Archive of SID

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۳۱۱ تا ۳۱۵

مقاله اصلی
(Original Article)

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

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

* گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *استرونژیلوئیدس 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 (ELISA، IFA) قادر به شناسایی بیماران مزمن و بدون علامت می‌باشند اما هنوز آنتی‌ژن استرونژیلوئیدس 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 نیتروسلولز منتقل شدند. تست وسترن بلات با سرم افراد مبتلا به استرونژیلوئیدس استرکورالیس و دیگر عفونتهای انگلی (توکسوکاریازیس، هیداتیدوزیس و آمبیازیس) و سرم فرد سالم در رقتهای 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 استرونژیلوئیدیازیس 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: *استرونژیلوئیدس استرکورالیس، لارو فیلاریفرم، SDS –PAGE ، Western blot.*

مقدمه

استرونژیلوئیدس 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 ایجادشده 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 انگل شناسی و قارچ شناسی، دکتر سهیلا روحانی **(email:** srouhani11@yahoo.com**)**

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸٦/۷/۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸٦/۱۱/۷

www.SID.ir

Archive of SID

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 اعضاء، سوء تغذیه و یا به هر نحوی که سیستم ایمنی تضعیف یا سرکوب گردد، تظاهرات بالینی بیماری تغییر کرده و 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 صدفی 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 ۱۹۹۳بعد از آنالیز پروتئینهای لارو فیلاریفرم استرونژیلوئیدس استرکورالیس 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 درسال 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 کردندکه 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 آنتی‌ژن های 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 نوترکیب 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 استرونژیلوئیدس استرکورالیس 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 ۷روز 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 استرپتومایسین و پنی‌سیلین قرار گرفته و مجددا 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 میکروتیوپ 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-

www.SID.ir

Archive of SID

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 L_3 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 نیتروسلولز 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 استرونژیلوئیدس استرکورالیس 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، ۰/۰۱و ۰/۰۰۱ قرار گرفت. آنزیم پراکسیداز بعنوان کونژوگه و با رقت ۰۰۱ /۰ تهیه شد. سپس تمام نوارها با آنتی‌سرم کونژوگه به مدت ۲-۱ساعت انکوبه شدند و در آخر با سوبسترا DAB (۴و۳ دی آمینوبنزیدین) 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 نیتروسلولز مشخص شد.

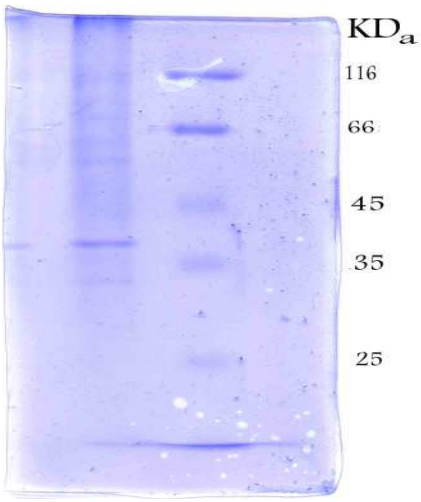
یافته‌ها

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، ۲۸،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 استرونژیلوئیدیازیس با ۴ پروتئین ۲۳، ۲۸، ۳۰ و ۴۱ کیلودالتون واکنش نشان دادند. سرم فرد آلوده به توکسوکارا با ۴ پروتئین ۲۵،۳۰، ۳۳ و۶۰ کیلودالتون و سرم فرد مبتلا به هیداتیدیوزیس با ۳ آنتی‌ژن ۳۰، ۳۳ و تقریبا ۴۲ کیلودالتون 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 استرونژیلوئیدیازیس با ۲ پروتئین ۴۱ و ۳۰ کیلودالتون و سرم فرد مبتلا به هیداتیدیوزیس با پروتئین ۴۲ کیلودالتونی واکنش نشان دادند و بقیه سرمها هیچ واکنشی نشان ندادند.

در رقت ۰/۰۰۱، فقط سرم افراد مبتلا به استرونژیلوئیدیازیس 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 حا صل از سونیکاسیون لارو فیلاریفرم.

بحث

در این مطالعه پروفایل‌های آنتی‌ژنیکی لارو عفونت‌زا (لارو فیلاریفرم) انگل استرونژیلوئیدس استرکورالیس 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 استرونژیلوئیدیازیس 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 استرونژیلوئیدس استرکورالیس، آنتامبا هیستولیتیکا و کیست هیداتید با پروتئین ۳۰ کیلودالتونی واکنش متقاطع نشان دادند. این واکنش متقاطع با رقیق شدن سرمها حذف گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

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 آنتی‌ژن‌های مفید در تشخیص اختصاصی استرونژیلوئیدیازیس در نمونه‌های 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 می‌تواند مربوط به تفاوت در تهیه و آماده‌سازی آنتی‌ژن 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 استرونژیلوئیدس استرکورالیس بدست آوردند (۷) در حالیکه Luciana و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار جهت تشخیص استرونژیلوئیدیازیس در انسان از لاروهای استرونژیلوئیدس 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 آنتی‌ژنیکی ایمونودامینت به وسیله سرمهای افراد آلوده شناسایی شدند. این پژوهشگران معتقدند که لاروهای عفونت‌زای S.ratti که از موش جدا می‌شود آنتی‌ژن‌های مناسب و در دسترس برای تشخیص استرونژیلوئیدیازیس در انسان است (۱۱).

Brindley و همکاران تعدادی آنتی‌ژن سطحی لارو فیلاریفرم ازجمله ۳۰ کیلودالتونی و تعدادی آنتی‌ژن دفعی- ترشحی شامل آنتی‌ژن‌های ۲۵، ۳۰ و ۴۰ کیلودالتونی را شناسایی نمودند (۱۲) که آنتی‌ژن دفعی- ترشحی ۳۰ کیلودالتونی مشابه یکی از ۴ پروتئین ایمونوژن در بررسی ما می‌باشد.

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

با توجه به نتایج سایر محققین و مقایسه با تحقیق حاضر بنظر می‌رسد مهمترین آنتی‌ژن‌های ایمونوژن این انگل پروتئینهای ۲۸، ۳۰، ۴۱ کیلودالتونی است. در بررسی حاضر، با رقیق کردن سرم بیماران مبتلا به استرونژیلوئیدیازیس تعدادی از باندها حذف شدند و فقط باند ۴۱ کیلودالتونی به وضوح مشاهده شد. لذا این پروتئین بعنوان مهمترین پروتئین ایمونوژن در این بررسی معرفی می‌گردد.

با توجه به شیوع این انگل در مناطق شمالی کشور و بدلیل افزونی مواردی مانند بیماری ایدز، بدخیمی‌ها، کورتیکوتراپی، کاربرد داروهای سرکوب‌گر ایمنی و... آلودگی به این انگل از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این رو هر یافته‌ای که بتواند مارا در تشخیص بهنگام این انگل یاری دهد، ارزشمند است.

شناسایی پروتئینهای ایمونوژن این انگل در ایران که با ویژگیهای ژنتیکی و فیزیولوژی میزبان، خود را منطبق کرده می‌تواند در این راستا باشد. دست یافتن به پروتئین نوترکیب این انگل مانند پروتئین ۴۱ کیلودالتونی می‌تواند حساسیت و اختصاصیت تستهای سرولوژی مانند تست الیزا را افزایش دهد (۹،۶).

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.

۳. روحانی س، کیانیان ه، اطهری ع. شیوع انگلهای روده‌ای در روستاهای شهرستان ساری ۱۳۷۸. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی استان زنجان، ۱۳۸۰؛ سال نهم، شماره ۳۴، صفحات ۲۳ تا ۲۷.

۴. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره بیماریهای عفونی و گرمسیری ایران. ۲۱ لغایت ۲۵ آذر ماه ۱۳۸۳، تهران، صفحه ۱۳۰.

۵. صدفی ه. شیوع انگلهای روده‌ای 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir