

شناسایی پروتئین آنتی ژنی 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 دام هاست که توسط ترما تودی بنام دیکروسلیوم دندریتیکم ایجاد می شود. تحقیق حاضر با هدف شناسایی آنتی ژن تشخیصی در آلودگی طبیعی گوسفند به دیکروسلیوم دندریتیکم انجام گرفت. برای تهیه دو نوع آنتی ژن بدنی و متابولیک، از کرم های بالغ که از مجاری صفراوی کبدهای آلوده جمع آوری شده بود استفاده شد. عصاره خام ترما تود بالغ متعاقب هموزنیزاسیون و سانتریفوژ بعنوان آنتی ژن بدنی تهیه شد. آنتی ژن دفعی ترشحاتی هم با انکو باسیون کرم بالغ در شرایط آزمایشگاهی تهیه گردید. نمونه ها ابتدا با روش سدیم دودسیل سولفات پلی اکریلامید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) تحت الکتروفورز و شناسایی پروتئین ها قرار گرفت و سپس آنتی ژن (های) اختصاصی توسط روش وسترن بلاتینگ تعیین هویت شد. بدین منظور آنتی ژن های تهیه شده به کاغذ نیتروسلولز انتقال یافت و سپس با استقرار غشا در بافر مسدود کننده، آنتی بادی اولیه و آنتی بادی کونژوگه در فواصل زمانی مشخص، پروتئین اختصاصی تحت شناسایی قرار گرفت. برای بررسی وجود واکنش متقاطع، آنتی ژن های فاسیولا از هر دو نوع بدنی و دفعی ترشحاتی، همچنین آنتی ژن کیست هیداتیک و سیستی سرکوس تیبوکولیس هم آزمایش شد. در ایمونو بلاتینگ آنتی ژن های بدنی و دفعی ترشحاتی کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیکم یک باند با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون بطور مشترک در هر دو آنتی ژن و در آنتی ژن دفعی ترشحاتی 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 یافته های بررسی حاضر، باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون بعنوان آنتی ژن اختصاصی برای تشخیص دیکروسلیازیس در گوسفند معرفی می شود.

واژه های کلیدی: دیکروسلیوم دندریتیکم، آنتی ژن اختصاصی، گوسفند.

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 می کند (۴، ۱۵). بر اساس آنچه که به اختصار توضیح داده شد در چند سال گذشته روش های متعدد سرولوژیک که عمدتاً بر پایه جست و جوی پادتن در سرم استوار هستند، افزایش و تنوع زیادی پیدا کرده اند (۱۰) و در این ارتباط روش های مختلفی نظیر بررسی پیتاسیون، همآگلوتیناسیون، ثبوت کمپلمان و الایزا مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳).

با توجه به آنچه که به اجمال توضیح داده شد و اهمیت روش های سرمی در تشخیص بیماری های کرمی و در بررسی حاضر بیماری دیکروسلیازیس که ناشی از عوامل مختلفی چون، تنوع و تعدد میزبان های واسط، سیر تکاملی پیچیده، عدم پاسخ مطلوب به درمان، اهمیت اقتصادی و بهداشتی می باشد و از طرفی نقاط ضعف آزمایش مدفوع، دستیابی به روش های تشخیصی 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 می باشد که در تحقیق در پیش روی به آن پرداخته می شود.

مقدمه

دیکروسلیازیس بیماری انگلی کرمی ناشی از دیکروسلیوم دندریتیکم از انواع ترما تودهای دیزینه آ و مستقر در مجاری صفراوی می باشد که بنابر عقیده ولف محققین مختلف از دو منظر بهداشتی و اقتصادی از اهمیت ویژه ای در دام های نشخوارکننده برخوردار است (۱۱، ۲۰). در ایران موارد آلودگی که اکثر آنها بر اساس 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 صرفاً از روی علائم تشخیص داده نشده و به همین دلیل است که تشخیص اساساً در ضمن بررسی های کشتارگاهی یا کالبدگشایی و جداسازی ترما تود بالغ از مجاری صفراوی و یا توسط آزمایش مدفوع با دیدن و شناسایی تخم کرم در دام زنده صورت می گیرد (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 آزمون های مدفوعی نوع روش به کار گرفته شده، نوع محلول (های) شناور سازی مورد استفاده نیز تاثیرگذار هستند (۵، ۱۲). بنابر نظر Campo



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، آنتی ژن های بدنی و دفعی ترشعی از آنها تهیه شد و سپس شناسایی آنتی ژن اختصاصی به شرح زیر انجام گرفت.

تهیه آنتی ژن: کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیکم در بازرسی کشتارگاهی از مجاری صفراوی کبد های آلوده جمع آوری گردید. نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه، ۴-۳ نوبت در فسفات بافر سالین (۰/۰۵PBS مولار) شسته شدند، پس از هموژنیزاسیون کرم بالغ، محلول حاصل در ۱۲۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. برای تهیه آنتی ژن دفعی ترشعی از انکوباسیون کرم بالغ در فسفات بافر سالین حاوی فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF ۰/۵ میلی مولار) به عنوان آنتی پروتئاز، به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده شد. در هر دو نوع آنتی ژن مایع رویی حاصل از سانتریفوژ بعد از پروتئین سنجی تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید (۲).

تهیه نمونه های سرمی: طی بازرسی های متعدد در کشتارگاه های 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 بره های کمتر از ۵ ماه سن که عدم آلودگی آنها به تایید بازرسی پس از کشتار رسیده بود، تحت آزمایش قرار گرفت.

شناسایی آنتی ژن اختصاصی: جهت شناسایی پروتئین (های) اختصاصی ابتدا آنتی ژن های بدنی تهیه شده تحت الکتروفورز در ژل پلی اکریلامید و سپس ایمونوبلاتینگ قرار گرفت.

به منظور الکتروفورز نمونه ها از دستگاه Mini-Protein III با ژل به ضخامت ۰/۷۵ میلیمتر، مطابق با روش توضیح داده شده توسط Laemmli در سال ۱۹۷۰ استفاده شد (۹). غلظت ژل جدا کننده 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 پروتئین ها بر اساس روش توضیح داده شده توسط Towbin و همکاران در سال ۱۹۷۹ با کمی تغییرات انجام گرفت (۱۷). بعد از انتقال آنتی ژن ها به غشا نیتروسولوز که با الکتروفورز غشای مدت یک شب در ۳۰ ولت صورت گرفت، کاغذ نیتروسولوز بترتیب در بافر مسدود کننده حاوی شیر خشک بدون چربی، آنتی بادی اولیه (۱ به ۵۰) و آنتی بادی کونژوگه (۱ به ۱۰۰۰)، هر کدام بمدت یک ساعت قرار گرفت. برای مشخص شدن باندها از سوبسترای دی آمینوبنزدین (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 آنتی ژن بدنی بدست آمده از کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیکم برای SDS-PAGE در حد ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تنظیم گردید. در شکل ۱ ایمونوبلاتینگ آنتی ژن های بدنی و دفعی ترشعی دیکروسلیوم دندریتیکم و برای بررسی واکنش متقاطع آنتی ژن های بدنی و دفعی ترشعی فاسیولا به همراه آنتی ژن های مایع کیست هیداتیک و سیستمی سرکوس تیبوکولیس نشان داده شده است. یک باند پروتئینی مشخص با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون در هر دو آنتی ژن بدنی (ستون اول) و دفعی ترشعی (ستون دوم) دیکروسلیوم دندریتیکم وجود دارد، ولی در وسترن بلاتینگ آنتی ژن دفعی ترشعی علاوه بر این باند شش باند پروتئینی با وزن مولکولی بین ۳۵ تا ۱۰۰ کیلودالتون دیده می شود که می توانند به عنوان باندهای اختصاصی مطرح باشند.

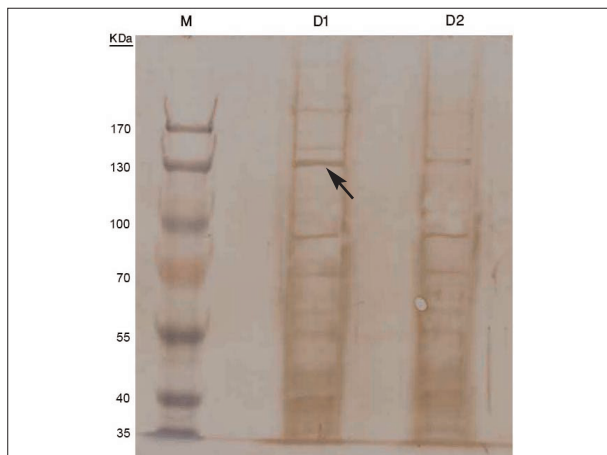
در وسترن بلات آنتی ژن های فاسیولا (ستون سوم و چهارم) باند مشخصی دیده نمی شود، ولی در مورد آنتی ژن مایع کیست سیستمی سرکوس تیبوکولیس (ستون ششم) یک باند ۵۳ کیلودالتونی و در آنتی ژن مایع کیست هیداتیک (ستون پنجم) هفت باند با وزن مولکولی بین ۳۷ تا ۱۲۰ کیلودالتون دیده می شود، ولی در محدوده ۱۳۰ کیلودالتون باند دیگری در سایر آنتی ژن ها وجود ندارد و لذا این پروتئین می تواند بعنوان پروتئین تشخیصی در ابتلا گوسفندان به دیکروسلیوم مطرح باشد. در شکل ۲ ایمونوبلاتینگ آنتی ژن 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 ایمنی شناسی تکامل یافته اند (۱۰). برخی از روش های تشخیص سرمی نظیر ایمونوفلورسانس (۳)، پرسی پیتاسیون، هم‌آگلوتیناسیون، ثبوت کمپلمان و الایزا (۸) بر اساس جستجوی آنتی بادی ضد دیکروسلیوم در سرم هستند.

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



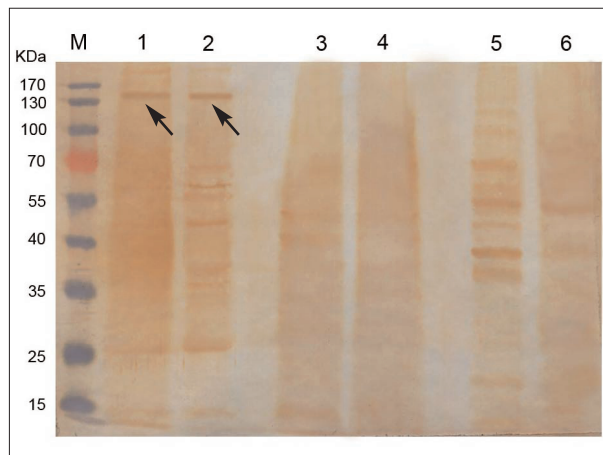


تصویر ۲- ایمونو بلائینگ آنتی ژن های دیکروسلیوم دندریتیکم در برابر سرم مثبت.

بدنی و دفعی ترشعی این ترماتود بترتیب ۸ (۲۴ تا ۲۰۵ کیلودالتون) و ۷ (۲۶ تا ۲۰۵ کیلودالتون) پروتئین ایمنی زار شناسایی کردند و در نهایت پروتئین با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون را برای تشخیص سرمی دیکروسلیوزیس معرفی کردند (۱۳). اگر چه اختلاف زیادی در تعداد و وزن مولکولی پروتئین های 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 آنتی ژن تشخیصی معرفی می کنند، دیده می شود. وجود اختلافاتی در تعداد یا وزن مولکولی سایر باندهای شناسایی شده می تواند به دلیل نوع روش انتخابی و تهیه آنتی ژن مورد استفاده، همچنین غلظت آنتی ژن و مواد بکار گرفته شده باشد. با توجه به نتایج این مطالعه باید در بررسی های تکمیلی پروتئین ۱۳۰ کیلودالتون استخراج شود و به منظور ارزیابی روش های مختلف سرمی، مورد استفاده قرار گیرد.

References

- Ambrosi, M., Baldelli, B., Piergili Fioretti, D., Polidori, G. A., Girolloni, V., Moretti, A., Principato, M (1980) Dicrocoeliosis 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.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Biochem. 72: 248-254.
- Calamel, M. (1977) Application de la technique



تصویر ۱- ایمونو بلائینگ دو نوع آنتی ژن دیکروسلیوم دندریتیکم در برابر سرم مثبت گوسفند (۱) آنتی ژن بدنی دیکروسلیوم دندریتیکم، (۲) آنتی ژن دفعی-ترشعی دیکروسلیوم دندریتیکم، (۳) آنتی ژن بدنی فاسیولا، (۴) آنتی ژن دفعی-ترشعی فاسیولا، (۵) آنتی ژن مایع کیست هیداتیک، (۶) آنتی ژن مایع کیست سیستی سرکوس تینوکولیس، (M) مارکر.

معتقدند، اگر چه ارتباطی بین وجود آنتی بادی ضد دیکروسلیوم و ایمنی محافظتی در میزبان دیده نمی شود، با این حال جست و جوی آنتی بادی در تشخیص زودرس دیکروسلیوزیس از اهمیت ویژه ای 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 آنتی بادی ۲ ماه پس از ابتلا دیده می شود و اختلاف معنی داری بین تعداد متاسرکر خورده شده و عیار آنتی بادی یا ارتباطی بین بار انگلی و پاسخ آنتی بادی وجود نداشته است (۸). Otranto و Traversa در سال ۲۰۰۳ معتقدند با توجه به ظهور آنتی بادی 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 بررسی های سرمی روش الایزا یا روش های مشابه بسیار کاربردی بوده و قابل توصیه می باشند (۱۱).

در بررسی حاضر دو آنتی ژن بدنی و دفعی ترشعی تهیه شده در برابر سرم گوسفندان با آلودگی طبیعی به دیکروسلیوم دندریتیکم تحت ایمونوبلائینگ قرار گرفت و نشان داده شد در آنتی ژن بدنی ۵ باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۵ تا بیش از ۱۷۰ کیلودالتون و در آنتی ژن دفعی ترشعی ۷ باند ۲۵ تا ۱۳۰ کیلودالتون قابل شناسایی است. اگر چه در دو بررسی پاسخ ایمنی آنتی ژن های بدنی (۱۸) همچنین آنتی ژن های سطحی و دفعی ترشعی (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 آنتی ژن دفعی ترشعی 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 بلائینگ آنتی ژن های



- dimmunofluorescence indirect a letude epidemiologique de la dicrocoeliose. Rec. Med. Vet. 153: 343-348.
4. Campo, R., Manga-Gonzalez, M. Y., Gonzalez-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 Helminthology. 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 dendriticum* (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.



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

Fakour, Sh.¹, Meshgi, B.^{1*}

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

²Department 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 western blotting 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

