

ارزیابی فراوانی زیرگونه‌های ژن‌های دی‌لامبلیا به روش PCR-RFLP در نمونه‌های مدفوع کودکان بستری شده در مرکز آموزش و درمانی مطهری شهر ارومیه

غلامرضا منافی^۱، خسرو حضرتی تپه*^۲، کامبیز دیبا^۳، حبیب محمدزاده^۴، محمد اصغرزاده^۵، شاه صنم غیبی^۶

تاریخ دریافت 1392/02/01 تاریخ پذیرش 1392/04/04

چکیده

پیش زمینه و هدف: ژن‌های دی‌لامبلیا یکی از شایع‌ترین پروتوزوهای تازکدار روده‌ای است که گروه وسیعی از میزبانان مهره‌دار را آلوده می‌کند. ژن‌های دی‌لامبلیا از معمول‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای در بچه‌هاست که باعث اختلالات شدید روده‌ای و تأخیر در رشد می‌شود. این مطالعه برای تعیین زیرگونه‌های ژن‌های دی‌لامبلیا به وسیله روش PCR-RFLP با استفاده از ناحیه گلوامات دهیدروژناز از کودکان بستری شده در بیمارستان مطهری ارومیه، آذربایجان غربی در ایران انجام گرفت. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، ۳۴ نمونه مدفوع از کودکان بستری شده در بیمارستان مطهری ارومیه که با استفاده از میکروسکوپ نوری دارای کیست‌های ژن‌های دی‌لامبلیا بودند جمع‌آوری شد. کیست‌ها به طور نسبی به وسیله روش گرادیان سوکروز تغلیظ و سپس جهت حذف موثر مهارکننده‌های PCR، به وسیله آب مقطر استریل شستشو داده شد. DNA ژنومیک انگل ژن‌های دی‌لامبلیا به وسیله سیکل‌های انجماد و ذوب کردن و سپس روش فنل کلروفرم استخراج شد. برای تمایز زیرگونه‌های A، B که در انسان‌ها یافت می‌شود یک آزمایش PCR-RFLP تک مرحله‌ای انجام گرفت. در این روش یک قطعه‌ای به اندازه 432 bp مورد انتظار بود، تکثیر یافت و سپس برای تعیین زیرگونه‌های انگل، از آنزیم‌های محدود کننده اختصاصی BspL1، RsaI استفاده شد. **یافته‌ها:** از ۷۲۰ نمونه بررسی شده میکروسکوپی، به طور کلی ۳۴ نمونه از نظر وجود کیست ژن‌های دی‌لامبلیا مثبت بودند که میزان شیوع انگل ۴/۷۲ درصد گزارش شد. آزمایش PCR-RFLP بر روی این نمونه‌ها آشکار کرد که ۲۸ نمونه (۹۳/۳٪) دارای ژنوتایپ BIII و دو نمونه (۶/۷٪) متعلق به زیر گروه BIV می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** PCR-RFLP یک روش قوی و قابل اعتمادی است که ما را در تعیین موثر ژنوتایپ در بین زیرگونه‌های ژن‌های دی‌لامبلیا با استفاده از ژن ناحیه گلوامات دهیدروژناز میسر ساخته و شناسایی وجود ژنوتایپ‌های مخلوط را ممکن می‌سازد. بر اساس نتایج یک منشأ حیوانی از عفونت پیشنهاد می‌شود. **کلمات کلیدی:** ژن‌های دی‌لامبلیا، گلوامات دهیدروژناز، ارومیه، ایران، آذربایجان غربی، PCR-RFLP

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره ششم، ص ۴۲۲-۴۱۴، شهریور ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۳۳۱۳۴

Email: hazrati_tappeh@yahoo.co.nz

مقدمه

بالینی بیماری متغیر بوده و از یک اسهال مزمن، کاهش وزن و سوء تغذیه شروع شده و در بیشتر موارد بدون علائم می‌باشد. ژن‌های دی‌لامبلیا بر اساس خصوصیات ژنتیکی بر اساس ژن‌های ناحیه گلوامات دهیدروژناز و ناحیه تریوز فسفات ایزومراز به ۷ گروه (A-G) تقسیم می‌شود.

ژن‌های دی‌لامبلیا، یک عفونت رایج انگلی روده‌ای می‌باشد که به وسیله ژن‌های دی‌لامبلیا ایجاد می‌شود که هم در کشورهای توسعه یافته و هم در حال توسعه به عنوان یک بیماری فراموش شده مورد توجه قرار گرفته شده است (۱). شیوع ژن‌های دی‌لامبلیا در همه گروه‌های سنی به خصوص کودکان بیشتر دیده شده است. علائم

^۱ کارشناس ارشد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۲ استاد مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۴ استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۵ استاد گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۶ دانشیار گروه کودکان، مرکز تحقیقات چاقی مادر و کودک، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

PCR

تکثیر ژن‌های ناحیه گلوتامات دهیدروژناز بر اساس روش PCR انجام گرفت. در این روش یک قطعه‌ای به طول 432bp با استفاده از پرایمرهای GDHiF (5 CAGTAC AAC TCY GCT CTC GG) و GDHiR (3 GTT RTC CTT GCA CAT CTC C) انجام گرفت (۱۶). محتویات واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتری انجام گرفته که شامل ۱۰ نانوگرم از DNA الگو، بافر 1X که شامل 1.5 mM MgCl₂ (سیناژن-ایران)، ۱۰۰ میکرومول از d NTP mix (Lithuania, Fermentas)، ۰.۵ میکرومول از هرکدام از پرایمرها (سیناژن-ایران)، 2U از آنزیم Taq DNA پلی مراز (سیناژن، ایران) می‌باشد. برنامه دستگاه ترمال سایکلر (Bioer) بدین صورت می‌باشد که یک مرحله شروع دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۹ دقیقه می‌باشد که به دنبال ۵۰ سیکل، به ترتیب ۳۵ ثانیه در ۹۴ درجه (واسرشت) و ۳۵ ثانیه در ۶۱ درجه (مرحله اتصال) و ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه (مرحله طولانی شدن)، با یک مرحله طولانی شدن به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام می‌شود (۱۶). یک نمونه مثبت به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی بکار برده شد.

RFLP

آنالیز RFLP به وسیله هضم ۸ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۵ واحد از آنزیم محدود ساز-هضمی Rsa1 (Lithuania, Fermentas) یا ۱۰ واحد از آنزیم BspL1 (Lithuania, Fermentas) در ۲ میکرولیتر از بافر آنزیم 10x در یک حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه انجام شد. آنزیم هضمی Rsa1 برای تشخیص ژنوتایپ BIII، BIV، و آنزیم BspL1 برای شناسایی ژنوتایپ AI، AII بکار برده شد (۱۶).

شناسایی قطعات PCR و مرحله RFLP

قطعات حاصل از PCR و RFLP به وسیله الکتروفورز افقی به ترتیب در ژل‌های ۵، ۱۰ درصد و ۲ درصد جداسازی و سپس به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و توسط دستگاه ژل داک باندها، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج**بررسی میکروسکوپی:**

در نهایت از مجموع ۷۲۰ ایزوله مدفوع انسانی، ۳۴ نمونه از نظر کیست ژیا ردیا، پس از دید مستقیم میکروسکوپی به دنبال رنگ آمیزی لوگول و تغلیظ رسوبی، مثبت شدند.

مرحله استخراج DNA

بیشترین گروه‌های جدا شده از انسان‌ها متعلق به گروه‌های AI، AII، BIII، BIV می‌باشند. سایر گروه‌های ژنتیکی D، C، E، F، G دارای میزبان‌های اختصاصی بوده و محدود به چارپایان می‌باشند (۵-۲). هرچند همه ژیا ردیاهای جدا شده از انسان‌ها متعلق به گروه‌های A، B می‌باشند، این گروه‌ها همچنین در حیوانات اهلی و وحشی، سگ، گربه و گاو هم دیده شده است (۶). بعضی محققان معتقدند که ژیا ردیا لامبلیا به عنوان یک عامل خطر زئونوز منتقله از گاو (۷)، سگ (۸-۱۰)، موش‌های وحشی، گوزن شمالی (۱۱)، حیوانات وحشی و اهلی (۱۲) است. بنابراین شناسایی مخازن عفونت با تعیین ژنوتایپ انگل موثر بوده که PCR-RFLP با استفاده از ژن‌های ناحیه گلوتامات دهیدروژناز یک روش مفید برای شناسایی گروه و زیرگروه‌های انگل می‌باشد (۱۳، ۳). ایران یکی از مکان‌های آندمیک بیماری بوده شیوع آن ۱۰/۹ درصد گزارش شده است (۱۴). در آذربایجان غربی میزان شیوع عفونت ۱۰/۳ درصد گزارش شده است (۱۵). با توجه به اینکه الگوی انتشار عوامل عفونت در سراسر ایران متنوع است، ضمناً مطالعات بیشتری در مورد انگل ژیا ردیا لامبلیا در این منطقه که برای شناسایی مخازن عفونت و ارائه راهکارهایی برای جلوگیری و کنترل بیماری مهم و ضروری می‌باشد انجام نگرفته است، بنابراین یکی از اهداف اصلی این مطالعه، تعیین ژنوتایپ‌های انگل ژیا ردیا لامبلیا و شناسایی مخازن انگل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها: نمونه‌ها در طی مدت ۹۱-۱۳۹۰ به مدت ۱۵ ماه از بین کودکان مبتلا به گاستروانتریت که در بخش گوارش بیمارستان مطهری بستری شده و از نظر کیست ژیا ردیا مثبت بودند انتخاب و نمونه مدفوع آن‌ها به بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی ارومیه منتقل شده و از نظر میکروسکوپی با سرم فیزیولوژی و لوگول بررسی مجدد انجام گرفته و بلافاصله به روش ساکاروز (۱۶)، نمونه‌ها تغلیظ شده و سپس در دمای منهای 20 درجه سانتی‌گراد جهت مراحل بعدی استخراج DNA و PCR ذخیره شد.

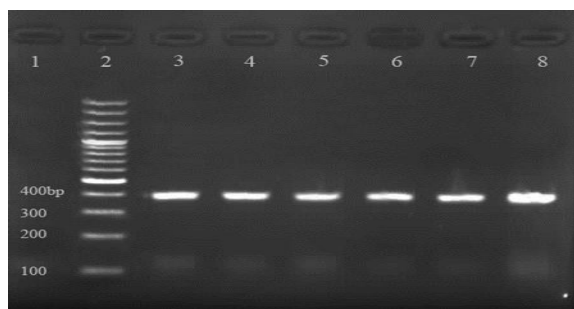
این کار تا زمانی که تعداد نمونه‌ها به ۳۴ مورد مثبت رسید ادامه یافت و در طی این مدت ۷۲۰ نمونه مشکوک مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA

جداسازی DNA انگل بر اساس انجماد و ذوب کردن (۱۶) و به دنبال آن با فنل کلورفرم (۱۶) صورت گرفت. در ادامه به اندازه ۱/۱۰ حجم، استات سدیم ۳ مولار و هم حجم آن، ۲-پروپانول اضافه کرده تا DNA انگل در ته میکروتیوب رسوب یابد. سپس رسوب به وسیله الکل ۷۰ درجه شستشو داده و در مرحله آخر DNA خالص شده در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ذخیره شد (۱۶).

عمل PCR با استفاده از ژن‌های ناحیه گلوتامات دهیدروژناز بر روی ۳۴ نمونه انجام گرفت. اما به خاطر استفاده از روش انجماد و ذوب کردن (۱۰ مرتبه) در مرحله اول و سپس استفاده از روش فنل-کلروفورم و glass beads، ۳۰ نمونه (۸۸.۲٪) با استفاده از پرایمرهای GDHiF، GDHiR تکثیر یافت.

با استفاده از روش ذوب و انجماد و سپس روش فنل کلروفورم، DNA انگل جدا گردید بطوریکه نتایج بدست آمده از این مرحله پس از PCR، نمونه‌های کیست مثبت انسانی باند خوبی ایجاد کردند. مرحله PCR و تکثیر ژن گلوتامات دهیدروژناز:



شکل ۱-۱ تصویر آگاروز الکتروفوریزس از محصولات PCR نمونه‌های استخراج شده متعلق به موارد ژن‌یازیس. چنانچه ملاحظه می‌شود ستون‌های ۴-۸ متعلق به محصولات PCR از تکثیر DNA ناحیه گلوتامات دهیدروژناز ژن‌یازیس لامبلیا از نمونه‌های کلینیکی، ستون ۱ مربوط به کنترل منفی، ستون ۳ مربوط به کنترل مثبت و ستون ۲ مربوط به سایز مارکر 100bp می‌باشد.

مرحله RFLP:

آزمایش RFLP بر روی ۳۰ نمونه با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده BspLI، RsaI انجام گرفت که نتایج آن بر حسب سن و جنسیت در جدول (۱-۱) نشان داده شده است.

جدول شماره (۱-۱): نتایج RFLP بر حسب سن و جنس

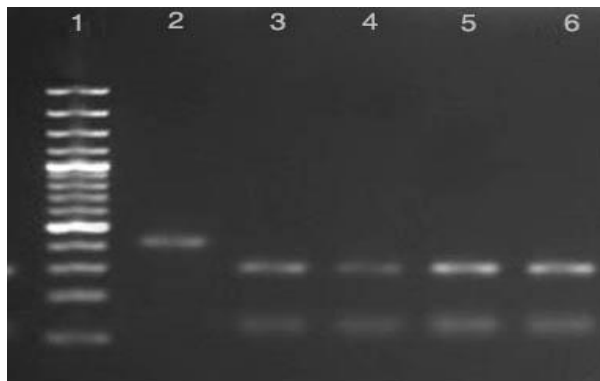
| code | sex | age | RFLP | Subspecies | code | sex | age | RFLP | Subspecies |
|------|-----|-----|---------|------------|------|-----|-----|----------|------------|
| 1 | M | 13 | 120,290 | BIII | 16 | M | 5 | 290, 120 | BIII |
| 2 | F | 4.5 | 120,290 | BIII | 17 | F | 4.5 | 120,290 | BIII |
| 3 | M | 7 | 120,290 | BIII | 18 | F | 5.5 | 120,290 | BIII |
| 4 | M | 11 | 120,290 | BIII | 19 | M | 4 | 120,290 | BIII |
| 5 | F | 3.5 | 120,290 | BIII | 20 | M | 9 | 120,290 | BIII |
| 6 | F | 7 | 120,290 | BIII | 21 | M | 4.5 | 120,290 | BIII |
| 7 | M | 4.5 | 120,290 | BIII | 22 | F | 12 | 120,290 | BIII |
| 8 | F | 7 | 120,290 | BIII | 23 | F | 5 | 120,290 | BIII |
| 9 | F | 6 | 120,290 | BIII | 24 | M | 7 | 120,290 | BIII |
| 10 | M | 4.5 | 430 | BIV | 25 | M | 4.5 | 120,290 | BIII |
| 11 | M | 5.5 | 120,290 | BIII | 26 | F | 6 | 120,290 | BIII |
| 12 | M | 4.5 | 120,290 | BIII | 27 | F | 7.5 | 430 | BIV |
| 13 | M | 6 | 120,290 | BIII | 28 | M | 4.5 | 120,290 | BIII |
| 14 | M | 4.5 | 120,290 | BIII | 29 | M | 5 | 120,290 | BIII |
| 15 | F | 5.5 | 120,290 | BIII | 30 | M | 4 | 120,290 | BIII |

لازم به یادآوری است که الگوی برش آنزیم‌ها در جدول (۱-۲) نشان داده شده است.

جدول شماره (۲-۱): الگوی برش آنزیم RsaI, BspLI

| Assamblage | Enzyme | Predict fragment sizes | Diagnostic genotyping profile |
|------------|--------|------------------------|-------------------------------|
| AI | BspLI | 16,18,39,87,123,149 | 87,123,149 |
| AII | BspLI | 16,18,39,72,77,87,123 | 72,77,87,123 |
| BIII | BspLI | 47,120,290 | 120,290 |
| BIV | BspLI | 47,120,290 | 120,290 |
| BIII | RsaI | 2,130,300 | 130,300 |
| BIV | RsaI | 2,430 | 430 |

مطابق با نتایج ۲۸ نمونه (۹۳٫۳٪) اسمبلاژ BIII و دو نمونه (۶٫۷٪) متعلق به اسمبلاژ BIV می‌باشد. در این بررسی اسمبلاژ AII که محدود به انسان می‌باشد شناسایی نگردید.



تصویر آگاروز الکتروفورزیس از محصولات هضم به وسیله آنزیم محدودساز:

ستون ۲، ژیلار دیا لامبلیا زیرگونه BIV و ستون ۳ ژیلار دیا لامبلیا زیرگونه BIII (اثر آنزیم محدود محدود ساز RsaI)، ستون ۴-۷ ژیلار دیا لامبلیا زیرگونه B (اثر آنزیم محدود ساز BspLI)

بررسی ریسک فاکتورها:

در این مطالعه، ارتباط انگل با سن، جنس مورد بررسی قرار گرفت که نتایج بدست آمده در جدول (۲-۱) نشان داده شده است.

جدول شماره (۲-۱): ارتباط انگل با سن و جنسیت افراد

| | Study group (no. examined) | No. infected | P. valu |
|-----------|----------------------------|--------------|---------|
| Sex | Mail (۳۷۴) (%۵۱/۹۴) | ۱۹ (%۵/۰۸) | ۰/۵۸۰ |
| | Fmale (۳۴۹) (%۴۸/۰۶) | ۱۵ (%۴/۲۹) | |
| Age group | <۱(۳۲) | ۰ (%۰) | ۰/۰۰۱ |
| | ۱-۳(۳۸) | ۱ (%۲/۶) | |
| | >۳-۵(۲۱۵) | ۱۷ (%۷/۹) | |
| | >۵-۸(۱۸۵) | ۱۱ (%۵/۹) | |
| | >۸-۱۱(۱۲۱) | ۲ (%۱/۶) | |
| | >۱۱-۱۴(۱۲۹) | ۳ (%۲/۳) | |
| Total | (۷۲۰) | ۳۴ (%۴/۷۲) | |

DNA انگل استخراج شد (استخراج DNA قبل از انجماد و ذوب ۱۴ نمونه و بعد از انجماد و ذوب ۳۰ نمونه بود). نتایج منفی مشاهده شده به واسطه تعداد خیلی کم انگل در نمونه‌ها و نیز مقدار کم بعضی نمونه‌ها قابل توجه است (۱۸). لازم به یادآوری است با توجه به اینکه نمونه برداری از کودکان و اطفال بستری شده در بیمارستان انجام شده، به علت سن کم بیماران، درمان و نیز ترخیص از بیمارستان، امکان گرفتن نمونه به دفعات و مقدار کافی در بعضی از افراد گروه مورد مطالعه ممکن نبود.

طبق نتایج حاصله از PCR-RFLP با استفاده از ژن‌های ناحیه گلوتامات دهیدروژناز، زیرگونه غالب این ناحیه BIII بوده و عدم شناسایی زیرگونه AII که محدود به انسان است نشان داده است که ذخایر این انگل حیوانات می‌باشد. با توجه به شیوع زیرگونه BIII در چارپایان اهلی (گاوهای شیرده، گوساله‌ها، بره‌ها و...) و رواج دامداری در این منطقه، احتمال چرخه زئونوتیک انتقال ژن‌های لامبلیا در منطقه وجود دارد. طی مطالعات انجام شده بر روی دام‌های اطراف ارومیه به خصوص گوساله در سال ۱۳۸۵ توسط دلیر ننده که میزان شیوع ژن‌های BIII را ۱۱/۸ درصد گزارش داده (۱۹)، این احتمال می‌رود که گوساله‌ها یکی از منابع عمده عفونت به حساب می‌آیند.

نتایج بدست آمده مطابقت زیادی با مطالعه‌ای که در هند در سال ۲۰۰۳ توسط Sulaiman و همکارانش انجام گرفته دارد که در این مطالعه ۱۰۰ درصد زیر گونه B مشاهده گردید (۲۰). در مطالعه دیگر که در انگلستان بر روی ۳۵ نمونه کلینیکی انجام گرفت، AII (۲۷٪) و B (۶۴٪) گزارش شده است. (۲۱)، که دلیل بر کثرت زیرگونه B می‌باشد. در دیگر مطالعه انجام گرفته در آذربایجان شرقی توسط دکتر فلاح و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر روی ۳۴ نمونه نشان دادند که زیرگونه غالب B (۶۷٪) و AII (۳۳٪) بوده که هم انسان‌ها و هم حیوانات به عنوان مخزن انگل می‌باشند (۱۶). در مطالعه‌ای توسط Boontanon و همکارانش در تایلند در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۱ نمونه نشان داد که زیرگونه غالب در منطقه بررسی (60%) BIV بوده و زیرگونه‌های دیگر (30%) AI، (10%) BIII می‌باشد که نتایج حاکی از آن است که حیوانات به عنوان مخزن انگل می‌باشند (۲۲). بر خلاف نتایج بدست آمده، در مطالعه‌ای که در برزیل در سال ۲۰۰۷ انجام گرفته، زیرگونه غالب AII بوده که مخزن عمده عفونت انسان‌ها می‌باشند و حیوانات نقش فرعی در انتقال و مخزن عفونت دارند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر توسط زهرا بابایی در تهران در سال ۲۰۰۸ بر روی ۳۸ نمونه، زیرگونه غالب منطقه (87%) AII و به نسبت کمتر (7.8%) BIII بوده که بیانگر این نکته است که انسان‌ها

نتایج نشان می‌دهد که بین آلودگی انگلی با جنس رابطه معنی‌داری وجود ندارد. اما بین شیوع انگل و سن رابطه معنی‌داری وجود داشته و در بین گروه‌های سنی مطالعه شده در گروه ۳-۵ ساله، انگل شیوع بیشتری دارد. با توجه به شیوع زیرگونه BIII در منطقه مورد مطالعه ارتباطی بین زیرگونه‌ها و جنس دیده نشد. ارتباط بین انگل و گروه‌های سنی که قبلاً بیان شد به قوت خود باقی است. لازم به یادآوری است با توجه به اینکه نمونه برداری از بخش گوارش و افرادی که دارای علائم گوارشی بودند، انجام گرفته، ارتباط معنی‌داری بین نوع زیرگونه و علت بستری دیده نشد.

بحث

ژن‌های لامبلیا یکی از مهم‌ترین انگل روده‌ای انسان بوده که در سرتاسر دنیا انتشار دارد و با توجه به اینکه ارومیه در ایران یکی از کانون‌های اندمیک بیماری بوده و عفونت ژن‌های BIII در میان انسان‌ها به خصوص در افراد کمتر از ۱۴ سال، شایع می‌باشد مطالعات اپیدمیولوژیک گسترده‌ای در این زمینه انجام شده است طوری که در سال‌های ۱۳۸۷ توسط دکتر حضرتی و همکارانش، شیوع ژن‌های BIII در منطقه ارومیه در میان دانش‌آموزان ابتدایی ۱۰/۳ درصد گزارش شده است (۱۵) اما در این مطالعه میزان شیوع ژن‌های BIII در بین نمونه‌های بررسی شده ۴/۷۲ درصد گزارش شد که این مطلب حاکی از آن است که میزان آگاهی مردم نسبت به بهداشت عمومی، رعایت بهداشت فردی، امکانات استفاده از آب سالم و بهداشتی و استفاده از امکانات بهداشتی روبه افزایش بوده و تأثیر مثبتی در کاهش میزان شیوع عفونت ژن‌های BIII داشته است.

PCR-RFLP یک روش آنالیتیک قوی و حساس برای تعیین ژنوتایپ انگل می‌باشد. در این روش، استفاده مستقیم از نمونه مدفوع به خاطر وجود لیپید، هموگلوبین، املاح صفراوی و پلی ساکاریدها باعث مهار PCR می‌شود و با توجه به مشکلات کشت انگل، که اولاً نیاز به زمان زیادی دارد و ثانیاً آلودگی‌های متعدد محیط کشت، استفاده از یک روشی به نام روش تغلیظ ساکاروز که هم مواد مهار کننده و باکتری‌هایی که در مدفوع وجود دارد را کاهش داده و امکان استفاده مستقیم از نمونه مدفوع بدون کشت انگل را ممکن می‌سازد (۱۷).

کیست انگل ژن‌های دیواره ضخیم و محکمی دارد که برای آزاد کردن DNA انگل، استفاده از روش انجماد و ذوب کردن باعث پاره شدن دیواره انگل شده که کمک زیادی در مراحل بعدی استخراج DNA انگل کرد (۱۶). استفاده از glass beads، در تخریب باقی مانده دیواره انگل کمک کرده و با استفاده از روش فنل کلروفرور

۳- زیرگونه B ژیا ردیا لامبلیا در استان آذربایجان غربی وجود دارد که بیوتایپ غالب در منطقه BIII می باشد.

۴- در ژیا ردیا دنودنالیس، زیرگونه BIII، به طور طبیعی در چارپایان اهلی بوده و با توجه به شیوع بالای عفونت ژیا ردیا در دامها احتمال وجود چرخه زئونوتیک انتقال ژیا ردیا دنودنالیس در منطقه وجود دارد.

۵- ارتباط منطقی بین زیرگونهها با سن افراد و علت بستری دیده نشد.

باتوجه به اینکه در ارومیه و اطراف آن دامداری و دامپروری رواج زیادی دارد و ضمن توجه به نتایج مولکولی بدست آمده که زیرگونه غالب انگل در منطقه BIII بوده که اغلب در چارپایان اهلی و انسان شیوع بیشتری دارد و با توجه به مطالعه انجام گرفته توسط دلیر نقده و همکارانش در سالهای ۸۶-۱۳۸۵ بر روی گوسالهها که میزان آلودگی را تقریباً ۱۲ درصد گزارش داد، به احتمال زیاد این فرضیه مطرح است که گوسالهها منبع عفونت در این منطقه می باشد که برای اثبات این نظریه، یک مطالعه اپیدمیولوژیک مولکولی بر روی دامها و چارپایان اهلی به خصوص گوسالههای آلوده به ژیا ردیا پیشنهاد می شود، که برای فهمیدن اپیدمیولوژی عفونت و روشهای کنترل بیماری و چرخه انتقال بیماری از حیوان به انسان و شناسایی مخازن مهم می باشد.

ثانیاً برای قطعیت بخشیدن به عدم تنوع ژنتیکی انگل در این منطقه، پیشنهاد می شود که یک مطالعه مولکولی دیگر بر روی افراد بالاتر از ۱۴ سال انجام شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه کارمندان بیمارستان مطهری ارومیه به خصوص از خانم هاشمی و از همکار گرامی، خانم شیوا حسین زاده که در تهیه نمونه برای کار پژوهشی زحمات زیادی را متحمل شده اند، و از مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی ارومیه که در فراهم ساختن محیط کاری و آزمایشگاه، مساعدت صمیمانه ای را داشته اند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

این مقاله استخراج شده از پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، دانشجو غلامرضا منافی می باشد.

مخازن عمده عفونت می باشند (۱۷). لازم به یادآوری است که در این سری از مطالعات کثرت ژنوتایپ A به وضوح دیده می شود.

با توجه به مطالعات انجام گرفته در مناطق مختلف جهان، تفاوت در شیوع اسمبلاژ A، B می تواند با جمعیت های مورد مطالعه در نواحی مختلف جغرافیایی مرتبط باشد.

با توجه به تفاوت بین ژنوتایپ های زیرگونه A و B در پاتوژنیسیته (۱۳) و وضعیت زئونوتیک آنها (۲۴)، این مطالعه برای اولین بار اطلاعاتی درباره انتشار ژنتیکی ژیا ردیا دنودنالیس از موارد انسانی مبتلا در ارومیه و ایران فراهم می نماید. در این مطالعه، مطابق با نتایج بدست آمده بین ابتلا انگل و جنس رابطه معنی داری وجود ندارد (P=0.580).

طبق نتایج حاصله از PCR-RFLP در این منطقه، که اکثراً BIII می باشند ارتباطی بین زیرگونهها و جنسیت و سن دیده نشد (مطابق جداول ۱-۲). مطابق با آزمون Chi square test بین ابتلا انگل و گروه های سنی ارتباط معنی داری وجود دارد (P=0.001) که میزان شیوع انگل در بین گروه سنی ۳-۵ سالهها دیده می شود.

با توجه به نبودن نمونه مثبت در افراد کمتر از ۱ سال، به نظر می رسد که این افراد تماس مستقیمی با انگل نداشته و ضمناً به علت وجود یک نوع آنزیم بنام لیپاز غیر معمولی در شیر مادر، که در از بین بردن انگل ژیا ردیا موثر می باشد، از آلودگی این افراد به این انگل جلوگیری می کند. لازم به یادآوری است با توجه به اینکه نمونه برداری از بخش گوارش و افرادی که دارای علائم گوارشی بودند، انجام گرفته، بنابراین بررسی بین وجود انگل و نوع زیرگونه با علت بستری به خودی خود منتفی است.

باتوجه به نتایج بدست آمده و بحث انجام گرفته می توان نتیجه گیری نمود:

- ۱- روش فنل کلروفورم با استفاده از انجماد ذوب کردن و استفاده از گلوله های شیشه ای بهترین و ارزان ترین روش استخراج DNA از کیست های ژیا ردیا لامبلیا می باشد
- ۲- ایزوله های ژیا ردیا دنودنالیس مشابه از نظر مورفولوژیکی، از نظر ژنومی متنوع هستند.

References:

1. Savioli L, Smith H, Thompson A. Giardia and Cryptosporidium join the "Neglected Diseases Initiative". Trends Parasitol 2006; 22: 203-8.
2. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey P. Genetic diversity with in the Morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. Infect Genet Evol 2003, 3: 29-38.

3. Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 125-30.
4. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes *lamblia* in human feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 5940-44.
5. Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *In J Parasitol* 2005; 5: 1181-90.
6. Itagaki T, Kinoshita S, Aoki M, Itoh N, Saeki H, Sato N, et al. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet Parasitol* 2005; 133(4): 283-7.
7. O'Handley RM, Olson ME, Fraser D, Adams P, Thompson RC. Prevalence And genotypic characterization of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet Parasitol* 2000; 90: 193-200.
8. Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. Genotype of *Giardia Intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Res* 2005; 97(1): 1-6.
9. Leonhard S, Pfister K, Beelitz P, Wielinga C, Thompson RC. The molecular characterization of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet Parasitol* 2007; 150(1-2): 33-8.
10. Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. Epidemiological and molecular evidence support the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs, 149 living in the same community. *Parasitology* 2004; 128(Pt 3): 253-62.
11. Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Hamnes IS, Gjerde B. *Giardiaduodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. *J Wildl Dis* 2007; 43(4): 576-85.
12. Van Keulen H, Macechko PT, Wade S, Schaaf S, Wallis PM, Erlandsen SL. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggest a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol* 2002; 108: 97-107.
13. Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhea. *Int. J Parasitol* 2002; 32 (2): 229-31.
14. Sayyari AA, Imanzadeh F, Bagheri Yazdi SA, Karami H, Yaghoobi M. Prevalence of intestinal parasitic infections in the Islamic Republic of Iran. *East. Mediterr Health J* 2005; 11(3): 377-8.
15. Hazrati Tappeh Kh, Mohammadzadeh H, Khashaveh Sh, Rezapour B. prevalence of intestinal parasitic infections among primary school attending students in Nazloo-Chay rural region of Urmia, West Azarbaijan province, Iran in 2008. *Urmia J Med Sci* 2008; 4(16).
16. Fallah E, Nahavandi KH, Jamali R, Poor BM, Asgharzadeh M. Molecular Identification of *Giardia duodenalis* Isolates from Human and Animal Reservoirs by PCR-RFLP. *J Biological Sci* 2008; 8(5): 896-901.
17. Babaei Z, Oormazdi H, Akhlaghi A, Rezaie S, Razmjou E, Soltani- Arabshahi SK, et al. Molecular characterization of the Iranian isolates of *Giardia lamblia*: application of the glutamate dehydrogenase gene. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(2): 75-82.
18. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005 ;43(12): 5940-44.

19. Dalir-Naghadeh B, Tavassoli M, Hatefinia AZ. Study of epidemiologic measures of association between *Giardia* sp. infection with occurrence of diarrhea in calves. *J. vet. Res* 2008; 62(6): 363-6.
20. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 2003, 9(11): 1444-52.
21. Amar CF, Dear PH, Pedraza - Diaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *Clin Microbiol J* 2002;40 (2): 446-52.
22. Boontanom P, Mungthin M, Tan-ariya P, Naaglor T, Leelayoova L. Epidemiology of giardiasis and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* in preschool children of a rural community, central Thailand. *Tropical Biomedicine* 2011; 28(1): 32-9.
23. Souza SLP, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HFJ, Funada MR, Cortez A, et al. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol* 2007, 149(3-4): 258-64.
24. Thomson RCA, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today* 2000, 16 (5): 210-3.

EVALUATION OF FREQUENCY OF GIARDIA LAMBLIA SUB SPECIES BY PCR-RFLP IN HOSPITALIZED CHILDREN'S STOOL SPECIMENS IN URMIA MUTAHHARI HOSPITAL

Gholamreza Manafi¹, Khosro Hazrati tappeh², Kambiz Diba³, Habib Mohammadzadeh⁴, Mohammad Asgharzadeh⁵, Shahsanam Gheibi⁶

Received: 21 Apr, 2013; Accepted: 25 Jun, 2013

Abstract

Background & Aims: Giardia lamblia is one of the most prevalent intestinal flagellate protozoan that infects a wide range of vertebrate hosts. Giardia is one of the most common intestinal pathogens in children causing severe intestinal disorder and growth retardation. This study was performed to determine subspecies of *Giardia lamblia* by the PCR-RFLP method, targeting the glutamate dehydrogenase (gdh) locus, in hospitalized children at the Urmia Mutahhari hospital, West Azarbaijan Province, Iran

Methods: In this study, thirty four stool specimen were collected from the hospitalized children in Urmia Motahhari hospital and giardia cysts were detected using microscopy. Cysts were partially purified by the sucrose density gradient method and then washed with sterile distilled water to effectively remove the PCR inhibitors. Genomic DNA of *G.lamblia* isolates was extracted by freeze-thaw cycles followed by phenol/ chloroform/isoamyl alcohol method. A single step PCR-RFLP assay was used to differentiate the assemblages A and B which been found in humans. In this method, 432 bp expected size were amplified and then for detection sub species were used of specific restriction RsaI and BspLI enzymes.

Findings: From 720 examined samples, totally 34 samples were positive in term of giardia cyst so the parasite spread rate was reported 4.72%. Analysis of PCR-RFLP on these samples revealed that 28 samples (93.3%) had the genotype BIII and two samples (6.7%) belonged to the subgroup BIV.

Conclusions: PCR-RFLP is a rapid and reliable method that enables us to effective genotype discrimination within Giardia assemblages using glutamate dehydrogenase gene, and makes it possible to identify the presence of mixed genotypes. In the base results, an animal source of infection is suggested.

Keywords: Giardia, Glutamate dehydrogenase, PCR-RFLP

Address: Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
Tel: +9143433134

Email: hazrati_tappeh@yahoo.co.nz

SOURCE: URMIA MED J 2013; 24(6): 422 ISSN: 1027-3727

¹ MS of Medical Parasitology, Urmia University of Medical Sciences,

² Professor of Cellular and Molecular Research center, Urmia, University of Medical Sciences (Corresponding Author)

Associate Professor of Medical Mycology, Urmia, University of Medical Sciences

⁴ Assistant Professor of Medical Parasitology, Urmia, University of Medical Sciences

⁵ Professor of Paramedical Faculty, Tabriz, University of Medical Sciences

⁶ Associate Professor of Pediatrics Gastroenterology, Head of Maternal and Childhood Obesity Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, I.R. Iran