JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره نهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

بررسی خاصیت ایمنی‌زایی آنتی ژن‌های انگل *پاراآسکاریس اکوئوروم* با استفاده از روش کانترایمنوالکتروفورز

فاطمه فروهی، هادی زمانی، سجاد یزدان ستاد، رضا نجف پور، الهه شمس، حسین وزینی*

۱- واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

۴- دانشجوی دکتری، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

۵- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۶. گروه پرستاری، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

*نویسنده مسئول: ***Hossein_vazini@yahoo.com***

دریافت مقاله:۲۳ خرداد ماه۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲بهمن ماه۱۳۹۷

چکیده:

پاراآسکاریس یکی از شایعترین عفونت های نماتودی اسب در دنیا می باشد. تهیه آنتی ژن یکی از کارهای بنیادی در پی ریزی روش های تشخیصی سرولوژی و همچنین تهیه واکسن می باشد. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ایمنی‌زایی آنتی ژن های انگل *پاراآسکاریس اکوئوروم* با استفاده از روش کانترایمنوالکتروفورز می باشد. روده باریک اسب به صورت طولی باز شده و انگل جدا، جنس و گونه کرم بالغ جدا شده طبق اصول مورفولوژیک و مورفومتریک شناسایی و تمامی نمونه ها در دمای۲۰°C- نگهداری شدند. کرم ها به روش خیساندن در محلول (PBS (Phosphate Buffered Saline ، به کمک هاون و در نهایت سونیکاسیون به فرم هموژن تبدیل شدند. آنتی ژن ها در رقت های مختلف و به صورت مجزا و نیز به همراه ادجوانت به خرگوش تزریق و تولید آنتی بادی با استفاده از روش ایمنوالکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. میزان تاثیر آنتی ژن جدا شده از انگل *پارا آسکاریس اکئوروم* در تولید آنتی بادی نسبت به گروه کنترل منفی از لحاظ آماری معنی دار بود. تزریق آنتی ژن به همراه ادجوانت موجب افزایش پاسخ ایمنی می شود. در این مطالعه نشان داده شده است که میزان تولید آنتی بادی در خرگوش هایی که ۲ بار در هر ۷ روز آنتی ژن دریافت کردند، بیشتر از آن هایی بود که یکبار در هر ۷ روز دریافت نموده اند. آنتی ژن تام انگل کرمی *پاراآسکاریس اکئوروم* دارای خاصیت آنتی ژنیکی و تحریک کنندگی می باشد و می تواند به عنوان کاندیدی جهت تهیه کیت های تشخیصی و همچنین تولید واکسن باشند.

واژگان کلیدی: ایمنی زایی، *پاراآسکاریس اکوئوروم*، کانترایمنوالکتروفورز

مقدمه:

پاراآسکاریس یا نماتود بزرگ (Large roundworm of horses) یکی از شایعترین عفونت‌های نماتودی اسب در دنیا می‌باشد(۱). انتشار این بیماری بسیار سریع اتفاق می‌افتد و تخم‌ها در برابر حرارت و عوامل خارجی بسیار مقاوم هستند و سال ها در محیط خارج زنده می مانند. همچنین کرم ماده تعداد زیادی تخم می گذارد و ممکن است با مدفوع اسب آلوده روزانه میلیون ها تخم خارج شود و علاوه بر آن جدار بسیار چسبنده تخم ها درانتقال غیر فعال آنها نقش بسزایی دارند(۲).

دوره کمون این بیماری در اسب حدود ۱۰ تا ۱۵ هفته می‌باشد و این بیماری از طریق بلع تخم‌های عفونت زا منتقل می‌شود(۳). بیماری در اسب به اشکال و درجات مختلف مشاهده می‌شود و موجب عفونت-های تنفسی، تهوع و استفراغ، لاغری، کاهش اشتها، کاهش وزن، کاهش رشد، انتریت و در بعضی مواقع موجب انسداد و پریتونیت تخم نیز می‌شود(۴). معمولا عفونت های شدید در کره اسب های یک ساله اتفاق می‌افتد که از اولین ماه تولد آلوده می‌شوند. بدلیل خسارات فراوان این انگل در مراکز آلوده، می‌بایستی ابتدا کره اسب های ۱۰-۸ هفته را درمان کرد و بعد هر ۶-۸ هفته یکبار درمان را تکرار نمود تا اسب ۶-۷ ماهه شود(۵). یکی از مشکلات اساسی در کنترل این عفونت، مقاومت دارویی این انگل به داروهای ضد کرمی از جمله ماکروسیکلیک لاکتون و ایورمکتین می باشد(۶). بر اساس مطالعات انجام شده در کشور های کانادا(۷)، دانمارک(۸) و آلمان(۹) اثربخشی ایورمکتین در درمان عفونت های ناشی از پاراآسکاریس اکئوروم فقط ۳۴٪ می‌باشد. همچنین Craig و همکاران در طی یک مطالعه، اثر بخشی داروی ایورمکتین را در درمان عفونت پاراآ-سکاریس مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه که بر روی ۳۲ کره اسب انجام شد نشان داده شد که داروی ایورمکتین اثر قابل قبولی در کاهش تعداد تخم انگل در مدفوع این حیوانات ندارد(۱۰). تشخیص عفونت معمولا با انجام مطالعات میکروسکوپی و آزمایشات انگل شناسی صورت می‌گیرد که معمولا از حساسیت های پایینی برخوردارند. روش های سرولوژی کمتر در تشخیص این عفونت مورد استفاده قرار گرفتند و همچنین مطالعات زیادی نیز در این زمینه صورت نگرفته است. یکی از نکات بسیار مهم در انجام روش‌های سرولوژی در تشخیص عفونت، آنتی ژنیک بودن آنتی ژن های انگلی می‌باشد(۱۱). بدین مفهوم که آیا آنتی ژن های انگل می‌توانند سیستم ایمنی را تحریک و وادار به تولید آنتی بادی کنند یا خیر؟ و یا اینکه آنتی بادی تولید شده اختصاصی این انگل می‌باشد یا خیر؟ تست‌های سرولوژی یکی از بهترین و سریع‌ترین راه‌های تشخیصی برای همه عفونت ها می‌باشند و می‌توانند بیماری را قبل از بروز هرگونه علائم بالینی تشخیص دهند و از بروز خسارت های مختلف جلوگیری کنند. تست کانترایمنوالکتروفورز Counter immunoelectrophoresis (CIEP) تستی کاملاً سریع، حساس و مناسب جهت تشخیص آنتی بادی ضد انگل می‌باشد(۱۲). هدف از این مطالعه استفاده از تست کانترایمنوالکتروفورز در تشخیص آنتی

بادی‌های ضد پاراآسکاریس اکئوروم می‌باشد و همچنین خاصیت آنتی ژنیک آنتی ژن‌های کرم پاراآسکاریس در خرگوش به عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش کار

جدا سازی کرم بالغ از روده اسب

مطالعه حاضر در منطقه شمال شرق استان فارس و روی ۵ راس اسب عرب با محدوده سنی ۹ تا ۱۵ سال (از جوانی تا میانسالی) انجام شد. کرم بالغ پارا آسکاریس از روده اسب ها استخراج شد. بدین صورت که پس از کشتار، طبق اصول کالبد شکافی و انجام آزمایشات پاراکلینیکی، روده باریک اسب به صورت طولی باز شده و انگل جدا گردید. قبل از انجام مطالعات بعدی، جنس و گونه کرم بالغ جدا شده طبق اصول مورفولوژیک و مورفومتریک شناسایی شده است. تمامی نمونه ها تا زمان انجام آزمایشات تکمیلی در درمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

تهیه آنتی ژن های انگلی

برای تهیه محلول آنتی ژنی انگل، کرم های جدا شده به روش خیساندن در محلول PBS، به کمک هاون به فرم هموژن تبدیل شدند و حدود ۲۰ گرم از کرم *پاراآسکاریس اکئوروم* به مدت ۲۰ دقیقه در معرض امواج بالایی از فرکانس (50KHz) و در کنار یخ سونیکاسیون شده است. در نهایت محلول بدست آمده تحت سانتریفوژ در دور ۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت، محلول رویی به عنوان ترکیب آنتی ژنی جدا گردید. نمونه‌ها با فیلتر دارای پورسایز ۱۰ دالتون، فیلتر شدند، از روش برادفورد که روشی ساده، دقیق، سریع و حساس بوده، جهت تعیین میزان پروتئین نمونه ها استفاده شد و برای مطالعه بعدی در دمای ۴- درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در هر مرحله برای تغلیظ نمونه ها، از کیسه دیالیز استفاده شد. بررسی آنتی ژن ها با روش های کانترایمونوالکتروفورز انجام شد(۱۳).

بررسی آنتی‌ژنیسیتی آنتی ژن‌های کرم پارا آسکاریس اکئوروم

برای بررسی آنتی ژنیسیتی، از ۱۶ عدد خرگوش نر در ۴ گروه ۴ تایی استفاده شد. گروه اول شامل ۴ خرگوش که محلول آنتی ژن را با دوز افزایشی از ۰/۲۵ تا ۱/۵ میلی لیتر در ۷ نوبت به فاصله ۷ روز از هم، از طریق زیر جلدی دریافت کردند و همچنین تزریق اول همراه با آنتی ژن ادجوانت کامل فروند و تزریق دوم به همراه آنتی ژن‌های غیرکامل فروند انجام شد. گروه دوم شامل ۴ خرگوش که فقط محلول آنتی ژنی را در دوز های افزایشی از ۰/۲۵ تا ۱/۵ میلی لیتر در ۷ نوبت به فاصله ۷ روز از هم، از طریق زیر جلدی دریافت کردند. گروه سوم شامل ۴ خرگوش که فقط آنتی ژن های ادجوانت را دریافت کرده بودند، به طوری که تزریق اول به همراه آنتی ژن ادجوانت کامل فروند و تزریق دوم به همراه آنتی ژن های غیر کامل فروند انجام شد (لازم به ذکر است در هر سه گروه بالا تزریقات به صورت دوبار تزریق در هر ۷ روز و یک بار تزریق در هر ۷ روز انجام شد). گروه چهارم شامل ۴ خرگوش که به عنوان کنترل منفی در این مطالعه بودند و تزریقی صورت نگرفت.

ده روز پس از آخرین تزریق، عمل خون گیری از رگ مارژینال خرگوش انجام شد، پس از جدا سازی سرم در شرایط استریل، سرم ها تا زمان استفاده در برودت نگهداری شدند. سرم خرگوش های گروه چهار نیز به طور همزمان تهیه شد تا به عنوان کنترل منفی در آزمایشات مورد استفاده قرار گیرد. در نهایت نسبت به تشخیص ایمونوژن بودن این انگل توسط روش کانترا- یمونوفورز آزمایش انجام شد. این روش سرولوژیک به ما این امکان را می دهد که در صورت مبتلا بودن اسب به انگل نوزاد و عقیم در مراحل اولیه پی به بیماری برده و از حاد شدن بیماری جلوگیری نماییم. داده‌های بدست آمده با نرم افزار SPSS (نگارش ۲۰) بررسی شد و با توجه به توزیع نرمال داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

نتایج

نتایج حاصل از مطالعه کانترایمونوفورز در این مطالعه در جدول شماره ۱ به تفصیل آورده شده است: در این مطالعه رقت‌های ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴، ۱:۱۲۸ و ۱:۲۵۶ تهیه شد که با این روش تا رقت های ۱:۶۴ سرم ها پاسخ مثبت داشتند و در رقت های رقیق تر و بالاتر از ۱:۱۲۸ هیچ هاله رسوبی مشاهده نشده است.

جدول ۱: مقایسه نتایج آزمون کانترایمونوفورز در گروه های مداخله و گروه کنترل منفی

رقت های سرم / آنتی ژن	تعداد تزریق در هر ۷ روز	۱:۸	۱:۱۶	۱:۳۲	۱:۶۴	۱:۱۲۸	۱:۲۵۶
آنتی ژن انگلی به همراه ادجوانت (۴ خرگوش)	۲ تزریق	+	++	++	+		
		+	++	+	+	−	−
	۱ تزریق	+	+	+	−	−	−
		+	++	+	−	−	−
آنتی ژن انگلی (۴ خرگوش)	۲ تزریق	+	++	+	−	−	−
		+	++	+	−	−	−
	۱ تزریق	+	+	−	−	−	−
		+	+	+	−	−	−
ادجوانت (۴ خرگوش)	۲ تزریق	+	−	−	−	−	−
		+	+	−	−	−	−
	۱ تزریق	+	−	−	−	−	−
		+				−	−
کنترل منفی (۴ خرگوش)	۲ تزریق	−	−	−	−	−	−
		−	−	−	−	−	−
	۱ تزریق	−	−	−	−	−	−
		−	−	−	−	−	−

+: وجود هاله رسوبی مشخص، -: عدم وجود هاله رسوبی، ++: هله رسوبی بسیار واضح نتایج حاصل از کانترایمو-نوفورز نشان داده است که میزان آنتی بادی تولید شده در گروهی که آنتی ژن انگلی را به همراه ادجوانت دریافت کرده اند بیشتر از سایر گروه های مورد مطالعه می باشد و همچنین جدول شماره ۱ نشان می دهد که هیچ آنتی بادی در گروه کنترل منفی وجود ندارد ($P=0.000$). همچنین در این مطالعه نشان داده شده است که واضح ترین هاله رسوبی در رقت ۱:۱۶ سرم به دست آمده است. در این مطالعه نشان داده شده است که میزان تولید آنتی بادی در خرگوش هایی که ۲ بار در هر ۷ روز آنتی ژن دریافت کردند، بیشتر از آن هایی بود که یک بار در روز آنتی ژن دریافت نموده اند.

بحث

با توجه به اهمیت و بیماریزایی انگل *پاراآسکاریس اکئـوروم* و همچنین با توجـه به این که هنـوز روش تشخیصی سریع و حساس برای این انگل به صورت روتین وجود ندارد، این مطالعه با هدف بررسی خاصیت آنتی ژنیک آنتی ژن های انگل *پاراآسکاریس اکئوروم* که قدم اول در پی‌ریزی یک تکنیک سرولوژی است، می‌باشد. مطالعات زیادی در این زمینه صورت نگرفته است و هنوز اطلاعات زیادی از اثر بخشی آنتی ژن های مختلف این انگل وجود ندارد. در مطالعه ایی که توسط Steffanie Valentine Burk و همکاران انجام شد، اثر بخشی آنتی ژن های دفعی- ترشحی لارو کرم پاراآسکاریس اکئوروم را بر روی خرگوش مورد بررسی قرار دادند که دریافتند که این آنتی ژن می تواند سیستم ایمنی خرگوش را وادار به تولید آنتی بادی کند(۱۴). در مطالعه حاضر از آنتی ژن تام این انگل استفاده شده است و نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که تولید آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های انگل پارا آسکاریس اکئوروم نسبت به گروه کنترل که آنتی ژن دریافت نکرده بودند بیشتر بوده است که این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار می باشد ($P<0.005$).

بر اساس جدول شماره ۱، میزان تولید آنتی بادی در خرگوش هایی که ۲ بار در هر ۷ روز آنتی ژن دریافت کردند، بیشتر از آنهایی بود که یک بار در روز آنتی ژن دریافت نموده اند. پس نتیجه می گیریم که با افزایش تعداد تزریقات تولید آنتی بادی در سرم نیز افزایش می یابد، در نتیجه هاله‌های ایجاد شده در تست های فوق ضخیم تر و پررنگ تر بوده است. در مطالعه Nakazawa و همکاران نیز بیان شده است که میزان جذب آنتی ژن توسط سیستم لنفاوی در تزریق اولیه کمتر است(۱۵). با توجه به نتایج آزمون کانتر ایمنو الکتروفورز به نظر می‌رسد که آنتی ژن های تام انگل *پاراآسکاریس اکئوروم* می توانند سیستم ایمنی را تحریک کنند و اساس روش های تشخیصی سرولوژی باشند.

صنعت اسب در دنیا همیشه یکی از صنایع پول ساز با گردش مالی بالا بوده است چون از یک سو افراد بسیاری به نگهداری و پرورش اسب علاقه‌مند بوده‌اند و در آن سرمایه‌گذاری کرده‌اند و کم‌کم آن را به شکل اقتصادی در آورده‌اند و برای آن، با تبلیغات و رسانه‌های جمعی، بازار ایجاد کرده‌اند که این بازار به سرعت به سمت حرفه‌ای شدن پیش می‌رود و از سوی دیگر دولت‌ها همیشه در حال گسترش فعالیت‌های

مرتبط با اسب بوده‌اند از دو منظر؛ یکی سرگرمی و دیگری اشتغالزایی. لذا کنترل و پیشگیری از بیماری ها در این حیوان یکی از مسائل حائز اهمیت در صنعت اسب و علم دامپزشکی می باشد که باید بیشتر مورد اهمیت قرار گیرد(۱۶). تشخیص آنتی ژن های آنتی ژنیک علاوه بر پی ریزی روش های تشخیصی، می توانند در تولید واکسن و کنترل عفونت نیز مورد استفاده قرار گیرند(۱۷). اگرچه هنوز واکسن ضد کرمی مناسب بر علیه عفونت های کرمی انسانی وجود ندارد ولی مطالعات زیادی در زمینه تولید واکسن با آنتی ژن های کرم های مختلف انجام شده است و به نتایج قابل قبولی هم دست یافته اند و تا به حال، آنتی ژن های متعددی هم گزارش شده اند که می توانند سیستم ایمنی را تحریک کنند(۱۸). مطالعات زیادی تاکنون در زمینه تهیه و تولید واکسن در نقاط مختلف دنیا انجام شده و همچنین در حال اجرا می باشد. تنیاها یکی از اولین کرم هایی بودند که مطالعات جهت تولید واکسن بر علیه آن ها آغاز شد(۱۹). اولین مطالعات در زمینه تولید واکسن بر علیه تنیا اوویس در استرالیا و نیوزلند در سال ۱۹۷۲ صورت گرفت که در سال های بعد این مطالعات توسط سایر محققین تکمیل شد و در حال حاضر واکسن تنیا اوویس به صورت تجاری تولید می شود که البته عملکرد بسیار خوبی نیز از خود نشان داده است(۲۰). البته مطالعات در زمینه تهیه واکسن بر علیه بیماری های هیداتیدوز و انواع اکینوکوکوزیس، سیستی سرکوز سلولزه، همونکوس در مراحل نهایی خود قرار دارد(۲۱).

در مطالعه حاضر، تولید آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌های تام کرم پاراآسکاراریس اکئوروم و تاثیر این آنتی ژن ها بر روی سیستم ایمنی هومورال مورد بررسی قرار گرفته است، در صورتی که اساس تهیه و تولید واکسن تحریک سیستم ایمنی سلولی می‌باشد، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی سیستم ایمنی سلولار و تولید سلول های خاطره نیز مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که آنتی ژن تام انگل کرمی *پاراآسکاریس اکئوروم* دارای خاصیت آنتی ژنیکی و تحریک کنندگی بر سیستم ایمنی خرگوش به عنوان یک مدل حیوان آزمایشگاهی می باشد و می تواند در آینده به عنوان کاندیدی جهت تهیه کیت های تشخیصی و همچنین تولید واکسن باشند. همچنین پیشنهاد می شود که از آنتی ژن های مختلف انگل به تفکیک نیز استفاده شود تا آنتی ژنیک ترین اپی توپ انگل شناسایی شود و نیز پیشنهاد می گردد که اثر این آنتی ژن ها بر روی سیستم ایمنی سلولی مورد بررسی قرار گیرد تا در صورت اخذ پاسخ مناسب بتوان از این آنتی ژن ها در تهیه واکسن نیز بهره جست.

References:

1.Hearn, F.P.D., Peregrine, A.S. (2003) Identification of foals infected with Parascaris equorum apparently resistant to ivermectin. Journal of the American Veterinary Medical Association 223(4) 482-485.

2.Clayton, H., Duncan, J. (1979) The migration and development of Parascaris equorum in the horse. International journal for parasitology 9(4) 285-292.

3.Clayton, H.M., Duncan, J. (1977) Experimental Parascaris equorum infection of foals. Research Veterinary Science 23(1) 109-114.

4.Clayton, H.M., Duncan, J.L. (1978) Clinical signs associated with Parascaris equorum infection in worm-free pony foals and yearlings. Veterinary Parasitology 4(1) 69-78.

5.Leathwick, D.M., Sauermann, C.W., Donecker, J.M., Nielsen, M.K. (2016) A model for the development and growth of the parasitic stages of Parascaris spp. in the horse. Veterinary Parasitology 228:108-115.

6.Armstrong, S., Woodgate, R.G., Gough, S., Heller, J., Sangster, N.C., Hughes, K.J. (2014) The efficacy of ivermectin, pyrantel and fenbendazole against Parascaris equorum infection in foals on farms in Australia. Veterinary Parasitolog 205 (3) 575-580.

7.Slocombe, J.O.D., de Gannes, R.V., Lake, M.C. (2007) Macrocyclic lactone-resistant Parascaris equorum on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. Veterinary Parasitology 145(3) 371-37.

8.Schougaard, H., Nielsen, M.K. (2007) Apparent ivermectin resistance of Parascaris equorum in foals in Denmark. Veterinary Record-English Edition 160 (13) 439-440.

9.von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B, Demeler, J, Schürmann, S, Rohn, K, Schnieder, T, Epe, C. (2007) Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of Parascaris equorum egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. Veterinary Parasitology 144(1) 74-80.

10.Craig, T., Diamond, P.L., Ferwerda, N.S., Thompson, J.A. (2007) Evidence of ivermectin resistance by Parascaris equorum on a Texas horse farm. Journal of Equine Veterinary Science 27(2) 67-71.

11.Nielsen, M., (2015) Evidence-based considerations for control of Parascaris spp. infections in horses. Equine Veterinary Education.

12.Babba, H., Messedi, A., Masmoudi, S., Zribi, M., Grillot, R., Ambriose-Thomas, P., Beyrouti, I., Sahnoun, Y. (1994) Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. The American journal of tropical medicine and hygiene 50 (1) 64-68.

13.Burk, S.V., Dangoudoubiyam, S., Brewster-Barnes, T., Bryant, U.K., Howe, D.K., Carter, C.N., Vanzant, E.S., Harmon, R.J., Kazacos, K.R., Rossano, M.G.

(2014) In vitro culture of Parascaris equorum larvae and initial investigation of parasite excretory-secretory products. Parasitology research 113(11) 4217-4224.

14.Burk, S.V., (2013) Detection of antibodies against Parascaris equorum excretory-secretory antigens.

15.Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K, (2010) Production and purification of polyclonal antibodies. Methods in Molecular Biology 657:63-74.

16.Upjohn, M.M., Shipton, K., Lerotholi, T., Attwood, G., Verheyen, K.L. (2010) Coprological prevalence and intensity of helminth infection in working horses in Lesotho. Tropical animal health and production 42(8) 1655-1661.

17.Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E., Mosmann, T. (1991) Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. The Journal of Immunology 147(8) 2713-2716.

18.Elias, D., Britton, S., Aseffa, A., Engers, H., Akuffo, H. (2008) Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF-β production. Vaccine 26(31) 3897-3902.

19.Gudding, R., Naess, B. (1986) Vaccination of cattle against ringworm caused by Trichophyton verrucosum. American journal of veterinary research 47(11) 2415-2417.

20.Gerdts, V., Mutwiri, G.K., Tikoo, S. K., Babiuk, L.A. (2006) Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. Veterinary research 37(3) 487-510.

21.Lightowlers, M., Flisser, A., Gauci, C.G., Heath, D.D., Jensen, O., Rolfe, R. (2000) Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. Parasitology Today 16(5)191-196.