

## مقایسه الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های لینگواتولا سراتا در نشخوارکنندگان اهلی و سگ به روش SDS- PAGE

فرید رضایی<sup>۱\*</sup>، موسی توسلی<sup>۲</sup> و مریم کریمی دهکردی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵

<sup>۱</sup> استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

<sup>۲</sup> استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

\*مسئول مکاتبه: [E-mail: f.rezaei@razi.ac.ir](mailto:f.rezaei@razi.ac.ir)

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** لینگواتولا سراتا یک انگل مشترک انسان و دام است و طیف وسیعی از حیوانات از جمله انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و بیماری‌های متعددی ایجاد می‌نماید. فرم بالغ این انگل در مجاری فوقانی تنفسی سگ‌سانان زندگی می‌کند و طیف وسیعی از علف خواران به ویژه نشخوارکنندگان به عنوان میزبان واسط عمل می‌کنند که نوچه انگل در اندام‌های احشایی به ویژه غدد لنفاوی مزانتریک آن‌ها یافت می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی مقایسه الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های لینگواتولا سراتا فرم بالغ و نوچه به دست آمده از میزبان‌های مختلف بود. روش کار: در این مطالعه، لینگواتولا سراتا بالغ جنس نر و ماده از مجاری فوقانی تنفسی سگ‌های تلف شده در اثر تصادف جاده‌ای و نوچه لینگواتولا سراتا از غدد لنفاوی مزانتریک بز، گاو میش، گوسفند، گاو و شتر کشتار شده در کشتارگاه جداسازی و به صورت جداگانه ذخیره شد. پس از تهیه عصاره غلظت پروتئین‌های نمونه‌های انگلی به روش برادفورد مورد سنجش قرار گرفت و در نهایت با استفاده از روش SDS- PAGE، الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های انگل در نشخوارکنندگان مختلف و سگ مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** در الکتروفورز پروتئین‌های سوماتیک گروه‌های مختلف نوچه‌ها، ۲ باند پپتیدی به خوبی واضح با وزن‌های تقریبی ۶۲ و ۵۳ کیلودالتون در ژل SDS-PAGE مشاهده شد. در اشکال بالغ، تنها باند پپتیدی با وزن تقریبی ۶۲ کیلودالتون حضور داشت. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج حاصله نشان می‌دهد حضور باند پپتیدی با وزن تقریبی ۶۲ کیلودالتون در تمام گروه‌های مورد مطالعه، ممکن است نشان‌دهنده برخی ویژگی‌های بیولوژیک آن باشد و به ویژه چنانچه با سویه‌های متفاوت انگل مواجه باشیم این تفاوت‌ها تعیین کننده است و می‌تواند در طراحی آزمون‌های سرولوژیکی کارآمد جهت تشخیص آلودگی‌ها در میزبان‌های مختلف مفید باشد.

**واژگان کلیدی:** لینگواتولا سراتا، الکتروفوریتیک، سگ، نشخوارکنندگان اهلی، SDS-PAGE

بیماری‌های انگلی ناشی از غذا یک تهدید بالقوه برای سلامتی انسان است و به لحاظ اهمیت می‌توان آن را در

مقدمه

کنار سه بیماری مهم ایدز، سل و مالاریا قرار داد (اسلام و همکاران ۲۰۱۸). یکی از این عوامل انگلی *Linguatula serrata* است که یک انگل مشترک انسان و دام است و طیف وسیعی از حیوانات از جمله انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سگها و سایر گوشتخواران میزبان نهایی هستند در حالی که بیشتر گیاهخواران از جمله نشخوارکنندگان خانگی به عنوان میزبان حد واسط عمل می‌کنند (موهانتا و ایناگاک ۲۰۱۷ و شمسی و همکاران ۲۰۲۰). این انگل متعلق به کلاس پنتاستومیدا است، از آنجاییکه، شکل این انگل شبیه زبان است، این انگل را "کرم زبانی" می‌نامند (فرشچی و همکاران ۲۰۱۸). همچنین، مبحث طبقه بندی لینگواتولا حل نشده است و به عنوان معمایی که نیازمند تحقیقات بیشتر است، باقیمانده است. با توجه به مطالعات اندک در زمینه ویژگی‌های ژنتیکی و بیولوژیک لینگواتولا این امکان وجود دارد که تا سال‌های آینده نیز موضوع طبقه بندی این انگل کامل حل نشود. با این حال، تمایل زیاد نوچه‌های این انگل به مهاجرت در ارگان‌های میزبان واسط، آن را به عنوان مشکل مهمی در حیوانات و احتمالاً، انسان مطرح نموده است (شمسی و همکاران ۲۰۲۰). از طرفی مطالعات فیلوژنیک نشان می‌دهد *لینگواتولا سراتا* بیشتر از بندپایان با نماتودها قرابت ژنتیکی دارد (نائد و همکاران ۲۰۱۸). *لینگواتولا سراتا* یا کرم زبانی در فرم بالغ و نوچه‌ای خود طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی را آلوده می‌کند به شکلی که در تحقیقات مختلف آلودگی نشخوارکنندگان اهلی و سگ‌های ولگرد و خیابانی به این انگل بسیار بالا گزارش شده است (حاجی‌پور و همکاران ۲۰۱۸). یکی از موارد مهم در خصوص این انگل عفونت‌هایی است که در انسان ایجاد می‌کند. چندین درگیری ناشی از آلودگی با مراحل مختلف *لینگواتولا سراتا* ممکن است در افراد ایجاد شود (مشریفیه و همکاران ۲۰۱۸). از شناخته‌شده‌ترین و معروف‌ترین این مشکلات سندرم هالزان یا مارارا است که به علت مصرف امعاء و احشاء آلوده نیم‌پز یا خام نشخوارکنندگان که حاوی نوچه انگل

است در افراد حساس رخ می‌دهد. اگر چه سندرم هالزان ممکن است به دلیل وجود انگل‌های دیگر نظیر دیکروسلیوم و فاسیولا نیز ایجاد شود ولیکن سندرم مارارا مختص آلودگی با *لینگواتولا سراتا* است. این فرم از آلودگی به دلیل علائم حادی که ایجاد می‌کند (نظیر تنگی نفس، سختی بلع، سر درد، تورم صورت و ...) بیش از سایر فرم‌های آلودگی تشخیص داده می‌شود (کوهسلا و همکاران ۲۰۱۱؛ مایرنا و همکاران ۱۹۸۹ و سرمدیان و همکاران ۲۰۲۰). فرم دیگر آلودگی با *لینگواتولا سراتا*، به ندرت تشکیل کرم‌های بالغ در حفرات بینی انسانی است که در پی مصرف احشاء آلوده به نوچه ایجاد می‌شود و می‌تواند باعث علائم تنفسی و ترشحات بینی شود. لینگواتولوزیس احشایی اگر چه احتمالاً شایع‌ترین فرم آلودگی در انسان (نظیر نشخوارکنندگان) است ولیکن به دلیل فقدان علائم مشهود بالینی تشخیص داده نمی‌شود و تنها به طور تصادفی در لاپاراسکوپی یا رادیولوژی (کیست‌های کلسیفیه شده) قابل مشاهده است (حمید و همکاران ۲۰۱۲؛ یزدانی و همکاران ۲۰۱۴). اگر چه ظاهراً فرم احشایی آلودگی مشکل خاصی در افراد ایجاد نمی‌کند ولیکن احتمال زمینه سازی برای سایر بیماری‌ها نظیر نئوپلاسم‌ها در این فرم از آلودگی دور از ذهن نیست به ویژه اینکه این ارتباط در مورد پنتاستومیازیس احشایی ناشی از آرمیلیفر ثابت شده است. فرم دیگر، فرم چشمی است که ندرتاً دیده شده است (ماکادو و همکاران، ۲۰۰۶ و تبری‌پور و همکاران ۲۰۱۹). تا کنون تحقیقات چندی در مورد شیوع آلودگی‌های *لینگواتولا سراتا* در میزبان‌های نهایی (سگ) و واسط (نشخوارکنندگان اهلی) در برخی نقاط دنیا و ایران صورت گرفته است و اغلب میزان شیوع این انگل بالا گزارش شده است. تحقیقات در مورد سایر جنبه‌های بیولوژیک *لینگواتولا سراتا* بسیار ناچیز است (بارتون و همکاران ۲۰۲۰). در مورد ویژگی‌های ریخت‌شناسی این انگل مطالعات اندکی صورت گرفته ولیکن نقش عوامل مختلف میزبانی و جغرافیایی این موارد مورد تحقیق قرار

باشد و وجود تفاوت در الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های این مجموعه در مراحل مختلف زندگی انگل و همچنین انگل‌های به دست آمده از حیوانات آلوده متفاوت می‌تواند نشان‌دهنده برخی ویژگی‌های بیولوژیک آن باشد و به ویژه چنانچه با سویه‌های متفاوت انگل مواجه باشیم این تفاوت‌ها تعیین کننده است.

#### روش کار

به منظور مقایسه الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های لینگواتولا سراتا در نشخوارکنندگان اهلی و سگ، انگل‌های بالغ جنس نر و ماده پس از کالبدگشایی لاشه سگ‌های جمع‌آوری شده از جاده‌ها که به علت تصادف تلف شده بودند از مجاری تنفسی فوقانی سگ‌های آلوده جدا و جمع‌آوری شد. همچنین جهت تهیه نوچه لینگواتولا سراتا غدد لنفاوی میزبان‌های واسط شامل گاو، گاو میش، بز، گوسفند و شتر، مورد بررسی قرار گرفت و نوچه‌های انگل از غدد مزانتر حیوانات آلوده جداسازی و به شکل جداگانه به آزمایشگاه منتقل شد. برای مطالعات الکتروفوریتیک زوائد دهانی انگل‌ها به دقت در زیر لوپ جدا شد و پس از چندین بار شستشو در محلول PBS<sup>۱</sup> به طور جداگانه جهت جنس نر و ماده و نوچه‌های جدا شده از هر گونه میزبانی داخل کرایوتیوپ‌های حاوی PBS در دمای ۲۰- درجه جهت مطالعات بعدی انتقال یافت. جهت تهیه محلول PBS از قرص‌های تجاری PBS استفاده شد که هر عدد قرص در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر خالص حل گردید و سپس توسط اتوکلاو استریل شد. اولین قدم در آنالیز پروتئین‌های انگل به روش الکتروفورز، تهیه عصاره است. نمونه‌های جدا شده از انگل تا حد امکان توسط تیغه‌های ظریف اسکالپل خرد و له شدند. به منظور مهار فعالیت پروتئازها از PMSF<sup>۲</sup> (فنیل متیل سولفونیل فلورید) استفاده شد. جهت حل نمودن PMSF بایستی از حلال ویژه آن استفاده نمود که الکل‌هایی نظیر ایزوپروپانول و اتانول می‌توانند PMSF را در خود حل کنند. غلظت کاری PMSF ۱ میلی‌مولار

نگرفته است. همچنین هنوز بررسی‌های لازم جهت تعیین میزان شیوع این آلودگی در جمعیت‌های انسانی صورت نپذیرفته است که علت آن می‌تواند عدم وجود تست‌های تشخیصی مناسب جهت تشخیص آلودگی‌های انسانی (به ویژه فرم احشائی) و همچنین بی اهمیت دانستن این آلودگی‌ها در انسان باشد (حاجی‌پور و همکاران ۲۰۱۹ و ناگاموری و همکاران ۲۰۱۹). متأسفانه تحقیقات در مورد بررسی داروهای موثر علیه لینگواتولا سراتا و شیوه‌های کنترل این ارگانسیم بسیار ناچیز است و هنوز ضد انگل مناسبی جهت این امر ارائه نشده است. به جز این بسیاری از جنبه‌های بیوشیمیایی و ایمنولوژی انگل و مکانیسم تهاجم آن به ارگان‌های مختلف بدن میزبان ناشناخته باقی مانده است (محمدی و همکاران ۲۰۲۰ و مورالس و همکاران ۲۰۲۰). تا کنون، مطالعات بسیار اندکی در مورد پروتئین‌های سوماتیک یا دفعی- ترشحی لینگواتولا سراتا و همچنین ویژگی‌های ژنتیکی این انگل انجام گرفته است و بر اساس مطالعات صورت گرفته نمی‌توان ویژگی‌های ژنتیکی و پروتئینی این انگل را با قطعیت توصیف کرد. با توجه فراگیر بودن عفونت‌های لینگواتولایی و همچنین اهمیت آن در پزشکی و دامپزشکی، در مطالعه حاضر سعی شد تا به برخی از جنبه‌های زندگی و ویژگی‌های این ارگانسیم پرداخته شود تا فتح بابی برای مطالعات گسترده‌تر در این موضوعات باشد. به دلیل احتمال وجود سویه‌های مختلف انگل در نشخوارکنندگان متفاوت مطالعه حاضر با هدف مقایسه الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های ضمامم دهانی مراحل نوچه‌ای و بلوغ (نر و ماده) لینگواتولا سراتا انجام شد. از آنجایی که ضمامم دهانی انگل در هر دو مرحله نوچه‌ای و بلوغ نقش مهمی در بقاء و مهاجرت انگل دارد و شاید بیش از سایر قسمت‌های بدن با میزبان در تماس باشد پس پروتئین‌های موجود در این قسمت نیز می‌تواند اهمیت بالاتری از منظر پروتئومیکس داشته

<sup>2</sup> Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

<sup>1</sup> Phosphate Buffered Saline

کرایوتیوپ‌های جداگانه‌ای برای هر نمونه انتقال یافت و تا بررسی‌های بعدی در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. از آنجایی که در روش SDS - PAGE<sup>۱</sup> بایستی غلظت خاصی از پروتئین‌ها در هر چاهک قرار گیرد لذا قبل از الکتروفورز نیاز به سنجش غلظت پروتئین‌های نمونه می‌باشد که به هنگام استفاده از آنها در الکتروفورز میزان معینی از محلول حاوی پروتئین بر روی ژل برده شود و چنانچه غلظت پروتئین‌ها در حد کافی نباشد اقدام به تغلیظ نمونه‌ها با روش‌هایی همچون استفاده از کیسه دیالیز نمود. به همین منظور از روش براد فورد جهت سنجش غلظت نمونه‌های آماده شده استفاده گردید (حاجی‌پور و همکاران ۲۰۱۶).

روش برادفورد در سنجش غلظت پروتئین‌های نمونه-  
های انگلی

۱- ۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بلوی G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانل ۹۵٪ حل شده به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک (۸۵٪ وزن/حجم) اضافه شده حجم آن به یک لیتر رسانده شد.

است. محلول به دست آمده در کرایوتیوپ‌های ۱ میلی-لیتری تقسیم شده و تا هنگام نیاز در ۷۰- درجه نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از فعالیت پروتئازهای سلولی، محلول ۱ میلی‌مولار PMSF در ایزوپروپانول در دو مرحله (به میزان ۱۰ میکرولیتر به ازای هر سی‌سی محلول پروتئین) یک مرتبه قبل از عمل سونیکاسیون و بار دیگر پس از سونیکه کردن به نمونه‌ها اضافه شد. همچنین قبل از سونیکاسیون نمونه‌ها به میزان ۱/۱- مولار محلول مرکاپتواتانول به هر یک اضافه گردید. نمونه‌های مورد نظر جهت سونیکه کردن داخل محلول PBS قرار گرفتند (در همان محلولی که له شده بودند) و سپس به درون تیوپ‌های ویژه‌ای جهت سونیکه کردن انتقال یافتند. سونیکاسیون با قدرت متوسط (۸۰۰۰ آمپر/ثانیه) به مدت ۳۰ دقیقه در سه نوبت ۱۰ انجام گرفت و بلافاصله پس از سونیکاسیون محلول ۱ میلی‌مولار PMSF مجدداً به میزان سابق به نمونه‌ها اضافه گردید و پروتئین‌های سونیکه شده جهت سانتیفریوژ به میکروتیوپ‌های سانتیفریوژ انتقال یافتند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰g سانتیفریوژ گردیدند و سپس مایع رویی توسط سمپلر جدا شد و به

Table 1. Standard concentrations used in the Bradford method for measuring proteins

Samples	Standards	Blank	Unknown
BSA <sup>2</sup> (ml)	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9	0	.
Water (ml)	0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1	1	0.5
Sample (ml)	-----	-	0.5
The contents of the tubes were mixed			
Kumasi Blue (ml)	5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5	5	5

۵- میزان جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۲۵ نانومتر تعیین و از روی نمونه استاندارد میزان پروتئین موجود در عصاره حاصل از سونیکه کردن ضمامم دهانی نمونه‌های متفاوت انگل *لینگوآتولا سراتا* به طور جداگانه تعیین گردید. از آنجایی که هنگام الکتروفورز پروتئین‌ها بایستی در هر چاهک تعبیه شده در

۲- محلول ۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از BSA تهیه شد. ۳- آزمایش بر اساس جدول شماره ۱ انجام و برای هر کدام دو لوله گذاشته شد.

۴- بعد از اضافه شدن کوماسی بلو لوله‌ها بلافاصله مخلوط و به مدت ۲ دقیقه در دمای اطاق انکوبه شد.

<sup>2</sup> Bovine Serum Albumin

<sup>1</sup> Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

پرسولفات را به وسیله آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. به منظور تهیه ۵ لیتر رنگ کوماسی بلو، ۵ گرم کوماسی بلو R-250 را در ۲۲۵۰ میلی‌لیتر متانول حل نموده و سپس ۲۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۵۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک به آن اضافه نموده و توسط صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و در دمای اتاق و محل تاریک نگهداری شد. برای تهیه ۵ لیتر محلول رنگر، ۳۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شده و به آن ۳۶۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر اضافه و در دمای اتاق و محل تاریک نگهداری شود (حاجی‌پور و همکاران ۲۰۱۶).

#### ساخت ژل

در بررسی حاضر بعد از استفاده از غلظت‌های مختلف ژل جداکننده، نهایتاً غلظت ۱۲/۵ درصد برای مطالعه انتخاب شد که طبق دستور ژل تهیه و داخل قالب ریخته شد. برای ساخت ژل ابتدا مواد مورد نیاز ژل پائین (جداکننده) در قالب ریخته شد. مقادیر مورد نیاز آمونیوم پرسولفات و تمد در پایان به ژل اضافه شد و با حرکت آرام تمام مواد ژل مخلوط شدند. سطح بالایی ژل را با ایزوبوتانول اشباع پوشانده و به ژل اجازه داده شد تا سفت شود. در دمای اتاق حدود ۳۰ تا ۶۰ دقیقه زمان جهت پلیمریزاسیون ژل نیاز بود. پس از بسستن ژل ایزوبوتانول را از بین دو شیشه خالی نموده و سطح ژل جدا کننده چندین مرتبه با آب مقطر دو بار تقطیر شسته شد. محلول ژل متراکم کننده تهیه شد و همانند ژل قبل تمد و آمونیوم پرسولفات در آخر به محتویات ژل افزوده شد و ژل آماده شده در قالب ژل روی ژل جداکننده ریخته شد. شانه پلاستیکی مخصوص بلافاصله پس از ریختن ژل متراکم کننده بر روی آن قرار گرفت و پس از پلیمریزه شدن ژل بالا (حدود ۳۰ دقیقه) به آرامی شانه از ژل خارج شد و چاهک‌های ایجاد شده بر روی ژل نمایان شدند. چاهک‌ها را به خوبی با آب مقطر دو بار تقطیر شسته و قالب ژل از پایه جدا شده و بر روی تانک الکتروفورز سوار شد. بافر تانک در مخزن بالا و پائین

ژل الکتروفورز میزان معینی پروتئین قرار گیرد، لذا بر اساس سنجش غلظت پروتئین در نمونه‌ها به روش برادفورد مقداری از هر نمونه که بایستی درون چاهک قرار گیرد به گونه‌ای محاسبه شد که در هر چاهک متوسط ۷۰ میلی‌گرم (۸۰-۵۰ میلی‌گرم) پروتئین قرار گیرد. سپس به روش SDS-PAGE اقدام به جداسازی باندهای پروتئینی بر اساس وزن مولکولی آنها شد (حاجی‌پور و همکاران ۲۰۱۶).

#### روش SDS-PAGE

به منظور تهیه محلول ذخیره ۳۰٪ آکریل‌آمید- بیس آکریل‌آمید، ۲۹ گرم آکریل‌آمید را با ۱ گرم بیس آکریل-آمید و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر صاف نموده و در تاریکی در دمای ۴ درجه نگهداری شود. برای تهیه بافر ژل جداکننده (ژل پائین)، ۱۸/۲ گرم تریس بازی به ۰/۴ گرم SDS و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر اضافه و توسط همزن حل نموده، pH توسط اسیدکلریدریک در ۸/۸ تنظیم گردید و بافر در ۴ درجه نگهداری گردد. بافر ژل متراکم کننده (ژل بالا)، ۶/۱ گرم تریس بازی به ۰/۴ گرم SDS اضافه و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل گردید، pH محلول را توسط اسید کلریدریک به ۶/۸ تنظیم شده و در ۴ درجه نگهداری گردید. به منظور تهیه بافر الکتروود (بافر حرکت)، ۱۲ گرم تریس بازی، ۴ گرم SDS و ۵۷/۶ گرم گلیسین در ۴ لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. جهت تهیه بافر نمونه (Sample buffer 5X)، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول به ۱ گرم SDS، ۱ میلی‌لیتر ۲-مرکاپتواتانول، ۱۰ میلی‌لیتر بافر ژل بالا و ۲۰ میلی‌گرم بروموفنول بلو اضافه گردید و حجم آن با آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. در نهایت بافر به حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری تقسیم نموده و در ۲۰- درجه نگهداری شد. برای تهیه SDS ۱۰٪ (وزنی-حجمی)، ۵۰ گرم SDS با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده و در دمای اتاق نگهداری شد و قبل از مصرف به نسبت ۱:۱۰ رقیق شود. برای تهیه آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ (وزنی-حجمی)، ۱ گرم آمونیوم

تانک ریخته شد. نمونه‌های دارای پروتئین در بافر نمونه (Sample buffer) به مدت ۳ دقیقه در حمام آب گرم (۱۰۰ درجه سانتیگراد) جوشانده شده و سرد گردیدند. سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون نمونه‌ها به دقت درون چاهک‌ها ریخته شد. عمل الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴ ساعت انجام گرفت. پس از پایان زمان الکتروفورز ژل درون ظرف حاوی محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو قرار داده شد و عمل رنگ‌آمیزی حدود ۲-۱ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر صورت پذیرفت. پس از اتمام رنگ‌آمیزی، ژل توسط محلول رنگ‌بر رنگ‌زدایی شد تا باندهای پروتئینی ظاهر شدند. به هنگام قرار دادن نمونه‌های حاوی پروتئین در داخل چاهک‌های ژل، از دو مارکر پروتئینی استاندارد جهت سنجش وزن مولکولی مقایسه باندهای پروتئینی شکل گرفته استفاده شد. یک مارکر پروتئینی با وزن بالا (High) که وزن مولکولی آن در بین محدوده ۳۶۰۰۰ تا ۲۰۵۰۰۰ دالتون بود و دیگری یک مارکر پروتئینی با وزن پائین (Low) با محدوده وزن مولکولی بین ۶۵۰۰ تا ۶۶۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. این مارکر پس از آماده‌سازی در چاهک‌های مجاور نمونه‌های پروتئینی در دو طرف ژل قرار داده شدند. در نهایت با توجه به میزان حرکت باندهای پروتئینی نسبت به نمونه‌های استاندارد محدوده وزن مولکولی باندها تعیین شد و همچنین الگوی حرکت و شکل‌گیری باندها در نمونه‌های مختلف مقایسه گردید (حاجی‌پور و همکاران ۲۰۱۶).

### نتایج و بحث

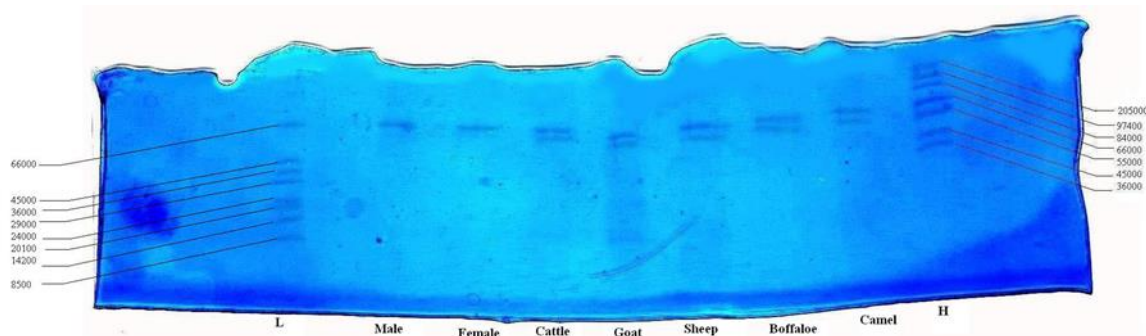
در الکتروفورز عصاره پروتئینی حاصل از ضمائم دهانی گروه‌های مختلف نوچه‌های به دست آمده از نشخوارکنندگان مختلف و فرم‌های بالغ *لینگوتولا سراتای* نر و ماده به روش SDS-PAGE محدوده وسیعی از باندهای پپتیدی بین ۸ کیلودالتون تا ۲۰۰ کیلودالتون مشاهده شد. در الکتروفورز عصاره‌های پروتئینی ضمائم دهانی تمام نوچه‌های جدا شده از

میزبان‌های مختلف (گاو، گاو میش، شتر، بز و گوسفند) دو باند بسیار مشخص پپتیدی مشاهده شد که اولین باند با وزن تقریبی ۶۲ کیلودالتون و بعدی با وزن تقریبی ۵۳ کیلودالتون مشخص شد. به جز این دو باند پپتیدی واضح تعداد زیادی باندهای ظریف و در بعضی نواحی به هم پیوسته پپتیدی به‌ویژه در محدوده وزن مولکولی کمتر از ۴۰ کیلودالتون به چشم خورد. در مورد پروتئین‌های تهیه شده از ضمائم دهانی نوچه‌های حاصله از بز باندهای پپتیدی ظریف با تراکم بیشتری ظاهر شدند و به‌ویژه در محدوده تقریبی ۹ کیلودالتون باند نسبتاً پررنگ‌تری دیده شد. موقعیت باندهای پپتیدی ظریف در پروتئین‌های تهیه شده از ضمائم دهانی نوچه‌های به‌دست آمده از گوسفند نیز تراکم بالایی را نشان داد هر چند این تراکم نسبت به مورد قبلی کمتر به چشم خورد. در مورد پروتئین‌های تهیه شده از ضمائم دهانی نوچه‌های حاصله از گاو و گاو میش باندهای پپتیدی ظریف چندان تراکم بالایی را نشان نداد و واضح نبودند و وضعیت این باندها در پروتئین‌های تهیه شده از ضمائم دهانی نوچه‌های حاصله از شتر الگوی متفاوتی را با سایر نشخوارکنندگان نشان داد به گونه‌ای که این باندها نسبت به نوچه‌های به‌دست آمده گاو و گاو میش واضح‌تر و نسبت به نوچه‌های حاصله از بز و گوسفند ضعیف‌تر بودند.

در الکتروفورز پروتئین‌های تهیه شده از ضمائم دهانی بالغین *لینگوتولا سراتا* که از حفرات بینی سگ‌های ولگرد پس از کالبدگشایی به‌دست آمده بودند، تنها یک باند پپتیدی پررنگ و واضح دیده شد که دارای وزن تقریبی ۶۲ کیلودالتون بود و مشابه با باند پپتیدی حدود ۶۲ کیلودالتون در پروتئین‌های ضمائم دهانی نوچه‌های انگل بود. باندهای پپتیدی ظریف در الکتروفورز پروتئین‌های ضمائم دهانی بالغین در هر دو جنس نر و ماده تقریباً مشابه و به شکل ضعیفی قابل تشخیص بود و از نظر الگوی الکتروفوریک با پروتئین‌های آنالیز شده از نوچه‌ها دارای تفاوت بود (شکل ۱)

واضح بودند که نشان دهنده غالب بودن غلظت پپتیدی در باندهای ذکر شده است. نکته مهم در نتایج حاصله تشابه باند پپتیدی حدود ۶۲ کیلودالتون در بین تمام گروه‌های نوچه‌ای و همچنین مراحل بلوغ (نر و ماده) انگل می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که این پپتید با وزن تقریبی ۶۲ کیلودالتون به شکل غالب در تمام مراحل انگل بدون ارتباط با منبع اخذ آنها (از میزبان‌های متفاوت) حضور دارد که ممکن است نقش مهمی در بیولوژی انگل در مراحل مختلف آن ایفا نماید.

در مطالعه حاضر همانگونه که انتظار می‌رفت به دلیل پرسلولی بودن لینگواتولا سراتا، طیف وسیعی از باندهای پپتیدی در محدوده ۸ تا ۲۰۰ کیلودالتون در تمام نمونه‌های آنالیز شده در SDS-PAGE یافت شد. با این حال تنها دو باند پپتیدی در مورد نمونه‌های آماده شده از ضمائم دهانی نوچه‌های انگل (باند حدود ۶۲ کیلودالتون و باند حدود ۵۳ کیلودالتون) و یک باند پپتیدی در پروتئین‌های آماده شده از ضمائم دهانی بالغین نر و ماده (حدود ۶۲ کیلودالتون) به خوبی رنگ آمیزی شده و کاملاً



**Figure 1- Electrophoretic pattern of mouth parts proteins of different groups of nymphs and adults (Male and Female) *Linguatula serrata* in SDS-PAGE**

The low molecular weight marker is on the left and the high molecular weight marker is on the right (BioRad purchased from Asel Teb) and from left to right are the somatic proteins of the mouth parts proteins of the adult male, adult female, nymphs isolated from cattle, goats, sheep, buffaloes and camels, respectively.

غالب انگل را در مراحل مختلف رشد آن تأیید می‌کند و با یافته‌های باکل و همکاران در سال ۲۰۰۲، که تفاوت‌های مشهودی را در الکتروفورز غدد فرونتال و تحت فرونتال مراحل مختلف نوچه‌ای و بالغ پروسفالوس کروتالی یافتند، همخوانی دارد (باکل و همکاران ۲۰۰۲). مطالعه اخیر نیز نشان می‌دهد که در طول تکامل و بلوغ انگل در میزبان نهایی (سگ) تغییر واضحی در الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های ضمائم دهانی آن حاصل می‌گردد که به ویژه از میان رفتن باند پپتیدی حدود ۵۳ کیلودالتون که در نوچه‌ها به وضوح قابل تشخیص است، کاملاً مشهود می‌باشد. به هر حال یافته‌های اخیر امکان واجد اهمیت بودن پپتید با وزن مولکولی حدود ۵۳ کیلودالتون را در بیولوژی مرحله نوچه‌ای لینگواتولا سراتا را نشان می‌دهد. در مطالعات آکالا-کانتو و همکاران در سال ۲۰۰۷ که بر روی الکتروفورز مواد

به نظر می‌رسد چنانچه این پپتید بتواند در مطالعات ایمونوبلاینگ و اکشن قابل قبولی با آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه انگل نشان دهد، کاندیدای مناسبی جهت طراحی یک تست کارآمد الایزا جهت تشخیص سرولوژیک مراحل مختلف انگل در میزبان‌های متفاوت باشد که البته مطالعات بیشتری در این زمینه بایستی صورت پذیرد. همچنین امکان وجود ویژگی‌های آنزیمی و یا سایر ویژگی‌های عملکردی این پپتید نیازمند بررسی‌های گسترده‌تری است. در مورد نوچه‌های به دست آمده از نشخوارکنندگان مختلف، الکتروفورز پروتئین‌های ضمائم دهانی علاوه بر باند پپتیدی حدود ۶۲ کیلودالتون، در محدوده تقریبی ۵۳ کیلودالتون نیز یک باند پپتیدی پررنگ و واضح را نشان داد که در تمام گروه‌های نوچه‌ای مشابه بود ولیکن باند پپتیدی اخیر در مراحل بلوغ انگل غایب بود. این یافته تفاوت در وضعیت باندهای پپتیدی

دفعی / ترشحي جمع‌آوری شده از نوچه لینگو/تولا سراتا در آزمایشگاه با روش SDS-PAGE انجام پذیرفت یک باند پپتیدی واضح با وزن تقریبی ۷۵ کیلودالتون مشاهده شد که در مطالعه اخیر این باند در پرتئین‌های ضمايم دهانی هیچ یک از مراحل انگل یافت نشد و به نظر می‌رسد که این پپتید که دارای فعالیت سرین پروتئازی می‌باشد دارای منشأ غیر از ضمايم دهانی است (آلکالا-کانتو و همکاران ۲۰۰۷). اگر چه تشابه مشخصی در باندهای پپتیدی ذکر شده (۶۲ و ۵۳ کیلودالتون) در تمام گروه‌های نوچه‌ای مشاهده شد ولیکن عمده تفاوت‌های یافت شده در بین نمونه‌های مختلف مورد آنالیز قرار گرفته مربوط به باندهای ظریف پپتیدی که اغلب وضوح اندکی را نشان می‌دادند، بود. با این حال مطالعه دقیق این باندهای پپتیدی به دلیل تعدد آنها و در برخی موارد روی هم افتادن برخی از آنها در آزمون SDS-PAGE مشکل است و نیازمند مطالعات پروتئینی گسترده‌تری دارد ولیکن به طور کلی می‌توان برخی تفاوت‌ها را در الگوی الکتروفوریتیک نمونه‌های مختلف مشاهده نمود. نکته حائز اهمیت در این مورد تراکم این باندهای پپتیدی ظریف به شکل گسترده-تر در محدوده وزن مولکولی پائین (اغلب کمتر از ۴۰ کیلودالتون) می‌باشد که نشان‌دهنده سبک بودن وزن مولکولی این پپتیدها است. از یافته‌های اخیر به نظر می‌رسد که باندهای پپتیدی ظریف با تراکم و وضوح بیشتری در پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از بز نسبت به نمونه‌های اخذ شده از سایر نشخوارکنندگان وجود داشت و به‌ویژه غلظت این باندها در پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از بز قابل توجه بود به گونه‌ای که در محدوده تقریبی ۹ کیلودالتون باند تا حدودی پررنگ‌تری مشاهده شد. الگوی باندهای ظریف در پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از بز تا حدودی شبیه به انگل‌های اخذ شده از گوسفند بود ولیکن تراکم و غلظت این باندها در پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از گوسفند تا حدودی کمتر از پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست

آمده از بز به چشم می‌خورد و همچنین وضوح باند پپتیدی در محدوده ۹ کیلودالتون در پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از گوسفند همانند پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از بز قابل تشخیص نبود. در مطالعه‌ای که توسط البرزی و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد محتوای کل عصاره های بدنی و محصولات دفعی-ترشحي نوچه‌های *L. serrata* به روش SDS-PAGE (ژل ۱۲٪) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، و در نهایت دو الگوی پروتئین با بیش از ۱۸ و ۹ باند قوی مشاهده شد. در این مطالعه از نمونه های سرم گوسفند آلوده به انگل، ۳ پروتئین آنتی ژنیک با وزن مولکولی در محدوده ۲۴ تا ۱۰۰ کیلو دالتون و یک پروتئین آنتی ژنی با وزن بیش از ۱۸۰ کیلو دالتون مشاهده شد (البرزی و همکاران ۲۰۲۱). در مطالعه حاضر الگوی باندهای پپتیدی ظریف در مورد پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های حاصل از گاو و گاومیش تا حدودی شبیه به هم بود و در هر دو مورد غلظت و تراکم این باندها چندان قابل تشخیص نبود. وضعیت باندهای پپتیدی ظریف در مورد پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از شتر تا حدودی متفاوت از پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از سایر نشخوارکنندگان بود و تراکم و وضوح این باندها با غلظت بیشتری از پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از گاو و گاومیش و غلظت کمتری از پروتئین‌های ضمايم دهانی نوچه‌های به دست آمده از بز و گوسفند به چشم خورد. در مطالعه‌ای که توسط حاجی پور و همکاران در ۲۰۱۶ انجام شد، آنها ۶ باند پروتئین مشابه (۱۴.۴، ۳۲، ۳۶، ۴۸، ۷۵ و ۱۰۰ کیلو دالتون) را در پروتئین های سوماتیک مرحله نوچه‌ای *L. serrata* جمع‌آوری شده از بز و گاو پیدا کردند (با باند اضافی، ۱۲۰ کیلو دالتون در گاو) (حاجی‌پور و همکاران ۲۰۱۶). در مقایسه با مطالعه ما، اختلافاتی در پروفایل های پروتئینی نوچه‌های *L. serrata* به دست آمده توسط حاجی پور و همکاران می‌تواند مشاهده می‌شود. در مورد



تکامل انگل و تغییرات این پپتیدها در طول پوست‌اندازی و تعویض میزبان (از میزبان واسطه با میزبان نهایی) توجه نمود ولیکن تفاوت‌های مشاهده شده در گروه‌های نوچه‌ای مختلف نیازمند بررسی‌های بیشتری جهت یافتن علت آنها می‌باشد. از طرفی امکان تاثیر فاکتورهای میزبانی در ترکیب پپتیدی پروتئین‌های ضمامم دهانی نوچه‌ها دور از ذهن نیست و با توجه به تغذیه نوچه انگل از مواد لنفی میزبان (در مورد نوچه‌های حاصله از غدد لنفاوی مزاتر در مطالعه حاضر) ممکن است تفاوت‌های ظریفی در الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های ضمامم دهانی (که بیش از سایر نواحی بدن انگل با میزبان در ارتباط است) ایجاد نماید. به‌ویژه اینکه تشابهات زیاد در وضعیت پپتیدی نوچه‌های حاصله از گاو و گاومیش و همچنین بز و گوسفند می‌تواند به دلیل نزدیکی گونه‌ای در این نشخوارکنندگان با یکدیگر باشد که ممکن است بر روی انگل نیز تاثیر گذارد. با این حال تاثیر فاکتورهای میزبانی بر روی الگوی پپتیدی انگل نیازمند بررسی‌های بیشتری است و به‌ویژه انجام مطالعات الکتروفوریتیک بر روی نوچه‌های حاصله از اندام‌های دیگر نشخوارکنندگان نظیر کبک، ریه، طحال و سایر نواحی و مقایسه آن‌ها با هم می‌تواند تا حدودی وجود این تاثیرات را روشن کند.

فرم‌های بالغ لینگواتولا سراتا (جنس نر و ماده) الگوی کلی باندهای پپتیدی همانند هم بود و ظاهراً جنسیت تأثیر چندانی در الگوی پروتئین‌های ضمامم دهانی بالغین لینگواتولا سراتا ایفا نمی‌کند. از طرف دیگر به جز عدم حضور باند واضح ۵۳ کیلودالتون در پروتئین‌های ضمامم دهانی بالغین، باندهای ظریف پپتیدی نیز با وضوح کمتری نسبت به نوچه‌ها به ویژه آنهایی که از بز و گوسفند اخذ شده بودند به چشم می‌خورد. از سویی، شمسی و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر اساس مطالعات فیلوژنیک حدس زدند که احتمالاً، حداقل دو گونه لینگواتولا در ایران وجود داشته باشد که با توجه به وجود شرایط آب و هوایی متنوع و همچنین، گونه‌های مختلف شناسایی شده در آفریقا و نروژ چنین احتمالی دور از ذهن نیست (شمسی و همکاران ۲۰۲۰). این گزارش ممکن است وجود تفاوت در باندهای پروتئینی غالب در مطالعات مختلف در مورد الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های لینگواتولا را توجیه نماید.

### نتیجه‌گیری

وجود تفاوت‌های بارز در پپتیدهای مراحل نوچه‌ای و بلوغ لینگواتولا سراتا را می‌توان بر اساس مرحله رشد و

### منابع مورد استفاده

- Alborzi AR, Bahrami S and Khajeh F, 2021. A Preliminary Study on the Antigenic Proteins of *Linguatula serrata* Nymphal Stage in Sheep with Visceral Linguatulosis. Archives of Razi Institute. <https://dx.doi.org/10.22092/ari.2021.352744.1578>
- Alcala-Canto Y, Alberti-Navarro A and Ibarra-Velarde F, 2007. Serine protease activity demonstrated in larval stage of the pentastomid *Linguatula serrata*. Parasitology Research 100: 1011-1014.
- Barton DP, Baker A, Porter M, Zhu X, Jenkins D and Shamsi S, 2020. Verification of rabbits as intermediate hosts for *Linguatula serrata* (Pentastomida) in Australia. Parasitology Research 119 (5) 1553-1562.
- Buckle AC, Knox DP and Riley J, 2002. Proteins and proteinases in the *in vitro* released products (IVRP) of tissue-invasive and lung-dwelling larvae of the pentastomid *Procepalus crotali*. Parasitology 124: 391-399.
- Farshchi S, Alikhani MY, Choresheh KS, Khaledi A, Farrash BR and Choresheh KS, 2018. Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in goats slaughtered in Mashhad slaughterhouse, Iran. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection 5(3) 52-54.
- Hajipour N, Soltani M and Mirshekar F, 2019. Effect of age, sex, and season on the prevalence of *Linguatula serrata* infestation in mesenteric lymph nodes of goats slaughtered in Tabriz, Iran. Tropical Animal Health and Production 51: 879-885.
- Hajipour N, Tavassoli M, Eslamlo AA and Javadi SH, 2018. Investigation of histopathological changes caused by adult stage of *Linguatula serrata* in dog. Comparative Clinical Pathology 27(3) 717-20.

- Hajipour N, Tavassoli M, Tayefi-Nasrabadi H and Seyedi S, 2016. Comparative evaluation of somatic proteins of the nymphal stage of *Linguatula serrata* isolated from goats and cattle in northwest Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 19 (3) 242-6.
- Hamid T, Hossein YD, Mehran BB, Masood FS and Hamid E, 2012. A case report of *Linguatula serrata* infestation from rural area of Isfahan city, Iran. *Advanced Biomedical Research* 1: 42-44.
- Islam R, Hossain MS, Alam Z, Islam A, Khan AH, Kabir ME, Hatta T, Alim A and Tsuji N, 2018. *Linguatula serrata*, a food-borne zoonotic parasite, in livestock in Bangladesh: Some pathologic and epidemiologic aspects. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 13: 135-140.
- Koehsler M, Walochnik J, Georgopoulo M, Prunte C, Boeckeler W, Auer H, Barisani-Asenbauer T, 2011. *Linguatula serrata* tongue worm in human eye, Austria. *Emerging Infectious Diseases* 17(5) 870-872.
- Machado MA, Makdissi FF, Canedo LF, Martino RB and Crescentini F, 2006. Unusual case of pentastomiasis mimicking liver tumor. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21: 1218-1220.
- Mairena H, Solano M and Venegas W, 1989. Human dermatitis caused by a nymph of *Sebekia*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41: 352-354.
- Mohammadi MA, Bamorovat M, Sharifi I, Mostafavi M, Zarandi MB, Kheirandish R, Karamoozian A, Khatami M and Zadeh SH, 2020. *Linguatula serrata* in cattle in southeastern Iran: Epidemiological, histopathological and phylogenetic profile and its zoonotic importance. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Report*, 22: 100465. doi: 10.1016/j.vprsr.2020.100465
- Mohanta UK and Itagaki, T, 2017. Molecular characterization and phylogeny of *Linguatula serrata* (Pentastomida: Linguatulidae) based on the nuclear 18S rDNA and mitochondrial cytochrome c oxidase I gene. *Journal of Veterinary Medical Science* 79(2) 398-402.
- Morales PM, Carrillo MP, González M. and Carvallo FC, 2020. Histopathological lesions compatible with nymphs of *Linguatula serrata* in bovine liver. *Austral Journal of Veterinary Sciences* 52(1) 19-23.
- Musharrafiyeh U, Hamadeh G, Touma A and Fares J, 2018. Nasopharyngeal linguatulosus or halzoun syndrome: clinical diagnosis and treatment. *Revista da Associação Médica Brasileira* 64(12) 1081-1084.
- Nagamori Y, Ramachandran A, Kuzma C, Nafe L and Johnson EM, 2019. A zoonotic parasite, *Linguatula serrata*, infection in a dog imported from Ethiopia to the United States. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 16: 100273. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100273>
- Naude T, Pant S, Tavassoli M, Sarker S and Ghorashi SA, 2018. The complete mitochondrial genome of *Linguatula serrata* (tongue worm) isolated from a dog and phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B: Resources* 3(1) 357-358.
- Sarmadian H, Nasiri Z, Saeedinia S, Moradi Y, Eshrati B, Ghasemikhah R, Salehi MM and Zamani M, 2020. Clinical manifestation and epidemiological findings of human *linguatula serrate* infection in Iran: systematic review. *Journal of Parasitic Diseases* 23: 1-9.
- Shamsi S, Barton DP, Zhu X and Jenkins DJ, 2020. Characterisation of the tongue worm, *Linguatula serrata* (Pentastomida: Linguatulidae), in Australia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 11: 149-57.
- Tabaripour R, Shokri A, Teshnizi SH, Fakhar M and Keighobadi M, 2019. Status of *Linguatula serrata* infection in livestock: A systematic review with meta-analysis in Iran. *Parasite Epidemiology and Control* 7: 1-13.
- Yazdani R, Sharif I, Bamorovat M and Mohammadi MA, 2014. Human linguatulosus caused by *Linguatula serrata* in the city of Kerman, South-eastern Iran: case report. *Iranian Journal of Parasitology* 9(2) 282-285.

## Comparison of electrophoretic pattern of *Linguatula serrata* proteins obtained from domestic ruminants and dogs by SDS-PAGE

F Rezaei<sup>1\*</sup>, M Tavassoli<sup>2</sup> and M Karimi Dehkordi<sup>3</sup>

Received: January 2, 2022

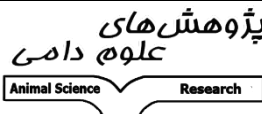

Accepted: March 6, 2022

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

\*Corresponding author: E-mail: f.rezaei@razi.ac.ir

 <p>پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research</p>	<p>Journal of Animal Science/vol.33 No.4/ 2024/pp 17-28 <a href="https://animalscience.tabrizu.ac.ir">https://animalscience.tabrizu.ac.ir</a></p>	 <p>OPEN ACCESS</p>
<p>© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (<a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/</a>) DOI: 10.22034/AS.2022.49721.1645</p>		

**Introduction:** The phylum Pentastomida contains a highly specialized taxon with more than 120 species which infect the respiratory tracts of reptiles and other vertebrates. The species of Pentastomida, a still-enigmatic group of worm-like, *linguatula serrata* belongs to the bloodsucking parasites that inhabit the upper respiratory tract of terrestrial, carnivorous vertebrates, mostly reptiles and birds; *L. serrata*, commonly called tongue worms, typically inhabit canids and felids. The intermediate hosts of these parasites are usually sheep, cattle, other ruminants or rodents. The hosts ingest the eggs, and the first instar larva hatches within their intestines, penetrates the mucosa, and retreats into the tissue, where it encysts and molts to the third larval stage. The parasite is tongue shaped, lightly convex dorsally and flattened ventrally. Males measure 1.8–2 cm, while females measure 8–13 cm in length. The nymph of *L. serrata* is characterised by the possession of a saw-like cuticle with multiple transverse grooves, a ventral buccal apparatus with two pairs of peribuccal hooks and acidophilic glands, a complete digestive system and primordial genital organs (Mohanta and Itagaki, 2017; Shamsi et al., 2020). Moreover, in degraded nymphs, the hooks and remnants of the cuticle are often the only findings that allow the diagnosis of the infestation. Humans may be infected with linguatula either by ingestion of nymphs of *L. serrate* resulting in a condition called nasopharyngeal linguatulosus or Halzoun syndrome or by ingestion of infective eggs which develop in internal organs resulting in visceral linguatulosus. Halzoun syndrome is a rare clinical disease that manifests as an acute allergic-like reaction involving the upper respiratory tract and nasopharyngeal mucosa after the consumption of raw sheep or goat liver, a popular food presentation in Lebanon and other countries of the Eastern Mediterranean region. *L. serrata* is a common human and animal parasite and affects a wide range of animals, including humans, and causes various diseases in humans. In Iran, this parasite reported from definitive and intermediate hosts in different regions. Also some reports from human Halzoun syndrome it exists in Iran. Diagnosis in final host will be done by clinical signs and separating of the parasite eggs in feces, nasal secretions and animal's saliva. The diagnosis in intermediate hosts will be done by biopsy. Compression of the electrophoretic pattern of adult and nymph *L. serrate* proteins obtained from different hosts (Sarmadian et al., 2020; Hamid et al., 2012).

**Material and methods:** In this study, adult male and female of *L. serrate* were isolated from the upper respiratory tract of dogs killed by road accident and linguatula nymphs isolated from mesenteric

lymph nodes of goats, buffaloes, sheep, cattle and camels. Obtained parasites were separately stored. Collected nymphs of the parasite were washed separately 3 times with 0.85% saline (sterile) and phosphate-buffered saline. The nymph and adult Mouth parts parasites were sonicated on ice with ultrasonicator. After preparing the extract, the protein concentration of parasitic samples was measured by Bradford method and finally, by SDS-PAGE method, the electrophoretic pattern of parasite proteins in different ruminants and dogs was investigated. SDS-PAGE of somatic proteins was performed in different percentage polyacrylamide gels using a discontinuous system as described by Laemmli. The prepared proteins were run on SDS-polyacrylamide gels, composed of 4 % resolving gel and 12 % stacking gel, under reducing conditions using the discontinuous buffer system. For size estimation in SDS-PAGE, a prestained protein marker at a range of 11-180KDa molecular weight (PS10 plus) was used.

**Results and discussion:** Electrophoresis of protein extracts from Mouth parts of different groups of nymphs obtained from different ruminants and adult forms of male and female *L. serrata* by SDS-PAGE showed a wide range of peptide bands between 8 kDa and 200 kDa. Electrophoresis of Mouth parts of larvae somatic proteins of different groups of parasites (separated from goat, cattle, buffalo, sheep and camel) showed 2 very clear peptide bands with approximate weights of 62 and 53 kDa in SDS-PAGE gel. For proteins prepared from the Mouth parts of cattle and buffaloes, the fine peptide bands did not show much density and were not clear. The status of these bands in the proteins prepared from the oral appendages of camel showed a different pattern from that of other ruminants. It differed from other ruminants in that these bands were clearer than those obtained from cattle and buffaloes and weaker than those from goats and sheep. In male and female adult forms (separated from dog), only the peptide band weighing approximately 62 kDa was present. In the present study, as expected, due to the multicellularity of *L. serrata*, a wide range of peptide bands in the range of 8 to 200 kDa were found in all samples analyzed by SDS-PAGE. However, there were only two peptide bands in the samples prepared from the oral appendages of the parasitic nodules (about 62 kDa band and about 53 kDa band) and one peptide bond in the proteins prepared from the adult male and female oral appendages (About 62 kDa) were well stained and quite clear, indicating a predominance of peptide concentrations in the mentioned bands.

**Conclusion:** The prevalence of Linguatulosus is important in ruminants because without any specific clinical symptoms, it leads to reduction of animal productions and hidden economic loss, as well as public health hazards. The results show that the presence of a peptide band with an approximate weight of 62 kDa in all study groups may indicate some of its biological characteristics, especially if we encounter different strains of the parasite is decisive and can be useful in designing efficient serological tests to detect infections in different hosts.

**Keywords:** *Linguatula serrata*, Electrophoretic, Dog, Domestic ruminants, SDS-PAGE