

فعالیت پروتئازی در ساب تایپ‌های مختلف بلاستوسیتیس در اصفهان

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

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بلاستوسیتیس، 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 بلاستوسیتیس، 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 بلاستوسیتیس مثبت در محیط کشت داده شدند، با استفاده از روش فایکول بلاستوسیتیس‌ها 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 بلاستوسیتیس مثبت بود که ۳۴ نمونه در کشت مثبت و PCR شد. از این تعداد، ۱۸ نمونه تعیین توالی گردید و ۴ نوع ساب‌تایپ ۱-۳ و ۶ جدا گردید. در ساب‌تایپ‌های مختلف، تفاوت سایز باندهای حاصل از فعالیت پروتئازهای مختلف مشهود بود. در ساب‌تایپ ۱-۳ یک باند با وزن ۲۰ کیلو دالتونی 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: بلاستوسیتیس؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز؛ ساب‌تایپ؛ پروتئاز

ارجاع: خسروی دانش فرزین، موسوی مبارکه سمیه، یوسفی دارانی حسین، غیور نجف‌آبادی زهرا. فعالیت پروتئازی در ساب تایپ‌های مختلف

بلاستوسیتیس در اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۶۹): ۲۸۸-۲۹۴

مقدمه

بلاستوسیتیس، تک‌یاخته‌ای در دستگاه گوارش انسان و طیف وسیعی از حیوانات است که متعلق به شاخه‌ی استرمانوبیل 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 ۱-۹ و ۱۲ در انسان گزارش شده، اما بیش از ۹۰ درصد گزارش‌ها مربوط به ساب‌تایپ‌های ۱-۴ می‌باشد (۳). با این‌که یک قرن از شناسایی این ارگانیسم می‌گذرد، اما

بیماری‌زایی آن همچنان بحث‌برانگیز می‌باشد. با این وجود بلاستوسیتیس را با علائم گوارشی از قبیل اسهال، درد شکمی، حالت تهوع، استفراغ، سندروم روده‌ی تحریک‌پذیر و کبیر مرتبط می‌دانند (۳). نوع ساب‌تایپ بلاستوسیتیس، 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 (۴، ۵). به خوبی شناخته شده است که پروتئازها، نقش اصلی را در تقابل میزبان با پاتوژن ایفا می‌کنند. در انگل‌های روده‌ای مانند انتاموبیا 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

کامل حذف شده بود. بلاستوسیتیس‌ها شمارش و به تعداد 10^6 در ۱ میلی‌لیتر رسانده شد.

استخراج DNA و PCR ۵۰ میکرولیتر از سلول‌های بلاستوسیتیس جمع‌آوری شده از محیط کشت در تیوب ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه قرار گرفت. سپس در دور 12000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی حاوی DNA برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

برای تکثیر قطعه‌ی SSU-rRNA بلاستوسیتیس از پرایمرهای اختصاصی (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') RD5 و (5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3') BhRDr استفاده گردید (۱۲). برای انجام PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر، از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آمپلیکون (دانمارک)، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر از هر کدام پرایمرها (۱۰ پیکومول) و ۲ میکرولیتر DNA استفاده گردید. با برنامه‌ی دمایی PCR ابتدا ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۵ سیکل شامل، ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد با کمک ترموسایکلر PCR BIORAD T100 انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ 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 آکریل امید 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 بلاستوسیتیس‌هایی که تعیین توالی شده بودند، توسط Gelatin/SDS-PAGE برای فعالیت پروتئاز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از سیستم بافر ناپیوسته (۱۳) و با غلظت آکریل امید ۱۲/۵ درصد این روش انجام گرفت. به طور خلاصه، ۰/۳ درصد (وزنی/حجمی) ژلاتین در ژل حل شد. نمونه‌ها جوشانده نشدند و همچنین در بافر لودینگ از ۲-مرکاپتواتانول استفاده نشد، تا پروتئین‌ها دناتوره نشده و پروتئازها غیر فعال نشوند. پس از

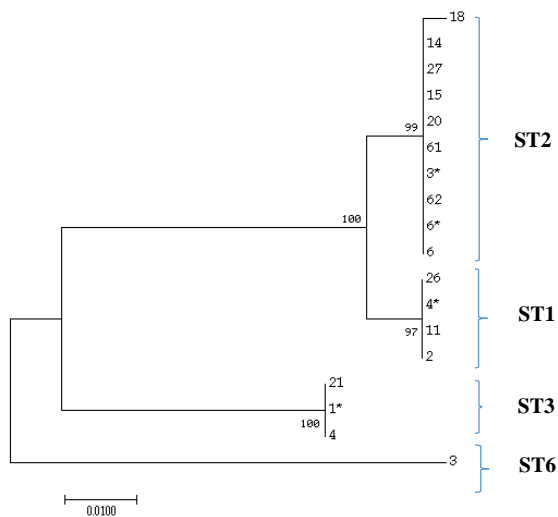
ژل‌ریزی، سیستمین پروتئازها به عنوان فاکتورهای کارآمد حدت در نظر گرفته شده‌اند (۶، ۷). در مطالعات انجام شده بر روی فعالیت‌های پروتئاز ST4 و ST7 بلاستوسیتیس نشان داده شد، پروتئازها قادرند ایمونوگلوبولین‌های A انسانی را در شرایط آزمایشگاهی بشکنند و نفوذپذیری سلول‌های اپی‌تلیال روده را افزایش دهند (۸، ۹). با این حال، تغییرات درون و درون‌زیرگروهی با حدت و فعالیت پروتئاز بلاستوسیتیس مرتبط است که احتمالاً منعکس‌کننده‌ی تغییرات در سرتاسر ژن‌های پروتئاز در میان زیرگروه‌ها است (۱۰). در حال حاضر مطالعات در ارتباط با فعالیت پروتئازی ساب‌تایپ‌های بلاستوسیتیس محدود می‌باشد، در مطالعه‌ی حاضر، فعالیت پروتئاز بلاستوسیتیس زیرگروه‌های ۱-۳ و ۶ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش‌ها

این مطالعه‌ی مقطعی-توصیفی با کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1399.776 از اسفندماه ۱۳۹۹ تا آذر ماه ۱۴۰۰ بر روی ۶۰۰ نمونه مدفوع از مراجعین به آزمایشگاه‌های شهر اصفهان انجام گرفت. هر نمونه‌ی مدفوع بلاستوسیتیس مثبت، معیار ورود نمونه به مطالعه و هر نمونه‌ی مدفوع بلاستوسیتیس منفی، معیار خروج از مطالعه بود. نمونه‌های بلاستوسیتیس 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 ۵۰ نمونه‌ی مثبت و مشکوک به بلاستوسیتیس میکروسکوپی، در محیط اختصاصی جونز با ۱۰ درصد سرم اسب غیر فعال کشت داده شد (۱۱). بعد از گذشت ۷۲ 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 ۴ روز محیط‌ها در دور 2000 به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب تمام لوله‌های یکسان مخلوط گردید و حجم نهایی با سرم فیزیولوژی به حجم ۶ میلی‌لیتر رسید. سپس به آرامی محلول حاوی بلاستوسیتیس، روی ۴ میلی‌لیتر فایکول سرد اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت 2500 rpm در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. لایه‌ی ابری مابین محلول زیری فایکول و رویی سرم فیزیولوژی که شامل بلاستوسیتیس بود، جدا گردید و با سرم فیزیولوژی به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به علت سمی بودن فایکول، انگل‌های جمع‌آوری شده در دور 1500 rpm به مدت ۵ 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

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 ۰/۱۶۵۱۴۸۲۵ 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.

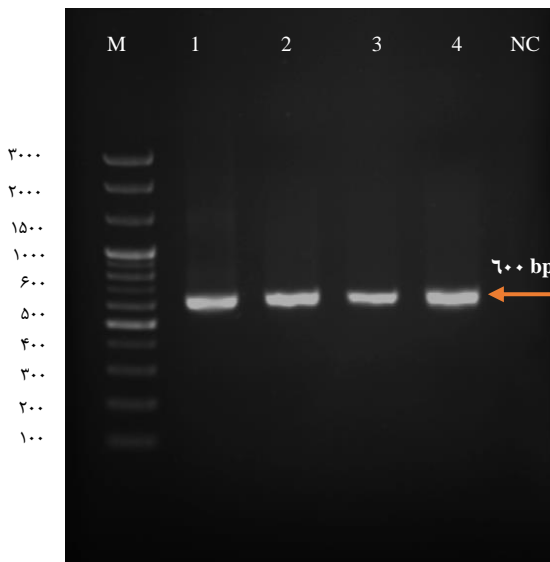
۴-۱-۸-۴ فعالیت پروتئازی: در صورتی که فعالیت پروتئازی وجود داشته باشد درون ژل آکریل آمید حاوی ژلاتین، باندهای بی‌رنگ دیده می‌شود. رنگ پس‌زمینه به دلیل وجود پروتئین ژلاتین و در حضور رنگ کوماسی بلو به رنگ آبی پررنگ دیده می‌شود و در مکان‌هایی که پروتئاز حضور داشته این ژلاتین مصرف شده و به صورت بی‌رنگ مشاهده می‌شود. زمانی که از محلول فایکول برای خالص‌سازی بلاستوسیتیس 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 ۶۰ و ۱۸۰ کیلو دالتون

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 (۱۴).

یافته‌ها

در روش بررسی مستقیم میکروسکوپی، ۵۰ نمونه (۸/۳۳ درصد) از لحاظ بلاستوسیتیس مثبت و یا مشکوک به بلاستوسیتیس بود که ۳۴ نمونه در کشت، مثبت شد. از نمونه‌های PCR شده (شکل ۱)، ۱۸ نمونه تعیین توالی شد. با تعیین توالی ۱۸ نمونه، تعداد ۴ ساب‌تایپ به دست آمد که برای مطالعه و بررسی پروتئاز ساب‌تایپ‌ها کافی بود.



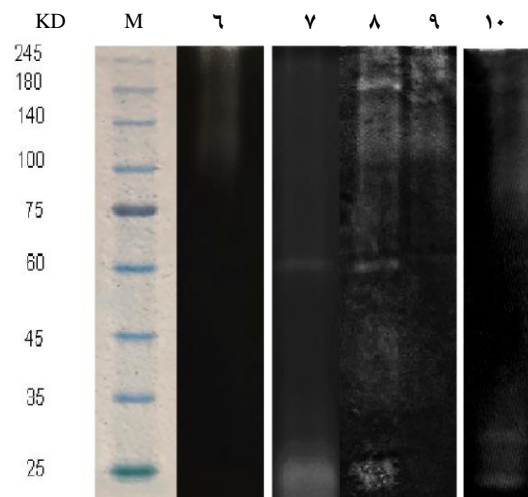
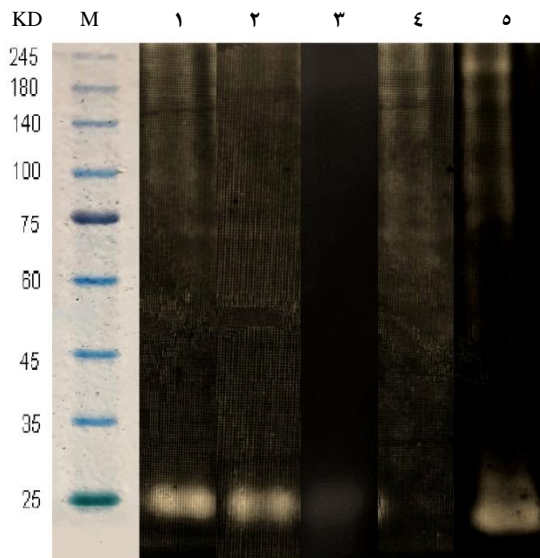
شکل ۱. ژل الکتروفورز M مارکر ۱۰۰bp، NC کنترل منفی، ۱ نمونه کنترل مثبت، ۲-۴ نمونه‌های مثبت

با بررسی توالی‌های انجام شده، بیشترین ساب‌تایپ مربوط به ST2 با فراوانی ۵۵/۶ درصد و سپس ST1 (۲۲/۲ درصد) بود (جدول ۱).

جدول ۱. فراوانی ساب‌تایپ‌ها

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

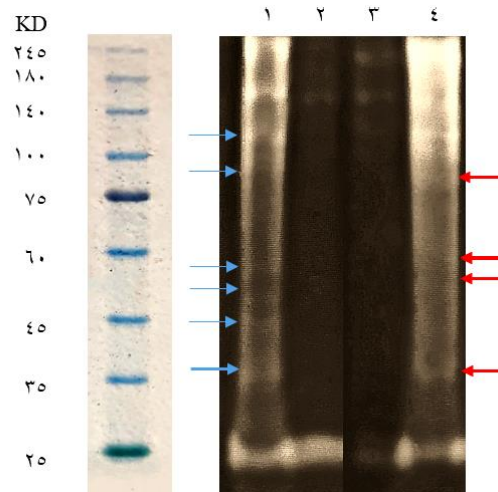
۴ نوع ساب تایپ بلاستوسیسیتیس (ST1, ST2, ST3 و ST6) مشاهده شد. از این تعداد، ST2 دارای فراوانی بیشتری بود که این نتیجه با مطالعه‌ی دیگری که در اصفهان انجام شد همخوانی داشت؛ ولی در اغلب مطالعات صورت گرفته در ایران بیشترین فراوانی مربوط به ST1 و ST3 می‌باشد (۱۷-۲۰). در مطالعه‌ی متاآنالیز انجام شده، ساب تایپ غالب در ایران، ST1 در نظر گرفته شده است (۲۱).



شکل ۴. ژل آکریل آمید در روش Gelatin/SDS-PAGE برای نمایش فعالیت پروتئازی که باندهایی روشن بر اثر تجزیه‌ی ژلاتین ظاهر شده؛ نمایش الگوهای متفاوت فعالیت پروتئازی در ساب تایپ‌های مختلف بلاستوسیسیتیس نمونه‌ی شماره‌ی ۱-۵ ST2, ۶ ST6, ۷-۹ ST3 و ۱۰ ST1 می‌باشد.

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

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 ساب تایپ‌ها تفاوت عمده داشت (شکل ۴).



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 خالص سازی با محلول فایکول. شماره‌ی ۱ و ۴؛ بدون خالص سازی با باندهای متعدد دیده می‌شود. شماره‌ی ۲ و ۳ بلاستوسیسیتیس خالص می‌باشند. دارای یک باند ۲۰ و دو باند در محدوده‌ی ۱۵۰ و ۲۰۰. فلش‌های آبی نشان‌دهنده‌ی باندهای حذف شده در نمونه ۱ در مقایسه با نمونه‌ی ۲ و فلش قرمز نمونه‌ی ۴ در مقایسه با نمونه‌ی ۳ است.

بحث

در این مطالعه، درصد شیوع آلودگی به بلاستوسیسیتیس (۸/۳ درصد) نسبت به سایر مطالعات صورت گرفته کاهش داشته است (۱۵). دلیل اصلی برای کاهش میزان بلاستوسیسیتیس در افراد ممکن است به شیوع ویروس کرونا که منجر به محدودیت‌های سفر بین شهری و رفت آمد مردم با یکدیگر، تغییرات در زندگی روزمره و رفتارهای بهداشتی، از جمله 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 (۱۶).

در مرحله‌ی PCR از یک ناحیه، ۶۰۰ نوکلئوتیدی بارکدی در ژن زیر واحد کوچک ریبوزوم استفاده شد. این ناحیه جهت بررسی ساب تایپ‌ها بسیار قابل اطمینان می‌باشد (۱۲). در مطالعه‌ی حاضر،

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 ۴۴ 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. تفاوت 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 تک‌یاخته‌ی اسرآرمیز 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 ۳۹۹۶۹۷ 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.

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 (۲۴، ۲۵).

نقش بیماری‌زای بلاستوسیستیس بحث‌برانگیز باقی مانده است (۲۶). 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 سیستین 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 سیستین پروتئازها در بقای انگل و بیماری‌زایی حیاتی هستند (۲۶). در تک‌یاخته‌ها، اکثر سیستین پروتئازها با وزن مولکولی بین ۲۰ تا ۳۳ کیلو دالتون می‌باشند (۳۲). در این مطالعه ST1-3 دارای باند ۲۰ کیلو دالتونی که مشخصه‌ی سیستین پروتئاز است، بودند. این باند از وضوح بیشتری در ST2 نسبت به سایر ساب‌تایپ‌ها برخوردار بود، که ممکن است دلیل قابل توجهی 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 ۹۴/۴ 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 پایین می‌باشد (۱۴). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در ST3.

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. Denoed 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- κ B-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. Abdel-Hameed DM, Hassanin OM. Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol Res* 2011; 109(2): 321-7.
 15. Alinaghizade A, Mirjalali H, Mohebbi 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, Haghghi 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, Sadjadi 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.

Protease Activity in Different *Blastocystis* Subtypes in Isfahan

Farzin KhosraviDanesh¹, Somayeh Mousavi-Mobarakeh²,
Hossain Yousofi-Darani³, Zahra Ghayour-Najafabadi⁴

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