بررسی ملکولی میزان شیوع آلودگی *بلاستوسیستیس* درتعدادی از گاوهای شهرستان خرم آباد، ایران

بادپروا، ا.[۱]، خیراندیش، ف.[۱]، صدرایی، ج .[۲*]، فروزنده، م.[۲].

دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۰۳ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۲۰

خلاصه

بلاستوسیستیس تک یاخته ای زئونوز و بی هوازی است که به صورت مستقیم از طریق خوردن آب و مواد غذایی آلوده به کیست منتقل می شود. این انگل دارای انتشار جهانی بوده و شیوع آن در جوامعی که سطح بهداشتی پایین تری دارند، بیشتر است. در این مطالعه، ۱۹۶ نمونه مدفوع ازگاوهای کشتاری (۹۸ نمونه) و گاو داری های (۹۸ نمونه) شهرستان خرم آباد، به صورت تصادفی جمع آوری شد. پس از استخراج DNA، آلودگی نمونه ها به *بلاستوسیستیس* به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۹۶نمونه مدفوع گاوی ۱۹نمونه (۹/۷ ٪) به انگل *بلاستوسیستیس* مبتلا بودند که ۱۲(۱۲/۲ ٪) نمونه گاو های کشتاری و ۷ (۷/۱ ٪) نمونه از گاوهای دامپروری بودند. از آنجایی که گاو به عنوان یک منبع مهم غذایی از نظر تامین گوشت و سایر فرآورده های آن در ایران محسوب می شود، بررسی این آلودگی با توجه به امکان انتقال آن به انسان از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: بررسی مولکولی، *بلاستوسیستیس* ، مدفوع، گاو، خرم آباد، ایران.

۱. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۲ . گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

*نویسنده مسؤول: **sadraeij@modares.ac.ir**

مقدمه

بلاستوسیستیس تک یاخته ای، بی هوازی و زئونوز است که درروده بزرگ انسان و حیوانات مختلف زندگی می کند (Denoeud، و همکاران، ۲۰۱۲ ; Yiming و همکاران، ۲۰۰۷). این انگل درسال ۱۹۱۲ از نمونه مدفوع انسان جدا و *بلاستوسیستیس* هومی نیس نامگذاری شد و به عنوان یک میکروارگانیسم بی ضرر تا ده ها سال به فراموشی سپرده شد. اما با مطالعات انجام شده در سال های اخیر، اهمیت بهداشتی انگل در انسان آشکار گردید. همچنین ارگانیسم های مشابه و غیر قابل تفکیکی با نمونه انسانی در سایر حیوانات نیز مشاهده شد، که انگل شناسان آن را *Blastocystis spp* نامیده اند (Jones و همکاران، ۲۰۰۹; Zhang و همکاران، ۲۰۰۷; Tan، ۲۰۰۸). میزان شیوع آلودگی درکشورها و حتی دربین حیوانات هر کشور تفاوت دارد، این میزان در کشورهای در حال توسعه بیشتر است و بیشترین شیوع آلودگی در مناطقی با فقر بهداشتی پایین، گزارش شده است (Jones و همکاران، ۲۰۰۸; Abe و همکاران، ۲۰۰۲; Tan، ۲۰۰۴). مجموعه مطالعات اپیدمیولوژیکی، تجربی و کشت سلولی نشان دهنده بیماری زایی *بلاستوسیستیس* در انسان است که با علائم گوارشی مانند اسهال های حاد و مزمن، نفخ، درد شکم و یبوست دیده می شود، ولی از آن جا که آلودگی در بعضی از افراد بدون علامت هم دیده شده، بیماریزایی انگل مورد بحث است (Tan ، ۲۰۰۸; Dogruman- AL و همکاران، ۲۰۰۹; Elwakil و Hewedi، ۲۰۱۰). *بلاستوسیستیس* دارای شش شکل متنوع شامل اشکال واکوئوله، گرانوله، کیست، آمبوئیدی، بدون واکوئوله و مولتی واکوئوله است و این تنوع در مرفولوژی موجب شده که تشخیص میکروسکوپی، حتی در افراد با تجربه مشکل باشد (Zhang و همکاران،۲۰۰۷; Yaicharoen و همکاران، ۲۰۰۵; Tan و Suresh ، ۲۰۰۶). این انگل براساس تفاوت های ژنتیکی به تحت نوع هایی(subtype) تقسیم می شود که هر یک به میزبان خاصی تمایل دارد، ضمن این که میزبان ها خیلی اختصاصی نیستند. مثلا تحت نوع شماره ۴ به جوندگان، شماره ۵ به گاو و خوک و شماره ۳ به انسان تمایل دارد (Tan ، ۲۰۰۸). بعضی از مطالعات نشان داده که شیوع و شدت آلودگی در افراد با نقص سیستم ایمنی بیشتر است (Forsell و همکاران، ۲۰۱۲). روش های متعدد آزمایشگاهی با حساسیت و ویژگی های متفاوت در تشخیص این انگل به کار می روند که تا قبل از استفاده از روش های مولکولی، روش کشت نسبت به روش میکروسکوپی از حساسیت بالاتری برخوردار بوده است. ولی مطالعات نشان داده که حساسیت روش PCR نسبت به سایر روش ها بیشتر و تا ۹۷ درصد می رسد (Stensvold و همکاران، ۲۰۰۶).

در مطالعات متعدد، زئونوز بودن این انگل گزارش شده است، بطوریکه وجود تحت نوع های گاوی و خوکی گونه ناشناخته *بلاستوسیستیس* در انسان و همچنین تحت نوع انسانی، در دام گزارش شده است (Moosavi و همکاران، ۲۰۱۲; Petrášová و همکاران، ۲۰۱۱; Yakoob و همکاران، ۲۰۱۰; Yan و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعات انجام شده در ایران حاکی از وجود گونه ناشناخته *بلاستوسیستیس* در این کشور می باشد. بطور مثال در مطالعه انجام شده به روش مولکولی بر روی ۴۲۰ نمونه مدفوع انسانی، ۳۳ درصد آلودگی به این انگل اعلام شده است (Moosavi و همکاران، ۲۰۱۲). لذا با توجه به اینکه این انگل از راه گوشت گاو، بعنوان یک منبع غذایی موجب آلودگی انسان می شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی آلودگی گاوها به گونه ناشناخته *بلاستوسیستیس* با روش ملکولی PCR بود که برای اولین بار در ایران در شهر خرم آباد انجام گرفت و با اثبات وجود انگل، زمینه برای مطالعات بعدی مساعد خواهد شد.

مواد و روش کار

این مطالعه مقطعی- توصیفی در سال ۱۳۹۰ در شهر خرم آباد، استان لرستان انجام گرفت. ۱۹۶ نمونه مدفوع گاوی از دامداری ها (۹۸ نمونه از آنهایی که شرایط بهداشتی مناسب تری داشتند) و کشتارگاه (۹۸ نمونه) که محل ارجاع دام های پراکنده در محیط اند و می تواند نمونه ای از جامعه گاوی شهرخرم آباد باشد، در ظروف پلاستیکی یکبارمصرف استریل و بدون اضافه نمودن فیکساتور جمع آوری و بلافاصله جهت انجام آزمایشات لازم به آزمایشگاه انگل شناسی ارسال شدند. در آزمایشگاه با مخلوط نمودن ۲ گرم از هر نمونه در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی، سوسپانسیونی تهیه و جهت حذف مواد زائد از الک شماره ۱۰۰ عبورداده شدند (Clark و همکاران،۲۰۰۲). سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰، سانتریفوژ و قسمت روئی تخلیه و از رسوب برای مراحل بعدی استفاده گردید.۲۰۰ میلی گرم از هر رسوب در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر ریخته و استخراج DNA توسط کیت کیا ژنQIAamp DNA stool Mini kit (QIAGEN,Hiden,Germany) و طبق پروتکل شرکت سازنده، انجام شد. سپس DNA های استخراج شده در ۲۰ ^{oC}- نگهداری شدند. واکنش PCR و پرایمرهای مورد استفاده مطابق آنچه در مطالعات قبلی توصیف شده بود انجام گردید (ابتدا ۵ دقیقه در دمای ۹۴ $^{o C}$ و سپس ۳۰ سیکل شامل: ۱ دقیقه در ۹۴ $^{o C}$ ، ۱ دقیقه در ۵۸ $^{o C}$ و ۱ دقیقه در ۷۲ $^{o C}$ و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ $^{o C}$ اجرا شد) و محصول PCR مورد انتظار bp ۳۱۰ بود

Yan) و همکاران، ۲۰۰۶).

به طور خلاصه، پرایمر های استفاده شده در این مطالعه، عبارت بودند از:

b11400 For C (5'- GGA ATC CTC TTA GAG GGA CAC TAT ACA T-3') و

b11710Rev C (5'-TTA CTA AAA TCC AAA GTG TTC ATC GGA C-3')

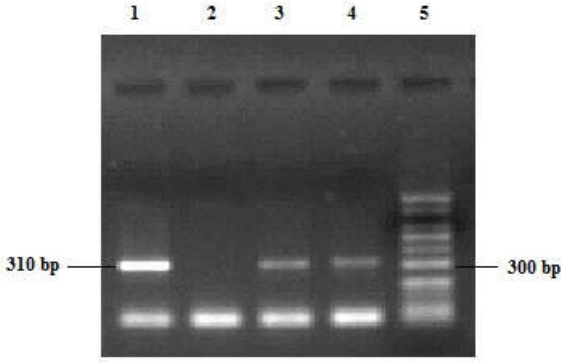
برای کنترل مثبت از نمونه ای که در لام مستقیم و کشت تهیه شده از آن، انگل *بلاستوسیستیس* جدا شد، استفاده گردید و برای کنترل منفی، از نمونه ای که در شرایط مذکور فاقد انگل بود استفاده شد. محصول PCR بدست آمده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد همراه با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و الکتروفورز شد و از طریق دستگاه Gel document مشاهده باند ها صورت گرفت. به منظور تعیین توالی، تعدادی نمونه جهت سکانس آماده گردید و به شرکت Bioneer در کشور کره فرستاده و سپس توسط نرم افزار Chromas خوانده شد.

نتایج

در این مطالعه ۱۹۶ نمونه مدفوع گاوی از دو گروه گاوداری های صنعتی (۹۸ نمونه) و گاوهای کشتارگاهی شهرستان خرم آباد (۹۸ نمونه) جمع آوری و به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR با bp ۳۱۰ نشان دهنده آلودگی نمونه با انگل *بلاستوسیستیس* بود (تصویر ۱). از ۱۹۶نمونه مورد بررسی ۱۹ نمونه (۹/۷٪) به انگل *بلاستوسیستیس* آلودگی داشتند. به تفکیک مکان نمونه گیری، ۱۲مورد (۱۲,۲) از گاو های کشتارگاهی و۷ مورد (۷,۱) از گاو های دامپروری به انگل مذکور مبتلا بودند که بین میزان آلودگی در این دو محل نمونه گیری، اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p>0.05$). نتیجه سکانس محصول PCR، در ژن بانک با شماره های JX524459 و JX524460 به ثبت رسید که با نمونه های *بلاستوسیستیس* ثبت شده در ژن بانک با درصد بالایی مشابهت داشتند.

بحث

در این مطالعه میزان آلودگی *بلاستوسیستیس* در تعدادی از گاوهای شهر خرم آباد به روش PCR، ۹/۶٪ بود و این میزان درگاوهای محلی ارجاع داده شده به کشتارگاه و گاوهای پرورش یافته در دامداری ها، فاقد اختلاف معنی دار بود. از آنجا که این مطالعه ملکولی برای نخستین بار بر روی گاوها در ایران انجام شده است، مقایسه



تصویر۱. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز

ستون ۱. کنترل مثبت

ستون۲. کنترل منفی

ستون های ۳و۴. ایزوله های مثبت

ستون ۵. Marker ۵۰ bp DNA Ladder

آن با بررسی های مشابه داخلی وجود نداشت، هرچند وجود آلودگی انگل در انسان یا خوک با روش های میکروسکپی در ایران گزارش شده است (Daryani و همکاران، ۲۰۱۲; Solaymani – Mohammadi و همکاران، ۲۰۰۴; Badparva و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعات انجام شده در سایر کشورها، نشان دهنده میزان شیوع بسیار متغیر آلودگی در گاو می باشد. آلودگی *بلاستوسیستیس* در گاوهای ژاپن کم و در محدوده ۱۵ – ۸ / ۱ درصد می باشد که با مطالعه حاضر قابل تطبیق است و در گاوهای مزارع اروپایی بالا و تا ۹۱ درصد می رسد (Abe و همکاران، ۲۰۰۲). انگل می تواند در دستگاه گوارش میزبان های مختلف جایگزین شود و این خود باعث پراکندگی بیشتر انگل می شود، لذا با توجه به اهمیت زئونوتیک انگل، احتمال آلودگی انسان افزایش می یابد (Denoeud وهمکاران، ۲۰۱۲; Yiming وهمکاران، ۲۰۰۷; Zhang و همکاران، ۲۰۰۷; Tan ، ۲۰۰۸; Jones و همکاران، ۲۰۰۸; Dogruman- AL و همکاران، ۲۰۰۹). نتایج یک مطالعه حاکی از آن بود که ۵۷٪ از افراد شاغل در کشتارگاه گاو و خوک به *بلاستوسیستیس* مبتلا بودند و در افرادی که با حیوانات ارتباط بیشتری داشتند، آلودگی هم به نسبت بیشتر بود و شاید این آلودگی از طریق شستشو، تمیز کردن و یا تغذیه این دام ها صورت گرفته باشد (Konig و Muller ، ۱۹۹۷; Rajah Salim و همکاران، ۱۹۹۹). شاخص های منحصر به فرد انگل سبب شده است که توسط انگل شناسان به عنوان یک انگل نوظهور مورد توجه قرار گیرد (Yiming وهمکاران، ۲۰۰۷ ; Jones و همکاران، ۲۰۰۹ ; Yaicharoen و همکاران، ۲۰۰۵). بر اساس نظر برخی

از محققین، *بلاستوسیستیس* علاوه بر انسان در حیوانات حساس آزمایشگاهی می تواند باعث ایجاد واکنش های التهابی گردد. در مطالعه ای، تزریق *بلاستوسیستیس* درعضله پای موش منجر به تورم شدید، نکروز عضلانی و تجمع پلی مورفونوکلئرها در محل تزریق گردید که نشان دهنده نقش این انگل در جذب سلول های دفاعی است (Moe و همکاران، ۱۹۹۸). *بلاستوسیستیس* همچنین قادر است چندین هفته تا چندین سال یا به عبارتی تا زمان معالجه در دستگاه گوارش میزبان باقی بماند که خود می تواند علتی برای افزایش احتمال آلودگی باشد (Long و همکاران، ۲۰۰۱). از آنجا که انتقال انگل به وسیله کیست و از راه مدفوعی- دهانی است پس رعایت نکات بهداشتی توسط انسان در پیشگیری حائز اهمیت است. از آنجا که گاو بعنوان یک منبع غذایی مهم (مصرف گوشت و فراورده های آن) برای انسان محسوب می شود، در نتیجه آلودگی در این حیوان از اهمیت ویژه ای برخوردار است، لذا توجه به این انگل در گاو و زئونوتیک بودن آن، ضرورت مطالعات جامع‌تر بر روی جنبه های گوناگون این انگل را می طلبد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری های صمیمانه سرکار خانم قاسمی در گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس، جناب آقای دکتر رسولیان وسایر همکاران محترم در مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی وهمچنین آقایان اکبریان وخانجانی کمال تشکر و سپاس را دارند. همچنین از تمامی افرادی که در انجام این تحقیق یاری رساندند صمیمانه قدردانی می گردد.

Journal of Veterinary Laboratory Research 6 (2014) 51-58

A molecular survey on the prevalent of *Blastocystis* infection in some cattle in Khorramabad city, Iran

Badparva, E.[1], Kheirandish, F.[1], Sadraee , J.[2*], Forouzandeh, M.[2].

Received: 21.02.2013 Accepted: 11.09.2013

Abstract

Blastocystis is a zoonotic and anaerobic protozoan that transmitted directly by the cyst via contaminated water and food. It is cosmopolitan in distribution and its prevalence is higher in the community with poor hygiene. Stool samples (n=196) were collected from cattle of slaughterhouse (98 samples) and dairy farms (98 samples). DNA extracted for each sample and analyzed by PCR for *Blastocystis* contamination. Out of 196 samples , 19 (9.6%) samples were positive for *Blastocystis* that 12 (12.2%) samples were form cattle of slaughterhouse and 7 (7.1%) samples from cattle of dairy farms. Since cattle are as an important source of food for the supply of meat and other products in Iran, hence investigation of the contamination and possibility of transmission to humans is of particular importance.

Key words: Molecular prevalent, *Blastocystis*, Feces, Cattle, Khorramabad city, Iran.

1. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

2. Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: **sadraeij@modares.ac.ir**

منابع

Abe, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y., Yoshikawa, H. 2002. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. Veterinary Parasitology. **106**, 203-212.

Badparva, E., Pournia, Y., Fallahi, SH. 2012. Prevalence of *Blastocystis hominis* in lorestan province , west of Iran . Asian Journal of Biological Sciences. **5**, 57 – 61.

Clark, G., Diamond L.S. 2002. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. Clinical Microbiology Reviews. **15**, 329–341.

Daryani, A., Sharif, M., Nasrolahei, M., Khalilian, A., Mohammadi, A., Baregar, G. 2012. Epidemiological survey of the prevalence of intestinal parasites among schoolchildren in Sari, northern Iran. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **106**, 455-9.

Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., Segurens, B., Anthouard, V., Texier, C., Blot, N., Poirier, P., Ng, G.C., Tan, K.S., Artiguenave, F., Jaillon, O., Aury, J.M., Delbac, F., Wincker, P., Vivarès, C.P., El Alaoui, H. 2012. Genome Sequence of the the stramenopile *Blastocystis* , a human anaerobic parasite. Genomic Biology **12**, R29.

Elwakil, H.S., Hewedi, I.H. 2010. Pathogenic potential of *Bastocystis hominis* in laboratory mice. Parasitology Research.**107**, 685-689.

Dogruman- AL, F., Kustimur, S., Yoshikawa, H., Tuncer, C., Simsek, Z., Tanyuksel, M., Araz, E., Boorom K. 2009. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and in ammatory bowel disease in Ankara, Turkey. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, **104**, 724-727.

Forsell, j., Granlund, M., Stensvold, C.R., Clark, G.C., Evengard, B. 2012. Subtype analysis of *Blastocystis* Isolates in Swedish patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. **31**, 1689 – 1696.

Jones, M., Whipps, C.M., Ganac, R.D., Hudson, R., Boroom, K. 2009. Association of *Blastocystis* suptype 3 and 1 with patients From an Oregon community Persenting with chronic gastrointestinal illness .Parasitology Research. **104**, 341 – 345.

Jones, M.S., Ganac, R.D., Hiser, G., Hudson, N.R., Le, A., Whipps, C.M. 2008. Detection of *Blastocystis* from stool samples using real- time PCR. Parasitology Research. **103**, 551-557.

Konig, G., Muller, H.E. 1997. *Blastocystis* hominis in animals: incidence of four serogroups. Zentralbl

Bakteriol. **286**, 435-440.

Long, H.Y., Handschack, A., Konig, W., Ambrosch, A. 2001. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial calls. Parasitology Research. **87**, 1029-1030.

Moe, K.T, Singh, M., Gopakrishnakone, P., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., Yap, E.H. 1998. Cytopathcic effect of *Blastocystis hominis* after intramuscular inoculation into laboratory mice , Parasitology Research. **84**, 450 – 454.

Moosavi, A., Haghighi, A., Mojarad, E.N., Zayeri, F., Alebouyeh, M., Khazan, H., Kazemi, B., Zali, M.R. 2012. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. Parasitology Research. **111**, 2311-2315.

Petrášová, J., Uzlíková, M., Kostka, M., Petrželková, K.J. Huffman, M.A. Modrý, D. 2011. Diversity and host speci city of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. International Journal for Parasitology. **41**,1113–1120.

Rajah Salim, H., Suresh Kumar, G., Vellayan, S., Mak, J.W., Khairul Anuar, A., Init, I., Vennila, G.D., Saminathan, R., Ramakrishnan, K. 1999. *Blastocystis* in animal handlers. Parasitology Research. **85**, 1032-1033.

Solaymani – mohammadi, S., Rezaian, M., Hooshyar, H., Mowlavi, G.R., Babaei, Z., Anwar, M.A. 2004. Intestinal protozoa in wild boars (Sus scrofa) in western Iran . Journal of Wildlife Diseases. **40**, 801 –803.

Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H.V., Arendrup, M.C. 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using PCR. Journal of Parasitology. **92**, 1081-87.

Tan, K.S. 2008. New insights on classi cation, identi cation and clinical Relevance of *Blastocystis SPP*. Clinical Microbiology Review. **2**, 639 -655.

Tan, T.C., Suresh, K.G. 2006. Amoeboid form of *Blastocystis hominis*- a detailed ultrastructural insight. Parasitology Research. **99**, 737-742.

Tan, K.S. 2004. *Bastocystis* in human and animals: new insight using modern methodologies. Veterinary Parasitology. **126**, 121-144.

Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M.A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., Khan, R. 2010. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. **106**:1033–1038.

Yaicharoen, R., Sripochang, S., Sermsart, B., Pidetcha, P. 2005. Prevalence of *Bastocystis hominis* infection in Asymptomatic individuals from Bangkok, Thailand, Southeast Asian. International Journal of Tropical Medicine and Public Health. **36**, 17-20

Yan, Y., Su, S., Lai, R., Liao, H., Ye, J., Li, X. 2006. Genetic variability of *Bastocystis* isolates in China. Parasitology Research. **99**, 597-601.

Yan, Y., Su, S., Ye, J., Lai, X. Lai, R. 2007. *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. Parasitology Research. **101**, 1527–1532.

Yiming, Y., Shuilian, S., Jinhura, Y., Xiaofang, L. 2007. *Blastocystis sp* . subtype 5 : a possibly zoonotic genotype . Parasitology Research, **101**, 1527 – 1532.

Zhang, X., Qiao, J.Y., Zhou, X.J., Yao, F.R., Wei, Z.C. 2007. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis* hominis in diarrhea and in vitro. Parasitology Research. **101**, 43-51.