آنالیز فیلوژنتیکی تریکوموناس واژینالیس با استفاده از ژن ITS1/5.8S/ITS2 در زنان مراجعه‌کننده به مراکز تشخیصی درمانی شهر کرج

راضیه آیتی[۱]، نادیا طائفی نصرآبادی*[۱]، زهره مؤمنی[۲]، شاپور رضا شجاعی[۱]

۱) گروه انگل‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی ، کرج، ایران

۲) گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی ، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۹ **تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۹/۵**

چکیده

مقدمه: تریکوموناس واژینالیس شایع‌ترین عفونت مقاربتی غیرویروسی (STI) در جهان محسوب می‌شود و منبع مهمی برای عارضهٔ تولیدمثلی و افزایش ریسک انتقال HIV است؛ بنابراین، به‌عنوان یک مشکل مهم بهداشتی مطرح است. هدف از این مطالعه، تعیین ویژگی‌های ملکولی و فیلوژنتیکی تریکوموناس واژینالیس در زنان استان البرز است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۵۰ نمونهٔ مثبت تریکوموناس واژینالیس از ترشحات واژن جمع‌آوری و پس از جداسازی انگل با استفاده از محیط کشت و استخراج DNA، واکنش PCR بر روی ژن ITS1/5.8S/ITS2 انجام شد. از موارد مثبت جداشده، ۱۰ نمونه برای توالی‌یابی ارسال گردید.

یافته‌های پژوهش: همهٔ ۵۰ نمونه با روش گسترش مرطوب، محیط کشت و PCR مثبت شدند. بر اساس نتایج مشاهده‌شده، اندازهٔ قطعات تکثیر این ژن bp ۳۷۲ بود. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، با استفاده از درخت فیلوژنتیکی و همبستگی (NJ) تجزیه‌وتحلیل و موتاسیون‌های احتمالی بررسی شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که ژن ITS1/5.8S/ITS2 جداشده از این نمونه‌ها، با توالی‌های موجود در بانک ژن، بیش از ۹۹ درصد شباهت ژنتیکی دارد. توالی ژن ۵/۸S rRNA و نواحی اطراف آن ITS1 و ITS2 ، پلی‌مورفیسم بودن این ژن را اندک نشان داد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، تریکوموناس واژینالیس، ژن ITS1/5.8S/ITS2، کرج

* نویسندهٔ مسئول: گروه انگل‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

Email: drnadiataeifi@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

تریکوموناس واژینالیس، انگلی تک‌یاخته‌ای تاژک‌دار در دستگاه ادراری تناسلی انسان است و به‌عنوان شایع‌ترین بیماری جنسی غیر ویروسی در سرتاسر جهان شناخته‌شده است (۱). نیمی از زنان آلوده به تریکوموناس واژینالیس، علائمی همچون ترشحات بدخیم واژن، سوزش و التهاب دهانهٔ واژن دارند و همچنین می‌توان به وجود نقاط میکروسکوپی خون‌ریزی در گردن رحم اشاره کرد که به نمای توت‌فرنگی (colpitis macularis or strawberry cervix) معروف است. مردان ممکن است بدون علامت باقی بمانند؛ اما ممکن است از علائمی همچون ترشحات مجرای ادراری، سوزش، اورتریت، اپیدیدیمیت و التهاب پروستات رنج ببرند. پیامدهای حاملگی با تریکوموناس واژینالیس در زنان باردار، با عوارض جانبی همچون تولد زودرس یا نارس نوزاد، پارگی کیسهٔ آب و افزایش انتقال و دستیابی به ویروس نقص ایمنی بدن (HIV) همراه است (۳، ۲). سازمان جهانی بهداشت (WHO) شیوع سالیانهٔ تریکوموناس واژینالیس را در سال ۲۰۰۵، بالغ بر ۲۴۸ میلیون نفر اعلام کرد که در سال ۲۰۰۸، این تعداد ۱۱/۲ درصد افزایش یافته و به ۲۷۶ میلیون نفر رسیده است (۴). شیوع آلودگی در زنان ایرانی بین ۲ تا ۸ درصد گزارش شده که با توجه به وضعیت فرهنگی اجتماعی ممکن است به بیشتر از ۳۰ درصد نیز برسد (۵). تشخیص از راه علائم کلینیکی، مشاهدهٔ مستقیم انگل در زیر میکروسکوپ از طریق تهیهٔ اسمیر مرطوب (با میزان حساسیت ۶۰ درصد) و محیط کشت اختصاصی انگل (با میزان حساسیت ۸۵–۹۵ درصد) میسر است (۷، ۶). به‌طورمعمول، PCR و روش‌های مرتبط با آن، به‌عنوان یک روش حساس و قابل‌اطمینان، به‌طور گسترده‌ای برای مطالعات ژنتیکی در اپیدمیولوژی مولکولی میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شوند. ژن‌های ریبوزومی (rRNA ژن‌ها)، به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی، عموماً برای بررسی تغییر و تنوع ژنتیکی موردمطالعه قرار می‌گیرند. نشانگرهای ملکولی که اغلب برای توصیف فیلوژنتیک کاربرد دارند، شامل ژن‌های 18S rRNA و ITS1/5.8S/ITS2 هستند (8). دو ناحیهٔ کدگذاری نشده که در دو طرف ژن 5/8S rRNA قرار می‌گیرند، به‌عنوان ITS1 و ITS2 شناخته می‌شوند. به سبب اینکه این نواحی خیلی کم توسط rRNA ژن‌ها محافظت شده‌اند، مناطق مناسبی برای مطالعهٔ فیلوژنتیکی در ارگانیسم‌ها هستند (۹). چندین مطالعه در ایران در ارتباط با تریکومونیازیس انجام شده؛ اما تلاش‌های اندکی برای توصیف ژنتیکی این انگل صورت گرفته است؛ پس با توجه به اهمیت تریکومونیازیس و نبود مطالعات جامع پیشین دربارهٔ توزیع و تنوع فیلوژنتیکی تریکومونیازیس انسانی، ضرورت بررسی این مطالعه در استان البرز احساس شد؛ بنابراین، هدف از این مطالعه، تعیین و شناسایی ملکولی و فیلوژنتیکی ایزوله‌های تریکوموناس واژینالیس توسط ژن ITS1/5.8S/ITS2 در زنان استان البرز است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: نمونه‌گیری توسط پزشک متخصص زنان، از تیرماه ۱۳۹۱ تا مرداد ۱۳۹۳، با جمع‌آوری ۵۰ نمونهٔ مثبت تریکوموناس واژینالیس از ترشحات واژن از زنان مراجعه‌کننده به کلینیک‌ها، آزمایشگاه تشخیص طبی و بیمارستان‌های شهر کرج انجام گردید. نمونه‌ها با استفاده از روش گسترش مستقیم زیر میکروسکوپ بررسی شد.

محیط کشت: نمونه‌های مثبت، به‌طور مستقیم در 15 میلی‌لیتر محیط کشت Diamond's Trypticase-yeast extract-maltose (TYM) همراه با ۱۰ درصد سرم گوساله، آنتی‌بیوتیک‌ها (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سفتریاکسون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سیپروفلوکساسین) و قارچ‌کش‌ها (۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمفوتریسین B)، به مدت سه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از رشد و تکثیر، برای اطمینان از وجود انگل، حرکت تریکوموناس‌ها با استفاده از میکروسکوپ بررسی گردیدند.

استخراج DNA: لوله‌های حاوی محیط کشت انگل، با محلول PBS سه مرتبه شستشو شدند. برای استخراج DNA نمونه‌ها، از کیت استخراج DNAاز خون و بافت (ساخت شرکت سیناژن، EX6071) استفاده گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش PCR، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

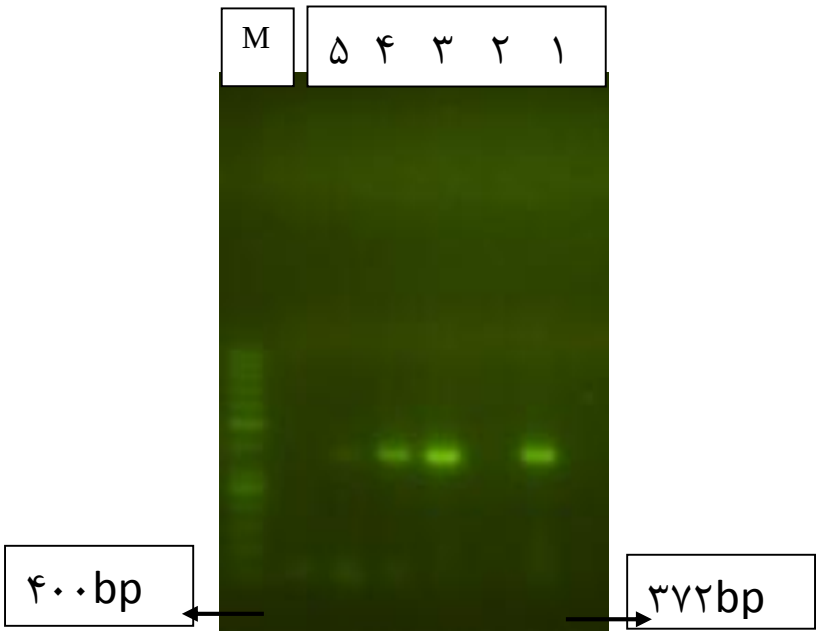
PCR: برای انجام آزمایش PCR، از یک جفت پرایمر به نام‌های TFR1 و TFR2 که از ژن ITS1/5.8S/ITS2 مشتق شده، استفاده گردید که ترادف نوکلئوتیدی این پرایمرها به شرح زیر است:

F: TGC TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC
R: CGG TAG GTG AAC CTG CCG TTG G

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱۲/۵ مسترمیکس (ساخت شرکت سیناژن،(MM2061 ، ۱ میکرولیتر پرایمر F و ۱ میکرولیتر پرایمر R و ۵/۵ میکرولیتر آب دیونیزه بود. PCR با واسرشت (دناتوراسیون) اولیه، به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شد؛ سپس ۳۵ سیکل، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکرار گردید. طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با دستگاه ژل داک و زیر لامپ UV مشاهده گردید. برای تأیید صحت تشخیص ملکولی، تعداد ۱۰ نمونه از محصول PCR نمونه‌های مثبت، برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال گردید. نتایج به‌دست‌آمده از تعیین توالی در پایگاه داده‌های NCBI جستجو شده و با توالی‌های مشابه ثبت‌شده BLAST شد.

یافته‌های پژوهش

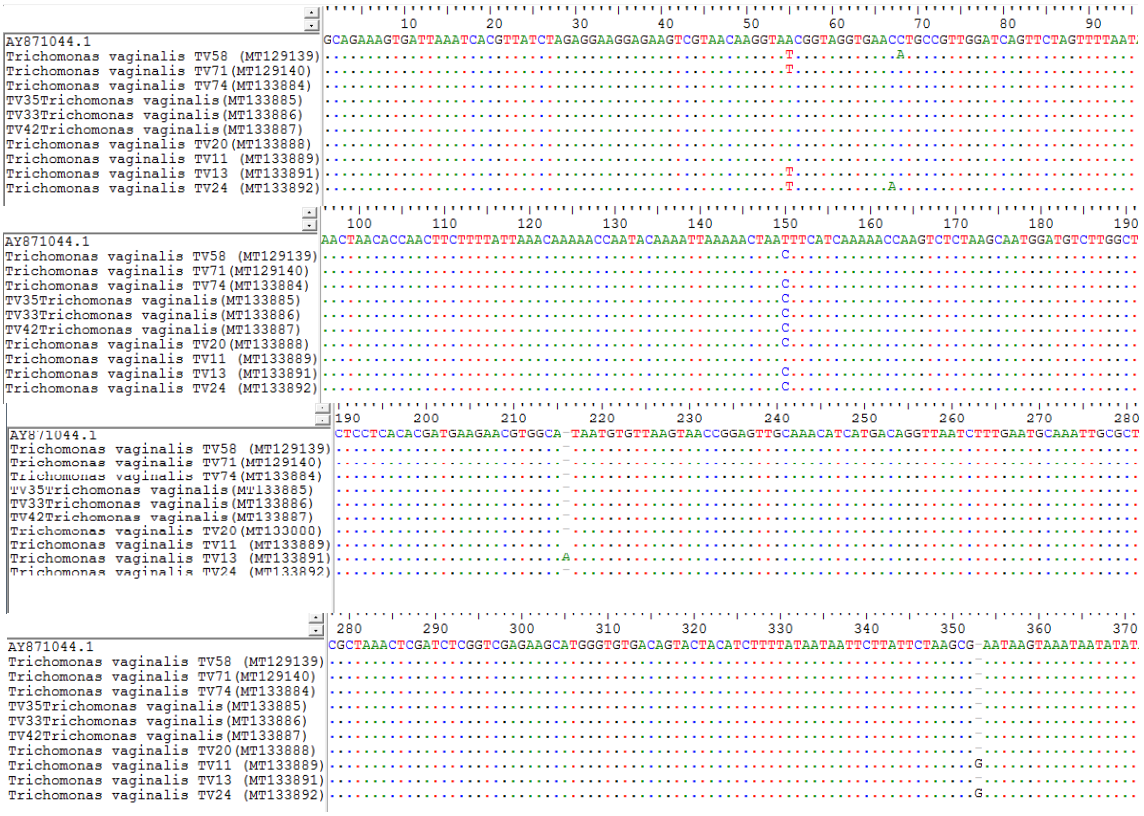
همهٔ ۵۰ نمونه از نظر میکروسکوپی، کشت و ملکولی مثبت شدند که نمایانگر وجود این تک‌یاخته در نمونه‌های بررسی‌شده بود. تکثیر PCR با استفاده از پرایمرهای TFR1 و TFR2 انجام گردید که توالی ژن ITS1/5.8S/ITS2 همهٔ نمونه‌ها، با اندازهٔ باندی با وزن ۳۷۲ جفت باز بر روی ژل مشاهده شد (شکل شمارهٔ ۱).



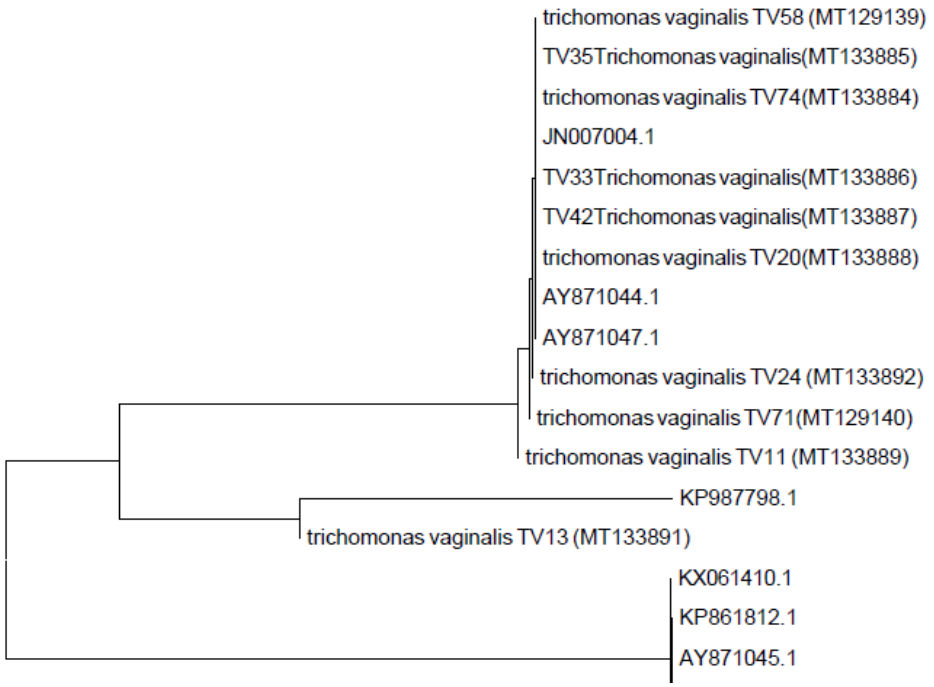
شکل شمارهٔ ۱. نتایج به‌دست‌آمده از PCR برای تشخیص DNA ژن ITS2 ITS1/5.8S/
ستون ۱. کنترل مثبت؛ ستون ۲. کنترل منفی؛ ستون ۳، ۴ و ۵. نمونه‌های مثبت تریکوموناس واژینالیس ستون M. DNA مارکر (۵۰bp)

بررسی و مقایسهٔ توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی: برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان ایزوله‌های تریکوموناس واژینالیس ثبت‌شده در این پژوهش، با ایزوله‌هایی که در بانک اطلاعات ژن (Genbank) پیشتر ثبت شده بود، Multiple aligment انجام گرفت (شکل شمارهٔ ۲) و با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ با الگوریتم Neighbor-Joining (NJ)، درخت فیلوژنتیک ترسیم شد (شکل شمارهٔ ۳). توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در NCBI، بیشتر از ۹۹ درصد شباهت ژنتیکی را نشان

داد. از توالی نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از ژن ITS1/5.8S/ITS2، ۱۰ ایزوله در GenBank ثبت گردید که شمارهٔ پذیرش آن‌ها MT129139، MT129140، MT133884- MT133889، MT133891 ، MT133892 این کدها هستند.



شکل شمارهٔ ۲. هم‌تراز کردن ژن ITS1/5.8S/ITS2 از ده توالی تریکوموناس واژینالیس مدنظر در این مطالعه



شکل شمارهٔ ۳. درخت فیلوژنتیکی ایزوله‌های موردمطالعه ژن ITS1/5.8S/ITS2 در مقایسه با ایزوله‌های ثبت‌شده در بانک جهانی ژن. الگوریتم neighbor-Joining با استفاده از bootstrapping 1000 ترسیم‌شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

تریکومونیازیس شایع‌ترین بیماری غیرویروسی منتقله از راه جنسی است (10). مطالعاتی بر روی ژن 5/8S rRNA و مناطق پیرامون آن (ITS)، اطلاعات مفیدی را برای طبقه‌بندی خانواده تریکومونادیده‌ها در اختیار قرار می‌دهد (11). برای اولین بار در ایران، دلیمی و همکاران در سال (۲۰۰۸) با استفاده از روش PCR و تکثیر ژن 18S rRNA، تریکوموناس واژینالیس را از ترشحات واژن کشت‌داده‌شده جدا کردند (۱۲). کاظمی و همکاران (۲۰۱۰) تعداد ۵۲ نمونه تریکوموناس واژینالیس را از ترشحات واژن جداسازی و با استفاده از تکنیک PCR، ژن ITS تکثیر نمودند و ۵۱ نمونه مثبت شد (۱۳). رایورا و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی ویژگی‌های ملکولی ایزوله‌های تریکوموناس واژینالیس در فیلیپین پرداختند. در این مطالعه، ۵۷ ایزوله تریکوموناس واژینالیس با روش PCR و تکثیر ژن ITS، تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیک شدند و گزارش کردند که مناطق مورد سکانس پلی‌مورفیسم ژنتیکی پایینی دارند (۱۴). روش‌های ژنوتیپ و فیلوژنتیک مولکولی می‌تواند ابهاماتی دربارهٔ اتیولوژی، پاتوبیولوژی، اپیدمیولوژی و مقاومت دارویی تریکوموناس واژینالیس را پاسخگو باشد که البته مشروط به انتخاب ژن‌های حیاتی مفید است (۱۵). پس از اینکه ۱۰ توالی این مطالعه با سایر ایزوله‌های ثبت‌شده در بانک ژنی هم‌تراز شد، چندین اختلاف نوکلئوتیدی در نواحی ITS از ژن S 5.8rRNA که کمتر محافظت‌شده‌اند، مشخص گردید که نشان از همولوگ بودن بالای این ژن با توالی‌های موجود دیگر است. با بررسی این تفاوت‌ها و شباهت‌ها و با توجه به درختچهٔ فیلوژنتیک ترسیم‌شده، ۹ مورد از ایزوله‌ها، باهم شباهت ۱۰۰ درصدی داشتند و تنها ایزولهٔ شمارهٔ MT133891 با سایر ایزوله‌ها متفاوت بود. دربارهٔ شباهت ایزوله‌های این مطالعه با ایزوله‌های ثبت‌شده در بانک ژن، بیشترین شباهت را با ایزوله‌های JN007004، AY871044،AY871047 و بیشترین اختلاف را با ایزوله‌های AY87104،KP861812،KX061410،KP987798 5 دارد. به نظر می‌رسد علت تفاوت میان توالی‌های جداشده و توالی‌های موجود در بانک ژن، در اثر جهش یا تأثیر عوامل محیطی باشد و شباهت میان آن‌ها نشان از این دارد که همهٔ این‌ها از یک منشأ هستند. درمجموع، نمونه‌های جداشده در این مطالعه، بیش از ۹۹ درصد شباهت را با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان دادند. توالی ایزوله‌های جداشده در مطالعهٔ ما با دیگر توالی‌های ثبت‌شده در GenBank نشان می‌دهد SNP مشابه (پلی‌مورفیسم چندشکلی تک نوکلئوتیدی) در منطقهٔ ITS وجود دارد؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود توالی مناطق دیگری از ژنوم مربوط به ایزوله‌های مطالعه‌شده در این تحقیق و مقایسهٔ آن‌ها با یکدیگر، به‌منظور شناخت بیشتر قرابت و تفاوت‌های فیلوژنتیکی موجود در ایزوله‌های انسانی صورت پذیرد؛ همچنین توصیه می‌شود بررسی اپیدمیولوژی ملکولی در سایر مناطق ایران، برای شناسایی و تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های تریکوموناس واژینالیس انجام گیرد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد کرج برای همکاری در انجام این مطالعه کمال تشکر و سپاس به عمل می‌آید.

کد اخلاق: 52/2062 دانشگاه تربیت مدرس

Refrences

1.Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. Plos One 2015;10: 143304. doi.10.1371/journal.pone.0143304.

2. Masha SC, Cools P, Crucitti T, Sanders EJ, Vaneechoutte M. Molecular typing of Trichomonas vaginalis isolates by actin gene sequence analysis and carriage of T. vaginalis viruses. Par Vec 2017; 10:1-9. doi.10.1186/s13071-017-2496-7.

3.Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. Clinical Microbiol Rev 2004; 17:794-803. doi.10.1128/CMR.17.4.794–803.2004

4.Zhang Z, Kang L, Wang W, Zhao X, Li Y, Xie Q, et al. Prevalence and genetic diversity of Trichomonas vaginalis clinical isolates in a targeted population in Xinxiang City,

Henan Province China. Par Vec 2018; 11:124. doi.10.1186/s13071-018-2753-4.
5.Matini M, Rezaie S, Mohebali M, Maghsood AH, Rabiee S, Fallah M, et al. Prevalence of Trichomonas vaginalis infection in Hamadan city Western Iran. Iranian J Parasitol 2012;7: 67-72.
6.Fouts AC, Kraus SJ. Trichomonas vaginalis: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. Journal of Infectious Diseases 1980; 141:137-143. doi: 10.1093/infdis/141.2.137.
7. Levi MH, Torres J, Wiston A, Pina C, Klein RS. Comparison of the in pouch TV culture system and Diamond's modified medium for detection of Trichomonas vaginalis. J Clin Microbiol 1997; 35:3308-10. doi.10.1128/JCM.35.12.3308-3310.1997.
8. Dimasuay KG, Rivera WL. Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines. Vet Parasitol 2013; 196:289-95. doi.10.1016/j.vetpar.2013.03.019.
9. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference. Quarter Rev Biol1991; 66:411-53.
10. Kissinger P. Trichomonas vaginalis a review of epidemiologic clinical and treatment issues. BMC infectious diseases2015; 15:307. doi.10.1186/s12879-015-1055-0.
11.Kamaruddin M, Tokoro M, Rahman MM, Arayama S, Hidayati AP, Syafruddin D, et al. Molecular characterization of various trichomonad species isolated from humans and related mammals in Indonesia. Korean J Parasitol 2014; 52:471-478. doi:10.3347/kjp.2014.52.5.471
12. Dalimiasl A, Shirbazou SH, Ghaffarifar F, Hosseinian KK, Jorjani ON, SHarifi Z, Hosseinzadeh N. [Molecular diagnosis of Trichomonias vaginalis by PCR]. Kowsar Med J2008; 13:179-84. (Persian)
13. Kazemi F, Hooshyar H, Zareikar B, Bandehpour M, Arbabi M, Talari S, Alizadeh R, Kazemi B. Study on ITS1 gene of Iranian Trichomonas vaginalis by molecular methods. Iranian J Parasitol2010; 5:9-14.
14. Rivera WL, Ong VA, Masalunga MC. Molecular characterization of Trichomonas vaginalis isolates from the Philippines. Parasitol Res 2009; 106:105-110. doi.10.1007/s00436-009-1635-2
15.Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. International J Parasitol1997; 27:1135-1145. doi.10.1016/s0020-7519(97)00111-2.

Phylogenetic Analysis of Trichomonas Vaginalis using ITS1/5.8S/ITS2 Gene in Women Referred to Diagnostic Treatment Centers in Karaj, Iran

Ayati R[1], Taiefinasrabadi N[1], Momeni Z[2], Shojaei S[1]*

(Received: June 29, 2020 Accepted: November 25, 2020)

Abstract

Introduction: Trichomonas Vaginalis is the most common nonviral sexually transmitted infection in the world. Moreover, it is an important source of reproductive complications and increased risk of HIV transmission, Therefore, it is considered a public health issue. This study aimed to determine the molecular and phylogenetic characteristics of Trichomonas Vaginalis among women in Alborz Province, Iran.

Materials & Methods: In this study, 50 positive samples of Trichomonas Vaginalis were collected from vaginal discharge, and after isolating the parasite using the culture medium and extracting DNA, the PCR was performed on the ITS1/5.8S/ITS2 gene. Out of the isolated positive cases, 10 samples were sent for sequencing.
Ethics code: 52/2062

Findings: All 50 samples were positive using the wet spread method, culture medium, and PCR. Based on the observed results, the size of the proliferative product of this gene was 372 base pairs. The results of this study were analyzed using phylogenetic tree and neighbor-joining. Furthermore, the possible mutations were investigated in this study.

Discussions & Conclusions: The results of this study showed that the ITS1/5.8S/ITS2 gene isolated from these samples was more than 99% similar to the sequences in the gene bank. The sequence of the 5/8SrRNA gene and its surrounding areas of ITS1 and ITS2 showed the low polymorphism of this gene.

Keywords: ITS1/5.8S/ITS2 gene, Karaj, Phylogenetic analysis, Trichomonas vaginalis

1.Dept of Parasitology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2.Dept of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
** Corresponding author Email: drnadiataeifi@gmail.com*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences