پژوهش و سازندگی
امور دام و آبزیان شماره ۷۵ تابستان ۱۳۸۶

بررسی مقایسه‌ای الگوی الکتروفورتیک پادگن‌های بدنی فاسیولا در میزبان های مختلف

• **بهنام مشگی، علی اسلامی و سیدحسین حسینی**
گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• **فرهید همت‌زاده**
گروه میکرب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• **الهام هوشمند**
دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت

تاریخ دریافت: آذرماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: شهریورماه ۱۳۸۵

Email: bmeshgi@ut.ac.ir

چکیده

هدف از بررسی حاضر تعیین الگوی الکتروفورتیک پادگن‌های بدنی دو گونه ترماتود شایع در ایران شامل *Fasciola hepatica* و *F. gigantica* بود. بدین منظورطی بازرسی کشتارگاهی اقدام به تهیه گونه‌های فاسیولا از میزبانهای مختلف شامل: فاسیولا ژیگانتیکا از دو میزبان گاو و شتر و *Fasciola hepatica* از گوسفند و گاومیش گردید. بعد از جداسازی ترماتودهای بالغ و انتقال به آزمایشگاه هر نمونه ۳ تا ۴ بار در محلول فسفات بافر سالین (PBS, pH=۷/۲) شسته شد. پادگن بدنی هر ترماتود به طور جداگانه توسط هموژنیزاسیون و سپس سانتریفوژ استخراج گردید. پادگن‌های مربوطه (۴ نمونه) بعد از تنظیم میزان پروتئین, به روش سدیم دودسیل سولفات پلی اکریلامید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) در مجاورت نشان‌دار با وزن مولکولی مشخص تحت الکتروفورز قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی الگوی الکتروفورتیک پادگن‌های بدنی ۴ نمونه نشان داد هر دو گونه دارای پروتئین هائی با وزن مولکولی حدود ۱۸ تا ۷۰ کیلو دالتون هستند, پادگن بدنی *F. gigantica* شتر و گاو باند مشخصی با وزن مولکولی ۵۷ کیلو دالتون دارند ولی گونه دیگر فاقد آن است. پادگن بدنی *F. hepatica* در گوسفند و گاومیش با داشتن دو باند۵۴ و۶۸ کیلو دالتونی از گونه دیگر فاسیولا قابل تفریق می‌باشد در حالیکه *F. hepatica* گاومیش دارای باند نسبتا ضعیفی با وزن مولکولی ۶۴ کیلو دالتون میباشد. لذا با توجه به اختلافاتی که در پروتئین های بدنی فاسیولا نه تنها بین گونه‌ها که بین یک گونه همسان ولی در دو میزبان متفاوت وجود دارد لازم است در روش‌های نوین ایمنولوژیک جهت تشخیص آلودگی با فاسیولا که معمولا از پادگن‌های مختلف بدنی ترماتود بالغ استفاده می‌گردد، حیوان میزبان و تاثیر آن بر ویژگی‌های مولکولی ارگانیسم مربوطه مورد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *Fasciola hepatica*، *Fasciola gigantica*، پادگن بدنی, الکتروفورز

Pajouhesh & Sazandegi: No 75 pp: 156-159

Comparative assessment of electrophoretic patterns of fasciola somatic antigens in different hosts

By: B. Meshgi, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran.
Eslami, A., Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
Hossieni, S.H., Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
Hemmatzadeh, F., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
Hooshmand, E, Faculty of Agriculture, Eslamic Azad University, Rasht, Iran.

To determine the electrophoretic patterns of *Fasciola hepatita* and *F. gigantica*, the former was collected from sheep and buffalo infected liver and the latter from that of cattle and camel and were washed in PBS. Somatic antigens of both species were prepared though homogenization and centrifugation of adult flukes. To show the eclrophoretic patterns of somatic antigens, the prepared antigens were electrophoresed using SDS-PAGE. Our findings revealed that proteins of 18-70 kDa molecular weights were present in both species in different hosts. Although a 57 kDa protein was seen in *Fasciola gigantica* of cattle and camel only. Meanwhile two bands of 54 and 68 kDa were seen exclusively in *F.hepatica* of sheep and buffalo. A band of 64 kDa was shown in *F.hepatica* of buffalo. According to our results in any study on immunological or immunodiagnostic of Fasciola spp, the species trematode as well as their hosts should be taken in consideration.

Keysords: *Fasciola hepatica*, *Fasciola qiqantica*, Somoticantigen, SDS-PAGE

مقدمه

فاسیولوزیس بیماری انگلی کرمی با گستردگی جهانی است که در مناطق با آب و هوای معتدل دنیا در انسان و حیوان اهمیت قابل توجهی دارد. سازمان بهداشت جهانی از این بیماری تحت عنوان بیماری انگلی قدیمی یاد می‌کند (۷)، به طوریکه در اروپا معتقدند حضور آلودگی به ادوار مزولیتیک و نئولیتیک که حدود ۵۱۰۰-۵۰۰۰ سال پیش از این بوده است بر می‌گردد(۱۱)، ولی با وجود قدمت این بیماری و با توجه به خسران اقتصادی که به صورت مستقیم و غیرمستقیم بر صنعت دام و دامپروری وارد می‌سازد, دنیای علم حاضر هنوز شاهد سئوالات و ابهامات زیادی در جنبه‌های مختلف آن میباشد. در انگل شناسی نوین امروزی سیاست‌های مختلفی جهت مبارزه با آلودگی‌های انگلی برپایه کنترل و پیشگیری اعمال شده است و در این مسیر است که روش‌های تشخیص سرم شناسی و راهکارهای واکسیناسیون علیه آلودگی‌های مربوطه جلوه گر شده‌اند(۱۴). در راستای استفاده از روش‌های سرم شناسی در تشخیص فاسیولوزیس از پادگن‌های مختلف بدنی و دفعی ترشحی فلوک‌های بالغ استفاده می‌گردد. مسلم است که عوامل گونه‌ای ممکن است خصوصیات پادگن‌های مختلف را در یک ارگانیسم واحد تحت تأثیر قرار دهند. در این مورد با بررسی الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های استخراج شده و استفاده از آنها در روش‌های سرم شناسی می‌توان کارایی پادگن‌های مختلف را در تشخیص سرمی آلودگی مورد بحث و ارزیابی قرار داد.

شناسایی گونه‌های فاسیولا بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، مورفوآناتومیک و مورفومتریک توسط لطفی و همکاران (۹) و با استفاده از روش ایزوالکتریک فوکوسینگ پروتئین‌های محلول توسط Lee و Zimmerman (۸) مؤید بر وجود دو گونه مشخص *F. hepatica* و *F. gigantica* می‌باشد. در بررسی حاضر با توجه به استفاده وسیع از پادگن‌های بدنی در تشخیص سرمی آلودگی با گونه‌های فاسیولا, الگوی الکتروفورتیک این نوع پادگن در هر دو گونه فاسیولا در میزبان‌های مختلف تحت بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش کار

پژوهش حاضر طی دو مرحله شامل تهیه پادگن بدنی از ترماتود بالغ و بررسی الگوی الکتروفورتیک آنها به شرح زیر صورت پذیرفت:

تهیه پادگن بدنی

جهت جداسازی پادگن بدنی ترماتود بالغ گونه‌های فاسیولا از روش Farrell و همکاران (۵) استفاده گردید، بدین منظور فلوک‌های بالغ ضمن بازرسی کشتارگاهی از مجاری صفراوی میزبان‌های مختلف جمع‌آوری شدند. همه نمونه‌ها از کشتارگاه بندر انزلی تهیه گردید و شامل: *F. gigantica* از گاو و شتر و *F. hepatica* از گوسفند و گاومیش بود. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، ۴-۳ نوبت در فسفات بافر سالین (۰/۰۵ مولار) شسته شدند، پس از هموژنیزاسیون کرم بالغ، محلول حاصل در ۱۲۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید و مایع روئی حاصل از سانتریفوژ به عنوان پادگن بدنی تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پروتئین سنجی پادگن‌های استخراج شده توسط روش Lowwry و همکاران (۱۰) انجام گرفت و در حد ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تنظیم گردید.

تعیین الگوی الکتروفورتیک

به منظور الکتروفورز نمونه‌ها از دستگاه Mini-Protean ۳ ساخت Bio-Rad با ضخامت ژل ۰/۷۵ میلیمتر و مطابق با روش توضیح داده شده توسط مصطفایی (۱) استفاده گردید. ژل جداکننده ۱۲٪ و ژل متراکم‌کننده ۵٪ در نظر گرفته شد. پس از اطمینان از انعقاد ژل پلی اکریلامید، نمونه‌ها به نسبت هم حجم با بافر نمونه مخلوط گردید و به مدت ۱۰-۸ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک انتقال یافت. الکتروفورز نمونه‌ها در مجاورت نشاندار با وزن مولکولی مشخص در ولتاژ ۷۰ و سپس ۱۱۰ ولت صورت پذیرفت. پس از اتمام الکتروفورز ژل مربوطه توسط رنگ کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی شد و جهت مشاهده باندهای پروتئینی به محلول رنگبر انتقال یافت و بعد از قرائت نتایج از ژل‌های بدست آمده عکسبرداری صورت گرفت.

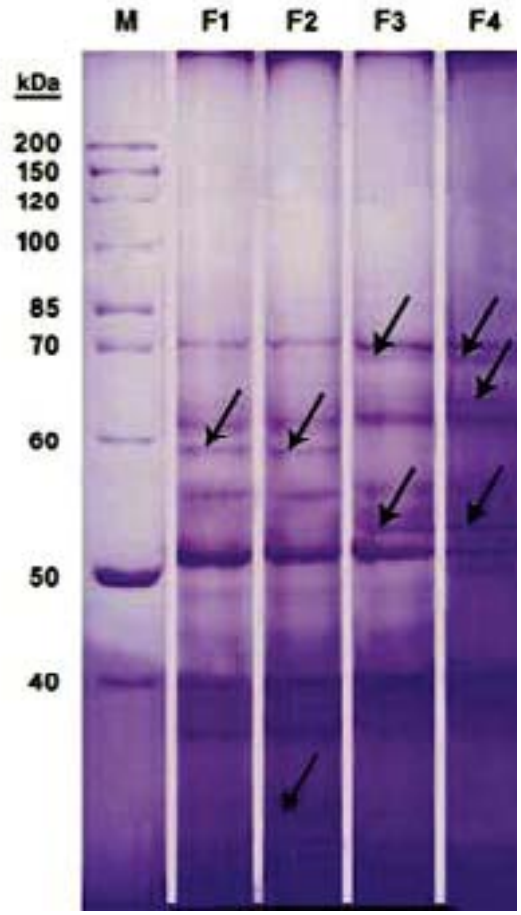
نتایج

نتایج حاصل از بررسی الگوی الکتروفورتیک پادگن‌های بدنی ۴ نمونه شامل: *F. gigantica* از گاو و شتر و *F. hepatica* از گوسفند و گاومیش در برابر نشاندار با وزن مولکولی مشخص در تصویر ۱ نشان داده شده است.

پادگن بدنی *F. hepatica* در گوسفند و گاومیش با داشتن دو باند ۵۴و۶۸ کیلو دالتونی از گونه دیگر فاسیولا قابل تفریق می‌باشد در حالیکه *F. hepatica* گاومیش دارای باند نسبتاً ضعیفی با وزن مولکولی ۶۴ کیلو دالتون بود. در مورد الکتروفورز پادگن بدنی *F. gigantica* شتر و گاو باند مشخصی با وزن مولکولی ۵۷ کیلو دالتون دیده شد ولی گونه دیگر فاقد آن بود.

بحث

سازمان بهداشت جهانی فاسیولوزیس را دومین بیماری مشترک بین انسان و دام میداند و بر لزوم اهمیت بیماری در هر دو طب انسانی و حیوانی تاکید می‌نماید، تخمین بالغ بر حدود ۱۷ میلیون نفر جمعیت انسانی مبتلا در دنیا بیانگر این مدعا می‌باشد (۶)، از ۷۰۷۱ مورد انسانی گزارش شده از ۵۱ کشور دنیا در ۲۵ سال اخیر ۳۵۴ مورد از قاره آسیا و از این تعداد ۲۴۴ مورد مربوط به ایران بوده است (۱۱). در بعضی کشورها نظیر مصر و ایران که مناطق بومی آلودگی به هر دو گونه فاسیولا وجود دارد شناسائی موارد آلودگی بدون تفریق گونه ائی صورت می‌پذیرد (۹، ۱۳) و این در حالی است که اختلاف بین ویژگی‌های اپیدمیولوژیک و تفاوت در میزبان‌های واسط دو گونه فاسیولا بر لزوم تفریق بین گونه‌ها تاکید دارد (۳). اگر چه تفریق بین گونه‌های مختلف بر اساس خصوصیات ریختی فلوک‌های بالغ و تخم کرم امکان‌پذیر است (۱۲) ولی بررسی‌های اخیر چه در آلودگی طبیعی و چه به صورت تجربی حاکی از تاثیر قطعی نوع میزبان اصلی بر خصوصیات ریخت شناسی کرم بالغ و تخم فاسیولا دارد (۱۶) و چه بسا که چنین وضعیتی بر ساختار پروتئین‌های بدنی و متابولیک فلوک‌های بالغ در میزبان‌های مختلف نیز تاثیر گذار باشد. مطابق با نظر Lee, Zimmerman (۸) گونه‌های فاسیولا ترماتودهائی پلی مورفیک هستند که ویژگی‌های ریخت شناسی آنها می‌تواند بستگی به میزبانشان داشته باشد، به طوریکه طیفی



تصویر ۱- الگوی الکتروفورتیک پادگن‌های بدنی *F. hepatica* و *F. gigantica* در میزبان‌های مختلف (M: نشاندار وزنی، F1: پادگن بدنی *F. gigantica* در گاو، F2: پادگن بدنی *F. gigantica* در شتر، F3: پادگن بدنی *F. hepatica* در گوسفند F4: پادگن بدنی *F. hepatica* در گاومیش)

از تنوع ریختی فاسیولا در کشورهای جنوب شرقی آسیا نظیر ژاپن, تایوان و فیلیپین (۷) و کره (۴) گزارش شده است. بررسی‌های مختلف انجام گرفته در مـورد تعیین الگوی الکتروفورتیک این دو نوع پادگن هم نشـان دهنده اختلاف بین آنها میباشد (۲، ۱۵).

در بررسـی الگوی الکتروفورتیک پادگن‌های بدنی هر دو گونه فاسیولا پروتئین‌های با وزن مولکولی حدود ۱۸ تا ۷۰ کیلو دالتون مشاهده شد ولی نـه تنها بین گونه‌ها که بین یک گونه همسـان ولـی در دو میزبان متفاوت نیز اختلا فاتی وجود داشـت. پادگن بدنی *F. gigantica* شـتر در مقایسه بـا گاو دارای باند با وزن مولکولی ۲۰ کیلو دالتون و *F. hepatica* گاومیش با داشـتن باند ۶۴ کیلو دالتون از گونه همسـان تفریق می‌گردد. در بررسی پادگن‌های ترماتود بالغ *F. gigantica* توسط Upadhyay و Kumar (۱۵) ۷ باندهای پروتئینی ۶۷-۱۶ کیلو دالتون شناسائی گردید. Allam و همکاران (۲) ضمـن تاکید بـر تفریق ویژگی‌هـای ایمنولوژیک گونه‌های فاسـیولا, سنگین‌ترین پروتئین را در دو گونه *F. hepatica* و *F. gigantica* به ترتیب ۴۸ و ۵۷/۶ کیلو دالتون تشخیص دادند در صورتیکه در بررسی حاضر در هر دو گونه (۴ نمونه) باند مشـخصی با وزن مولکولی ۷۰ کیلو دالتون مشاهده شد، در این بررسی وجود دو باند با وزن مولکولی ۵۴ و ۶۸ کیلو دالتون صرفا مربوط به *F. hepatica* و باند ۵۷ کیلو دالتون منحصرا در *F. gigantica* بر لزوم تفریق پادگن‌های بدنی دو گونه فاسـیولا تاکید دارد، از طرفی حضور بانـد پروتئینی ۶۴ کیلو دالتونی در *F. hepatica* گاومیش و باند حدود ۲۰ کیلو دالتون در *F. gigantica* شـتر بر لزوم در نظر گرفتن میزبان نهائی این فلوک کبدی در جداسـازی و خالص سازی پادگن‌های بدنی اصرار می‌ورزد. در پایان خاطر نشان می‌سازد با توجه به روش‌های نوین ایمنولوژیک جهت تشـخیص آلودگی با فاسـیولا که معمولاً از پادگن‌های مختلـف بدنی و یا دفعی ترشحی کرم بالغ استفاده می‌گردد, می‌بایستی حیوان میزبان و تاثیر آن بر ویژگی‌های مولکولی ارگانیسم مربوطه مورد نظر قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

۱ - مصطفائی, ع. ۱۳۷۸؛ الکتروفورز پروتئین در ژل, راهنمای عملی و نظری.

2- Allam, A.F., El-Agamy, E.S.I., Helmy, M.H., .2002; Molecular and immunological characterisation of fasciola species. British Journal Biomedical Science. 59 (4), 191-195

3- Bargues, M.D., and Mas-Coma, S. .1997; Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. Molecular Biology and Evolution. 14, 569-577.

4- Chu, J.K., and Kim, Y.K. .1967; Taxonomical study on the fasciolidae in Korea. Korea Journal of Parasitology. 5, 139-146.

5- Farrell, C.J., Shen, D.T., Wescott, R.B., and Lang, B.Z. .1981; An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatic* infection in cattle. American Journal Veterinary Research. 42, 237-240.

6- Hopkins, D.R. .1992; Homing in on helminthes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 46, 626-634.

7- Kendall, S.B. .1965; Relationships between the species of fasciola and their molluscan hosts. Advance in Parasitology.3, 59-98.

8- Lee, C.G., and Zimmerman, G.L., .1993; Banding patterns of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (Trematoda; by Isoelectric Focusing. Journal of Parasitology. 79, 1, 120-123.

9- Lotfy, W.M., EI-Morshedy, H.N., Abou EI-Hoda, M., EI-Tawila, M.M., Omar, E.A., and Farag, H.F. .2002; Identification of the Egyptian species of fasciola. Veterinary Parasitology. 103, 323-332.

10- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.I., and Randall, R.J. .1951; Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biological chemistry. 193, 265-275.

11- Mas-coma, S. .2003; Human fascioliasis: Epidemiological Patterns in human endemic areas of south America, Africa and Asia. 4th Seminar on food and water-borne parasitic zoonoses, 2th International meeting on Genathostomiasis joint International Tropical Medicine Meeting. 2-4 December 2003, Bangkok, Thailand.

12- Mas-Coma, S., Esteban, J,G., and Bargues, M.D. .1999; Epidemiology of human fascioliasis: A review and proposed new classification. Bulletin of the World Health Organization. 77, 340-346.

13- Sahba, G.H., Arfaa, F., Farahmandian, I., and Jalali, H. .1972; Animal fascioliasis in Khuzestan, southwestern Iran. Journal of Parasitology. 58, 712-716.

14- Spithill, T.W., Piedrafita, D., Smooker, P.M., .1997; Immunological approaches for the control of fasciolosis. Int. J. Parasitol. 27 (10), 1221-1235.

15- Upadhyay, A.K., Kumar, M., .2002; SDS-PAGE analysis of *Fasciola gigantica* antigen. Journal Immunology and Immunopathology. 4 (1/2), 91-92.

16- Valero, M.A., Darce, N.A., Pavova, M., and Mas-Coma, S. .2001; Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. Veterinary Parasitology. 102, 85-100.

17- World Health Organization .1995; Control of foodborne trematode infections. WHO Technical Report Series. 849.