DOI: 10.48305/jims.v40.i669.0288

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۶۹/هفته‌ی اول تیر ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۱۹ تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۴/۷

فعالیت پروتئازی در ساب تایپ‌های مختلف بلاستوسیستیس در اصفهان

فرزین خسروی دانش[۱]، سمیه موسوی مبارکه[۲]، حسین یوسفی دارانی[۳]، زهرا غیور نجف‌آبادی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بلاستوسیستیس، تک‌یاخته‌ای خارج سلولی و غیر متحرک بوده که در حال حاضر شایع‌ترین تک‌یاخته‌ی دستگاه گوارش انسان و طیف وسیعی از موجودات است. با این‌که زمان طولانی از شناسایی آن می‌گذرد، اما نقش آن در بیماری و سلامت افراد بحث‌برانگیز است. پروتئاز بلاستوسیستیس، یکی از فاکتورهای مهم در ایجاد علائم می‌باشد. در این مطالعه فعالیت پروتئازی در چند ساب‌تایپ به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: نمونه‌ی مدفوع ۶۰۰ فرد مراجعه‌کننده به مراکز آزمایشگاهی شهر اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به صورت میکروسکوپی بررسی گردید و نمونه‌های بلاستوسیستیس مثبت در محیط کشت داده شدند، با استفاده از روش فایکول بلاستوسیستیس‌ها به صورت خالص جدا گردید. برای مشخص نمودن ساب‌تایپ‌ها PCR (Polymerase chain reaction) و تعیین توالی انجام پذیرفت. جهت ارزیابی فعالیت پروتئازی روش Gelatin/SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در روش بررسی مستقیم میکروسکوپی، ۵۰ نمونه (۸/۳۳ درصد) از لحاظ بلاستوسیستیس مثبت بود که ۳۴ نمونه در کشت مثبت و PCR شد. از این تعداد، ۱۸ نمونه تعیین توالی گردید و ۴ نوع ساب‌تایپ ۳-۱ و ۶ جدا گردید. در ساب تایپ‌های مختلف، تفاوت سایز باندهای حاصل از فعالیت پروتئازهای مختلف مشهود بود. در ساب‌تایپ ۳-۱ یک باند با وزن ۲۰ کیلودالتونی به صورت مشترک مشاهده گردید. ساب‌تایپ ۶ الگوی باندها کاملاً متفاوت با سایر ساب‌تایپ‌ها بود.

نتیجه‌گیری: در ساب‌تایپ‌های مختلف، تفاوت سایز باند پروتئازی مشاهده گردید که می‌تواند دلیلی بر تفاوت پروتئازی و احتمالاً بیماری‌زایی در نوع ساب‌تایپ‌های مختلف باشد. در این مطالعه با انجام روش فایکول از محیط کشت مدفوع، نتایج قابل اعتمادتری به دست آمد.

واژگان کلیدی: بلاستوسیستیس؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز؛ ساب‌تایپ؛ پروتئاز

ارجاع: خسروی دانش فرزین، موسوی مبارکه سمیه، یوسفی دارانی حسین، غیور نجف‌آبادی زهرا. **فعالیت پروتئازی در ساب تایپ‌های مختلف بلاستوسیستیس در اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۶۹): ۲۹۴-۲۸۸

مقدمه

بلاستوسیستیس، تک‌یاخته‌ای در دستگاه گوارش انسان و طیف وسیعی از حیوانات است که متعلق به شاخه‌ی استرامنوپیل می‌باشد. تخمین زده می‌شود که این انگل، ۱ تا ۲ میلیارد نفر را در سراسر جهان آلوده کرده است (۱). بر اساس تجزیه و تحلیل ژن rRNA (SSU)، ۲۲ ساب‌تایپ در انسان و در انواع حیوانات شناسایی شده است (۲). ساب‌تایپ ۹-۱ و ۱۲ در انسان گزارش شده، اما بیش از ۹۰ درصد گزارش‌ها مربوط به ساب تایپ‌های ٤-۱ می‌باشد (۳).

با این‌که یک قرن از شناسایی این ارگانیسم می‌گذرد، اما بیماری‌زایی آن همچنان بحث‌برانگیز می‌باشد. با این وجود بلاستوسیستیس را با علائم گوارشی از قبیل اسهال، درد شکمی، حالت تهوع، استفراغ، سندروم روده‌ی تحریک‌پذیر و کهیر مرتبط می‌دانند (۳). نوع ساب‌تایپ بلاستوسیستیس، تولید پروتئازها، تقابل این تک‌یاخته با فلور میکروبی دستگاه گوارش و ایجاد تغییر در عملکرد سیستم ایمنی میزبان از جمله عواملی هستند که در بیماری‌زایی یا میزان علائم مؤثر است (٤، ٥).

به خوبی شناخته شده است که پروتئازها، نقش اصلی را در تقابل میزبان با پاتوژن ایفا می‌کنند. در انگل‌های روده‌ای مانند انتاموبا و

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: زهرا غیور نجف‌آبادی: استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: ghayour@med.mui.ac.ir

ژیاردیا، سیستئین پروتئازها به عنوان فاکتورهای کارآمد حدت در نظر گرفته شده‌اند (٦، ٧). در مطالعات انجام شده بر روی فعالیت‌های پروتئاز ST4 و ST7 بلاستوسیستیس نشان داده شد، پروتئازها قادرند ایمونوگلوبولین‌های A انسانی را در شرایط آزمایشگاهی بشکنند و نفوذپذیری سلول‌های اپی‌تلیال روده را افزایش دهند (٩، ٨). با این حال، تغییرات درون و درون‌زیرگروهی با حدت و فعالیت پروتئاز بلاستوسیستیس مرتبط است که احتمالاً منعکس‌کننده‌ی تغییرات در سرتاسر ژن‌های پروتئاز در میان زیرگروه‌ها است (١٠). در حال حاضر مطالعات در ارتباط با فعالیت پروتئازی ساب‌تایپ‌های بلاستوسیستیس محدود می‌باشد، در مطالعه‌ی حاضر، فعالیت پروتئاز بلاستوسیستیس زیرگروه‌های ٣-١ و ٦ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش‌ها

این مطالعه‌ی مقطعی- توصیفی با کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1399.776 از اسفندماه ١٣٩٩ تا آذر ماه ١٤٠٠ بر روی ٦٠٠ نمونه مدفوع از مراجعین به آزمایشگاه‌های شهر اصفهان انجام گرفت. هر نمونه‌ی مدفوع بلاستوسیستیس مثبت، معیار ورود نمونه به مطالعه و هر نمونه‌ی مدفوع بلاستوسیستیس منفی، معیار خروج از مطالعه بود. نمونه‌های بلاستوسیستیس مثبت بلافاصله برای انجام آزمایشات بعدی به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال می‌یافت.

بررسی مستقیم و کشت: نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده به روش مستقیم با میکروسکوپ مورد آزمایش قرار گرفت. سپس ٥٠ نمونه‌ی مثبت و مشکوک به بلاستوسیستیس میکروسکوپی، در محیط اختصاصی جونز با ١٠ درصد سرم اسب غیر فعال کشت داده شد (١١). بعد از گذشت ٧٢ ساعت و در صورت مثبت بودن، هر کدام از کشت‌ها در دو و یا سه محیط جونز جدید پاساژ داده شد و بعد از گذشت ٤ روز محیط‌ها در دور ٢٠٠٠ به مدت ٥ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب تمام لوله‌های یکسان مخلوط گردید و حجم نهایی با سرم فیزیولوژی به حجم ٦ میلی‌لیتر رسید. سپس به آرامی محلول حاوی بلاستوسیستیس، روی ٤ میلی‌لیتر فایکول سرد اضافه و به مدت ٢٠ دقیقه با سرعت ٢٥٠٠ rpm در دمای ١٠ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. لایه‌ی ابری مابین محلول زیری فایکول و رویی سرم فیزیولوژی که شامل بلاستوسیستیس بود، جدا گردید و با سرم فیزیولوژی به حجم ١٠ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به علت سمی بودن فایکول، انگل‌های جمع‌آوری شده در دور ١٥٠٠ rpm به مدت ٥ دقیقه سانتریفیوژ گردید. جهت دستیابی به تک یاخته‌ی عاری از هرگونه آلودگی، مرحله‌ی جداسازی با استفاده از فایکول مجدداً تکرار گردید. با مشاهده‌ی رسوب، باکتری‌ها و مخمرها به صورت کامل حذف شده بود. بلاستوسیستیس‌ها شمارش و به تعداد 10^6 در ١ میلی‌لیتر رسانده شد.

استخراج DNA و PCR: ٥٠ میکرولیتر از سلول‌های بلاستوسیستیس جمع‌آوری شده از محیط کشت در تیوب ریخته شد و به مدت ١٥ دقیقه در بن‌ماری با دمای ٩٥ درجه قرار گرفت. سپس در دور ١٢٠٠٠ rpm به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی حاوی DNA برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

برای تکثیر قطعه‌ی SSU-rRNA بلاستوسیستیس از پرایمرهای اختصاصی RD5 (5′-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3′) و BhRDr (5′-GAGCTTTTTAACTGCAACAACG-3′) استفاده گردید (١٢). برای انجام PCR با حجم ٢٥ میکرولیتر، از ١٢/٥ میکرولیتر مسترمیکس آمپلیکون (دانمارک)، ٨/٥ میکرولیتر آب مقطر، ١ میکرولیتر از هر کدام پرایمرها (١٠ پیکومول) و ٢ میکرولیتر DNA استفاده گردید. با برنامه‌ی دمایی PCR ابتدا ٣ دقیقه در دمای ٩٥ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ٣٥ سیکل شامل، ٣٠ ثانیه در ٩٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، ٣٠ ثانیه در ٥٨ درجه‌ی سانتی‌گراد و ٢٠ ثانیه در ٧٢ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت ١ دقیقه در ٧٢ درجه‌ی سانتی‌گراد با کمک ترموسایکلر PCR BIORAD T100 انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ١ درصد الکتروفورز شد و باندها به وسیله‌ی دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده گردید.

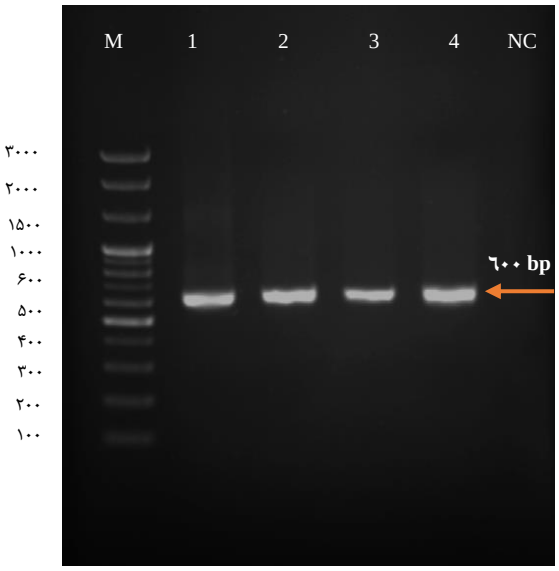
تعیین توالی: محصولات PCR با استفاده از پرایمر BhRDr برای تعیین توالی به آزمایشگاه جامع دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ارسال شد. کیفیت توالی‌یابی با نرم‌افزار Chromas مورد بررسی قرار گرفت و توالی‌ها با فرمت FASTA در پایگاه NCBI به آدرس (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) بررسی گردید. همچنین با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 توالی‌ها هم‌ردیف و درخت تکاملی آن رسم گردید.

روش Gelatin/SDS-PAGE: در این روش، پروتئین ژلاتین در ژل آکریل‌آمید استفاده گردید. ژلاتین پس از الکتروفورز توسط پروتئازها هضم شده و پس از رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو نوارهای شفافی در زمینه‌ی آبی مشاهده می‌شود. لیزات سلولی بلاستوسیستیس‌هایی که تعیین توالی شده بودند، توسط Gelatin/SDS-PAGE برای فعالیت پروتئاز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از سیستم بافر ناپیوسته (١٣) و با غلظت آکریل آمید ١٢/٥ درصد این روش انجام گرفت. به طور خلاصه، ٠/٣ درصد (وزنی/ حجمی) ژلاتین در ژل حل شد. نمونه‌ها جوشانده نشدند و همچنین در بافر لودینگ از ٢-مرکاپتواتانول استفاده نشد، تا پروتئین‌ها دناتوره نشده و پروتئازها غیر فعال نشوند. پس از

الکتروفورز با جریان ثابت ۳۰ میلی‌آمپر به مدت ۱/۵ ساعت تنظیم گردید. پس از آن برای حذف SDS، ژل‌ها ۱ ساعت در ۲/۵ درصد، Triton X-100 (v/v) قرار گرفت. پروتئازها با قرارگیری ژل‌ها در بافر حاوی ۱ میلی‌مولار DTT به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد فعال شدند. باندها با استفاده از رنگ‌آمیزی کوماسی بلو R-250 به مدت ۱ ساعت و بعد از رنگ‌بری، مشاهده شدند (۱٤).

یافته‌ها

در روش بررسی مستقیم میکروسکوپی، ۵۰ نمونه (۸/۳۳ درصد) از لحاظ بلاستوسیستیس مثبت و یا مشکوک به بلاستوسیستیس بود که ۳٤ نمونه در کشت، مثبت شد. از نمونه‌های PCR شده (شکل ۱)، ۱۸ نمونه تعیین توالی شد. با تعیین توالی ۱۸ نمونه، تعداد ٤ ساب‌تایپ به دست آمد که برای مطالعه و بررسی پروتئاز ساب‌تایپ‌ها کافی بود.



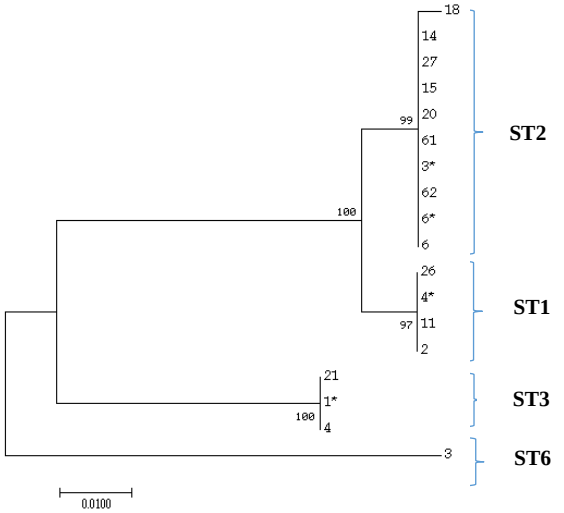
شکل ۱. ژل الکتروفورز M مارکر ۱۰۰bp، NC کنترل منفی، ۱ نمونه کنترل مثبت، ٤-۲ نمونه‌های مثبت

با بررسی توالی‌های انجام شده، بیشترین ساب‌تایپ مربوط به ST2 با فراوانی ۵۵/٦ درصد و سپس ST1 (۲۲/۲ درصد) بود (جدول ۱).

جدول ۱. فراوانی ساب‌تایپ‌ها

نوع ساب‌تایپ	ST1	ST2	ST3	ST6
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
تعداد	۴ (۲۲/۲)	۱۰ (۵۵/۶)	۳ (۱۶/۷)	۱ (۵/۵)

درخت تکاملی: برای رسم درخت تکاملی از ۱۸ توالی دارای پیک‌های منظم (در برنامه‌ی Chromas) استفاده شد. درخت تکاملی با استفاده از روش Neighbor-Joining تعریف و درخت بهینه با مجموع شاخه ۰/۱٦۵۱٤۸۲۵ نشان داده شد. مقادیر Bootstrapping با ۲۰۰۰ تکرار به دست آمد. مقیاس درخت، با طول شاخه در واحدهای مشابه به عنوان فاصله‌های تکاملی درخت فیلوژنتیک رسم گردید (شکل ۲).



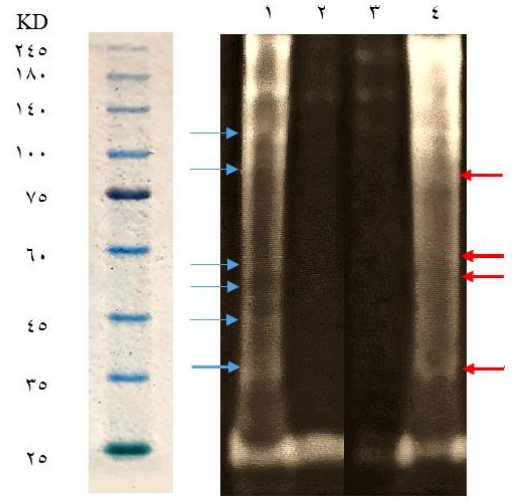
شکل ۲. رسم درخت تکاملی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7

چهار نوع ساب‌تایپ از هم تفکیک شد. بیش‌ترین شباهت بین ST1 و ST2 مشاهده شد و ST6 با دیگر ساب‌تایپ‌ها کاملاً تفاوت مشخص داشت.

٤-۸ فعالیت پروتئازی: در صورتی که فعالیت پروتئازی وجود داشته باشد درون ژل آکریل آمید حاوی ژلاتین، باندهای بی‌رنگ دیده می‌شود. رنگ پس‌زمینه به دلیل وجود پروتئین ژلاتین و در حضور رنگ کوماسی بلو به رنگ آبی پر رنگ دیده می‌شود و در مکان‌هایی که پروتئاز حضور داشته این ژلاتین مصرف شده و به صورت بی‌رنگ مشاهده می‌شود. زمانی که از محلول فایکول برای خالص‌سازی بلاستوسیستیس استفاده گردید، تعدادی از باندها و اسمیرهای ناشی از فعالیت آنزیمی سایر عوامل موجود در محیط کشت مانند باکتری‌ها، مخمرها، بقایای سلول‌های گیاهی و جانوری هضم نشده، حذف شد (شکل ۳).

در روش Gelatin/SDS-PAGE ساب‌تایپ ۲ دارای باند اصلی مشخص دارای اندازه در حدود ۲۰ کیلو دالتون و باندهای با وزن مولکولی بالا از ۲۰۰-۷۵ قابل مشاهده بود. ST1 و ST3 نیز دارای باند ۲۰ کیلو دالتون بودند. علاوه بر آن در ST3 باند ٦۰ و ۱۸۰ کیلو دالتون

مشاهده گردید که مخصوص ST3 بود. در ST1 نیز علاوه بر باند ۲۰ کیلو دالتون باند اختصاصی ۳۰ و چند باند بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ کیلو دالتون مشاهده شد. ST6 باندهای با وزن مولکولی پایین نداشت و در الگوی پروتئازی با سایر ساب‌تایپ‌ها تفاوت عمده داشت (شکل ٤).

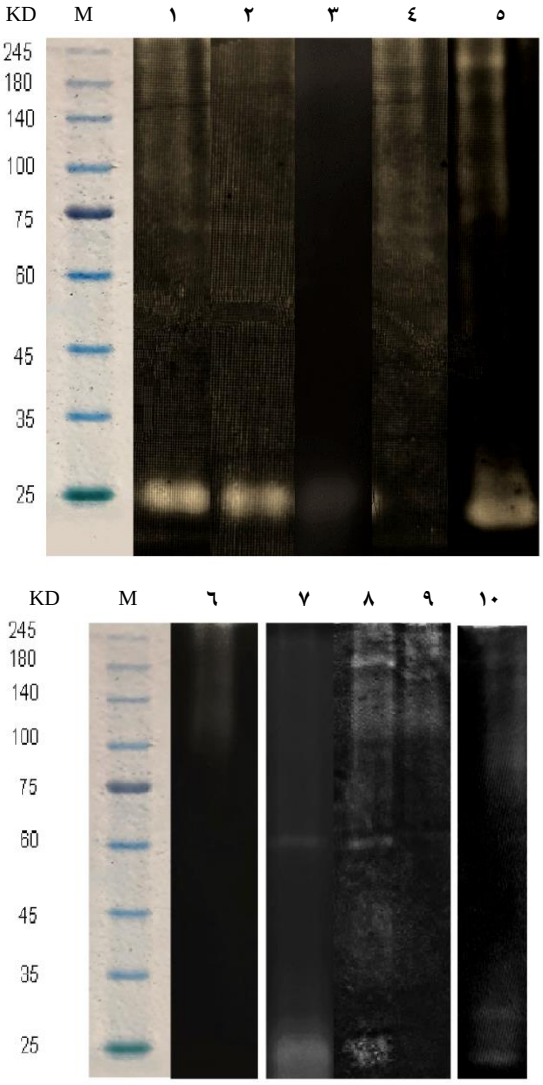


شکل ۳. ژل ژلاتین/آکریل آمید، برای نمایش فعالیت پروتئازی که بر اثر تجزیه‌ی ژلاتین باندهای بدون رنگ ظاهر شده؛ الگوهای متفاوت فعالیت پروتئازی در دو نمونه با ST2 قبل و بعد از خالص‌سازی با محلول فایکول. شماره‌ی ۱ و ٤: بدون خالص‌سازی با باندهای متعدد دیده می‌شود. شماره‌ی ۲ و۳ بلاستوسیستیس خالص می‌باشند. دارای یک باند ۲۰ و دو باند در محدوده‌ی KD ۱۵۰ و ۲۰۰. فلش‌های آبی نشان‌دهنده‌ی باندهای حذف شده در نمونه ۱ در مقایسه با نمونه‌ی ۲ و فلش قرمز نمونه‌ی ٤ در مقایسه با نمونه‌ی ۳ است.

بحث

در این مطالعه، درصد شیوع آلودگی به بلاستوسیستیس (۸/۳ درصد) نسبت به سایر مطالعات صورت گرفته کاهش داشته است (۱۵). دلیل اصلی برای کاهش میزان بلاستوسیستیس در افراد ممکن است به شیوع ویروس کرونا که منجر به محدودیت‌های سفر بین‌شهری و رفت آمد مردم با یکدیگر، تغییرات در زندگی روزمره و رفتارهای بهداشتی، ازجمله افزایش شستن دست‌ها، که احتمال قرار گرفتن در معرض عوامل بیماری‌زای غذایی را تغییر داده است مداخلات گسترده بهداشت عمومی برای جلوگیری از انتقال SARS-CoV-2 به این کاهش کمک کرده باشد (۱٦).

در مرحله‌ی PCR از یک ناحیه، ٦۰۰ نوکلئوتیدی بارکدی در ژن زیر واحد کوچک ریبوزوم استفاده شد. این ناحیه جهت بررسی ساب‌تایپ‌ها بسیار قابل اطمینان می‌باشد (۱۲). در مطالعه‌ی حاضر، ٤ نوع ساب‌تایپ بلاستوسیستیس (ST1، ST2، ST3 و ST6) مشاهده شد. از این تعداد، ST2 دارای فراوانی بیشتری بود که این نتیجه با مطالعه‌ی دیگری که در اصفهان انجام شد همخوانی داشت؛ ولی در اغلب مطالعات صورت گرفته در ایران بیشترین فراوانی مربوط به ST1 و ST3 می‌باشد (۱۷-۲۰). در مطالعه‌ی متاآنالیز انجام شده، ساب‌تایپ غالب در ایران، ST1 در نظر گرفته شده است (۲۱).



شکل ٤. ژل آکریل‌آمید در روش Gelatin/SDS-PAGE برای نمایش فعالیت پروتئازی که باندهایی روشن بر اثر تجزیه‌ی ژلاتین ظاهر شده؛ نمایش الگوهای متفاوت فعالیت پروتئازی در ساب‌تایپ‌های مختلف بلاستوسیستیس نمونه‌ی شماره‌ی ٥-۱ ST2، ٦ ST6، ۹-۷ ST3 و ۱۰ ST1 می‌باشد.

در این مطالعه یک مورد ST6 یافت شد که میزبان اصلی آن

طیور بودند (۲۲) و در مطالعه‌ی حاضر ST4 وجود نداشت، این نتیجه مطابق با یافته‌های مطالعات قبلی است که نشان می‌داد، ST4 در آسیا و خاورمیانه نادر است، در حالی که ST4 یکی از شایع‌ترین ساب‌تایپ‌ها در اروپا می‌باشد (۲۳). در این مطالعه، تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی نشان داد که ST1 و ST2 دارای شباهت بیشتری نسبت به سایر ساب‌تایپ‌های به دست آمده هستند. در سایر مطالعات نیز رابطه‌ی نزدیک بین ST1 و ST2 تأیید شده است (۲٤، ۲۵).

نقش بیماری‌زای بلاستوسیستیس بحث‌برانگیز باقی‌مانده است (۲٦). تاکنون بسیاری از آنزیم‌های هیدرولیتیک مؤثر در بیماری‌زایی در موجودات شناسایی شده‌اند و پروتئازهای بلاستوسیستیس نیز در بیماری‌زایی انگل نقش مهمی دارند (۲۷). پروتئازهای آزاد شده توسط بلاستوسیستیس مانند سیستئین و سرین پروتئازها، می‌توانند آپوپتوز را از طریق کاسپاز ۳ تحریک کنند (۲۸). این پروتئازها، عملکردهای سد روده را مختل می‌کنند، پروتئازها همچنین می‌توانند SIgA را تجزیه کنند که منجر به فرار انگل از سیستم ایمنی میزبان و کلونیزه شدن در دستگاه گوارش می‌شود (۲۹، ۳۰). پروتئازهای آزاد شده توسط انگل‌های تک‌یاخته، نقش مهمی در پاتوژنز دارند و به نظر می‌رسد، ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را تحریک می‌کنند (۳۱).

اهمیت پروتئازها در پاتوژنز بلاستوسیستیس به‌ویژه سیستئین پروتئازها در بقای انگل و بیماری‌زایی حیاتی هستند (۲٦). در تک یاخته‌ها، اکثر سیستئین پروتئازها با وزن مولکولی بین ۲۰ تا ۳۳ کیلو دالتون می‌باشند (۳۲). در این مطالعه ST1-3، دارای باند ۲۰ کیلو دالتونی که مشخصه‌ی سیستئین پروتئاز است، بودند. این باند از وضوح بیشتری در ST2 نسبت به سایر ساب‌تایپ‌ها برخوردار بود، که ممکن است دلیل قابل توجیهی در بیماری‌زایی ST2 باشد. نتایج مطالعات متعدد بیماری‌زا بودن ST2 را گزارش کرده‌اند (۳۰-۳۲).

Abdel-Hameed و Hassanin، فعالیت پروتئاز بلاستوسیستیس ST3 از انسان‌های علامت‌دار و بدون علامت جدا شده را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئازها در ۹٤/٤ درصد از بیماران علامت‌دار و ۲۵ درصد از افراد بدون علامت، وجود دارد. در مطالعه‌ی فوق نشان داده شد که ST3 دارای پروتئازهای با وزن مولکولی بالا و همچنین وزن مولکولی پائین می‌باشد (۱٤). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در ST3، پروتئازهای با وزن مولکولی پایین و بالا وجود دارد ولی باندهای مشاهده شده متفاوت از مطالعه‌ی آن‌ها بود. تغییرات در فعالیت پروتئازها در بین ساب‌تایپ‌های بلاستوسیستیس در مکان‌های مختلف ممکن است منجر به تفاوت در بیماری‌زایی آن‌ها شود و دلیلی برای متفاوت بودن بیماری در ساب‌تایپ‌های مختلف در مطالعات متعدد باشد.

Sio و همکاران، پروتئازهایی با وزن مولکولی بالا و پایین شامل پنج باند بین ٤٤ تا ۷۵ کیلو دالتون و چهار باند بین ۲۰ تا ۳۳ کیلو دالتون مشاهده نمودند (۳۳). نوع ساب‌تایپ در این پژوهش مشخص نشده و مقایسه بین چند تک‌یاخته‌ی دیگر صورت گرفته بود و همچنین روش خاصی برای جداسازی بلاستوسیستیس از سایر سلول‌های مزاحم در محیط کشت انجام نپذیرفته بود. در مطالعه‌ی حاضر، بدون انجام فایکول نمونه‌ها دارای باکتری و باندهای متعددی مشاهده شد که با انجام مرحله‌ی فایکول و خالص‌سازی بلاستوسیستیس‌ها، این باندهای غیر اختصاصی متعلق به سایر عوامل نیز حذف گردید. در ST6 مطالعه‌ی حاضر، پروتئاز با باندهای وزن مولکولی پایین مشاهده نشد. متفاوت بودن الگوی پروتئازی در ST6 با جایگاه آن در درخت فیلوژنی که کم‌ترین شباهت را با دیگر ساب‌تایپ‌ها داشت، تأیید گردید.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه انجام شده، به نظر می‌رسد که فعالیت پروتئازی در ساب‌تایپ‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. همچنین فعالیت پروتئازی در موقعیت‌های جغرافیایی مختلف در ساب‌تایپ‌های یکسان هم متفاوت است. این تک یاخته‌ی اسرارآمیز همچنان ناشناخته باقی مانده است و نیاز دارد که مطالعات بیشتر در زمینه‌های مختلف همانند تعیین ساب‌تایپ‌ها در موقعیت‌های جغرافیایی و میزبان‌های متفاوت، بیماری‌زا بودن و فعالیت پروتئازی ساب‌تایپ‌های آن انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی به شماره ۳۹۹٦۹۷ می‌باشد که با همکاری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. از همکاری معاونت پژوهشی و گروه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Scanlan PD, Stensvold CR. Blastocystis: getting to grips with our guileful guest. Trends Parasitol 2013; 29(11): 523-9.
2. Stensvold CR, Clark CG. Pre-empting Pandora's box: Blastocystis subtypes revisited. Trends Parasitol 2020; 36(3): 229-32.
3. Ajjampur SSR, Tan KSW. Pathogenic mechanisms in Blastocystis spp.-Interpreting results from in vitro and in vivo studies. Parasitol Int 2016; 65(6 Pt B): 772-9.
4. Kurt Ö, Al FD, Tanyüksel M. Eradication of Blastocystis in humans: Really necessary for all?

Parasitol Int 2016; 65(6 Pt B): 797-801.
5. Beghini F, Pasolli E, Truong TD, Putignani L, Cacciò SM, Segata N. Large-scale comparative metagenomics of Blastocystis, a common member of the human gut microbiome. ISME J 2017; 11(12): 2848-63.
6. Buret AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. Gut 2007; 56(3): 316-7.
7. Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 196-206.
8. Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, et al. Genome sequence of the stramenopile Blastocystis, a human anaerobic parasite. Genome Biol 2011; 12(3): R29.
9. Puthia MK, Lu J, Tan KS. Blastocystis ratti contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-κB-dependent manner. Eukaryotic Cell 2008; 7(3): 435-43.
10. Gonzalez-Arenas NR, Villalobos G, Vargas-Sanchez GB, Avalos-Galarza CA, Marquez-Valdelamar LM, Ramirez-Miranda ME, et al. Is the genetic variability of Cathepsin B important in the pathogenesis of Blastocystis spp.? Parasitol Res 2018; 117(12): 3935-43.
11. Clark CG, Stensvold CR. Blastocystis: isolation, xenic cultivation, and cryopreservation. Curr Protoc Microbiol 2016; 43(1): 20A.1.1-20A.1.8.
12. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of blastocystis. Protist 2006; 157(1): 77-85.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(5259): 680-5.
14. 14-Abdel-Hameed DM, Hassanin OM. Proteaese activity of Blastocystis hominis subtype3 in symptomatic and asymptomatic patients. Parasitol Res 2011; 109(2): 321-7.
15. Alinaghizade A, Mirjalali H, Mohebali M, Stensvold CR, Rezaeian M. Inter-and intra-subtype variation of Blastocystis subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. Infect Genet Evol 2017; 50: 77-82.
16. Ray LC, Collins JP, Griffin PM, Shah HJ, Boyle MM, Cieslak PR, et al. Decreased incidence of infections caused by pathogens transmitted commonly through food during the COVID-19 pandemic-foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 2017-2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2021; 70(38): 1332-36.
17. Khademvatan S, Masjedizadeh R, Yousefi-Razin E, Mahbodfar H, Rahim F, Yousefi E, et al. PCR-based molecular characterization of Blastocystis hominis subtypes in southwest of Iran. J Infect Public Health 2018; 11(1): 43-7.
18. Moosavi A, Haghighi A, Mojarad EN, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, et al. Genetic variability of Blastocystis sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. Parasitol Res 2012; 111(6): 2311-5.
19. Sardarian K, Hajilooi M, Maghsood A, Moghimbeigi A, Alikhani M. A study of the genetic variability of Blastocystis hominis isolates in Hamadan, west of Iran. Jundishapur J Microbiol 2012; 5(4): 555-9.
20. Motazedian H, Ghasemi H, Sadjjadi SM. Genomic diversity of Blastocystis hominis from patients in southern Iran. Ann Trop Med Parasitol 2008; 102(1): 85-8.
21. Badparva E, Ezatpour B, Mahmoudvand H, Behzadifar M, Behzadifar M, Kheirandish F. Prevalence and genotype analysis of blastocystis hominis in Iran: A systematic review and meta-analysis. Arch Clin Infect Dis 2017; 12(1): e36648.
22. Rauff-Adedotun AA, Zain SNM, Haziqah MTF. Current status of Blastocystis sp. in animals from Southeast Asia: a review. Parasitol Res 2020: 119(11): 3559-70.
23. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ESU, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications. Acta Trop 2013; 126(1): 11-8.
24. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RA, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for Blastocystis subtypes-a consensus. Trends Parasitol 2007; 23(3): 93-6.
25. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark G, Evengård B. Subtype analysis of Blastocystis isolates in Swedish patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(7): 1689-96.
26. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA. Current views on the clinical relevance of Blastocystis spp. Curr Infect Dis Rep 2010; 12(1): 28-35.
27. Nourrisson C, Wawrzyniak I, Cian A, Livrelli V, Viscogliosi E, Delbac F, et al. On Blastocystis secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. Parasitology 2016; 143(13): 1713-22.
28. Puthia MK, Sio SWS, Lu J, Tan KSW. Blastocystis ratti induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. Infect Immun 2006; 74(7): 4114-23.
29. Parija SC, Jeremiah SS. Blastocystis: Taxonomy, biology and virulence. Trop Parasitol 2013; 3(1): 17-25.
30. Mirza H, Tan KSW. Blastocystis exhibits inter-and intra-subtype variation in cysteine protease activity. Parasitol Res 2009; 104(2): 355-61.
31. Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol Biochem Parasitol 2002; 120(1): 1-21.
32. McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu Rev Microbiol 1993; 47(1): 821-53.
33. Sio SW, Puthia MK, Lee ASY, Lu J, Tan KSW. Protease activity of Blastocystis hominis. Parasitol Res 2006; 99(2): 126-30.

DOI: *10.48305/jims.v40.i669.0288*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 669, 1st Week, July 2022**

Received: 14.02.2022 Accepted: 09.05.2022 Published: 28.06.2022

Protease Activity in Different *Blastocystis* Subtypes in Isfahan

Farzin KhosraviDanesh[1], Somayeh Mousavi-Mobarakeh[2], Hossain Yousofi-Darani[3], Zahra Ghayour-Najafabadi[4]

Original Article

Abstract

Background: *Blastocystis* is an extracellular and immobile protozoan known as the most common protozoan found in the human gastrointestinal tract and a wide range of animals. Although it takes a long time to identify it, its role in the disease and health of people is controversial. Parasite protease is one of the important factors in eliciting symptoms. Thus, this study investigated protease activity in several subtypes.

Methods: Stool samples were collected from 600 patients referred to Isfahan laboratory centers. The samples were examined microscopically and the blastocysts positive samples were cultured in medium. The *blastocysts* were purified using the ficoll method. PCR and sequencing were performed to identify the subtypes. Gelatin/SDS-PAGE method was used to evaluate protease activity.

Findings: A total of 34 samples was positive in culture and PCR. Of these, 18 samples were sequenced, and 4 subtypes 1-3 and 6 were isolated. Subtype 2 was more common. In the Gelatin/ SDS-PAGE method, a large difference in the size of the bands resulting from protease activity was evident in different subtypes. 20 kDa band was observed in subtypes 1-3. In Subtype 6, the band pattern was completely different from other subtypes.

Conclusion: Differences in protease band size were observed in different subtypes, which could probably be the reason for the difference in protease activity and pathogenicity in different subtypes. The present study obtained more reliable results using the ficoll method.

Keywords: *Blastocystis*; Polymerase chain reaction; Subtype; Protease

Citation: KhosraviDanesh F, Mousavi-Mobarakeh S, Yousofi-Darani H, Ghayour-Najafabadi Z. **Protease Activity in Different *Blastocystis* Subtypes in Isfahan.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(669): 288-94.

1- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- MSc, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Zahra Ghayour-Najafabadi, Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: ghayour@med.mui.ac.ir