مطالعه پاسخ ایمنی هومورال در گوسفندان آلوده شده به انگل اورنیتو بیلارزیا ترکستانیکم با استفاده از روش ELISA

دکترغلامرضا کریمی [1]* نسرین آبشار [1] مریم درخشانفر [1]

دریافت مقاله :۶ بهمن‌ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۲۸ اردیبهشت ماه ۱۳۸۳

هدف: مطالعه پاسخ ایمنی هومورال در گوسفندانی که به طریق تجربی با انگل اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم آلوده شده بودند و همچنین بررسی آنتی ژن مناسب جهت تست EIISA برای تشخیص این انگل می‌باشد.

طرح: مطالعه تجربی.

حیوانات: تعداد ۶۰ راس گوسفند مورد مطالعه قرار گرفت که ۱۵ راس به اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم، ۲۰ راس به اکینوکوکوس گرانولوزوس و ۲۰ راس به فاسیولا ژیگانتیکا، به طور تجربی آلوده شده بودند و همچنین ۵ راس به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

نتایج: در این مطالعه از روش الایزا برای تشخیص وتعیین عیار پادتن تولید شده در گوسفندانی که به‌طور تجربی با انگلهای اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم، فاسیولا ژیگانتیکا واکینوکوکوس گرانولوزوس آلوده شده بودند، استفاده گردید.

دو آنتی ژن مختلف یعنی آنتی ژن پیکره‌ای و دفعی-ترشحی انگل اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم جهت استفاده در تست الایزا مورد بررسی قرار گرفت. آنتی ژن دفعی - ترشحی با آنتی سرمهای فاسیولا ژیگانتیکا واکنش متقاطع کمتری را نشان دادند یعنی ۸ مورد از ۲۰ مورد سرم تحت آزمایش(۴۰درصد) و این در حالیست که آنتی ژن پیکره‌ای در ۱۱ مورد از ۲۰ مورد سرم تحت آزمایش (۵۵درصد) واکنش متقاطع را نشان دادند.

هیچ‌یک از ۲۰ آنتی‌سرم اکینوکوکوس گرانولوزوس تحت‌آزمایش باآنتی ژن‌های پیکره‌ای و دفعی- ترشحی اورنیتو بیلارزیا ترکستانیکم واکنش متقاطع ایجاد نکردند. نتایج نشان می‌دهد که عیار پادتن در ماههای اول و دوم پس ازآلودگی بسیار به کندی بالا رفته و در ماه چهارم به بالا ترین میزان خود رسیده و تا زمان کشتار یعنی ۱۰ تا ۱۲ ماه پس ازآلودگی همچنان بالا باقی ماند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۱، ۸۶-۷۹.

واژه‌های کلیدی: اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم، آنتی ژن دفعی - ترشحی، آنتی ژن پیکره‌ای، تست ELISA، گوسفند.

اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم (Ornithobilharzia turkestanicum) یکی از گونه‌های جنس اورنیتوبیلارزیا متعلق به خانواده شیستوزوماتیده می‌باشد. سیر تکاملی آنها شبیه به شیستوزوماها و محل زندگی در رگهای خونی روده بند و سیاهرگهای کبدی می‌باشد. کرم ماده تخمگذار در رگهای خونی کوچک مخاطات و زیر مخاطات روده بند نفوذ کرده و در مویرگها تخمگذاری می‌کند. مدت زمان لازم برای ظهور تخم در مدفوع ۴۶-۴۳ روز می‌باشد.

۱) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک، کرج - ایران.
*) نویسنده مسؤول: karimighr2003@yahoo.com

Study on humoral immune- response in sheep experimentally infected with Ornithobilharzia turkestanicum by using ELISA test.

Karimi,Gh.R.,[1] Abshar, N.,[1] Derakhshanfar, M.[1]

[1]Razi Vaccine and Serum Reseach Institute Karaj- Hessarak, Tehran-Iran.

Objective: To study the humoral immune - responses in sheep experimentally infected with O. turkestanicum and to compare two different antigens in ElISA test : excretory / secretory and somatic .

Design: Experimental study.

Animals: Sixty sheep were divided into four groups : 1) 15 sheep were infected experimentally with O. turkestanicum, 2) 20 experimentally infected sheep with Fasciola gicantica, 3) 20 experimentally infected sheep with Echinococcus granulosus 4) 5 non infected lambs - control groups.

Procedure: In this study total antibody response to worm extract antigens and to excretory/ secretory products (ES) were determined in 15 Ornithobilharzia turkestanicum infected sheep at monthly intervals for 12 months.

Results: The infection induced an early and relatively highly immune-response to adult worm extract . This response reached its maximum level at 4 months post infection. The response to worm extracts antigens was slighthly higher than to ES products . The response against ES antigens was started later and remained at its maximum level untile 10 - 12 months after infection. A remarkable level of cross- reactivity was observed when Fasciola gigantica antisera were used .A low degree of cross reactivity was found with ES antigens of O . turkestanicum.There were not any cross reactivity between anti Echinoccucos granolusos sera to both tested antigens (ES & worm extract). ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,1:79-86,2005.***

Key words: Ornithobilharzia turkestanikum, Exertory/ secretory antigen, Somatic antigen, ElISA test, Sheep.

Corresponding author's email: karimighr2003@yahoo.com

میراسیدیوم پس از برخورد با حلزون میزبان واسط یعنی auricularia Lymnaea، و Lymnaea gedrosiana وارد بدن آنها شده و پس از طی مراحل نوزادی به‌صورت سرکر از بدن حلزون خارج می‌گردد.

میزبان نهایی آن گوسفند، بز، گاو، گاومیش، اسب، الاغ، قاطر، شتر، گربه، موش وگراز می‌باشند.

پس از نفوذ سرکر به داخل پوست حیوان آلوده شده و تولید کرم بالغ در آلودگی شدید علا ئمی مانند لاغری، اسهال بدبو و مزمن، بی اشتهایی، فرورفتگی محوطه شکمی و زبری موها دیده می‌شود (۱،۲،۴،۲۲).

طبق اطلاعات به‌دست آمده به‌جز چند مورد محدود، آزمایشهای سرولوژی وسیعی برای تشخیص بیماری اورنیتوبیلارزیوز به‌کار برده نشده است، لذا با توجه به اینکه تعداد تخم انگل در مدفوع بسیار محد ود بوده و تشخیص انگل از طریق جستجوی تخم در مدفوع مشکل می‌باشد، آزمایشهای سرولوژی می‌توانند تا حدودی تعیین کننده عیار پادتن تولید شده و در نتیجه تشخیص بیماری باشند. در این مطالعه سعی شده است با استفاده از تست ElISA عیار پادتن تولید شده در زمانهای مختلف پس از آلودگی تجربی تعیین گردد.

مواد و روش‌کار

در این مطالعه مجموعا ۶۰ راس گوسفند به شرح زیر مورد مطالعه قرار گرفتند: ۱۵ راس گوسفند که به‌طور تجربی با سرکرهای فعال و زنده اورنیتو بیلارزیا به دو روش پوستی و تزریق زیر جلدی آلوده شده بودند (تعداد متوسط ۵۰۰۰ سرکر) در فواصل زمانی مختلف (قبل از آلودگی، دو هفته، یکماه، چهار ماه، شش ماه و یک سال پس ازآلودگی) نمونه‌های سرمی تهیه گردید.

الف: روش پوستی: دست چپ گوسفندان تحت آزمایش (۸ راس) را در ظرف پلاستیکی استوانه‌ای که حدودا حاوی ۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سرکر زنده و فعال بود، به مدت یکساعت در معرض سرکرها قرار دادیم تا به آسانی بتوانند از راه پوست نفوذ نمایند.

ب: روش تزریق زیر جلدی: گوسفندان تحت آزمایش (۷ راس) با تعداد مشخصی سرکر (بین ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سرکر زنده و فعال)، به‌وسیله سرنگ، در ناحیه جلد و زیر کتف تزریق گردیدند. گوسفندان در تمام مدت آزمایش ازنظر علائم درمانگاهی و آزمایش مدفوع تحت نظر بودند وپس از طی زمان معین کالبدگشا یی شدند و کرمهای زنده جداگردید.

ج: از تعداد ۲۰ گوسفندی که با متاسرکرهای فعال و زنده فاسیولا ژیگانتیکا آلوده شده بودند یکماه وسه ماه پس از آلودگی نمونه‌های سرمی تهیه گردید. برای تهیه متا سرکرها و آلوده نمودن گوسفندان از روش پایکاری استفاده شد(۳).

د: از تعداد ۲۰ گوسفندی که با تخمهای زنده و فعال اکینوکوکوس گرانولوزوس به طور تجربی و طبق روش (Heat, Lawrence درسال ۱۹۸۱) آلوده شده بودند در فواصل یک، دو و سه ماه پس از آلودگی، آنتی سرم تهیه گردید(۱۶).

هـ: تعداد ۵ راس گوسفند زیر یک سال که حتی الامکان از آلودگیهای انگلی (بخصوص آلودگیهای کرمی) پاک بودند، به‌عنوان گوسفندان شاهد به‌کار برده و با سرم فیزیولوژی استریل به صورت تزریق زیر جلدی تلقیح گردیدند.

نمونه‌های سرمی از گوسفندان آلوده شده با اورنیتوبیلارزیا و گوسفندان شاهد در فواصل زمانی مناسب یعنی قبل از آلوده شدن (در مورد گوسفندان آلوده) دو هفته، یکماه، دو ماه، چهارماه، شش ماه و یکسال پس از آلودگی سرم تهیه‌گردید و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

تهیه آنتی ژن: آنتی ژن‌های دفعی - ترشحی و پیکره‌ای به طریق زیر تهیه‌گردید:

الف - آنتی ژن دفعی ترشحی: بر اساس روش Bautista درسال ۱۹۸۹ تعداد ۱۵۰تا۲۰۰عدد کرم زنده در یک ظرف در پیچ دار حاوی ۱۵ میلی‌لیتر PBSدر pH= ۷/۴)، ریخته شد(۷). پس از ته نشین شدن کرمها سه بار آنها را شستشو داده و بار چهارم پس از اضافه کردن مقداری PBS روی آنها، به مدت سه ساعت در اتوی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس مایع رویی با دور ۲۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه (در ۴ درجه سانتی‌گراد) سانتریفوژ شد. این سوسپانسیون حاوی آنتی ژن دفعی ترشحی انگل می‌باشد.

میزان پروتئین این سوسپانسیون با استفاده از روش Lowry درسال ۱۹۵۱ اندازه‌گیری شد و میزان پروتئین آن ۸ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید(۲۱).

ب - آنتی ژن پیکره‌ای: برای تهیه آنتی ژن پیکره‌ای از روش Chaffee درسال ۱۹۵۴ استفاده گردید(۹). به طور خلاصه، در این روش پس از له نمودن کرمها در دستگاه بافت خرد کن (tissue grinder) میزان ۱۰ میلی لیتر اتر خالص سرد به آنها اضافه شد و سوسپانسیون به مدت ۶ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد، سپس برای مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با دور (۸۵۰g ۴۰۰۰rpm) سانتریفیوژ گردید. پس از خارج کردن اتر روئی، بافر ورونال (VBSبا PH=۷/۲) به آن اضافه نموده و سپس برای مدت ۴ ساعت در یخچال قرار داده شد و پس از سانتریفیوژ مجدد به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۵۰گرم، مایع روئی را برداشته و با استفاده از روش Lowrey میزان پروتیین آن ۶۶ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید(۲۱).

روش استاندارد نمودن رقتهای آنتی ژن، آنتی سرم و آنتی بادی کانژوگه:

الف: سرم کنترلهای مثبت: به دلیل عدم دسترسی به سرم‌های تجاری، جهت تهیه سرم کنترلهای مثبت، ازگوسفندانی که به طور تجربی به انگل اورنیتوبیلارزیا آلوده شده بودند، و بالا ترین عیار را در تستهای ElISA، IHA نشان داده بودند وهمچنین در کالبدگشایی حیوان تعداد بیش از ۵۰۰ کرم از آنها جدا شده بود استفاده شد، سرم‌ها به‌صورت یک کاسه (Pooled) تهیه و به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. از سرم کنترلهای مثبت مانند سایر سرم‌های مورد آزمایش رقتهای ۱:۵۰ تا ۱:۳۲۰۰ تهیه گردید. رقت ۱:۲۰۰ به عنوان بهترین رقت انتخاب شد.

ب: سرم کنترلهای منفی: از سرم بره‌های جوان که هیچ‌گونه آلودگی انگلی کرمی نداشتند رقتهای ۱:۵۰ تا ۱:۳۲۰۰ تهیه گردید و به عنوان سرم کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند. رقت ۱:۲۰۰ به عنوان بهترین رقت

جدول ۱- عیار پادتن در گوسفندان شاهد در فواصل زمانی مختلف .

عیار پادتن در زمان کشتار (یکسال بعد)	عیار پادتن شش ماه بعد از تزریق	عیار پادتن چهار ماه بعد از تزریق	عیار پادتن دو ماه بعد از تزریق	عیار پادتن چهار هفته بعد از تزریق	عیار پادتن دو هفته بعد از تزریق	عیار پادتن قبل از تزریق	تعداد کرم جدا شده	نوع تزریق	جنس گوسفندان	شماره گوسفندان
۰/۳۹۹	۰/۴۱	۰/۴۴۹	۰/۴۰۲	۰/۳۲۹	۰/۳۴۳	۰/۳۳۹	o	کنترل	ماده	۲۴۴
۰/۳۵۶	۰/۴۷۹	۰/۵۰۹	۰/۴۴۴	۰/۴۳۲	۰/۳۰۹	۰/۴۲	o	کنترل	ماده	۲۱۱
۰/۴۴۲	۰/۴۱۳	۰/۴۱۵	۰/۴۴	۰/۵۰۲	۰/۴۴۶	۰/۳۶۹	o	کنترل	نر	۲۸۲
۰/۴۴۸	۰/۴۵۸	۰/۴۰۲	۰/۴۸۴	۰/۳۷۵	۰/۴۴۶	۰/۴۴۳	o	کنترل	نر	۸۱
۰/۴۵۳	۰/۳۷۲	۰/۳۶۷	۰/۴۶	۰/۳۸۱	۰/۴۵۱	۰/۴۸	o	کنترل	ماده	۲۳۴
۰/۴۱۹	۰/۴۲۶	۰/۴۲۸	۰/۴۴۶	۰/۴۰۴	۰/۳۹۸	۰/۴۱				میانگین جذب نوری

جدول۲- عیار پادتن در گوسفندان آلوده شده به روش پوستی در فواصل زمانی مختلف.

عیار پادتن زمان کشتار (یکسال بعد)	عیار پادتن شش ماه بعد از آلودگی	عیار پادتن چهار ماه بعد از آلودگی	عیار پادتن دو ماه بعد از آلودگی	عیار پادتن یک ماه بعد از آلودگی	عیار پادتن دو هفته بعد از آلودگی	عیار پادتن قبل از آلودگی	تعداد کرم جدا شده	روش آلودگی	جنس گوسفند	شماره گوسفندان
۱/۰۴۴	۰/۸۲	۰/۵۹۳	۰/۴۳۲	۰/۴۴۲	۰/۳۵۱	۰/۳۷۸	۲۰عدد	پوستی	ماده	۱۵۰
۰/۸۸۶	۰/۸۱۸	۰/۹۴۶	۰/۵۸۵	۰/۶۲۱	۰/۶۶۳	۰/۲۴۵	۱۵عدد	پوستی	ماده	۲۰۲
۰/۴۴۱	۰/۳۶۸	۰/۴۱۸	۰/۴۱	۰/۴	۰/۳۶۸	۰/۲۶۶	۲۰۰عدد	پوستی	نر	۲۸۴
۰/۴۳۶	۰/۵۴۸	۰/۳۶	۰/۳۱۴	۰/۳۳۲	۰/۳۸۱	۰/۲۵۸	۲۰۰عدد	پوستی	نر	۲۹۹
۰/۸۶	۰/۸۹۱	۰/۴۴۱	۰/۲۷۲	۰/۲۳۲	۰/۱۰۹	۰/۱۳۷	۱۰۰عدد	پوستی	نر	۲۸۳
۱/۰۸۲	۰/۸۸۲	۰/۸۱۷	۰/۶۴۸	۰/۵۱۸	۰/۴۱۲	۰/۴۲۳	۱۵۰۰عدد	پوستی	نر	۱۶۰۰
۱/۲۳۰	۱/۰۲	۰/۸۳۹	۰/۶۸۲	۰/۵۳۱	۰/۳۵۴	۰/۳۸۲	۳۰۰۰عدد	پوستی	نر	۶۶۶
۰/۶۲	۰/۶۸۰	۰/۶۵۲	۰/۶۳۶	۰/۵۷۴	۰/۳۲۱	۰/۳۲۵	۱۵عدد	پوستی	نر	۰۰۴۴
۰/۸۲۶	۰/۷۵۳	۰/۶۳۳	۰/۴۹۷	۰/۴۵۶	۰/۳۶۹	۰/۳۰۱				میانگین جذب نوری

انتخاب گردید.

تعیین رقت مناسب سرم‌های تحت آزمایش جهت تست الایزا: رقتهای ترتیبی(Serial Dilution) از رقت ۱:۵۰ تا ۱:۳۲۰۰ تهیه گردید (در محلول PBS - Tween۲۰). رقت ۱:۲۰۰ به عنوان بهترین رقت انتخاب شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید.

تعیین رقت مناسب کانژوگه جهت تست الایزا: رقتهای ۱:۵۰۰ تا ۱:۱۰۰۰۰ از کانژوگه تهیه شده و رقت ۱:۶۰۰۰ به عنوان بهترین رقت انتخاب گردید.

SIGMA-Anti sheep conjugate IgG(whole molecule) peroxidase ,Antibody developed in donkey .

تعیین رقت مناسب آنتی ژن: برای تعیین بهترین رقت آنتی ژن و کانژوگه مورد استفاده یک آزمون شطرنجی (Checher Board Test) تهیه شده و پس از تعیین میزان پروتیین آنتی ژن با بافر کربنات بی‌کربنات به رقتهای ۱۰، ۷/۵، ۵،۲/۵،۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه نموده و بهترین رقت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر انتخاب گردید.

سوبسترای مورد استفاده در تست الایزا: از سوبسترای از شرکت SIGMA O-PHENYLENEDIAMINE (1,2-Benzenediamine) استفاده گردید.

روش کارالایزا: براساس روش Craig درسال ۱۹۸۶ تست الایزا با استفاده از پلیتهای ۹۶ خانه‌ای (Maxisorb، Nunc، Denmark) انجام گردید(۱۰). به‌طور خلاصه، پلیت‌ها را پس از کوت کردن با آنتی ژن (۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در بافر کربنات (pH=۹.۶) رقیق نموده، سپس با محلول بلاکینگ (BSA/ PBS/ Tween۲۰) برای یکشب در ۴ درجه سانتیگراد، انکوبه گردید.

جدول ۳- عیار پادتن در گوسفندان آلوده شده به روش تزریقی در فواصل زمانی مختلف.

شماره گوسفندان	جنس گوسفند	نوع تزریق	تعداد کرم جدا شده	عیار پادتن قبل از آلودگی	عیار پادتن دو هفته بعد از آلودگی	عیار پادتن یکماه بعد از آلودگی	عیار پادتن دو ماه بعد از آلودگی	عیار پادتن چهار ماه بعد از آلودگی	عیار پادتن شش ماه بعد از آلودگی	عیار پادتن زمان کشتار (یکسال بعد)
۲۷۸	نر	تزریق زیر جلدی	۲۰۰	۰/۳۲	۰/۳۶۳	۰/۴۴۹	۰/۵۹۲	۰/۷۶۹	۰/۸۰۴	۰/۷۸۶
۱۷۵	ماده	تزریق زیر جلدی	۲۵۰	۰/۳۲۹	۰/۳۵۸	۰/۵۶۱	۰/۷۴۵	۰/۷۹۵	۰/۸۳۲	۰/۹۲۷
۲۸۵	نر	تزریق زیر جلدی	۵۰۰	۰/۳۸۸	۰/۴۰۲	۰/۴۸۴	۰/۶۶	۰/۶۹۷	۰/۹۲۹	۰/۷۲۱
۲۹۳	نر	تزریق زیر جلدی	۲۰۰	۰/۳۴۹	۰/۴۴۹	۰/۶۳۱	۰/۶۶۸	۰/۷۱۴	۰/۷۸۶	۰/۷۵۲
۱۶۷	ماده	تزریق زیر جلدی	۳۰۰	۰/۳۳۲	۰/۳۱۵	۰/۴۳۵	۰/۷۰۴	۰/۸۷۹	۰/۸۱۶	۰/۸۵۶
۱۴۲	نر	تزریق زیر جلدی	۵۰۰	۰/۳۴۹	۰/۳۲۵	۰/۵۰۷	۰/۵۳۲	۰/۵۸۲	۰/۶۰۲	۰/۶۴۰
۳۲۲۴	نر	تزریق زیر جلدی	۳۰۰۰	۰/۳۱۲	۰/۳۵۶	۰/۴۱۸	۰/۳۹۹	۰/۴۳۹	۰/۴۳۱	۰/۵۱۲
میانگین جذب نوری				۰/۳۳۹	۰/۳۶۶	۰/۴۹۷	۰/۶۱۴	۰/۶۹۶	۰/۷۴۲	۰/۷۴۲

سپس سرم‌ها را که بهترین رقت برای آنها ۱:۲۰۰ انتخاب شده بود اضافه نموده (۱۰۰میکروگرم برمیلی لیتر) و برای یکساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار دادیم. سپس کانژوگه که به رقت مناسب تهیه شده بود(رقت ۱:۶۰۰)، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید و پس از سپری شدن مدت معین و شستشوی پلیتها از اضافات کانژوگه، سوبسترا را به رقت مناسب به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر افزوده و سپس با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Technologies -Dynex MRXII) میزان جذب نوری آنرا با طول موج ۴۰۵ خوانده شد.

میزان cut off الایزا در این تست بر اساس میانگین جذب نوری سرم کنترلهای منفی به اضافه سه انحراف معیار اندازه‌گیری گردید.

نتایج

نتایج این آزمایش در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است. همان‌طور که در جدول ۱ یعنی گوسفندان شاهد نشان داده می‌شود، عیار پادتن در هر ۵ راس گوسفند از زمان هفته دوم تا زمان کشتار یعنی حدود یکسال، تغییر محسوسی پیدا نکرد و منحنی آن به صورت یک خط نسبتا ثابت باقی ماند. (نمودار ۳).

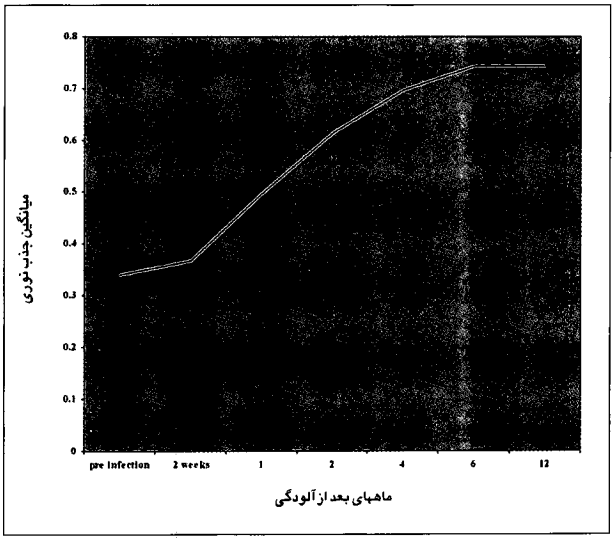
جدول ۲ عیار پادتن درگوسفندانی را که به طریق پوستی آلوده شده‌اند را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود عیار پادتن در زمان قبل و دو هفته پس از آلودگی از میزان cut off(۰/۶۳۲) پایین تر بوده، در یکماه پس از آلودگی نیز منفی می‌باشد. میانگین دو ماه پس از آلودگی نیز از حد cut off پایینتر می‌باشد. چهار ماه پس از آلودگی ۵۰درصد موارد (یعنی ۴ راس ازگوسفندان) عیار بالا تر از cut off را نشان می‌دهند ودراین زمان به وضوح عیار پادتن بالا رفته است. شش ماه پس از آلودگی ۷۵درصد موارد (۶ راس ازگوسفندان) عیار بالای cut off را نشان دادند. در زمان کشتار یعنی یکسال پس از آلوده شدن ۵/ ۶۲ درصد از موارد (۵ راس ازگوسفندان) عیار بالا تر از cut off را نشان می‌دهند. بنابراین مشخص می‌شود که عیار پادتن از ماههای اول تا سوم بتدریج بالا رفته و در ماه چهارم به بعد با شتاب بیشتری بالا می‌رود و در شش ماهگی به اوج خود می‌رسد. و تا زمان کشتار یعنی یکسال بعد نیز با همان عیار باقی می‌ماند.این جدول نشان می‌دهد که جنسیت حیوان و تعداد کرم جدا شده تاثیر چندانی بر روی عیار پادتن ایجاد شده ندارد. نمودار ۲ نیز نشان می‌دهد که عیار پادتن از ماه اول شروع به بالا رفتن کرده و در ماه چهارم با شتاب بیشتری بالا می‌رود و در ماههای ششم تا زمان کشتار (ماه ۱۰ تا ۱۲) همچنان بالا باقی ماند.

جدول۳ عیار پادتن حاصل از تزریق سرکر به داخل جلد (تزریق زیر جلدی) را نشان می‌دهد. طبق اطلاعات ارائه شده در این جدول، عیار پادتن در قبل و دو هفته پس از آلودگی از نظر نتیجه الایزا منفی است. یک ماه و دو ماه پس از آلودگی عیار پادتن زیر cut off را نشان می‌دهند، در حالیکه چهار ماه پس ازآلودگی در۵ راس از ۷ راس گوسفند (۷۱/۴۲ درصد) بالا رفتن عیار پادتن در آزمایش الایزا مثبت است. شش ماه پس از آلودگی ۵ راس از گوسفندان (۸۵/۷۱ درصد) عیار پاتن بالا را در تست الایزا نشان می‌دهند.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود میزان عیار پادتن ازدو ما ه پس از آلودگی بتدریج بالا رفته و از ماه چهارم و ششم با شتاب بیشتری بالا می‌رود واین میزان تا زمان کشتار نیز باقی می‌ماند. نمودار ۱ این مطلب را به خوبی نشان می‌دهد. در اینجا نیز میزان کرم جدا شده در ایجاد میزان پادتن تاثیر چندانی ندارد.

بحث

با توجه به انتشار وسیع انگل اورنیتوبیلا رزیا ترکستانیکم و همچنین میزبان‌های واسط آن یعنی حلزون Lymnaea auricularia و L. gedrosiana در اکثر نقاط ایران و جهان، انتظار می‌رود که آلودگی در دامهای نقاط وسیعی از



نمودار ۱- میانگین جذب نوری عیار پادتن در گوسفندان آلوده شده به طریق زیر جلدی با سرکر اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم

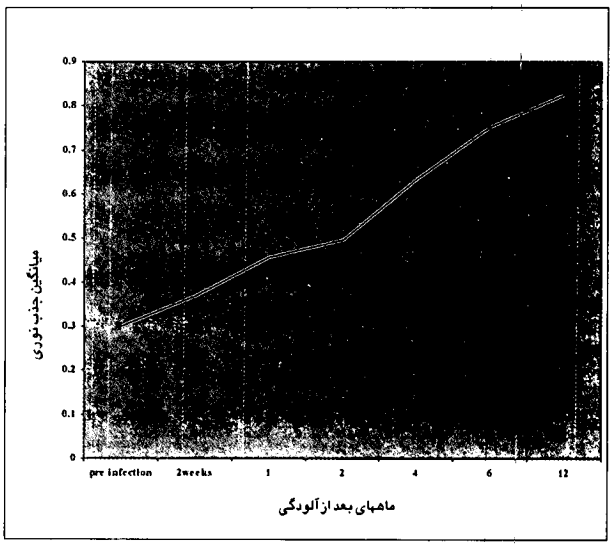
کشور توسعه داشته باشد. در سالهای اخیر نیز چند همه‌گیری در منطقه اقلید فارس ملکی و همکاران در سال ۱۳۷۳ و منطقه شادگان خوزستان در سال ۱۳۷۷، کریمی وهمکاران درسال ۱۳۸۲ گزارش شده است(۵،۶). با توجه به ضررهای اقتصادی وسیعی که این انگل به تولید گوشت، پشم و ارزش کشتارگاهی روده‌ها وارد می‌کند، در نتیجه تشخیص سریع و به موقع بیماری با استفاده از تکنیکهای انگل شناسی (جستجوی تخم انگل درمدفوع) وروشهای سرولوژی (EIISA، IFA، IHA،...) ضروری می‌باشد. تا کنون تکنیکهای متعددی جهت تشخیص شیستوزوماها بکار برده شده است، در حالی‌که طبق اطلاعات موجود به جز چند مورد Geng درسال ۱۹۹۴ و کریمی درسال ۱۳۸۲، برای تشخیص سرولوژیکی اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم بررسی‌های زیادی انجام نگرفته است(۵،۱۲). Geng از مجموع ۵۵ گوساله آلوده به اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم با روش الایزا ۹۸/۷ درصد جواب مثبت به دست آورد. همچنین در ۷۸ گوساله سالم ۹۸/۴ درصد از آنها پاسخ الایزای منفی را نشان دادند. او نتیجه گرفت که این تست در مقایسه با تست IHA و دیگر تستهای سرولوژی جواب حساستر و بهتری را نشان می‌دهد.

چون تعداد تخم انگل در مدفوع بسیار محدود بوده و مشاهده تخم انگل در مدفوع بعد از ۴۵ روز امکانپذیر می‌باشد. لذا می‌توان ازآنتی ژن‌های اختصاصی(مانند آنتی ژن‌های دفعی-ترشحی و آنتی ژن‌های پیکره‌ای انگل) در روشهای ساده سرولوژی مانند EIISA، IFA، IHA بهره برد. هر چند مشاهدات نشان می‌دهد که استفاده از آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی و پیکره‌ای انگل اورنیتوبیلارزیا در روشهای تشخیص سرولوژی می‌تواند بسیار مفید باشد، اما به علت واکنشهای متقاطعی که این آنتی ژن‌ها (پیکره‌ای و دفعی - ترشحی) با آنتی ژن‌های سایر انگلها بخصوص به گونه فاسیولاها دارند، لذا بایستی با استفاده از آنتی ژن‌های بسیار اختصاصی در هر یک از این انگلها، این گونه واکنش‌های متقاطع را به حد اقل رساند Hassam در سال ۱۹۸۹ در مطالعه حاضر، پاسخ ایمنی هومورال درگوسفندانی که به‌طور تجربی با سرکرهای اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم آلوده شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت(۱۸). در این بررسی پاسخهای هومورال تا هفته چهارم تقریبا نامحسوس بوده ولی از ماه دوم به بعد شروع به بالا رفتن کرد و در ماه چهارم به اوج خود رسید و تا زمان ذبح حیوان یعنی ۱۰ تا ۱۲ ماه پس از آلودگی همچنان در سطح بالا باقی ماند و یا به میزان بسیار جزئی پایین آمد.

Rodriguz و همکاران درسال ۱۹۹۹ در یک بررسی که بر روی شش گوسفند سه ماهه با استفاده از تست الایزا برای ارزیابی عیار پادتن علیه شیستوزوما بویس انجام داده بودند، نشان دادند که عیار IgG سه هفته پس از آلودگی شروع به بالا رفتن کرده و در نهمین هفته (در ۲/۵ ماهگی) به حد اکثر میزان خود رسید و پس از آن به آرامی پایین می آید(۲۶). Johanson و همکاران درسال ۱۹۹۶ مطالعه پاسخ ایمنی هومورال را در بزهایی که به‌طور تجربی با سرکرهای شیستوزوما بویس آلوده شده بودند، مورد بررسی قرار دادند(۱۷). آنها مشاهده کردند که پادتن‌های اختصاصی (IgG، IgM،Ig total) علیه آنتی ژن‌های شیستوزوما بویس همگی در چهارمین هفته پس از آلودگی شروع به بالا رفتن کرده و تا هفته‌های ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ همچنان بالارفت. و در مورد آنتی ژن تخم شیستوزوما بویس افزایش قابل توجه در ایمنوگلوبولین توتال و پاسخهای اختصاصی در گروههای آلوده شده از هشتمین هفته پس از آلودگی مشاهده گردید و تا پایان زمان مطالعه همچنان بالا باقی ماند.

در بررسی حاضر از دو نوع آنتی ژن انگل اورنیتوبیلارزیا ، یعنی آنتی ژن پیکره‌ای و آنتی ژن دفعی - ترشحی استفاده گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده، آنتی ژن پیکره‌ای باعث پدید آمدن سریعتر پاسخ آنتی بادی، یعنی در هفته دوم پس از آلودگی گردید و بتدریج شروع به بالا رفتن کرد و تا زمان ذبح نیز همچنان بالا باقی ماند. در حالی‌که آنتی ژن دفعی - ترشحی به آرامی یعنی از هفته چهارم شروع به بالا رفتن کرده و همان‌طور بتدریج بالا رفت و تا ماه چهارم به قله اوج خود رسید .اما به دلیل بیشتر بودن واکنشهای متقاطع آنتی ژن پیکره‌ای با آنتی سرمهای فاسیولا ژیگانتیکا، ترجیح داده شد از آنتی ژن‌های دفعی - ترشحی انگل برای تست الایزا استفاده شود. ونتایج به‌دست آمده منطقی تر به نظر می‌رسید.

Rodriguez وهمکاران درسال ۱۹۹۹ نشان دادند که پاسخ به آنتی ژن دفعی - ترشحی بهتر از آنتی ژن پیکره‌ای کرم بالغ شیستوزوما بویس می‌باشد(۲۵). هر چند که پاسخ در هشتمین هفته پس از آلودگی شروع شده و تا پانزدهمین هفته در همان سطح باقی می‌ماند، آنها مشاهده کردند که یک واکنش متقاطع بسیار مشخص در استفاده از آنتی سرم‌های شیستوزوما با آنتی ژن پیکره‌ای فاسیولا دیده می‌شود. در حالی‌که با آنتی ژن دفعی - ترشحی انگل واکنش متقاطع کمتر بود و عیار پادتن در هفتمین هفته پس از آلودگی به بالا ترین حد خود رسید. آنها همچنین دریافتند که در زمان استفاده از آنتی ژن‌های پیکره‌ای و دفعی - ترشحی شیستوزوما بویس با آنتی سرمهای فاسیولا در تست الایزا، واکنش متقاطع در استفاده از آنتی ژن‌های دفعی - ترشحی در حد اقل میزان خود بود.



نمودار۲- میانگین جذب نوری عیار پادتن در گوسفندان آلوده شده به طریق پوستی با سرکر اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم

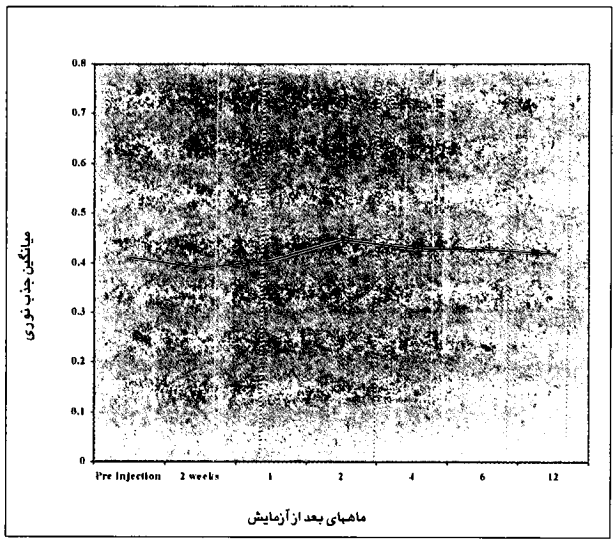
Johanson و همکاران درسال ۱۹۹۶ در مطالعه پاسخ ایمنی هومورال در بزهایی که به‌طور تجربی با سرکرهای شیستوزوما بویس آلوده شده بودند، مشاهده کردند که پاسخ ایمنی نسبت به عصاره پیکره‌ای کرم سریعتر از آنتی ژن‌های دفعی - ترشحی به‌دست می آید و پاسخ نسبت به آنتی ژن‌های دفعی - ترشحی مانند پاسخ به آنتی ژن‌های تخم انگل دیرتر ایجاد می‌شود یعنی در هشتمین هفته پس از آلودگی و تا پایان پانزدهمین هفته نیز همچنان بالا باقی ماند(۱۷).

بر طبق نظر **Lai**و همکاران درسال ۱۹۸۹ و **Sloan** درسال ۱۹۹۱ وجود این واکنشهای متقاطع ممکن است به دلیل وجود فسفوریل کولین (Phosphory[1] choline) باشد. این اپی توپ در بسیاری ازانگلها بخصوص درگونه‌های شیستوزوماها (*Schistosoma spp*) وگونه فاسیولاها (*Fasciola spp*) یافت می‌شود(۱۹،۲۷).

بسیاری از محققین وجود این مسئله یعنی واکنش متقاطع شیستوزوماها را با فاسیولاها به عنوان یک عامل در ایجاد واکنشهای متقاطع در تستهای سرولوژیک گزارش نموده‌اند.

Hillyer و همکاران درسال ۱۹۸۸ ضمن ایمن سازی موشها با آنتی ژن پیکره‌ای کرم بالغ فاسیولا هپاتیکا در مقابل شیستوزوما مانسونی، پیشنهاد کردند که وجود یک ترکیب اساسی (Major component) در آنتی ژن‌های فاسیولا - شیستوزوما (FhsmIII) که یک پپتید با ۱۲۰۰۰ MV می‌باشد، ممکن است دلیل این واکنش متقاطع باشد(۱۴).

Hillyer و همکاران در سال ۱۹۹۱ ,Hillyeq درسال ۱۹۸۵ توانستند در گوسفندانی که با آنتی ژن دفعی - ترشحی فاسیولا هپاتیکا آلوده شده بودند، آنتی بادی‌های محافظت کننده (Protection) را در مقابل شیستوزوما مانسونی به‌دست آورند(۱۳،۱۵). آنها پیشنهاد کردند که تولید این آنتی بادیها ممکن است بدلیل واکنش متقاطع آنتی ژن‌های تخم



نمودار ۳- میانگین جذب نوری عیار پادتن در گوسفندان شاهد

شیستوزوماها باشد که می‌توانند با آنتی بادیهای ضد فاسیولایی واکنش متقاطع نشان دهند.

Rodriguez درسال۱۹۹۳ درگوسفندانی که به طور تجربی با آنتی ژن فاسیولا هپاتیکا آلوده شده بودند در دهمین هفته پس از آلودگی میزان بالایی از آنتی بادیهای ضد شیستوزوما بویس به‌دست آوردند این موضوع شباهت پادگنی این دو گونه انگل را نشان می‌دهد(۲۵). Noureldin، درسال۲۰۰۰ نیز توانستند آنتی ژن‌های شیستوزوما مانسونی را برای تشخیص فاسیولوزیس در تستهای سرولوژی به‌کار برند(۲۳). و اما در مورد راه حل منطقی برای جلوگیری از این‌گونه واکنشهای متقاطع بنا به پیشنهاد Weil و همکاران در سال۱۹۸۴ فقط با به‌کارگیری یک آنتی ژن با وزن مولکولی بین ۱۴۰۰۰تا ۴۳۰۰۰ که شامل آنتی ژن‌های اختصاصی فاسیولا هپاتیکا می‌باشد و با آنتی سرمهای فاسیولا بسیار اختصاصی واکنش می دهد، می‌تواند در تستهای سرولوژی از جمله الایزا و ژل دیفوزیون با شیستوزوماها نتایج مثبت کاذب را از میان برداشت(۲۸).

Rodriguez و همکاران درسال۱۹۹۳ نشان دادند که با استفاده از دو آنتی ژن اختصاصی شیستوزوماها یعنی CAA (anodic antigen circulating) و CCA (circulating cathodic antigen) که اختصاص به جنس شیستوزوماها داشته و در محوطه داخلی (gut) انگل یافت می‌شود، می‌توان تا حدود زیادی از نتایج مثبت کاذب و واکنشهای متقاطع جلوگیری نمود(۲۵).

Rodriguezو همکاران درسال ۱۹۹۹ نشان دادند که آنتی ژن‌های گردشی CCA و CAA یک هفته پس از آلوده نمودن حیوان به سرکر شیستوزوماها بوجود آمده و قابل شناسایی می‌باشند(۲۵). این آنتی ژن‌ها در هر دو مرحله زندگی انگل یعنی کرم بالغ و شیستوزومولا وجود دارند. بالاترین میزان آنتی ژن در هفتمین هفته پس از آلودگی بوجود می‌آید یعنی زمانی‌که کرمهای بالغ شیستوزوما بویس در عروق مزانتر جایگزین

شده و آنتی ژن‌های آنها در سیستم گردش خون ریخته می‌شوند.

Johasen و همکاران درسال ۱۹۹۶ با آلوده نمودن بزها به شیستوزوما بویس توانستند میزان آنتی بادی تولید شده را در مقابل آنتی ژن‌های گردشی یعنی CAA و CCA به‌دست آورند(۱۷). Li و همکاران درسال ۱۹۹۶ دریافتند که سطح CAA درگروههای آلوده شده به‌طور قابل ملاحظه‌ای در زمان تولید تخم بالا رفته بود و در طول ریزش تخم در مدفوع، یک ارتباط منطقی مثبت بین سطوح CCA و تعداد کرمها و تخمهای دیده شده در مدفوع وجود داشت. در این مطالعه جنسیت و سن حیوانات تحت مطالعه بجز در مورد پاسخ IgM تاثیری نداشت(۲۰). Rodriguez وهمکاران درسال ۱۹۹۵ توانستند آنتی ژن‌های دفعی - ترشحی گردشی را در گوسفندان آلوده به شیستوزوما بویس و فاسیولا هپاتیکا به‌دست آورند(۲۴). همچنین Deelderو همکاران درسال ۱۹۹۴ برای تشخیص شیستوزوماها از آنتی ژن‌های گردشی در تستهای سرولوژی استفاده نمودند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه و همچنین نتایج سایر محققین، وجود آنتی ژن‌های مشترک بین گونه‌های شیستوزوما و فاسیولا، می‌تواند منجر به واکنشهای مثبت کاذب گردد، لذا با استفاده از روشهای اصلاح شده خاص که پاره‌ای از آنها در بالا توضیح داده شد می‌توان تا حد امکان از وجود چنین نتایج کاذبی جلوگیری بعمل آورد. پیشنهاد می‌شود با استفاده از آنتی ژن‌های گردشی یعنی CCA و CAA اختصاصی برای تولید پادتن اختصاصی، بتوان به ارائه راهکارهایی جهت تولید و ارزیابی آنتی ژن مورد استفاده در تستهای سرولوژی برای تشخیص آلودگی با انگل اورنیتوبیلارزیا دست یافت.

References

۱. اسلامی، ع. (۱۳۷۷): کرم شناسی دامپزشکی، جلد اول (ترماتودها)، انتشارات دانشگاه تهران. صفحه: ۱۷۰-۱۶۵.

۲. ارفع، ف. (۱۳۵۱): کرم شناسی پزشکی، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، ۷۷ - ۷۶.

۳. پایکاری، ح. ا. (۱۳۷۸): مطالعه پاسخ ایمنی گوسفند به آنتی ژن خالص شده فاسیولا ژیگانتیکا . پایان نامه جهت اخذ دکترای تخصصی انگل شناسی از دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران.

۴. رسولی بیرامی، ن.، موذنی، غ.، نوذری، ن. (۱۳۷۳): اورنیتوبیلارزیوزیس دامها در استان فارس. دومین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ۲۸ تا ۳۰ آبانماه ۱۳۷۳.

۵. کریمی، غ. ر. (۱۳۸۲): بررسی اپیدمیولوژی اورنیتوبیلارزیا ترکستانیکم در حلزون وگوسفند منطقه شادگان و ارزیابی تستهای سرولوژی برای تشخیص بیماری. پایان نامه دانشجویی جهت اخذ دکترای تخصصی انگل شناسی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه اهواز.

۶. ملکی، م.، خداکرم تفتی، ع.، عریان، ا.، اصلانی م. ر.، حسین زاده، س. وسجادی، س. م. (۱۳۷۳): یافته‌های ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک در باره اورنیتوبیلارزیوزیس شیوع یافته در گله‌های عشایری گوسفند و بز استان فارس. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۲۴، صفحه: ۱۷۰-۶۶.

7. Bautista, G.R. ;Lopez - Arellano, M.E. ;Sanchez, A. (1989): A new method for serodiagnosis of sheep Fasciolosis using helminth excretory- secretory products. Parasitol . Res . 76:2, 135- 137.

8. Cornelisson, J., Gasenbeek, C.;Boersma, W.;Borgsteede,F. and Milligan, F.(1999): Use of a pre - selected epitope of catepsin- L1 in a highly specific peptide - based immunoassay for the diagnosis of Fasciola hepatica infections in cattle. Int. J.Parasitology . 29:685- 695.

9. Chaffee.E.F.;Bauman.P.M. and Shapilo. J.J. (1954): Diagnosis of Schistosomiasis by complement fixation.American.Journal of Tropical Medicine and Hygiene 3:905.

10. Craig, P.S. (1986):Detection of specific circulating antigen immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya)and Great Britan by ElISA . Parasite immunology ;8:171-188.

11. Deelder, A.M.,Qian, Z.L. ;Kermsner, L. ;Acosta, A.L.T., Rabello, P.,Enyong, P.P., Simarro, E.C.M., Vaneten, F.W.,Krijger, J.P.,Rothman,J.P., Fillie, Y.E.,Jonge, N.DE,Agnew,A.M. and Lieshout, L.Van. (1994): Quantitative diagnosis of Schistosoma infections by measurements of circulating antigens in serum and urine. Tropical and Geographical Medinine 46: 233- 238.

12. Geng,Jinming,G. (1994):Preliminary studies on the diagnosis of cattle Ornithobilharziosis by ElISA .Journal of Jilin- Agricultural . University .16(3):88-91.

13. Hillyer,G.V.;Galances,M.S.DE. ; De- Galances, MS. (1991):Initial feasibility studies of the fast - ELISA for the immunodiagnosis of Fascioliasis. Journal of Parasitology .77: 3, 362 - 365.

14. Hillyer, G.V., Haroun, E.T.M., Hernandez,A; Galanes, M.S.- de ; El- Tahir,M. Haroun; De-Galances, M.S. (1987). Acquired resistance to Fasciola hepatica in cattle using a purified adult worm antigen.American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 37:2, 363- 369.

15. Hillyer, G.V. (1985): Induction of immunity in mice to Fasciola with a Fasciola / Schistosoma cross - reactive defined immunity antigen. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 34:6,1127- 1131.

16. Heath, D.D. and Lawrence, S.B. (1981): Echinococcus granulosus cyst : Early development in vitro in the presence of serum from infected sheep . International Journal for Parasitology .11:261-266.

17. Johansen,M.V., Fillie, Y., Monrad, J., Christensen, N.O. and Deeleer A. (1996): Experimental Schistosoma bovis infection in goats. Circulating antigen and antibody responses to egg and adult worms antigens during infection and following treatment with Praziquantel.Parasitology . 113: 367 - 375.

18. Hassam, M.M., Fraghly, A.M., E.l. Gamal, R.L. and Ridi,A.M. (1989): Cross - reaction in immunodiagnosis of patients infected with Schistosoma, Fasciola and Heterophyes using ELISA . Journal of the Egyptian Society of Parasitology . 19: 845 - 851.

19. Lai, R.B., Ottesen, E.A. (1989): Phosphocholine epitopes on helminth an protozoal parasites and their precence in circulation of infected human patients . Trans. R . Soc. Trop. Med. Hyg. 83 (5) : 652 - 655 .

20. Li, y. ; Idris, M.A. ; Corachan, M. ; Han, J ., Kirchfinnk, M. and Rupel, A. (1996): Circulating antigen in Schistosomiasis :Detection of 31/32 KDa proteins in sera from patients infected with Schistosoma japonicum, Schistosoma haematobium or Schistosoma intercalatum. Parasitology Research. 82: 14 - 18.

21. Lowry, O.H.(1951): Protein measurement with the folin pheno reagent . J.Biol . Chem; 193: 256.

22. Massoud, J.(1973): Studies on the Schistosomiasis of domestic animals in Iran.Observation on the Ornithobilharzia turkestanicum in Khusestan . Journal . Helmintol ;47:165- 180.

23. Noureldin - M.S.A., EL- Shinnawy H.; and Elenin .A.A. (2000): Serum pretreatment with Schistosoma mansoni antigens for serological diagnosis of Fascioliasis . Journal of the Egyptian Society of Parasitology .30:1, 157- 168 .

24. Rodriguez- Perez J. and Hyllier, G.V. (1995): Detection of secretory - excretory circulating antigens in sheep infected with Fasciola hepatica and with Schistosoma bovis . Veterinary Parasitilogy . 56: 57-66 .

25. Rodriguez - Osorio, M., Gomez-Garcia,V., Rojas - Gonzales, J. Ramjo-Martin, V. ; Manga-Gonzales, M.Y. and Gonzales-Lanza,C. (1993): Resistance of Schistosoma bovis in sheep induced by an experimental Fasciola hepatica infection . Journal of Parasitology . 79: 223- 225.

26. Rodriguez - Osorio, M., Gomez - Garcia, V., Rojas, J. and Ramajo - Martin V. (1999): Humoral immune-response and antigenemia in sheep experimentally infected with Schistosoma bovis . Cross - raectivity with Fasciola hepatica antigens. J. Parasitol; 85(3), 585- 587.

27.Sloan, T., Dooge, D. and Joyce, P. (1991): Identification of Phosphorylcholine containing antigens of Fasciola hepatica . Successful to lerisation against this epitope in experimental animals .Parasite immunology .13: 443- 455 .

28. Weil, N.S.-de; Hillyer,G.V., Pacheco,E. (1984): Isolation of Fasciola hepatica genus- specific antigens . International Jounal of Parasitology . 14 :2, 197-206.