ارزیابی کوپرو آنتی ژنهای انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با استفاده از روش دات-بلاتینگ در سگ

دکتر هاشمی تبار غلامرضا[1]، دکتر کیوانلو مرتضی[2]، دکتر رزمی غلامرضا[1].

1- دانشیارگروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد.

2- رزیدنت گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

خلاصه

در مطالعه حاضر، آزمایش دات بلاتینگ برای کوپروآنتی ژنهای اختصاصی اکینوکوکوس گرانولوزوس در مدفوع سگ مورد ارزیابی قرار گرفته است. سه توله 2 – 3 ماهه با استفاده از داروی پیپرازین بر علیه نماتودهای روده ای درمان شدند و چند روز بعد، مدفوع آنها بعنوان نمونه قبل از عفونت جمع آوری گردید. یک هفته پس از درمان، سه توله سگ با کبد و ریه آلوده به کیست هیداتید بمدت چند روز تغذیه شدند. در پایان هر هفته (تا 5 هفته) مدفوع آنها بعنوان نمونه پس از عفونت جمع آوری گردید. پروتئینهای محلول نمونه های قبل و پس از عفونت آماده شد و آزمایش دات بلاتینگ روی گونه ها انجام گردید. همچنین 15 نمونه مدفوع ارجاعی از بیمارستان دامپزشکی رازی مشهد ابتدا مورد آزمایش تخم کرم قرار گرفتند و نیز آزمایش دات بلات بر روی آنها انجام شد. برای تشخیص بافته های پروتئینی انگل آزمایش SDS-PAGE انجام شد. نتایج نشان داد که از هفته اول تا پنجم پس از عفونت، افزایش لکه های رنگی در سگهای عفونی شده مشاهده گردید. از 15 نمونه ارجاعی از درمانگاه خصوصی، درتمام نمونه واکنش مثبت رنگی مشاهده گردید، در صو رتیکه فقط 4 نمونه در آزمایش تخم کرم مثبت بودند. در آزمایش SDS-PAGE ، چهار باند در نمونه های مدفوع هفته چهارم پس از عفونت مشاهده گردید. وزن مولکولی باند ها به ترتیب 14، 22، 36 و45 کیلودالتون بود. با توجه به نتایج بدست آمده توصیه میگردد که جهت تشخیص کوپرو آنتی ژنهای اکینوکوکوس گرانولوزوس از روش کوپرو آنتی ژن الیزا و نه دات بلاتینگ استفاده گردد.

کلمات کلیدی : اکینوکوکوس گرانولوزوس، کوپروآنتی ژن، دات بلاتینگ، سگ.

مقدمه

روشهای تشخیصی الودگیهای انگلی در حیوانات علیرغم دارا بودن دقت بالا باید سریعتو قابل استفاده در شرایط مزرعه باشد .یکی از این روشها بعنوان مثال ایجاد اسهال در سگ بوسیله خوراندن آرکولین هیدروبروماید و بررسی میکروسکوپیک تخم وبندهای انگل می باشد (6). روشهای ایمونولوژیک نظیر الایزا و دات بلاتینگ برای اهداف سرم شناختی روشهایی دقیق و قابل اتکا می باشند، هرچند دقت انها به میزان بالایی به کیفیت منبع آنتی‌ژن استفاده شده بستگی دارد (2). مقایسه بین تشخیص مدفوعی و سرولوزی نشان داده است که تشخیص از طریق بررسی کوپروآنتی ژنی 2/5 برابر حساستر از تشخیص بر مبنای آنتی بادی است (3).دات بلات یک روش بر مبنای الایزا می باشد که می تواند کوپرو آنتی‌ژنهای ویژه را در نمونه های مدفوعی ردیابی نماید.همچنین الکتروفورز به منظور شناسایی باندهای پروتئینی انگل انجام میشود. یک روش بررسی اکینوکوکوس جدیدا مطرح شده است که در آن از ترکیب روش تشخیصی کوپروالیزا بهمراه کوپرو-وسترن بلات استفاده می گردد که در این روش از مدفوع های خشک جمعاوری شده از محیط بدون شناسایی سگ دفع کننده مدفوع و بدون استفاده از مواد دفع کننده تنیاها استفاده می گردد.در سگهای حامل اکینوکوکوس گرانولوزوس حساسیت و ویژگی این روش 100% بوده است(4). هدف از مطالعه حاضر ردیابی کوپرو آنتی‌ژنهای ویژه اکینوکوکوس گرانولوزوس در نمونه های مدفوعی و شناخت سیمای پلی پپتیدی انگل در نمونه های مدفوعی قبل و بعد آلودگی بوسیله آزمون دات بلات می باشد.

مواد و روش کار

سه توله سگ 2/5 ماهه نژاد مخلوط ایرانی بعد از معاینه وبررسی وضعیت بدنی با داروی ضد انگل پیپرازین مورد درمان ضدانگلی قرار گرفتند. بعد از یکهفته از درمان ضد انگلی از هر 3 توله سگ نمونه مدفوع گرفته شد. پس ازدرمان ضد انگلی به توله سگها کبد و ریه گوسفندان آلوده به کیست هیداتیدخورانده شد. هر هفته بعد از خوراندن کیست‌ها به سگها مدفوع توله‌ها جمعآوری شده و بطور جداگانه در ظروف شماره گذاری شده‌ای به فریزر منتقل می گردید. این روند مدفوع گیری از توله سگها بعد از خوراندن کیست به توله‌ها تا پنج هفته ادامه داشت. درپایان هفته پنجم توله سگها بااستفاده از تزریق سولفات منیزیم به درون قلبشان کشته شدند و روده‌های آنان جداگانه در ظروف فرمالین نگهداری شد تا از نظر وجود انگل مورد بررسی قرار گیرند. برای حصول اطمینان، طی این مدت علاوه برتوله سگها، بطور همزمان یک سگ بالغ نیز درمان ضدانگلی گردید وسپس ریه و کبد گوسفندی آلوده به کیست هیداتید به سگ خورانده شد وبعد از 2 ماه سگ کشته شده و روده آن باز شد. بعد از باز کردن روده، انگل‌های بالغ از روده سگ برداشته شدندو به ظروفی منتقل شدند. این انگلهای بالغ درشرایط استریل در هاون له شده و سپس با دستگاه سونیکاتور بصورت هموژن در آمدند. در هنگام ایمنی زایی 2 خرگوش بالغ جهت تلقیح آنتی ژنهای انگل مورد استفاده قرار گرفتند که 5 تزریق از آنتی ژن صورت پذیرفت وسرم خون خرگوش ایمن جدا گردید. بعد از این مرحله آماده سازی نمونه ها بااستفاده از بافرکربنات بی کربنات 0/05 مولار انجام گردید.

1- دات بلاتینگ Dot-blotting

نمونه های آماده شده مدفوعی به صورت مرتب در کنار هم قرار داده شد. نمونه‌ها درروی کاغذ نیترو سلولز بوسیله سرنگ همیلتون به میزان 4 میکرولیتر نمونه گذاری شد. پس ازخشک شدن کاغذها با محلولPBS (Phosphate Buffer Saline(PH = 7/2) به مدت سی دقیقه،شستشو داده شدند. سپس کاغذها با محلولBSA (Bovine Serum Albumin) (0/02 گرم از BSA در 10میلی لیتر بافر PBS) بمدت 3 ساعت مجاورت داده شد تا اپی توپهای ناخواسته را بپوشاند. سپس سی دقیقه با محلول PBS شستشومجدداً صورت گرفت. بعد از این مرحله سرم حاصله از خرگوش ایمن شده با محلول PBS به نسبت 1:10 رقیق گشته و با کاغذ بمدت3 ساعت مجاوگردید. بعد ازآن کاغذها بامحلول PBS حاوی 0/05 % توین 30 دقیقه - سه بار هر بار ده دقیقه - شستشو داده شد. سپس کاغذها در ظرف محتوی 10 CC محلول PBS بهمراه 10 میکرو لیترآنتی بادی ثانویه (آنتی بادی ضدخرگوش) قرار داده شدند و 3 ساعت روی Shaker بخوبی تکان داده شدند و سپس مجدداً شستشو انجام شدو در ظرف محلول رنگ DAB قرار داده شد. بعد از حدود 1 دقیقه کاغذهاتوسط پنس برداشته شده وبه ظرف شیشه‌ای تیره‌ای حاوی آب مقطر منتقل شد تا واکنش رنگی متوقف شود. به منظور بررسی نتایج بدست آمده توسط این روش از بیمارستان دامپزشکی رازی مشهد 15 نمونه مدفوع از 15 سگ از نژادهای مختلف گرفته شد وپس از آماده‌سازی بهمراه نمونه‌های 3 توله قبلی آلوده شده، روی کاغذ نیتروسلولز آزمایش دات بلات انجام گرفت. ضمن اینکه نمونه‌های بیمارستان رازی با روش فرمالین- اتر از لحاظ وجود تخم تیناها مورد بررسی قرار گرفتند

وهمچنین روده‌های 3 توله وروده ها از نظر آلودگی به اکینوکوکوس گرانولوزوس مورد بررسی قرار گرفتند.جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئینی درنمونه‌های مدفوع گرفته شد ازتوله‌ها، روش برادفورد برگزیده شد.

2- آزمایش SDS-PAGE : نمونه‌ها و استاندارد وزن ملکولی آماده شده توسط سرنگ همیلتون به‌ترتیب به میزان 20 و 10 میکرولیتر در گودهها ریخته شد والکتروفورزانجام شد و سپس رنگ امیزی و رنگ زدایی انجام شد.

3- وسترن بلاتینگابتدا SDS-PAGE (12/5%) انجام شد. ژل حاصله طی عمل وسترن بلا ت به کاغذ منتقل گردید که از روش مرطوب استفاده شد.

نتایج

پس از انجام آزمایش دات بلاتینگ مستقیم بدون western blot روی نمونه‌های مدفوعی توله‌ها، لکه‌های قهوه ای رنگ مربوط به نمونه‌ها از هفته اول تا هفته پنجم در روی کاغذ نیتروسلولز ظاهر گردید. حاشیه لکه‌هااز نظر تغییر رنگ درنمونه ها در هفته‌های اول در هر 3 توله سگ واضح نبود ولی بمرور نمونه ها درهفته‌های بعد پررنگتر ظاهر شدند. درنمونه‌های مدفوع گرفته شده از بیمارستان رازی مشهد حاشیه لکه‌هااز نظر تغییر رنگ درنمونه ها بتدریج در هفته های متوالی بیشتر شد.نمونه‌های بیمارستان رازی همزمان به لحاظ وجود تخم تنیا بررسی شدند که چهارنمونه از لحاظ وجود تخم تینا در زیر میکروسکوپ مثبت بودند. بعلاوه 3 توله‌سگ نیز به لحاظ وجود انگل درمدفوع مثبت بودند. نتایج میزان جذب نوری در هفته های مختلف آلودگی نشان دادکه غلظت پروتئینها درمدفوع توله ها نه تنها بیشتر نشده است حتی گاهی کاهش یافته است. بررسی باندهای تشکیل شده ورنگ‌آمیزی شده روی ژل اکریل آمیددر هفته های مختلف نشان داد که قبل از آلودگی حدود 1 باند پروتئینی رؤیت شدولی در هفته پنجم بعد از آلودگی سه باند دیگر نیز مشاهده شد.

بحث

مهمترین مزیت مربوط به روشهای کوپروآنتی‌ژن الایزا که مبنای آنها ردیابی آنتی بادی در سرم می باشد این است که آلودگی کنونی را نشان می دهد. کوپروآنتی ژنها در دوره آلودگی بخوبی دوره قبل الودگی قابل شناسایی هستند و بنظر می رسد 2الی 5 روز بعد از حذف کرمهای اکینوکوک ناپدید می شوند(5). بعلت سادگی تکنیک دات بلات در مطالعه حاضر این تکنیک جهت ارزیابی کوپروانتی‌ژنهای خاص اکینوکوکوس گرانولوزوس در سگ مورد استفاده قرار گرفته است.در مطالعه حاضر در نمونه های مدفوعی اخذ شده از هفته های اول تا پنجم لکه های رنگی مشاهده گردید که 4 باند در هفته پنجم بعد از الودگی در SDS-PAGE دیده شد و یک باند هم در هفته قبل از آلودگی مشاهد گردید. احمد و نظامی در 1998 در هفته چهارم بعد از آلودگی یک واکنش واضح که با شدت رنگ مشخص شده بود، مشاهده نمودند. آنها 4 باند در SDS-PAGE شناسایی کردندکه در هفته چهارم بعد از آلودگی کاملا واضح بود اما وزن ملکولی آنها را مشخص نکردند (1).در الکتروفورز نمونه های مدفوعی اخذ شده در هفته های متوالی اول تا چهارم مشخص گردید که این چهار باند بتدریج واضح می شوند . این نتایج نشان می دادند که این باندها در نمونه های قبل از آلودگی وجود ندارد . باندها بتدریج قابل مشاهده بودند و این باندها احتمالا مربوط به اکینوکوکوس گرانولوزوس می باشند.

هرچند کوپرودات بلات می تواند در مطالعات گسترده اپیدمیولوژیک در سگ مورد استفاده باشد اما ارزش قابل شناسایی این روش مورد شک وتردید است و لازم است که کوپروآنتی‌ژن‌های ویزه اکینوکوکوس گرانولوزوس در سگبوسیله کوپروآنتی‌ژن الایزا مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

1- Ahmad, G and Nizami, WA (1998) Coproantiens: early detection and suitability of an immunodiagnostic method for echinicoccosis in dogs. Vet. Parasitol. 77: 237-244.

2- Carmena, D; Benito, A and Eraso, E (2007). Recent advances in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 25(4): 263-9.

3- Craig, PS; Gasser, RB; Parada, L; Cabrera, P; Parietti, S; Borgues, C; Acuttis, A; Agulla, J; Snowden, K and Paolillo, E (1995). Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. Vet. Parasitol., 56(4): 293-301.

4- Guarnera, E; Santillán, G; Bottinelli, O and Franco, A (2000). Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology. Vet. Parasitol., **88**: 131–134.

5- Jenkins, DJ; Fraser, A; Bradshaw, H and Craig, PS (2000). Detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in Australian canids with natural or experimental infection. J. Parasitol., 86: 140–145.

6-Wachira, TM; Macpherson, CN and Gathuma, JM (1990). Hydatid disease in the Turkana District of Kenya, VII: analysis of the infection pressure between definitive and intermediate hosts of *Echinococcus granulosus*, 1979-1988. Ann. Trop. Med. Parasitol., 84(4): 361-8.

Evaluation of *Echinococcus granulosus* coproantigens by Dot-blotting in dogs

Hashemitabar,GH.R. Keywanloo,M and Razmi, GH.R.

Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

In the present study, dot-blotting test for *Echinococcus. granulosus*-specific coproantigens has been evaluated in dog. Three puppies of 2-3 months of age of mixed sex were treated by piperazine and a few days later their fecal samples were collected as pre-infection samples. Seven days after treatment, the puppies were fed with hydatid-cystic livers and lungs of sheep. At the end of each week (till 5 weeks) their fecal samples were collected as post-infection samples. Soluble protein of pre and post-infection of fecal samples were prepared and dot-blotting test was conducted. In another experiments, examination of egg of *Echinococcus. granulosus* were tested and then dot-blotting test also used for 15 fecal samples of dogs from Razi Veterinary hospital in Mashhad. For detection of protein bands (pre-infection and fifth post-infection week samples), polypeptide profile was analyzed by Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that, on first to fifth post-infection week samples, incremental of spot colors was observed in experimentally infected dogs. Dot- blot analysis of 15 fecal samples of dogs were positive, whereas, only 4 samples were positive in examination of egg of *Echinococcus. granulosus*. In SDS-PAGE, one band in pre-infection and four bands in fifth- post infection week samples were observed. The molecular weights of pre-infection sample of experimentally infected dogs was 16 kDa and also the molecular weight of the fifth post –infection week samples were 14, 22, 36, 45 kDa respectively. In conclusion, the results in this study indicated the value of the detectable of this method is doubtable and it is necessary to evaluate the *Echinococcus. granulosus*-specific coproantigens in dog by coproantigen-ELISA.

Key word: ***Echinococcus. granulosus,*** Coproantigens, Dot-blotting, Dog.