مقاله پژوهشی

بررسی اسمبلیج *ژیاردیا اینتستینالیس* انسانی در استان مرکزی، ایران

نویسندگان:

محمد جواد عبدی[1]، پارسا یوسفی چایجان[2]، زهرا اسلامی راد[3]*، رضا حاجی حسین[3]، اعظم احمدی[4]

۱- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳- گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴- مرکز تحقیقات عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.3, Fall 2020

چکیده:

مقدمه: ژیاردیازیس عفونت روده کوچک با انتشار جهانی است. عامل مولد این بیماری تک‌یاخته‌ای تاژکدار به نام *ژیاردیا* است. انتقال انگل فقط توسط کیست‌های رسیده انجام می‌شود. شناسایی توزیع جغرافیایی اسمبلیج‌ها و ژنوتیپ‌های *ژیاردیا اینتستینالیس* به منظور تعیین الگوی انتقال آنها در هر منطقه از کشور اهمیت دارد. از این رو، مطالعه کنونی به منظور تعیین اسمبلیج غالب *ژیاردیایی* در نمونه‌های انسانی شهر اراک انجام شد.

روش کار: نمونه‌های مدفوع آلوده به ژیاردیا از آزمایشگاه‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اراک جمع آوری و کیست‌های *ژیاردیا* به روش شناورسازی جداسازی و DNA به روش فنل- کلروفرم روی این نمونه‌ها استخراج شد. محصول استخراج DNA در واکنش PCR بر پایه شناسایی ژن بتاژیاردین (β-giardin) استفاده و محصول این واکنش به منظور توالی‌یابی ارسال شد.

یافته‌ها: در این مطالعه ۲۵ نمونه مدفوع آلوده به *ژیاردیا* مورد بررسی قرار گرفت و ۱۲ محصول واکنش PCR به منظور توالی‌یابی ارسال شد. از این نمونه‌ها تعداد ده نمونه تشابه ۹۸ درصدی با توالی LC508640.1 و LC508640.1 و دو نمونه تشابه ۹۷ درصدی با توالی JN616244.1 انگل *ژیاردیا اینتستینالیس* داشتند. این ایزوله‌ها در ژن بانک ثبت شدند (MT584765- MT584776). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اسمبلیج غالب انگل *ژیاردیا اینتستینالیس* در شهر اراک از نوع A است.

نتیجه‌گیری: اسمبلیج همه ایزوله‌های به دست آمده در مطالعه کنونی با نوع A تطابق داشت. با توجه به این که اسمبلیج A بیشتر انسان و سایر پستانداران را آلوده می‌کند به نظر می‌رسد الگوی اپیدمیولوژیکی انتقال *ژیاردیا* در شهر اراک، زئونوتیک است.

واژگان کلیدی: آنتروپوزئونوتیک، اسمبلیج، اراک، زئونوتیک، *ژیاردیا*، ژنوتایپ

Pars J Med Sci 2020;18(3):43-48

مقدمه:

ژیاردیازیس عفونت روده کوچک با انتشار جهانی است. عامل مولد این بیماری، تک‌یاخته‌ای تاژکدار به نام *ژیاردیا* است. انگل در چرخه زندگی خود به دو شکل تروفوزوئیت و کیست زندگی می‌کند ولی انتقال آن فقط توسط کیست‌های رسیده انجام می‌شود. *ژیاردیا* دارای شش گونه است[۱]. گونه‌ای که پستانداران را آلوده می‌کند، *ژیاردیا اینتستینالیس* است. شیوع این انگل در کشورهای صنعتی بین ۲ تا ۵ درصد و در کشورهای در حال توسعه بین ۲۰ تا ۳۰ درصد است [۲]. این بیماری در اکثر مبتلایان بدون علامت بوده ولی در برخی از افراد علائم خفیف یا شدید نیز مشاهده می‌شود. شایع ترین علامت بیماری اسهال است که بیشتر مواقع بدون نیاز به درمان بهبود می‌یابد و گاهی نیز به صورت مزمن در آمده که در صورت عدم درمان می‌تواند منجر به عوارضی همچون عوارض اختلال‌های رشد در کودکان شود [۳]. *ژیاردیا اینتستینالیس* یک گونه کمپلکس متشکل از هشت

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
تلفن تماس: ۳۳۵۳۳۸۶-۸۶ موبایل: ۹۱۲۳۳۵۳۳۸۶ پست الکترونیک: dr.eslami@arakmu.ac.ir ; z.eslami64@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۹/۶/۸ اصلاح: ۱۳۹۹/۷/۳۰ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۲

ژنوتایپ یا اسمبلیج اصلی A تا H است. این اسمبلیج‌ها از نظر مورفولوژیکی مشابه ولی از نظر ژنتیکی متفاوت هستند. در بین هشت اسمبلیج ذکر شده فقط نوع A و B که از انسان جدا شده است قادر به آلوده کردن حیوانات نیز می‌باشد. توزیع جغرافیایی اسمبلیج‌های مختلف *ژیاردیا* در ایران متفاوت است. به عنوان مثال نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ در تهران انجام شد نشان داد که ۷۸ درصد موارد ابتلا انسان به انگل *ژیاردیا* در تهران، اسمبلیج نوع A و ۷/۸ درصد نوع B و ۵/۲ درصد موارد آلودگی مخلوطی از دو نوع اسمبلیج ذکر شده بوده است[۴]. در استان فارس نیز نتایج مشابه تهران مشاهده شده است ولی در اصفهان اسمبلیج نوع B شایع‌تر از A بوده است [۶،۵،۲].

برخی از مطالعات نیز نشان دهنده وجود ارتباط بین اسمبلیج انگل و علائم بالینی است. به طوری که نتایج یک مطالعه اجمالی روی وضعیت ژیاردیازیس در ایران و جهان حاکی از آن است که علائم بالینی در مبتلایان به ژیاردیای نوع A متناوب و خفیف، ولی در نوع B مداوم و شدید است[۷]. با توجه به این که برخی از اسمبلیج‌ها و ژنوتیپ‌های انگل *ژیاردیا* فقط به یک میزبان محدود شده و برخی دیگر طیف گسترده‌ای از میزبانان از جمله انسان را آلوده می‌کنند، از این‌رو، تعیین هویت ژنتیکی *ژیاردیا* در انسان‌های آلوده می‌تواند در شناسایی منابع انتشار انگل یا به عبارتی تعیین الگوی انتقال انگل در جوامع انسانی کمک کرده و به این ترتیب در پیش‌بینی رفتار بالینی انگل در میزبان و به دنبال آن در برنامه‌ریزی برای پیشگیری از شیوع انگل و درمان بیماری موثر باشد. با توجه به این که تا کنون اطلاعاتی در خصوص هویت ژنتیکی انگل *ژیاردیا* در استان مرکزی گزارش نشده است، مطالعه حاضر با هدف تعیین اسمبلیج غالب *ژیاردیا اینتستینالیس* انسانی جداسازی شده در اراک انجام شد.

روش کار:

نمونه‌های مدفوع آلوده به کیست ژیاردیا از آزمایشگاه‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اراک جمع‌آوری و کیست‌ها با روش شیب ساکاروز تک فازی جداسازی شد [۸]. سپس DNA به روش فنل/کلروفرم استخراج شد[۹]. هر یک از محصولات استخراج DNA به طور مجزا در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی بهره برداری شد [۱۱،۱۰]. توالی پرایمرهای اختصاصی که برای شناسایی ژن بتاژیاردین (β-giardin) به کار رفت به صورت زیر است:

Forward primer B3 (5′-GAA CGA ACG AGA TCG AGG TCC G-3′)

Reverse primer B4 (5′-CTC GAC GAG CTT CGT GTT-3′)

محصول واکنش‌های PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد و اندازه قطعه به دست آمده در مجاورت با مارکر وزن مولکولی بررسی شد. دوازده عدد از محصولات مرحله یاد شده که کیفیت و غلظت مناسب‌تری داشتند، به منظور توالی یابی به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شد.

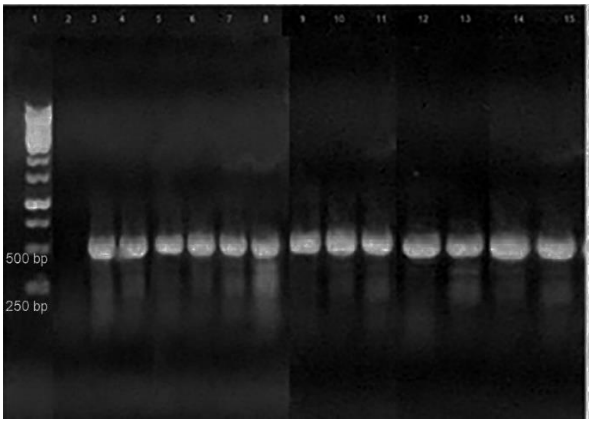
توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار مگا (Mega7) پردازش و سپس برای تعیین میزان تشابه با توالی‌های موجود در ژن بانک مقایسه شدند.

یافته‌ها:

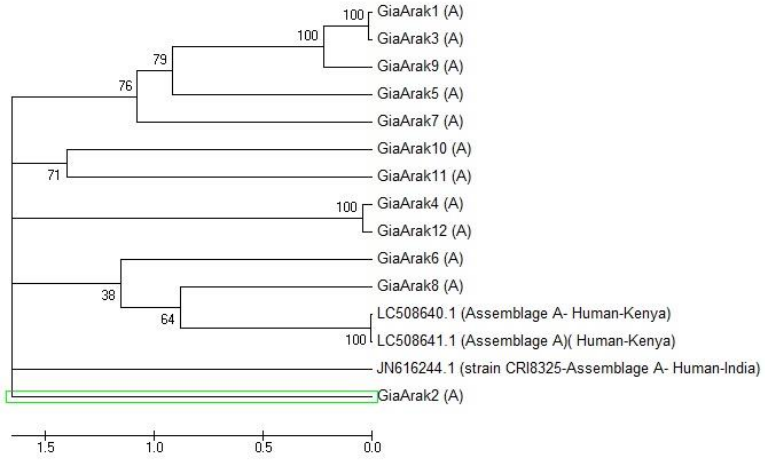
در این مطالعه ۲۵ نمونه مدفوع که نتیجه آزمایش مستقیم آن‌ها وجود کیست‌های انگل *ژیاردیا* را تایید کرده بود، مورد آزمایش مولکولی قرار گرفتند. نتیجه واکنش PCR روی این نمونه‌ها تکثیر قطعه‌ای ژنی به اندازه تقریبی ۵۱۱ bp از هر یک نمونه‌ها را نشان داد (تصویر ۱).

با توجه به توالی‌های به دست آمده از ۱۲ ایزوله ارسالی و بلاست نمودن داده‌های این توالی‌ها، مشخص شد که ده ایزوله دارای تشابه۹۸ درصدی با توالی LC508640**.1** و LC508641**.1** *ژیاردیا اینتستینالیس* ثبت شده در بانک ژنی بودند. نمونه‌های این دو توالی در کشور کنیا از انسان به دست آمده بودند. همچنین دو ایزوله باقیمانده دارای تشابه ۹۷ درصدی با توالی JN616244**.1** ثبت شده در بانک ژنی بود. نمونه این توالی در کشور هند از انسان به دست آمده بود. همه توالی‌های به دست آمده در این مطالعه با شماره دست‌یابی MT584765 الی MT584776 در بانک ژنی به ثبت رسیده است. با توجه به نتایج توالی‌یابی ایزوله‌های به دست آمده، همه ایزوله‌هایی جدا شده در این مطالعه از نوع اسمبلیج A بود.

با توجه به تشابه توالی‌های ایزوله‌های به دست آمده در مطالعه کنونی با توالی‌های موجود در بانک ژنی (به عنوان استاندارد) و با استفاده از نرم‌افزار مگا درخت فیلوژنی این ایزوله‌ها رسم شد (تصویر ۲).



تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR نمونه ها روی ژل آگاروز ۱٪ با باند اختصاصی bp ۵۱۱ ~: ستون ها به ترتیب ۱: مارکر وزن مولکولی 1kb(شرکت فرمنتز به شماره SM0313) ، ۲: کنترل منفی، ۳: کنترل مثبت، ۴ الی ۱۵ نمونه های مثبت



تصویر ۲: درخت فیلوژنی ایزوله های شناسایی شده *ژیاردیا اینتستینالیس* در شهر اراک بر اساس ژن بتاژیاردین با استفاده از الگوریتم Maximum composite Likelihood ، روش Bootstrap و ۵۰۰ تکرار (در این درخت فیلوژنی *GiaArak* که با خط سبز در درخت فیلوژنی مشخص شده به عنوان outgroup استفاده شده است)

بحث:

در مطالعه حاضر، آزمایش PCR روی ۲۵ نمونه مدفوع آلوده به *ژیاردیا* انجام شد که همه نمونه ها مثبت بودند. همچنین نتایج توالی‌یابی دوازده محصول واکنش PCR نشان داد که همه نمونه‌های مذکور متعلق به اسمبلیج A *ژیاردیا اینتستینالیس* بودند. پیشرفت‌های اخیر در شناسایی هویت ژنتیکی *ژیاردیا* دانسته‌های بشر در مورد بیولوژی و رابطه میزبان و این انگل را به طور وسیعی افزایش داده است. با این که همه ژیاردیاهایی که از انسان جدا شده است متعلق به اسملیج های A و B بوده، این اسمبلیج‌های از حیوانات اهلی و وحشی مثل سگ، گربه و گاو نیز جدا شده است. به همین دلیل برخی از پژوهشگران نیز خطر زئوآنتروپونوتیک شدن این انگل را مطرح کرده‌اند [۴]. با توجه به مشکل بودن شناسایی مورفولوژیک ژنوتایپ‌های ژیاردیای انسانی، به منظور درک و بررسی اپیدمیولوژی مولکولی این انگل روش توالی‌یابی یک ابزار قوی محسوب می‌شود[۴].

در ایران نیز مطالعات زیادی با هدف شناسایی اسمبلیج‌ها و ژنوتایپ‌های انگل *ژیاردیا* و همچنین بررسی ارتباط احتمالی بین ژنوتایپ و علائم بیماری انجام شده است. به عنوان نمونه، مطالعه اعتمادی و همکاران در شهر کرمان نشان داد که ساب ژنوتایپ‌های ایزوله‌های جدا شده در این شهر AI , AII ,BIII بوده و بین این ایزوله‌ها و علائم اسهال، درد شکم و تهوع ارتباط معنادار وجود دارد[۱۲].

نتایج مطالعه منوچهری و همکاران که به منظور بررسی ارتباط بین ژنوتایپ انگل *ژیاردیا* و بروز اسهال مزمن در شهرکرد انجام شد، نشان داد که به ترتیب بین ژنوتایپ A و B انگل *ژیاردیا* با

اسهال ارتباط آماری معناداری وجود دارد. به عبارت دیگر ابتلا به ژنوتایپ A این انگل همراه با اسهال و در مقابل ابتلا به ژنوتایپ B فاقد این علامت است[۱۳]. نتایج مطالعه گورابی و همکاران که به منظور بررسی ژنوتایپ انگل ژیاردیا در بیماران فاقد علامت بالینی انجام شد نیز موید این مطلب است که اکثر بیماران فاقد علامت، مبتلا به ژنوتایپ A این انگل بوده‌اند [۱۰].

نتایج دو مطالعه مجزا که به منظور بررسی ژنتیکی انگل *ژیاردیا* در استان فارس انجام شد حاکی از آن است که بیشترین و کمترین درصد ایزوله‌های مورد بررسی در این استان به ترتیب در اسمبلیج A و B قرار داشته و ژنوتایپ آن‌ها AII و BIV بوده است [۲،۶]. نتایج مطالعه‌ای در اصفهان نشان داد که اسمبلیج غالب این انگل در این منطقه B و ژنوتایپ‌های BIII و BIV از سایر ژنوتایپ‌ها شایع‌تر بوده است[۱۴،۵].

با این که بررسی ایزوله‌های *ژیاردیا اینتستینالیس* (*ژ. لامبلیا*) نشان داد که این انگل از نظر فنوتایپی و ژنوتایپی ناهمگونی زیادی دارد، ولی اکثر ایزوله‌هایی که در انسان و حیوانات اهلی شناسایی شده در دو اسمبلیج ژنتیکی A و B قرار دارند. ایزوله‌های متعلق به این دو اسمبلیج در همه جهان شناسایی شده ولی به نظر می رسد که ایزوله‌های اسمبلیج B انتشار کمتری دارند [۱۵]. ایزوله‌های *ژیاردیا اینتستینالیس* پاتوژنیسیته، ویرولانس و خصوصیات بیولوژیک متفاوتی دارند که افتراق آن‌ها را امکانپذیر می‌سازد. به طوری که نتایج چند مطالعه این فرضیه را مطرح می‌کند که اسمبلیج A در افراد فاقد علامت شایع‌تر است[۱۶،۱۵].

نتیجه‌گیری:

همه ایزوله‌های جدا شده در مطالعه کنونی در اسمبلیج A انگل *ژیاردیا* قرار داشتند. از آن جا که ایزوله‌های موجود در این اسمبلیج بیشتر انسان و سایر پستانداران اهلی و به ندرت پستانداران وحشی را آلوده می‌کند، به نظر می‌رسد که الگوی انتقال اپیدمیولوژیکی انگل *ژیاردیا اینتستینالیس* در اراک به صورت زئونوتیک بوده، ولی نباید امکان انتقال آنتروپوزئونوتیک آن را نادیده گرفت. بدیهی است به منظور روشن شدن دقیق این مورد لازم است که در این شهر ژنوتایپ این انگل نیز مورد بررسی قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی:

این مقاله بر گرفته از پایان نامه دانشجوی پزشکی عمومی با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1398.022 است. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله نویسندگان از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک برای فراهم کردن امکان انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می‌کنند.

References:

1. Adam RD. Biology of Giardia lamblia. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):447-75.
2. Rayani M, Zasmy Unyah N, Hatam G. Molecular Identification of Giardia duodenalis Isolates from Fars Province, Iran. Iran J Parasitol. 2014;9(1):70-8.
3. Lujan HD, Svärd S. Giardia: A Model Organism: Springer; 2011.
4. Babaei Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Rezaie S, Razmjou E, Soltani- Arabshahi S, et al. Molecular characterization of the Iranian isolates of Giardia lamblia: application of the glutamate dehydrogenase gene. Iran J Public Health. 2008;37(2):75-82.
5. Pestehchian N, Rasekh H, Babaei Z, Yousefi H, Eskandarian AA, Kazemi M, et al. Identification of genotypes of Giardia duodenalis human isolates in Isfahan, Iran, using polymerase chain reaction – Restriction Fragment Length polymorphism. Adv Biomed Res. 2012;1(2):84.
6. Sarkari B, Ashrafmansori A, Hatam GR, Motazedian MH, Asgari Q, Mohammadpour I. Genotyping of Giardia lamblia isolates from human in southern Iran. Trop Biomed. 2012 Sep;29(3):366-71.
7. Fakhar M, Kialashaki E, Sharif M. An Overview on the present Situation of Giardiasis in Iran and the World with Emphasis on Zoonotic Aspects. J Mazand Univ Med Sci. 2014;24(113):235-51.
8. Barazesh A, Majidi J, Fallah E, Gholikhani R. Introduction a simple and economical method to purify Giarda lamblia cysts. African J Biotechnol. 2011;10:8498.
9. Solymane H, Eslamirad Z, Bayat M, Hajihossein R. Molecular Detection of Toxoplasma gondii Oocytes in the Soil from the Public Parks of the Arak City, Iran. Res Mol Med. 2014;2(1):35-8.
10. Goorabi L, Pirestani M, Sadraei J. Genotyping of Giardia Duodenalis by β-giardin Gene in Asymptomatic Patients. J Mazand Univ Med Sci. 2017;27:27-34.
11. Tan L, Wu S, Abdullahi AY, Yu X, Hu W, Song M, et al. PCR-RFLP method to detect zoonotic and host-specific Giardia duodenalis assemblages in dog fecal samples. Parasitol Res. 2016;115(5):2045-50.
12. Etemadi S, Ziyaali N, Babaei Z, Fasihi M, Ziyaali A, Salari Z, et al. The Correlation between Clinical Signs

and Genotypes of Giardia duodenalis Isolated from Patients with Giardiasis in Kerman City. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2011;18(4):330-9.
13. Manouchehri Naeini K, Hosseini SA, Gholipour A, Babaei Z, Taghipoor S. Genotyping of Giardia Duodenalis Isolates in Individuals with and without Chronic Diarrhea Using Polymerase Chain Reaction. J Mazand Univ MeD Sci. 2012;22(95):39-46.
14. Pestehchian N, Rasekh H, Rostami-Nejad M, Yousefi H, Hosseini-Safa A. Molecular identification of Giardia lamblia; is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population? Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2014 06/18;7:168-72.
15. Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. Correlation between genotype of Giardia duodenalis and diarrhoea. Int J Parasitol. 2002 ;32(2):229-31.
16. Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol. 2001;31(8):822-6.

Original Article

Investigating of Human *Giardia intestinalis* Assemblage in Markazi province, IRAN

Mohammad Javad Abdi[1], Parsa Yosefi Chigan[2], Zahra Eslamirad[3*], Reza Hajihossein[3], Azam Ahmadi [4]

Received: 2020.08.29 Revised: 2020.10.21 Accepted: 2020.12.12

1. Medicine student, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2. Department of pediatrics, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3. Associate Professor Parasitology, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4. Infectious Disease Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.3, Fall 2020

Pars J Med Sci 2020;18(3):43-48

Abstract:

Introduction:
Giardiasis is a worldwide infection of the small intestine. The causative agent of this disease is a flagellate protozoan called *Giardia*. It is only transmitted by mature cysts. It is important to identify the geographical distribution of *Giardia intestinalis* assemblages and genotypes in order to determine their transmission pattern in each region of the country. Therefore, the present study was performed to determine the predominant *Giardia* assemblage in human samples in Arak.

Materials & Methods:
Fecal samples with severe contamination to *Giardia* were collected from laboratories affiliated to Arak University of Medical Sciences and *Giardia* cysts were isolated by flotation method and then DNA extraction was performed by phenol-chloroform method on these samples. The extraction product was used in the PCR reaction based on the identification of the β-giardin gene. Finally, the product of PCR reaction was sent to the sequencing.

Results:
In this study, 25 samples of *Giardia*-infected feces were examined by PCR method and 12 of PCR reaction products were sent for sequencing. Ten isolates were 98% similarity to LC508640.1 sequence and two isolates were 97% similarity to JN616244.1. These isolates were recorded in GenBank (MT584765- MT584776). Results of current study showed assemblage A of *Giardia intestinalis* is the dominant in Arak.

Conclusion:
The assemblage of all isolates that obtained from current study was matched with genotype A. Given that assemblage A is mostly contaminating humans and other mammals, it seems the transmission of *Giardia* is zoonotic in Arak city.

Keywords: Anthropozoonotic, Assemblage, Arak, Zoonotic, Giardia, Genotype

* Corresponding author Email: dr.eslami@arakmu.ac.ir