DOI: 10.22092/VJ.2022.358234.1963
شماره ۱۳۸ بهار ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی شیوع آلودگی به تک‌یاخته بلاستوسیستیس در انسان و پرندگان اهلی

• **سمانه عبداله‌یی**
گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.
• **عبدالحسین دلیمی(نویسنده مسئول)**
گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.
• **مجید پیرستانی**
گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.

تاریخ دریافت: ۱۸-۰۱-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: ۳۱-۰۱-۱۴۰۱
Emali: dalimi_a@modares.ac.ir

چکیده

بلاستوسیستیس انگل روده‌ای بی‌هوازی و شایع در بین انسان‌ها و حیوانات مختلف در سراسر جهان است. برای تشخیص بلاستوسیستیس از روش‌های مختلفی مانند روش مستقیم، رنگ‌آمیزی و مولکولی می‌توان استفاده کرد. هدف از این مطالعه، بررسی آلودگی بلاستوسیستیس در انسان و پرندگان اهلی در شهرستان تفرش و مقایسه سه روش در تشخیص بلاستوسیستیس بوده است. مطالعه حاضر، به صورت مشاهده‌ای-توصیفی در خلال سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در شهرستان تفرش طراحی و اجرا گردید. بدین‌منظور از کبوتران (۳۰۰ نمونه)، مرغ و خروس‌ها (۵۰ نمونه) و از صاحبان آنها (۱۰۰ نمونه) نمونه مدفوع جمع‌آوری شد. سپس مدفوع ابتدا با روش میکروسکوپی (آزمایش مستقیم و رنگ‌آمیزی با تری‌کروم) از لحاظ ابتلا به بلاستوسیستیس مورد مطالعه قرار گرفت سپس نمونه‌های مثبت از لحاظ مولکولی با روش PCR و از طریق تکثیر ژن ۱۸S rRNA تشخیص داده شد.

طبق نتایج حاصله، در آزمایش مستقیم ۳۹ نمونه کبوتر (۱۳٪)، ۱۳ نمونه مرغ و خروس (۲۶٪) و ۱۸ نمونه مدفوع انسانی (۱۸٪) و در آزمایش رنگ‌آمیزی با تری‌کروم، ۴۵ نمونه کبوتر (۱۵٪)، ۱۲ نمونه مرغ و خروس (۲۴٪) و ۱۵ نمونه مدفوع انسانی (۱۵٪) از نظر وجود انگل بلاستوسیستیس مثبت تشخیص داده شد. در آزمایش PCR از بین نمونه‌های مدفوع مثبت کبوتران، یک نمونه (۲/۵٪) و از بین نمونه‌های مدفوع مثبت مرغ و خروس، فقط ۵ نمونه (۳۸/۴۶٪) و از نمونه‌های مدفوع مثبت انسانی، ۴ نمونه (۲۲/۲۲٪) از نظر وجود انگل بلاستوسیستیس، مثبت تشخیص داده شد. در مطالعه حاضر فقط تعداد محدودی از نمونه‌های مثبت مرتبط با روش‌های مستقیم و رنگ‌آمیزی شده با تری‌کروم در آزمایش PCR مثبت شدند، این نشان می‌دهد که روش PCR با استفاده از یک جفت پرایمر به تنهایی روشی مناسب برای تعیین میزان آلودگی نیست. لذا پیشنهاد می‌شود برای تشخیص دقیق بلاستوسیستیس از چندین روش متفاوت استفاده شود.

کلمات کلیدی: بلاستوسیستیس، انسان، پرندگان، میزان آلودگی

Veterinary Researches & Biological Products No 138 pp: 49-55

Prevalence of *Blastocystis* protozoan infection in humans and domestic birds

By: Abdolahi, S., Department of Medical Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Dalimi, A., (Corresponding Author) Department of Medical Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. and Piranestani, M., Department of Medical Parasitology and Entomology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University.

Received:2022-04-07 Accepted: 2022-04-20

Emali: dalimi_a@modares.ac.ir

Blastocystis is an anaerobic intestinal parasite that is prevalent among humans and various animals throughout the world. Different methods such as direct and staining stool smear examination as well as molecular methods can be used to diagnose *Blastocystis*.

The main objective of the present work was to study *Blastocystis* infection in humans and domestic birds in Tafresh city and to compare three methods in diagnosing *Blastocystis*. The present study was designed and conducted as a cross-sectional descriptive study during the years 1399-1400 in Tafresh city. For this purpose, fecal samples were collected from pigeons (300 samples), hens and roosters (50 samples) and from their owners (100 samples). Stools were then examined microscopically (direct examination and trichrome staining) for *Blastocystis* detection. The positive samples were tested molecularly by PCR (*18S rRNA* amplification).

In direct stool examination, 39 samples of pigeon feces (13%) and 13 samples of hen and rooster feces (26%) and 18 samples of human feces (18%) and in trichrome staining examination, 45 samples of pigeon feces (15%), 12 samples of hen and rooster feces (24%) and 15 samples of human feces (15%) were found to be positive for *Blastocystis*. In PCR test, only one sample (2.5%) of pigeon positive samples and 5 samples (38.46%) of hen and rooster positive samples and 4 samples (22.22%) of human positive samples were found to be positive. In the present study, only a limited number of positive samples related to direct stool examination and stained with trichrome were found to be positive in PCR experiment. This indicates that PCR method alone is not an appropriate method to determine the infection rate of *Blastocystis*. Therefore, it is suggested to use several different techniques for accurate diagnosis of *Blastocystis*.

Keywords: *Blastocystis,* Human, Bird, Infection rate.

مقدمه

بلاستوسیستیس، تک‌یاخته یوکاریوتی بی‌هوازی مطلق، از نظر شکل و اندازه متنوع و یکی از شایع‌ترین انگل‌هایی است که در نمونه مدفوع میزبانان مختلف از جمله انسان یافت می‌شود. انتشار بلاستوسیستیس جهانی بوده و در کشورهای مختلف شیوع آن متفاوت و در کشورهای در حال توسعه بین ۰/۵ تا ۲۳ درصد گزارش شده است (۱۹). ولی در مناطق گرمسیری و تحت حاره کشورهای در حال توسعه تا حدود ۶۰٪ گزارش شده است (۳۰ و۳۲). این شیوع ممکن است ناشی از فقر بهداشتی، تماس با حیوانات یا مصرف آب و غذای آلوده باشد. آلودگی بلاستوسیستیس در انسان ممکن است، با علایمی مانند درد شکم، یبوست، اسهال و نفخ شکم همراه باشد. و با توجه به وسعت انتشار آن، می‌تواند برای کودکان و افراد دارای عارضه نقص سیستم ایمنی خطرناک باشد بهمین جهت امروزه آلودگی به این انگل در نزد متولیان بهداشتی جامعه، دارای اهمیت می‌باشد (۳۰). بلاستوسیستیس شامل حداقل ۲۸ زیر تایپ است (۲۰). از این ۲۸ زیرتایپ گزارش شده زیر تایپ‌های ۱ الی ۹ (ST۹-ST۱) از انسان گزارش شده‌اند و زیر تایپ‌های ۱ الی ۴ و از جمله زیر تایپ ۳ شایع‌ترین آن‌ها می‌باشد. زیرتایپ‌های ۱۰ الی ۱۷ از حیوانات جدا شده‌اند که برخی از این زیر تایپ‌ها در انسان نیز گزارش شده‌اند (۲۵).

این انگل به طور معمول به اشکال مختلف در نمونه‌های مدفوع با استفاده از میکروسکوپ نوری قابل شناسایی می‌باشد، اگر چه شناسایی آن نیاز به مهارت خاصی دارد. انگل به طور کلی به شکل کروی است. برای تشخیص بلاستوسیستیس در انسان و حیوانات از روش‌های مختلفی از قبیل روش گسترش مستقیم، روش رنگ‌آمیزی دائمی گسترش مدفوع با رنگ‌های تری کروم، گیمسا و هماتوکسیلین، روش‌های سرولوژیکی، کشت انگل و روش‌های مولکولی استفاده شده است. شایع‌ترین فرم انگل در نمونه مدفوع، شکل واکوئولار است (۱۰، ۱۵، ۱۷، ۲۱، ۳۱، ۳۶).

گرچه در مورد تعیین میزان شیوع این انگل در انسان در مناطق مختلف جهان، مطالعات خوبی صورت گرفته است. ولی مطالعه در مورد میزان

شیوع این انگل در پرندگان و بخصوص در مرغ و خروس‌ها بسیار کم و محدود می‌باشد. در این ارتباط، برای تعیین زیرتیپ‌های بلاستوسیستیس، مطالعاتی توسط Iguchi و همکاران (۲۰۰۷) بر روی مرغ و خرگوش (۱۴)، Chandrasekaran و همکاران (۲۰۱۴) در شترمرغ (۵)، Roberts و همکاران (۲۰۱۸) در انسان و ماکیان (مرغ) (۲۷)، Wang و همکاران (۲۰۱۸) در پرندگانی چون جوجه مرغ، کبوتر و مرغ ماهیخوار (۳۴)، Maloney و همکاران (۲۰۲۰) در پرنده‌های وحشی اسیر شده (۱۸)، Falkowski و همکاران (۲۰۲۲) در گله‌ی غازها (۹)، و در ایران Asghari و همکاران (۲۰۱۹) در کلاغ و کبوتر (۲) مطالعاتی صورت گرفته شده است.

نظر به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تعیین آلودگی انسان و پرندگان اهلی در شهرستان تفرش انجام نشده است. لذا این بررسی با هدف تعیین میزان آلودگی بلاستوسیستیس در کبوتران، مرغ و خروس‌ها و صاحبان آن‌ها در شهرستان تفرش واقع در استان مرکزی انجام شد. علاوه بر این، سه روش تشخیصی با هم مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر، یک مطالعه مشاهده‌ای-توصیفی است که در طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در شهرستان تفرش طراحی و اجرا گردید. در این مطالعه میزان آلودگی به انگل بلاستوسیستیس در سه گروه کبوتران(۳۰۰ نمونه مدفوع)، مرغ و خروس (۵۰ نمونه مدفوع) و انسان (۱۰۰ نمونه مدفوع) مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه‌برداری

محل نمونه‌برداری

تفرش شهر کوچکی در غرب استان مرکزی ایران است. بر اساس سرشماری سال ۱۳۹۰، جمعیت آن ۲۵۹۱۲ نفر (شامل ۱۲۸۸۴ مرد و ۱۳۰۲۸ زن) بوده است. تفرش در ۲۲۲ کیلومتری جنوب غربی تهران در میان کوه‌های مرتفع واقع شده است. ارتفاع متوسط تفرش از سطح دریا ۱۹۱۲ متر است و دارای آب و هوای قاره‌ای و نیمه خشک با بارندگی سالانه ۲۷۰ میلی‌متر است (شکل ۱).

شکل ۱- نقشه و موقعیت تفرش در کشور.

نحوه نمونه‌برداری

از تمامی افراد شرکت‌کننده در این پژوهش، ابتدا رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. برای انجام این پژوهش ابتدا با مراجعه به منازل افرادی که مرغ و خروس نگه می‌دارند، نمونه مدفوع مرغ و خروس‌ها و صاحبان آن‌ها جمع‌آوری شد، برای جمع‌آوری نمونه‌ها از ظرف‌های مخصوص حاوی فیکساتیوهایی مانند الکل ۸۰ درصد جهت انجام تست مولکولی، فرمالین ۱۰٪ جهت انجام آزمایش مدفوع و PVA (پلی وینیل الکل) جهت رنگ‌آمیزی تری‌کروم استفاده شد.

آزمایش مدفوع

ابتدا نمونه‌های مدفوع با استفاده از آزمایش مستقیم مدفوع و رنگ‌آمیزی با لوگل مورد بررسی قرار گرفت. سپس از مدفوع روی لام گسترش نازک تهیه و با تکنیک تری‌کروم رنگ‌آمیزی شد و در نهایت مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت.

آزمایش مولکولی

پس از شناسایی نمونه‌های مثبت بلاستوسیستیس، تخلیص DNA با روش CTAB انجام شد (۱۲). سپس DNAهای استخراج شده را در فریزر ۲۰- درجه تا زمان انجام PCR نگهداری شد.

برای انجام مطالعه مولکولی از طریق تکثیر ژن *18s rRNA* از روش PCR استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده شامل پرایمرهای RD۵ و BhRDr با توالی زیر بوده است:

آزمایش PCR با استفاده از Master mix شرکت سیناکلون (ایران) انجام گرفت. مرحله اول واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر بصورت ۵,۵ میکرولیتر Template DNA، ۲ میکرولیتر (۲۰pico mol) پرایمرهای رفت و برگشت، ۷,۵ میکرولیتر Master mix انجام شد.

با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad USA)، فرآیند واسرشت با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه شروع شد در ادامه ۴۰ سیکل در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، فرایند اتصال پرایمر در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سرانجام؛ مقدار ۶ میکرولیتر از محصول PCR توسط ژل اگاروز ۱٪ آغشته به Safe Stain ۵۰µl مربوط به شرکت سیناکلون الکتروفورز شد و در زیر نور UV کوتاه عکس‌برداری شد. اندازه محصول PCR با DNA-ladder تجاری سیناکلون ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای محاسبه درصد از آزمون نسبت‌ها و نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از روش آزمایش مستقیم مدفوع

در روش مستقیم، از ۱۰۰ نمونه انسانی ۱۸ نمونه (۱۸٪)، از ۵۰ نمونه مرغ و خروس ۱۳ نمونه (۲۶٪) و از ۳۰۰ نمونه کبوتر ۳۹ نمونه (۱۳٪) مثبت شد. در این مرحله پس از آماده‌سازی نمونه‌ها نتایج حاصل به شکل جدول (۲) ارائه شده است. طبق نتایج این جدول آلودگی در زنان بیش از دو برابر

مردان است ولی در پرندگان اعم از کبوتران و ماکیان، جنس نر بیشتر از ماده آلودگی را نشان می‌دهد.

نتایج بررسی گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با تری‌کروم

در این مرحله، نمونه گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با تری‌کروم از لحاظ میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در جدول ۳ نشان داده شده است. در این روش از مجموع نمونه‌های انسانی ۱۵ (۱۵٪) مورد، از کل نمونه‌های مرغ و خروس، تعداد ۱۲ (۲۴٪) و از ۳۰۰ نمونه کبوتر ۴۵ (۱۵٪) نمونه مثبت تشخیص داده شدند.

نتایج مطالعه مولکولی

در آزمایش PCR از بین نمونه‌های مدفوع مثبت کبوتران، یک نمونه (۲/۵٪) و از بین نمونه‌های مدفوع مثبت مرغ و خروس، فقط ۵ نمونه (۳۸/۴۶٪) و از نمونه‌های مدفوع مثبت انسانی، ۴ نمونه (۲۲/۲۲٪) از نظر وجود انگل بلاستوسیستیس، مثبت تشخیص داده شد.

از ۴ نمونه مثبت انسانی، با وزن مولکولی ۶۳۰ bp ، تعداد ۳ نمونه مربوط به افرادی بوده که نمونه مدفوع پرندگان آن‌ها نیز مثبت و یکی از نمونه‌ها مرتبط با نمونه مدفوع پرندگان منفی بوده است. تصویر باندها بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز در شکل ۲ نشان داده شده است.

بحث

در سال‌های اخیر، با توجه به مطالعات متنوع و وسیعی که بر روی بلاستوسیستیس انجام شد این انگل به عنوان یک تک‌یاخته فرصت طلب و نوظهور، مطرح گردید و شیوع آن در تمام نقاط جهان، اعم از کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته، مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری باعث شد به عنوان شایع‌ترین انگل گوارشی از آن یاد کنند و به طور معمول، در اثر عدم رعایت بهداشت فردی، تماس با حیوانات و مصرف مواد غذایی و آب آلوده منتقل می‌شود. این انگل در بین پرندگان و پستانداران بالاترین میزان شیوع را دارد و حیوانات اهلی احتمالا بیشترین عامل انتقال انگل به انسان را برعهده دارند. از این رو مطالعات اکواپیدمیولوژیک انگل بلاستوسیستیس بسیار حائز اهمیت می‌باشد. (۷)

در مطالعه حاضر که به صورت مطالعه مورد-شاهدی در شهرستان تفرش اجرا گردید. در آزمایش مستقیم از ۳۰۰ نمونه مدفوع کبوتر ۳۹ نمونه (۱۳٪) و از ۵۰ نمونه مدفوع مرغ و خروس، ۱۳ نمونه (۲۶٪) و از ۱۰۰ نمونه مدفوع انسانی ۱۸ نمونه (۱۸٪) و در آزمایش رنگ‌آمیزی با تری‌کروم، از ۳۰۰ نمونه مدفوع کبوتر ۴۵ نمونه (۱۵٪) و ۵۰ نمونه مدفوع

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

ترادف	نام پرایمر
ATCTGGTTGATCCTGCCAGT	رفت (RD۵)
GAGCTTTTTAACTGCAACAACG	برگشت (BhRDr)

جدول ۲- نتیجه بررسی بلاستوسیستیس هومنیس در مدفوع مرغ و خروس، کبوتران و صاحبان آنها در شهرستان تفرش با روش مستقیم.

نوع میزبان	تعداد نمونه مورد مطالعه	نمونه مثبت	
		تعداد	درصد
مرد	۸۶	۱۳	۱۵/۱۱
زن	۱۴	۵	۳۵/۷۱
مجموع	۱۰۰	۱۸	۱۸
خروس	۱۹	۸	۴۲/۱۱
مرغ	۳۱	۵	۱۶/۱۳
مجموع	۵۰	۱۳	۲۶
کبوتر نر	۱۷۸	۲۹	۱۶/۲۹
کبوتر ماده	۱۲۲	۱۰	۸/۱۹
مجموع	۳۰۰	۳۹	۱۳

هریک از آزمایش‌ها در سه مرحله تکرار شد.* نرمال سالین ۰/۹ ٪، ** نمک هیپرتونیک ۲۰ ٪.

مرغ و خروس ۱۲ نمونه (۲۴٪) و از ۱۰۰ نمونه مدفوع انسانی ۱۵ نمونه (۱۵٪) از نظر وجود انگل بلاستوسیستیس مثبت تشخیص داده شد. در آزمایش PCR از بین نمونه‌های مدفوع مثبت کبوتران، یک نمونه (۲/۵٪) و از بین نمونه‌های مدفوع مثبت مرغ و خروس، فقط ۵ نمونه (۳۸/۴۶٪) و از نمونه‌های مدفوع مثبت انسانی، ۴ نمونه (۲۲/۲۲٪) از نظر وجود انگل بلاستوسیستیس، مثبت تشخیص داده شد. طبق نتایج بررسی حاضر، آلودگی در زنان بیش از دو برابر مردان است شاید علت این باشد که زنان در این شهرستان بیشتر از مردان وظیفه نظافت جایگاه پرندگان را بر عهده می‌گیرند و بیشتر در معرض آلودگی هستند. ولی در پرندگان اعم از کبوتران و ماکیان، جنس نر بیشتر از ماده آلودگی را نشان می‌دهد. شیوع انگل در انسان در نقاط مختلف کشور متفاوت گزارش شده است در برخی مناطق مانند قزوین (۰/۷٪)، کرج (۰/۸٪)، زاهدان (۲/۲٪)، خوزستان (۴/۲٪) و شیراز (۴/۲۵ ٪) دارای آلودگی کمتر از ۵٪ و در برخی دیگر مانند بندرعباس، (۶/۲۴٪)، یزد (۷/۱۵٪)، و تهران (۸/۱۲٪) بین ۵ الی ۸٪ گزارش شده است (۱، ۴، ۸، ۱۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۸).

گزارش آلودگی بلاستوسیستیس در حیوانات ایران بسیار کم است. بادپروا و همکاران (۲۰۱۵) در گاو با استفاده از روش مولکولی میزان شیوع این انگل را ۹,۶ درصد گزارش کرده‌اند (۳) و در استان تهران، اصغری و همکاران (۲۰۱۹) زیرتیپ‌های بلاستوسیستیس را در کلاغ و کبوتر از طریق Nested-PCR،RFLP و تعیین ترادف، مطالعه نمودند. در این مطالعه ۴۴/۴ درصد کلاغ‌ها و۴۲/۵ درصد از کبوتران، از نظر بلاستوسیستیس مثبت گزارش شدند (۲).

در اکثر مطالعات انجام شده در ایران و جهان برای تشخیص بلاستوسیستیس از روش مستقیم استفاده شده است. در روش مستقیم و روش رنگ‌آمیزی گسترش مدفوع، معمولا مهارت و تخصص لازم در کار با میکروسکوپ برای شناسایی انگل ضروری است زیرا گاهی اوقات تنها تعداد کمی از انگل‌ها در نمونه مدفوع وجود دارند. معمولا اشکال واکوئلی و گرانولار فرم‌های رایج انگل در تشخیص بلاستوسیستیس در زیر میکروسکوپ نوری است. با این حال، اگر سرعت لازم در نمونه‌برداری و انجام آزمایش انجام نشود، مورفولوژی این انگل معمولاً در نمونه گسترش مستقیم و یا رنگ‌آمیزی شده موقت و یا دائمی ممکن است دچار تغییر شود، زیرا وقتی انگل در معرض اکسیژن و یا آب مقطر قرار گیرند بسرعت تخریب می‌شوند (۳۱).

نمونه‌های مدفوع تازه برای تشخیص آزمایشگاهی بلاستوسیستیس کاملا ضروری است. حتی استفاده از فرمالین بافر ۱۰٪، استات سدیم-اسید استیک-فرمالین (SAF)، یا محلول دی کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد نیز ممکن است باعث مرگ و تخریب کیست بلاستوسیستیس شود. ولی روش تشخیص سریع بصورت مستقیم با استفاده از گسترش مدفوع تازه و رنگ‌آمیزی با لوگل و یا استفاده از پلی وینیل الکل برای فیکس کردن مدفوع تازه و رنگ‌آمیزی دائمی با تری کروم و یا هماتوکسیلین می‌تواند کارایی تشخیص فرم‌های واکوئولار و گرانولی بلاستوسیستیس را در مدفوع افزایش می‌دهد. بلاستوسیستیس یک ارگانیسم بی‌هوازی است و در صورت قرار گرفتن در معرض هوا و یا آب مقطر به سرعت آسیب می‌بیند و در نتیجه مورفولوژی کروی آن به شکل نامنظم تغییر می‌کند یا خراب می‌شود. از طرفی، مقدار کافی نمونه مدفوع برای معاینه تشخیصی ضروری است و باید از تعداد کم نمونه مدفوع برای استفاده اجتناب شود. مطالعات تطبیقی نشان می‌دهد که روش کشت در شرایط برون‌تنی نسبت به روش‌های دیگر برای تشخیص بلاستوسیستیس برتری دارد (۱۶، ۳۵). در واقع کشت انگل در شرایط برون‌تنی یک روش "استاندارد طلایی" برای تشخیص بلاستوسیستیس بشمار می‌آید، این روش مقرون به صرفه است و به تجهیزات و تخصص خاصی نیاز ندارد. بدین منظور تاکنون چندین محیط کشت برای کشت و تشخیص بلاستوسیستیس در نمونه‌های مدفوع بیماران یا حیوانات مورد مطالعه قرار گرفته‌اند از جمله این محیط‌ها می‌توان به محیط‌های تک فازی مانند محیط کشت جونز'Jones medium و RSHA (ترکیب محلول رینگر حاوی ۱۰٪ سرم اسب و ۰,۰۵٪ آسپاراژین)، محیط‌های کشت دو فازی مانند محیط کشت (Locke-Egg LE)، محیط کشت رابینسون Robinson's medium و محیط‌های ترکیبی کشت آگار با RSHA را می‌توان نام برد (۶، ۱۳، ۲۹).

اگرچه بسیاری از تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی و طبقه‌بندی زیرتیپ‌های مختلف بلاستوسیستیس معرفی شده‌اند، ولی هنوز در مورد استفاده از یک روش استاندارد برای تشخیص زیرتایپ‌های انگل توافق نشده است. طبق گزارش برخی از محققین بسیاری از نمونه‌های کشت مثبت انگل، در آزمایش PCR به میزان ۱۳,۹-۴۵,۸٪ منفی گزارش شده‌اند (۲۶، ۳۰، ۳۳). این نتایج منفی PCR معمولا بعلت استفاده از پرایمرهای ناکارآمد برای تشخیص همه زیرتایپ‌ها و به دلیل تغییر توالی ژن *SSU rRNA* در زیرتایپ‌های جنس بلاستوسیستیس ایجاد می‌شود. پرایمرهای

جدول ۳- نتیجه بررسی بلاستوسیستیس هومنیس در مدفوع مرغ و خروس، کبوتران و صاحبان آنها در شهرستان تفرش با روش با تری کروم.

نوع نمونه	تعداد نمونه مورد مطالعه	نمونه مثبت	
		تعداد	درصد
انسان	۱۰۰	۱۵	۱۵
مرغ و خروس	۵۰	۱۲	۲۴
کبوتر	۳۰۰	۴۵	۱۵

مختلفی که برای شناسایی زیرتایپ‌ها ساخته شده‌اند احتمالاً کاربرد محدودی دارند. بهمین دلیل در مطالعه حاضر فقط تعداد محدودی از نمونه‌های مثبت مرتبط با روش‌های مستقیم و رنگ‌آمیزی شده با تری کروم در آزمایش PCR مثبت شدند. بدین ترتیب که در آزمایش PCR از ۳۹ نمونه‌های مدفوع مثبت کبوتران، فقط یک نمونه (۲/۵٪) و از ۱۳ نمونه‌های مدفوع مثبت مرغ و خروس، فقط ۵ نمونه (۳۸/۴۶٪) و از ۱۸ نمونه‌های مدفوع مثبت انسانی، ۴ نمونه (۲۲/۲۲٪) از نظر وجود انگل بلاستوسیستیس، مثبت و مابقی منفی تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر فقط تعداد محدودی از نمونه‌های مثبت شده با روش‌های مستقیم و رنگ‌آمیزی شده با تری‌کروم در آزمایش PCR مثبت شدند، این نشان می‌دهد که روش PCR با استفاده از یک جفت پرایمر به تنهایی روشی مناسب برای تعیین میزان آلودگی نیست. لذا پیشنهاد می‌شود برای تشخیص دقیق بلاستوسیستیس در نمونه‌های انسانی و حیوانی از چندین روش متفاوت استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از زحمات اساتید و همکاران محترم انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بخصوص سرکارخانم باغخانی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع مورد استفاده

1. Akhlaghi L, J. Shamsedin, A.R. Meamar, E. Razmjou and H. Oormazdi. 2009. Frequency of intestinal Parasites in Tehran. *Iranian Journal of Parasitology* 4: 44-47.

2. Asghari, A., J. Sadraei, M. Pirestani and I. Mohammadpour. 2019. First molecular identification and subtype distribution of *Blastocystis sp*. isolated from hooded crows (Corvus cornix) and pigeons (Columba livia) in Tehran Province, Iran. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 62: 25-30.

3. Badparva, E., J. Sadraee and F. Kheirandish. 2015. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in Khorramabad, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 8: e14810.

4. Bairami Kuzehkanani, A., S. Rezaei, Z. Babaei, M. Niyyati, S.N. Hashemi and M. Rezaeian. 2011. Enteric Protozoan Parasites in Rural Areas of Bandar- Abbas southern Iran: comparison of past and present Situation. *Iranian Journa of Public Health* 40: 80-85.

5. Chandrasekaran, H., S.K. Govind, C. Panchadcharam, P. Bathmanaban, K. Raman, G. Thergarajan. 2014. High lipid storage in vacoular forms of subtype 6 *Blastocystis sp*. in ostrich. *Parasite Vectors* 7: 469.

6. Dogruman-Al, F. Hisao Yoshikawa, S. Kustimur and N. Balaban. 2009. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symtomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitology Research* 106: 263-68.

7. dos Santos Zanetti, A., A.F. Malheiros, T.A. De Matos, F.G. Longhi, L.M. Moreira, S.L. Silva, et al. 2020. Prevalence of *Blastocystis sp*. infection in several hosts in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Parasite Vectors* 13(1): 1-15.

8. Ebadi, M., H. Anvarim, A. Rajabioun and A.A. Dehyhani. 2008. Parasitic infections in cases Referring to Yazd central laboratory 2002-2004. *The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical sciences* 15: 53-58.

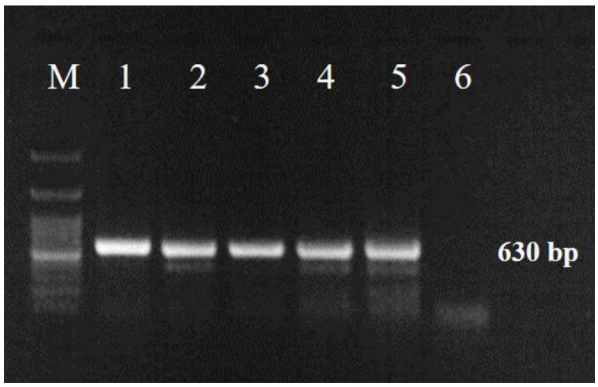
9. Falkowski, P., A. Gaweł and K. Bobrek. 2022. Prevalence of *Blastocystis* in Geese Reproductive Flocks. *Animals* 12: 291

10. Garavelli, P.L., C.H. Zierdt, T.A. Fleisher, H. Liss and B. Nagy. 1995. Serum antibody detected by fluorescent antibody test in patients with symptomatic *Blastocystis hominis* infection. *Recenti Progressi in Medicina* 86: 398-400.

11. Haghighi, A., A.S. Khorashad, B. Nazemalhosseini-Mojarad, B. Kazemi, M. Rostami-Nejad and S. Rasti. 2009. Frequency of enteric protozoan parasites among patients with gastrointestinal complaints in medical centers of Zahedan, Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 542-544.

12. Healey, A., A. Furtado, T. Cooper and R.J. Henry. 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10: 21.

13. Kaneda, Y., N. Horiki, X.J. Cheng, Y. Fujita, M. Maruyama and H. Tachibana. 2001. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolates in Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 393-396.



شکل ۲- نتیجه الکتروفورز حاصل از PCR نمونه های مثبت انسانی و مرغ و خروس و کبوتر، از چپ به راست به ترتیب: مارکر bp ۱۰۰، نمونه‌های ۱ الی ۳ انسانی و ۴ نمونه مرغ و خروس و۵ نمونه کبوتر و نمونه ۶ منفی.

14. Iguchi, A, A. Ebisu, S. Nagata, Y. Saitou, H. Yoshikawa, S. Iwatani and I. Kimata. 2007. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitology International* 56: 107-112.

15. Kaneda, Y. N., Horiki, X Cheng, H.Tachibana and Y.Tsutsumi. 2000. Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* 25: 51-56.

16. Leelayoova, S.P. Taamasri, R. Rangsin, T. Naaglor, U. Thathaisong and M. Mungthin. 2002. In-vitro cultivation: A sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 96: 803-807.

17. Mahmoud, M.S.E., and W.A. Saleh. 2003. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 33: 13.

18. Maloney, J.G., A. Molokin, , M.J.R. da Cunha, M.C. Cury and M. Santin. 2020. *Blastocystis* subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasite Epidemiology and Control* 9:e00138.

19. Mehlhorn, H. 1988. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: are there different stages or species? *Parasitology Research* 74: 393-395.

20. Moe, K, M. Singh, J. Howe, L. Ho, S. Tan, X. Chen, G.C. Ng and E.H. Yap. 1997. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research* 83: 319-325.

21. Moe, K, M. Singh, J. Howe, L. Ho, S. Tan, X. Chen and E.H. Yap. 1999. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research* 85:103-108.

22. Molavi, Gh.R., H. Mirahmadi, M. Rezaian, E. Bigemkia, N. Daryani and MB. Rokni, 2007. Prevalence of intestinal parasites in tribal parts of Khuzestan province during 2005-2007. *Govaresh Journal* 12: 219-228.

23. Nasiri, V., k. Esmailnia, Gh. karimi, M. Nasiri and O. Akhavan. 2009. Intestinal Parasitic infections among inhabitants of karaj city, Iran in 2006-2008. *Korean Journal of Parasitology* 47: 265-268.

24. Neghab, M., S. Moosavi and M.D. Moemenbellah-Frad. 2006. Prevalence of intestinal parasitic infections among catering staff of students canteens at Shiraz, Southern Iran. *Pakistan Journal of Biological Science* 9: 2703-2699.

25. Ok, Ü.Z., M. Cirit, A. Üner, E. Ok, F. Akçiçek, A. Başçi and M.A. Ozcel. 1997. *Cryptosporidiosis* and *blastocystosis* in renal transplant recipients. *Nephron* 75:171-174.

26. Rene, B.A. C.R. Stensvold, J.H. Badsberg and H.V. Nielsen. 2009. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from Blastocystis cyst excreting patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygine* 80: 588-592.

27. Roberts, T., D. Stark, J. Harkness and J. Ellis. 2013. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Veterinary Parasitology* 196: 85-89.

28. Sadeghi, H., M. Bakht, H. Saghafi and T. Shahsavari. 2013. Prevalence of intestinal parasites in a population in Eghbalieh city from Qazvin Province, Iran. *Journal of Parasitic Disease* 39:126-129.

29. Scicluna, S.M., B. Tawari, and C.G. Clark. 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 157: 77-85.

30. Souppart, L., G. Sanciu, A. Cian, I. Wawrzyniak, F. Delbac, M. Capron, E. Dei-Cas, K. Boorom, L. Delhaes and E. Viscogliosi. 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitology Research* 105: 413-421.

31. Suresh, K. and H. Smith 2004. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eurpean Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease* 23(6):509-511.

32. Tan, S., M. Singh, E. Yap, L. Ho, K. Moe, J. Howe and G.C. Ng. 1996. Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. *Parasitology Research* 82: 375-7.

33. Thathaisong, U., J. Worapong, M. Mungthin, P. Tan-Ariya, K. Viputtigul, A. Sudatis, A. Noonai and S. Leelayoova. 2003. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to Blastocystis hominis. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 967-975.

34. Wang J., B. Gong, X. Liu, W. Zhao, T.Bu, W. Zhang, A. Liu and F. Yang. 2018. Distribution and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in various mammal and bird species in northeastern China. *Parasite Vectors* 11: 522.

35. Wong, K.H., G.C. Ng, R.T.P. Lin, H. Yoshikawa, M.B. Taylor and K.S.W. Tanl. 2008. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research*: 102: 663-670.

36. Zierdt, C.H., W.S. Zierdt and B. Nagy. 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *Journal of Parasitology* 81: 127.