تنوع ژنتیکی آنتی ژن B۲ در ایزوله‌های حیوانی اکینوکوکوس گرانولوزوس در شهر تبریز

عباس شهبازی[۱]، ناهیده مظهری[۲]، اردوان قازانچایی[۲]، مجید خانمحمدی[۳]، اسماعیل فلاح*[۲]

چکیده

بیماری کیست هیداتید *(Cystic hydatid disease)* یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است. عامل بیماری انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* می‌باشد، که با رشد کیست‌های متاستود در میزبان واسط ایجاد می‌شود. با توجه به اینکه در تشخیص کیست هیداتید مشکلاتی همچون واکنش متقاطع آنتی بادی‌های موجود در سرم بیماران با سایر تنیاها و اختصاصی بودن پائین آنتی ژن‌های به کار رفته وجود دارد، این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی آنتی ژن B۲ طراحی شده است واطلاعات به دست آمده از آن در طراحی و استاندارد کردن تست‌هایی که از آنتی ژن B استفاده می‌کنند، ضروری است.۱۰۰ نمونه کیست هیداتید (۶۰ کیست گوسفندی و۴۰ کیست گاوی) از کشتارگاه شهر تبریز جمع‌آوری و از پروتواسکولکس‌های نمونه‌های گوسفندی و لایه زایای نمونه‌های گاوی DNA استخراج شد. طی واکنش PCR تمام نمونه‌های گوسفندی با پرایمر اختصاصی آنتی ژن B۲ تکثیر یافتند و بعد از انجام RFLP، در تمام ایزوله‌های گوسفندی الگوی یکسانی مشاهده شد، که بیانگر تشابه ژنتیکی درون سویه‌ای آنتی ژن B در ایزوله‌های گوسفندی می‌باشد. نمونه‌های گاوی با پرایمر اختصاصی آنتی‌ژن B۲ تکثیر نیافتند، که بیانگر تنوع ژنتیکی بین سویه‌ای آنتی ژن B در ایزوله‌های گاوی می‌باشد. تنوع ژنتیکی آنتی ژن B در ایزوله‌های مختلف *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در مناطق اندمیک به منظور طراحی و استاندارد کردن تست‌هایی که از این آنتی ژن برای تشخیص آنتی بادی‌های اختصاصی انسانی استفاده می‌کنند باید مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *اکینوکوکوس گرانولوزوس، آنتی‌ژن B، تنوع ژنتیکی، تبریز*

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۲

مقدمه

هیداتیدوزیس یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است (۱۶و۱۰). این بیماری در بیشتر نقاط جهان به ویژه در کشورهایی که دامپروری در آن رایج است شایع می‌باشد. این امر سالیانه زیان‌های بهداشتی و اقتصادی زیادی را به دنبال می‌آورد (۱۷و۱۳). عامل بیماری کرم نواری *اکینوکوکوس گرانولوزوس* می‌باشد که میزبان نهایی آن سگ و میزبان واسط آن انسان و علفخواران می‌باشند. هیداتیدوزیس با رشد کیست‌های متاستود در میزبان واسط ایجاد می‌شود(۱). آلودگی به این انگل در کشورهای حوزه مدیترانه، روسیه، خاورمیانه، خاوردور، استرالیا، زلاندنو، امریکا و آفریقا وجود دارد (۹و۴). طبق اطلاعات جهانی ایران یکی از مناطق هایپراندمیک می‌باشد (۱۷). سویه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس بر اساس میزان وفور در میزبان‌های واسط، G۱-۱۰ نامگذاری شده‌اند که فقط ۵ سویه ۷و۶و۵و۲و G۱ از انسان جدا شده است و می‌توانند آلوده کننده انسان باشند (۱۵). لارو کرم اکینوکوکوس گرانولوزوس لیپوپروتئینی به نام آنتی ژن B می‌سازد که قبل از ترشح شدن به درون مایع کیست هیداتید، توسط سلول های تگومنت پروتواسکولکس و به میزان کمتر در لایه زایا و مطبق کپسول زایا ساخته می‌شود (۲). این آنتی ژن مقاوم به حرارت بوده و یکی از فراوانترین آنتی ژن‌های انگل در مایع کیست هیداتید می‌باشد و به طور معمول برای تشخیص ایمونولوژیکی اکینوکوکوزیس به کار می‌رود (۱۸و۸). آنتی ژن B به وسیله خانواده ژنی رمزدهی می‌شوند که از ۵ لوکوس ژنی تشکیل یافته است و شامل ۵و۴و۳و۲و۱ Ag B می‌باشد که هر کدام با زیر واحد خاصی از آنتی ژن B مرتبط می‌باشد (۶). مقایسه پتانسیل تشخیصی آنتی ژن‌هایی که به وسیله این ژن‌ها رمزدهی می‌شوند، نشان داده است که آنتی ژن نوترکیب B۲ قدرت تشخیصی بهتری دارد(۱۸). کیفیت و چگونگی آنتی ژن B در بین میزبان‌های مختلف و مناطق

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
۲*- گروه انگل شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
Efallah37@gmail.com
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، گروه علوم آزمایشگاهی، مرند، ایران

اندمیک مختلف متغیر می‌باشد(۱۲). پیشنهاد شده است که تماس با ملکول‌ها و سلول‌های میزبان پروتئین‌های آنتی ژن را مستعد تغییر آنتی ژنیک می‌کند که کاربرد عملی آن را تحت تاثیر قرار می دهد؛ بنابراین ارزیابی آنتی ژن B تهیه شده از میزبان‌های مختلف *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در مناطق اندمیک باید مورد توجه قرار گیرد (۱۲).

از آنجایی که در تشخیص اولیه کیست هیداتید مشکلاتی همچون واکنش متقاطع در سرم بیماران مبتلا به سایر بیماری‌های انگلی وجود دارد؛ بنابراین استفاده از منبع مناسب جهت تهیه آنتی ژن B در رفع این مشکل بسیار مهم است. از بررسی تنوع ژنتیکی آنتی‌ژن B در طراحی، کاربرد و استاندارد کردن تست‌هایی که از آنتی ژن B برای تشخیص آنتی بادی‌های اختصاصی در انسان استفاده می‌کنند، لازم و ضروری است. تاکنون در کشور ایران مطالعه ای در این زمینه انجام نشده است و این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی آنتی ژن B، طراحی شده است.

مواد و روش کار

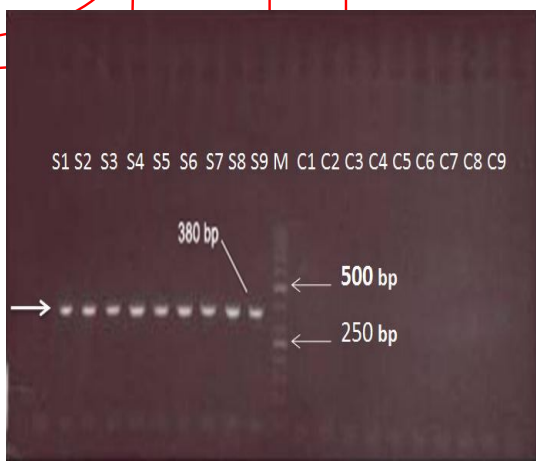
در این مطالعه ۱۰۰ نمونه کیست هیداتید از کشتارگاه تبریز تهیه شد که شامل ۶۰ عدد نمونه گوسفندی و ۴۰ عدد نمونه گاوی بود. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش میکروسکوپی جهت بررسی از نظر وجود پروتواسکولکس، در اتانول ۷۰٪ و دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۵). در مورد نمونه‌های گوسفندی مایع هر کیست هیداتید به وسیله سرنگ مجزا جداسازی گردید و بعد از ۵-۳ دقیقه سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰rpm، رسوب حاصله در زیر میکروسکوپ بررسی شد. پروتواسکولکس‌ها و کپسول‌های زایای به دست آمده، در اتانول ۷۰٪ ریخته شده و تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی، در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در مورد نمونه‌های گاوی به دلیل عدم وجود پروتواسکولکس، جهت استخراج DNA، لایه زایای هر کیست جداسازی شد. قبل از استخراج DNA، جهت حذف اتانول، پروتواسکولکس‌ها و لایه زایا چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس DNA به وسیله کیت تجاری استخراج DNA، AccuPrep® Genomic DNA Extraction kit طبق دستور شرکت سازنده کیت استخراج گردید.در این مطالعه واکنش PCR برای حجم ۲۵ میکرولیتر طراحی شد که شامل ۵۰ نانوگرم نمونه DNA و ۱۰pmol از هر پرایمر (Fernandez و همکاران(۵) و ۱۲/۵ µl 2x super hot PCR master mix (Emerald, Takara, Japan) و ۸/۵ µl H_2O بود. پرایمرهای مورد استفاده در سال ۱۹۹۶ توسط Fernandez et al(5) به کار گرفته شده اند.

F: 5-ATTTGTGGAGACAATCGC-3'
R: 5- AGGCAAATCATGTGTCCC-3'

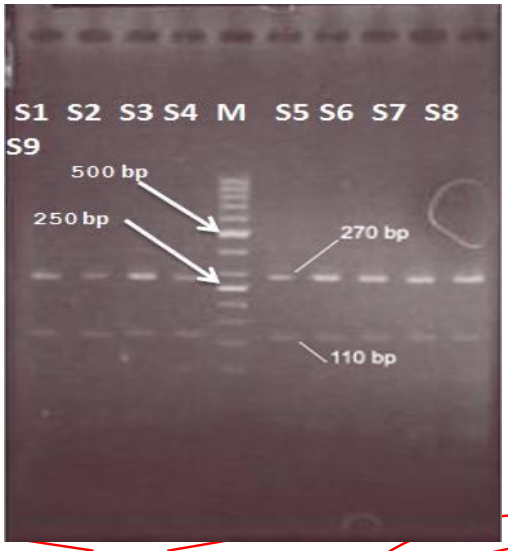
دستگاه ترمال سایکلر به شرح زیر تنظیم گردید: دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۵ دقیقه ۳۵ سیکل با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای آنیلینگ ۶۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای اکستنشن ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و اکستنشن نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. قطعه ژن تکثیر یافته (۳۸۷ bp)، در ژل آگارز ۱/۵ الکتروفورز شده، سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید و با دستگاه ترانس لومیناتور زیر اشعه ماورائ بنفش بررسی شد. قطعه مورد نظر از ژل بریده شده و با کیت استخراج DNA از ژل (Jena Bioscience) طبق دستور شرکت سازنده جداسازی شد. سپس بر روی قطعه جدا شده، RFLP انجام گرفت که طی آن، اثر آنزیم‌های محدود کننده (Jena Bioscience) ALUI , EcoRI بر روی قطعه ژن مورد نظر بررسی شد(۱۵). در انجام RFLP، نمونه‌ها در بافر مربوطه و دمای ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. سپس عمل برش آنزیم‌های محدود کننده، با حرارت دادن در دمای ۶۵ درجه به مدت ۲۰ دقیقه متوقف گردید. قطعات به دست آمده در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی ودر زیر اشعه ماورا بنفش بررسی شدند(۱۵).

نتایج

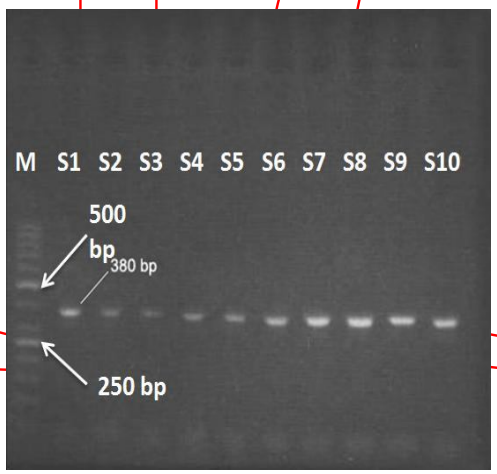
در این مطالعه تنوع ژنتیکی قطعه ژن مربوط به آنتی ژن B۲ در ایزوله‌های گوسفندی و گاوی بررسی شد. در مورد نمونه‌های گوسفندی بعد از انجام PCR و الکتروفورز، محصولاتی به اندازه ۳۸۷ bp مشاهده شد. در مورد نمونه‌های گاوی پس از انجام PCR و الکتروفورز باند اختصاصی آنتی ژن B۲ با وزن مولکولی ۳۸۷ bp مشاهده نشد(نگاره ۱). سپس باندهای به دست آمده از نمونه‌های گوسفندی به وسیله آنزیم های محدودکننده (AluI & Eco RI) برش داده شد. تمام نمونه‌ها بعد از برش با آنزیم AluI الگوی یکسانی (۲۷۰ bp و ۱۲۰) ارائه دادند (نگاره ۲) و بعد از انکوبه کردن با آنزیم Eco RI هیچ برشی مشاهده نشد (نگاره ۳). نتایج RFLP نشان دهنده تشابه ژنتیکی قطعه ژن مربوط به آنتی ژن B در ایزوله‌های گوسفندی می‌باشد که می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که آنتی ژن B در ایزوله گوسفندی تنوع درون سویه‌ای ندارد. از طرف دیگر، عدم وجود قطعه ژن مورد نظر در نمونه‌های گاوی و وجود آن در نمونه‌های گوسفندی می‌تواند نشان دهنده تنوع ژنتیکی بین سویه‌ای آنتی ژن B۲ باشد.



نگاره ۱ـ محصول PCR قطعه ژنی مربوط به Ag B2 در ایزوله‌های گوسفندی و گاوی *اکینوکوکوس گرانولوزوس*.S : گوسفند C: گاو M: مارکر



نگاره ۲ـ الگوی RFLP قطعه ژنی مربوط به AgB2 با آنزیم ALU1 در ایزوله‌های گوسفندی اکینوکوکوس گرانولوزوس S: گوسفند M: مارکر



نگاره ۳ـ الگوی RFLP قطعه ژنی مربوط به AgB2 در ایزوله‌های گوسفندی با آنزیم ECOR1: S : گوسفند M: مارکر

بحث

روش PCR-RFLP و تعیین توالی DNA به طور وسیعی برای شناسایی سویه‌ها و تشخیص پلی مورفیسم DNA استفاده می‌شود. پلی مورفیسم آنتی ژن B در یک مطالعه با روش SSCP در ترکیه بررسی شده است و نتایج حاصله

بیانگر این است که این آنتی ژن دربین ایزوله‌های انسانی و حیوانی فقط در یک مورد پلی مورفیسم داشته و بقیه موارد مطابق هم بوده‌اند(١٤). همچنین تنوع ژنتیکی این آنتی ژن در مطالعه‌ای دیگر در مصر با روش RFLP-PCR بررسی شده است که در این مطالعه از دو آنزیم ALUI , EcoRI استفاده شده است و نتایج نشان داده است که آنتی ژن B در ایزوله انسانی با گوسفندی ١٠٠٪ با خوکی ٩٦٪ و با سویه شتری ٩٩٪ تشابه داشته است (١٥). در مطالعه کنونی، تنوع ژنتیکی آنتی ژن B در ایزوله‌های گاوی و گوسفندی کیست هیداتید جمع‌آوری شده از کشتارگاه شهر تبریز، با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی گردید و الگوی برش با آنزیم ALUI، در تمام ایزوله‌های گوسفندی یکسان بود که بیانگر وجود تشابه ژنتیکی در قطعه ژن مربوط به آنتی ژنB٢ در ایزوله‌های مربوط به یک سویه (گوسفندی) می‌باشد. در مطالعه ای که در آرژانتین توسط Muzulin و همکاران انجام شد، تنوع ژنتیکی آنتی ژن مذکور بررسی گردید و نتایج نشان داد که آنتی ژن B٢و٤ فقط در سویه G١ (سویه گوسفندی) رونویسی می‌شود و در سویه‌های G٧ و G٦ و G٥ (گاوی، شتری و خوکی) نقش خاصی ندارد(١١). همچنین در مطالعه ای که توسط Kamenetzky و همکاران (٧) با روش PCR–SSCP به عمل آمد، نتایج نشان داد که آنتی ژنB٢ به طور انحصاری در سویه گوسفندی وجود دارد و تنها در این سویه رونویسی می‌شود و در سویه های گاوی، شتری و خوکی رونویسی نمی‌شود، که این یافته‌ها با یافته‌های به دست آمده از مطالعه انجام شده در آرژانتین (١١) سازگار می‌باشد و این امر بیانگر این مطلب است که آنتی ژنB٢ درایزوله‌های به دست آمده از یک سویه تنوع ژنتیکی ندارد؛ بلکه این تنوع در بین سویه‌ها وجود دارد (٧). در این تحقیق DNA به دست آمده از لایه زایای ایزوله‌های گاوی، با پرایمر مربوط به آنتی ژنB٢ تکثیر نیافت و باند مشاهده شده در ایزوله‌های گوسفندی، در ایزوله‌های گاوی مشاهده نشد که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بین سویه‌ای می‌باشد. با توجه به اینکه کیست‌های گاوی استریل بوده و در مطالعه میکروسکوپی پروتواسکولکسی به دست نیامد و از طرفی پروتواسکولکس‌ها از تکثیر غیرجنسی لایه زایا حاصل می‌شوند هدف از مطالعه نمونه‌های گاوی بررسی امکان جداسازی آنتی ژن B از لایه زایای کیست‌های استریل (به عنوان منشاء پروتواسکولکس) و همچنین بررسی وجود پلیمورفیسم درآنها بوده است. در حالت کلی مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر، به دلیل تفاوت در تکنیک‌های به کار گرفته شده، محدود می‌باشد. Rosenzvit و همکاران (٢٠٠٦) پیشنهاد کرده اند که تماس با ملکول ها و سلول‌های میزبان پروتئین‌های آنتی ژن B را مستعد تغییر آنتی ژنیک می‌کند که کاربرد عملی آن را تحت تاثیر قرار می دهد؛ بنابراین ارزیابی آنتی ژن B تهیه شده از میزبان‌های مختلف *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در مناطق اندمیک باید مورد توجه قرار گیرد (١٢). تشخیص سریع آلودگی به *اکینوکوکوس گرانولوزوس*، نقش مهمی در بهبود کنترل و درمان بیماری می‌تواند داشته باشد؛ به این منظور امروزه از تست‌های حساسی همچون الایزا، ایمنوبلاتینگ و ایمنوفلورسنت استفاده می‌شود هر چند تست الایزا به دلیل حساسیت بیشتری دارد، جهت تشخیص آنتی بادی‌های اختصاصی در انسان بیشتر استفاده می‌شود؛ با این حال کارایی هر تست سرولوژیک بستگی به اختصاصیت آنتی ژن‌های به کار رفته در آن دارد. مایع کیست هیداتید منبع تهیه آنتی ژن B در تست‌های سرولوژیک می‌باشد(١٨) ولی مشکلاتی همچون واکنش‌های متقاطع آنتی بادی موجود در سرم بیماران با سایر تنیاها و اختصاصی بودن و حساسیت پائین این آنتی ژن‌ها همچنان وجود دارد (٣)؛ لذا استفاده از آنتی ژن مناسب در رفع این مشکل بسیار مهم است. اطلاعات به دست آمده از بررسی تنوع ژنتیکی در طراحی، کاربرد و استاندارد کردن تست‌هایی که از آنتی ژن B برای تشخیص آنتی بادی‌های اختصاصی انسانی استفاده می‌کنند کاربردی است.

تشکر و سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و به عنوان طرح شماره ۰۳- ۹۱ آن مرکز اجرا گردیده است و این مقاله منتج از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد خانم ناهیده مظهری با شماره پایان نامه ۱/۵ – ۹۰/۲ می‌باشد. نویسندگان بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران این مرکز و آقای احد بازمانی جهت همکاری در انجام این مطالعه و مدیریت کشتارگاه تبریز جهت جمع آوری نمونه‌ها اعلام می‌نمایند.

فهرست منابع

۱. ارباب، م.، مسعود، ج.، دلیمی اصل، الف.، سجادی، س. (۱۳۷۷): بررسی میزان شیوع هیداتیدوزیس در تشخوارکنندگان کشتار شده در همدان. مجله دانشور. ۵۷-۶۲:۵.

2. Arend, A.C., Zaha, A., Ayala, F.J., Haag, K.L. (2004): The Echinococcus granulosus antigen B shows a high degree of genetic variability. Exp. Parasitol. 108: 76-80.
3. Babba, H., Messedi, A., Masmoudi, S. (1994): Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 64-68.
4. Eslami, A. (1998): Veterinary helminthology. Tehran University press, Iran. p: 551-553.
5. Fernandez, V., Ferreira, H.B., Fernandez, C., Zaha, A., Nieto, A. (1996): Molecular characterization of a novel 8-kDa subunit of Echinococcus granulosus antigen B. Mol. Biochem. Parasitol. 77: 247-250.
6. Haag, K.L., Alves-Junior, L., Zaha, A., Ayala, F.J. (2004): Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the Echinococcus granulosus antigen B gene family. Gene. 333: 157-167.
7. Kamenetzky, L., Muzulin, P.M., Gutierrez, A.M., Angel, S.O., Zaha, A., Guarnera, E.A., Rosenzvit, M.C. (2005): High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of Echinococcus granulosus. Camb. j. 131: 805-815
8. Maddison, S.E., Slemenda, S.B., Schantz, P.M., Fried, J.A., Wilson, M., Tsang V.C.W. (1989): A specific diagnostic of antigen Echinococcus granulosus with an apparent molecular weight of 8 kDa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40: 377-383.
9. Mobedi, I., Dalimi-Asl, A. (2006): Epidemiology of hydatid cyst in the world and Iran. Ketab azargan press, Iran. p: 138-44.
10. Muller, R. (2002): Worms and human diseases 2nd edition. CABI Publishing, London. p: 85-94.
11. Muzulin, P.M., Kamenetzky, L., Gutierrez, A.M., Guarnera, E.A., Rosenzvit, M.C. (2008): Echinococcus granulosus antigen B gene family: further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. Exp. Parasitol. 118: 156-164.
12. Rosenzvit, M.C., Camicia, F., Kamenetzky, L., Muzulin, P.M., Gutierrez, A.M. (2006): Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from Echinococcus granulosus. Parasitol. Int. 55: 63-67.
13. Schantz, P.M. (1991): Parasitic zoonoses in perspective. Int J Parasitol. 21: 161-170.
14. Simsek, S., Ozcetin, C., Balkaya, I. (2011): Detection of Polymorphism in AgB1 gene from Sheep, Cattle and Human Isolates of Echinococcus granulosus by SSCP. Vet. Par. 21: 109-117.
15. Tawfeek, G.M., Elwakil, H.S., Awad, N.S., El-Hoseiny, L., Thabet, H.S. (2009): Genetic variability of antigen B among Echinococcus granulosus Egyptian Isolates. Korean J. Parasitol. 47: 259-264
16. Thompson, R. C. A., McManus, D. P. (2002): Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus. Trends Parasitol. 18:452–457.
17. Todorov, T., Boeva, V. (1999): Human Echinicoccosis in Bulgaria: a comparative epidemiological analysis. Bull World Health Organ. 77(2): 110-118.
18. Virginio, V.G., Fernandez, A., Rott, M.B., Monteiro, K.M., Zandonai, A.F., Nieto, A., Zaha, A., Ferreira, H.B. (2003): A set of

recombinant antigens from Echinococcus granulosus with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. Clin. Exp. Immunol. 132: 309-315.

JCP