بررسی شیوع مولکولی انگل بلاستوسیستیس هومینیس در مراجعه کنندگان به آزمایشگاه‌های شهر خرم‌آباد

ابراهیم بادپروا [1]، جاوید صدرائی [1]، مهدی فروزنده [2]، فرناز خیراندیش [3]
۱- گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران
۳- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

یافته / دوره چهاردهم / شماره ۴ / پاییز ۹۱ / مسلسل ۵۳

چکیده

دریافت مقاله: ۹۰/۱۲/۱۳ ، پذیرش مقاله: ۹۱/۴/۴

* **مقدمه:** بلاستوسیستیس هومینیس، انگلی تک یاخته ای، بی هوازی و زئونوز است که در روده بزرگ انسان و بسیاری از مهره داران دیگر یافت می شود . انتشاری جهانی و انتقال آن در میزبان های مختلف مستقیم و از طریق کیست به همراه آب و مواد غذایی آلوده صورت می گیرد و عواملی مانند فرهنگ بهداشتی، فصول سال، ارتباط باحیوانات و سن در شیوع آن مؤثرند. برخلاف گذشته، بسیاری از مطالعات دهه اخیر، بیماریزایی بالقوه آن را تأیید و علائم گوارشی و خارج گوارشی متعددی را به آن نسبت می‌دهند. این انگل دارای مرفولوژی، سیر تکاملی و تکثیر عجیب و منحصر به فردی است. این مطالعه با هدف بررسی شیوع مولکولی این انگل در مراجعه کنندگان به آزمایشگاه‌های شهر خرم‌آباد انجام شد.

* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه که برای اولین بار در استان لرستان انجام گرفت، ۵۱۱ نمونه مدفوع از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه های شهر خرم آباد جمع آوری گردید که پس از استخراج DNA با روش PCR، جهت تشخیص مولکولی انگل بلاستوسیستیس مورد مطالعه و بررسی قرارگرفتند.

* **یافته‌ها:** از۵۱۱ نمونه که مورد بررسی قرار گرفته ،۳۳ نمونه (۶/۵٪) به بلاستوسیستیس آلوده بودند.

* **بحث و نتیجه‌گیری:** شاخص‌های مرفولوژیک انگل و سایر عوامل مداخله گر، تشخیص میکروسکوپی آن را با چالش‌هایی مواجه ساخته‌اند و روش تشخیصی PCR که حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به سایر روش های تشخیصی دارد، توصیه می شود. محققان، دنیا را بر حسب میزان شیوع انگل بلاستوسیستیس به دو گروه توسعه یافته تا ۱۰٪ و در حال توسعه تا ۵۰٪ تقسیم نموده اند که شیوع ۶/۵٪ جمعیت مذکور در شهر خرم آباد، در محدوده کشورهای گروه اول است که با توجه به منبع آب آشامیدنی شهر خرم آباد که اکثراً از چشمه ها تأمین می‌شود، قابل تفسیر است ولی از آنجا که دامداری یکی از مشاغل مهم استان محسوب می شود، رعایت نکات بهداشتی و پوشش مناسب را هنگام برخورد با حیوانات ضروری می نماید. ضمناً نتایج این تحقیق و مطالعات مشابه در کشور های در حال توسعه از یک طرف و شیوع در حال افزایش ۲۳درصدی در ایالات متحده آمریکا به عنوان یک کشور توسعه یافته از طرف دیگر، معادله تقسیم بندی قبلی را به هم زده است.

* **واژه‌های کلیدی:** بلاستوسیستیس هومینیس، PCR، خرم آباد.

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروهانگل شناسی و حشره شناسی
پست الکترونیک: sadraeij@modares.ac.ir

مقدمه

بلاستوسیستیس نوعی انگل تک یاخته و زئونوزی است که در روده بزرگ انسان و بسیاری از مهره داران دیگر یافت می‌شود (۱). حدود یک قرن از تشخیص آن در نمونه‌ی مدفوع انسان می‌گذرد ولی تا مدت‌ها آن را غیر بیماریزا می‌دانستند تا این که در سال‌های اخیر با مطالعات وسیع و معلوم شدن بسیاری از مجهولات، اهمیت آن برای انگل شناسان مشخص شد (۴-۲).

کیست یا عامل عفونت‌زا، نسبت به آب مقاوم بوده و به صورت مستقیم از طریق آب یا مواد غذایی آلوده در میان میزبان‌های مختلف که خیلی هم اختصاصی نیستند، منتقل می‌شود (۵،۶). شیوع انگل در دنیا بین ۶۱/۸-۰/۸ درصد متغیر است و این میزان در کشورهای مختلف حتی جوامع گوناگون هر کشور متفاوت است. به طور کلی شیوع آن درکشورهای در حال توسعه، خصوصاً نواحی گرمسیری بالاتر است. از جمله عوامل موثر در افزایش آن را فقر بهداشتی و ارتباط با حیوانات می‌دانند و بر عکس سایر انگل‌های گوارشی، در بعضی از مطالعات نشان داده شده که در بزرگسالان شایع‌تر است و همچنین در بعضی از فصول سال درصد شیوع آن افزایش می‌یابد (۱۰-۷، ۲). بسیاری از مطالعات آن را بیماریزا و علائمی مانند اسهال‌های حاد و مزمن، درد و نفخ شکم، یبوست، تهوع، سندرم تحریک پذیری و التهاب روده‌ای، درد مفاصل و راش‌های پوستی را به آن نسبت می‌دهند. این شاخص‌ها و تغییرات پاتولوژی در حیوانات آزمایشگاهی و کشت سلولی هم به اثبات رسیده ولی از آنجا که مانند بعضی دیگر از انگل‌های گوارشی، این انگل در افراد فاقد علامت هم دیده می‌شود، بیماریزایی آن بحث برانگیز شده است (۱۵-۱۱).

این انگل با داشتن سیرتکاملی متعدد و روش‌های متنوع تکثیری مانند تقسیم دوتایی، جوانه زدن، اندودیوژنی، اسپوروگونی، شیزوگونی و بلاسموتومی و همچنین اشکال مختلف مرفولوژیکی مانند فرم‌های واکوئله، گرانوله، آمبوبید و کیستی با ابعاد ۲-۲۰۰nm، انگلی مرموز و منحصر به فرد است و متأسفانه این شاخص‌ها، باعث کاهش در حساسیت و ویژگی میکروسکوپی شده‌اند (۴،۱۰،۱۶).

برای تشخیص از روش‌های مستقیم، رنگ‌آمیزی و کشت با حساسیت‌های به ترتیب ۳۶/۷٪، ۵۰٪ و ۸۳٪ نسبت به PCR استفاده می‌شود ولی روش PCR در مقایسه با سایر روش‌ها دارای ویژگی و حساسیت معنی‌دار بالاتری است (۱۶،۱۷). با توجه به این موضوع، هدف از این مطالعه بررسی مولکولی شیوع انگل بلاستوسیستیس هومینیس به روش PCR در مراجعه کنندگان به آزمایشگاه‌های شهر خرم‌آباد بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه ها

این مطالعه توصیفی از خرداد تا آبان ماه سال ۱۳۹۰ بر روی ۵۱۱ نمونه مدفوع از مراجعین به آزمایشگاه‌ها ی شهرستان خرم‌آباد انجام گرفت. برای جداسازی انگل، بررسی میکروسکوپی نمونه ها با روش مستقیم، تغلیظی و رنگ‌آمیزی دائم انجام شد، اما چون تشخیص بر اساس مورفولوژی انگل مشکل است، از روش PCR استفاده گردید (۱۷).

نمونه ها به منظور انجام PCR به آزمایشگاه انگل شناسی مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان ارسال و در فریزر ۲۰- سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

DNA ژنومی توسط کیت استخراج DNA شرکت Bioneer کره جنوبی از نمونه های مدفوع طبق دستورالعمل شرکت سازنده مستقیماً استخراج گردید. سپس DNA های استخراج شده در ۲۰- سانتیگراد نگهداری شدند.

واکنش PCR

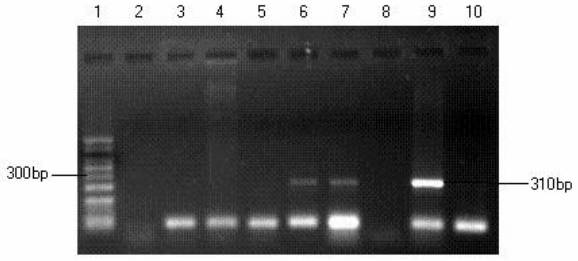
پرایمرهای اختصاصی به کار رفته در این مطالعه شامل،

b11400 ForC (5'- GGA ATC CTA TTA GAG GGA CAC TAT ACA T-3')
b11710 RevC (5'-TTA CTA AAA TCC AAA GTG TTC ATC GGA C-3')
بودند که مورد استفاده قرار گرفتند (۱۶).

برنامه PCR ابتدا ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و سپس ۳۰ سیکل شامل، ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه در ۵۸ درجه سانتیگراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد اجرا شد (۱۶). محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و باندها به وسیله دستگاه ترانس ایلومینیتور uv[1] مشاهده گردید.

یافته‌ها

پس از استخراج DNA از ۵۱۱ نمونه مدفوع انسانی که به طور تصادفی از آزمایشگاه های تشخیص طبی جمع آوری شده بودند و انجام واکنش PCR،تعداد ۳۳ مورد (۶/۵ ٪) مبتلا به انگل بلاستوسیستیس تشخیص داده شدند. محصول PCR با باندی به طول 310bp در مقایسه با مارکر، نشان دهنده انگل مذکور در این مطالعه بوده است (شکل۱).



شکل۱- محصولات PCR بر روی ژل آگارز
ستون ۱: DNA Ladder Marker 50 bp
ستون های۶،۷ و۹: موارد مثبت، ستون های ۵-۲ و ۸ : موارد منفی
ستون ۱۰: کنترل منفی

بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که عوامل مختلفی مانند پلی مورفیسم انگل و قابلیت اشتباه شدن با مخمرها، ذرات چربی و اشغال‌های مدفوعی و همچنین تفسیر نادرست کارکنان آزمایشگاه در نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها دخالت دارند، استفاده از PCR به عنوان روشی با حساسیت و ویژگی بالا توصیه می‌شود (۱۴،۱۷،۱۸).

شیوع ۶/۵ درصدی بلاستوسیستیس در شهر خرم‌آباد با توجه به حساسیت و ویژگی این روش که کاملاً قابل اعتماد است، جایگاه ویژه‌ای دارد. محققان، کشورها را برحسب شیوع بلاستوسیستیس به دو گروه توسعه یافته (شیوع انگل تا ۱۰٪) و در حال توسعه (شیوع انگل بین۵۰-۳۰٪) تقسیم نموده‌اند (۶،۱۶،۱۷) و عامل مؤثر کاهش در گروه اول را نظارت و کنترل بهداشتی در راه‌های انتقال، بخصوص آب می‌دانند. در حالی که از یک طرف به عنوان کشورهای توسعه یافته شیوع ۰/۵٪ در ژاپن و ۲۳٪ در ایالات متحده آمریکا که حتی در بعضی از ایالات این کشور، به علت کثرت مراجعین با علائم گوارشی ناشی از بلاستوسیستیس، این میزان را در حال افزایش می‌دانند و از طرف دیگر شیوع ۵/۱٪ در ترکیه، ۶/۵٪ در خرم‌آباد، ۱۲/۵٪ در تعدادی از بیمارستان‌های تهران و ۱/۹ تا ۳۲/۶٪ در چین به عنوان کشورهای در حال توسعه این موازنه را به هم زده و بهتر است گفته شود شیوع در جوامع مختلف متغیر است (۱۰،۲۰،۲۱).

شیوع ۶/۵ درصدی انگل زئونوز فوق در شهر خرم‌آباد که دارای میزبان‌های متعددی می‌باشد در محدوده کشورهای توسعه یافته است و با توجه به نحوه انتقال که به طور مستقیم و از طریق آب و مواد غذایی آلوده صورت می‌گیرد قابل تفسیر است، زیرا بیشتر آب مصرفی شهر از طریق چشمه‌ها تأمین می‌گردد که احتمال آلودگی آنها پایین است، البته با توجه به موقعیت دامداری استان، رعایت اصول بهداشتی از جمله، پوشش مناسب لباس و استفاده از دستکش در حین برخورد با دام ها به منظور

1. UV Transilluminitor

پیشگیری ضروری به نظر می رسد، زیرا بعد از ده ها سال فراموشی، بیماریزایی بالقوه آن به اثبات رسیده (۴-۲) و باید مورد توجه قرار گیرد.

در پایان، روش مستقیم تشخیصی مولکولی با PCR، روشی حساس، آسان، سریع و اختصاصی است و به منظور تشخیص و مطالعات اپیدمیولوژیکی پیشنهاد می‌شود (۱۶،۱۷) .

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران مرکزتحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان که خالصانه و صادقانه از آنچه که در توان داشتند دریغ نکردند و همچنین از همکارانی که در جمع‌آوری نمونه‌ها نهایت همکاری را به عمل آورده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Jones MS, Whipps CM, Ganac RD, Hudson NR, Boorom K. Association of Blastocystis subtype 3 and 1 with patients from an oregon community presenting with chronic gastrointestinal Illnes. Parasitol Res. 2009; 104: 491.
2. Souppart L, Sanciu G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, et al . Molecular epidemiology of human Blastocystis Isolates in france. Parasitol Res.2009: 105; 413-421.
3. Tan KS. New insights on classification, Identification, and clinical Relevance of Blastocystis spp. Clin Microbiol Rev.2008; 21(4): 639-665.
4. Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC. Morphology and reproductive mode of Blastocystis hominis in diarrhea and in vitro Parasitol Res.2007;101:43-51.
5. Rivera WL. Polygenetic analysis of Blstocystis Isolates from animal and human hosts in the Philippines. Veter parasitol. 2008: 156;178-182.
6. Valido EM, Rivera WL. Colony growth of Philippine Isolates of Blastocystis hominis in simplified. Soft agar medium. Parasitol Res .2007; 101:213-217.
7. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human Blastocystis hominis Egyptian Isolates in Experimentally infected rats. Parasitol Res.2008; 102: 853-860.
8. Su FH, Chu FY, Li CY, Tang HF, Lin YS, Peng YJ, et al. Blastocystis hominis infection in long-term care Facilities in Taiwan prevalenve and associated clinical Factors. Parasitol Res.2009;105:1007-1013.
9. Rhongbutsri P. Seasonal prevalence of Blastocystis hominis among patients Attending Thammasat chalermprakiat Hospital, pathum Thani province, Thailand. J Trop med Parasitol. 2005;28:39-42.
10. Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human Blastocystis Isolates from four epidemiological setting in china. Parasitol Res. 2007;102:83-90.
11. Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, et al. Blastocystis subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz.2009;104(5):724-727.
12. Long HY, Handschack A, König W, Ambrosch A. Blastocystis hominis modulates Immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. Parasitol. Res. 2001;87: 1029-1030.
13. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Experimental Blastocystis hominis infection in laboratory mice. Parasitol Res. 1997;83:319-325.
14. Jones MS 2nd, Ganac RD, Hiser G, Hudson NR, Le A, Whipps CM.Detection of Blastocystis from stool samples using real time PCR. Parasitol Res. 2008;103:551-557.
15. Elwakil HS, Hewedi IH. Pathogenic Potential of Blastcystis hominis in laboratory Mice. Parasitol Res. 2010: 107; 685-689.

16. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC. Detection of Blastocystis hominis in unpreserved stool specimens by using PCR. J parasitol. 2006; 92(5):1081-1087.
17. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorom K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, et al. Comparison of methods for Detection of Blastocystis infection in Routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD patients in Ankara, Turkey. PLoS One. 2010;5(11): e15484.
18. Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, et al. Genetic variability of Blastocystis Isolates in china. Parasitol Res. 2006;99:597-601.
19. Tan KS. Blastocystis in humans and animals: New insights using modern methodologies. Vet Parasitol.2004; 126: 121-144.
20. Dagci H, Kurt O, Demirel M, Ostan I, Azizi NR, Mandiracioglu A, et al. The prevalence of intestinal parasites in the province of Izmir, Turkey. Parasitol Res. 2008;103:839-845.
21. Akhlaghi L, Shamseddin J, Meamar AR, Razmjou E, Oormazdi H. Frequency of intestional parasites in Tehran. Iranian J Parasitol. 2009; 4(2):44-47.