

بررسی تفاوت‌های ژنتیکی زیاردیا لامبلیا در شهرستان خرم آباد و روستاهای اطراف آن با استفاده از PCR و تعیین توالی بازی

امین اکبریان^۱، جاوید صدراعی^۲، مهدی فروزنده^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. دانشیار گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. (مؤلف مسوول) تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۵۵۵ Sadraeij@modares.ac.ir

۳. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: زیاردیا لامبلیا تک یاخته انگلی آلوده کننده روده کوچک است که در سراسر جهان انسان را آلوده می‌کند. این انگل در انسان معمولاً به وسیله مواد غذایی و آب‌های آلوده به کیست انتقال می‌یابد. هدف از این تحقیق ارزیابی تفاوت‌های ژنتیکی زیاردیا لامبلیا در شهر خرم آباد و روستاهای اطراف با استفاده از PCR و تعیین توالی بود.

روش بررسی: در این تحقیق ۳۰ نمونه مثبت مدفوع از نظر زیاردیا لامبلیا از شهر خرم آباد و روستاهای اطراف جمع آوری شد و سپس نمونه‌ها بعد از صاف کردن در محلول دیکرومات ۵٪ نگهداری شدند. قبل از استخراج DNA با روش فنل کلروفورم تمامی نمونه‌ها برای زدودن دیکرومات با محلول PBS شستشو داده شدند. به منظور تعیین تفاوت‌های ژنتیکی ۵ نمونه بصورت تصادفی انتخاب و تعیین توالی بر روی آنها انجام شد.

یافته‌ها: پس از استخراج DNA، تکثیر ژن GDH با روش PCR از ۳۰ نمونه مدفوع دارای انگل بر روی ۲۴ نمونه با موفقیت انجام شد. هم‌ردیفی توالی GDH به دست آمده با توالی‌های بانک ژن انجام گردید و بدلیل محدودیت مالی ۳ نمونه شهری و ۲ نمونه روستایی همه از ژنوتایپ A زیاردیا لامبلیا بودند و تفاوتی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ژنوتایپ غالب در شهر خرم‌آباد و روستاهای اطراف می‌تواند ژنوتایپ A باشد ولی بدلیل محدود بودن نمونه‌ها تحقیقات بیشتری لازم می‌باشد.

کلیدواژگان: ژنوتایپ، زیاردیا لامبلیا، شهرستان خرم‌آباد، PCR و تعیین توالی.

وصول مقاله: ۹۰/۴/۱۴ اصلاحیه نهایی: ۹۰/۱۱/۱۰ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

مقدمه

(۱). زیاردیا لامبلیا یک انگل با انتشار وسیع در پستانداران از جمله انسان است. بدلیل وجود ناقلین سالم انگل، این مساله مطرح شده که احتمالاً تفاوت‌های ژنتیکی در این گونه وجود دارد. بررسی‌های اخیر نشان داده که هفت گروه ژنتیکی یا اسمبلیج در این گونه وجود دارد. اسمبلیج‌های A

انگل زیاردیا لامبلیا دارای توزیع جهانی است که سالانه باعث آلودگی ۲۸۰ میلیون نفر می‌شود و این شایع‌ترین انگل روده‌ای در کشورهای توسعه یافته است. در آفریقا، آسیا و آمریکای لاتین ۲۰۰ میلیون نفر دارای آلودگی زیاردیا هستند که ۵۰۰۰۰۰ نفر دارای علائم بالینی هستند

فیزیولوژی و لوگول) انجام شد، سپس نمونه‌های مدفوع مثبت جمع آوری شده به منظور حفظ انگل تا انجام آزمایش با محلول دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ به خوبی مخلوط شد و در ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد، سپس نمونه‌ها از الک شماره ۸۰ عبور داده شد و محلول صاف شده با دی کرومات پتاسیم ۵٪ در فالكون ۱۵ میکرولیتر نگه داری شد. از محلول صاف شده جهت تایید مجدد آلودگی لام مستقیم تهیه شد.

آماده سازی نمونه مدفوع برای استخراج DNA

شستشوی نمونه‌های مدفوع مثبت با بافر^۱ PBS برای زدودن دی کرومات پتاسیم انجام شد و در نهایت رسوبهای شسته شده تا انجام سایر آزمایشات مولکولی در فریزر نگه داری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA با روش فنل / کلروفورم و کیت‌های استخراج DNA از مدفوع بیونر^۲ و کیاژن^۳ با موفقیت بر روی تمام نمونه‌های مثبت انجام شد. مراحل استخراج با روش فنل / کلروفورم به صورت زیر انجام شد (۴):

به مقدار تقریبی ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه ۱۷۰ میکرولیتر بافر TE^۴، ۷۰ میکرولیتر SDS^۵ و ۱۰ میکرولیتر پروتیناز K اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ ساعت در بن ماری ۵۶ درجه سانتی گراد نگه داری شد. سپس به نمونه ۱۰۰ میکرولیتر NaCl و ۱۰۰ میکرولیتر CTAB^۶ اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۶ درجه نگه داری شد. پس از آن به نمونه ۷۰۰ میکرولیتر کلروفورم ایزوآمیل الکل اضافه شد. سپس DNA با افزودن ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد رسوب داده شد. در نهایت با افزودن ۷۰ میکرولیتر آب مقطر استریل DNA رقیق شد و تا انجام PCR در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد.

و B در انسان و حیوانات مثل سگ وجود دارد ولی C تا G دارای میزبان اختصاصی هستند. مطالعات تعیین توالی نمایانگر شمار زیاد زیر ژنو تایپ‌های اسمبلیج‌های A و B در گونه‌های حیوانی بود (۲).

با طبقه بندی شدن این انگل به گروه‌های ژنتیکی مختلف و مشخص شدن میزبان‌های اختصاصی برای هر ژنوتایپ خاص، بینش ما نسبت به این انگل بیشتر شده است. مطالعات ژنتیکی با استفاده از تکنیک‌های PCR بر روی کیست‌های موجود در نمونه‌های مدفوع در آلودگی‌های طبیعی به دست آمده‌اند (۳). اما برای رفع ابهام کردن سوالات بیشتر به خصوص، انتقال ژنوتایپ، جمع کردن اطلاعات بیشتر ضروری است. با توجه به اینکه مشخص شده که اسمبلیج‌های A و B به صورت ژنوتایپ عمل می‌کنند تعیین تفاوت‌های ژنتیکی گونه‌های انسانی با استفاده از روش مولکولی و تعیین توالی از نظر مولکولار اپیدمیولوژی دارای اهمیت است. بنابراین در این تحقیق هدف مطالعه را بر تعیین تفاوت‌های ژنوتایپی در نمونه‌های شهری و روستایی خرم آباد قرار دادیم.

روش بررسی

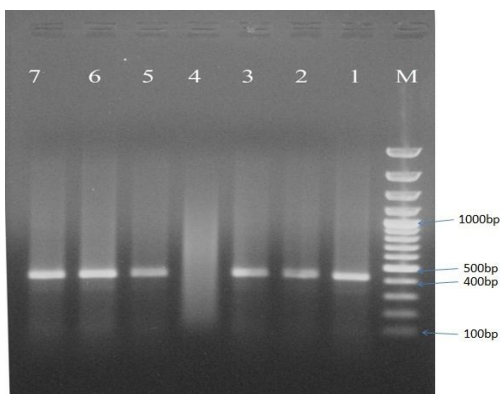
جمع آوری نمونه

نمونه‌های مدفوع مثبت از نظر ژنوتایپ از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان خرم آباد جمع آوری شدند از مجموع ۳۰ نمونه مثبت ۱۵ نمونه از مناطق شهری و ۱۵ نمونه از مناطق روستایی بود. انتخاب جامعه روستایی بدلیل تماس بیشتر این افراد با حیوانات اهلی بود. افراد بیمار ۱ تا ۱۵ سال سن داشتند. نمونه‌ها با استفاده از روش مستقیم آزمایش شدند. به منظور تعیین تفاوت‌های ژنتیکی و با توجه به محدودیت مالی فقط ۵ نمونه بصورت تصادفی انتخاب و تعیین توالی بر روی آنها انجام شد.

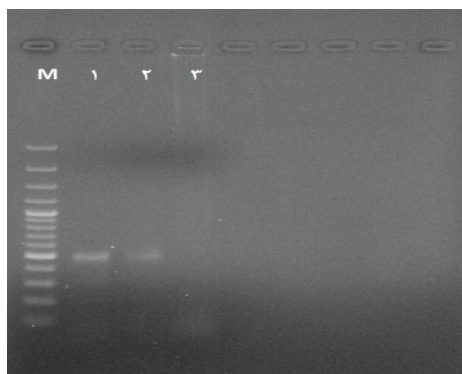
روش تشخیص آزمایشگاهی ژنوتایپ لامبلیا در نمونه مدفوع تشخیص اولیه انگل در مدفوع با تهیه گسترش مستقیم (سرم

1 Phosphate buffered saline
2 Cat.n: K-3036 AccuPrep Stool DNA Extraction Kit
3 Cat.n: 51504 QIAamp DNA Stool Mini Kit
4 Tris EDTA buffer
5- Sodium Dodecyl Sulfate
6- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

نتایج الکتروفورز نمونه‌ها و کنترل‌ها روی ژل به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR روی ژل. ستون ۴ نشان دهنده کنترل منفی است و M نشان دهنده مارکر است. نمونه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ نمونه‌های مثبت هستند.



شکل ۲- نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های استاندارد و کنترل منفی روی ژل، ستون‌های ۱ و ۲ الکتروفورز محصول PCR در ناحیه GDH نمونه‌های استاندارد ژیاوردیا لامبلیا، ستون ۳ کنترل منفی، ستون M مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

تکثیر ژن GDH با روش PCR و الکتروفورز تکثیر ژن GDH با یک مرحله PCR با پرایمرهای ذیل انجام شد.

Forward (GDHF): 5'
TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGT3'
Reverse (GDHR): 5'
GTTGTCCTTGCACATCTCC3'

پرایمرها با نمونه DNA استاندارد ژیاوردیا (نمونه حاوی تروفوزوایت که DNA آن با کیت استخراج بیونیر استخراج شد) به عنوان کنترل مثبت بررسی شدند. مخلوط واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر ماستر میکس^۷، ۷ میکرولیتر محصول استخراج DNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت تهیه شد. برنامه PCR به صورت: ۸ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه به صورت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۶۰/۵ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. کنترل منفی شامل مخلوط واکنش PCR بود که بجای استفاده از محصول استخراج DNA در آن از آب مقطر استریل استفاده شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. برای نشان دادن اندازه باند از مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد (۵).

نتایج

نتایج نمونه‌گیری

۳۰ نمونه مثبت از شهر خرم‌آباد و روستاها جمع‌آوری شد. علاوه بر انگل مورد نظر در این تحقیق از نمونه مناطق روستایی یک مورد تخم آسکاریس و دو مورد تخم هیمنولپس نانا نیز مشاهده شد.

نتایج الکتروفورز روی ژل

از ۳۰ نمونه مثبت ۲۴ مورد با موفقیت بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و باند ۴۵۸bp مورد نظر را نشان دادند.

7 - Master mix

نتایج تعیین توالی ایزوله‌های ژیاوردیا لامبلیا

توالی ژن GDH در ۵ تا از نمونه‌ها. این توالی‌ها به شرح زیر هستند. ایزوله شماره ۱۲ و ایزوله شماره ۳۰ از مناطق روستایی بودند.

>Seq1 [Giardia lamblia] isolate 16, Glutamate Dehydrogenase gene, partial sequence ایزوله شماره ۱۶

TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
 CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCG
 ATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCC
 AGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCTGCCGGCGACATCGGGCTCGG
 CGCCCGGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAGGC
 AAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTCATCAGGCCGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAGG
 AGATGTGCAAGGACAAC

>Seq2 [Giardia lamblia] isolate 30, Glutamate Dehydrogenase gene, partial sequence ایزوله شماره ۳۰

TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
 CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCG
 ATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCC
 AGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCTGCCGGCGACATCGGGCTCGG
 CGCCCGGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAGGC
 AAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTCATCAGGCCGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAGG
 AGATGTGCAAGGACAAC

>Seq3 [Giardia lamblia] isolate 12, Glutamate Dehydrogenase gene, partial ایزوله شماره ۱۲
 sequence

TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
 CCCTCTGTCAATCTTTCGATTTCGAAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCC
 GATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGC
 CAGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCTGCCGGCGACATCGGGCTCG
 GCGCCCGGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAG
 GCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTCATCAGGCCGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAG
 GGAGATGTGCAAGGACAAC

ایزوله شماره ۱۴ >Seq4 [Giardia lamblia] isolate 4, Glutamate Dehydrogenase gene, partial sequence

TCAACGTCAACCGGGCTTCCGTGTCCAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
 CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCG
 ATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCC
 AGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCCCTGCCGGCGACATCGGCGTCGG
 CGCCCGGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCTCACAGGC
 AAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTCATCAGGCCGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCTGGAGG
 AGATGTGCAAGGACAAC

ایزوله شماره ۲۸ >Seq5 [Giardia lamblia] isolate 28, Glutamate Dehydrogenase gene, partial sequence

TCAACGTCAACCGGGCTTCCGTGTCCAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
 CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCG
 ATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCC
 AGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACCTGACGTTCCCTGCCGGCGACATCGGCGTCGG
 CGCCCGGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCTCACAGGC
 AAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTCATCAGGCCGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCTGGAGG
 AGATGTGCAAGGACAAC

نتایج هم ردیفی^۸ توالی‌های نوکلئوتیدی

نتیجه تعیین توالی با برنامه Clustal X جهت مشخص شدن هم ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی مورد پردازش قرار گرفت که نتیجه آن در شکل ۳ نشان داده شده‌است. مرتب سازی چندگانه با استفاده از سایت ncbi انجام شد. که در پایان مشخص شد که در ایزوله ۱۲ باز شماره ۹۷ از T به G و در ایزوله ۲۸ باز شماره ۲۶۴ از A به C تغییر یافته است.

8- Alignment

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره هفدهم /تابستان ۱۳۹۱

شکل ۳- هم‌ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی ژنار دی‌آلامبلیا در ناحیه GDH.

ایزوله ۴	TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTG	60
ایزوله ۲۸	60
ایزوله ۳۰	60
ایزوله ۱۶	60
ایزوله ۱۲	60

ایزوله ۴	GCCTCCGCTTCCACCCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGA	120
ایزوله ۲۸	120
ایزوله ۳۰	120
ایزوله ۱۶	120
ایزوله ۱۲	120

ایزوله ۴	TCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCAGATGGGCGGCGCAAGGGCGGCTCCGACTTTG	180
ایزوله ۲۸	180
ایزوله ۳۰	180
ایزوله ۱۶	180
ایزوله ۱۲	180

ایزوله ۴	ACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCTTCATGACCGAGC	240
ایزوله ۲۸	240
ایزوله ۳۰	240
ایزوله ۱۶	240
ایزوله ۱۲	240

ایزوله ۴	TCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCTGCCGGCGACATCGGCGTCGGCGCCC	300
ایزوله ۲۸	300
ایزوله ۳۰	300
ایزوله ۱۶	300
ایزوله ۱۲	300

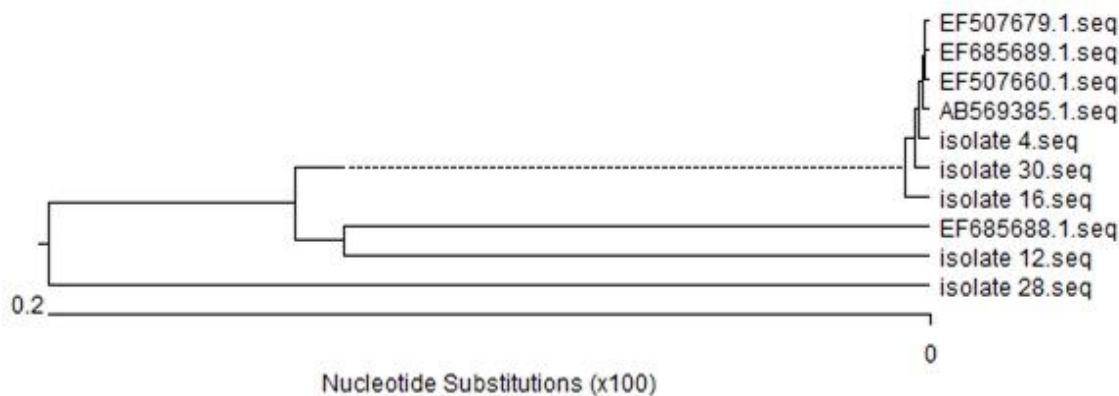
ایزوله ۴	GCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCC	360
ایزوله ۲۸	360
ایزوله ۳۰	360
ایزوله ۱۶	360
ایزوله ۱۲	360

ایزوله ۴	TCACAGGCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTCATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATG	420
ایزوله ۲۸	420
ایزوله ۳۰	420
ایزوله ۱۶	420
ایزوله ۱۲	420

ایزوله ۴	GCGCTGTCTACTTCCTGGAGGAGATGTGCAAGGACAAC	458
ایزوله ۲۸	458
ایزوله ۳۰	458
ایزوله ۱۶	458
ایزوله ۱۲	458

نتایج آنالیز فیلوژنتیک توالی GDH نمونه‌ها با نمونه‌های مشابه در بانک ژن

درخت فیلوژنتیک برای ۵ نمونه تعیین توالی شده و نمونه‌های مشابه در بانک ژن توسط برنامه MegAlign ترسیم شد.



شکل ۴ نتیجه آنالیز فیلوژنتیک نمونه‌های ژناردا یا لامبلیا با نمونه‌های مشابه در بانک ژن

نتایج حاصل از مقایسه نمونه‌ها با نمونه‌های موجود در بانک ژن

توالی ژن GDH نمونه با ایزوله‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد که نشان داده شد که همه ۵ ایزوله از ژنوتایپ A بودند.

جدول ۱. مقایسه توالی ژن GDH با ایزوله‌های موجود در بانک ژن

شماره ایزوله	۴	۱۲	۱۶	۲۸	۳۰
منطقه	شهر	روستا	شهر	شهر	روستا
ایزوله یا سویه و شماره دسترسی	Brazil: Sao Paulo	USA: West Virginia	Japan: Tokyo	Brazil: Sao Paulo	USA: Maryland
در بانک ژن	EF507679.1	ZEF685688.1	AB569385.1	EF507660.1	EF685689.1
درصد شباهت	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ژنوتایپ	assemblage A	assemblage A	Assemblage A	assemblage A	assemblage A

است (P= ۰/۰۱۶) (۳). اگر چه بعضی تحقیقات نشان داده که استفاده از نمونه مدفوع تازه باعث جلوگیری از منفی کاذب شدن جواب می شود (۴) ولی در این تحقیق، چون نمونه‌ها به صورت متوالی از آزمایشگاه‌های سطح شهر و روستا جمع آوری می‌شدند و جمع آوری این نمونه‌ها به طول انجامید، استفاده از دی کرومات پتاسیم به عنوان نگه‌دارنده کیست‌ها اجتناب‌ناپذیر بود.

در سال ۲۰۰۵ لالی^۱ و همکاران در ایتالیا با استفاده از توالی ژن بتا ژیرادین به بررسی هتروژنی ژیرادیا لامبلیا نمونه‌های انسانی و حیوانی پرداختند. ۳۷ نمونه انسانی با استفاده از تعیین توالی ژن بتا ژیرادین تعیین ژنوتایپ شدند. ۱۶ ایزوله ژنوتایپ A، ۱۰ ایزوله ژنوتایپ B و ۱۱ نمونه دارای هر دو ژنوتایپ بودند. از ۲۱ ایزوله سگ، ۶ ایزوله از ژنوتایپ A، ۱ ایزوله از ژنوتایپ C، ۱۳ ایزوله از ژنوتایپ D و یک ایزوله دارای ژنوتایپ‌های A و D بودند. نمونه‌های گربه با استفاده از تعیین توالی کد کننده ژن GDH تعیین ژنوتایپ شد که ژنوتایپ F بود. از نمونه‌های گاوی یک زیر ژنوتایپ جدید در ژنوتایپ A دیده شد. ۱۳/۵ درصد از ایزوله‌های گاوی شامل ژنوتایپ‌های A و B، ۱۳/۵ درصد از ژنوتایپ B بودند و بقیه از سایر ژنوتایپ‌ها بودند. در این مطالعه که به بررسی توانایی زئونوز بودن ژیرادیا لامبلیا پرداخته شده بود نقش زیر ژنوتایپ AI در زئونوز بودن به طور واضح نشان داده شد (۶).

ایتاگی^{۱۱} در ژاپن برای تعیین ژنوتایپ ایزوله‌های ژیرادیا لامبلیا از نمونه‌های حیوانات اهلی و وحشی یک مطالعه با استفاده از ژن GDH انجام داد. ایزوله‌های سگ شامل گروه‌های ژنتیکی A، C، D، و A/D، ایزوله‌های گربه فقط از گروه ژنتیکی F، ایزوله‌های گاو شامل گروه‌های ژنتیکی A و E، ایزوله‌های میمون فقط از گروه ژنتیکی B بودند.

بعد از استخراج DNA تکثیر ژن GDH، با استفاده از PCR انجام شد که از ۳۰ نمونه ۲۴ نمونه مثبت شدند. برای تعیین اختلافات ژنتیکی بر روی ۵ نمونه تعیین توالی انجام شد. هم‌ردیفی^۴ توالی ژن GDH نشان داد که همه ۵ نمونه از ژنوتایپ A بودند. این یافته‌ها نشان داد که ایزوله‌های شهرستان خرم‌آباد و روستاهای اطراف آن، می‌توانند از لحاظ ژنوتایپ شبیه هم باشند، اما مطالعات بیشتری نیاز است. مرتب سازی چندگانه با استفاده از سایت ncbi انجام شد و مشخص شد که در ایزوله ۱۲ (که ایزوله منطقه روستایی بود) باز شماره ۹۷ از T به G و در ایزوله ۲۸ (که ایزوله منطقه شهری بود) باز شماره ۲۶۴ از A به C تغییر یافته است.

بحث

در این مطالعه ۳۰ نمونه که با روش میکروسکوپی مثبت بودند با روش مولکولی ۲۴ مورد آنها مثبت شد با توجه به محدودیت بودجه امکان تعیین توالی همه نمونه‌ها میسر نشد لذا بصورت تصادفی ۳ نمونه شهری و ۲ نمونه روستایی تعیین توالی شدند و همه آنها از ژنوتایپ A بودند. در مطالعه‌ای که ویلک^{۱۰} و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام دادند. مشخص شد که دیکرومات پتاسیم ۵٪ نگه‌دارنده خوبی برای کیست‌های ژیرادیا لامبلیا است در این مطالعه آن‌ها ۴ نگه‌دارنده مختلف را از لحاظ DNA استخراج شده با هم مقایسه کردند. نمونه‌های مثبت ژیرادیا که از طریق میکروسکوپ تشخیص داده شده بودند، در دیکرومات پتاسیم ۵٪، فرمالین ۴٪، اتانول مطلق و PBS نگه‌داری شدند و در بازه‌های زمانی مختلف از لحاظ کیفیت DNA یی که از آن‌ها استخراج شد با هم مقایسه گردیدند. از ژن 18S SSU-rRNA برای PCR استفاده شد. در نهایت این نتیجه به دست آمد که نگهداری کیست ژیرادیا در دیکرومات پتاسیم ۵٪ و ۴۰°C بهتر از سه نگه‌دارنده دیگر

بین ژنوتایپ B و نشانه‌های بیماری مشاهده شد. ۲۵٪ دارای عفونت مختلط بودند. با استفاده از تعیین توالی عفونت‌های مختلط A+F به اثبات رسید. این اولین بار بود که ژنوتایپ F که به گربه اختصاص دارد در انسان مشاهده شد (۹).

لئونارد^{۱۴} و همکاران در سال ۲۰۰۷ نمونه‌های مدفوع را از سنگ‌های خانگی جمع آوری کردند. از ۶۰ نمونه ژیاوردیا مثبت، در ۵۵ نمونه تکثیر ژن 18S rDNA به طور موفق انجام گرفت. ژنوتایپ A بیشترین شیوع را داشت بعد از آن عفونت مختلط ژنوتایپ‌های A و C بالا بود و ژنوتایپ‌های C و D به تنهایی کم‌ترین شیوع را داشتند (۱۰).

فلاح و همکاران در سال ۲۰۰۸ یک مطالعه در آذربایجان شرقی انجام دادند. در این مطالعه ۳۲۵ نمونه مدفوع مثبت بودند و از ژن TPI برای تعیین ژنوتایپ استفاده شد از میان نمونه‌ها به طور تصادفی از ۳۴ نمونه مدفوع استخراج DNA و PCR انجام گرفت که ۳۱ نمونه (۹۱/۱٪) مثبت و ۳ نمونه (۸/۸٪) منفی شدند. در نتیجه انجام RFLP ۱۳ نمونه (۴۱/۹٪) از ژنوتایپ B و ۱۷ نمونه (۵۴/۸٪) از ژنوتایپ A بودند در ضمن یکی از نمونه‌ها با هر دو ژنوتایپ آلوده بود. نتایج نشان داد که روش PCR یک روش مناسب و آسان برای تشخیص آلودگی مدفوع است. علاوه بر آن نشان داده شد که ژنوتایپ‌های A و B در استان آذربایجان شرقی آندمیک هستند (۱۱).

نهاوندی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تبریز مطالعه‌ای انجام دادند، در این مطالعه ۳۴ نمونه مدفوع مثبت از لحاظ ژیاوردیا لامبلیا جمع آوری شدند. روش PCR-RFLP برای شناسایی تنوع ژن‌های TPI و GDH به کار برده شد. در استفاده از ژن TPI در این مطالعه ۱۳ نمونه (۴۱/۹٪) از ژنوتایپ B، ۱۷ نمونه (۵۴/۸٪) از ژنوتایپ A و ۱ نمونه (۳/۲٪) از هر دو ژنوتایپ بودند و ۳ نمونه (۸/۸٪) منفی شده بود. اما در استفاده از ژن GDH فقط ۱۸ (۵۲/۹٪) نمونه

این اولین گزارش از تعیین ژنوتایپ در نمونه‌های گربه، سگ، گاو و میمون وحشی در ژاپن بود (۷).

بابایی در سال ۲۰۰۷ با استفاده از PCR-RFLP ژن گلوتامات دهیدروژناز به تعیین ژنوتایپ ایزوله‌های ژیاوردیا لامبلیا در تهران پرداخت. در این مطالعه ۳۸ نمونه مدفوع به طور تصادفی از ۱۲۵ بیمار ژیاوردیایی که از لحاظ میکروسکوپی مثبت بودند برای کار مولکولی انتخاب شدند. استخراج DNA با استفاده از روش فنول/کلروفرم/ایزوامیل الکل انجام گرفت. روش PCR-RFLP بر روی ژن GDH برای تشخیص ژنوتایپ‌های A و B به کار برده شد. در نتیجه از ۳۸ ایزوله، ۳۳ نمونه (۸۷٪) از ژنوتایپ AII و ۳ نمونه (۷/۸٪) از ژنوتایپ BIII و دو نمونه دارای هر دو ژنوتایپ بودند (۵).

در سال ۲۰۰۸ مینویلی^{۱۲} و همکاران به مطالعه تعیین ژنوتایپ ژیاوردیا لامبلیا در آرژانتین پرداختند. در این مطالعه ۶۰ نمونه انسانی (از کودکان و بزرگسالان)، ۸ نمونه مدفوع سگ و دو نمونه گاو جمع آوری شدند. پس از استخراج DNA از روش PCR-RFLP برای تعیین تنوع ژن تریوز فسفات ایزومراز استفاده شد. که در میان آن‌ها ۳ نمونه (۶/۹۸٪) از ژنوتایپ AII و ۴۰ نمونه (۹۳/۰۲٪) از ژنوتایپ B بودند. این ژنوتایپ همچنین در افراد با نشانه‌های بیماری مختلف مشاهده شد که بیشتر آن‌ها به اسهال مبتلا بودند. ژنوتایپ B در یک سگ مشاهده شد. نمونه‌های گاو هر دو از ژنوتایپ E بودند (۸).

جلانئو^{۱۳} و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی ژنتیکی ایزوله‌های ژیاوردیای انسانی در ایتوپی پرداختند. از قطعه ژن بتا ژیاوردین برای انجام PCR لانه‌ای استفاده کردند. از ۵۹ ایزوله به وسیله RFLP آزمایش شده بودند، ۵۲٪ از ژنوتایپ A و ۲۲٪ از ژنوتایپ B بودند. یک ارتباط قوی

1- Minvielle
13- Gelanew

14- Leonhard

خفیفی داشتند. این ژنوتایپ در حیوانات دیده نشد. شیوع ژنوتایپ B در کودکان و بالغین بسیار بالا بود. این ژنوتایپ همچنین در افراد با نشانه‌های بیماری مختلف مشاهده شد که بیشتر آن‌ها به اسهال مبتلا بودند. برخی منابع ژنوتایپ B را عامل اسهال معرفی کرده‌اند ولی در این مطالعه این ژنوتایپ مشاهده نشد و این مساله می‌تواند بدلیل تعداد کم نمونه‌های مورد بررسی و تعیین توالی شده باشد.

نتیجه‌گیری

از ۲۴ نمونه مثبت بصورت تصادفی ۳ نمونه شهری و ۲ نمونه روستایی تعیین توالی شدند و همه آنها از ژنوتایپ A بودند. این مطالعه نشان داد که ایزوله‌های شهر خرم‌آباد و روستاهای اطراف آن می‌توانند از لحاظ ژنوتایپی شبیه هم باشند اما جهت اظهار نظر قطعی مطالعات دیگری نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت‌های علمی و عملی، بیمارستان‌های تأمین اجتماعی، بیمارستان شهید مدنی و مراکز بهداشت روستایی برای همکاری در نمونه‌گیری بدینوسیله از آقایان دکتر مجید پیرستانی، و روح الله ولی پور نوروزی صمیمانه تشکر می‌نمایند.

مثبت بودند. که ۶ نمونه (۳۳/۳۳٪) از ژنوتایپ AII، ۸ نمونه (۴۴/۴۴٪) از ژنوتایپ BIII و ۴ نمونه (۲۲/۲۲٪) از ژنوتایپ BIV بودند (۱۲). تعیین ژنوتایپ تعداد زیادی از ایزوله‌های ژیا ردیا در مناطق مختلف جهان نشان داده‌اند که تقریباً انسان منحصراً با ژنوتایپ‌های A یا B آلوده می‌شوند. دیگر ژنوتایپ‌ها که به ندرت در انسان دیده شده‌اند شامل: C و D هستند که البته به مطالعات بیشتری برای اثبات نیاز است. همچنین گزارش شده است که ژنوتایپ A دارای سه زیر ژنوتایپ است شامل: AI، AII و AIII که AI در انسان و سگ، AII فقط در انسان و AIII فقط در حیوانات بجز انسان دیده می‌شود. ژنوتایپ B دارای دو زیر ژنوتایپ BIII و BIV است، که ژنوتایپ BIII بین انسان، سگ، بوزینه خرگوش و ... مشترک است در حالی که ژنوتایپ BIV فقط در انسان گزارش شده است (۱۳).

با توجه به مطالعات ذکر شده، در این تحقیق استخراج DNA با روش فنل / کلروفورم و کیت‌های بیونر^{۱۵} و کیاژن انجام شد که روش فنل / کلروفورم در مقایسه با کیت‌ها بهتر نتیجه داد و با توجه به اینکه در اغلب بررسی‌ها ژن GDH استفاده شده بود در این بررسی هم از این ژن استفاده گردید. در روش مولکولی باید دقت کرد چون احتمال منفی شدن نمونه بدلیل شستشوهای مکرر فیکساتیو بدلیل کم شدن انگل وجود دارد بنابراین توصیه می‌شود از نمونه تازه استفاده گردد. با توجه به مطالعات محققین ذکر شده گونه‌های انسانی از ژنوتایپ A و B می‌باشند ولی در مطالعه حاضر فقط ژنوتایپ A مشاهده شد و تفاوتی بین نمونه‌های شهری و روستایی مشاهده نگردید در حالیکه انتظار می‌رفت بدلیل تماس بیشتر روستاییان با حیوانات اهلی ژنوتایپ متفاوتی از نوع شهری مشاهده شود. در مطالعه مینویلی سه ایزوله‌ای ژنوتایپ AII از کودکان به دست آمده که این کودکان مدفوع اسهالی نداشتند و علائم

15 Cat.n: K-3036 AccuPrep Stool DNA
Extraction Kit

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره هفدهم / تابستان ۱۳۹۱

Reference

1. Guy RA, Xiao C, Paul A, Horgen A. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:3310-3317.
2. Caccio SM, Ryan U. Review, molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2007;160:62-75.
3. Wilke H, Robertson LJ. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis, *Journal of Microbiological Methods* 2009;78:292-295.
4. Molina N, Polverino D, Minvielle M, Basualdo J. PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. *Rev Latinoam Microbiol* 2007;49 :6-11.
5. Babaei Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Rezaie S, Razmjou E, Arabshahi SK and et al. Molecular characterization of the Iranian isolates of *Giardia lamblia*-application of the glutamate dehydrogenase gene. *Iranian Journal of Public Health* 2008;37:72-82.
6. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 2005;35:207-213.
7. T Itagaki, S Kinoshita, M Aoki, N Itoh, H Saeki, N Sato and et al. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamatedehydrogenase gene sequencing. *Veterinary Parasitology* 2005;133:283-287.
8. Minvielle MC, Nora BM, Daniela P, Juan AB. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, south America. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2008;103:98-103.
9. Gelanew T, Lalle M, Asrat H, Edoardo P, Simone M. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica* 2007;102:92-99.
10. Leonhard S, Pfister K, Beelitz P, Wielinga C, Thompson RCA. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Veterinary Parasitology* 2007; 150:33-38.
11. Fallah E, Nahavandi KH, Jamili R, Mahdavi B, Asgharzadeh M. Genetic characterization of giardia intestinalis strains from patient having sporadic Giardiasis by using PCR assay. *J Med Sci* 2008;8:310-315.
12. Nahavandi K, Fallah E, Asgharzadeh M, Mirsamadi N, Mahdavi B. Glutamate dehydrogenase and triose-phosphate-isomerase coding genes for detection and genetic characterization of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-RFLP. *Turk J Med Sci* 2011;41:283-289.
13. Simone M, Cacci O, Sprong H. *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental Parasitology* 2009; 124:107-111