lawrence, S.B., Gauci, C.G., Young, J., Ralston, M.J. and Mass, D. (1996): Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen Parasite Immunology, 18: 457-62.

11. Osborn, P.J., Heath, DD. and Roberts, MG. (1982): Vaccination of sheep against *Teania ovis*. The response to vaious dose rate of antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro. Res. Vet. Sci. 32: 351-353.

12. Osborn P.J. and Heath, DD. (1982): Immunisation of lambs aginst *Echinococcus granulosus* using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro. Res. Vet. Sci. 33: 132-133.

13. Rickard, M.D. and Bell, K.J. (1981): Successful vaccination of lambs against infection with T. ovis using antigens produced during in vitro cultivation of the larval stages. Res. Vet. Sci. 12: 401-402.

14. Rickard, M.D., Arundel, J.H. and Adolph, A.Y. (1971): A preliminary field trial to evaluate the use of imunisation for the control of naturaly acquired *T.saginata* infection in cattle. Res. Vet. Sci. 30, 1: 104-108.

15. Singh, B.P. (1997): Immunisation of buffalo calves against *E. granulosus* using excretory and secretory antigens of oncospheres. J. Vet. Parasitol. 11. 2: 189-191.