مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی
JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH
سال اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۸
صفحات ۸۰-۷۵

تشخیص تفریقی فاسیولوز و دیکروسلیوز با استفاده از الگوهای پروتئینی سوماتیک

عباس بایگان[۱]، نادیا طایفی نصرآبادی[۲*]

۱- پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی ایران، جهاد دانشگاهی

۲- گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

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

چکیده:

دیکروسلیوم و فاسیولا از جمله ترماتودهای شایع در مجاری صفراوی کبد میزبانهای مختلف مانند گاو، گاومیش، شتر، گوسفند و بز میباشد. وجود این انگل در کبد میزبانهای نهایی باعث بیماریزایی شده و در اثر تجمع انگل و تخم آن، مجاری صفراوی متسع شده و جدار آنها تیره رنگ می شود. فناوریهای جدید در زمینه بیولوژی مولکولی باعث ایجاد تغییرات اساسی در مطالعات کلاسیک و تشخیص نوع انگلها شده است. یکی از این روشها، تشخیص پروتئین سوماتیک انگل به وسیله آزمون PAGE-SDS (سدیم دو دسیل سولفات ژل الکترو فورزیس) میباشد. نتایج این تحقیق نشان میدهد که باندهای پروتئینی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* در گسترهی ۱۴/۴ تا ۱۱۶ کیلو دالتون و تعداد آنها ۱۵ باند میباشد. باندهای پروتئینی *فاسیولا هپاتیکا* در گسترهی ۱۸ تا ۶۳ کیلو دالتون بوده و شامل ۷ باند میباشد درحالی که *فاسیولا ژیگانتیکا* در همین گستره دارای ۹ باند است. با استفاده از نتایج این تحقیق میتوان روش جدیدی برای تشخیص تفریقی و پاراکلینیکی این ترماتودها معرفی کرد.

واژه های کلیدی: *تشخیص پاراکلینیکی، فاسیولیازیس، دیکروسلیازیس، الگوهای پروتئینی، PAGE-SDS.*

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH
J.Vet.Clin.Res.1(1)75-80,2010

Differential Diagnosis of Fasciolosis and Dicrocoeliosis by using Somatic Protein Bands

Baygan, A. [1], Taiefi Nasrabadi, N. [2*]

1- Iranian Institute of Research & Development in Chemical Industries (IRDCI), Jahad Daneshgahi, Tehran, Iran

2- Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karadj Branch, Iran

Corresponding Author: drtaiefi_vet@yahoo.com

Dicrocoelium and Fasciola are hepatic duct parasites of different animals that are reported from cattle, buffalo, camel, sheep, goats, wild rabbit and hogs in Iran and many other parts of the world. Studies show that the existence of this parasites in the livers of final hosts become pathogens.The new technologies in the field of molecular biology had caused basic changes in the classic researches and indistinguishing parasites. One of these methods is the somatic proteins identification of the parasites resulted from SDS-PAGE.

In an abattoir, adult trematodes were obtained from infested livers of cows, sheep and goats. The different parts of the parasite, such as evacuated materials, excretory and somatic parts can have antigens for diagnosing proteins. There are different method for diagnosing proteins. The best and easiest of these methods is electrophoresis with SDS PAGE. After some processing, some adult termatodes of every host for the expulsion of extra materials was washed in PBS (pH= 7.4) 3-4 times and the resulting solution was centrifuged in 4ºC for 30 min in 12000 G.

The results of the present study showed that *D. denderiticum* protein bands are in 14.4-116 kDa range and their numbers is 15. *F. hepatica* protein bands are in 18-63 kDa and include 7 bands, while *F. gigantica* in the same range is 9 bands.

Using somatic proteins pattern can be considered as a new paraclinic method for the differential diagnosis of Fascioliasis and Dicrocoeliasis.

Key Words: *Clinical Diagnosis, Fasciolosis, Dicrocoeliosis, Protein Bands, SDS-PAGE*

مقدمه:

دیکروسلیوم و فاسیولا از ترماتودهای شایع در مجرای صفراوی میباشند که از حیوانات مختلف مانند گاو، گاومیش، شتر، گوسفند، الاغ، خرگوش وحشی، گراز جدا شده اند. تغییرات ایجاد شده در کبد شامل تورم مجاری صفراوی و تخریب پارانشیم کبد است. در آلودگی شدید و طولانی، فیبروز شدید مجرای صفراوی، سفت شدن و عضلانی شدن، چروکیده و اسکلروزه شدن کبد و لبه‌های آن دیده میشود (۱). سایر علایم شامل آنمی، ادم، لاغری، در موارد پیشرفته سیروز، انبساط مجرای صفراوی و تزاید سلولی می باشد (۹).

در سالهای گذشته نگرانی انسان در خصوص انگلها با مطالعات کلاسیک و تعیین میزان شیوع، بیماریزایی و یافتن داروهای مناسب برای درمان آنها مرتفع میشد، ولی پیشرفت تکنولوژی در چند دهه اخیر به ویژه در زمینه بیولوژی مولکولی باعث تغییرات اساسی در تصور کلاسیک از هر انگل شده است. در این میان، تشخیصهای سرولوژیکی و ایمنی-زایی از اهمیت خاصی برخوردار است. به منظور دستیابی به این تکنیکها، ابتدا باید گسترهی الگوهای پروتئینی هر انگل و تفاوتهای آنها تعیین گردد. در این تحقیق، الگوهای پروتئینی بدنی دو گونهی فاسیولا و دیکروسلیوم با استفاده از روش سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریل آمید ژل الکتروفورزیس (PAGE-SDS) تعیین و با یکدیگر مقایسه شده است.

مواد و روش کار:

بخشهای مختلف انگل مانند مواد دفعی، ترشحی و بدنی میتوانند دارای پادگنهای تشخیصی یا ایمنیزا باشند. پروتئین-ها به عنوان آنزیمهای درون سلولی مطرح هستند و همچنین ساختمان تمامی هورمونها پروتئینی است. پروتئینهایی که به وسیله گیرنده های سطحی سلولهای بدن شناخته نشوند، به وسیله سیستم ایمنی مورد شناسایی قرار گرفته و به عنوان یک پادگن محسوب میشوند. روشهای مختلفی برای شناسایی پروتئینها وجود دارد، اما بهترین و راحتترین آنها الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید است (۲).

تهیه پادگن بدنی: طی چندین نوبت بررسی کشتارگاهی، کبدهای آلوده از میزبانهای مختلف نظیر گاو، گوسفند و بز تهیه شده و به سرعت در کنار یخ و در ظروف نگهدارنده به آزمایشگاه انتقال یافت. بعد از تکه تکه کردن و شستشوی کامل، ترماتودهای بالغ جمعآوری و برای تهیه پادگن بدنی از روش فارل و همکاران (۶) ضمن تغییراتی در روش کار استفاده شد. برای دفع مواد زاید، ترماتودهای بالغ مربوط به هر میزبان به طور جداگانه ۴-۳ بار در فسفات بافرسالین (PBS) با اسیدیته ۷/۴ مورد شستشو قرار گرفت و به طور کامل هموژنیزه شدند. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲/۰۰۰ G و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و مایع درونی حاصل بعد از تعیین غلظت به روش براد فورد (۵) تا زمان استفاده در ویالهای مخصوصی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر و در برودت ۷۰- درجه سانتیگراد به عنوان پادگن بدنی نگهداری شدند.

تعیین الگوی الکتروفورتیک: از روش سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریل آمید ژل الکتروفورزیس (PAGE-SDS) براساس روش لاملی (۸) استفاده شد. نمونهها به نسبت ۱ به ۲ با بافر اختصاصی مخلوط شدند و بعد از حرارت دادن، ۳۰ میکرولیتر از محلول بدست آمده به هر چاهک انتقال یافت و چاهک نشاندار با وزن مولکولی مشخص به میزان ۷ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت.

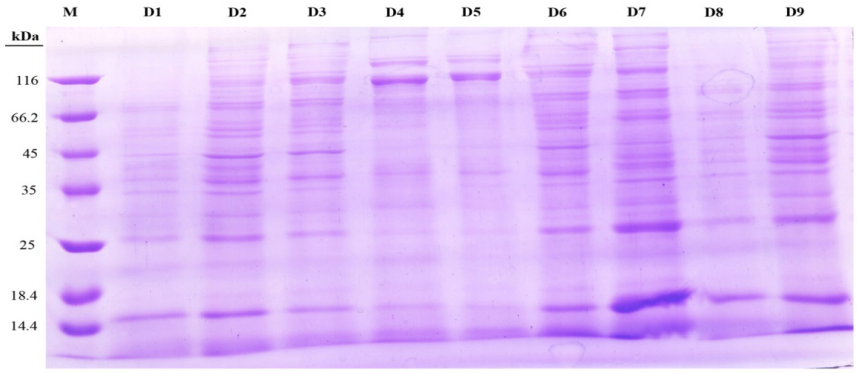
الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۱۱۰ ولت انجام شد. پس از پایان آزمایش، ژلها با کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و در انتها برای آشکار شدن باندهای پروتئین از محلول رنگبر (اسید استیک گلاسیال و متانول) استفاده شد.

نتایج:

مقایسه الگوی باندهای پروتئینی دیکروسلیوم دندریتیکوم در میزبانهای گاو، گوسفند و بز در (شکل ۱) و همچنین گستره

باندهای پروتئینی فاسیولا هپاتیکا و ژیگانتیکا در (شکل ۲) نشان داده شده است. همانطور که در شکلها مشاهده میشود، باندهای پروتئینی مشخص شده در *دیکروسلیوم دندریتیکوم* در گسترهی ۱۴/۴ تا ۱۱۶ کیلو دالتون، و تعداد آنها بین ۱۶ تا ۱۸ عدد می‌باشد.

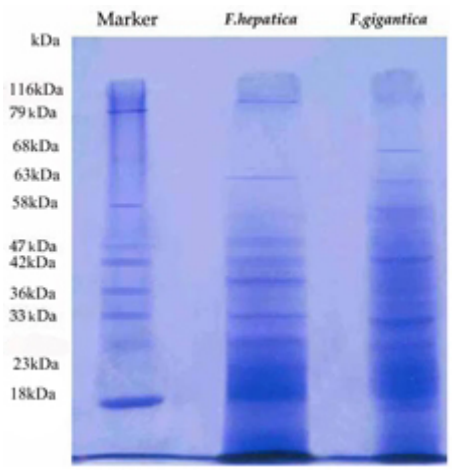
باندهای پروتئینی مشخص شده در فاسیولاهپاتیکا در گسترهی ۱۸ تا ۶۳ کیلو دالتون و شامل ۷ باند میباشد. همچنین باندهای پروتئینی در فاسیولا ژیگانتیکا در گسترهی ۱۸ تا ۶۸ کیلو دالتون و شامل ۹ باند میباشد.



شکل ۱- گستره باندهای پروتئینی *دیکروسلیوم دندریتیکوم*.

M = Marker

D2, D9= بز D1, D5, D6, D8=گوسفند D7, D4, D3 = گاو



شکل ۲- گستره باندهای پروتئینی *فاسیولا هپاتیکا* و *ژیگانتیکا*.

بحث:

ترکیبات دفعی ترشحی و همچنین ساختار بدنی انگلها می‌توانند به عنوان پادگنهای تشخیصی و ایمنیزا مطرح باشند. شناسایی پادگنهای کرمها میتواند در راستای تولید واکسن، تشخیص، تجزیه و تحلیل فرایندهای ایمونوپاتولوژیک و مطالعه کمی، کیفی پاسخهای ایمنی در آلودگیهای مربوطه مورد استفاده قرار گیرد.

براساس اعتقاد رولینسون و همکاران (۱۱) ترماتودهای هم شکل میتوانند چهرههای متفاوتی از بیماریزایی، تولیدمثل، ایمنیزایی و حساسیت در برابر درمان را از خود نشان دهند،

لذا میبایستی فرایند و تولیدات مختلف درون سلولی و برون سلولی انگل تحت ارزیابی قرار گیرد.

در تحقیق دیگری که توسط محمد مؤذنی (۴) صورت گرفته، وجود یا عدم تشابه بین آنتیژنهای خام دفعی ـ ترشحی و سوماتیک دو گونه فاسیولا با آزمایش الیزا بررسی شده و نتایج نشان داد که آنتیژنهای هرگونه با آنتی سرم گونه دیگر واکنش قوی نشان میدهد ولی با وجود تشابه بین بسیاری از مواد آنتی ژنیک دو گونه، برخی از این مواد با یکدیگر متفاوتند که این تفاوتها میتواند در تشخیص تفریقی بیماران مبتلا به این انگلها از سایر ترماتودها به کار رود. در تحقیقات مشابه که توسط رکنی و همکاران (۱۰) انجام شد، پروتئین ۲۷ کیلو دالتونی به عنوان آنتی ژن در تشخیص فاسیولوز انسانی به کار رفته است.

همچنین در پژوهشی دیگر، پروتئین سبک ۸ کیلو دالتونی به وسیله الکتروفورز ژل دو دسیل سدیم سولفات تغلیظ شده و در تشخیص فاسیولوز انسانی به کار میرود که با سایر ترماتودهای انسانی واکنش متقاطع ندارد (۷).

همانطور که از این تحقیقات بر میآید، تشخیص سرولوژیک دیکروسلیوم و فاسیولا بسیار اختصاصی و بر پایه تعیین الگوی پروتئین این انگلها میباشد. لذا نتایج این تحقیق میتواند در راستای رسیدن به چنین هدفی بسیار موثر و تعیین کننده باشد.

باندهای پروتئینی در فاسیولا هپاتیکا و ژیگانتیکا به ترتیب ۷ و ۹ باند در گسترهی ۱۸ تا ۶۸ کیلو دالتون میباشد ولی باندهای پروتئینی تعیین شده در *دیکروسلیوم دندریتیکوم* ۱۵ باند و در گسترهی ۱۴/۴ تا ۱۱۶ کیلو دالتون میباشد که تفاوت در باندهای پروتئینی میتواند در تشخیص اختصاصی سرولوژیک این انگلها مؤثر باشد (۳).

منابع:

۱- اسلامی، علی (۱۳۸۵) کرم شناسی دامپزشکی (جلد اول) ترماتودا، (چاپ سوم) انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۱۰۳ تا ۱۱۳.

۲- حسینی، سید رضا (۱۳۸۵) تعیین الگوی الکتروفورتیک پادگن-های مختلف سوبههای اکینوکوکوس گرانولوزوس و ایمینیزایی آنها، پایان-نامه برای دریافت دکتری تخصصی انگل شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۲۹۳.

۳- طایفی نصرآبادی نادیا (۱۳۸۶) بررسی مقایسهای مورفولوژیک، مورفومتریک و الکتروفورتیک الگوهای پروتئینی بدنی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* حیوانات مختلف ایران، پایاننامه برای دریافت دکتری تخصصی انگلشناسی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران.

۴- مؤذنی محمد (۱۳۸۶) مقایسه آنتیژنهای خام فاسیولاهپاتیکا و ژیگانتیکا به وسیله آزمایش الیزا، مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره ۱۱، صفحه ۵-۱.

5 -Brad Ford ,M.M (1976) .A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitive protein utilizing the principle of protein-dye binding .*Am. Bioch*. 22. 248-254.

6- Farrel, C.J., Wescott, D.T. and Long, B.Z. (1981) An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Fasciola hepatica infection in cattle. *American Vet. Res*. 72: 23J-240.

7- KIM. Kwansig. Hyun. Jong Yang. Young-Bae Chung. (2003) usefulness of 8 kDa protein of fasciola hepatical in diagnosis of fascioliasis, *Korean Journal of Parasitology*. Vol. 1, No. 2, 121-123.

8- Laemli, U.K. (1970) cleavage at structural proteins during assembly of the head of bactriophage T4. *Nature*. 227: 678-685.

9- Otranto, D., Traversa, D. (2002) Review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advance in the diagnosis and treatment, *Vet. Parasitol*. 107, (4), 317-335.

10- Rokni, M.B., Baghernejad, A., Mohebali, M. and Kia, E.B. (2007) Enzyme-linked immunotransfer blot analysis of

fasciola hepatica in diagnosis of human fascioliasis. *Iranian J. Public Health*, 33:8-13.

11- Rollinson, D., Wallker, T.K., Simpson, J.G. (1986) The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. *Parasitology,* 91 (suppl) 353-371.