Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017

مقاله پژوهشی

ارزیابی فراوانی زیرگونه‌های ژیاردیالامبلیا 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: ژیاردیا لامبلیا یکی از شایع‌ترین پروتوزواهای تاژکدار روده‌ای است که گروه وسیعی از میزبانان مهره‌دار را آلوده می‌کند. ژیاردیا یکی از معمول‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای در بچه‌هاست که باعث اختلالات شدید روده‌ای و تأخیر در رشد می‌شود.این مطالعه برای تعیین زیرگونه‌های ژیاردیالامبلیا به وسیله روش PCR-RFLP با استفاده از ناحیه گلوتامات 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 ژیاردیا بودند جمع‌آوری شد. کیست‌ها به طور نسبی به وسیله روش گرادیان سوکروز تغلیظ و سپس جهت حذف موثر مهار کننده‌های PCR، به وسیله آب مقطر استریل شستشو داده شد. DNA ژنومیک انگل ژیاردیا 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 bp 432 مورد انتظار بود، تکثیر یافت و سپس برای تعیین زیرگروه‌های انگل، از آنزیم‌های محدود کننده اختصاصی RsaI، BspL1 استفاده شد.

یافته‌ها: از ۷۲۰ نمونه بررسی شده میکروسکوپی، به طور کلی ۳۴ نمونه از نظر وجود کیست ژیاردیا مثبت بودند که میزان شیوع انگل ۴/۷۲درصد 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.

نتیجه گیری: PCR-RFLP یک روش قوی و قابل اعتمادی است که ما را در تعیین موثر ژنوتایپ در بین زیرگونه‌های ژیاردیا با استفاده از ژن ناحیه گلوتامات دهیدروژناز میسر ساخته و شناسایی وجود ژنوتایپ‌های مخلوط را ممکن می‌سازد. بر اساس نتایج یک منشأ حیوانی از عفونت پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: ژیاردیا لامبلیا، گلوتامات 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

ژیاردیوزیس، یک عفونت رایج انگلی روده‌ای می‌باشد که به وسیله ژیاردیا لامبلیا ایجاد می‌شود که هم در کشورهای توسعه یافته و هم در حال توسعه به عنوان یک بیماری فراموش شده مورد توجه قرارگرفته شده است(۱). شیوع ژیاردیا لامبلیا در همه گروه‌های سنی به خصوص کودکان بیشتر دیده شده است. علایم بالینی بیماری متغیر بوده و از یک اسهال مزمن، کاهش وزن و سوء تغذیه شروع شده و در بیشتر موارد بدون علایم می‌باشد. ژیاردیا لامبلیا بر اساس خصوصیات ژنتیکی بر اساس ژن‌های ناحیه گلوتامات دهیدروژناز و ناحیه تریوز فسفات ایزومراز به ۷ گروه (A-G) تقسیم می‌شود.

[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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017

بیشترین گروه‌های جدا شده از انسان‌ها متعلق به گروه‌های AI، AII، BIII، BIV می‌باشند. سایر گروه‌های ژنتیکی D، C، F، E، G دارای میزبان‌های اختصاصی بوده و محدود به چارپایان می‌باشند (۵-۲). هرچند همه ژیاردیاهای 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 ژیاردیا لامبلیا به عنوان یک عامل خطر زئونوز منتقله از گاو(۷)، سگ(۱۰-۸)، 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 (۳،۱۳). ایران یکی از مکان‌های آندمیک بیماری بوده شیوع آن ۱۰/۹درصد گزارش شده است(۱۴). در آذربایجان‌غربی میزان شیوع عفونت ۱۰،۳درصد گزارش شده است (۱۵). با توجه به اینکه الگوی انتشار عوامل عفونت در سراسر ایران متنوع است، ضمناً مطالعات بیشتری در مورد انگل ژیاردیا 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 ژیاردیا 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 ژیاردیا 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 DNAو 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 کلروفرم (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 آخرDNA خالص شده در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ذخیره شد (۱۶).

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 3) و GDHiR 5 GTT RTC CTT GCA CAT CTC C 3) انجام گرفت (۱۶). محتویات واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتری انجام گرفته که شامل ۱۰ نانوگرم از DNA الگو، بافر 1X که شامل 1.5 mMازMgcl2 (سیناژن-ایران)، ۱۰۰ میکرومول از d NTP mix (Fermentas، Lithuania)، ۰،۵ میکرومول از هرکدام از پرایمرها (سیناژن-ایران)، 2U از آنزیمDNA Taq 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) و۵۰ 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:

آنالیزRFLP به وسیله هضم ۸ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۵ واحد از آنزیم محدود ساز-هضمی Rsa1 (Fermentas، Lithuania) یا ۱۰ واحد از آنزیم BspL1 (Fermentas، Lithuania) در ۲ میکرولیتر از بافر آنزیم 10xدر یک حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه انجام شد. آنزیم هضمیRsa1 برای تشخیص ژنوتایپBIII، BIV، و آنزیم BspL1 برای شناسایی ژنوتایپ AI، AII بکار برده شد (۱۶).

شناسایی قطعات PCR و مرحله RFLP:

قطعات حاصل ازPCR و RFLP به وسیله الکتروفورز افقی به ترتیب در ژل‌های ۱،۵درصد و ۲درصد 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 ژیاردیا، پس از دید مستقیم میکروسکوپی به دنبال رنگ آمیزی لوگول و تغلیظ رسوبی، مثبت شدند.

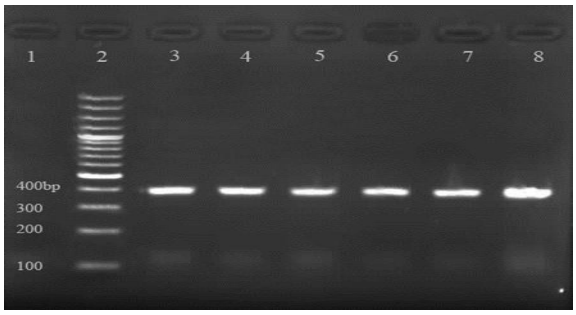
مرحله استخراج DNA:

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017

با استفاده از روش ذوب و انجماد و سپس روش فنل کلروفرم، 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:

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 (۱۰مرتبه) در مرحله اول و سپس استفاده از روش فنل –کلروفورم وglass beads، ۳۰ نمونه(۸۸،۲%) با استفاده از پرایمرهای GDHiF، GDHiR تکثیر یافت.



شکل ۱-۱تصویر آگاروز الکتروفورزیس از محصولات PCR نمونه‌های استخراج شده متعلق به موارد ژیاردیازیس.

چنانچه ملاحظه می‌شود ستون‌های ۴-۸ متعلق به محصولات PCR از تکثیر DNA ناحیه گلوتامات دهیدروژناز ژیاردیا لامبلیا از نمونه‌های کلینیکی، ستون ۱ مربوط به کنترل منفی،ستون ۳مربوط 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 RsaI، BspLI 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

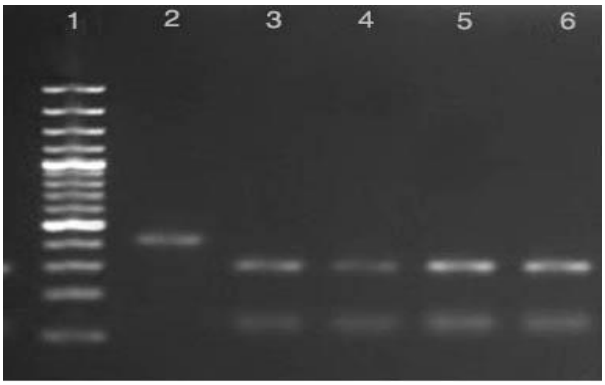
-لازم به یادآوری است که الگوی برش آنزیم‌ها در جدول(۱-۲) نشان داده شده است.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017

جدول شماره (۱-۲): الگوی برش آنزیم Rsal1,BspL1

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،ژیاردیا لامبلیا زیرگونه BIVو ستون ۳ ژیاردیا لامبلیا زیرگونه BIII (اثر آنزیم محدود سازRsaI)، ستون ۴-۷ ژیاردیا 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(۱-۲) نشان داده شده است.

جدول شماره (۱-۲): 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)	
	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)	۰/۰۰۱
Total	(۷۲۰)	۳۴(۴/۷۲)	

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017

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 ۵-۳ 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 یاد آوری است با توجه به اینکه نمونه برداری از بخش گوارش و افرادی که دارای علایم گوارشی بودند، انجام گرفته، ارتباط معنی‌داری بین نوع زیرگونه و علت بستری دیده نشد.

بحث

ژیاردیا 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 ژیاردیوزیس 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 ژیاردیوزیس در منطقه ارومیه در میان دانش آموزان ابتدایی ۱۰/۳ درصد گزارش شده است (۱۵) اما در این مطالعه میزان شیوع ژیاردیوزیس 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 ژیاردیوزیس 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 ژیاردیا 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 کلروفورم 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 توجیه 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-RFLPبا استفاده از ژن‌های ناحیه گلوتامات دهیدروژناز، زیرگونه غالب این ناحیهBIII بوده و عدم شناسایی زیرگونهAII 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 ژیاردیا لامبلیا در منطقه وجود دارد. طی مطالعات انجام شده بر روی دام‌های اطراف ارومیه به خصوص گوساله در سال ۱۳۸۵ توسط دلیر نقده که میزان شیوع ژیاردیوزیس 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 ۱۰۰درصد 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 زیرگونهB می‌باشد. در دیگر مطالعه انجام گرفته در آذربایجان شرقی توسط دکتر فلاح و همکارانش در سال ۲۰۰۸بر 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 BIV(60%) بوده و زیرگونه‌های دیگر AI(30%)، BIII(10%) می‌باشد که نتایج حاکی از ان است که حیوانات به عنوان مخازن انگل می‌باشند(۲۲). بر خلاف نتایج بدست آمده، در مطالعه‌ای که در برزیل در سال ۲۰۰۷ انجام گرفته، زیرگونه غالب AII بوده که مخازن 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 AII(87%) و به نسبت کمتر BIII(7.8%) بوده که بیانگر این نکته است که انسان‌ها

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017

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

با توجه به مطالعات انجام گرفته در مناطق مختلف جهان، تفاوت در شیوع اسمبلاژA، B می‌تواند با جمعیت‌های مورد مطالعه در نواحی مختلف جغرافیایی مرتبط باشد.

با توجه به تفاوت بین ژنوتیپ‌های زیرگونه A و B در پاتوژنیسیته (۱۳) و وضعیت ژئونوتیک آن‌ها (۲۴)، این مطالعه برای اولین بار اطلاعاتی درباره انتشار ژنتیکی ژیاردیا دئودنالیس از موارد انسانی مبتلا در ارومیه و ایران فراهم می‌نماید. در این مطالعه، مطابق با نتایج بدست آمده بین ابتلا انگل و جنس رابطه معنی‌داری وجود ندارد(P= 0.580).

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

با توجه به نبودن نمونه مثبت در افراد کمتر از ۱ سال، به نظر می‌رسد 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 ژیاردیا موثر می‌باشد، از آلودگی این افراد به این انگل جلوگیری می‌کند.لازم به یاد آوری است با توجه به اینکه نمونه برداری از بخش گوارش و افرادی که دارای علایم 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 می‌توان نتیجه گیری نمود:

۱-روش فنل کلروفرم با استفاده از انجماد –ذوب کردن و استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای بهترین و ارزان‌ترین روش استخراج DNA از کیست‌های ژیاردیا لامبلیا می‌باشد

۲- ایزوله‌های ژیاردیا دئودنالیس مشابه از نظر مورفولوژیکی، از نظر ژنومی متنوع هستند.

۳- زیرگونهB ژیاردیا لامبلیا در استان آذربایجان غربی وجود دارد که بیوتایپ غالب در منطقه BIII می‌باشد.

۴-درژیاردیا دئودنالیس، زیرگونه BIII، به طور طبیعی در چارپایان اهلی بوده وبا توجه به شیوع بالای عفونت ژیاردیا در دام‌ها احتمال وجود چرخه زئونوتیک انتقال ژیاردیا دئودنالیس 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 ۱۲درصد گزارش داد، به احتمال زیاد این فرضیه مطرح است که گوساله‌ها منبع عفونت در این منطقه می‌باشد که برای اثبات این نظریه، یک مطالعه اپیدمیولوژیک مولکولی بر روی دام‌ها و چارپایان اهلی به خصوص گوساله‌های آلوده به ژیاردیا پیشنهاد می‌شود، که برای فهمیدن اپیدمیولوژی عفونت و روش‌های کنترل بیماری و چرخه انتقال بیماری از حیوان به انسان و شناسایی مخازن مهم می‌باشد.

ثانیاً برای قطعیت بخشیدن به عدم تنوع ژنتیکی انگل در این منطقه، پیشنهاد می‌شود 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 شده‌اند، و از مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی ارومیه که در فراهم ساختن محیط کاری و آزمایشگاه، مساعدت صمیمانه‌ای را داشته‌اند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

این مقاله استخراج شده از پایان نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی، دانشجو غلامرضا منافی می‌باشد.

References:

1. Savioli L, Smith H, Thompson A. Giardia and Cryptosporidiumjoin the “Neglected Diseases Initiative”. Trends Parasitol 2006; 22: 203–8.
2. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G.EyP.Genetic diversity with in theMorphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. InfectGenet Evol 2003, 3: 29-38.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017

3. Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of Giardia duodenalis at the glutamate dehydrogenaselocus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol 2004; 4: 125-30.
4. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target geneslamblia in human feces by PCR andPCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. J Clin Microbiol 2005; 43(12): 5940-44.
5. Hunter PR, Thompson RC. The zoonotictransmission 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 domesticand 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 Giardiain dairy calves from Western Australia and Western Canada. Vet Parasitol 2000; 90: 193-200.
8. Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardosoe E. Genotype of Giardia Intestinalis isolates from children anddogs 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 supportthe zoonotic transmission of Giardiaamong 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 characterizationby PCR-RFLP and sequenceanalysis 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 indomestic, farm and wild animals, and environmentalsamples suggest a zoonoticpotential 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, Yaghooobi 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, Rezapor 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.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017

19. Dalir-Naghadeh B, Tavassoli M, Hatefinia AZ ,Study of epidemiologyic 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 characterizationof Giardia duodenalis in preschool children of a ruralcommunity, 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 doudenalis isolates from humans ,dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo Brazil,by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenese (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.

Original Article

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

Gholamreza Manafi[1],Khosro Hazrati tappeh[2],Kambiz Diba[3], Habib Mohammadzadeh[4], Mohammad Asgharzadeh[5], Shahsanam Gheibi[6]

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 sever 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 dgiardia 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 Parasitolog, 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*

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 22:01 +0330 on Thursday November 23rd 2017