شناسایی و تعیین پادگن‌های ایمنی‌زای موثر Ascaridia galli در ماکیان پرورشی منطقه تبریز

یعقوب قره‌داغی[۱*]، ناصر حقوقی‌راد[۲]، پرویز شایان[۳]، علی اسلامی[۳]

چکیده

در بررسی انجام شده طی سال ۱۳۸٤ که در شهر تبریز صورت گرفت، توانایی یک واکسن تجربی ساخته شده از لاروهای هوموژن شده آسکاریدیا گالی ارزیابی شد. به یک گروه پنج تایی از مرغ‌های نژاد لگهورن سفید، دوبار و هر دفعه ۱۰۰ میکروگرم از لاروهای هوموژن شده آسکاریدیا گالی رقیق شده در یک میلی لیتر PBS که در یک میلی لیتر ادجوانت فروند امولسیفیه شده بود، به صورت داخل دهانی خورانده شد. ایمن‌سازی نوبت دوم در روز ۲۱ به صورت داخل دهانی انجام گردید. گروه بعدی (پنج مرغ نژاد لگهورن سفید) یک میلی لیتر PBS امولسیفیه شده در یک میلی لیتر از همان ادجوانت دریافت کردند. در روز ۳۳ به هر مرغ تقریباً ۱۰۰۰۰ عدد تخم عفونی‌زای آسکاریدیا گالی خورانده شد. از زمان اولین تجویز تا چالش مرغ‌ها با تخم‌های عفونی‌زا، از هر مرغ هر ۱۰ روز یکبار خون اخذ شد و پس از آن تا انتهای زمان بررسی، این کار به صورت هفتگی انجام گردید. سرم‌ها توسط روش الایزا و وسترن بلاتینگ آزمایش شدند. مرغ‌ها هشت هفته پس از چالش با تخم‌های عفونی زا، برای به دست آوردن نماتودها کالبدگشایی شدند. مرغ‌های واکسینه کاهش ۷٦ درصدی در میانگین EPG، ۷٤ درصد کاهش در میانگین کرم‌های نر، ۷۹ درصد کاهش در میانگین تعداد کرم‌های ماده و ۷۷ درصد کاهش در میانگین تعداد کل کرم‌ها را نشان دادند. اختلاف معنی‌دار در میانگین دانسیته نوری سرم‌ها در الایزا مورد توجه بود (P<۰/۰۰۱). پروتئین‌های آسکاریدیا گالی به وسیله SDS-PAGE جدا شدند. سرم‌های گروه واکسینه واکنش بالایی را در وسترن بلاتینگ نشان دادند.

مجله علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، ۱۳۸٦، دوره ۱، شماره ۱، ٦-۱.

کلمات کلیدی: آسکاریدیا گالی، ایمن‌سازی، مرغ لگهورن سفید

مقدمه

یکی از راه‌های کنترل آلودگی‌های کرمی، واکسیناسیون می‌باشد که تا کنون تنها بر علیه تعداد معدودی از آنها واکسن تهیه شده است. از آنجایی که برای ایمن‌سازی طیور علیه این کرم، استفاده از روش‌های نوین زیست مولکولی بسیار ضروری است، بر این اساس بررسی‌های زیادی بر روی پادگن‌های ایمنی‌زای کرم بالغ و نوزادهای آسکاریدیا گالی در دهه گذشته انجام شده است (۱٦و۱۹). با توجه به اینکه این بررسی‌ها در دیگر نقاط جهان بر روی نژادهای طیور محلی و سویه‌های آسکاریدیا گالی مربوط به آن نواحی صورت گرفته است، لذا ضرورت انجام مطالعه‌ای به عنوان بررسی مقدماتی جهت شناخت اثر این پادگن‌ها بر روی سویه‌های موجود در یکی از نژادهای طیور ایران (نژاد لگهورن سفید) احساس گردید.

Identification and determination of effective and immunogenic antigens of Ascaridia galli in poultry reared in Tabriz area

Gharehdaghi, Y[1]., Hoghooghi Rad, N[2]., Shayan, P[3]., Eslami, A[3].

1-Graduated from Veterinary Parasitology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Campus, Tehran, Iran.
2-Department of Parasitology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Campus, Tehran, Iran.
3-Department of Parasitology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Tehran Uneversity, Tehran, Iran.

In a trial, in Tabriz area, the ability of an experimental vaccine from the larval homogenate of Ascaridia galli was evaluated during the year 1384. A group of 5 white leghorn hens were immunized twice with 100 micrograms larval homogenate of Ascaridia galli diluted in 1ml PBS and emulsified in 1ml Freund's adjuvant orally. Booster immunization was also administered orally on day 21 The other group (5 white leghorn hens) received 1 ml PBS emulsified in 1ml of the same adjuvant. On day 33 each hen was administered approximately 10,000 Ascaridia galli infective eggs orally. Blood samples were collected from the animals in a 10 day interval from the first immunization until infective challenge and weekly thereafter until the end of study. Sera were tested by ELISA and Western-blotting. Hens were necropsied 8 weeks post challenge with infective eggs for recovery of the nematodes. Vaccinated hens showed a 76 percent reduction in mean EPG, 74 percent reduction in the average number of male worms, 79 percent reduction in the average number of female worms and 77 percent reduction in the mean number of total worms. Significance in mean optical density of sera in ELISA was noticed ($p<0.001$). Proteins of Ascaridia galli were separated by SDS-PAGE. The vaccinated sera indicated a high reactivity in Western-Blotting.

J. Spe. Vet. Sci. Islam. Azad. Uni. Tabriz. 1, 1: 1-6, 2007.
Key words: Ascaridia galli, immunization, white leghorn hen
Corresponding author's email: yg958@yahoo.com

۱. دانش آموخته انگل‌شناسی دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.

۲. گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.

۳. گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: yg958@yahoo.com

آسکاریدیا گالی در روده کوچک طیور، بوقلمون، غاز و خیلی از پرندگان وحشی در اکثر قسمت های دنیا دیده شد است. نرها ۷۶-۵۰ میلی متر و ماده ها ۱۱۶-۷۲ میلی متر طول دارند. در سر سه لب بزرگ و مری گرزی شکل دارند. تخم آنها بیضی شکل و دارای دیواره کلفت و صاف می‌باشد. اندازه تخم ۹۴-۵۵ میکرون می‌باشد. نژاد لگهورن یکی از معروفترین نژادهای تخمی دنیا محسوب می شود. ۱۳ واریته مختلف از این نژاد استاندارد شده است که واریته خرمائی آن بیشتر از واریته های دیگر مورد توجه قرار گرفته است. اصل این نژاد از ناحیه لگهورن واقع در کشور ایتالیا است که بدین جهت به این نام معروف شده است (۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦ و ١٤).

مواد و روش کار

در این بررسی، ۱۰ قطعه مرغ نژاد لگهورن سفید از یکی از واحدهای مرغداری شهرستان تبریز خریداری شد. این مرغ‌ها ۲ ماهه با وزن ۳- ۲/۵ کیلوگرم بودند. بررسی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز در اواخر تیرماه ۱۳۸٤ تا اواخر مهر ماه ۱۳۸٤ انجام گرفت. در طی زمان مطالعه، مرغ‌ها تحت شرایط بدون آلودگی انگلی (کرمی) و در شرایط بسته در داخل یکسری از قفس‌های مخصوص نگهداری شدند تا مرغ‌ها هیچ گونه تماس دهانی با مدفوع و تخم‌های عفونی‌زا نداشته باشند. با بررسی مرغ‌های اطراف تبریز، یک قطعه مرغ آلوده به آسکاریدیا گالی بعنوان مرغ دونور (Donor) طبیعی انتخاب شد. برای تهیه تخم‌های آسکاریدیا گالی از مرغ دونور به دو صورت اقدام گردید:

۱- استفاده از نمونه مدفوع پرنده آلوده

۲- کالبدگشایی مرغ دونور و جمع‌آوری کرم‌های ماده آسکاریدیا گالی و به دست آوردن تخم‌ها از کرم ماده.

برای کشت تخم‌ها تا رسیدن به نوزاد مرحله دوم (L2) زمانی حدود ۲-۱ هفته در حرارت آزمایشگاه لازم می‌باشد (١٤ و١٧). بر اساس توصیه منابع، نوزادهای آزاد شده از تخم را در محلول نمکی Earles (EBSS) وارد کردیم تا در مرحله بعدی بتوانیم با SDS-PAGE آنتی ژن‌های آنها را جدا کرده و پروفایل پروتئینی آنها را به دست آوریم (۱۲ و ۱۵).

مرغ‌ها به طور تصادفی به دو گروه ۵ تایی تقسیم شدند. در روز صفر مرغ‌های گروه یک، ۱۰۰ میکروگرم پروتئین درحجم یک میلی لیتر PBS را که توسط دستگاه همزن لوله‌ای در یک میلی لیتر ادجوانت فروند امولسیفیه شده بود، دریافت کردند (واکسینه‌ها). به مرغ‌های گروه دوم یک میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) امولسیفیه در یک میلی لیتر از همان ادجوانت خورانده شد (گروه شاهد).

ایمن‌سازی نوبت دوم در روز ۲۱، با خوراندن همان مقادیر ولی با استفاده از ادجوانت فروند غیر کامل انجام شد. در روز ۳۳ به تمام مرغ‌ها حدود ۱۰۰۰۰ عدد تخم عفونی زای آسکاریدیا گالی خورانده شد.

EPG به صورت هفتگی تا قبل از چالش مرغ‌ها با تخم‌های عفونی زا و هفته‌ای دوبار پس از چالش، انجام شد. هشت هفته پس از چالش با تخم‌های عفونی‌زا، محتویات داخل روده باریک مرغ‌های واکسینه و شاهد پس از ذبح جهت‌شناسایی نماتودها بررسی شد و نماتودهای به دست آمده جهت تعیین جنس، گونه و تعداد مطالعه شدند (۱۰). جهت تعیین دانسیته نوری سرم مرغ‌های گروه واکسینه شده و کنترل، از هر مرغ در روز صفر و هر ده روز یکبار تا قبل از چالش با تخم‌های حاوی لارو و سپس به صورت هفتگی پس از چالش، خونگیری به عمل آمد. سنجش پادتن‌های سرمی بوسیله الایزا (کیت الایزای Faltroste ساخت Bayer) انجام شد. همچنین جهت بررسی چگونگی واکنش سرم‌های جمع‌آوری شده با پروتئین‌های آسکاریدیا گالی، این سرم‌ها در آزمایش وسترن بلاتینگ مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج

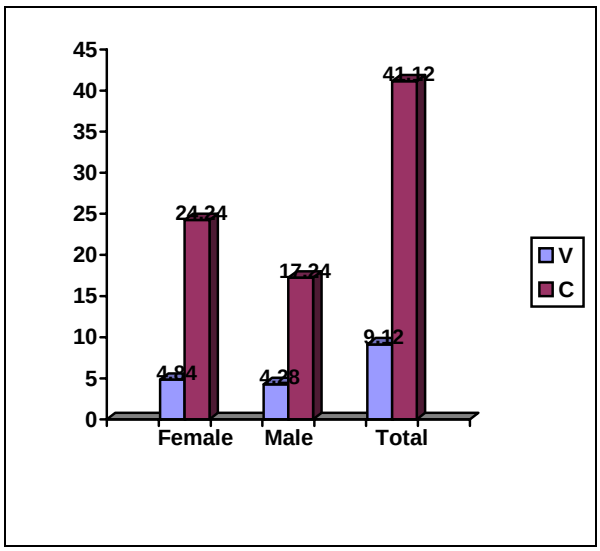
میانگین تعداد کرم آسکاریدیا گالی در گروه واکسینه و در گروه کنترل، ٤١/٤٨ می باشد که نشان دهنده کاهش قابل توجه تعداد کرم در گروه واکسینه در مقایسه با گروه کنترل می باشد و اطلاعات مربوط به تعداد کرم و EPG در جداول ۱ و ۲ و نمودارهای ۱، ۲ و ۳ آمده است.

جدول۱- تعداد کرم آسکاریدیا گالی در گروه های واکسینه شده و کنترل پس از کالبدگشایی

ردیف	شماره مرغ	گروه	تعداد کرم		
			ماده	نر	تعداد کل
۱	۱۳۸۳	واکسینه	۱	۰	۱
۲	۱۳۸۲	واکسینه	۳	۲	۵
۳	۱۳۸۱	واکسینه	۱	۰	۱
٤	۱۳۸۰	واکسینه	۱۸	۱۹	۳۷
۵	۱۳۷۹	واکسینه	۱	۰	۱
میانگین			**٤/۸٤**	**٤/۲۸**	**۹/۱۲**
٦	۱٤۲۱	کنترل	۲	۱	۳
۷	۱٤۲۲	کنترل	۳۹	۳۰	٦۹
۸	۱٤۲۳	کنترل	٤۵	۳۵	۸۰
۹	۱٤۲٤	کنترل	۹	۷	۱٦
۱۰	۱٤۲۵	کنترل	۲٦	۱۳	۳۹
میانگین			**۲٤/۲٤**	**۱۷/۲٤**	**٤۱/٤۸**

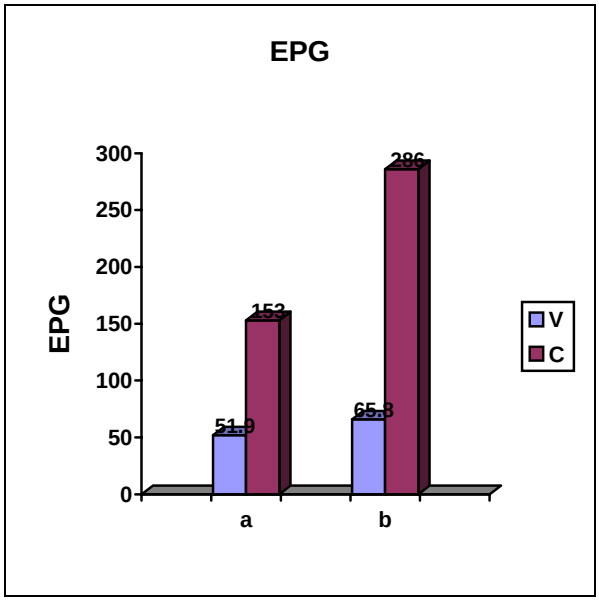
جدول۲- تعداد تخم در هر گرم مدفوع در گروه واکسینه و کنترل

ردیف	شماره مرغ	گروه	EPG ۵۲ روز پس از چالش مرغ ها با تخم‌عفونی زا
۱	۱۳۸۳	واکسینه	٤
۲	۱۳۸۲	واکسینه	۵۰
۳	۱۳۸۱	واکسینه	۳
٤	۱۳۸۰	واکسینه	۲٦۹
۵	۱۳۷۹	واکسینه	۳
میانگین			**٦۵/۸**
٦	۱٤۲۱	کنترل	۱۵
۷	۱٤۲۲	کنترل	۷۰۸
۸	۱٤۲۳	کنترل	۳۸۹
۹	۱٤۲٤	کنترل	۱۳۵
۱۰	۱٤۲۵	کنترل	۱۸۵
میانگین			**۲۸٦**



نمودار۱- تعداد کرم آسکاریدیا گالی در گروه کنترل و واکسینه پس از کالبد گشایی

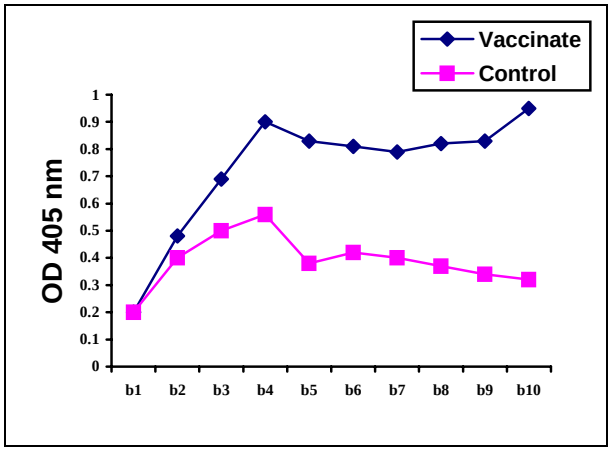
V= گروه واکسینه شده C= گروه کنترل



نمودار۲- تعداد تخم کرم موجود در هر گرم مدفوع در گروه کنترل و واکسینه

a= ٤١ روز پس از چالش مرغ ها با تخم‌های عفونی‌زای آسکاریدیا گالی

b=٥٢ روز پس از چالش V= گروه واکسینه شده C= گروه کنترل



نمودار۳- میانگین دانسیته نوری گروه واکسینه و کنترل

b1= اولین خونگیری b10= آخرین خونگیری

در نهایت در این بررسی نتایج زیر به دست آمده است:

۱) واکسن تهیه شده از آسکاریدیا گالی شایع در منطقه تبریز، برای ایمنی سازی مرغ های نژاد لگهورن به نحو چشمگیری موثر بوده است.

۲) ایمن سازی مرغ ها که حداکثر موجب کاهش ۷۷ درصد کاهش کرم های بالغ آسکاریدیا گالی و ۷٦ درصد کاهش تخم این کرم گردید، نه تنها در افزایش تولیدات دامی موثر خواهد بود، بلکه آلودگی مرغداری را نیز تا حد مطلوب کاهش می دهد.

بحث

با انجام واکسیناسیون تعداد کرم‌های ماده، نر و تعداد تخم کرم موجود در مدفوع مرغ‌های مبتلا به آسکاریدیا گالی به ترتیب ۷۹ درصد، ٧٤ درصد و ٧٦ درصد کاهش یافت. این کاهش در سطح مرغداری موجب کاهش آلودگی مرغداری و به دنبال آن کاهش سطح آلودگی مجدد (Reinfection) می‌شود. اگر چه کاهش تعداد کرم در روده باریک مطلوب و به خصوص در مورد آسکاریدیا گالی جهت جلوگیری از افت تولید لازم می‌باشد، اما ارزش بیشتر واکسن ممکن است در کنترل تخم‌های عفونی‌زای مرغداری باشد تا فقط در حذف نماتودهای بالغ میزبان. در حقیقت حذف ۱۰۰ درصد کرم‌ها جهت کنترل آلودگی مجدد ممکن است نیاز نباشد. انتخاب ادجوانت می‌تواند روی نتایج پاسخ ایمنی موثر باشد (۲۰). ادجوانت این مطالعه فروند بود، بر اساس مطالعات قبلی مقدار پادگن تزریق شده همچنین سن و نژاد پرنده بر روند واکسیناسیون موثرند، به طوریکه پاسخ هر مرغ در هر نژاد نسبت به آلودگی و در گروه‌های واکسینه شده نسبت به پادگن تزریق شده متفاوت است.

با توجه به مطالب فوق احتمال دارد که حساسیت نژادهای دیگر مرغ‌های منطقه تبریز و یا سایر نقاط ایران نسبت به این انگل و پادگن‌های موجود در کرم‌های بالغ آسکاریدیا گالی متفاوت باشد. بنابراین لازم است در این مورد بررسی‌های بیشتری صورت گیرد. در بررسی حاضر، میانگین EPG، ۵۲ روز پس از آلودگی و همچنین تعداد کرم‌های ماده با میزان دانسیته نوری سرم ها در مرغ های واکسینه شده رابطه منفی داشت، یعنی

EPG و تعداد کرم ها در گروه واکسینه شده کاهش یافتند در حالیکه میزان دانسیته نوری سرم مرغ های واکسینه شده افزایش یافته بود و افزایش دانسیته نوری سرم‌های گروه واکسینه شده نشان دهنده افزایش عیار سرمی مرغ‌های این گروه است و احتمال دارد که این پادتن‌های سرمی از مکانیسم‌های موثر و مهم ایمنی در این پاسخ باشد (۱٦و۱۸).

از آنجایی که ایمنی اکتسابی طبیعی در جوجه‌های در حال رشد، آهسته است، بنابراین واکسنی که بتواند جوجه‌های در حال رشد را محافظت کند دارای اهمیت ویژه‌ای است. با توجه به اثرات چشمگیر ایمنوگلوبولین G_1 (IgG_1) سرمی و نیز ارتباط قوی آن با دیگر عوامل به نظر می‌رسد که این پادتن نقش مهم‌تری نسبت به بقیه پادتن‌ها در پاسخ ایمنی بازی کند (۸ و۱۸).

در دهه گذشته، پیشرفت‌های قابل توجهی در جهت تهیه واکسن بر ضد نماتودهای طیور صورت گرفته است. چندین پادگن محافظتی کشف شده‌اند اما تا ساخت یک واکسن یک ظرفیتی (Monovalant) برای آسکاریدیا گالی هنوز موانع زیادی وجود دارد و دست‌یابی به یک واکسن ضد نماتودی یک ظرفیتی هنوز بعید به نظر می‌رسد. مانع اصلی، تولید نسخه‌های نوترکیبی با ارزش از نظر محافظتی است ولی اگر میزان پیشرفت به دست آمده در طی ۱۰ سال گذشته بتواند ادامه یابد، دهه بعد می‌توانیم شاهد ساخت اولین واکسن پادگن ضد نماتود برای طیور باشیم. تعداد بسیار زیادی از مولکول‌ها با خاصیت محافظتی در برابر آسکاریدیا گالی به خوبی تکامل و پیشرفت آتی در ساخت واکسن‌های مولکولی در برابر این انگل را نشان می‌دهد. هدف اصلی، ساخت یک واکسن مولکولی وسیع الطیف است که قادر باشد مرغ‌ها و پرندگان دیگر را در برابر آسکاریدیا گالی و هتراکیس گالیناروم که از نظر اقتصادی مهم می‌باشند، محافظت کند و به عبارت دیگر قادر باشد با داروهای وسیع‌الطیف ضد کرمی رقابت کند (۹ و۱۱). هدف اصلی، به دست آوردن پادگن‌ها یا حداقل تعداد کمی مولکول است که قادر به ایجاد محافظت متقاطع باشند (۷ و۱۳).

فهرست منابع

۱- اسلامی، ع. (۱۳۷٤): کرم شناسی دامپزشکی، جلد دوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ٥-۱.

۲- ارفع، ف. (۱۳۷٤): کرم شناسی پزشکی، جلد دوم، تهران، انتشارات بنفشه، صفحه: ٦-۱.

۳- حقوقی راد، ن. (۱۳٦۷): تشخیص آزمایشگاهی بیماری های انگلی روده، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۲۰۰-۱۹۹.

٤- زهری، م. (۱۳۸۱): اصول پرورش طیور، چاپ دوازدهم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۱۷-۱٥.

٥- محمود زاده، ع. و مهرانی، ح. (۱۳۸۲): کاربرد روش های مولکولی در انگل شناسی تحلیلی، (ترجمه)، تالیف: میشل، تی. چاپ پنجم، تهران، انتشارات گوهر منظوم، صفحه: ٤٥ و ۱۲.

٦- میرزایانس، ا.، راک، ه.، انوار، م. و نیاک، ع. (۱۳٥٤): روش های آزمایشگاهی بیماری های انگلی در دامپزشکی، چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۹-۱.

7- Becker, K.L. (1998): Purification and characterization of p54, p63 (p120) from Ascaridia galli, Immunology Journal. 213: 198-203.

8- David, J. M., Michael, T. (1996): Purification and characterization of prostaglandine- H E- isomerase, a sigma – class glutation s- transferase from Ascaridia galli, Biochemistry Journal. 313: 223-227.

9- Dellman, H.H. and Brown, E. N. (1997): A survey into the prevalence of Ascaridia galli in Texas commercial broiler chickens. Avian disease. 85(3): 172-184.

10- Eklund, J., Loomis, E. and Abplanalp, H. (1988): Genetic resistance of white leghorn chickens to Ascaridia galli. Arch Gefluegelkd. 42: 185-191.

11- Growther, J.R. (1995): Methods in Molecular Biology, ELISA: Theory and practice. Humana. U.S.A., 42.

12- Harlow, E. and Lane, D. (1988): Antibodies a laboratory manual. Cold spring laboratory, U.S.A., pp: 461-470, 560.

13- Head, K. and Wand west, G. S. (1989): Study of the Immunologic responses for Ascaridia galli in poultry, Current Science India. 73(5): 356-370.

14- Jitla, D.S., Guraya, S.S. and Parshad, V.R. (1991): Effects of host intestinal secretions and antimetabolite on survival and mobility of Ascaridia galli. Biomedical Letters. 41 (2): 181, 73-79.

15- Karanv, F.N., Mc guire, T.C., Davis, W.C., Besser, T.E. and Jasmer, D.P. (1997): CD^+4 T-lymphocytes

contribute to protective gut antigens. Parasite Immunology. 19:435-445.

16- Krystyna, Z. (2001): Purification and characterization of ∝- amylases from the intestine and muscle of Ascaridia galli, Current Science India. 87(4): 380-385.

17- Mcclure, S. (2000): Poultry immunity to gastrointestinal nematode parastie. Available at: http://www.Csiro.Au/Scips.htm

18- Muimo, R. and Isaac, R.E. (1995): Nematod Arylalkylamine N-Acetyl- Transferases: Purification and charcaterization from Ascaridia galli. University of Leeds, Lsz 9JT U.K. International Worm Meeting, pp: 335-338.

19- Peter, F. (2001): Conformational and functional analysis of the lipid binding protein Ag-NPA-1 from the parasitic nematode Ascaridia galli, Indian Journal of Animal Sciences. 65(3): 55-59.

20- Rao, M.V.S. and Lal, S.S. (1991): Immunophysiological changes induced by Ascaridia galli in white leghorn chickens. Comarative Physiology and Ecology. 16 (4): 134 - 136.