تشخیص *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* با به کارگیری تکنیک PCR و با استفاده از ژن 18S rRNA

رقیه نوروزی[۱*]، آرمان منوچهری[۲]، پریسا شهبازی[۳] و معصومه فیروزامندی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۶

چکیده

استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس (*Strongyloides papillosus*) نماتود مهم روده‌ای نشخوارکنندگانی مانند گاو، گوسفند و بز است که به صورت متناوب سیکل انگلی (Parasitic) و آزادزی (free-living) را طی می‌کند و باعث ایجاد چرخه‌های عفونت خود به خودی (Autoinfection) در میزبانان می‌گردد. این عفونت در نشخوارکنندگان بالغ معمولاً بدون علامت می‌باشد ولی در نشخوارکنندگان جوان (گوساله‌ها و بره‌ها) ایجاد استرونژیلوئیدیازیس کشنده و سندرم مرگ ناگهانی (sudden death syndrome) می‌کند که این سندرم به دلیل اختلالات قلبی در اثر حضور لاروها در دهلیز و بطن قلب، اتفاق می‌افتد. هدف این تحقیق، به کارگیری تکنیک PCR جهت تشخیص آلودگی ناشی از *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* در نمونه‌های مدفوع گاو، گوسفند و بز در استان کردستان می‌باشد. در این بررسی ۳۰ نمونه مدفوع گاو، ۳۰ نمونه مدفوع گوسفند و ۳۰ نمونه مدفوع بز از نظر آلودگی به لارو *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس*، به روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن 18S rRNA مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که ۲۹ نمونه‌ی گاوی (۹۶/۷ درصد)، ۱۲ نمونه گوسفندی (۴۰ درصد) و از ۱۵نمونه بزی (۵۰ درصد) آلوده به *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* بودند. با انجام این بررسی می‌توان نتیجه گرفت روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن 18S rRNA در تشخیص نماتود *استرونژیلوئیدس پاپیلوسوس* مناسب می‌باشد.

کلمات کلیدی: *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس*، PCR، ژن 18S rRNA و استان کردستان

مقدمه

کرم‌های استرونژیلوئیدس، جزو نماتودهای انگلی هستند که ۵۰ گونه از آن‌ها تا به حال شناخته شده است و قادر هستند دستگاه گوارش پستانداران، پرندگان، خزندگان و دوزیستان را آلوده نمایند و در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان از انتشار بالایی برخوردار هستند (Vadlamudi et al. 2006). این نماتودها به صورت متناوب سیکل انگلی (Parasitic) و آزادزی (free-living) را طی می‌کنند. آلودگی در بدن میزبانان می‌تواند عفونت خود به خودی داخلی و خارجی را ایجاد نماید و در صورت سرکوب سیستم ایمنی میزبان، به شکل ازدیاد عفونت (hyperinfection) بروز نماید. در این صورت، تعداد زیادی از لاروها، اندام‌های خارج روده‌ای از جمله ریه‌ها، گره‌های لنف مزانتریک، کیسه‌ی صفرا، کبد، دیافراگم، قلب، پانکراس، ماهیچه‌ی اسکلتی، کلیه‌ها، مغز و به مقدار کم‌تر پوست را درگیر می‌کنند (Fabian et al. 2013).

از بین تمام گونه‌ها *Strongyloides papillosus* در گاو، گوسفند و بز ایجاد آلودگی می‌کند. در نشخوارکنندگان بالغ معمولاً بدون علامت می‌باشد ولی در نشخوارکنندگان جوان (گوساله‌ها و بره‌ها) ایجاد

[۱*] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز E-mail: r.norouzi@tabrizu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز

[۳] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز

استرونژیلوئیدیازیس کشنده و سندرم مرگ ناگهانی (sudden death syndrome) می‌نماید. این سندرم به دلیل اختلالات قلبی در اثر حضور لاروها در دهلیز و بطن قلب، اتفاق می‌افتد. *Strongyloides papillosus* می‌تواند به عنوان مشکل جدی در فارم‌های پرورش حیوانات اهلی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری مطرح باشد (Alexander et al. 2008).

آلودگی به استرونژیلوئیدس معمولاً در بالغین فاقد علامت است ولی زمانی که حیوان مخصوصاً نوزادان در معرض تعداد زیادی لارو قرار گیرند علائمی مانند بی-اشتهایی، کاهش وزن، اسهال و گاهاً سرفه را بروز می‌دهند و در آلودگی‌های شدید مرگ اتفاق می‌افتد (Watson 1990).

مرگ و میر بره‌ها و گوساله‌ها، اهمیت اقتصادی دام‌ها، داشتن دو سیکل انگلی و آزادزی، نبودن خصوصیات مورفولوژی واضح در افتراق گونه *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* از گونه‌های دیگر و نیز مشکلات تشخیصی، باعث سردرگمی در تشخیص این انگل شده است و از آنجایی که تشخیص گونه در شناخت و قطع چرخه‌ی انتقال انگل ضرورت دارد و روش میکروسکوپی قادر به انجام آن نیست بر آن شدیم تا در این تحقیق از روش PCR برای تشخیص *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* استفاده کنیم. جهت انجام PCR ژن 18S rRNA به عنوان کاندید مناسب انتخاب شد و پرایمرهای اختصاصی برای آن‌ها طراحی گردید.

در ایران آمار دقیق و کاملی از میزان بروز یا شیوع استرونژیلوئیدیازیس در دسترس نیست. به دلیل اهمیتی که بررسی شیوع انگل در هر ناحیه، در کنترل و درمان آن بیماری دارد تعیین نسبت آلودگی در هر منطقه ضروری به نظر می‌رسد. این تحقیق در نوع خود منحصر به فرد بوده و در داخل کشور مشابه آن انجام نشده است.

مواد و روش کار

تعداد کل دام‌های استان دو میلیون و سیصد هزار رأس به تعداد ۳۸ درصد گوسفند و بره، ۱۲ درصد بز و بزغاله، ۴۴ درصد گاو و گوساله و ۶ درصد آن را تک‌سمی‌ها تشکیل می‌دهد. همچنین استان با داشتن حدود ۳/۵ میلیون واحد دامی از تراکمی به میزان دو برابر سطح کشور برخوردار است. نقشه‌ی جغرافیایی استان در شکل ۱ آورده شده است. در این مطالعه ۹۰ نمونه به شکل تصادفی شامل ۳۰ نمونه مدفوع گاو، ۳۰ نمونه مدفوع گوسفند و ۳۰ نمونه مدفوع بز مستقیماً از رکتوم اخذ و از نظر آلودگی به لارو استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس به دو روش مستقیم و تغلیظی فرمالین-اتیل استات مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از این که مثبت بودن آن‌ها اثبات شد؛ نمونه‌های مدفوع کشت داده شده و بعد از ۱۰-۷ روز لاروهای فیلاریفرم به روش برمن جمع‌آوری و برای استفاده در مراحل بعد در الکل ۷۰ درصد نگهداری شد.

جهت از بین بردن دیواره کوتیکولی لاروهای فیلاریفرم، سه بار در ۸۰- فریز و دفریز انجام شد. برای استخراج DNA ۵۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۱ درصد و SDS ۱ درصد به تیوب اپندورف حاوی ۲۵۰ میکرولیتر نمونه لارو جمع‌آوری شده اضافه شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول حاوی فنول، الکل و کلروفرم یه محلول فوق اضافه شد و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰۰ مایع رویی جداسازی و با کلروفرم شسته شد. آنگاه ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد و ۶۰ میکرولیتر سدیم استات اضافه شد. محصول این مرحله در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در این مرحله مایع رویی جدا و به رسوب حاصله یک میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد اضافه شد و پس از سانتریفوژ مجدد الکل ۷۰ درصد جداسازی و به رسوب ۵۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده گردید. محصول استخراج بعد از قرائت OD آن با اسپکتوفتومتر وارد

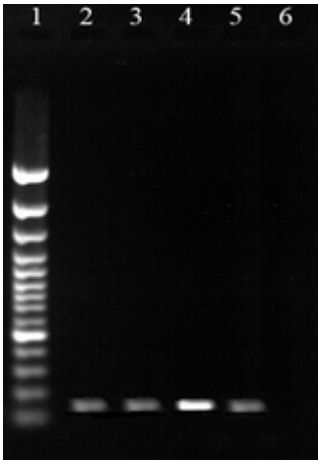
واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی با توالی رفت 5'-GAGAAACGGCTACCACATCCA-3' و توالی برگشت 5'-AAGGAAAGGGCAAGTCTGGT-3' انجام گردید.

به منظور انجام PCR به تیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر که حاوی ۲/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۱۰۰ میکرو مولار دی‌نوکلئوتید تری فسفات، ۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز هستند ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده اضافه و سپس ۲۰ پیکومول از پرایمر رفت و برگشت اضافه گردید و حجم نهایی با آب مقطر تزریقی به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. در مرحله‌ی اول PCR، اول نمونه‌ها در ۹۴ به مدت ۵ دقیقه به منظور denaturation اولیه و سپس ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ به مدت ۳۰ ثانیه برای annealing و ۷۲ به مدت ۱ دقیقه به منظور extension به تعداد ۳۵ سیکل قرار داده شدند. Extension نهایی به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی ۱ میکرولیتر DNA safe stain انتقال و با استفاده از بافر الکتروفورز در میدان الکتریکی پتانسیل ۹۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد . نهایتاً به دستگاه ترانس ایلومیناتور (UVdoc) منتقل و تصاویر آن گرفته شد.

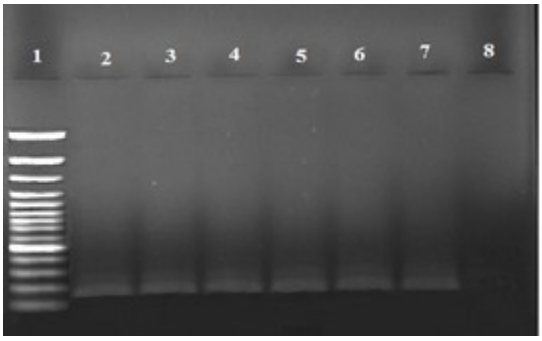
شکل ۱: نقشه‌ی جغرافیایی استان کردستان

نتایج

از مجموع ۹۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از ۳۰ گاو، ۳۰ گوسفند و ۳۹ بز از استان کردستان، ۲۹ نمونه گاوی (۹۶/۷ درصد)، ۱۲ نمونه گوسفندی (۴۰ درصد) و از ۱۵ نمونه بزی (۵۰ درصد) آلوده به *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* بودند. بعد از تهیه‌ی لام مستقیم و انجام روش تغلیظ فرمالین–اتیل استات که مثبت بودن نمونه‌ها اثبات شد. کشت و جمع‌آوری لاروها انجام و لاروها وارد فرآیند استخراج DNA و PCR شدند. در شکل ۳ نتیجه‌ی PCR جهت تکثیر قطعه‌ی ۱۶۵bp با دماهای متفاوت آنیلینگ نشان داده شده است. در شکل ۳ باندهای محصول PCR گاوهای آلوده به لارو *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* به دست آمده از استان کردستان آورده شده است.



شکل ۲: نتیجه PCR با دماهای متفاوت آنیلینگ (Annealing): چاهک ۱: مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۲: دمای ۶۰ درجه، چاهک ۳: دمای ۵۸ درجه، چاهک ۴: دمای ۵۵ درجه، چاهک ۵: دمای ۵۳ درجه و چاهک ۶: کنترل منفی



شکل ۳: باندهای PCR حاصل از لارو *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* ایزوله شده از گاوهای آلوده استان کردستان: چاهک ۱: مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۷–۲ نمونه‌های مثبت، چاهک ۸: کنترل منفی

بحث

با توجه به شیوع انگل *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* در جهان و ایجاد استرونژیلوئیدیازیس کشنده در حیوانات جوان این عفونت می‌تواند به عنوان مشکل جدی در فارم‌های پرورش حیوانات اهلی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مطرح شود (Nakamura et al. 1994). نبودن خصوصیات مورفولوژی واضح در افتراق یک گونه *استرونژیلوئیدس* از گونه‌های دیگر باعث سردرگمی در تشخیص این انگل به روش میکروسکوپی شده است. از آنجایی که تشخیص صحیح انگل، در شناخت و قطع چرخه‌ی انتقال لازم و ضروری است و در کشور ایران مطالعه مولکولی اصلاً انجام نشده است؛ این تحقیق جهت set up واکنش PCR برای تشخیص صحیح انگل انجام شده است.

در سال ۱۹۵۵ Eslami و همکاران، میزان آلودگی گاوهای ایران به *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* را ۲ درصد و گوسفندان را ۳۵ درصد گزارش نمودند که بیش‌تر آلودگی در شرایط نگهداری ضعیف از نظر بهداشتی دیده شد و از این میزان هم ۹۰ درصد آلودگی در بره‌ها و گوساله‌های شیرخوار مشاهده گردید. Alborzi و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان آلودگی گاو و گاومیش‌های استان خوزستان را ۴۴/۷۷ درصد گزارش نمودند. Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۰ میزان ابتلا گوسفندان استان گرگان و مشهد را ۱/۳ درصد گزارش کردند. نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که میزان ابتلای گاوهای استان کردستان به *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* ۹۶/۷ درصد، گوسفندان ۴۰ درصد و بزها ۵۰ درصد می‌باشد که از سایر تحقیقات انجام شده در سایر نقاط ایران بالاتر می‌باشد و نیز روی بزها مطالعه‌ای انجام نشده است . همچنین در ایران هیچ گونه مطالعه و تشخیص مولکولی در مورد *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* انجام نشده است.

Nakamura و همکاران در سال ۱۹۹۴ وجود یک کرم ماده *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* را عامل مرگ ناگهانی یک بره به دلیل ایست قلبی گزارش نمودند. ورود انگل از طریق پوست یا از راه دهان به بدن حیوانات می‌تواند باعث بروز مشکلات پوستی، ریوی و گوارشی به دلیل انتقال میکروب‌ها گردد. مثلاً Tiara و همکاران در سال ۱۹۹۱ وقوع یک همه‌گیری و تلفات ناگهانی در گوساله-های گوشتی با چرای آزاد در مرتع همراه با تب و عوارض ریوی در جمهوری چک در اثر ابتلا به *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* گزارش نمودند و نیز درماتیت ناشی از استرونژیلوئیدیازیس در بره‌های یک گله‌ی ۲۵۰ رأسی در ایالت ویرجینیای آمریکا توسط Cithwood در سال ۱۹۹۲ گزارش شد. در سال ۲۰۰۹ در یکی از دامداری‌های اطراف تهران ۱۰ رأس بره و بزغاله (۱۰ درصد) از گله‌ی ۱۰۰ رأسی در ظرف یک هفته تلف شدند که در معاینات بالینی ریزش مو و پشم به شکل کانونی و وجود دمل‌های چرکی در اندام‌های حرکتی مشهود بود؛ Moriyan و همکاران دلیل مرگ را ابتلا به *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* گزارش کردند و نیز در نوک انگشت دست کارگر دامداری یک زخم وجود داشت که از آن نیز لارو *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* جدا شد (Moriyan et al. 2009). Alexander و همکاران در سال ۲۰۰۷ رابطه‌ی فیلوژنتیک بین *استرونژیلوئیدس پاپیلوزوس* و *استرونژیلوئیدس رتی* و *استرکورالیس* را پیدا کردند.

در سال ۲۰۱۱ Kramme و همکاران گونه‌های مختلف استرونژیلوئیدس را با استفاده از روش real-time PCR و ژن 28S rRNA ردیابی نمودند. Eberhardt و همکاران در سال ۲۰۰۸ درخت فیلوژنی *استرونژیلوئیدس پاپیلوسوس*، *ویچولی*، *استرکورالیس* و *رتی* را رسم نمود و ریشه‌ی مشترک *استرونژیلوئیدس پاپیلوسوس* و *استرکورالیس* را نشان داد. Hasegawa و همکاران در سال ۲۰۰۹ چهار نقطه‌ی بسیار متغیر در ژن 18S rRNA پیدا کردند که با استفاده از آن توانستند ۱۵ گونه از جنس-های استرونژیلوئیدس را از هم متمایز سازند. در مطالعه‌ای

Elbahy و همکاران در ۲۰۱۴ روش RAPD-PCR را برای تشخیص همزمان بعضی از گونه‌های نماتودی مانند *همونکوس کونتورتوس*، *آسترتاژیا آسترتاژی*، *تریکیوریس اویس*، *کوپریا کورتیسی* و *استرونژیلوئیدس پاپیلوسوس* استفاده نمودند و در این تحقیق از توالی‌های الیگونوکلئوتیدی به عنوان پرایمر استفاده کردند. در ایران هیچ‌گونه تحقیق مولکولی بر روی *استرونژیلوئیدس پاپیلوسوس* انجام نشده است و برای تشخیص آن از روش PCR استفاده نشده است و این تحقیق اولین تحقیق و تشخیص مولکولی بر روی آن می‌باشد. با توجه به این که نمونه‌های مثبت حاصل از آزمایش مستقیم برای PCR انتخاب شدند بنابراین آزمایش مستقیم به عنوان آزمایش استاندارد یا گلدن محسوب می‌گردد ولی جهت افتراق گونه‌ی *استرونژیلوئیدس* از سایر لاروهای مشابه، انجام PCR لازم و ضروری می‌باشد.

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن 18S rRNA در تشخیص نماتود *استرونژیلوئیدس پاپیلوسوس* مناسب می‌باشد.

منابع

Alborzi, A. and Farmani, A. (2008). Survey on intestinal parasites infection of buffalo calves in Ahvaz. 6th Iranian National Congress of Parasitology, 537.

Chitwood, B.G. (1992). The association of *Strongyloides* with dermatitis in lambs, Ameriacan veterinary Journal, 93: 35-40.

Eberhardt, A.G.; Mayer, W.E.; Bonfoh, B. and Streit, A. (2008). The *Strongyloides* (Nematoda) of sheep and the predominant *Strongyloides* of cattle form at least two different, genetically isolated populations. Vet Parasitology, 157 (1-2): 89-99.

Elbahy, N. and Khalafalla, R. (2014). Molecular diagnostic of some nematode species infecting ruminants in Egypt. International Journal of Basic and Applied Sciences, 344-8.

Eslami, A.; Veterinary Helminthology Vol. III Nematoda and Acanthocephala. 2nd ed. Tehran University Publication, 1997.

Fabian, S.; Odermatt, P.; Khieua, V.; Panning, M.; Duong, S.; Muthc, H.M. and Kramme, S. (2013). Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. Acta Tropica, 126 (2): 89-92.

Hasegawa, H.; Hayashida, S.; Ikeda, Y. and Sato, H. (2009). Hyper-variable regions in 18S rDNA of *Strongyloides* spp. as markers for species-specific diagnosis-Parasitol, 104 (4): 869-74.

Kramme, S.; Nissen, N.; Soblik, H.; Erttmann, K.; Tannich, E.; Fleischer, B. et al. (2011). Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. Journal of Medical Microbiology, 60 (Pt 4): 454-458.

Moriyan, S.J.; Mohammadi, A.R.; Hamidiye, H. and Ghadiri adyaneh, M. (2009). A report on the occurrence of acute strongyloidosis in a sheep from around Tehran and concurrent occurrence of its dermal complication in a farm worker. Veterinary Journal of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch, 3 (3): 605-608.

Nakamura, Y.; Tsuji, N.; Taira, N. and Hirose, H. (1994). Parasitic females of *Strongyloides papillosus* as a pathogenetic stage for Sudden Cardiac Death in infected Lambs. Journal of Veterinary Medical Science, 56 (4): 723-727.

Razmi, Gh.R. and Borji, H. (2000). A survey of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep. 1th Iranian cingress of neterinary basic science, 238.

Tiara, T. and Ura, S. (1991). Sudden death in calves associated with *Strongyloides papillosus* infection. Veterinary parasitology, 39 (3-4): 313-319.

Vadlamudi, R.; SChi, D. and Krishnaswamy, G. (2006). Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. Clinical and Molecular Allergy, 4-8.

Watson, J.M. (1990). Medical Helmitology. Baillier Tindall and Cox, London, 121-150.

Diagnosis of *Strongyloides papillosus* by using of PCR method and 18S rRNA gen

Norouzi, R.[1]; Manochehri, A.[2]; Shahbazi, P.[1] and Firouzamandi, M.[1]

Received: 28.10.2017 Accepted: 16.03.2017

Abstract

Strongyloides papillosus is an important intestinal nematodes in ruminants including, calf, sheep and goat that their life cycle alternates between free-living and parasitic generations and autoinfection can occur in hosts. This infection in adult ruminants asymptomatic but in young ruminant (calves and lambs) is causing severe strongyloidiasis and sudden death syndrome. *Strongyloides papillosus* causes sudden cardiac arrest by ventricular fibrillation which is preceded by continuous sinus tachycardia in calves and lambs. The main objective of this study, was to determine the prevalence of *Strongyloides papillosus* infection in livestock faecal samples by using PCR in Kurdistan province. In this present, 30 calf faecal samples, 30 sheep faecal samples and 30 goat faecal samples were examined by PCR with specific primers from the 18srRNA gene of *Strongyloides papillosus*. The results of this study, revealed that 29(96.7%) of calf samples, 12(40%) of sheep samples, and 15(50%) of goat samples infected with *Strongyloides papillosus.* Results of this study revealed an application of PCR method for amplification of 18srRNA gene for diagnosis of *Strongyloides papillosus* nematod is appropriate.

Key words: *Strongyloides papillosus*, PCR, 18S rRNA gen, Kurdistan Province

1- Assistance Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- MSc Student of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz Tabriz, Iran
Corresponding Author: Norouzi, R.., E-mail: r.norouzi@tabrizu.ac.ir