

ORIGINAL ARTICLE

Genotyping of Giardia Duodenalis Isolates in Individuals with and without Chronic Diarrhea Using Polymerase Chain Reaction

Koroush Manouchehri Naeini¹,
Seyed Abdollah Hosseini²,
Abolfazl Gholipour³,
Zahra Babaei¹,
Simin Taghipoor

¹ Department of Parasitology, Mycology and Entomology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

³ Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Bahonar University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received, August 1, 2012; Accepted, November 28, 2012)

Abstract

Background and purpose: *Giardia* cyst and trophozoite have invariant morphologies, therefore, investigating aspects such as host specificity, transmission patterns and clinical behavior of the parasite in hosts requires molecular characterization of the parasites isolated from clinical samples. The aim of this study was to characterize giardiasis isolated from human fecal samples with symptomatic (with a history of chronic diarrhea) and asymptomatic giardiasis and investigating the correlation of parasite's assemblage with diarrhea.

Materials and methods: Thirty one fecal samples containing *Giardia* cysts from individuals with symptomatic and asymptomatic giardiasis were used to characterize the parasites' genotype. Triose Phosphate Isomerase (TPI) gene was amplified by polymerase chain Reaction (PCR). Demographic information was recorded using a questionnaire and SPSS ver.16 and Fisher's exact test were applied to analyse the data.

Results: PCR showed a higher frequency of *Giardia duodenalis* assemblage B compared with assemblage A (51.6% vs. 35.5%). However, the frequency of *Giardia duodenalis* assemblage A in symptomatic giardiasis was significantly higher than that of the asymptomatic giardiasis (62.5% vs. 18.75%). The Fisher's exact test revealed a significant correlation between *Giardia duodenalis* assemblage A and diarrhea ($p < 0.005$).

Conclusion: Usually, duodenalis assemblage A is accompanied by clinical symptoms such as diarrhea. However, duodenalis assemblage B is more prevalent among those with diarrhea.

Keywords: *Giardia duodenalis*, TPI gene, PCR, diarrhea

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(95): 39-46 (Persian).

بررسی ژنوتیپ های ژیا ردیا دئودنالیس در مبتلایان به ژیا ردیازیس همراه و بدون اسهال مزمن مراجعه کننده به آزمایشگاه های شهرکرد با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز

کوروش منوچهری نائینی^۱

سید عبدالله حسینی^۱

ابوالفضل قلی پور^۲

زهرا بابایی^۳

سیمین تقی پور^۱

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به ریخت شناسی نسبتاً یکنواخت کیست و تروفوزوایت ژیا ردیا در میزبان، بررسی ویژگی میزبانی، الگوهای انتقال و رفتار بالینی انگل در میزبان نیازمند تعیین هویت ژنتیکی انگل های جدا شده از نمونه های کلینیکی است. هدف از این تحقیق تعیین ژنوتیپ ژیا ردیاهای جدا شده از نمونه های مدفوع مبتلایان به ژیا ردیازیس با سابقه اسهال مزمن و مبتلایان بدون سابقه اسهال مزمن و بررسی ارتباط ژنوتیپ های انگل با این نشانه بالینی بود.

مواد و روش ها: ۳۱ نمونه مدفوع پس از تغلیظ و جداسازی کیست های ژیا ردیا به منظور تعیین ژنوتیپ انگل توسط ژن تریوز فسفات ایزومراز و با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز تکثیر شد. اطلاعات دموگرافی مبتلایان در پرسشنامه ای ثبت، پردازش و تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از روش های آماری انجام گرفت.

یافته ها: آزمایش PCR نشان داد که در مبتلایان فراوانی ژنوتیپ B ژیا ردیا دئودنالیس در مقایسه با ژنوتیپ A آن بیشتر است (۵۱/۶ درصد در مقابل ۳۵/۵ درصد). با این حال، فراوانی ژنوتیپ A انگل در بین مبتلایان به اسهال در مقایسه با مبتلایان بدون علامت به طور آشکاری بیشتر بود. (۶۲/۵ درصد در مقابل ۱۸/۷۵ درصد). آزمون دقیق فیشر نشان داد که در مبتلایان به ژیا ردیازیس بین اسهال و ژنوتیپ A انگل و عفونت های بدون علامت و ژنوتیپ B آن همبستگی آماری آشکاری وجود دارد ($p < 0/05$).

استنتاج: با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر اگر چه غالباً ژنوتیپ A ژیا ردیا دئودنالیس با نشانه های بالینی از قبیل اسهال همراه است اما به طور کلی به نظر می رسد در مبتلایان به ژیا ردیازیس ژنوتیپ B انگل در مقایسه با ژنوتیپ A از فراوانی بیشتری برخوردار باشد.

واژه های کلیدی: ژیا ردیا دئودنالیس، ژن تریوز فسفات ایزومراز، ژنوتیپ، اسهال

مقدمه

ژیا ردیا یک جنس از تازک داران روده ای است که طیف وسیعی از میزبانان مهره دار را آلوده می نماید (۱). از زمان کشف این تک یاخته تازک دار در سال ۱۶۸۱ توسط آنتونی ون لیون هوک تاکنون این

مؤلف مسئول: کوروش منوچهری نائینی - شهرکرد: رحمتیه، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی، قارچ شناسی و حشره شناسی E-mail: K_manouchehri@yahoo.com

۱. گروه انگل شناسی، قارچ شناسی و حشره شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۲. گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۳. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۱/۶/۱۹ تاریخ تصویب: ۹۱/۹/۸

انگل از طیف وسیعی از پستانداران، پرندگان، خزندگان و دوزیستان جدا شده است که امروزه بسیاری از آن‌ها به عنوان مخازن مهم عفونت‌های انسانی مورد توجه قرار گرفته‌اند. اگر چه در گذشته بیش از ۵۰ گونه از ژیا ردیا توصیف شده بود (۲)، اما امروزه به کارگیری فن آوری‌های نوین مولکولی موجب گردیده تا تغییرات قابل ملاحظه‌ای در طبقه‌بندی و ویژگی میزبانی این انگل رخ دهد، به طوری که در حال حاضر با مشخص شدن ویژگی‌های میزبانی انگل شک زئونوتیک بودن عفونت ناشی از آن بیشتر تقویت شده است (۲).

ژیا ردیا لامبلیا یکی از شایع‌ترین تک یاخته‌های انگلی روده‌ای انسان با انتشار جهانی است، به طوری که شیوع جهانی آن از ۶۰-۲۰ درصد و میزان بروز آن در کشورهای صنعتی از ۷-۲ درصد و در ایران از ۱۹ تا ۲۲ درصد تخمین زده می‌شود (۳). این انگل تک یاخته‌ای می‌تواند در انسان طیف بالینی گسترده‌ای از عفونت‌ها، از عفونت‌های بدون علامت تا اسهال شدید و یا سندرمی از اسهال مزمن، کاهش وزن و سوء جذب را ایجاد کند. شواهد موجود نشان می‌دهد اگر چه ممکن است اعضای مجموعه گونه‌ای ژیا ردیادئودنالیس از نظر ریخت‌شناسی با یکدیگر تفاوت اندکی داشته باشند اما براساس ویژگی‌های ژنتیکی می‌توان اعضای این گونه را حداقل به هفت جمعیت ژنتیکی یا ژنوتیپ از A تا G تقسیم نمود (۴). بررسی‌های مولکولی انجام شده بر روی ژن‌های مختلفی از قبیل گلو تامات دهیدروژناز، بتا ژیا ردین، تحت واحد کوچک RNA ریپوزومی و تریوز فسفات ایزومراز در انسان و حیوانات نشان داده‌اند که از بین ژنوتیپ‌های مختلف این انگل عمدتاً دو ژنوتیپ اصلی A و B در ایجاد عفونت‌های انسانی دخالت دارند (۵-۷)، اما این که آیا نشانه‌های بالینی از قبیل اسهال با ژنوتیپ خاصی از این انگل در ارتباط است موضوعی است که تاکنون مورد بررسی چندانی قرار نگرفته و در این زمینه نتایج برخی مطالعات انجام شده در مناطق مختلف با یکدیگر متفاوت و گاه متناقض است (۸، ۹). بر

این اساس تصور گردید که احتمالاً الگوی انتشار ژنوتیپ‌های انگل و تأثیر آن بر علائم عفونت با در مناطق مختلف جغرافیایی با یکدیگر متفاوت باشد. از سوی دیگر به رغم کاهش چشمگیر شیوع عفونت‌های انگلی هنوز هم ژیا ردیازیس از شایع‌ترین علل بیماری‌های اسهالی در این منطقه محسوب می‌شود. بنابراین مطالعه توصیفی - تحلیلی حاضر با هدف تعیین ژنوتیپ‌های مختلف ژیا ردیا دئودنالیس در مبتلایان به ژیا ردیازیس همراه و بدون اسهال مزمن در شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۱-۱۳۹۰ و مطالعه ارتباط ژنوتیپ‌های موجود با اسهال مزمن به عنوان یکی از شایع‌ترین پیامدهای ژیا ردیازیس در مقایسه با مبتلایان بدون اسهال مزمن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب و جمع آوری نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی نمونه‌های مدفوع بیش از ۹۰ نفر از مبتلایان به ژیا ردیازیس که برای تشخیص بیماری و یا معاینات دوره‌ای به آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی شهرستان شهرکرد مراجعه نموده بودند و وجود انگل در مدفوع آن‌ها مورد تأیید قرار گرفته بود با استفاده از روش نمونه‌گیری آسان جمع آوری و برای انجام مراحل بعدی تحقیق به آزمایشگاه تحقیقاتی گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی شهرکرد انتقال یافت. سپس اطلاعات دموگرافیک مورد نیاز و اطلاعات مربوط به نشانه‌های احتمالی عفونت از طریق تماس و مصاحبه با مبتلایان جمع آوری و در پرسشنامه‌های مربوطه ثبت گردید. در نهایت پس از تقسیم مبتلایان به دو گروه علامت‌دار (با سابقه‌ای از اسهال مزمن) و فاقد علامت، تعداد ۳۱ نمونه که در آن تعداد کیست‌های انگل برای مطالعات مولکولی مناسب به نظر می‌رسید، انتخاب شد.

آزمایش میکروسکوپی و جداسازی انگل از نمونه‌ها

برای اطمینان از وجود انگل و انتخاب نمونه‌های پر

استخراج DNA از کیست های انگل

ابتدا برای خروج از انجماد نمونه‌ها، میکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون کیست‌های انگل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس نمونه‌ها دو بار با آب مقطر دوبار تقطیر شستشو داده شد و با اضافه نمودن تعدادی گلوله شیشه‌ای ۵۲۰-۴۵۰ میکرونی (Glass beads) و ۵۰۰ میکرو لیتر بافر لیزکننده به میکروتیوب‌ها و با کمک ورتکس نمودن به مدت ۸ دقیقه دیواره کیست‌ها خرد گردید. در این مرحله به هریک از نمونه‌ها ۱۵ میکرو لیتر پروتیناز K و ۴۲ میکرو لیتر سدیم دو دیسل سولفات ۱ درصد اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری ۵۵ °C قرار داده شدند. سر انجام استخراج DNA انگل با توجه به دستورالعمل کیت (QIAgen, Company) (QIAgen, Company) با توجه به دستورالعمل کیت انجام پذیرفت و DNA استخراج شده تا زمان انجام آزمایش PCR در فریزر ۲۰ °C- نگهداری گردید.

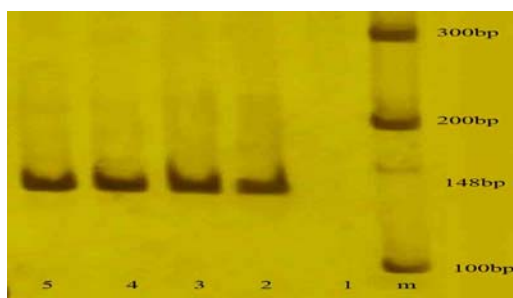
آزمایش PCR

با توجه به حساسیت بسیار بالای ژن تریوز فسفات ایزومراز با انجام آزمایش PCR دو ژن A, B, آنزیم تریوز فسفات ایزومراز (TPI-A و TPI-B) انگل ژیا ردیا تکثیر گردید. برای تعیین ژنوتیپ A ژیا ردیا، قطعه ۱۴۸ جفت بازی با پرایمر رفت (بالا دست) 5'-GGAGACCGACGAGCAAAGC-3' و پرایمر برگشت (پسین دست) 3'-CTTGCCAAGCGCCTCAA-5' و برای تعیین ژنوتیپ B آن قطعه ۸۱ جفت بازی با پرایمر رفت (بالا دست) 5'-AATAGCAGCACARAACGTGTATCTG-3' و پرایمر برگشت (پسین دست) 3'-CCCATGTCCAGCAGCATC-5' تکثیر گردید (۱۲، ۱۱). پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر ژن TPI-A، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر

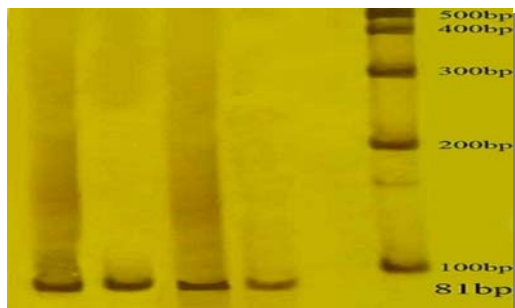
انگل جهت انجام آزمایش‌های مولکولی، ابتدا کلیه نمونه‌ها با استفاده از روش لام مرطوب مستقیم مورد آزمایش میکروسکوپی قرار گرفت. پس از تأیید مجدد آلودگی، چنانچه در پنج میدان میکروسکوپی با عدسی شی ۴۰X به طور متوسط ۱۰-۵ کیست انگل وجود داشت نمونه برای جدا سازی کیست‌ها انتخاب می‌گردید. برای جداسازی کیست‌های انگل از نمونه‌های مدفوع، پس از تهیه سوسپانسیون مدفوعی و عبور دادن آن از گاز مرطوب دو لایه، پالیده به لوله‌های آزمایش منتقل و به مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰ gX سانتریفیوژ شد. برای به دست آوردن نمونه‌ای مناسب، به رسوب باقی مانده در هر لوله ۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده، مجدداً نمونه‌ها دو بار با شرایط فوق سانتریفیوژ گردیدند. سپس ۳ میلی لیتر محلول سوکروز ۸۵ درصد مولار سرد در یک لوله سانتریفیوژ ریخته، به آرامی ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون مدفوعی تهیه شده به آن اضافه گردید. به طوری که دو لایه سوسپانسیون مدفوعی و سوکروز از یکدیگر قابل تمایز بودند. در مرحله بعد لوله‌های حاوی سوسپانسیون مدفوعی و محلول سوکروز به سانتریفیوژ یخچال دار منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C در ۶۰۰ gX سانتریفیوژ گردیدند. در این مرحله کیست‌های انگل که در یک لایه یا حلقه غباری میانی متراکم شده بودند با استفاده از پیت پاستور تخلیه و به لوله دیگری انتقال یافته، پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰ gX، مایع رویی دور ریخته شد. سپس برای شستشو و خارج نمودن سوکروز اضافه از محیط به رسوب باقیمانده در هر لوله ۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه و مجدداً لوله‌های حاوی کیست انگل دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با شرایط فوق سانتریفیوژ گردید. سرانجام به رسوب باقیمانده ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده، پس از مخلوط نمودن کامل محتوای لوله‌ها، نمونه‌های حاوی کیست انگل به میکروتیوب‌های مخصوص منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی در دمای ۲۰ °C- نگهداری شدند (۱۰).

یافته‌ها

در این مطالعه از ۳۱ فرد مبتلا به ژیا ردیازیس ۱۹ نفر مرد (۶۱/۳ درصد) و ۱۲ نفر زن (۳۸/۷ درصد) بودند که دامنه سنی آن‌ها بین ۵۰-۲ سال (میانگین سنی $14/35 \pm 18/61$) متغیر بود. در بین مبتلایان به ژیا ردیازیس در ۱۶ نفر (۵۱/۶ درصد) سابقه‌ای از اسهال مزمن وجود داشت. نتایج آزمایش PCR نشان داد که در بین مبتلایان به عفونت شیوع ژنوتیپ B ژیا ردیا (۸۱ جفت بازی) در مقایسه با ژنوتیپ A این انگل (۱۴۸ جفت بازی) بیشتر بوده است (۵۱/۶ درصد در مقابل ۳۵/۵ درصد) (تصاویر شماره ۱ و ۲). اما علی‌رغم این مسأله فراوانی ژنوتیپ A انگل در بین مبتلایان به اسهال در مقایسه با ژنوتیپ B آن بیش از سه برابر بود (۶۲/۵ درصد در مقابل ۱۸/۷۵ درصد).



تصویر شماره ۱: نمایی از ژل رنگ آمیزی شده پلی اکریلامید مربوط به ژن TPI-A
m مارکر وزنی -- ستون اول کنترل منفی -- ستون دوم کنترل مثبت -- ستون های ۳-۵ نمونه های ژنوتیپ A



تصویر شماره ۲: نمایی از ژل رنگ آمیزی شده پلی اکریلامید مربوط به ژن TPI-B
m مارکر وزنی -- ستون اول کنترل منفی -- ستون دوم کنترل مثبت -- ستون های ۳-۵ نمونه های ژنوتیپ B

شامل ۳ میکرو لیتر از DNA انگل، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP با غلظت ۰/۲۵، ۱/۲۵ میکرو لیتر از پرایمر با غلظت ۱۰، ۰/۵ Pmol، ۲/۵ میکرو لیتر از Taq DNA polymeras (2.5u)، ۰/۵ میکرو لیتر از بافر PCR (10X)، ۰/۵ میکرو لیتر از $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ mM و ۱۵/۵ میکرو لیتر از آب مقطر دو بار تقطیر انجام شد. شرایط حرارتی دستگاه ترموسایکلر ASTEC (Germany) جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بدین شرح بود: دناتوراسیون اولیه در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۸ دقیقه، در ادامه $35^{\circ}C$ با دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۳۵ ثانیه، $64^{\circ}C$ به مدت ۳۵ ثانیه، $72^{\circ}C$ به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل با دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

همچنین تکثیر ژن TPI-B، واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۳ میکرو لیتر از DNA انگل، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP با غلظت ۰/۲۵، ۱/۲۵ میکرو لیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰، ۰/۵ Pmol، ۲/۵ میکرو لیتر از بافر Taq DNA polymeras (2.5u)، ۰/۵ میکرو لیتر از بافر PCR (10X)، ۱ میکرو لیتر از $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ mM و ۱۵ میکرو لیتر از آب مقطر دو بار تقطیر با استفاده از ترموسایکلر Corrbet (Germany) با برنامه یک سیکل در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۸ دقیقه، $35^{\circ}C$ با دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $66^{\circ}C$ به مدت ۳۵ ثانیه، $72^{\circ}C$ به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل با دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۶ دقیقه انجام شد.

در این مطالعه از سویه استاندارد (ATCC: 30888TM) ژیا ردیا به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین با توجه به اندازه ژن مورد نظر و قدرت تفکیک قابل توجه ژل پلی‌اکریلامید برای ژن‌هایی با اندازه کم‌تر از ۱۰۰۰ bp در مقایسه با آگارز، محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد مورد الکتروفورز قرار گرفت و برای مشاهده باندها از رنگ آمیزی نترات نقره استفاده شد.

با این حال، در بین افراد بدون نشانه بالینی اسهال، فراوانی ژنوتیپ B زیاردیا در مقایسه با ژنوتیپ A آن بسیار چشم گیر بود (۸۶/۷ درصد در مقابل ۶/۷ درصد). در این مطالعه در ۱۱ نفر از مبتلایان به ژنوتیپ B که فقط ژنوتیپ A انگل را داشتند، ۱۰ بیمار (۹۱ درصد) به اسهال مزمن مبتلا بودند در حالی که از ۱۶ نفر مبتلای به این عفونت که فقط دارای ژنوتیپ B انگل بودند تنها در ۳ نفر (۱۸/۷۵ درصد) سابقه‌ای از اسهال مزمن وجود داشت (جدول شماره ۱). آزمون آماری فیشر نشان داد که در مبتلایان به ژنوتیپ B بین اسهال و ژنوتیپ A انگل و عفونت‌های بدون علامت و ژنوتیپ B زیاردیا همبستگی آماری آشکاری وجود دارد ($p < 0.05$).

جدول شماره ۱: فراوانی ژنوتیپ‌های زیاردیا دئودنالیس در مبتلایان به ژنوتیپ‌های A و B در شهر کرد بر حسب وجود علامت بالینی اسهال

ژنوتیپ انگل	مبتلایان علامت دار (اسهال)	مبتلایان بدون علامت	جمع (نفر)
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
ژنوتیپ A	۱۰ (۶۵/۵)	۱ (۶/۶)	۱۱
ژنوتیپ B	۳ (۱۸/۷۵)	۱۳ (۸۷)	۱۶
ژنوتیپ A و B	۳ (۱۸/۷۵)	۱ (۶/۶)	۴
جمع	۱۶ (۱۰۰)	۱۵ (۱۰۰)	۳۱

بحث

در مطالعه حاضر تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آزمون آماری دقیق فیشر نشان داد که بین ژنوتیپ A زیاردیا دئودنالیس و اسهال همبستگی آماری آشکاری وجود دارد. این نتایج با یافته‌های به دست آمده از مطالعات Alam و همکاران (۲۰۱۱) (۱۳) و Haque و همکاران (۲۰۰۹ و ۲۰۰۵) در بنگلادش (۱۴، ۱۵)، مطالعه Real و همکاران (۲۰۰۲) در استرالیا (۱۶) Aydin و همکاران (۲۰۰۴) در ترکیه (۱۷)، Sahagun و همکاران (۲۰۰۸) در اسپانیا (۱۸)، Paintlia و همکاران (۱۹۹۹) در هند (۱۹) و اعتمادی و همکاران (۱۳۹۰) در ایران (۲۰) همخوانی دارد. نشانه‌های عفونت زیاردیایی بسیار متغیر است و برخی از مبتلایان بدون نشان دادن هرگونه علائم بالینی مشخصی می‌توانند کیست‌های عفونت را از طریق مدفوع خود به محیط دفع کنند (۲۱). این که چرا برخی از

مبتلایان به زیاردیازیس توأم با نشانه‌های بالینی مبتلا می‌گردند اما برخی دیگر ممکن است بدون علامت باقی بمانند؟، به خوبی مشخص نیست. با این حال به نظر می‌رسد عوامل میزبانی و تفاوت در سویه انگل یا هر دو در بروز چنین تفاوتی دخیل باشند (۲۲). اگرچه مطالعات مختلف نشان داده است که ایزوله‌های زیاردیا دئودنالیس که از نظر ریخت‌شناسی مشابه یکدیگر می‌باشند، از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی با یکدیگر متفاوتند (۱۸)، اما غالب ایزوله‌های زیاردیا دئودنالیس انسانی و برخی از گونه‌های حیوانات اهلی را می‌توان در یکی از دو جمعیت ژنتیکی A یا B گروه‌بندی نمود (۲۴-۲۲) ایزوله‌های متعلق به این دو جمعیت ژنتیکی در سرتاسر دنیا یافت می‌شوند، هرچند به نظر می‌رسد ایزوله‌های دو جمعیت ژنتیکی A و B در مقایسه با سایر جمعیت‌ها از پراکندگی کمتری برخوردار بوده، به کانون‌های اندمیک محدود باشند (۲۵، ۲۶).

به اعتقاد برخی از محققین چنانچه مطالعات صرفاً بر اساس نمونه‌گیری از بیماران مبتلا به اسهال انجام پذیرد ممکن است شیوع واقعی زیاردیا بویژه در مورد دو جمعیت ژنتیکی A و B کمتر از میزان واقعی برآورد شود (۱۶-۱۴) از سویی ارتباط بین وجود اسهال و ژنوتیپ زیاردیا الزاماً بدان معنی نیست که یک ژنوتیپ خاص دارای حدت بیشتری در مقایسه با ایزوله‌هایی است که کمتر با اسهال در ارتباط می‌باشند (۱۶). با این حال نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Homan و همکاران (۲۰۰۱) در هلند (۸) و Gelanew و همکاران (۲۰۰۷) در ایتوپی (۹) مغایر است. به طوری که این محققین ارتباط آشکاری را بین جمعیت ژنتیکی B زیاردیا دئودنالیس و اسهال شدید و پایدار گزارش نمودند. در موارد اخیر باید بر این نکته تأکید نمود که محققین مذکور صرفاً ژنوتیپ انگل در بیمارانی را مورد مطالعه قرار دادند که همه دارای علائم بالینی بیماری بودند و در این مطالعات صرفاً ارتباط بین ژنوتیپ انگل و شدت نشانه‌های بیماری مورد بررسی قرار گرفته است

واقعی ژنوتیپ‌های مختلف انگل در استان و تأثیرات آن در بروز علائم بالینی بیماری توصیه می‌شود مطالعات جامع‌تری و با حجم نمونه بیشتر انجام پذیرد.

و در مورد ارتباط بین ژنوتیپ ژیا ردیا و وجود یا عدم وجود نشانه‌های بالینی تحقیقی انجام نشده است (۸).

محدودیت‌های مطالعه

دشواری تهیه کیت استخراج DNA و Setup نمودن آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس از عمده‌ترین محدودیت‌های مطالعه حاضر محسوب می‌شد.

هر چند که تحقیق حاضر نشان داد که در شهرستان شهرکرد غالباً ژنوتیپ A ژیا ردیا دئودنالیس با نشانه‌های بالینی از قبیل اسهال همراه است اما به نظر می‌رسد در این منطقه نیز همانند بسیاری از سایر نقاط جهان ژنوتیپ B ژیا ردیا دئودنالیس در مقایسه با ژنوتیپ A آن از فراوانی بیشتری برخوردار باشد. با این حال به رغم مشخص شدن نقش ژنوتیپ ژیا ردیا در بروز اسهال در مطالعه حاضر، برای قضاوت بهتر در مورد پراکنش

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت‌های مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و همکاری کارشناسان مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه، کارشناسان آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی-درمانی و آزمایشگاه‌های خصوصی شهرستان شهرکرد و راهنمایی‌های تکنیکی خانم سارا غلامی دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی مشهد به انجام رسیده است. لذا بدین وسیله از همکاری‌های ارزنده آنان تقدیر می‌نمایم.

References

- Adam RD. The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol* 2000; 30(4): 475-484.
- Thompson RCA. Towards a better understanding of host specificity and the transmission of *Giardia*: the impact of molecular epidemiology. In: *Giardia: The cosmopolitan parasite*. Olsen BE, Olsen ME, Wallis PM, (eds). Wallingford, UK and New York: CABI Pub; 2002. p. 55-69.
- Shafie R, Jahani MR, Rezaeian M, Amini M, Metvayi AR, Mirahmadi H, et al. *Giardia lamblia* and *Helicobacter pylori* Coinfection. *Iranian J Publ Health* 2009; 38(1): 127-130.
- Caccio SM, Lalle M, Reck E, Pozio E. Insights into the molecular detection of *Giardia duodenalis*: Implications for Epidemiology. In: *Giardia and Cryptosporidium from Molecules to Disease*. Ortega-Pierres G, Simone M, Cacciò R, Fayer R, Mank TG, Smith HV, et al, (eds). Wallingford, Oxfordshire, UK; Cambridge, MA: CABI; 2009. p. 81.
- Ajjampur SS, Sankaran P, Kannan A, Sathyakumar K, Sarkar R, Gladstone BP, et al. *Giardia duodenalis* assemblages associated with diarrhea in children in South India identified by PCR-RFLP. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80(1): 16-19.
- Fallah E, Nahavandi KH, Jamali R, Mahdavi B, Asgharzadeh M. Genetic characterization of *Giardia intestinalis* strains from patients having sporadic Giardiasis by using PCR assay. *J Med Sci* 2008; 8(3): 310-315.
- Nahavandi KH, Fallah E, Asgharzadeh M, Mirsamadi N, Mahdavi-pour 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(2): 283-289.
- Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol* 2001; 31(8):

- 822-826.
9. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Caccio SA. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *J Acta Trop* 2007; 102(2): 92-99.
 10. Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp Parasitol* 2011; 128(2): 159-162.
 11. Fallah E, Hatam Nahavandi K, Jamali R, Mahdavi poor B, Asgharzadeh M., Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from human and animal reservoirs by PCR RFLP. *J Biol Sci* 2008; 8(5): 896-901.
 12. Tungtrongchitr A, Sookrung N, Indrawattana N, Kwangsi S, Ongrotchanakun J, Chaicumpa W. *Giardia intestinalis* in Thailand: Identification of Genotypes. *J Health Popul Nutr* 2010; 28(1): 42-52.
 13. Alam M, Ilias M, Siddique M, Kabir M, Nazib F, Musawwir Khan M. Genotype specific detection of *Giardia lamblia* in stool samples of diarrhoeal and non diarrhoeal patients in Dahka, Bangladesh. *Dhaka Uni J Biol Sci, North America* 2011; 20(2): 183-189.
 14. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis* 2005; 192(12): 2171-2173.
 15. Haque R, Mondal D, Karim A, Molla IH, Rahim A, Faruque AS, et al. Prospective case-control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. *Clin Infect Dis* 2009; 48(9): 1191-1197.
 16. Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 2002; 32(2): 229-231.
 17. Aydin AF, Besirbelliogu BA, Avci IY, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50(2): 147-151.
 18. Sahagun J, Clavel A, Goni P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, et al. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol* 2008; 27(1): 81-83.
 19. Paintlia AS, Mahajan RC, Chakraborti A, Sehgal R, Ganguly NK. Characterization of *Giardia lamblia* groups A and B from North India by isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Parasitol Res* 1999; 85(6): 510-512.
 20. Etemadi S, Zia-Ali N, Babai Z, Fasihi Harandi M, Zia-Ali A, Salari Z, et al. The correlation between clinical signs and genotype of *Giardia duodenalis* isolated from patients with Giardiasis in Kerman city. *J Kerman Uni Med Sci* 2011; 18(4): 330-338 (Persian).
 21. Farthing MJ. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24(1): 79-88.
 22. Thompson RC. Giardiasis as a reemerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000; 30(12-13): 1259-1267.
 23. Homan WL, van Enckevort FH, Limper L, van Eys GJ, Schoone GJ, Kasprzak W, et al. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res* 1992; 78(4): 316-323.
 24. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison

- with *Giardia muris*. Parasitology 1995; 111 (Pt 1): 11-17.
25. Thompson RC, Meloni BP. Molecular variation in *Giardia*. Acta Trop 1993; 53(3-4): 167-184.
26. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect Genet Evol 2003; 3(1): 29-38.