جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره هفدهم /تابستان ۱۳۹۱/۷۱-۶۱

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

امین اکبریان[۱]، جاوید صدرایی[۲]، مهدی فروزنده[۳]

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

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

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

چکیده

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

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

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

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که ژنوتایپ غالب در شهر خرم‌آباد و روستاهای اطراف می تواند ژنوتایپ A باشد ولی بدلیل محدود بودن نمونه ها تحقیقات بیشتری لازم می‌باشد.

کلیدواژگان: ژنوتایپ، ژیاردیا لامبلیا، شهرستان خرم آباد، PCR و تعیین توالی.

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

مقدمه

انگل ژیاردیا لامبلیا دارای توزیع جهانی است که سالانه باعث آلودگی ۲۸۰ میلیون نفر می‌شود و این شایع‌ترین انگل روده‌ای در کشورهای توسعه یافته است. در آفریقا، آسیا و آمریکای لاتین ۲۰۰ میلیون نفر دارای آلودگی ژیاردیا هستند که ۵۰۰۰۰۰ نفر دارای علائم بالینی هستند (۱). ژیاردیا لامبلیا یک انگل با انتشار وسیع در پستانداران از جمله انسان است. بدلیل وجود ناقلین سالم انگل، این مساله مطرح شده که احتمالا تفاوتهای ژنتیکی در این گونه وجود دارد. بررسیهای اخیر نشان داده که هفت گروه ژنتیکی یا اسمبلیج در این گونه وجود دارد. اسمبلیج های A

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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

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

روش بررسی

جمع آوری نمونه

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

روش تشخیص آزمایشگاهی *ژیاردیا لامبلیا* در نمونه مدفوع تشخیص اولیه انگل در مدفوع با تهیه گسترش مستقیم (سرم فیزیولوژی و لوگول) انجام شد، سپس نمونه‌های مدفوع مثبت جمع آوری شده به منظور حفظ انگل تا انجام آزمایش با محلول دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ به خوبی مخلوط شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد، سپس نمونه‌ها از الک شماره ۸۰ عبور داده شد و محلول صاف شده با دی کرومات پتاسیم ۵٪ در فالکون ۱۵ میکرولیتر نگه داری شد. از محلول صاف شده جهت تایید مجدد آلودگی لام مستقیم تهیه شد.

آماده سازی نمونه مدفوع برای استخراج DNA

شستشوی نمونه‌های مدفوع مثبت با بافر PBS[1] برای زدودن دی کرومات پتاسیم انجام شد و در نهایت رسوبهای شسته شده تا انجام سایر آزمایشات مولکولی در فریزر نگه داری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA با روش فنل/ کلروفورم و کیت‌های استخراج DNA از مدفوع بیونر[2] و کیاژن[3] با موفقیت بر روی تمام نمونه‌های مثبت انجام شد. مراحل استخراج با روش فنل/ کلروفورم به صورت زیر انجام شد (۴):

به مقدار تقریبی ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه ۱۷۰ میکرولیتر بافر TE[4]، ۷۰ میکرولیتر SDS[5] و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ ساعت در بن ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد. سپس به نمونه ۱۰۰ میکرولیتر Nacl و ۱۰۰ میکرولیتر CTAB[6] اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۶ درجه نگه داری شد. پس از آن به نمونه ۷۰۰ میکرولیتر کلروفورم ایزوآمیل الکل اضافه شد. سپس DNA با افزودن ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد رسوب داده شد. در نهایت با افزودن ۷۰ میکرولیتر آب مقطر استریل DNA رقیق شد و تا انجام PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شد.

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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

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

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

نتایج

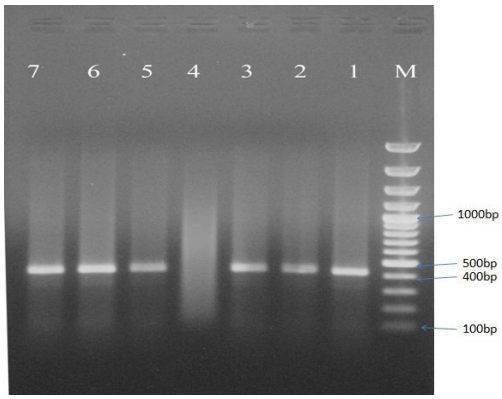
نتایج نمونه گیری

۳۰ نمونه مثبت از شهر خرم آباد و روستاها جمع آوری شد. علاوه بر انگل مورد نظر در این تحقیق از نمونه مناطق روستایی یک مورد تخم آسکاریس و دو مورد تخم هیمنولپیس نانا نیز مشاهده شد.

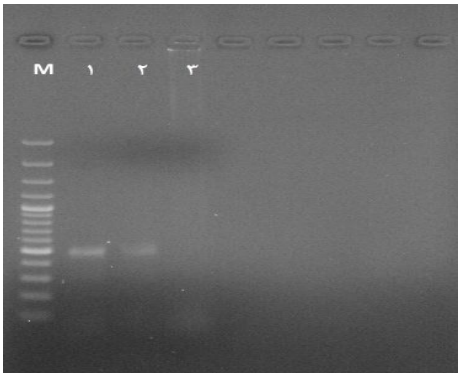
نتایج الکتروفورز روی ژل

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

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



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



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

7 - Master mix

نتایج تعیین توالی ایزوله‌های ژیاردیا لامبلیا

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

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

TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACTCTGCTCTCGGCCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCG
ATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCC
AGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCCTGCCGGCGACATCGGCGTCGG
CGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAGGC
AAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCCTTCATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAGG
AGATGTGCAAGGACAAC

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

<u>TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGT</u>GTCCAGTACAACTCTGCTCTCGGCCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCG
ATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCC
AGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCCTGCCGGCGACATCGGCGTCGG
CGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAGGC
AAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCCTTCATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAGG
AGATGTGCAAGGACAAC

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

TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACTCTGCTCTCGGCCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCGCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCC
GATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGC
CAGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCCTGCCGGCGACATCGGCGTCG
GCGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAG
GCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCCTTCATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGA
GGAGATGTGCAAGGACAAC

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

TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACTCTGCTCTCGGCCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCG
ATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCC
AGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCCTGCCGGCGACATCGGCGTCGG
CGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAGGC
AAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCCTTCATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAGG
AGATGTGCAAGGACAAC

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

TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACTCTGCTCTCGGCCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCAC
CCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCG
ATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCC
AGTCCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACCCTGACGTTCCTGCCGGCGACATCGGCGTCGG
CGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAGGC
AAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCCTTCATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAGG
AGATGTGCAAGGACAAC

نتایج هم ردیفی[8] توالی‌های نوکلئوتیدی

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

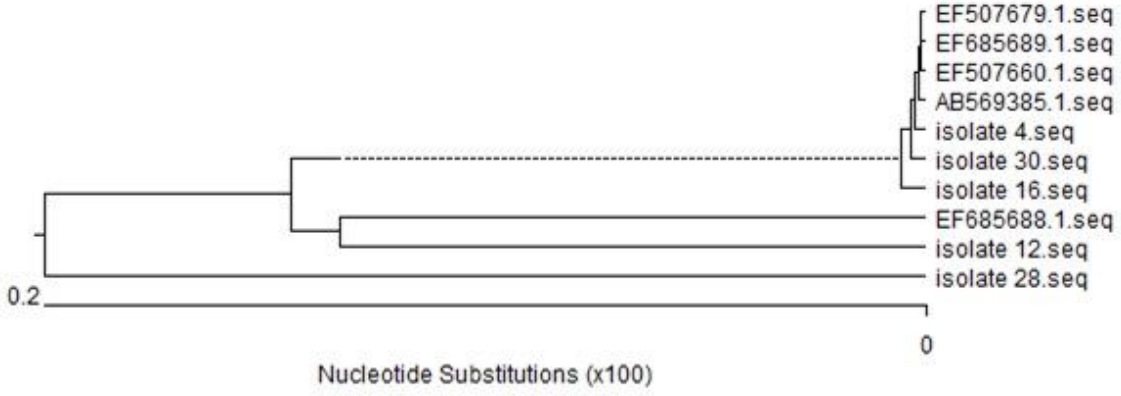
8- Alignment

شکل ۳ -هم ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی *ژیاردیا لامبلیا* در ناحیه GDH.

```
ایزوله ۴      TCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACTCTGCTCTCGGCCCCTACAAGGGTG 60
ایزوله ۲۸     ............................................................ 60
ایزوله ۳۰     ............................................................ 60
ایزوله ۱۶     ............................................................ 60
ایزوله ۱۲     ............................................................ 60
              ************************************************************

ایزوله ٤      GCCTCCGCTTCCACCCCTCTGTCAATCTTTCGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGA 120
ایزوله ۲۸     ........................................................... 120
ایزوله ۳۰     ........................................................... 120
ایزوله ۱۶     ........................................................... 120
ایزوله ۱۲     ...................................G....................... 120
              ************************************************************

ایزوله ٤      TCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCGATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTG 180
ایزوله ۲۸     ........................................................... 180
ایزوله ۳۰     ........................................................... 180
ایزوله ۱۶     ........................................................... 180
ایزوله ۱۲     ........................................................... 180
              ************************************************************

ایزوله ٤      ACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCTTCATGACCGAGC 240
ایزوله ۲۸     ........................................................... 240
ایزوله ۳۰     ........................................................... 240
ایزوله ۱۶     ........................................................... 240
ایزوله ۱۲     ........................................................... 240
              ************************************************************

ایزوله ٤      TCCAGAGGCACGTCGGCGCCGACACTGACGTTCCTGCCGGCGACATCGGCGTCGGCGCCC 300
ایزوله ۲۸     ......................C.................................... 300
ایزوله ۳۰     ........................................................... 300
ایزوله ۱۶     ........................................................... 300
ایزوله ۱۲     ........................................................... 300
              ************************************************************

ایزوله ٤      GCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTCC 360
ایزوله ۲۸     ........................................................... 360
ایزوله ۳۰     ........................................................... 360
ایزوله ۱۶     ........................................................... 360
ایزوله ۱۲     ........................................................... 360
              ************************************************************

ایزوله ٤      TCACAGGCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCCTTCATCAGGCCGGAGGCTACGGGCTATG 420
ایزوله ۲۸     ........................................................... 420
ایزوله ۳۰     ........................................................... 420
ایزوله ۱۶     ........................................................... 420
ایزوله ۱۲     ........................................................... 420
              ************************************************************

ایزوله ٤      GCGCTGTCTACTTCCTGGAGGAGATGTGCAAGGACAAC 458
ایزوله ۲۸     ....................................... 458
ایزوله ۳۰     ....................................... 458
ایزوله ۱۶     ....................................... 458
ایزوله ۱۲     ....................................... 458
              ***************************************
```

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

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



شکل ۴ نتیجه آنالیز فیلوژنتیک نمونه‌های *ژیاردیا لامبلیا* با نمونه‌های مشابه در بانک ژن

نتایج حاصل از مقایسه نمونه‌ها با نمونه‌های موجود در بانک ژن

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

جدول۱. مقایسه توالی ژن GDH با ایزوله‌های موجود در بانک ژن

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

بعد از استخراج DNA تکثیر ژن GDH، با استفاده از PCR انجام شد که از ۳۰ نمونه ۲۴ نمونه مثبت شدند. برای تعیین اختلافات ژنتیکی بر روی ۵ نمونه تعیین توالی انجام شد. هم ردیفی[۹] توالی ژن GDH نشان داد که همه ۵ نمونه از ژنوتایپ A بودند. این یافته‌ها نشان داد که ایزوله‌های شهرستان خرم آباد و روستاهای اطراف آن، می توانند از لحاظ ژنوتایپ شبیه هم باشند، اما مطالعات بیشتری نیاز است.مرتب سازی چندگانه با استفاده از سایت ncbi انجام شد و مشخص شد که در ایزوله ۱۲ (که ایزوله منطقه روستایی بود) باز شماره ۹۷ از T به G و در ایزوله ۲۸ (که ایزوله منطقه شهری بود) باز شماره ۲۶۴ از A به C تغییر یافته است.

بحث

در این مطالعه ۳۰ نمونه که با روش میکروسکوپی مثبت بودند با روش مولکولی۲۴ مورد آنها مثبت شد با توجه به محدودیت بودجه امکان تعیین توالی همه نمونه ها میسر نشد لذا بصورت تصادفی ۳ نمونه شهری و ۲ نمونه روستایی تعیین توالی شدند و همه آنها از ژنو تایپ A بودند.

در مطالعه‌ای که ویلک[۱۰] و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام دادند. مشخص شد که دیکرومات پتاسیم ۵٪ نگه‌دارنده خوبی برای کیست‌های *ژیاردیا لامبلیا* است در این مطالعه آن‌ها ۴ نگه‌دارنده مختلف را از لحاظ DNA استخراج شده با هم مقایسه کردند. نمونه‌های مثبت ژیاردیا که از طریق میکروسکوپ تشخیص داده شده بودند، در دیکرومات پتاسیم ۵٪، فرمالین ۴٪، اتانول مطلق و PBS نگه داری شدند و در بازه‌های زمانی مختلف از لحاظ کیفیت DNA یی که از آن‌ها استخراج شد با هم مقایسه گردیدند. از ژن 18S SSU-rRNA برای PCR استفاده شد. در نهایت این نتیجه به دست آمد که نگهداری کیست ژیاردیا در دیکرومات پتاسیم ۵٪ و ۴°C بهتر از سه نگه‌دارنده دیگر است (P= ۰/۰۱۶)(۳). اگر چه بعضی تحقیقات نشان داده که استفاده از نمونه مدفوع تازه باعث جلوگیری از منفی کاذب شدن جواب می شود (۴) ولی دراین تحقیق، چون نمونه‌ها به صورت متوالی از آزمایشگاه‌های سطح شهر و روستا جمع آوری می‌شدند و جمع آوری این نمونه‌ها به طول انجامید، استفاده از دی کرومات پتاسیم به عنوان نگه‌دارنده کیست‌ها اجتناب نا پذیر بود.

در سال ۲۰۰۵ لالی[1] و همکاران در ایتالیا با استفاده از توالی ژن بتا ژیاردین به بررسی هتروژنی *ژیاردیا لامبلیا* نمونه‌های انسانی و حیوانی پرداختند. ۳۷ نمونه انسانی با استفاده از تعیین توالی ژن بتا ژیاردین تعیین ژنوتایپ شدند. ۱۶ ایزوله ژنوتایپ A، ۱۰ ایزوله ژنوتایپ B و ۱۱ نمونه دارای هر دو ژنوتایپ بودند. از ۲۱ ایزوله سگ، ۶ ایزوله از ژنوتایپ A، ۱ ایزوله از ژنوتایپ C، ۱۳ ایزوله از ژنوتایپ D و یک ایزوله دارای ژنوتایپ‌های A و D بودند. نمونه های گربه با استفاده از تعیین توالی کد کننده ژن GDH تعیین ژنوتایپ شد که ژنوتایپ F بود. از نمونه‌های گاوی یک زیر ژنوتایپ جدید در ژنوتایپ A دیده شد. ۱۳/۵ درصد از ایزوله‌های گاوی شامل ژنوتایپ‌های A و B، ۱۳/۵در صد از ژنوتایپ B بودند و بقیه از سایر ژنوتایپ‌ها بودند. در این مطالعه که به بررسی توانایی زئونوز بودن *ژیاردیا لامبلیا* پرداخته شده‌بود نقش زیر ژنوتایپ AI در زئونوز بودن به طور واضح نشان داده شد(۶).

ایتاگی[11] در ژاپن برای تعیین ژنوتایپ ایزوله‌های *ژیاردیا لامبلیا* از نمونه‌های حیوانات اهلی و وحشی یک مطالعه با استفاده از ژن GDH انجام داد. ایزوله‌های سگ شامل گروه‌های ژنتیکی A، C، D، و A/D، ایزوله‌های گربه فقط از گروه ژنتیکی F، ایزوله‌های گاو شامل گروه‌های ژنتیکی A و E، ایزوله‌های میمون فقط از گروه ژنتیکی B بودند.

1- Lalli

11- Itagaki

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

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

جلانئو[۱۳] و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی ژنتیکی ایزوله‌های ژیاردیای انسانی در اتیوپی پرداختند. از قطعه ژن بتا ژیاردین برای انجام PCR لانه‌ای استفاده کردند. از ۵۹ ایزوله به وسیله RFLP آزمایش شده‌بودند، ۵۲٪ از ژنوتایپ A و ۲۲٪ از ژنوتایپ B بودند. یک ارتباط قوی بین ژنوتایپ B و نشانه‌های بیماری مشاهده شد. ۲۵٪ دارای عفونت مختلط بودند. با استفاده از تعیین توالی عفونت‌های مختلط A+F به اثبات رسید. این اولین بار بود که ژنوتایپ F که به گربه اختصاص دارد در انسان مشاهده شد(۹).

لئونارد[۱۴] و همکاران در سال ۲۰۰۷ نمونه‌های مدفوع را از سگ‌های خانگی جمع آوری کردند. از ۶۰ نمونه ژیاردیا مثبت، در ۵۵ نمونه تکثیر ژن 18S rDNA به طور موفق انجام گرفت. ژنوتایپ A بیشترین شیوع را داشت بعد از آن عفونت مختلط ژنوتایپ‌های A و C بالا بود و ژنوتایپ‌های C و D به تنهایی کم‌ترین شیوع را داشتند(۱۰).
فلاح و همکاران در سال ۲۰۰۸ یک مطالعه در آذربایجان شرقی انجام دادند. در این مطالعه ۳۲۵ نمونه مدفوع مثبت بودند و از ژن TPI برای تعیین ژنوتایپ استفاده شد از میان نمونه‌ها به طور تصادفی از ۳۴ نمونه مدفوع استخراج DNA و PCR انجام گرفت که ۳۱ نمونه (۹۱/۱٪) مثبت و ۳ نمونه (۸/۸٪) منفی شدند. در نتیجه انجام RFLP ۱۳نمونه (۴۱/۹٪) از ژنوتایپ B و ۱۷ نمونه (۵۴/۸٪) از ژنوتایپ A بودند در ضمن یکی از نمونه‌ها با هر دو ژنوتایپ آلوده بود. نتایج نشان داد که روش PCR یک روش مناسب و آسان برای تشخیص آلودگی مدفوع است. علاوه بر آن نشان داده شد که ژنوتایپ‌های A و B در استان آذربایجان شرقی آندمیک هستند(۱۱).

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

1- Minvielle
13- Gelanew
14- Leonhard

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

با توجه به مطالعات ذکر شده، در این تحقیق استخراج DNA با روش فنل/ کلروفورم و کیت های بیونر[15] و کیاژن انجام شد که روش فنل/ کلروفورم در مقایسه با کیت ها بهتر نتیجه داد و با توجه به اینکه در اغلب بررسی ها ژن GDH استفاده شده بود در این بررسی هم از این ژن استفاده گردید. در روش مولکولی باید دقت کرد چون احتمال منفی شدن نمونه بدلیل شستشو های مکرر فیکساتیو بدلیل کم شدن انگل وجود دارد بنابراین توصیه می شود از نمونه تازه استفاده گردد. با توجه به مطالعات محققین ذکر شده گونه های انسانی از ژنوتیپ A و B می باشند ولی در مطالعه حاضر فقط ژنوتیپ A مشاهده شد و تفاوتی بین نمونه های شهری و روستایی مشاهده نگردید در حالیکه انتظار می رفت بدلیل تماس بیشتر روستاییان با حیوانات اهلی ژنوتیپ متفاوتی از نوع شهری مشاهده شود. در مطالعه مینویلی سه ایزوله‌ای ژنوتایپ AII از کودکان به دست آمده که این کودکان مدفوع اسهالی نداشتند و علائم خفیفی داشتند. این ژنوتایپ در حیوانات دیده نشد. شیوع ژنوتایپ B در کودکان و بالغین بسیار بالا بود. این ژنوتایپ همچنین در افراد با نشانه‌های بیماری مختلف مشاهده شد که بیشتر آن‌ها به اسهال مبتلا بودند. برخی منابع ژنوتیپ B را عامل اسهال معرفی کرده‌اند ولی دراین مطالعه این ژنوتیپ مشاهده نشد و این مساله می تواند بدلیل تعداد کم نمونه های مورد بررسی و تعیین توالی شده باشد.

نتیجه گیری

از ۲۴ نمونه مثبت بصورت تصادفی ۳ نمونه شهری و ۲ نمونه روستایی تعیین توالی شدند و همه آنها از ژنو تایپ A بودند. این مطالعه نشان داد که ایزوله های شهر خرم آباد و روستاهای اطراف آن می توانند از لحاظ ژنوتایپی شبیه هم باشند اما جهت اظهار نظر قطعی مطالعات دیگری نیاز است.

تشکر و قدردانی

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

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

Reference

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