مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۱، ۶۴-۶۱

شناسایی پروتئین آنتی‌ژنی دیکروسلیوم دندریتیکم در گوسفندان آلوده

شاهین فکور[۱] بهنام مشگی[۲*]

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج-ایران.
۲) گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۱۹ مرداد ماه ۱۳۸۹ ، پذیرش نهایی: ۱۹ مهر ماه ۱۳۸۹)

چکیده

دیکروسلیازیس یکی از بیماری های انگلی مهم در دام‌هاست که توسط ترماتودی بنام دیکروسلیوم دندریتیکم ایجاد می‌شود. تحقیق حاضر با هدف شناسایی آنتی‌ژن تشخیصی در آلودگی طبیعی گوسفند به دیکروسلیوم دندریتیکم انجام گرفت. برای تهیه دو نوع آنتی‌ژن بدنی و متابولیک، از کرم‌های بالغ که از مجاری صفراوی کبدهای آلوده جمع‌آوری شده بود استفاده شد. عصاره خام ترماتود بالغ متعاقب هموژنیزاسیون وسانتریفوژ بعنوان آنتی‌ژن بدنی تهیه شد. آنتی‌ژن دفعی ترشحی هم با انکوباسیون کرم بالغ در شرایط آزمایشگاهی تهیه گردید. نمونه ها ابتدا با روش سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریلامید ژل الکتروفورزیس (SDS-PAGE) تحت الکتروفورز وشناسایی پروتئین ها قرارگرفت وسپس آنتی‌ژن (های) اختصاصی توسط روش وسترن بلاتینگ تعیین هویت شد. بدین منظور آنتی‌ژن‌های تهیه‌شده به کاغذ نیتروسلولز انتقال یافت وسپس با استقرار غشا در بافر مسدود کننده، آنتی‌بادی اولیه وآنتی‌بادی کونژوگه در فواصل زمانی مشخص، پروتئین اختصاصی تحت‌شناسایی قرارگرفت. برای بررسی وجود واکنش متقاطع، آنتی‌ژن‌های فاسیولا از هر دو نوع بدنی ودفعی ترشحی، همچنین آنتی‌ژن کیست هیداتیک وسیستی‌سرکوس تنیوکولیس هم آزمایش شد. در ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژن های بدنی و دفعی ترشحی کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیکم یک باند با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون بطور مشترک در هر دو آنتی‌ژن ودرآنتی‌ژن دفعی ترشحی علاوه بر وجود این باند، شش باند پروتئینی با وزن مولکولی بین ۲۵ تا ۶۰ کیلودالتون توسط سرم مثبت کوسفندان با آلودگی طبیعی مشخص گردید. بنابر یافته‌های بررسی حاضر، باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون بعنوان آنتی‌ژن اختصاصی برای تشخیص دیکروسولیازیس درگوسفند معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: دیکروسلیوم دندریتیکم، آنتی‌ژن اختصاصی، گوسفند.

مقدمه

دیکروسلیازیس بیماری انگلی کرمی ناشی از دیکروسلیوم دندریتیکم از انواع ترماتودهای دیژنه‌آ و مستقر در مجاری صفراوی می باشد که بنابر عقیده ولف محققین مختلف از دو منظر بهداشتی واقتصادی از اهمیت ویژه‌ای در دام های نشخوارکننده برخوردار است (۱۱،۲۰). در ایران موارد آلودگی که اکثرا هم براساس بررسی های کشتارگاهی صورت گرفته است با حدودی متغیر از ۳ درصد تا ۷۰ درصد در نشخوارکنندگان اهلی گزارش شده است (۶).

به دلیل وقوع شکل تحت درمانگاهی دیکروسلیازیس در اغلب موارد بیماری بصورت بالینی و صرفا از روی علائم تشخیص داده نشده و به همین دلیل است که تشخیص اساساً در ضمن بررسی های کشتارگاهی یا کالبدگشایی و جداسازی ترماتود بالغ از مجاری صفراوی و یا توسط آزمایش مدفوع با دیدن و شناسایی تخم کرم در دام زنده صورت می‌گیرد (۱۵)، اگر چه بر اساس گزارش Ambrosi و همکاران در سال ۱۹۸۰ آزمایش مدفوع گوسفندان با کمتر از ۱۰۰ عدد کرم بالغ منفی خواهد بود (۱). از طرفی در آزمون‌های مدفوعی نوع روش به کار گرفته شده، نوع محلول (های) شناورسازی مورد استفاده نیز تاثیرگذار هستند (۵،۱۲). بنابر نظر Campo و همکاران در سال ۲۰۰۰ و Senlik و همکاران در سال ۲۰۰۶ تعداد تخم دفع شده در یک دام نه تنها از یک روز به روز دیگر که حتی در ساعات مختلف روز هم تغییر می‌کند (۴،۱۵). بر اساس آنچه که به اختصار توضیح داده شد در چند سال گذشته روش های متعدد سرولوژیک که عمدتا بر پایه جست و جوی پادتن در سرم استوار هستند، افزایش و تنوع زیادی پیدا کرده‌اند (۱۰) و در این ارتباط روش‌های مختلفی نظیر پرسی پیتاسیون، هماگلوتیناسیون، ثبوت کمپلمان و الایزا مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳).

با توجه به آنچه که به اجمال توضیح داده شد و اهمیت روش‌های سرمی در تشخیص بیماری‌های کرمی و در بررسی حاضر بیماری دیکروسلیازیس که ناشی از عوامل مختلفی چون، تنوع و تعدد میزبان‌های واسط، سیر تکاملی پیچیده، عدم پاسخ مطلوب به درمان، اهمیت اقتصادی و بهداشتی می‌باشد و از طرفی نقاط ضعف آزمایش مدفوع، دستیابی به روش‌های تشخیص که از کارایی لازم برخوردار باشند در خور توجه و اهمیت است، برای رسیدن به این هدف هم اولین قدم شناسایی پروتئین اختصاصی برای تشخیص سرمی می‌باشد که در تحقیق در پیش‌روی به آن پرداخته می‌شود.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۷۰ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۲۲۳۳۳ Email: bmeshgi@ut.ac.ir

مواد و روش کار

در بررسی حاضر طی مراجعات متعدد به کشتارگاه کبد های مبتلا به دیکروسلیوم دندریتیکم به آزمایشگاه انتقال یافت و بعد از جداسازی و شست و شوی کرم های بالغ، آنتی‌ژن‌های بدنی و دفعی ترشحی از آنها تهیه شد و سپس شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی به شرح زیر انجام گرفت.

تهیه آنتی‌ژن: کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیکم در بازرسی کشتارگاهی از مجاری صفراوی کبدهای آلوده جمع آوری گردید. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، ۴-۳ نوبت در فسفات بافر سالین (PBS ۰/۰۵ مولار) شسته شدند، پس از هموژنیزاسیون کرم بالغ، محلول حاصل در ۱۲۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. برای تهیه آنتی‌ژن دفعی ترشحی از انکوباسیون کرم بالغ در فسفات بافر سالین حاوی فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF ۰/۵ میلی مولار) به‌عنوان آنتی پروتئاز، به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. در هر دو نوع آنتی‌ژن مایع رویی حاصل از سانتریفوژ بعد از پروتئین سنجی تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید (۲).

تهیه نمونه های سرمی: طی بازرسی‌های متعدد در کشتارگاه‌های محلی نمونه های خون از گوسفندان کشتار شده گرفته شد و در چرخه پس از کشتار ضمن بازرسی اندام های مختلف هر نوع آلودگی ثبت گردید. در این بررسی ۵ نمونه سرمی مثبت (آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکم) ۴ نمونه آلوده به فاسیولا، ۴ نمونه آلوده به کیست هیداتیک و ۵ نمونه سرمی منفی از بره‌های کمتر از ۵ ماه سن که عدم آلودگی آنها به تایید بازرسی پس از کشتار رسیده بود، تحت آزمایش قرار گرفت.

شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی: جهت شناسایی پروتئین(های) اختصاصی ابتدا آنتی‌ژن‌های بدنی تهیه شده تحت الکتروفورز در ژل پلی اکریلامید و سپس ایمنوبلاتینگ قرار گرفت.

به منظور الکتروفورز نمونه ها از دستگاه Mini-Protean III با ژل به ضخامت ۰/۷۵ میلیمتر، مطابق با روش توضیح داده شده توسط Laemmli در سال ۱۹۷۰ استفاده شد (۹). غلظت ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد در نظر گرفته شد. پس از اطمینان از انعقاد ژل پلی اکریلامید، نمونه ها به نسبت هم حجم با بافر نمونه مخلوط گردید. الکتروفورز نمونه ها در مجاورت نشاندار با وزن مولکولی مشخص به مدت ۱۰۰ دقیقه صورت پذیرفت. وسترن بلاتینگ پروتئین‌ها بر اساس روش توضیح داده شده توسط Towbin و همکاران در سال ۱۹۷۹ با کمی تغییرات انجام گرفت (۱۷). بعد از انتقال آنتی‌ژن‌ها به غشا نیتروسلولز که با الکتروفورز غشا بمدت یک شب در ۳۰ ولت صورت گرفت، کاغذ نیتروسلولز بترتیب در بافر مسدود کننده حاوی شیر خشک بدون چربی، آنتی‌بادی اولیه (۱ به ۵۰) و آنتی‌بادی کونژوگه (۱ به ۱۰۰۰)، هر کدام بمدت یک ساعت قرار گرفت. برای مشخص شدن باندها از سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین (DAB) در مجاورت آب اکسیژنه استفاده شد. توقف واکنش با اضافه کردن آب مقطر انجام گرفت و در پایان از غشاهای با باند مشخص اسکن تهیه شد.

نتایج

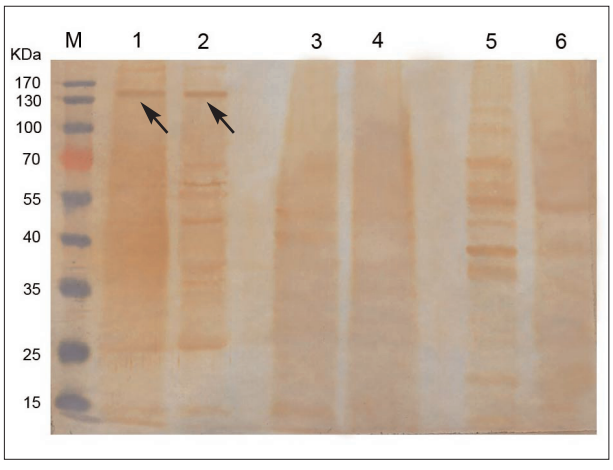
غلظت آنتی‌ژن بدنی بدست آمده از کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیکم برای SDS-PAGE در حد ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنظیم گردید. در شکل ۱ ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژن‌های بدنی و دفعی ترشحی دیکروسلیوم دندریتیکم و برای بررسی واکنش متقاطع آنتی‌ژن‌های بدنی و دفعی ترشحی فاسیولا بهمراه آنتی‌ژن‌های مایع کیست هیداتیک و سیستی‌سرکوس تنیوکولیس نشان داده شده است. یک باند پروتئینی مشخص با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون در هر دو آنتی‌ژن بدنی (ستون اول) و دفعی ترشحی (ستون دوم) دیکروسلیوم دندریتیکم وجود دارد، ولی در وسترن بلاتینگ آنتی‌ژن دفعی ترشحی علاوه بر این باند شش باند پروتئینی با وزن مولکولی بین ۳۵ تا ۱۰۰ کیلودالتون دیده می‌شود که می توانند به‌عنوان باندهای اختصاصی مطرح باشند.

در وسترن‌بلات آنتی‌ژن‌های فاسیولا (ستون سوم و چهارم) باند مشخصی دیده نمی‌شود، ولی در مورد آنتی‌ژن مایع کیست سیستی‌سرکوس تنیوکولیس (ستون ششم) یک باند ۵۳ کیلودالتونی و در آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک (ستون پنجم) هفت باند با وزن مولکولی بین ۳۷ تا ۱۲۰ کیلودالتون دیده می‌شود، ولی در محدوده ۱۳۰ کیلودالتون باند دیگری در سایر آنتی‌ژن‌ها وجود ندارد و لذا این پروتئین می‌تواند بعنوان پروتئین تشخیصی در ابتلا گوسفندان به دیکروسلیوم مطرح باشد. در شکل ۲ ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژن دیکروسلیوم به تنهایی ولی با غلظت بیشتر نشان دهنده باند مشخص ۱۳۰ کیلودالتون است.

بحث

در کنار روش های نسبتاً قدیمی برای تشخیص دیکروسلیازیس در ۳۰ سال گذشته روش های ایمنی‌شناسی تکامل یافته‌اند (۱۰). برخی از روش های تشخیص سرمی نظیر ایمونوفلورسانس (۳)، پرسی پیتاسیون، هماگلوتیناسیون، ثبوت کمپلمان و الایزا (۸) بر اساس جستجوی آنتی بادی ضد دیکروسلیوم در سرم هستند.

آنتی‌ژن‌های بدنی و تولیدات دفعی ترشحی حاصل از کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیکم در روش الایزا بکار رفته‌اند (۱۹)، اگر چه نتایج بدست آمده توسط این محققین نشان می دهد که آنتی‌ژن‌های بدنی و مولکول‌های سطحی دیکروسلیوم منجر به پاسخ و تولید آنتی‌بادی موثرتری می شوند، ولی معمولا مسئله کمتر بودن ویژگی و حساسیت آزمون هنگامی که از عصاره بدنی بجای تولیدات دفعی ترشحی استفاده می‌شود، وجود دارد. بررسی Gonzalez-lanza و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مورد پاسخ ضعیف تر سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی کمتر در استفاده از آنتی‌ژن‌های بدنی نیز، موید این موضوع است، از این رو محققین اخیر

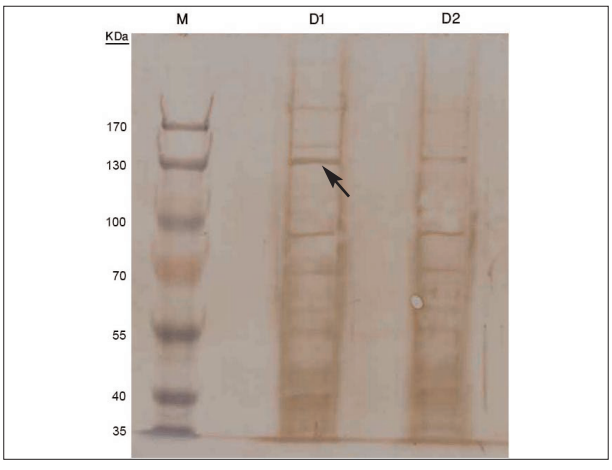


تصویر ۱ـ ایمونو بلاتینگ دو نوع آنتی‌ژن دیکروسلیوم دندریتیکم در برابر سرم مثبت گوسفند.۱) آنتی‌ژن بدنی دیکروسلیوم دندریتیکم، ۲) آنتی‌ژن دفعی-ترشحی دیکروسلیوم دندریتیکم، ۳) آنتی‌ژن بدنی فاسیولا، ۴) آنتی‌ژن دفعی-ترشحی فاسیولا، ۵) آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک، ۶) آنتی‌ژن مایع کیست سیستی‌سرکوس تنیوکولیس، (M مارکر.

معتقدند، اگرچه ارتباطی بین وجود آنتی‌بادی ضد دیکروسلیوم و ایمنی محافظتی در میزبان دیده نمی‌شود، با این حال جست و جوی آنتی‌بادی در تشخیص زودرس دیکروسلیازیس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در آلودگی تجربی گوسفندان با دیکروسلیوم دندریتیکم IgG سرمی ۲۳-۱۹ روز زودتر از وجود تخم در مدفوع قابل ارزیابی خواهد بود. حداکثر میزان آنتی‌بادی ۲ ماه پس از ابتلا دیده می‌شود و اختلاف معنی‌داری بین تعداد متاسرکر خورده شده و عیار آنتی‌بادی یا ارتباطی بین بار انگلی و پاسخ آنتی بادی وجود نداشته است (۸). Traversa و Otranto در سال ۲۰۰۳ معتقدند با توجه به ظهور آنتی‌بادی ضد دیکروسلیوم در ۳۰ روز پس از آلودگی بمنظور ممانعت از ضرر و زیان اقتصادی، هزینه های درمان، همچنین تشخیص زود هنگام بیماری و برای بررسی‌های سرمی روش الایزا یا روش های مشابه بسیار کاربردی بوده و قابل توصیه می‌باشند (۱۱).

در بررسی حاضر دو آنتی‌ژن بدنی و دفعی ترشحی تهیه شده در برابر سرم گوسفندان با آلودگی طبیعی به دیکروسلیوم دندریتیکم تحت ایمونوبلاتینگ قرار گرفت و نشان داده شد در آنتی‌ژن بدنی ۵ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۵ تا بیش از ۱۷۰ کیلودالتون و در آنتی‌ژن دفعی ترشحی ۷ باند ۲۵ تا ۱۳۰ کیلودالتون قابل شناسایی است. اگر چه در دو بررسی پاسخ ایمنی آنتی‌ژن های بدنی (۱۸) همچنین آنتی‌ژن های سطحی و دفعی ترشحی (۱۹) در گاوهای با آلودگی طبیعی به دیکروسلیوم دندریتیکم تحت ارزیابی قرار گرفته است، ولی Simsek و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی مشابهی در بین ۱۴ باند که در آنتی‌ژن دفعی ترشحی دیکروسلیوم دندریتیکم وجود داشتند و وزن مولکولی آنها بین ۶ تا ۲۰۵ کیلودالتون بود، باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۰۵ کیلودالتون را بعنوان پروتئین اختصاصی معرفی کردند (۱۶). در مطالعه مشابه دیگری توسط Revilla-Nuin و همکاران در سال ۲۰۰۵ در وسترن بلاتینگ آنتی‌ژن‌های



تصویر ۲ـ ایمونو بلاتینگ آنتی‌ژن‌های دیکروسلیوم دندریتیکم در برابر سرم مثبت.

بدنی و دفعی ترشحی این ترماتود بترتیب ۸ (۲۴ تا ۲۰۵ کیلودالتون) و ۷ (۲۶ تا ۲۰۵ کیلودالتون) پروتئین ایمنی‌زا را شناسایی کردند و در نهایت پروتئین با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون را برای تشخیص سرمی دیکروسلیازیس معرفی کردند (۱۳). اگر چه اختلاف زیادی در تعداد و وزن مولکولی پروتئین‌های شناسایی شده در بررسی Simsek و همکاران در سال ۲۰۰۶ با دو بررسی حاضر و مطالعه Revilla-Nuin و همکاران در سال ۲۰۰۵ وجود دارد (۱۳،۱۶) ولی شباهت زیادی بین دو بررسی اخیر که هر دو پروتئین ۱۳۰ کیلودالتون را بعنوان آنتی‌ژن تشخیصی معرفی می‌کنند، دیده می‌شود. وجود اختلافاتی در تعداد یا وزن مولکولی سایر باندهای شناسایی شده می‌تواند به دلیل نوع روش انتخابی و تهیه آنتی‌ژن مورد استفاده، همچنین غلظت آنتی‌ژن و مواد بکار گرفته شده باشد. با توجه به نتایج این مطالعه باید در بررسی‌های تکمیلی پروتئین ۱۳۰ کیلودالتون استخراج شود و به‌منظور ارزیابی روش‌های مختلف سرمی، مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Ambrosi, M., Baldelli, B., Piergili Fioretti, D., Polidori, G. A., Girelloni, V., Moretti, A., Principato, M (1980) Dicroceliosi ovina: insorgenza e decorso della infezione da *Dicrocoelium dendriticum* studiati con metodi parassitologici e serologici (ELISA) in quattro gruppi di ovini di traccia. Rivista. Di. Parasitologia. 3: 299-307.
2. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the qiantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Biochem. 72: 248-254.
3. Calamel, M. (1977) Application de la technique

dimmunofluorescence indirect a letude epidemiologique de la dicrocoeliose. Rec. Med. Vet. 153: 343-348.

4. Campo, R., Manga-Gonzàlez, M. Y., Gonzàlez-Lanza, C. (2000) Relationship between egg output and parasitic burden in lambs experimentally infected with different doses of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). Vet. Parasitol. 87: 139-149.
5. Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A. (2004) The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. Vet. Parasitol. 123: 121-131.
6. Eslami, A. (1998) Veterinary Helminthologhy. Volum I, Trematoda 2 edition. Tehran University Publication. Tehran, Iran.
7. Gonzalez-lanza, C., Manga-Gonzalez, M. Y., Campo, R., Del-Pazo, P., Sandaval, H., Oleata, A., Ramajo, V. (2000) IgG antibody response to ES or somatic antigens of *Dicrocoelium dentriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. Parasitol. Res. 86: 472-479.
8. Jithendran, K. P., Vaid, J., Krishan, L. (1996) Comparative evaluation of agar gel precipitation, counterimmuno-electrophoresis and passive haemagglutination tests for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep and goats. Vet. Parasitol. 61: 151-156.
9. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
10. Otranto, D., Traversa, D. (2002) A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. Vet. parasitol. 107: 317-335.
11. Otranto, D., Traversa, D. (2003) Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. Trend. Parasitol. 19: 12-15.
12. Rehbein, S., Kokott, S., Lindner, T. (1999) Evaluation of techniques for the enumeration of Dicrocoelium eggs in sheep faeces. J. Vet. Med. 46: 133-139.
13. Revilla-Nuin, B., Manga-Gonzalez, M. Y., Minambres, B., Gonzalez-Lanza, C. (2005) Partial characterization and isolation of 130 kDa antigenic protein of *Dicrocoelium dendriticum* adults. Vet. Parasitol. 134: 229-240.
14. Sanchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suarez, J. L., Arias, M., Lopez, C., Morrondo, P., Scala, A. (2003) Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep from Sardinia (Italy). Prev. Vet. Med. 57: 1-5.
15. Senlik, B., Çirak, V., Muz, M., Tinar, R. (2006) Changes in faecal egg counts at different hours of the day and relationship between faecal egg count and parasite burden in sheep naturally infection with *Dicrocoelium dendriticum*. Turk. J. Vet. Anim. Sic. 30: 107-111.
16. Simsek, S., Koroglu, E., Otuk, A. 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.
17. Towbin, H., Stacklin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels into nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
18. Wedrychowicz, H., Ducommun, D., Gorski, P., Pfister, K. (1995) Somatic antigens of adult *Dicrocoelium dendriticum* recognized by bile antibodies of naturally infected cattle. Vet. Parasitol. 56: 47-56.
19. Wedrychowicz, H., Ducommun, D., Klockiewicz, M., Pfister, K. (1996) Surface and ES antigens of adult *Dicrocoelium dendriticum* inducing bile antibody responses in naturally infected cattle. Acta. Parasitol. 41: 139-144.
20. Wolff, K., Hauser, B., Wild, P. (1984) Dicrocoeliose des Schafes: Untersuschungen zur pathogenese und zur regeneration des leber nach therapie. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 97: 378-387.

J.Vet.Res. 66,1:61-64,2011

DETERMINATION OF ANTIGENIC PROTEIN OF *DICROCOELIUM DENDRITICUM* IN NATURALLY INFECTED SHEEP

Fakour, Sh.[1], Meshgi, B.[1*]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Azad Islamic University of Sanandaj, Sanandaj-Iran.*

[2]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 10 August 2010 , Accepted 11 October 2010)

Abstract:

Dicrocoeliasis is an important livestock disease caused by digenean trematode namely *Dicrocoelium dendriticum*. The aim of the present study was to identify somatic and metabolic antigens of adult *D.dendriticum* in naturally infected sheep. Adult parasites collected from the liver of naturally infected sheep, were washed in cold phosphate buffer saline (PBS, pH=7.4) and stored at -20°c until analysis. Antigen used for the detection of antibody included somatic and metabolic of mature trematode. Somatic and excretory-secretory antigens prepared with haemogenization and incubation of adult helminths, respectively. Electrophoretic patterns of excretory secretory and somatic antigens of *D.dendriticum* were revealed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) and westernblotting using sera from naturally harbored sheep. In western blot analysis of antigens *D.dendriticum* demonstrate 1 major antigenic polypeptide 130 kDa in both somatic and metabolic antigens and 6 protein bands ranging from 25 to 60 kDa in excretory-secretory antigens which were recognized by serum of sheep naturally infected. Our findings showed that the 130 kDa molecular weight polypeptide could be used as specific antigen for the immunodiagnosis of sheep dicrocoeliasis.

Key words: *Dicrocoelium dendriticum*, Specific antigen, sheep.

***Corresponding author's email: bmeshgi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117070, Fax: 021-66922333**