

شناسایی پروتئینهای لارو فیلاریفرم (L3) استرونیلویئیدس استرکورالیس به روش وسترن بلات

دکتر سهیلا روحانی، مهری محمودی، دکتر بهرام کاظمی، دکتر هوشنگ خزان*

* گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: استرونیلویئیدس استرکورالیس انگلی است که در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر جهان پراکنده است. جستجوی لارو با آزمونهای انگل‌شناسی در مدفوع مشکل است، زیرا بخش بزرگی از بیماران مزمن با آلودگی خفیف، تعداد کمی لارو به صورت متناوب دفع می‌کنند. تستهای سرولوژیکی (IFA, ELISA) قادر به شناسایی بیماران مزمن و بدون علامت می‌باشند اما هنوز آنتی‌ژن استرونیلویئیدس استرکورالیس به منظور استفاده روتین تشخیصی در دسترس نمی‌باشد. این بررسی با هدف تشخیص آنتی‌ژن‌های ایمونوژن این انگل برای اولین بار در ایران انجام شده است.

روش بررسی: با آزمایش مدفوع به سه روش مستقیم، فرمالین-اتر و کشت آگار پلیت بیماران شناسایی شدند. در ۲ بیمار، لاروهای رابدیتی فرم (L1) مشاهده شد. بعد از کشت، لاروهای فیلاریفرم ۷-۶ روز بعد از انکوباسیون مدفوع در محیط آگار پلیت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بدست آمدند. ۱۲۰۰۰ لارو در ۲۵۰ میکرولیتر PBS حاوی مهارکننده‌های پروتئاز سونیکه شدند. سپس میزان پروتئین با روش برادفورد تعیین شد. پروتئینهای لارو فیلاریفرم انگل با روش SDS-PAGE تفکیک شده و به روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شدند. تست وسترن بلات با سرم افراد مبتلا به استرونیلویئیدس استرکورالیس و دیگر عفونتهای انگلی (توکسوکاریازیس، هیداتیدوزیس و آمیبیازیس) و سرم فرد سالم در رفتهای مختلف (۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱) انجام شد.

یافته‌ها: ۴ باند پروتئینی ۲۳، ۲۸، ۳۰ و ۴۱ کیلودالتونی توسط سرم افراد مبتلا (در رقت ۰/۱) شناسایی شدند. در همین رقت هیچ کدام از پروتئینهای لارو فیلاریفرم با سرم فرد سالم و با سرم فرد مبتلا به آمیبیازیس واکنشی نشان ندادند. ولی بعضی از پروتئینها با سرم بیماران مبتلا به هیداتیدوزیس و توکسوکاریازیس واکنش نشان دادند. با رقیق کردن سرمها فقط پروتئین ۴۱ کیلودالتونی با سرم بیماران مبتلا به استرونیلویئیدس واکنش نشان دادند لذا این پروتئین، بعنوان مهمترین پروتئین ایمونوژن معرفی می‌گردد. نتیجه‌گیری: شناسایی پروتئینهای ایمونوژن این انگل در ایران که با ویژگیهای ژنتیکی و فیزیولوژی میزبان، خود را منطبق کرده می‌تواند گامی مهم در این راستا باشد.

واژگان کلیدی: استرونیلویئیدس استرکورالیس، لارو فیلاریفرم، SDS-PAGE، Western blot.

مقدمه

استرونیلویئیدس استرکورالیس انگلی است که در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر شایع است. این گونه مخصوص انسان

است. آلودگی با ورود لارو فیلاریفرم انگل از طریق پوست ایجاد می‌شود که بعد از مهاجرت ریوی در روده به کرم بالغ تبدیل می‌گردد. تنها نماتودی است که قادر به تکثیر در بدن بیمار و ایجاد خود آلودگی است بدین ترتیب سالیان طولانی در بدن میزبان زندگی می‌کند. در اکثر موارد عفونت ایجاد شده بدون علامت است و گاهی با درد خفیف در ناحیه شکم و اسهال با دوره کوتاه مدت تظاهر می‌کند. علائم غیراختصاصی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی گروه انگل‌شناسی و

قارچ‌شناسی، دکتر سهیلا روحانی (email: srouhani11@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۷/۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۱۱/۷

شامل علائم پوستی، گوارشی و ریوی است که با توجه به الگوی مهاجرتی انگل در بیمار ایجاد می‌شود (۱).

بدنبال مصرف داروهای ایمونوساپرسیو، ابتلا به بیماریهایی نظیر لوسمی‌ها و سایر بدخیمی‌ها، پیوند اعضا، سوء تغذیه و یا به هر نحوی که سیستم ایمنی تضعیف یا سرکوب گردد، تظاهرات بالینی بیماری تغییر کرده و باعث بروز موارد منتشر می‌شود (۲).

اطلاع دقیقی از میزان شیوع این انگل در ایران وجود ندارد و آمارهای مختلفی از مناطق گوناگون کشور بخصوص استانهای شمالی (مازندران و گیلان) گزارش شده است. طبق گزارش روحانی و همکاران در سال ۱۳۷۸ میزان شیوع این انگل در روستاهای شهرستان ساری ۱/۴٪ (۳) و فراهانی و همکاران در سال ۱۳۸۳ میزان آلودگی را در مناطق روستایی استان مازندران ۲/۴٪ (۴) و صدقی در سال ۱۳۷۵ در گیرندگان داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی میزان آلودگی را ۱٪ گزارش نمودند (۵).

تشخیص قطعی عفونت با دیدن لارو در مدفوع و مایع دئودنوم یا سایر نمونه‌های بیمار امکان‌پذیر است ولی به دلیل ظرفیت پایین تولید تخم و دفع نامنظم لارو رابدیتوئید از طریق مدفوع میزبان، تشخیص به موقع انگل با روشهای انگل‌شناسی مشکل است و تا مدتی عفونت ناشناخته باقی می‌ماند. بنابراین نیاز مبرم برای بکارگیری روشهای مناسب و حساس جهت تکمیل روشهای انگل‌شناسی در بیماران مبتلا به فرم مزمن به خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی و پیگیری درمان آنها به چشم می‌خورد تا از بروز موارد منتشر و مرگ‌زا جلوگیری به عمل آید.

Conway و همکاران در سال ۱۹۹۳ بعد از آنالیز پروتئینهای لارو فیلاریفرم استرونیلیوئیدس استرکوریالیس توسط روش SDS-PAGE و انجام تست Western blot مشخص کردند که پروتئینهای با وزنهای ۲۸، ۳۱ و ۴۱ کیلودالتون به ترتیب با ۹۰٪، ۸۸٪ و ۹۱٪ سرم افراد مبتلا به این انگل واکنش نشان دادند در حالیکه با سرم افراد سالم هیچ واکنشی نشان ندادند. این پروتئینهای تفکیک شده به ترتیب فقط با ۹٪، ۱۲٪ و ۱۴٪ سرم افراد مبتلا به سایر نماتودها واکنش نشان دادند (۶). Siddiqui و همکاران در سال ۱۹۹۷ در آمریکا به منظور شناسایی آنتی‌ژن ایمونوژن لاروفیلاریفرم این انگل از دو تست SDS-PAGE و Western blot استفاده کردند. بعد از انجام این دو روش ۸ آنتی‌ژن بارز با وزن ملکولی بین ۲۶ تا ۹۶ کیلودالتونی را معرفی کردند که بیشترین واکنش بین پروتئین ۴۱ کیلودالتونی و سرم افراد مبتلا مشاهده شد. این پروتئینها

با سرم افراد غیرآلوده واکنشی نشان ندادند. این محققین معتقدند که تولید *in vitro* این آنتی‌ژن و استفاده آن در تست‌های سرولوژیکی بسیار مفید و با ارزش است (۷).

در سالهای اخیر از روشهای سرولوژی مختلف مانند ELISA، با استفاده از آنتی‌ژن‌های خام تهیه شده از لاروفیلاریفرم به عنوان روشهای تکمیلی در تشخیص این بیماری استفاده می‌گردد ولی عدم دسترسی به آنتی‌ژن‌های این انگل از مشکلات اصلی این روشها است.

مطالعات متعددی در زمینه شناسایی پروتئینهای این انگل توسط پژوهشگران در دنیا انجام شده است که همگی حکایت از آن دارد که شناسایی آنتی‌ژن‌های این انگل و سپس تولید نو ترکیب آنها در بالا بردن حساسیت و ویژگیهای روشهای سرولوژی مانند الیزا بسیار موثر است. لذا این پژوهش با هدف شناسایی پروتئینهای ایمونوژن لارو فیلاریفرم انگل استرونیلیوئیدس استرکوریالیس به روش وسترن بلات برای اولین بار در ایران انجام شده است.

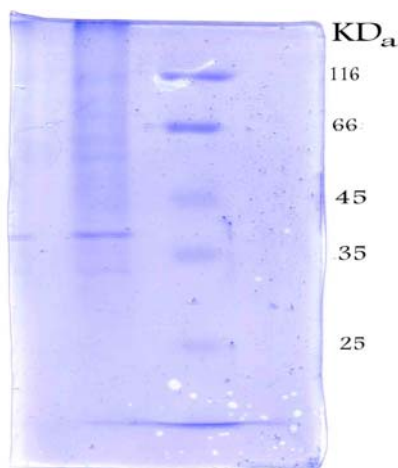
مواد و روشها

این تحقیق بنیادی از نوع توصیفی و تکنیک آن مشاهده‌ای است. برای شناسایی مبتلایان آزمایش مدفوع از مددجویان توانبخشی در تهران و شمال ایران (شهرستان بهشهر) به سه روش گسترش مستقیم، فرمالین اتر و کشت آگار پلیت انجام شد. بعد از شناسایی افراد مبتلا، سرم آنها در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد. نمونه مدفوع تازه ۲۴ ساعته بیمار بعد از اطمینان از زنده بودن لاروهای رابدیتی فرم در محیط آگار پلیت کشت داده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. با بررسی روزانه کشتها، بهترین زمان جمع‌آوری لارو فیلاریفرم ۷ روز بعد از کشت مدفوع بود. لاروها به کمک پیپت پاستور در میکروتیوبها جمع‌آوری شدند و با بافر PBS استریل سه بار با دور ۶۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار شسته شدند. سپس لاروها به مدت ۵ دقیقه در PBS حاوی استرپتومايسين و پنی‌سیلین قرار گرفته و مجدداً به روش فوق سه بار شستشو شدند و در انتها در ۷۰- درجه سانتیگراد فریز شدند. در حدود ۱۲۰۰۰ لارو در PBS استریل حاوی پروتئازهای EDTA (Ethylen diamine tetra acetic acid) و PMSF (Phenyle methyl sulphonyl fluorid) به مدت ۲ دقیقه داخل میکروتیوب سونیکه شدند. سپس لوله‌های حاوی لارو به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با سانتریفوژ یخچال‌دار، سانتریفوژ شدند. مایع رویی به عنوان آنتی‌ژن جمع‌آوری و در ۲۰-

واکنش مشاهده شد. این پروتئینها با سرم فرد مبتلا به انتامبا هیستولیتیکا و سرم فرد سالم هیچ واکنشی نشان ندادند.

در رقت ۰/۰۱، سرم افراد مبتلا به استرونیلوییدیازیس با ۲ پروتئین ۴۱ و ۳۰ کیلودالتون و سرم فرد مبتلا به هیداتیدوزیس با پروتئین ۴۲ کیلودالتونی واکنش نشان دادند و بقیه سرمها هیچ واکنشی نشان ندادند.

در رقت ۰/۰۰۱، فقط سرم افراد مبتلا به استرونیلوییدیازیس با پروتئین ۴۱ کیلودالتون واکنش نشان دادند در حالیکه بقیه سرمها در این رقت هیچ واکنشی نشان ندادند.



شکل ۱- ژل SDS-PAGE سمت راست مارکر و سمت چپ محلول حاصل از سونیکاسیون لارو فیلاریفرم.

بحث

در این مطالعه پروفایل‌های آنتی‌ژنیکی لارو عفونت‌زا (لارو فیلاریفرم) انگل استرونیلوییدیاس استرکوریس شناسایی شد. بعد از تفکیک پروتئینهای لارو به روش SDS-PAGE، ۱۱ ترکیب آنتی‌ژنیکی (۲۳، ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۳، ۳۸، ۴۱، ۴۸، ۶۰، ۶۶، ۷۴ و ۸۵ کیلودالتون) مشاهده شد. با انجام تست وسترن بلات در بین این باندهای پروتئینی، ۴ پروتئین ایمونوژن با وزن ملکولی ۲۳، ۲۸، ۳۰ و ۴۱ کیلودالتونی با سرم افراد مبتلا به استرونیلوییدیازیس واکنش نشان دادند. با افزایش رقت سرم به ۰/۰۰۱، فقط پروتئین ۴۱ کیلودالتون با سرم این بیماران واکنش نشان داد.

در کمترین رقت سرمها یعنی ۰/۱، سرم مبتلایان به استرونیلوییدیاس استرکوریس، انتامبا هیستولیتیکا و کیست هیداتید با پروتئین ۳۰ کیلودالتونی واکنش متقاطع نشان دادند. این واکنش متقاطع با رقیق شدن سرمها حذف گردید.

درجه سانتیگراد فریز شد. میزان پروتئین این محلول به روش برادفورد تعیین شد.

برای انجام تست SDS-PAGE (۸)، ۵۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌ژنی لارو L3 را با حجم برابر از بافر نمونه مخلوط کرده و سپس این محلول در ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد.

در نهایت این محلول در تانک الکتروفورز در کنار مارکر پروتئینی روی ژل ۱۲٪ الکتروفورز شد و پروتئینها بر اساس وزن مولکولی تفکیک شده و باندهای مختلفی را ایجاد نمودند. برای انجام تست وسترن بلات (۸)، ابتدا پروتئینها از ژل به کاغذ نیتروسولوز منتقل شدند. این کاغذ به نوارهای ۴ میلی‌متری بریده شد و در مجاورت سرم افراد مبتلا به عفونتهای انگلی شامل ۲ سرم مربوط به بیماران مبتلا به استرونیلوییدیاس استرکوریس که از آن لارو جدا شد، ۳ سرم مربوط به بیماران مبتلا به توکسوکارا، کیست هیداتید و انتامبا هیستولیتیکا و ۱ سرم کنترل (فرد سالم) در سه رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ قرار گرفت. آنزیم پراکسیداز بعنوان کونژوگه و با رقت ۰/۰۰۱ تهیه شد. سپس تمام نوارها با آنتی‌سرم کونژوگه به مدت ۲-۱ ساعت انکوبه شدند و در آخر با سوبسترا DAB (۳ و ۴ دی‌آمینوبنزیدین) مجاور شدند و به مدت ۱۰ دقیقه دور از نور قرار گرفتند. با تخلیه سوبسترا و افزودن آب دیونیزه واکنش متوقف گردید. در طی این اعمال ایمونوژن بودن هر یک از باندهای پروتئینی تفکیک شده در SDS-PAGE، بصورت نوار قهوه‌ای رنگ روی کاغذ نیتروسولوز مشخص شد.

یافته‌ها

لاروهای فیلاریفرم ۶ تا ۷ روز بعد از کشت در آگار پلیت مشاهده شدند. در این بررسی، این زمان بهترین زمان جمع‌آوری این لاروها نیز بود. با انجام روش SDS-PAGE با محلول آنتی‌ژنی لارو L3 چندین باند پروتئینی در فاصله بین ۱۰ تا ۹۰ کیلودالتون شامل ۲۳، ۲۵، ۳۰، ۳۳، ۳۸، ۴۱، ۴۸، ۶۰، ۶۶، ۷۴ و ۸۵ کیلودالتون بدست آمد (شکل ۱).

با انجام تست وسترن بلات، در رقت ۰/۱، سرم افراد مبتلا به استرونیلوییدیازیس با ۴ پروتئین ۲۳، ۲۸، ۳۰ و ۴۱ کیلودالتون واکنش نشان دادند. سرم فرد آلوده به توکسوکارا با ۴ پروتئین ۳۰، ۳۳ و ۶۰ کیلودالتون و سرم فرد مبتلا به هیداتیدوزیس با ۳ آنتی‌ژن ۳۰، ۳۳ و تقریباً ۴۲ کیلودالتون

Brindley و همکاران تعدادی آنتی ژن سطحی لارو فیلاریفرم از جمله ۳۰ کیلودالتونی و تعدادی آنتی ژن دفعی- ترشحی شامل آنتی ژن های ۲۵، ۳۰ و ۴۰ کیلودالتونی را شناسایی نمودند (۱۲) که آنتی ژن دفعی- ترشحی ۳۰ کیلودالتونی مشابه یکی از ۴ پروتئین ایمونوزن در بررسی ما می باشد.

منبع و چگونگی تهیه لارو نیز می تواند در نتایج چنین بررسی تاثیرگذار باشد. ضمن آنکه پلی مورفیسم در انگل در نقاط مختلف دنیا می تواند توجیهی دیگر برای این تفاوتها باشد.

با توجه به نتایج سایر محققین و مقایسه با تحقیق حاضر بنظر می رسد مهمترین آنتی ژن های ایمونوزن این انگل پروتئینهای ۲۸، ۳۰، ۴۱ کیلودالتونی است. در بررسی حاضر، با رقیق کردن سرم بیماران مبتلا به استرونیلیوئیدزایس تعدادی از باندها حذف شدند و فقط باند ۴۱ کیلودالتونی به وضوح مشاهده شد. لذا این پروتئین بعنوان مهمترین پروتئین ایمونوزن در این بررسی معرفی می گردد.

با توجه به شیوع این انگل در مناطق شمالی کشور و بدلیل افزونی مواردی مانند بیماری ایدز، بدخیمی ها، کورتیکوتراپی، کاربرد داروهای سرکوبگر ایمنی و... آلودگی به این انگل از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از این رو هر یافته ای که بتواند ما را در تشخیص بهنگام این انگل یاری دهد، ارزشمند است. شناسایی پروتئینهای ایمونوزن این انگل در ایران که با ویژگیهای ژنتیکی و فیزیولوژی میزبان، خود را منطبق کرده می تواند در این راستا باشد. دست یافتن به پروتئین نو ترکیب این انگل مانند پروتئین ۴۱ کیلودالتونی می تواند حساسیت و اختصاصیت تستهای سرولوژی مانند تست الیزا را افزایش دهد (۹،۶).

Conway و همکاران در سال ۱۹۹۳ (۶)، John و همکاران در سال ۱۹۹۴ (۹) و Uparanukraw و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۱۰) به روش وسترن بلات سه پروتئین ایمونودامینت با وزن ملکولی ۲۸، ۳۱ و ۴۱ کیلودالتون را به عنوان آنتی ژن های مفید در تشخیص اختصاصی استرونیلیوئیدزایس در نمونه های سرم شناسایی کردند. به جزء پروتئین ۲۳ کیلودالتونی، نتایج این بررسی با نتایج مطالعات سایر محققین مشابه و یا اختلاف بسیار جزئی دارد. نتایج بررسی ما تنها در پروتئین ۲۰۵ کیلودالتونی با بررسی این محققین مغایرت دارد. بعضی از این اختلافات مشاهده شده با نتایج سایر محققین می تواند مربوط به تفاوت در تهیه و آماده سازی آنتی ژن و یا روشهای ایمونوبلات باشد.

Conway و همکاران در سال ۱۹۹۳ در بررسی خود لاروهای فیلاریفرم انگل را از کشت مدفوع بیماران مبتلا تهیه کردند (۶). Siddiqui و همکاران این لاروها را از کشت مدفوع سگ با آلودگی تجربی به استرونیلیوئیدس استرکوریالیس بدست آوردند (۷) در حالیکه Luciana و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار جهت تشخیص استرونیلیوئیدزایس در انسان از لاروهای استرونیلیوئیدس راتی (S.ratti) موجود در مدفوع *Rattus rattus* که به طور تجربی آلوده شدند، استفاده نمودند. با استفاده از این لاروها در روش وسترن بلات، ۱۱ ترکیب آنتی ژنیک ایمونودامینت به وسیله سرمهای افراد آلوده شناسایی شدند. این پژوهشگران معتقدند که لاروهای عفونت زای S.ratti که از موش جدا می شود آنتی ژن های مناسب و در دسترس برای تشخیص استرونیلیوئیدزایس در انسان است (۱۱).

REFERENCES

1. Seeymiller AC, Rita M. Abdominal pain and leukocytosis in an immunosuppressed patient. *Lab Med* 2004;35(4):669-71.
2. Coucha R, Harrington WJR. Intestinal strongyloidiasis: Recognition, management, and determinant of outcome. *Clin Gastroenterol* 2005;39(3):203-24.
3. روحانی س، کیانیان ه، اطهری ع. شیوع انگلهای روده ای در روستاهای شهرستان ساری ۱۳۷۸. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی استان زنجان*، ۱۳۸۰؛ سال نهم، شماره ۳۴، صفحات ۲۳ تا ۲۷.
4. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره بیماریهای عفونی و گرمسیری ایران. ۲۱ لغایت ۲۵ آذر ماه ۱۳۸۳، تهران، صفحه ۱۳۰.
5. صدقی ه. شیوع انگلهای روده ای در گیرندگان داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی در تهران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سال ۱۳۷۵.
6. Conway DJ, Bailey YW, Lindo JF, Robinson RD, Bandy DA, Bianco AE. Serum IgG reactivity 41, 31, 28 kDa Larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. *J Infect Dis* 1993;168:784-7.

7. Siddiqui AA, Koenig NM. Strongyloides stercoralis: identification of antigens in natural human infection from endemic areas of the United States. *Para Res* 1997;83(7):655-8.
8. Sambrook A, Russell D, editors. *Molecular cloning; A laboratory manual*. 3rd edition. CSHL press, 2001;p:40-55.
9. John F, Lindo R. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic strongyloides stercoralis infection. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51(2):175-79.
10. Uparanukraw P, Phonogsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in Strongyloides stercoralis infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:967-73.
11. Luciana PS, Solange da Costa I. Western blotting using strongyloides ratti antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(5).
12. Brindly PJ, Gam AA, Mckerrow JH, Neva FA. Ss40: the zinc endopeptidase secreted by inf Strongyloides stercoralis. *Exp Parasitol* 1995;80:1-7.