DOI: 10.22092/VJ.2021.354863.1862
شماره ۱۳۵ تابستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی فعالیت کمپلمان و لیزوزیم و تعیین تیتر آنتی‌بادی در سرم میزبان‌های واسط آلوده به لینگواتولا سراتا با هماگلوتیناسیون غیرمستقیم

• علیرضا البرزی(نویسنده مسئول)
بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران •
ماندانا حسینی
بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• سمیه بهرامی
بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران •
مسعود قربانپور نجف‌آبادی
بخش ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• محمدرضا تابنده
بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۲۰-۰۳-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: ۱۶-۰۶-۱۴۰۰
Email: a.alborzi@scu.ac.ir

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین شیوع آلودگی در گوسفندان و بزها با روش مشاهده‌ی انگل در غدد لنفاوی مزانتر و سنجش تیتر آنتی‌بادی با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و همچنین بررسی فعالیت کمپلمان سرم به روش کلاسیک و لیزوزیم صورت گرفته است. تعداد ۷۹۱ نمونه‌ی خون و غدد لنفاوی مزانتر از گوسفندان (۴۵۶) و بزهای (۳۳۵) کشتار شده در کشتارگاه شهر اهواز (استان خوزستان) جمع‌آوری شد. نتایج حاصل نشان داد که ۷/۸ درصد از کل نشخوارکنندگان در تحقیق حاضر آلوده به لینگوآتولا سراتا بودند. میزان درصد آلودگی به تفکیک در گوسفندان ۵/۷ درصد و در بزها ۱۰/۷ درصد تخمین زده شد. در میزان فعالیت کمپلمان به روش کلاسیک و لیزوزیم بین گروه‌های آلوده و غیرآلوده در هر دو گروه حیوان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین با استفاده از روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم علاوه بر مشخص نمودن دقیق نمونه‌های آلوده از غیرآلوده میزان IgG و IgM علیه لینگواتولا سراتا در سرم حیوانات نیز تخمین زده شد. میزان IgG در نمونه‌های آلوده بالاتر از میزان IgM بود و میزان این آنتی‌بادی‌ها در نمونه‌های غیرآلوده به میزان قابل توجهی پایین بود. در مجموع مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که این انگل در بدن میزبان واسط احتمالاً توانایی فرار از برخی از اجزای مهم سیستم ایمنی ذاتی (نظیر سیستم کمپلمان و لیزوزیم) را دارد. با اینکه نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که آلودگی به انگل باعث افزایش سطح برخی آنتی‌بادی‌ها می‌شود اما بنظر نمی‌رسد این تغییرات شرایط را برای از بین بردن انگل فراهم کند.

کلمات کلیدی: کمپلمان، لیزوزیم، لینگواتولا سراتا، میزبان واسط، هماگلوتیناسیون

● Veterinary Researches & Biological Products No 135 pp: 49-56

Evaluation of complement and lysozyme activity and determination of antibody titers in the sera of *Linguatula serrata* -infected intermediate hosts by indirect hemagglutination

By: Alborzi, A.R., (Corresponding Author) Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Hosseini, M., Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Bahrami, S., Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Ghorbanpoor Najafabadi, M., Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Tabandeh, M.R., Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Received: 2021-06-10 **Accepted: 2021-09-07**

Email: a.alborzi@scu.ac.ir

This study was performed to determine the prevalence of *Linguatula serrata* in sheep and goats by observing the parasite in the mesenteric lymph nodes and measuring the antibody titer by indirect haemagglutination test and also evaluating the activity of serum complement activity by classical method and lysozyme. 791 samples of blood and mesenteric lymph nodes from sheep (456) and goats (335) were collected in the slaughterhouse of Ahvaz (Khuzestan province). The results showed that 7.8% of all ruminants in the present study were infected with *L. serrata*. There was no significant difference in the level of complement activity by classical method and lysozyme activity between infected and non-infected animals. Also, using an indirect haemagglutination test, in addition to accurately identifying infected samples from non-infected animals, the levels of IgG and IgM antibodies against *L. serrata* were estimated. IgG levels in infected samples were higher than IgM levels and the levels of these antibodies were significantly lower in non-infected samples. Overall, the present study suggests that this parasite in the intermediate host may escape from some important components of the innate immune system (such as the complement and lysozyme). Although the results of the present study showed that infection with the parasite increased the level of some antibodies, but these changes do not seem to provide the conditions for the eradication of the parasite.

Keyword: Complement, Haemagglutination, Intermediate host, *Linguatula serrata*, Lysozyme

مقدمه

لینگواتولا سراتا *(Linguatula serrata)* شبه بندپایی از راسته پنتاستومیدا و انگلی زئونوز با گسترش جهانی است. فرم بالغ این انگل در دستگاه تنفسی و به ویژه حفرات بینی میزبانان نهایی (سگ‌سانان) یافت می‌شود. تخم‌ها از طریق ترشحات بینی و یا مدفوع این حیوانات خارج شده و سپس توسط میزبانان واسط (طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی) همراه با آب و غذا بلعیده می‌شوند. لاروها در روده‌ی این حیوانات از تخم خارج شده و به غدد لنفاوی مزانتر، کبد، ریه و طحال مهاجرت کرده و به نوچه تبدیل می‌شوند (۲۷). از نظر اپیدمیولوژی انگل، گزارش‌هایی از شیوع آلودگی به نوچه لینگواتولا سراتا در نشخوارکنندگان کوچک ایران و جهان وجود دارد (۱۴،۱۷،۱۹،۲۵،۲۶،۲۹). انسان می‌تواند بطور تصادفی به مراحل تخم و نوچه‌ای انگل مبتلا شود. آلودگی انسان به این انگل به عنوان میزبان واسط و نهایی و البته نامناسب با اثرات پاتولوژیک و بروز نشانه‌های بالینی همراه است (۱۸).

به طور کلی آلودگی‌های انگلی پاسخ ایمنی میزبان را تحریک می‌کنند که این روند ممکن است شرایط برای کشتن و یا حذف عامل مهاجم را فراهم آورد (۲۰). سیستم کمپلمان میزبان به عنوان اولین خط دفاعی در برابر تهاجم انگل‌ها عمل می‌کند. این سیستم بخش عمده‌ای از ایمنی ذاتی است که توسط یک آبشار پروتئولیتیک قوی و کارآمد فعال می‌شود که در نهایت منجر به اپسونیزاسیون و لیز شدن بسیاری از پاتوژن‌های مهاجم می‌گردد. علاوه براین به ایمنی اکتسابی متصل شده و از طریق تولید مولکول‌های پیش‌التهابی، پاسخ التهابی ایجاد می‌کند. سه مسیر برای فعال‌سازی کمپلمان وجود دارد: مسیر کلاسیک، مسیر آلترناتیو و مسیر لکتین اگرچه نقطه شروع سه مسیر متفاوت است، اما آنها در مسیر نهایی همسو می‌شوند و نهایتاً منجر به لیز پاتوژن‌ها می‌گردند. مسیر کلاسیک و یا اصلی، توسط آنتی‌بادی‌های IgG و IgM فعال می‌شود (۱۳).

آنزیم لیزوزیم نیز یکی از اجزای ایمنی ذاتی است که دارای فعالیت ضدباکتریایی (۱۲) و ضدانگلی است (۲). این آنزیم لیتیک است و با مشارکت سیستم کمپلمان و فاگوسیت‌ها، می‌تواند اجرام انگلی را از بین ببرد (۱۱). اگرچه اثر آلودگی به انگل‌های مختلف بر سطح این آنزیم در برخی مهره‌داران آلوده (ماهی‌ها) با نتایج متفاوتی همراه بوده است (۲۸). با این‌حال مطالعات نشان داده است که در پستانداران

سطح لیزوزیم سرم به دنبال تحریک آنتی‌ژنیک سیستم ایمنی بدن، به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. بطوری‌که در خرگوش‌های آلوده به تریشنلا اسپیرالیس افزایش فعالیت لیزوزیم مشاهده شده است (۲۳). آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان اجزای ایمنی اکتسابی (هومورال)، توسط سیستم ایمنی بدن در پاسخ به آنتی‌ژن‌ها تولید می‌شوند (۱). با توجه به نقش ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی در پاسخ به عوامل بیماری‌زا به‌ویژه انگلی، و نیز نبود و یا در دسترس نبودن اطلاعات در مورد پاسخ ایمنی ذاتی علیه لینگواتولا سراتا، هدف از مطالعه‌ی اولیه‌ی حاضر، ارزیابی میزان فعالیت سیستم کمپلمان به روش کلاسیک، فعالیت لیزوزیم و سطح آنتی‌بادی به روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم IHA) در میزبانان واسط (گوسفندان و بزهای) آلوده به انگل لینگواتولا سراتا بوده‌است.

مواد و روش کار

از مهر تا اسفند ۱۳۹۷ با تعیین تعداد نمونه با سطح اطمینان ۹۵ درصد و حاشیه خطای ۵ درصد و تعدیل جمعیتی مورد نظر، ۷۹۱ نمونه از خون و گره‌لنفاوی مزانتر گوسفندان (۴۵۶) و بزهای (۳۳۵) کشتارگاه شهر اهواز، استان خوزستان به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. آلودگی حیوانات با روش مشاهده نوچه انگل در گره لنفاوی مزانتر با استفاده از استریومیکروسکوپ (Olympus، ژاپن) تأیید شد. سرانجام ۱۵ نمونه‌ی مثبت و ۱۰ نمونه منفی مطمئن از هر حیوان جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب شدند. نمونه‌هاي سرم با استفاده از لوله‌های مخصوص جداکننده‌ی سرم و سانتریفوژ خون تهیه شد. علاوه بر خون، نوچه‌های موجود در گره‌های لنفاوی جهت تهیه آنتی‌ژن پیکری لینگواتولا سراتا جدا شده و در بافر فسفات نمکی (PBS) قرار داده شد.

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان سرم

برای ارزیابی مسیر کلاسیک کمپلمان سرم، ابتدا از خرگوش خون‌گیری شد. خون گرفته شده با دور g ۳۵۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع‌رویی حذف گردید. رسوب حاصل سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو شد و از گلبول شسته شده با سرم فیزیولوژی سوسپانسیون ۱۰ درصد تهیه گردید. مقدار یک میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد خون خرگوش در سه نوبت به فاصله پنج روز به محوطه صفاقی دو سر موش صحرایی (رت) تزریق شد تا آنتی‌سرم ضد گلبول خرگوش تهیه شود. سه روز پس از آخرین تزریق، موش‌ها با اتر بیهوش شدند و نمونه خون به طور مستقیم از قلب موش‌ها گرفته شد.

جهت اندازه‌گیری کمپلمان به روش کلاسیک، ۷۵ میکرولیتر از نمونه سرم و ۷۵ میکرولیتر بافر باربیتال با pH: ۷/۲ در گوده‌های پلیت U مخلوط شد و رقت ۱:۲۰ از هر سرم در دو تکرار تهیه شد. سرانجام، ۷۵ میکرولیتر سوسپانسیون ۱ ٪ گلبول قرمز موش (حساس شده با گلبول قرمز خرگوش) شسته شده نیز به هر گوده اضافه شد. از رقت ۱:۲۰ یک نمونه سرم که کمپلمان آن غیرفعال شده بود (۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد) نیز در دو تکرار به عنوان شاهدهای منفی استفاده گردید. نمونه‌ها یک شب در دمای چهار درجه انکوبه شده و سپس جذب نوری مایع رویی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اختلاف میانگین جذب نوری نمونه‌ی سرم از میانگین جذب نوری شاهد منفی به عنوان ملاکی جهت ارزیابی فعالیت همولیتیکی مسیر کلاسیک کمپلمان در نظر گرفته شد (۱۱).

اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم سرم

این آزمایش بر توانایی لیزوزیم در لیز کردن باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس استوار است. در این روش ابتدا ۶۰ میلی لیتر بافر لیزوزیم به همراه یک گرم پودر آگار جوشانده شده و سپس زمانی‌که به دمای ۵۵ سانتی‌گراد رسید سوسپانسیون ۱۵ میلی‌گرم در ۱۵ میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس (سیگما) در بافر سدیم فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۶/۲) را اضافه کرده و در سه پلیت ریخته و اجازه داده تا سرد شود و ژل آگاروز بسته شود. سپس با استفاده از میله‌ای باریک و توخالی حفره با فواصل منظم ایجاد کرده و سپس ۱۵ میکرولیتر سرم نمونه به حفره‌ها ریخته شد. پس از ۳۰ دقیقه میزان لیز باکتری توسط لیزوزیم موجود در نمونه‌ها با ایجاد هاله‌ای شفاف با استفاده از خط کش مدرج سنجیده شد.

ارزیابی عیار پادتن ضدِ لینگواتولا سراتا با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم

تهیه آنتی‌ژن پیکری لینگواتولا سراتا

به منظور انجام آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم از آنتی‌ژن پیکری لینگواتولا سراتا استفاده شد. جهت تهیه آنتی‌ژن، ۵۰ عدد نوچه زنده *L. serrata* چندین بار در محلول PBS (pH: ۷,۴) با جنتامایسین (۴۰ میلی‌گرم در لیتر) شسته شد و سپس با یک سونیکاتور باندلین (باندلین، برلین، آلمان) در پنج میلی‌لیتر ۱۵ مرتبه به مدت ۲۰ ثانیه سونیکه شد. مخلوط هموژن شده در سانتریفیوژ با دور g ۷۰۰۰ به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و مایع رویی جدا شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، قرار گرفت.

روش انجام آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم

برای انجام این آزمایش، از آنتی‌ژن پیکری لینگواتولا سراتا استفاده شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر خون اخذ شده از گوسفند با تقریباً ۱۰ برابر PBS مخلوط شده و پس از آن سه مرتبه با دور g ۲۰۰۰ به مدت پنج دقیقه شستشو داده شد تا مایع رویی به خوبی شفاف شده و نهایتاً گلبول ۱ و ۴٪ تهیه شد.

پس از آن به منظور افزایش مقاومت و چسبندگی سطح گلبول، به گلبول‌ها اسید تانیک اضافه شد. بدین منظور ۲/۵ میلی‌گرم از اسید تانیک به ۵۰ میلی‌لیتر PBS اضافه شده و نهایتاً ۵۰ میلی‌لیتر از محلول اسید تانیک تهیه شده با ۵۰ میلی‌لیتر PBS ۴٪ مخلوط شد و پس از آن به مدت یکساعت در ۳۷ سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس دو مرتبه محلول را با دور g ۴۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ کرده و در نهایت در سه لوله فالکن ریخته شد و به دو لوله از سه لوله به میزان ۶۰۰ میکرولیتر آنتی‌ژن (با غلظت۱:۴۰) اضافه شد. جهت غیرفعال کردن پروتئازها، ۱۰۰ میکرولیتر محلول فنیل متان سولفونیل فلوراید (Phenylmethanesulfonyle fluorid: PMSF) به هر ۱۰ میلی‌لیتر خون اضافه شد. پس از یک شب سه بار محتویات لوله‌ها شستشو داده شد و سپس آلبومین سرم گاو ۱ ٪ در PBS به عنوان بلوکر به لوله‌ها اضافه شد.

در مرحله بعد، ابتدا از سرم در دو پلیت ۹۶ خانه با استفاده از PBS، رقت‌های متوالی از ۱:۲ تا ۱:۲۵۶ تهیه گردید. به عبارتی در هر گوده، ۵۰ میکرولیتر PBS و ۵۰ میکرولیتر سرم نمونه و ۵۰ میکرولیتر RBC یک درصد، با و بدون آنتی‌ژن برای اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی‌ها اضافه شد. سپس برای اندازه‌گیری IgG در میکروپلیت دیگری مشابه قبل عمل شد؛ با این تفاوت که برای رقیق‌سازی سرم به جای PBS از بافر ۲ME استفاده شد تا IgM را از بین برده و میزان IgG به دست آید (۸).

محتویات گوده‌ها با قرار دادن پلیت‌ها روی شیکر پلیت به مدت ۲ دقیقه با هم مخلوط شدند و بعد از آن، تمام پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه بی‌حرکت گذاشته شد. بعد از ۲ ساعت پلیت مورد بررسی قرار گرفت. چنانچه رسوب به صورت یک تکمه ● بود نتیجه منفی قرائت می‌شد و اگر رسوب به شکل ● و ○ و ○ بود و یا در صورتی که تمام گلبول‌ها پراکنده شده بودند و رسوبی ایجاد نشده بود و شکل ○ حاصل شده بود نتیجه مثبت قرائت می‌گردید. عکس رقت آخرین حفره‌ای که آگلوتیناسیون داشت، به عنوان عیار ثبت شد (۱۸). به اینصورت میزان آنتی‌بادی تام ضد لینگواتولا سراتا و IgG برای هر نمونه به دست آمد. اختلاف عیار آنتی‌بادی تام و IgG به عنوان عیار IgM منظور گردید.

نتایج

نتایج بررسی نشان داد که شیوع کلی آلودگی به انگل لینگواتولا سراتا در نشخوارکنندگان کوچک اهواز ۷/۸ درصد و به ترتیب در بز و گوسفند ۱۰/۷ درصد و ۵/۷ درصد می‌باشد.

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، فعالیت کمپلمان به روش کلاسیک در گروه گوسفندان و بزهای آلوده اگرچه پایین‌تر بود اما این میزان تفاوت معنی‌دار نبود (P<۰/۰۵). در میزان فعالیت لیزوزیم نیز تفاوت معنی‌داری در گوسفندان و بزهای مورد مطالعه در گروه‌های آلوده و غیرآلوده مشاهده نشد (P<۰/۰۵).

با استفاده از روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم علاوه بر مشخص نمودن دقیق نمونه‌های آلوده از غیرآلوده میزان IgG و IgM علیه لینگواتولا سراتا در سرم حیوانات نیز تخمین زده شد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، در اندازه‌گیری آنتی‌بادی با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم میزان IgG در نمونه‌های آلوده بالاتر از میزان IgM بود و میزان آنتی‌بادی در نمونه‌های غیرآلوده به میزان قابل توجهی پایین بود.

بحث و نتیجه‌گیری

انگل لینگواتولا سراتا، شبه‌بندپایی با گسترش جهانی در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است. در سال ۱۹۵۰ میلادی بیماری لینگواتولوزیس توسط سازمان بهداشت جهانی در فهرست عوامل بیماری‌زای مشترک انسان و دام قرار گرفت (۹).

در مورد شیوع آلودگی نشخوارکنندگان کوچک به نوچه انگل در برخی نقاط ایران و جهان مطالعاتی انجام شده است که با نتایج متفاوتی همراه بوده است. در مطالعه حاضر شیوع آلودگی به نوچه لینگواتولا سراتا در بز و گوسفند اهواز به ترتیب ۱۰/۷ درصد و ۵/۷ درصد بدست آمد. این نتایج نشان داد که میزان آلودگی در بزها بیشتر از گوسفندان است، بنظر می‌رسد دلایل این تفاوت در بزها بیش از آنکه به تفاوت‌های فیزیولوژیکی و ایمنی آنها ارتباط داشته باشد به کشتار شدن بزها در سنین بالاتر در کشتارگاه ها نسبت به گوسفندان مرتبط است. قابل توجه است که در برخی مطالعات به ارتباط معنی‌دار آماری بین افزایش سن و افزایش آلودگی اشاره شده است.

میرزایی و همکاران در سال ۲۰۱۱، با بررسی گره‌های لنفاوی مزانتریک ۴۲۰ رأس گوسفند کشتار شده در تبریز (آذربایجان شرقی) شیوع آلودگی به نوچه لینگواتولا سراتا را ۳۷/۵۷ درصد و رابطه معنی‌داری بین میزان آلودگی و بالا رفتن سن حیوانات را گزارش کردند (۱۹). در صورتی‌که رضایی و همکاران (۲۰۱۲)، شیوع آلودگی به نوچه لینگواتولا سراتا در گره‌های لنفاوی ۷۴۰ بز از تبریز (آذربایجان شرقی) را ۴۵/۱۳ درصد و ارتباط آن با سن حیوانات را معنی‌دار گزارش نموده‌اند (۲۶). خیرآبادی و همکاران در ۲۰۱۵، با بررسی گره‌های لنفاوی مزانتر ۵۰۶ گوسفند از استان اصفهان، شیوع آلودگی به نوچه انگل را ۱۱/۶۶ درصد گزارش کردند (۱۷). تباری‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۷، با بررسی گره‌های لنفاوی ۶۲۴۹ بز، گوسفند و گاو از استان مازندران، شیوع آلودگی به نوچه لینگواتولا سراتا را به ترتیب ۱۶/۸، ۶/۸ و ۶/۹ درصد گزارش کردند (۲۹). راویندران و همکاران در سال ۲۰۰۸، با بررسی غدد لنفاوی مزانتر ۱۰۰ بز و گاو و گاومیش از استان کرالا در جنوب هند، شیوع آلودگی به نوچه انگل را به ترتیب ۲۱، ۱۹ و ۸ درصد گزارش کردند (۲۵). گول و همکاران در سال ۲۰۰۹، با بررسی غدد لنفاوی ۳۴۷ گوسفند از استان وان ترکیه، شیوع آلودگی به نوچه لینگواتولا سراتا را ۵/۱۹ درصد گزارش کردند (۱۴).

جدول ۱- مقایسه اثر آلودگی لینگواتولا سراتا بر فعالیت کمپلمان و لیزوزیم در سرم حیوانات آلوده و غیرآلوده.

پارامتر	گونه حیوان	آلوده	غیرآلوده
کمپلمان{کلاسیک} (OD)	گوسفند	۰/۰۹۰ ± ۰/۰۲۴ a	۰/۰۹۴ ± ۰/۰۰۸ a
	بز	۰/۰۸۳ ± ۰/۰۱۷ a	۰/۰۹۶ ± ۰/۰۲۴ a
لیزوزیم (IU/ml)	گوسفند	۰/۸۶ ± ۰/۰۵۲ a	۰/۹۳ ± ۰/۰۵۷ a
	بز	۰/۹۴ ± ۰/۰۹۶ a	۰/۹۰ ± ۰/۱۰۰ a

جدول ۲- نتایج عیار IgG و IgM ضدِ لینگواتولا سراتا در سرم گوسفندان آلوده و غیرآلوده به لینگواتولا سراتا به روش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA) (۱-۱۵ نمونه‌های آلوده، ۱۶-۳۵، نمونه‌های غیرآلوده).

تیتر آنتی بادی / شماره نمونه	گوسفند			بز		
	آنتی‌بادی تام	IgG	IgM	آنتی‌بادی تام	IgG	IgM
۱	۸	۸	-	۸	۸	-
۲	۱۶	۱۲	۴	۱۶	۸	۸
۳	۱۶	۴	۱۲	۱۶	۸	۸
۴	۱۶	۸	۸	۱۶	۱۲	۴
۵	۱۶	۱۶	-	۱۶	۱۶	-
۶	۱۶	۱۶	-	۱۶	۸	۸
۷	۱۶	۱۶	-	۱۶	۱۶	-
۸	۳۲	۱۶	۱۶	۳۲	۱۶	۱۶
۹	۳۲	۱۶	۱۶	۳۲	۳۲	-
۱۰	۳۲	۳۲	-	۶۴	۶۰	۴
۱۱	۳۲	۳۲	-	۶۴	۶۲	۲
۱۲	۶۴	۶۴	-	۶۴	۶۴	-
۱۳	۶۴	۶۲	۲	۶۴	۶۲	۲
۱۴	۶۴	۶۴	-	۶۴	۶۴	-
۱۵	۲۵۶	۲۵۶	-	۱۲۸	۱۲۸	-
۱۶	۲	-	۲	۲	-	۲
۱۷	۴	۴	-	۴	۴	-
۱۸	-	-	-	۲	۲	-
۱۹	۲	-	۲	-	-	-
۲۰	۲	۲	-	۴	۴	-
۲۱	-	-	-	۲	۲	-
۲۲	۴	۲	۲	-	-	-
۲۳	۲	-	۲	۲	۲	-
۲۴	۴	۲	۲	۴	۴	-
۲۵	۲	-	۲	۲	۲	-

مطالعات فوق نشان می‌دهد که شیوع آلودگی در حیوانات و مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت می‌باشد و همچنین بالاتر بودن شیوع آلودگی در بزها در مقایسه با گوسفندان با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.
بطور کلی، با توجه به وجود آلودگی در نشخوارکنندگان به عنوان میزبان واسط که نمایانگر آلوده بودن سگ‌های منطقه است بنابراین اقدامات کنترل و پیشگیری به خصوص در اجتناب از خوراندن گره‌های لنفاوی به صورت خام به سگ‌ها می‌توان سیرتکاملی انگل را قطع و به میزان قابل توجهی از آلودگی میزبانان نهایی(سگ‌ها) جلوگیری کرد.
در مطالعه حاضر، اندازه‌گیری میزان فعالیت سیستم کمپلمان به روش کلاسیک در دو گروه آلوده و غیرآلوده در هر دو حیوان تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. به نظر می‌رسد بسیاری از عوامل بیماری‌زا از استراتژی‌های مشابهی برای جلوگیری از حمله‌ی سیستم کمپلمان استفاده می‌کنند (۱۳). در بسیاری موارد انگل‌های چند سلولی قادرند مولکول‌های زیادی را تولید کنند که یا از انگل ترشح می‌شوند یا در سطح بدن بیان می‌گردند و سپس با سیستم ایمنی میزبان به عنوان یک استراتژی فرار برای زنده ماندن در میزبان تعامل دارند (۲۴). در بسیاری آلودگی‌های انگلی نظیر تریشنلا اسپیرالیس، شیستوزوما مانسونی، تنیا تنیه فورمیس، نکاتورآمریکانوس، بروگیا مالایی، سارکوپتس اسکبئی انگل با تولید و ترشح مولکول‌هایی باعث مهار فعالیت اجزاء سیستم کمپلمان به ویژه C1q در مسیر کلاسیک شده و به این ترتیب از سیستم ایمنی میزبان فرار می‌کنند و مانع فعال‌سازی کمپلمان می‌شوند (۴،۷،۳۱). به‌نظر می‌رسد این انگل نیز با ترشح مولکول‌هایی با فرار از سیستم کمپلمان و عدم فعال‌سازی این سیستم علیه خود، توانایی زنده ماندن طولانی در بدن حیوان آلوده را داشته باشد.
فعالیت لیزوزیم شاخص مهم ایمنی غیراختصاصی در مهره‌داران و بی‌مهره‌گان است و همان‌طور که گفته شد دارای فعالیت ضدباکتریایی و ضدانگلی است. لیزوزیم در تمام ترشحات و بافت‌های بدن بجز مایع مغزی نخاعی وجود دارد و قادر است میکروارگانیسم‌ها را از طریق هیدرولیز پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی از بین ببرد (۱۱). در این مطالعه، تفاوت معنی‌داری در فعالیت لیزوزیم در گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت. در برخی مطالعات صورت گرفته نیز نظیر آلودگی با استرونگل‌های کوچک (۲۱) و فاسیولا هپاتیکا (۱۰) ارتباطی بین میزان فعالیت لیزوزیم و آلودگی‌های انگلی یافت نشد. این یافته‌ها می‌تواند نشان دهنده‌ی تعادل دینامیکی بین میزبان و انگل در گروه‌های آلوده باشد و به این ترتیب آلودگی انگلی اثری بر میزان فعالیت لیزوزیم نداشته‌است. بدین ترتیب بنظر می‌رسد که برخی آلودگی‌های انگلی قادر به فعال‌کردن موثر این آنزیم نبوده و بدین طریق از سیستم ایمنی میزبان می‌گریزد.
در این مطالعه جهت مشخص نمودن تیتر آنتی‌بادی‌های موجود در سرم حیوانات آلوده و همچنین به منظور تشخیص دقیق آلودگی علاوه بر مشاهده انگل در غدد لنفاوی از روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم استفاده شد. این روش در تشخیص آلودگی‌های انگلی بسیاری نظیر فاسیولا هپاتیکا، کیست هیداتیک، اونکوسرکیازیس مورد استفاده قرار گرفته و از حساسیت و ویژگی قابل قبولی برخوردار می‌باشد (۲۲، ۱۶، ۶). همچنین با توجه به مطالعات قبلی صورت گرفته این روش با استفاده از آنتی‌ژن پیکری لینگواتولا سراتا روشی مناسب از جهت پایش آلودگی به این انگل است. این روش سرولوژیک، به دلیل سریع، ارزان و ساده بودن و حساسیت و ویژگی بالا و بخصوص عدم نیاز به کنژوگه در شناسایی آلودگی به عوامل انگلی به ویژه لینگواتولا سراتا کارآمد می‌باشد. خصوصا به دلیل اینکه این آلودگی در میزبان‌های واسط معمولا فاقد نشانه‌های درمانگاهی است این روش می‌تواند در تشخیص میزبان‌های واسط کمک کننده باشد (۳۰). در آزمایش صورت گرفته میزان IgG به میزان قابل توجهی در هر دو دسته حیوانات آلوده بالا بود. مروری بر مطالعات گذشته نشانگر این است که در نژادهای مختلف نشخوارکنندگان آنتی‌بادی‌ها و به خصوص IgG به دنبال عفونت انگلی مزمن افزایش می‌یابد و با افزایش مقاومت در برابر برخی از عفونت‌ها همراه است (۳، ۵). در مواردی کمی نیز میزان تیتر IgM بالا بود و با توجه به اینکه این آنتی‌بادی، اولین آنتی‌بادی تولید شده در مواجهه با عفونت است به نظر میرسد دام در ابتدای بیماری است چرا که میزان IgG نیز هنوز افزایش چندانی نیافته است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده این فرضیه مطرح هست که با وجود فعال‌سازی سیستم ایمنی و افزایش میزان تیتر آنتی‌بادی‌ها در برابر لینگواتولا سراتا، این انگل قادر است از سیستم ایمنی فرار کند و با توجه به اینکه علائم کلینیکی در میزبان واسط ایجاد نمی‌کند مدت زمان طولانی در بدن این میزبانان زنده مانده و به راحتی قادر است به میزبانان نهایی و به ویژه انسان‌ها انتقال یابد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌ی این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان نامه‌ی Ph. D انگل‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند اعلام می‌دارند.

منابع مورد استفاده

1. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, P. Walter, M. Raff and K. Roberts. 2002. "Chapter 24: The Adaptive Immune System" . Molecular Biology of the Cell (4th ed.). Garland Science. New York.
2. Alishahi, M. and K. Buchmann. 2006. Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 269-273.
3. Antonio, R., J. Manuel Molina, J. Gonzaleza, F. J. Martinez-morenob, P. N. Gutierrezb and A. Martinez-morenob. 2003. Humoral response (IgG) of goats experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases of adult fluke. *Veterinary Research* 34: 435–443.
4. Bergstrom, F. C., S. Reynolds, M. Johnstone, R. N. Pike, A. M. Buckle, D. J. Kemp, K. Fischer and A. M. Blom. 2009. Scabies

mite inactivated serine protease paralogs inhibit the human complement system. *Journal of immunology research.* 182: 7809–7817.

5. Bisset, S. A., A. Vlassoff, P. G. C. Douch, W. E. Jonas, C. J. West and R. S. Green. 1996. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Veterinary Parasitology.* 61: 249–263.

6. Cornelissen, J.B., W. A. Leeuw and P. J. Vander heijden. 1992. Comparison of an indirect haemagglutination assay and an elisa for diagnosing *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected sheep. *Veterinary quarterly.* 14(4): 152-156.

7. Deng, J., D. Gold, P. T. LoVerde and Z. Fishelson. 2007. Mapping of the complement C9 binding domain in paramyosin of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *The International Journal for Parasitology.* 37: 67–75.

8. Desmonts, G. and J. S. Remington. 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology* 11(6):562-8.

9. Drabick, J. J. 1987. Pentastomiasis. Reviews of infectious diseases 9:1087-1094.

10. Duffus, W.P., K. Thorne and R. Oliver. 1980. Killing of juvenile *Fasciola hepatica* by purified bovine eosinophil proteins. *Clinical and Experimental Immunology* 40:336–44.

11. Ellis, A. E. 1990. Lysozyme Assays. PP: 101-103. In: J.S. Stolen., T.C. Fletcher, D.P. Anderso, B. S. Roberson and W. B. Van Muiswinkel. Eds. Techniques in Fish Immunology, SOS Publications, Fair Haven.

12. Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 827-839.

13. Gadjeva, M. G., M. M. Rouseva, A. S. Zlatarova, K. B. Reid, U. Kishore and M. S. Kojouharova. 2008. Interaction of human C1q with IgG and IgM: revisited. *Biochemistry* 47:13093–13102.

14. Gül A., S. Değer and V Denizhan. 2009. The prevalence of *Linguatula serrata* (Fröhlich, 1789) nymphs in sheep in the Van province. *Turkiye parazitolojii dergisi* 33(1):25-7.

15. Hay, F. C., O. M. R. Westwood and P. N. Nelson. 2002. Practical Immunology4th edn. Blackwell Publishers.

16. Ikeda, T., I. Tada and Y. Aoki. 1978. The Indirect Hemagglutination Test for Onchocerciasis Performed with Blood Collected on Filter Paper. *The Journal of Parasitology* 64(5):786-789.

17. Kheirabadi, K.P., AA. Fallah, H. Azizi, AD. Samani and SD. Dehkordi. 2015. Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in sheeps in Isfahan province, southwest of Iran. *Journal of Parasitic Diseases* 39(3):518-21

18. Koehsler, M., J. Walocchnik, M. Georgopoulos, C. H. Pruente, W. Boeckeler, H. Auer and A. Barisani-Asenbauer. 2011. *Linguatula serrata* tongue worm in human eye, *Emerging Infectious Disease* 17(5): 870-872.

19. Mirzaei, M., H. Asgarinezad, and H. Rezaeisaghinsara.2011. A survey of *Linguatula serrata* infection in sheep in Tabriz abattoir, East Azarbaijan Province. *Journal of Veterinary Laboratory Research* 3(1): 69-75.

20. Motran, C. C., L. F. Ambrosio, X. Volpini, D. P. Celias and L. Cervi. 2017. Dendritic cells and parasites: from recognition and activation to immune response instruction. *Seminars in Immunopathology* 39: 199–213.

21. Norynska, M. R., R. Sokol and A. K. Siwick. 2014. Selected blood immunological and biochemical parameters in horses infected with Cyathostominae before and afer ivermectin treatment. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 38: 394-397.

22. Nur Eris, F., C. Akisu and Aksoy. U. 2009. Evaluation of Two ELISA and Two Indirect Hemagglutination Tests for Serodiagnosis of Pulmonary Hydatid Disease. *The Korean Journal of Parasitology* 47(4): 427-429.

23. Prokopowicz, D. and M. Trippner. 1983. Some indices of organ reactivity in experimental trichinellosis. II. Lysozyme activity in trichinellosis in rabbits. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Serie A 255(4):560-5.

24. Prowse, R. K., P. Chaplin, H. C. Robinson and T.W. Spithill. 2002. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunology* 2:57–66.

25. Ravindran, R., B. Lakshmanan, C. Ravishankar and H. Subramanian.2008. Prevalence of *Linguatula serrata* in domestic ruminants in South India. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*.39(5):808-12.

26. Rezaei, H., J. Ashrafihelan, A. Nematollahi, and E. Mostafavi. 2012.The prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in goats slaughtered in Tabriz, Iran. *Journal of Parasitic Diseases* 36(2): 200-202.

27. Shamsi, S. h., k. McSpadden and S. Baker. 2017. Occurrence of tongue worm, *Linguatula serrata* (Pentastomida: Linguatulidae) in wild canids and livestock in south-eastern Australia. International *Journal for Parasitology-Parasites and Wildlife* 6(3):271-277.

28. Skouras, A., V. Schmidt, W. Körting and D. Steinhagen. 2003. Note: the effect of parasite infection on the innate immune response of European flounder (Platichthys flesus L.) in the southern North Sea. *Helgoland marine research.* 57(3-4), 176-180.

29. Tabaripour, R., M. Fakhar, A. Alizadeh, MR. Youssefi, R. Tabaripour, SH. Teshnizi and M. Sharif. 2017. Prevalence and histopathological characteristics of *Linguatula serrata* infection among slaughtered ruminants in Mazandaran Province, northern Iran. *Comparative Clinical Pathology* 26(6):1259-65.

30. Yousefnezhad, K. 2017. Evaluation of indirect haemagglutination test for serological detection of *Linguatula serrata* infection in goat using the parasite nymphal excretory-secretory and somatic antigens. MSc thesis. Shahid Chamran University. Ahvaz, Iran.

31. Zhao, L., S. Shao, Y. Chen, X. Sun, R. Sun, J. Huang, B. Zhan and X. Zhu. 2017. *Trichinella spiralis* calreticulin binds human complement C1q as an immune evasion strategy. *Frontiers in Immunology*. 8:636.