مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۳، ۱۸۹-۱۸۳

مقایسه ایمنی زایی آنتی ژنهای اکینوکوکوس گرانولوزوس علیه کیست هیداتیک گوسفند

سینا سلیمانی[۱] سید حسین حسینی[۲]* محمد علی اخویزادگان[۱] غلامرضا معتمدی[۱]

[۱] موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج - ایران
[۲] گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۱۲ شهریور ماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۱۷ خردادماه ۱۳۸۵)

چکیده

در این مطالعه ایمنی زایی آنتی ژنهای مراحل مختلف چرخه زندگی اکینوکوکوس برای تعیین اثر بخش ترین آنتی ژن جهت استفاده در ساخت واکسن علیه کیست هیداتیک در گوسفند مورد مقایسه قرار گرفت. آنالیز یافته ها با آزمون Cocran و t-student نشان داد که اختلاف معنی داری در میانگین جذب نوری گروههای تزریق شده با آنتی ژنها نسبت به گروههای کنترل وجود دارد. علاوه بر آن بیشترین میزان جذب نوری در گروههای تزریق شده با مخلوط آنتی ژنها انکوسفر و پروتواسکولکس است و کمترین آن مربوط به تزریق پروتواسکولکس به تنهایی است. ($p<0/05$). همچنین مطالعات آسیب‌شناسی نشان داد که گروههای تزریق شده فاقد کیست و یا واجد کیستهای کلسیفیه بودند ولی گروههای کنترل دارای کیستهای بارور هستند. ایمنی ایجادشده با استفاده از آنتی ژنها پروتواسکولکس کیست هیداتیک، انکوسفر تخم و مخلوط این دو به ترتیب ۸۲,۷۲,۵۰۲ درصد تعیین شد. در مجموع می توان نتیجه گرفت که پاسخ ایمنی در نتیجه تزریق مخلوط آنتی ژنها انکوسفر و پروتواسکولکس از هر کدام به تنهایی بیشتر است و باسطح اطمینان ۹۵ درصد ($p<0/05$) از ایجاد کیست هیداتیک پیشگیری می کند.

واژه‌های کلیدی: اکینوکوکوس، گرانولوزوس، کیست هیداتیک، الایزا، آنتی ژن، انکوسفر، پروتواسکولکس.

مقدمه

اکینوکوکوس گرانولوزوس یکی از سستودهای روده باریک گوشتخواران بویژه سگ می باشد که از نظر اقتصادی و بهداشتی از اهمیت زیادی برخوردار است. این انگل دارای دو میزبان در چرخه زندگی خود می باشد. تخم انگل از طریق مدفوع گوشتخوار دفع شده و پس از خورده شدن توسط میزبان واسط مانند نشخوارکنندگان و انسان در کبد، ریه و بافتهای دیگر به مرحله متاسستود تبدیل می شود. هیداتیدوز که ناشی از مرحله نوزادی انگل است سالیانه خسارت اقتصادی و بهداشتی فراوانی را در جهان باعث می شود. کشور ما نیز یکی از مناطق بومی این بیماری می باشد. عامل مولد کیست هیداتیک در تمام نقاط کشور دیده می شود و در مطالعات زیادی آلودگی سگ به مرحله بالغ و میزبانهای واسط (نشخوارکنندگان، تک سمی، انسان) به مرحله نوزادی نشان داده شد(۱،۲،۴،۶،۹،۱۲،۱۸). گوسفند در میان میزبانهای واسط مختلف با توجه به تعداد و پراکندگی، درصد آلودگی به کیست هیداتیک (۱۶/۸ - ۱/۶) و درصد بالای باروری و زنده بودن پروتواسکولکس های آن مهمترین میزبان واسط اکنیوکوکوس گرانولوزوس در ایران می باشد(۱،۳،۵،۱۸). میزان شیوع اکینوکوکوس گرانولوزوس هم در سگهای ولگرد و سگهای مزرعه به ترتیب بین ۵۰ - ۵ و ۳/۳ - ۶۳ درصد بوده است(۱،۱۲،۱۸).

علی رغم تلاشها و اقداماتی که برای کنترل و پیشگیری از آلودگی ها صورت گرفت همچنان هیداتیدوزیز بعنوان مشکل اقتصادی و بهداشتی در دنیا مطرح است و در سالهای اخیر مطالعات زیادی در مورد ایمنی زایی و تهیه واکسن علیه انگل در میزبان واسط صورت گرفت و تلاش برای ساخت واکسن مناسب برای کنترل انگل از اهمیت خاصی برخوردار است. در مطالعه حاضر آنتی ژنهای مراحل مختلف چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس از نظر ایمنی زایی بر علیه کیست هیداتیک مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

از آنجایی که ایران یک منطقه اندمیک مهم برای این انگل محسوب می شود و به خاطر اهمیت بهداشتی و اقتصادی بیماری، تلاش برای ساخت یک واکسن مناسب برای کنترل این انگل در میزبانان واسط از اهمیت خاصی برخوردار است. مطالعه حاضر آنتی ژنهای مختلف اکینوکوکوس گرانولوزوس را از نظر ایمنی زایی در مقابل کیست هیداتیک جهت استفاده در واکسن بررسی می کند.

مواد و روش کار

مرحله ۱- تهیه آنتی ژن انکوسفر

۱-۱- به منظور تهیه کرم بالغ و تخم انگل ۶ قلاده توله سگ که از بدو تولد بطور دستی تغذیه دریافت نمودند در یک مکان ایزوله نگهداری شدند. اندامهای گوسفند آلوده به کیست هیداتیک بارور از کشتارگاههای کرج و زیاران جمع آوری و به سگها خورانده شد. سگها ۷ هفته پس از چالش کالبد گشایی شدند. برای تهیه تخم انگل از روش Dempster و همکاران(۱۰،۱۱) استفاده شد:

پس از کالبد گشایی، روده قطعه قطعه شده و در محلولی که حاوی ۸/۵ گرم کلرور سدیم، ۱/۳۴ گرم فسفات دی سدیک، ۰/۳۹ گرم فسفات منو سدیک و یک لیتر آب بود، قرار داده شده و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند تا کرمها از مخاط روده جدا شوند و در ته ظرف رسوب کنند. پس از خرد شدن کرمها توسط برووایر تخمها از توری ۱۰۰ میکرون گذرانیده شده و

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۷۳-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: hhoseini@ut.ac.ir

توسط توری نایلونی با سوراخهای ۲۰ میکرون جمع آوری شده و شمارش شدند و در ظروف در پیچ دار ریخته شدند. سپس با پپسین(st.Lois, USA, Sigma) و پانکراتین فعال شده و سونیکه شدند.

۱-۲- تهیه آنتی ژن انکوسفر از تخم انگل: پس از جمع آوری تخمها برای تهیه آنتی ژن از روش Dempster و همکاران(۱۰،۱۱) استفاده شد: ابتدا تخمهای نارس و رسیده در پپسین ۱ درصد و اسید کلریدریک ۱ درصد (pH=۲) به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند تا کیسه های زرده اضافه از بین بروند. سپس تخمها در percoll ایزوتونیک (Pharmacia, Uppsala, Sweden) مجزا شدند. سپس در ۱۸۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. تخمهای رسیده ته نشین شده و برداشت شدند و ۲ بار در محلول سرم فیزیولوژی شستشو داده شده و تفریخ شدند. تخمهای نارس که در Percoll شناور ماندند، آسپیره شده و دوبار شستشو شدند. انکوسفرها با دستگاه count Fuchus- Rosental شمرده شده و غلظتشان تنظیم شد($۲-۵ \times ۱۰^{۵}$). بدلیل مقاومت تخمهای نارس در برابر هچ شدن، آنها را در بافر تهیه کننده آنتی ژن { بافر ۲۰Tris- Hcl میلی مولار، ۱۰۰ میلی لیتر ایدواستامید، ۲ میکروگرم پپستاتین، ۳۰ واحد آپروتونین(۰/۰۰۳۷ میلی گرم شرکت sigma) و ۲EDTA میلی مولار(BDH, poole, UK)} منجمد کرده و سپس ذوب شدند و به مدت ۳۰ ثانیه سونیکه شدند تا متلاشی شوند. سپس در ۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع رویی بعنوان انکوسفرهای یخ زده، ذوب شده و سونیکه در ۱۸- درجه ذخیره شد. هنگام استفاده در سدیم دی دسیل سولفات حل شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند و در ۱۰۰۰۰۰ دور به مدت ۱ ساعت سانتریفوژ شدند. مایع رویی انکوسفرهای اکینوکوکوس گرانولوزوس سدیم دی دسیل سولفاته یخ زده نگهداری شد.

مرحله ۲- تهیه آنتی ژن پروتواسکولکس

۲-۱- تهیه مایع کیست هیداتیک: با مراجعه به کشتارگاههای کرج و زیاران اندامهای آلوده به کیست هیداتیک گوسفند جمع آوری شدند و مایع کیست حاوی پروتواسکولکس و کپسول زایا از این کیستها توسط سرنگ استخراج شد.

۲-۲- تهیه آنتی ژن پروتواسکولکس از مایع کیست: مایع کیست جمع آوری شده از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرون (Bed ford, MA, USA) عبور داده شد. پروتواسکولکس زایا در بافر تهیه کننده آنتی ژن هموژنیزه شدند. بعد از سونیکه شدن در ۱۸- درجه ذخیره شدند. در هنگام استفاده پس از انکوباسیون در پپسین ۰/۰۵ درصد و اسید کلریدریک(pH=۲)، در سرم فیزیولوژی ایزوتونیک به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی هم زن قرار گرفتند. بعد از برداشت مایع روی پروتواسکولکس های ته نشین شده، عملیات هضم شدن دوباره تکرار شد. بعد از هر مرحله سونیکه شدن از پاره شدن کامل آن ها توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار می گرفت.

مرحله ۳- تلقیح آنتی ژنها به گوسفندان

۳-۱گروه بندی آنتی ژنها: آنتی ژنها از نظر نوع و مقدار به ۱۲ گروه تقسیم شدند (جدول ۱).

جدول ۱- نوع و مقدار آنتی ژن برای تلقیح به گوسفندان.

گروه	نوع آنتی ژن	مقدار آنتی ژن و ادجوانت
A1	انکوسفر با دز کم	۱۰۰۰۰ انکوسفر + ۵۰۰ میکروگرم ژل
A2	انکوسفر با دز متوسط	۲۰۰۰۰ انکوسفر + ۵۰۰ میکروگرم ژل
A3	انکوسفر با دز زیاد	۳۰۰۰۰ انکوسفر + ۵۰۰ میکروگرم ژل
B1	پروتواسکولکس با دز کم	۲۵۰ میکروگرم پروتواسکولکس + ۲۵۰ میکروگرم ژل
B2	پروتواسکولکس با دز متوسط	۵۰۰ میکروگرم پروتواسکولکس + ۲۵۰ میکروگرم ژل
B3	پروتواسکولکس با دز زیاد	۷۵۰ میکروگرم پروتواسکولکس + ۲۵۰ میکروگرم ژل
C1	انکوسفر + پروتواسکولکس با دز کم	۱۰۰۰۰ انکوسفر + ۲۵۰ میکروگرم پروتواسکولکس + ۹۰۰ میکروگرم ژل
C2	انکوسفر + پروتواسکولکس با دز متوسط	۲۰۰۰۰ انکوسفر + ۵۰۰ میکروگرم پروتواسکولکس + ۱۲۰۰ میکروگرم ژل
C3	انکوسفر + پروتواسکولکس با دز زیاد	۳۰۰۰۰ انکوسفر + ۷۵۰ میکروگرم پروتواسکولکس + ۱۶۰۰ میکروگرم ژل
D1	کنترل	۵۰۰ میکروگرم ژل
D2	کنترل	۷۵۰ میکروگرم ژل
D3	کنترل	یک میلی لیتر نرمال سالین

۳-۲- گروه بندی گوسفندان: ۴۸ راس بره سالم از بدو تولد در محیط ایزوله پرورش داده شدند. در ماه اول با شیر و سپس در طول مدت نگهداری با یونجه خشک و کنسانتره تغذیه شدند. این گوسفندان به صورت تصادفی به ۱۲ گروه ۴ تایی (۹ گروه برای تزریق آنتی ژنها و ۳ گروه کنترل) تقسیم شدند.

۳-۳- تلقیح آنتی ژنها: آنتی ژنها به همراه ژل (سولفات آلومینیم) به عنوان ادجوانت به صورت زیر پوستی در ناحیه ران گوسفندان تلقیح شدند. مجددا سه هفته بعد آنتی ژنها با همان مقدار ولی بدون ادجوانت به گوسفندان تلقیح شدند(یادآور).

مرحله ۴- خونگیری و تهیه سرم

خونگیری و جداسازی سرم در ۴ مرحله انجام شد:

۱- قبل از تلقیح آنتی ژنها

۲- یک هفته بعد از تلقیح آنتی ژنها

۳- یک هفته بعد از چالش

۴- دو ماه بعد از چالش

مرحله ۵- چالش

چهار ماه پس از تلقیح آنتی ژنها، ۲۰۰۰ عدد تخم اکینوکوکوس گرانولوزوس که به روش Dempster و همکاران در سال ۱۹۹۲ تهیه شده بودند به هر گوسفند در همه گروهها خورانده شد.

مرحله ۶- ارزیابی سرولوژی

۶-۱- انتخاب روش سرولوژی: برای ارزیابی سطح ایمنی گوسفندان از روش الایزای غیر رقابتی با فرمولاسیون اختصاصی که در این تحقیق بدست آمد، استفاده شد.

۶-۲- انتخاب آنتی ژن در الایزا: برای تهیه آنتی ژن مورد نیاز برای پوشاندن حفرات میکروپلیت در الایزا از آنتی ژنهای مختلف زیر استفاده شد:

۱- آنتی ژن تخم اکینوکوکوس گرانولوزوس

۲- آنتی ژن مایع کیست هیداتیک گوسفندی

۳- آنتی ژن مایع کیست هیداتیک گوسفند پوشیده شده با آنتی

جدول۲ـ جذب نوری سرمی در گوسفندان سالم برای محاسبه مرز شروع عفونت.

شماره گوسفند	جذب نوری	شماره گوسفند	جذب نوری	شماره گوسفند	جذب نوری
۱	۰/۴۰	۱۱	۰/۴۱	۲۱	۰/۴۳
۲	۰/۵۰	۱۲	۰/۳۵	۲۲	۰/۴۸
۳	۰/۴۵	۱۳	۰/۳۷	۲۳	۰/۳۶
۴	۰/۵۶	۱۴	۰/۳۹	۲۴	۰/۵۳
۵	۰/۵۹	۱۵	۰/۳۵	۲۵	۰/۳۸
۶	۰/۳۵	۱۶	۰/۳۶	۲۶	۰/۴۷
۷	۰/۳۵	۱۷	۰/۳۷	۲۷	۰/۵۷
۸	۰/۳۵	۱۸	۰/۳۹	۲۸	۰/۶۳
۹	۰/۴۴	۱۹	۰/۴۳	۲۹	۰/۵۸
۱۰	۰/۳۹	۲۰	۰/۴۵	۳۰	۰/۴۶

$Cut\ off = \mu + 2SD \qquad \mu = ZXI/N \qquad \mu = 0.43 \qquad SD = 0.074$

$Cut\ off = 0.43 + (2 \times 0.074) = 0/57$

گوسفندی (Antisheep)

۴ـ آنتی ژن مایع کیست هیداتیک گوسفند رسوب گیری شده

۵ـ مخلوط آنتی ژنهای مایع کیست هیداتیک گوسفند و تخم اکینوکوکوس گرانولوزوس

۶ـ آنتی ژن مایع کیست هیداتیک گاوی پوشیده شده با آنتی گوسفندی

۷ـ آنتی ژن مایع کیست هیداتیک گاوی

در نهایت به دلیل حداقل واکنش متقاطع و دستیابی به نتیجه مناسب از آنتی ژن مایع کیست هیداتیک گاوی که به صورت زیر بدست آمد استفاده شد:

پس از جمع آوری اندامهای آلوده به کیست هیداتیک گاو، مایع کیست استخراج شد و در آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و مایع رویی جدا شد. این مایع به کمک کیسه دیالیز به مدت یک شب در مقابل PBS دیالیز شده و بکمک فیلتر ۰/۴۵ میکرون استریل شد.

۶-۳ـ اندازه گیری مقدار پروتئین در مایع کیست: برای استفاده از آنتی ژن مایع کیست در الایزا جهت تعیین حجم مناسب برای پوشاندن پلیت باید میزان پروتئین موجود در مایع کیست اندازه گیری شود. برای این کار از روش لوری بر اساس گزارش های قبلی (به کمک معرف لوری) استفاده شد(۲۰،۲۹)

۶-۴ـ طراحی روش الایزا برای سنجش ایمنی: از الایزا با آنتی ژن مایع کیست هیداتیک گاوی و فرمولاسیون اختصاصی سایر مواد از جمله بافرها بدین شرح استفاده شد: از روش Checker board برای تعیین تیتر مناسب سرم، آنتی ژن و کونژوگه استفاده شد: برای سرم، رقتهای: ۱/۵ تا ۱/۵۱۲۰، برای آنتی ژن، رقتهای: ۱/۱۰ تا ۱/۱۰۰۰ و برای کونژوگه رقتهای: ۱/۱۰۰۰ تا ۱/۱۰۰۰۰ تست شدند. سرانجام رقتهای ۱/۵۰، ۱/۳۰۰ و ۱/۵۰۰ به ترتیب برای سرم، آنتی ژن و کونژوگه مناسب تعیین گردید. پس از اندازه گیری غلظت پروتئین یک محلول ۵ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی ژن در بافر کربنات { بیکربنات سدیم ۰/۱ مولار، کربنات سدیم ۰/۱ مولار، کلرور منیزیم ۱ مولار (pH۹/۶)} تهیه شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر یک از حفرات میکروپلیت (Maxisorb شرکت Nunc) ریخته شد و سپس به مدت یک شب در محیط مرطوب و در ۴ درجه قرار داده شد. پس از خالی کردن آنتی ژن از حفرات میکروپلیت، ابتدا آن را سه بار به کمک بافر شستشو (کلرور سدیم ۰/۹ درصد و توین بیست ۰/۳ درصد) شسته و پس از خالی کردن حفرات برای بلوک کردن از بافر مسدودکننده (PBS۰/۱۵ مولار، فنل رد ۲ درصد، توین بیست ۰/۳ درصد و سدیم آزاید ۰/۰۰۲ درصد) استفاده شد. سرمهای کنترل مثبت و منفی و تست را به کمک بافر رقیق کننده (با فرمول مشابه با بافر مسدود کننده) به نسبت ۱/۲۰۰ رقیق کرده و در هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر (برای هر نمونه ۲ حفره) ریخته شد. پلیت را با پارا فیلم پوشانده و به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه و محیط مرطوب قرار داده شد. پس از خالی کردن سرمها، حفرات را چهار مرتبه با بافر شستشو شسته، و سپس به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سرم ضد آنتی بادی گوسفندی کونژوگه با پراکسیداز (شرکت سیگما) اضافه شد. مجددا پلیت را به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه کرده و پس از چهار بار شستشو با روش قبلی و خالی کردن حفرات، به هر حفره ۵۰ میکرولیتر سوبسترای ABTS که به نسبت ۱/۹ در بافر مربوطه {اسید سیتریک ۰/۱ مولار، سدیم فسفات دی بازیک ۰/۲ مولار با (pH ۶/۴)} رقیق شده است، اضافه شد. میزان جذب نوری هر حفره پس از ۳۰ دقیقه و اضافه کردن محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک ۲ نرمال) به کمک دستگاه ELISA reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. جذب نوری هر نمونه با میانگین گرفتن از اعداد مربوط به دو حفره یکسان بدست آمد(۳۱).

۶-۵ـ تعیین مرز شروع عفونت (Cut off): از چندین راس گوسفند در کشتارگاه قبل از کشتار خونگیری شد. گوسفندان و نمونه های خونی مربوطه علامت گذاری شدند. سپس گوسفندان کشتار شدند و از نظر کیست هیداتیک بررسی شدند. ۳۰ نمونه خون از گوسفندان سالم انتخاب و نمونه خون گوسفندان آلوده حذف شدند. بعد از جدا سازی سرم، سرمها با ELISA ارزیابی شدند و مرز شروع عفونت (Cut off) محاسبه شد.

۶-۶ـ تعیین میزان جذب نوری در گروهها: میزان جذب نوری در گروهها بوسیله روش الایزا در مراحل زیر تعیین شد:

۱ـ قبل از تلقیح آنتی ژن

۲ـ بعد از تلقیح آنتی ژن

۳ـ یک هفته بعد از چالش

۴ـ دو ماه بعد از چالش

مرحله ۷ـ بازرسی بعد از کشتار

یکسال و ۴ ماه بعد از تلقیح آنتی ژنها همه گوسفندان کشتار شدند و کبد، ریه، طحال، کلیه و سایر اندامها از نظر آلودگی به کیست هیداتیک بازرسی شدند. از ریه برشهای کلفت (۱۰ میلی متر) و از کبد برشهای نازک (۲ میلی متر) تهیه شده و بررسی شدند. در گوسفندان آلوده تعداد کیست، اندازه و وضعیت کیست از نظر باروری و کلسیفیکاسیون بررسی شدند.

مرحله ۸ـ آنالیز های آماری

برای آنالیزهای آماری از دو تست آماری cocran و مربع کای استفاده شد:

نتایج

۱ـ تعیین غلظت پروتئین مایع کیست هیداتیک گاو: با استفاده از روش

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار میزان جذب نوری گروههای مورد مطالعه.

گروهها	قبل از تزریق	بعد از تزریق	یک هفته بعد از تزریق	دو ماه بعد از آلودگی تجربی	میانگین کل دوره[1]
	میانگین[2] ±انحراف معیار	میانگین[2] ±انحراف معیار	میانگین[2] ±انحراف معیار	میانگین[2] ±انحراف معیار	میانگین[2] ±انحراف معیار
A1	۰/۴۲۶±۰/۱۳۸	۱/۵۸۴±۰/۵۵۷	۰/۹۵۰±۰/۲۶۵	۰/۷۸۴ ±۰/۷۸	۱/۱۰۶±۰/۴۲۲
A2	۰/۳۶۷±۰/۰۶۸	۱/۳۵۱±۰/۵۸	۰/۷۱۴±۰/۰۶۲	۰/۸۲۵±۰/۰۸۹	۰/۹۶۳±۰/۳۴
A3	۰/۴۵۶±۰/۱۱۸	۱/۲۸۶±۰/۸۱۶	۰/۷۶۷±۰/۲۹۸	۰/۸۹۵±۰/۱۹۷	۰/۹۸۳±۰/۲۷
B1	۰/۴۰۲±۰/۰۹۹	۱/۴۱۹±۰/۵۵۲	۰/۷۹۷±۰/۲۲	۰/۸۱۲±۰/۱۵	۱/۰۰۶±۰/۳۴۸
B2	۰/۴۳۴±۰/۱۲۵	۱/۱۸۵±۰/۴۲۶	۰/۸۱۴±۰/۲۲	۰/۷۹۱±۰/۰۹۷	۱/۰۰۴±۰/۱۸۵
B3	۰/۴۰۹±۰/۱۳۲	۱/۱۷۰±۰/۴۲۷	۰/۸۰۸±۰/۲۸۷	۰/۹۴۶±۰/۲۸۷	۱/۰۱۰±۰/۱۸۵
C1	۰/۳۴۴±۰/۰۵۹	۱/۴۳۷±۰/۲۴۴	۱/۱۷۰±۰/۶۲۹	۱/۱۱۰±۰/۳۱	۱/۲۴۱±۰/۱۷۳
C2	۰/۵۲۱±۰/۰۵۲	۱/۴۰۶±۰/۷۰۷	۰/۹۱۴±۰/۶۱۷	۱/۱۳۶±۰/۲۹۲	۱/۰۷۸±۰/۱۴۴
C3	۰/۴۱۲±۰/۰۵۶	۱/۳۹۲±۰/۴۹۲	۱/۰۲۲±۰/۶۵۶	۱/۰۵۳±۰/۲۲۸	۱/۱۲۰±۰/۲۳۸
D1	۰/۳۸۴±۰/۰۷۳	۰/۸۰۷±۰/۰۲۱	۰/۷۱۳±۰/۳۸	۰/۶۴۲±۰/۰۶۱	۰/۷۲۱±۰/۰۸۲
D2	۰/۳۹۸±۰/۲۸۳	۰/۵۱۱±۰/۱۶۴	۰/۶۸۲±۰/۱	۰/۷۶۳±۰/۱۶۶	۰/۶۵۲±۰/۱۲۸
D3	۰/۴۳۳±۰/۸۳	۰/۶۹۴±۰/۱۰۵	۰/۶۲۵±۰/۰۹۷	۰/۸۵۲±۰/۴۳۳	۰/۷۲۴±۰/۱۱۶

۱- میانگین کل دوره بدون احتساب اعداد قبل از تزریق محاسبه شده است. ۲- میانگین مربوط به جذب نوری چهار راس گوسفند در هر گروه.

لوری، غلظت پروتئین موجود در نمونه آنتی ژن مایع کیست هیداتیک برای پوشاندن پلیت در الایزا ۰/۵۴ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد.

۲-تعیین مرز شروع عفونت(Cut off): جدول ۲ میزان جذب نوری سرمی در ۳۰ گوسفند عاری از عفونت کیست هیداتیک را نشان می دهد.

بدین ترتیب مشخص شد که بالاترین میزان جذب نوری گوسفندان سالم ۰/۵۷ نانومتر است. لذا برای ارزیابی نتایج، اعداد بالاتر از ۰/۵۷ بعنوان مثبت، بین ۰/۴۵ و ۰/۵۷ مشکوک و پایین تر از ۰/۴۵ منفی در نظر گرفته شدند.

۳-نتایج آزمون الایزا در گوسفندان: جدول ۳ میزان جذب نوری سرم گوسفندان را که بصورت متوسط جذب نوری دو تست موازی محاسبه شده است نشان می دهد.

۳- نتایج بازرسی بعد از کشتار: جدول ۴ نتایج بازرسی بعد از کشتار را نشان می دهد.

۵- در تجزیه و تحلیل آماری تفاوت بین گروههای واکسینه و کنترل با سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار بود($p<0/05$).

بحث

در این مطالعه ایمنی زایی آنتی ژنهای مراحل مختلف چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس، به منظور انتخاب آنتی ژن مناسب برای ساخت واکسن علیه عفونت هیداتیدوز مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مطالعات برای شناسایی پادگن‌های محافظت کننده در مقابل اکینوکوکوس گرانولوزوس ازدهه ۱۹۳۰ آغاز شد. Gemml در سال ۱۹۶۶ نشان داد که پادگن های تخم و اونکوسفر توانایی ایجاد واکنش ایمنی را در گوسفند دارد (۱۳). تحقیقات Heath و Lowrence در سال ۱۹۸۱ و Osborn در سال ۱۹۸۲ نیز نشان داد که با استفاده از آنتی ژنهای غیر زنده که از اونکوسفر انگل بدست آمده است سطح آنتی بادی سرمی در بره به میزان قابل توجهی افزایش می یابد و می توان گوسفندان را بر علیه کیست هیداتیک واکسینه

جدول ۴- میانگین، تعداد، اندازه کیست و وضعیت هر کیست در گوسفندان مورد بررسی.

گروهها	تعداد کیست	اندازه کیست به سانتیمتر	وضعیت کیست
	میانگین[1] ±انحراف معیار	میانگین[1] ±انحراف معیار	
A1	۹/۷۵±۹/۳۲	۲/۳۱±۰/۸۹۷	یک کیست بارور، بقیه کلسیفیه
A2	۶/۲۵±۶/۲۴	۲/۳۸±۰/۸۷۱	همه کیست ها کلسیفیه
A3	۰	-	-
B1	۳±۲/۴	۱/۶±۰/۵۱۷	یک کیست بارور، بقیه کلسیفیه
B2	۱۳/۲۵±۲۲	۱/۸±۰/۴۸۶	همه کلسیفیه
B3	۱۱/۵۰±۱۲/۵۵	۱/۹۸۳±۰/۵۶۴	هفت عدد کیست بارور، بقیه کلسیفیه
C1	۴/۷۵ ±۵/۵	۰/۴۵۶±۰/۱۴۴	همه کلسیفیه
C2	۵/۲۵±۹/۸۴	۰/۷۴±۰/۲۳۷	همه کلسیفیه
C3	۰	-	-
D1	۲۱/۷۵±۳۵/۹۵	۳/۹±۲/۹۶	همه بارور
D2	۱۶/۲۵± ۱۶/۹۴	۴/۷۵±۰/۷	همه بارور
D3	۱۷/۷۵±۱۹/۵۷	۵/۰۲±۱/۶۳	همه بارور

۱- میانگین مربوط به چهار راس گوسفند در هر گروه.

نمود(۱۵،۳۲). Dempster و همکاران نیز در سال ۱۹۹۲ نشان دادند که اونکوسفر یک منبع غنی از پادگن های محافظت کننده در طیف وسیعی از سستودهای خانواده تنیا است و پادگن‌های اونکوسفر اکینوکوکوس گرانولوزوس که با سدیم دودسیل سولفات تهیه شده‌اند توانایی ایجاد محافظت علیه آلودگی تجربی را تا ۹۱ درصد دارد. در زمانی‌که از مایع کیست هیداتیک، ترکیبات دفعی ترشحی کرم بالغ، کپسول زایا و پروتواسکولکس بعنوان آنتی ژن استفاده شد میزان ایمنی زایی به ترتیب ۳۰، ۵۷، ۴۴، ۷۸ درصد می باشد(۱۱). همچنین Singh در سال ۱۹۹۷ در مطالعه‌ای که در گاومیش انجام داد به این نتیجه رسید که سرم گاومیش پس از تزریق آنتی ژن استخراج

شده از اونکوسفر (در شرایط آزمایشگاهی) به میزان ۹۴درصد می تواند اونکوسفرها را از بین ببرد(۳۳). نویدپور و همکاران در سال در۱۳۸۱ ایمن سازی گوساله گاومیش با استفاده از پادگن های تخم و انکوسفر اکینوکوکوس گرانولوزوس نشان دادند که پادگن های مذکور توانایی ایجاد محافظت علیه استقرار و رشد کیست هیداتیک در گاومیش داشته و توانایی پادگن انکوسفرفعال در این خصوص بیشتر از پادگن تخم است(۷). Lightowlers و همکاران در طی مطالعات متعددی اعلام نمودند که پادگن‌های انکوسفرها قویترین منبع آنتی ژن محافظت کننده هستند(۲۲،۲۴،۲۵،۲۶). Canon وهمکاران نیزدرسال ۲۰۰۴ تاکیدنمودندکه مراحل مختلف زندگی سستودهای تنیایی دارای آنتی ژنهای محافظت کننده هستند اما اینکه آیا آنتی ژنهای مراحل مختلف زندگی تنیاها با هم مشابه‌اند یا خیر، مورد بحث است(۸).

درمطالعه هاشمی تبار وهمکاران بااستفاده ازپروتئین پروتواسکولکس و مایع کیست هیداتیک در موش و پروتئین محلول کرم بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس در گوسفند ایمنی محافظتی به ترتیب ۷۲/۱، ۸۲/۶، ۹۰/۹درصد ایجاد شد(۱۴). در دهه ۱۹۹۰ کاربرد علمی استفاده از آنتی ژنهای مراحل مختلف انگل خصوصا اونکوسفر درواکسیناسیون میزبان واسط مورد تائید قرار گرفت(۱۱،۱۶،۱۷،۲۲،۲۳،۲۴،۲۷،۲۸) و با استفاده از روشهای نوترکیبی DNA محققان توانستند در این زمینه به نتایج خوبی برسند.به عنوان مثال(Lightowler وهمکاران بااستفاده ازپروتئین mRNA نوترکیبی موفق به ساخت واکسن EG95 شدند که در Ecoli کلون شده وموجب القای ایمنی مناسب در گوسفند می شود. این واکسن برای گوسفند حاوی ۵۰ میکروگرم پروتئین EG95 و یک میلی گرم ادجوانت بنام Quil A در یک محلول استریل است. این واکسن با سه بار تزریق در سال قادر به ایجاد ایمنی بالا و طولانی مدت است(۲۵،۲۶) .در مطالعه ای دیگر آنتی ژن نوترکیب GST متعلق به اکینوکوکوس گرانولوزوس در برابر عفونت تجربی در گوسفند بیش از ۹۵ در صد ایمنی ایجاد کرده است(۳۰).

درمطالعه حاضربه منظوراندازه‌گیری آنتی بادیها ازآزمون الایزا استفاده شد. در اجرای این آزمون مشخص شد که استفاده از مایع کیست هیداتیک گوسفند به دلیل واکنشهای متقاطع برای سنجش ایمنی ناشی از کیست هیداتیک در گوسفند، مناسب نیست. لذا پس از آزمایش آنتی ژنهای بدست آمده از کیست هیداتیک و با درنظر گرفتن این یافته، که از آنتی ژن نیمه خالص مایع کیست هیداتیک گاوی با اطمینان بیشتری در تست‌های سرولوژیکی گوسفند استفاده نمود(۲۱)، آنتی ژن خام پروتواسکولکس (prot ELISA) مربوط به مایع کیست هیداتیک گاوی مناسب تشخیص داده شد و با تغییراتی که در روشهای منتشر شده قبلی ایجاد گردید (۳۵)جهت تهیه آنتی ژن استفاده شد. نتایج حاصل از الایزا با استفاده از مواد تهیه شده درآزمایشگاه ومقایسه آنها با نتایج بدست آمده از مشاهده ماکروسکوپی لاشه گوسفندان پس از ذبح نشان می دهد، این روش با حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی ۷۹ درصد و کارایی ۸۴ درصد می تواند بعنوان یک تست غربالی سریع و آسان در اندازه گیری سطح ایمنی در گوسفندان آلوده به کیست هیداتیک بکاررود.

با انجام آزمون الایزا مشخص شد که جذب نوری سرمی گروههای مورد مطالعه قبل از تزریق آنتی ژن زیر مرز شروع عفونت (۵۷درصد نانومتر) (جدول ۲) و نزدیک به هم بودند. یک هفته بعد از تزریق آنتی ژن میزان جذب نوری در همه گروههای واکسینه افزایش یافته است و مقدار افزایش نسبت به قبل از واکسیناسیون معنی دار است($p<0/05$)، ولی در گروههای کنترل میزان آنتی بادی پائینتر از مرزشروع عفونت بوده و اختلاف آن در نوبتهای مختلف خونگیری، معنی‌دار نیست. افزایش بسیار جزیی جذب نوری در گروههای کنترل شاید به علت اثر غیر اختصاصی تزریق ادجوانت در افزایش پاسخ ایمنی باشد. در بین گروههای واکسینه بیشترین افزایش مربوط به مخلوط آنتی ژنهای انکوسفر و پروتواسکولکس است و کمترین، مربوط به پروتواسکولکس تنها است. میانگین جذب نوری سرمی گروهها یک هفته بعد از تقابل تا حدی کاهش پیدا کرده است و دو ماه بعد از مقابله همچنان بالا است. در این مرحله نیز پایدارترین جذب نوری مربوط به استفاده توام از انکوسفر و پروتواسکولکس و کمترین پایداری مربوط به پروتواسگولکس تنها می باشد(جدول ۳). قابل ذکر است که مقدار آنتی ژنها تاثیر معنی‌داری در میزان ایمنی ندارد.

نتایج بازرسی بعد از کشتار نیز نشان می دهد که گروههای واکسینه معمولا فاقد کیست و یا دارای تعداد کمی کیست کلسیفیه هستند. از این نظر نیز در گروههای واکسینه با مخلوط انکوسفر و پروتواسکولکس حداقل آلودگی مشاهده شد(جدول ۴) و در گروههای واکسینه با انکوسفر آلودگی کمتری نسبت به گروههای واکسینه با پروتواسکولکس دیده شد، در حالی که در گروههای کنترل کیست ها زیاد، بزرگ و بارو بودند. به این ترتیب نتایج بازرسی بعد از کشتار، نتایج بررسی های ایمونولوژی را تائید کرد که این نکته یکی از یافته های مهم در این مطالعه بود. آنالیزهای آماری (تست Cocran با سطح اطمینان ۹۵ درصد) نیز نشان می دهد که تفاوت بین نتایج در گروههای واکسینه و کنترل معنی‌دار است($p<0/05$). به طوری‌که تزریق مخلوط انکوسفر و پروتواسکولکس به طور قابل توجهی از هر کدام به تنهایی مؤثرتر بود($p<0/05$) و می تواند از عفونت با کیست هیداتیک با سطح اطمینان ۹۵درصد جلوگیری کند.

اگرچه گزارش‌های قبلی بیشتر بر پایه استفاده از پادگن های انکوسفر بوده است ولی درمطالعاتی که از سایر پادگن های چرخه زندگی انگل مانند پروتواسکولکس ومایع کیست هیداتیک استفاده گردبد نیز درجات نسبتا مناسبی از ایمنی زایی گزارش گردید(۱۱،۱۳،۱۴). اگرچه میزان ایمنی زایی پادگن پروتواسکولکس کم می‌باشد ولی مناسب‌ترین ایمنی‌زایی در این مطالعه با استفاده توام از دو آنتی ژن بدست آمده است. لازم به ذکر است به دلیل وجود سویه‌های مختلف این انگل در کشورهای مختلف و اختلافات آنتی‌ژنتیکی سویه‌ها، آنتی‌ژن مورد نیاز برای تولید واکسن در یک کشور، باید از سویه‌های بومی همان کشور تهیه شود زیرا واکسن تهیه شده بر ضد یک

سویه ممکن است بر سویه دیگر اثر نداشته باشد (۲۲). لازم به ذکر است که در ایران دو سویه سگ-گوسفند و سگ- شتر وجود دارد و سویه سگ-گوسفند سویه غالب در کشور است (۱۹،۳۵). بنابراین یافته‌های این مطالعه و همچنین تحقیقات هاشمی تبار و همکاران و نوید پور و همکاران در زمینه ایمنی زایی آنتی ژنهای اکینوکوکوس گرانولوزوس سویه بومی ایران گامی برای ساخت واکسن کیست هیداتیک می باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با استفاده از اعتبارات موسسه تحقیقات سرم واکسن رازی انجام شد. نگارندگان: از همکاری اقایان دکتر ظریف فرد، دکتر پایکاری، دکتر عالمیان و خانم‌ها دکتر موسوی و اسدی و کلیه کارکنان بخش‌های انگل شناسی، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی موسسه رازی و گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تقدیر و تشکر به عمل می آورند.

Today Vo 16 No5 . 191-196.

25. Lightowlers, M.W., Colebrook, A.L., Gauci, C.G., Gauci, S.M., Kyngdon, C.T., Monkhouse, J.L., Valle, J.O., Rodrique, Z.C., Read, A.J., Rolf, R. and Sato, A., July,C. (2003) Vaccination against cestode parasites anti helminth vaccines that work and why. Verterinary Parasitology. 115: 83-123.
26. Lightowlers, M.W., Gauci, C.G., Chow, C., Drew, D.R., Guaci, S.M., Heath, D.D., Jachson, D.C., Dadly - Moore, D.L., Read, A.J. (2003) Molecular and genetic characterization of the host- Protective onchosphere antigens of taeniid cestode Parasites . International J. Parasitol. 33: 1207-1217.
27. Lightowlers, M.W., Heath, D.D(2004) Immunity and Vaccine control of Echinococcus granulosus infection in animal intermediate host. Parasitologia 46(1-2) 27-31.
28. Lightowlers, M.W.(2006) Vaccines againts Cysticercosis and hydatidosis: Foundations in taeniid Cestode immunology. Parasitology International. 55: 539-543.
29. Lowry,O.H.(1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biological. Chemistry. 193:256.
30. Manderson, D., Dempster, R., Chisti, Y.(2006) A recombinant Vaccine against hydatidosis Production of the antigen in Echerichia coll. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 33: 173-182.
31. Negeruh, F.M., Gathuma, J.M.(1987) Sero diagnosis of hydatidosis in livestock by the indirect heamaglutination test and ELISA. Bulletin, R. Animal Health and production in Africa. 24: 124-129
32. Osborn, P.J., Heath, D.D (1982) Immunisation of lambs against Echinococcus granulosus using antigens obtained by incubation Onchospheres in vitro. Research in Veterinary Science. 33 . 132-133.
33. Sigh,B.H.(1997)Immunusation of buffalo calves against E.granulosus using excretory and secretory antigens of onchospheres. J. Vet. Parasitol. 11:2:189-191.
34. Zhang, L.(1996) Purification and N- terminal amino acid sequencing of Echinococcus granulosus antigen B. Parasite Immunology. 18:597-606.
35. Zhang, L., Eslami, A., Hosseini, S.H., Mcmanus D.P.(1998) Indication of the presence of two distinct strains of Echinococcus granulosus in Iran by mitochondrial DNA markers. American J. Tropical Med. Hygine. 171-174.

References

۱.اسلامی، ع.(۱۳۷۶): کرم شناسی دامپزشکی. جلد دوم، سستودها، انتشارات دانشگاه تهران

۲. اسلامی، ع.، حسینی، س.ح. (۱۳۷۵): گزارش درباره آلودگی کرمی لوله گوارش سگهای گله در ایران. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۳۲. ۸۵-۸۳

۳. حسینی، س. ح. (۱۳۷۶): تعیین رابطه بین شیوع کیست هیداتیک در گوسفند، بز، گاو با سن و میزان باروری و زنده بودن پروتواسکولکس های آن. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۵۲ شماره ۲. ۱۰۵-۹۹

۴.حسینی، س.ح.، بکائی س.، متوسل الحسینی، م.ر.(۱۳۷۷): کیست هیداتیک در شتر و نقش آن در اپیدمیولوژی آکینوکوکوس گرانولوزوس مجله دانشکده پزشکی. دوره ۵۳، شماره ۴ و ۳. ۸۶-۸۳

۵. میرزایانس، آراکسیا(۱۳۵۳): بررسی آلودگی گوسفند و گاو به کیست هیداتیک و سایر نوزاد سستودها در کشتارگاه تهران. نامه دانشکده دامپزشکی ۴، ۶-۱

۶. نورجاه، ن.(۱۳۶۷): هیداتیدوزیس - آکانیوکوکوزیس و تعیین زیانهای اقتصادی مربوط به آن. پایان نامه برای دریافت دکتری در رشته انگل شناسی. از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳۷۰

۷. نویدپور، ش.، حقوقی راد، ن.، پایکاری ،ح. (۱۳۸۲): بررسی مقدماتی پیرامون ایمن سازی گوساله گاومیش با استفاده از پادگن های تخم وانکوسفر اکینوکوکوس گرانولوزوس. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۸، شماره ۲. ۱۹۱-۱۸۷.

8. Conan Chow, Charles G.Gauci, Alan F., Cow Man and Marsha, W., Lightowlers, March -April (2004) Echinococcus granulosus: Oncospher specific transcription of genes encoding a host - protective antigen. Experimental Parasitology. 106: 183-186.

9. Dalimi, A ., Motamedi, Q. H., Hosseini, M., Mohammadian, B.(2002) Echinococcosis / hydatidosis in western Iran. Veterinary Parasitology. 105: 161- 171

10. Dempster, R.P., Berridge, M.V., Harison, G.B.L., Heath, D. D.(1991)Echinococcus granulosus: Development of an intermediate host model for use in vaccination studies, International J. Parasitol., Vol.21,No.5,549-554.

11. Dempster, R. P., Harison, R. pG B L., Berridge,M. V., Heath, D.D.(1992) Echinococcus granulosus use of an intermediate host mouse model to evaluate sources of protective antigens and a role for antibody in the immune response:International J. Parasitol. Vol22No 4. pp.435-441.

12. Eslami, A., Hosseini, H.(1998) Echinococcus granulosus infection of farm dogs in Iran. Parasitol. Res. 84: 205-207.

13. Gemmel, M.A. (1966) Immunological responses of the mammalian host against tape worm infection. Immunology. 11: 235

14. Hashemitabar, G.R., Razmi, G.R., Naghabi, A. Trials to induce protective immunity in mice and sheep by application of Protoscolex and hydatid fluid antigen or whole body antigen of Echinococcus granulosus. J. Vet. Med. , Infections Diseases and Veterinary Public. Health. 52: 243- 245.

15. Heath, D.D., Lawrence, S.B.(1981) Echinococcus granulosus cysts: Early development in-vitro in the presence of serum from infected sheep. International J. Parasitol. 4:261-266.

16. Heath, D.D, Jensen, O., Lightowlers, M.W.(2003) Progress in control of hydatidosis using vaccina vaccine and recommendations for practical use in control programmes. Acta Tropica . 85: 133-143.

17. Heath, D.D., Yang, W., Lit, Xia, Y., Chew, X., Huang Y., Yang, Y., Wang, Q. and Qui, J.(2006) Control of hydatidosis . Parasitology International. 55. 247-252.

18. Hoghoughi, N.(1971) A study of prevalence of Echinococcus granulosus in dogs and hydatid cyst in sheep, goats, cattle, and man in Isfahan. Pahlavi Med. J. J2: 670-676.

19. Hosseini, S. H., Eslami, A.(1998) Morphological and development characteristics of Echinococcus granulosus drived from sheep, cattle Camels in Iran. J. Helminthol. 72:337-341.

20. Johnstone, A.(1993) Immunochemistry in practice, 2nd Ed., Blackwell scientific publications. 102-117.

21. Leggatt, G.R.(1996) Identification and diagnostic value of major antibody epitope on the 12 KD a antigen from Echinococcus granulosus cyst fluid. Parasite Immunol. 16:87-96.

22. Lightowlers, M.W.(1996) Vaccination against cestode parasities. International J. Parasitol. 8: 819-825.

23. Lightowlers, M.W.(1999) Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. International J. Parasitol. 4: 531-534.

24. Lightowlers, M.W., Flisser, A., Gauci, C.G., Heath, D.D., Jensen, O., Rolf, R.(2000) Vaccination against Cysticercosis and Hydatid diseases . Parasitology

J.Vet.Res. 62,3:183-189,2007

STUDY OF DIFFERENT IMMUNOGENIC ANTIGENS OF *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS* ON IMMUNIZATION AGAINST HYDATID CYST IN SHEEP

Soleimani, S.[1], Hosseini, S.H.[2*], Akhavizadegan, M.A.[1], Motamedi, Gh.R.[1]

[1]*Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj- Iran*

[2]*Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*

(Received 3 September 2005 , Accepted 7 June 2006)

Abstract:

Immunogenicity of Echinococcus granulosus different antigens for determination of suitabhe antigen for production of hydatid cyst vaccine compared.Data analysis by one way Cocran and student-test was showed significant difference in optical density between the groups were injected with antigens and the control groups. The most optical density is in the groups were injected by mix of oncosphere and protoscolex and the lowest is in the groups were injected by protoscolex ($p<0.05$). Furthermore, in pathology study, there was not any cyst in injected groups, but in control groups high number and big fertile cysts were founded. The level of protection with antigens of protoscolexes, onchospheres and mix of them were, 50.2,72 and 82% respectively. Vacination by a mix of oncosphere and protoscolex was considerably more effective than each one individually and prevented the hnfection of hydatid cyst with confidence level of 95% ($p<0.05$). So these antigens can produce a suitable immune response and can use for production of vaccine against hydatid cyst.

Key words: *Echinococcus granulosus*, hydatid cyst, ELISA, antigen, protoscolex, oncospher.

***Corresponding author's email:hhoseini@rvsri.com,Tel: 021-61117073 , Fax:021-66933222**