Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.13, No.2, Summer 2013, Page 164 -173

Study of the Genetic Resemblance of tpi Gene in Cat and Human Giardia Using PCR-RFLP Method

Pezeshki A[1], Rezaeian M[2], Zarebavani M*[3]

[1]Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[2]Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Hygiene, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Departmentof Microbiology and Parasitology, Schoolof Allied Health Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding Author. Tel: +982182944645 Fax: 02182944645 E-mail: zarebava@tums.ac.ir

Received: 24 Dec 2012 Accepted: 18 Apr 2013

ABSTRACT

Background & Objectives: *Giardia duodenalis* is the most common intestinal parasite with cosmopolitan distribution. This parasite has been found in the intestine of humans and other mammalian hosts including cats, dogs, cattle, sheep, deer, pigs and muskrats. It is postulated that animals maybe reservoir for human infection and viceversa. In present study, the possible genetic similarity between cat and humans Giardia and its probable zoonosis were investigated.

Methods: Direct examination and formalin-ether concentration techniques were performed on stray and semi stray cat fecal specimens. Gradient sucrose method was applied for collection and purification of cysts and DNA extraction was performed by phenol-chloroform and CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromid) methods. DNA of cysts could hardly be extracted after repeated freezing and thawing. Polymerase chain reaction (PCR) was performed for DNA amplification. In this study triosephosphate isomerase (tpi) gene was selected as a molecular marker. Two sets of primers (PM 290 and PM 924) were considered. Two restriction enzymes *RsaI* and *AvaI* were also used to determine restriction fragment length polymorphism (RFLP) for PCR fragments amplified by both primer sets.

Results: Ten samples were positive for Giardia cysts which were examined for molecular investigation. Four cat isolates were amplified by PM 290. PCR-RFLP patterns were found to be similar to human isolates AC≠AF 069556 (subgroup of AC≠U 57897) with possibility of cross-transmission.

Conclusion: Therefore the similarity of genomic characters of isolates of cat and human Giardia implies possibility of zoonosis and transmission of these protozoa from cat to human and vice versa.

Key words: PCR-RFLP; Giardia; Cat; Human

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

بررسی تشابه ژن tpi در ژیاردیای گربه و انسان با استفاده از روش PCR-RFLP

علی پزشکی[۱]، مصطفی رضائیان[۲]، میترا زارع بوانی[۳]*

[۱] گروه انگل شناسی و میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران [۲] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران [۳] گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۸۲۹٤٤٦٤٥ فاکس: ۰۲۱۸۲۹٤٤٦٤٥ پست الکترونیک: zarebava@tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *ژیاردیا دئودنالیس* شایعترین انگل روده ای با انتشار جهانی است. این انگل در بسیاری از گونه های حیوانات از جمله گربه، سگ، گاو، گوسفند، گوزن، خوک و موش آبی به انضمام انسان یافت می شود. در این مطالعه احتمال تشابه ژنومی *ژیاردیا دئودنالیس* انسان و گربه و نیز احتمال زئونوز بودن (بیماری مشترک میان انسان وحیوان) آن بررسی گردیده است.

روش کار: آزمایش به دو روش مستقیم و روش تغلیظی فرمل- اتربر روی مدفوع گربه انجام شد. در نمونه‌های مثبت حاوی کیست ژیاردیا، جمع آوری و تخلیص کیست ها با روش گرادیان ساکارز صورت پذیرفت. جهت استخراج DNA از روش فنل- کلروفرم و روش Cetyl trimethyl ammonium bromid (CTAB) استفاده گردید. DNAی کیست ها به سختی و با تکرار فریز و ذوب کردن استخراج شد. ژن تریوز فسفات ایزومراز (tpi) در نظر گرفته شد. سپس تکثیر DNA با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) انجام شد. دو جفت پرایمر اختصاصی PM290 و PM924 که به ترتیب دو آمپلیکون ۲۹۰ و ۹۲٤ جفت بازی را تکثیر می‌نمایند، مورد استفاده قرار گرفتند. برای هضم آنزیمی restriction fragment length polymorphism (RFLP) قطعات حاصل از تکثیر توسط این دومجموعه پرایمر، از آنزیمهای هضم کننده *RsaI* و *AvaI* استفاده گردید.

یافته ها: در این مطالعه ۱۶۶ نمونه مدفوع گربه ولگرد و نیمه ولگرد جمع آوری شد.۱۰ نمونه مدفوع از نظر کیست ژیاردیا مثبت بودند، که مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. ٤ مورد از این نمونه ها با پرایمرهای PM290 تکثیر و باند در ناحیه ۲۹۰ دادند. هیچیک از نمونه ها با پرایمر PM 924 تکثیر نشدند. الگوی PCR-RFLP ایزوله های تکثیر یافته با ایزوله‌های انسانی AC≠AF069556 (زیرگروه AC≠U57897) تطابق داشتند.

نتیجه گیری: در مجموع به نظر می‌رسد که تشابه ژنومی بین ژیاردیای انسانی و گربه‌ای وجود داشته و می‌توان احتمال زئونوز بودن و انتقال این تک یاخته از گربه به انسان و بالعکس (Cross-transmission) را مطرح کرد.

کلمات کلیدی: PCR-RFLP، ژیاردیا، گربه، انسان

دریافت: ۹۱/۱۰/٤ **پذیرش:** ۹۲/۱/۲۹

مقدمه

جنس ژیاردیا شامل تک یاخته تاژکدار دو هسته‌ای است [۱]. دارای دو مرحله در سیکل زندگی می‌باشد که به صورت تروفوزوئیت تاژکدار، در روده کوچک میزبان زندگی می‌نماید و دیگری به فرم کیستی که آلوده کننده بوده و به همراه مدفوع میزبان دفع شده و در محیط برای هفته‌ها باقی می‌ماند [۲]. در سال ۱۹۵۲، Filice سه گونه ژیاردیا را با توجه به شکل جسم میانی[1] شناسایی و طبقه بندی کرد که شامل *G.duodenalis* (مترادف *G.intestinalis* و *G.lamblia*) گروه مشابه از نظر مورفولوژی که انسان و سایر پستانداران را آلوده می‌نماید، *G.agilis* در خزندگان و *G.muris* در جوندگان بودند [۳،٤].

[1] Median Body

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

اخیراً علاوه بر سه گروه معرفی شده توسط Filice دو گونه جدید به نامهای *G.psittaci* و *G.ardeae* در پرندگان شناخته شده‌اند [٤].

این تک یاخته شایعترین انگل روده‌ای با انتشار جهانی است. میزان شیوع عفونت بر اساس سن افراد، منطقه جغرافیایی، شرایط بهداشتی و وضعیت آب مصرفی بین ۲ تا ۵۰ درصد متفاوت می‌باشد. آلودگی با خوردن کمتر از ۱۰ کیست انگل اتفاق می‌افتد. کیست انگل از طریق مدفوع میزبان آلوده دفع و سبب انتشار آلودگی دیگران می‌گردد. دوران دفع کیست انگل از طریق مدفوع فرد مبتلا، چند روز لغایت چند ماه به طول می‌انجامد. کودکان کمتر از ۱۰ سال بیشترین گروه در معرض خطر را تشکیل می دهند [۷-۵]. این تک یاخته یکی از عوامل عارضه التهاب معده- روده ای، سوءِ جذب و دل پیچ های شدید شکم میباشد [۸]. همچنین به عنوان یکی از عوا مل اصلی اسهال اپیدمیک نیز به حساب می‌آید [۹،۱۰]. در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین، تقریباً ۲۰۰ میلیون نفر مبتلا به ژیاردیازیس با علائم بالینی هستند [٤]. تنوع ژنتیکی در ژیاردیا دئودنالیس توسط آنالیزهای سرولوژیک [۱۱] بیوشیمیایی [۱۲،۱۳] و ژنتیک مولکولی [١٤] نشان داده شده است.

اطلاعات قابل توجهی نشان می‌دهند که *G.duodenalis* را می‌توان کمپلکس گونه‌ای در نظر گرفت که اعضا آن هر چند از نظر مورفولوژیکی یکسان می‌باشند اما بر اساس بررسی‌های ژنتیکی می‌تواند به هفت اسمبلاژ مجزا تقسیم شود [۱۶،۱۵] و فقط اسمبلاژ A (شامل ایزوله JH وWB) و B و زیرگروه‌های آن در انسان و در گستره وسیعی از میزبانان پستاندار دیگر یافت شده است و سایر اسمبلاژها (C تا G) از نظر میزبان اختصاصی می‌باشند [۱۷]. در این تحقیق ایزوله‌های ژیاردیادئودنالیس از گربه برای ارزیابی پتانسیل انتقال زئونوتیک عفونت ژیاردیایی برای ژن تریوز فسفات ایزومراز انسانی بررسی ژنتیکی شدند.

شواهد دال بر انتقال زئونوتیک ژیاردیا بسیار قوی است، اما به چه میزان و تحت چه شرایطی این انتقال اتفاق می‌افتد و همچنین نقش حیوانات در انتقال به انسان هنوز مشخص نشده است [۱۸،۱۹]. به علت افزایش روزافزون و نگهداری حیوانات خانگی از جمله گربه و آپارتمان‌نشینی و تماس نزدیک با انسان خطر انتقال عوامل بیماریزا مانند ژیاردیا از حیوانات به انسان یا برعکس وجود دارد، لذا جهت ارزیابی احتمال انتقال زئونوتیک این انگل در ایران ایزوله‌های ژیاردیا بدست آمده از گربه در مقایسه با سویه انسانی که در ایران بدست آمده است مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

جمع آوری نمونه

در این تحقیق از نمونه مدفوع گربه های ولگرد و نیمه ولگرد به روش تله گذاری استفاده شد و ۱۶۶ نمونه از نقاط مختلف تهران جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت تشخیص کیست ژیاردیا دئودنالیس به روش مستقیم و روش تغلیظی فرمل- اتر [۲۰] بررسی گردیدند. نمونه‌های مثبت از نظر کیست *ژیاردیا* به روش گرادیان سوکروز تخلیص و کیست‌ها به طور خالص جمع‌آوری شدند [۲۱].

استخراج DNA

برای استخراج DNA ابتدا نمونه های حاوی کیست ۱۵ بار انجماد و ذوب شدند که جهت انجماد از نیتروژن مایع و جهت ذوب از دمای جوش استفاده شد. سپس استخراج DNA با دو روش فنل- کلروفرم [۲۲] و روش (CTAB)[1] [۲۳] انجام گردید که با استفاده از روش CTAB نتیجه بهتری حاصل شد.

پرایمرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCR

[1] Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

طبق اطلاعات بدست آمده در بانک ژنی، ژن تریوزفسفات ایزومراز ایزوله‌های مختلف ژیاردیا (ایزوله JH) AC#U57897، (ایزوله AC#L02120 WB) و AC#AF069559، AC#AF069558، AC#AF069556 (زیرگروه‌های JH) بدست آمد.

دو جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده در توالی ژن tpi [۲٤] که اختصاصی گونه ژیاردیادئودنالیس انسانی می‌باشند به منظور تکثیر ژن مذکور مورد استفاده قرار گرفت.

PM290-F - 5`-GCC ATT GCT GCC CAC AAG AT -3`
PM290 - R-5`-GTC ATC CCC TTT TCT AGA GC-3`
PM924-F- 5`-TCA TGC ACC GTC ATT TGG AG-3`
PM924-R - 5`-AGT TGC TTC CAT TGG CCG AT-3`

آنزیم‌های هضم کننده *RsaI* و *AvaI* که قادر به شناسائی اختلاف توالی در ژن مذکور بودند توسط نرم‌افزار DNASIS انتخاب گردیدند. هر دو آنزیم نامبرده بر روی قطعه ۹۲٤ bp حاصل از تکثیر با PM924 جایگاه دارد و با این آنزیم‌ها گروه JH و WB ژیاردیادئودنالیس قابل افتراق از یکدیگرند. چنانچه نمونه‌ای فقط با PM290 تکثیر شود (حاصل تکثیر قطعه ای به طول۲۹۰ bp است) نشان دهنده این است که زیر گروهی از گروههای نامبرده می‌باشد و فقط آنزیم *RsaI* جهت افتراق به کار برده می‌شود و آنزیم *AvaI* بر روی این قطعه جایگاهی ندارد.

انجام واکنش PCR

مقدار مواد لازم برای انجام PCR عبارت بود از:
۲۰ pmol از هر یک از پرایمر های رفت و برگشت، ۱/۵ mM $MgCl_2$، ۱۰ mM dNTPs، Taq DNA polymerase ۱U، ۱۰ X PCRbuffer و Template DNA ۱۰۰ng که با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد و با دستگاه ترموسیکلر ساخت شرکت استرالیایی CORBETT RESEARCH تحت شرایط ذیل انجام گرفت.

شرایط PCR

مرحله واسرشته شدن[1] اولیه به مدت ٤ دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد و سپس مرحله واسرشته شدن، جفت شدن[2] و گسترانیدن[3] هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه و ۳۵ مرتبه تکرار گردید. دمای جفت شدن برای پرایمر PM290 ۵۲/۵ درجه و برای پرایمر PM924 ۵۸/۵ درجه و دمای مرحله گسترانیدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد و نهایتاً واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

جهت تایید انجام PCR و اطمینان از تکثیر قطعه مورد هدف در مورد هر ایزوله، محصول PCR باید رویت می شد. مشاهده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

RFLP

برای انجام هضم آنزیمی، ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم *RsaI*، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم و ۱۵ میکرولیتر محصول PCR مربوط به پرایمر PM290 در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید و بلافاصله محلول آنزیمی تهیه شده به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای مشاهده قطعات حاصل از برش و تفکیک هر چه بهتر قطعات مختلف به دست آمده از هضم آنزیمی از الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید۱۰٪ و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره استفاده گردید.

یافته ها

نمونه‌های انسانی که به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند یا گروه JH با شماره دسترسی AC#U57897 بوده که هر دو آنزیم *RsaI* و *AvaI* بر روی آن جایگاه داشته و الگوی هضم آنزیمی آن طبق جدول ۱ می‌باشد (شکل ۱) و یا زیرگروه JH با شماره دسترسی AC#AF069556 بوده و فقط

[1] Denaturation
[2] Annealing
[3] Extension

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

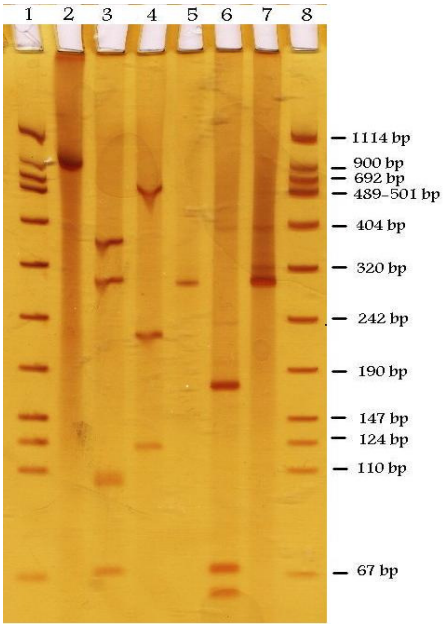
آنزیم *RsaI* روی آن جایگاه دارد و الگوی هضم آنزیمی آن طبق جدول ۲ می‌باشد (شکل ۲).

جدول ۱. قطعات حاصله از تاثیر آنزیمهای هضم کننده RsaI وAvaI برروی محصول PCR ایزوله‌های انسانی (۹۲٤ bp) و جفت پرایمر PM924

ایزوله‌های انسانی / آنزیم	AC#U57897	AC# L02120
	قطعات حاصله از هضم ۹۲٤bp	قطعات حاصله از هضم ۹۲٤ bp
RsaI	۳٦٤، ۲۹۷، ۱۰۱، ۹۷، ٦۵	٤٦۵، ۲۹۷، ۹۷، ٦۵
AvaI	۵۹۲، ۲۱۳، ۱۱۹	۸۰۵، ۱۱۹

جدول ۲. قطعات حاصله از تاثیر آنزیمهای هضم کننده RsaI برروی محصول PCR نمونه‌های انسانی (۲۹۰ bp) جفت پرایمر PM290

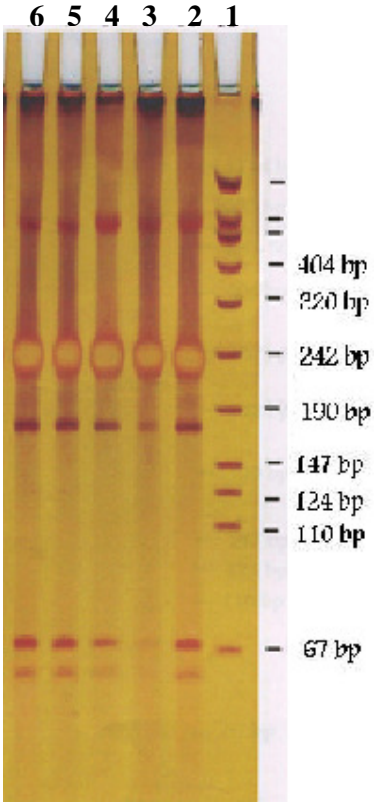
ایزوله‌های انسانی / آنزیم	AC# 069558	AC#069559	AC#AF069556
	قطعات حاصله	قطعات حاصله	قطعات حاصله
RsaI	۱٦۷، ۱۲۳	۹۸، ٦۹، ٦۵، ۵۸	۱٦۷، ٦۵، ۵۸



شکل ۱. نتایج حاصله از PCR-RFLP ایزوله انسانی

ستون ۱ و ۸- DNA marker شماره VIII (Roche)
ستون ۲- قطعه ۹۲٤ bp حاصل از PCR با پرایمر PM 924
ستون ۳- الگوی باندی قطعه ۹۲٤ bp پس از هضم با آنزیم RsaI
ستون ٤- الگوی باندی قطعه ۹۲٤ bp پس از هضم با آنزیم AvaI
ستون ۵- قطعه ۲۹۰ bp حاصل از PCR با پرایمر PM 290
ستون ٦- الگوی باندی قطعه ۲۹۰ bp پس از هضم با آنزیم RsaI
ستون ۷- الگوی باندی قطعه ۲۹۰ bp پس از هضم با آنزیم AvaI

در طی این پژوهش ۱۰ نمونه مدفوع گربه های ولگرد و نیمه ولگرد که از نظر کیست ژیاردیا مثبت بودند (٦٪ = ۱۰/۱٦٦) مورد بررسی قرار گرفتند که پس از تخلیص DNA واکنش PCR بر روی ژن با هر دو مجموعه پرایمرهای PM290 و PM924 انجام گردید که از این تعداد ٤ مورد از نمونه‌ها برای چندین بار متوالی فقط با پرایمرهای PM290 تکثیر شدند و با پرایمرهای PM924 تکثیر نگشتند.



شکل ۲. نتایج بدست آمده پس از هضم با آنزیم RsaI بر روی قطعه ۲۹۰ bp حاصل از PCR با پرایمر PM 290 بر روی ژل اکریل آمید۱۰٪

ستون ۱- DNA marker شماره VIII (Roche)
ستون ۲- PCR-RFLP ایزولهٔ انسانی
ستون ۳، ٤، ۵ و ٦- PCR-RFLP ایزوله‌های گربه‌ای

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

۶ ایزوله گربه‌ای تکثیر نشدند. تمام ایزوله‌هایی که با پرایمر PM290 تکثیر شده بودند پس از انجام عمل هضم با آنزیم RsaI در نواحی ۵۸bp، ۶۵bp و ۱۶۷bp باند ایجاد کردند که طبق جدول۱ با سویه AC#AF069556 که زیرگروهی از گروه JH با شماره دسترسی AC#U57897 می‌باشد، مطابقت دارد (شکل ۲) و در واقع با ایزوله‌های انسانی که با پرایمر PM290 تکثیر و با آنزیم *RsaI* برش داده شده بودند، مطابقت داشتند [۲٤].

بحث

آگاهی از ژیاردیازیس به عنوان یک بیماری مهم انسان، سبب شده تا مطالعات زیادی روی انگل عامل آن انجام پذیرد. هر چند، هنوز کمبودهای اساسی در دانش ما در مورد تمام جنبه های بیولوژی ارگانیسم و بیماری وجود دارد و اهمیت حیوانات به عنوان میزبانان مخزن بیماری انسان هنوز کاملا مشخص نشده است و گونه‌های ژیاردیا که در حیوانات پست تر یافت می‌شوند معلوم نیست مشابه گونه‌های انسانی باشند. اخیراً توجه روی مسأله تکوین گونه‌های جدید[1] معطوف گشته و مشخص گردیده که ارگانیسم های تیپ *G.duodenalis* در بسیاری از گونه‌های حیوانات به انضمام انسان یافت می‌شوند [۲۵]. در بررسی که توسط Nash و همکاران روی مسئله زئونوز بودن انگل ژیاردیا انجام گرفت مشخص شد که تفاوت کمی بین ایزوله‌های انسانی، گربه، خوکچه هندی، سگ‌آبی و خرگوش وجود دارد. لذا به نظر می‌رسد احتمال اینکه ژیاردیای انسان به حیوان و بالعکس منتقل شود، بدین معنی که ژیاردیازیس یک بیماری زئونوز باشد وجود دارد [۱۱،۲۶]. از طرفی مطالعات اپیدمیولوژیک بر روی ژیاردیازیس انسان و نقش پستانداران اهلی و وحشی به عنوان یک منبع عفونت، نشان دهنده این است که ایزوله‌های ژیاردیا از انسان می‌تواند حیوانات دیگر را آلوده کند و این اصل وجود دارد که *G.duodenalis* دارای توان آلوده کردن انسان و حیوانات می‌باشد. بنابراین اخیراً به عنوان یک بیماری Zooanthroponotic شناخته شده است [۲۵،۲۷]. هاپکینز و همکارانش با استفاده از روشهای سکانس زیر واحد کوچک rRNA (ssu-rRNA) و ایزوآنزیمی نشان دادند که برخی ایزوله‌های انسانی، سگی و گربه‌ای متعلق به یک منطقه، مشابه هم بوده‌اند [۲۸]. همچنین ملونی[2] و همکاران در بررسی که انجام دادند از نتایج الکتروفورز ایزوآنزیم بر روی ایزوله‌های به دست آمده از انسان و گربه، به این نتیجه رسیدند که ایزوله Portland-1 (P-1) که منشاء اصلی از منبع انسانی می‌باشد، خصوصیات cat-Portland -1 را نشان می‌دهد و ایزوله P-1 کم و بیش در تمام نقاط دنیا پخش می‌باشد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که سوش‌هایی از *G.duodenalis* که از نظر ژنتیکی مشخص می‌باشند، محدود به یک گونه از میزبان نمی‌شود و امکان انتقال متقاطع[3] وجود دارد و ایزوله‌های گربه‌ای مشابه بسیاری از ایزوله‌های انسانی هستند [۱۳]. انگل های گونه ژیاردیا دئودنالیس از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی بسیار مشابه هم بوده و بنابراین با مشاهده ظاهری آنها و بررسی میکروسکوپ نوری قابل تفکیک از هم نمی‌باشند [۳۱-۲۹]. بنابراین گونه ژیاردیادئودنالیس کمپلکس گونه‌ای بوده که به لحاظ مورفولوژیکی قابل تشخیص نمی‌باشند لذا بررسی مولکولی و ساختار ژنتیکی در افتراق آنها می‌تواند کمک کننده باشد.

در این بررسی چون هدف بررسی احتمال آلودگی انسان به ژیاردیا از گربه و یا برعکس بوده است لذا از پرایمرهایی که جهت تشخیص ایزوله‌های انسانی به

[1] Speciation

[2] Meloni

[3] Cross-Transmission

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

کار برده شده است برای ایزوله‌های گربه‌ای به کار گرفته شده است.

ایزوله‌های انسانی یا با هر دو پرایمر PM924 و PM290 تکثیر می‌شدند که در اینصورت طبق جدول۱ و پس از هضم با دو آنزیم *RsaI* و*AvaI* یا گروه JH با شماره دسترسی AC#U57897 و یا گروه WB با شماره دسترسی AC#L02120 می‌شدند که در ایران سویه غالب گروه JH بدست آمد. برخی از سویه‌های انسانی فقط با PM290 تکثیر شدند که بر روی قطعه تکثیر یافته با این پرایمر فقط آنزیم *RsaI* جایگاه دارد که پس از هضم آنزیمی زیر گروه‌ها را مشخص می‌نماید (جدول ۲). در این تحقیق نمونه انسانی به عنوان کنترل مثبت جهت ایزوله‌های انسانی بدست آمده از ایران استفاده گردید.

ایزوله‌های گربه‌ای و کنترل مثبت همزمان با هر دو پرایمر، مورد بررسی قرارگرفتند. ایزوله‌های گربه فقط با پرایمر PM290 تکثیر شدند که پس از هضم آنزیمی الگوی AC#AF069556 که زیر گروه، گروه JH می‌باشد را نشان دادند (شکل۲).

به علت مشکلات جمع‌آوری مدفوع از گربه‌های ولگرد و دفع تعداد کمی کیست ژیاردیا توسط گربه و نیز مشکلات استخراج DNA از کیست ژیاردیا بر روی ۱۰ نمونه مثبت حاوی کیست این انگل در گربه کار شد.

واکنش PCR بر روی DNA تخلیص شده از کیستهای بدست آمده از مدفوع گربه انجام گردید که با مشکلات عدیده جهت PCR این نمونه‌ها روبرو بودیم که یکی از مشکلات شکستن کیستها برای استخراج DNA بود که برای این کار تعداد مراحل ذوب و انجماد را افزایش دادیم و سرانجام موفق به این کار شدیم. در این مطالعه متوجه شدیم که در اکثر نمونه‌ها، سیگنالها در رقتهای بالاتر دیده می‌شوند تا در رقتهای پائین‌تر، که حکایت از وجود بازدارنده PCR در محیط داشت. لذا لازم بود که بازدارنده‌ها رقیق شوند اما با رقیق شدن بازدارنده‌ها DNA Template، نیز کاهش یافته که در جواب PCR دخالت و باندهای ضعیف ایجاد می‌گردید که در جواب RFLP تداخل می‌نمود، لذا پس از آزمایشات مکرر با Double PCR توانستیم به نتیجه مطلوب دست یابیم. نتایج به دست آمده، با یافته‌های دیگر محققین نیز مطابقت دارد. مهبودانی[1] و همکاران در بررسیهای متعددی که بر روی آب جهت یافتن کیست ژیاردیا انجام داده‌اند به این نتیجه رسیدند که در یافتن کیستهای ژیاردیا توسط PCR، Double PCR حساسیت بیشتری در مقایسه با یکبار PCR دارد و فاکتورهای بازدارنده مانند اسیدهای humic و fulvic که در فاضلاب وجود دارند ممکن است توجیه گر اینکه چرا یک Double PCR جهت به دست آوردن آمپلیکون ژیاردیا نیازمند می‌باشد، باشد [۳۴-۳۲]. هدف دیگر این مطالعه، بررسی الگوی باندی ژن ''tpi'' ژیاردیا با منشاء گربه پس از انجام PCR-RFLP و تعیین تشابه یا عدم تشابه با ایزوله‌های با منشا انسانی و احتمال زئونوز بودن آن می باشد. بر این اساس از ۱۰ ایزوله گربه‌ای مورد ارزیابی ۶ ایزوله پس از انجام PCR تکثیر نشدند که یا به علت از دست دادن کیستهای اندک موجود در نمونه هنگام تخلیص کیستها و در نتیجه عدم وجود DNA در محیط بوده است یا به علت عدم موفقیت در استخراج DNA یا مقدار ناچیز DNA ژنومی یا حضور بازدارنده‌ها در محیط و یا عدم تشابه ایزوله‌های مزبور به ژیاردیای انسانی می‌باشد و ایزوله‌ها مربوط به زیرگروه ژیاردیای گربه (F) بوده‌اند.

همچنان که در بخش نتایج ذکر گردید در ٤ مورد فقط با جفت پرایمر PM290 تکثیر مشابه با ایزوله‌های انسانی صورت گرفت و هیچ تکثیری با جفت پرایمر PM924 مشاهده نشد. الگوی باندی ٤ ایزوله گربه‌ای که فقط با پرایمر PM290 تکثیر

[1] Mahbodani

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

گشتند، پس از انجام RFLP مشابه کیستهای انسانی که فقط با همین پرایمر تکثیر شده‌بودند [۲٤] گشت و زیرگروه JH بدست آمد.

باید خاطر نشان کرد که دراین بررسی اولیه با توجه به مشکلات موجود در بررسی و تشابه مورفوموژیکی و ژنومی در برخی از ایزوله های گربه ای با ایزوله انسانی، به نظر می‌رسد که به نقش گربه ها بایستی توجه بیشتری معطوف داشت و با توجه به اینکه در ایران تعداد گربه های ولگرد زیاد می باشند، تاثیر نقش گربه های ولگرد در انتقال و انتشار این انگل بایستی مد نظر باشد. همچنین در مورد سایر نمونه ها که با پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق تکثیر نشدند باید خاطر نشان کرد که علاوه بر مشکلات ذکر شده که یا به علت عدم استخراج DNA بوده و یا وجود بازدارنده در محیط، بایستی توجه داشت که نمونه های تکثیر نشده با این دو مجموعه پرایمر، سویه های خاص گربه بوده اند که چون هدف از این بررسی تشابه و احتمال انتقال از گربه به انسان یا برعکس و اهمیت و نقش آن در بررسیهای اپیدمیولوژیک می باشد، سویه گربه ای مورد بررسی قرار نگرفت.

نتیجه گیری

با توجه به این بررسی و نتایج به دست آمده، برخی از ایزوله‌های با منشا گربه ای، زیر گروهی از سویه‌های JH می‌باشند که در کیستهای ژیاردیا با منشا انسانی نیز همین زیر گروهها در ایران به دست آمد [۲٤] که با توجه به بررسی محققین در نقاط دیگر دنیا [۲۸] سویه انسانی غالب در ایران (JH) در گربه نیز مشاهده شد. در حالیکه در سایر مناطق دنیا که بر روی انسان و گربه کار شده است سویه انسانی غالب درآن مناطق WB است و سویه گربه ای نیز مطابق با همین سویه انسانی در آن مناطق شده است [۱۳].

باید خاطر نشان کرد که ژیاردیازیس می‌تواند یک زئونوز باشد ولی چیزی که واضح است توان زئونوتیک ژیاردیا ممکن است از یک منطقه اندمیک تا منطقه دیگر تفاوت نماید و در اکثر مناطقی که آلودگی به ژیاردیا بالا می باشد، سطح بهداشتی پائین و عدم آگاهی بهداشتی افراد مشاهده شده و در واقع این خود افراد هستند که در انتقال بیماری از حیوانات به انسان نقش دارند [۳۵].

بنابراین سیستمهای بهداشتی و دامپزشکی باید هشدار لازم را به افراد جامعه در مورد افزایش سطح بهداشتی فردی و عمومی و انتقال بیماریهای زئونوز ازجمله ژیاردیوز که در کودکان شایعتر می‌باشد را بدهند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به خاطر تامین هزینه اجرائی این تحقیق و پرسنل آزمایشگاه تک یاخته های روده ای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران خانمها فرنیا و طریقی و آقای رحیمی و از سرکار خانم دکتر بابائی عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان و همچنین از کلیه پرسنل بخش سلولی- مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را در اجرای این طرح یاری کردند کمال تشکر و قدردانی می گردد.

References

1- Mayerhofer 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. J Parasitol. 1995 Jul; 111: 11-17.

2- Adam RD. The biology of Giardia spp. Microbiol Review. 1991 Dec; 55(4): 706-732.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

3- Meloni BP, lymbery AJ, Thompson RCA. Characterization of Giardia isolates using a non-radiolabled and Probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. Am J Trop Med Hyg. 1989 Jun; 40(6): 629-637.
4- Thompson RCA, Hopkins RM, Homans WL. Nomenclature and genetic grouping of Giardia infecting mammals. Parasitol Today. 2000 May; 16(5): 210-213.
5- Ortega RY, Adam DR. Giardia: overview and apdate. Clin infect Dis. 1997 Sep; 25(3): 545-50.
6- Davidson AR. The treatment of Giardiasis. Am J Gastroenterology. 1984 Apr; 79(4): 250-267.
7- Nash TE. Treatment of *Giardia lamblia* infections. The ped infect Dis J. 2001 Feb; 20(2): 193-194.
8- Farthing MJG. *Giardia lamblia*. MJ Blaser, PD Smith, JI Ravdin, HB Green, RL Guerrant, editors. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven press, 1995: 1081-1106.
9- Mintz ED, Hudson W, Mashar P, carterr ML, Halder JL. Food borne giardiasis in a corporate office setting. J infect Dis. 1993 Jan; 167: 250-253.
10- Barwick RS, Levy DA, Craun GF, Beach MG, Calderon RL. Surveillance for waterborne disease outbreaks, united states, 1997-1998. Morb Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ, 2000 Oct; 49 (ss-4): 1- 35.
11- Nash TE, Keister DB. Differences in excretory-secretory products and surface antigen among 19 Isolates of Giardia. J infect Dis. 1985 Dec; 152: 1166-71.
12- Bertram MA, Mayer EA, LiLe JD, Morse SA. A comparison of isoenzyme of five axenic Giardia isolates. J parasitol. 1983 Oct; 69(5):793-801.
13- Meloni BP, lymbery AJ, Thompson RCA. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of Giardia from humans and felines. Am J Trop Med Hyg. 1988 Jan; 38: 65-73.
14- Nash TE, Mccutchan T, Keister D, Dame JB, Gillin FD. Restriction – endonuclease analysis of DNA from 15 Giardia isolates obtained from man and animals. J Infect Dis. 1985 July; 152: 64-73.
15- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect Genet Evol. 2003 May; 3: 29-38.
16- Jaros D, Zygner W, Jaros S, Wedrychowicz H. Detection of *Giardia intestinalis* assemblages A, B and D in domestic cats from Warsaw, Poland. Polish J Microbiology. 2011 July; 60(3): 259-263.
17- Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis. Vet Parasitol. 2004 Dec; 126(1-2): 15-35.
18- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardian locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int J Parasitol. 2005 Feb; 35(2): 207-13.
19- Monis PT, Thompson RC. Cryptosporidium and Giardia zoonosis. Fact or fiction? Infect Genet Evol. 2003 Nov; 3: 233-244.
20- Ridley DS, Hawgood BC. The value of formol –ether concentration of fecal cysts and ova. J clin pathology. 1956 Feb; 9: 74 -76.
21- Roberts-Thompson IC, Stevens DP, Mahmoud AAF, Warren KS. Giardiasis in the mouse: An animal model. Gastroentrol. 1976 July; 71: 57-61.
22- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatist T. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. cold spring Habor laboratory, New York, 1989: E3-E4.
23- Appelbee AJ, Frederick LM, Heitmen TL, Olson ME. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta – Canada. Vet parasitol. 2003 Mar; 112: 289-294.
24- Zare Bavani M, Rezaian M, Jeddi Tehrani M, Kazemi B. Application of PCR-RFLP for identification of Giardia isolates of human in Iran. Yakhteh J. 2001 Mar; 12: 1-4. (Full text in Persian)
25- Capon AG, upcroft JA, Boreham PFL, cottis LE, Bundesen PG. Similarities of Giardia antigens derived from human and animal sources. Int J parasitol. 1989 Feb; 19(1): 91-98.
26- Suzuki J, Murata R, Kobayashi S, Sadamasu K, Kai A, Takeuchi T. Risk of human infection with *Giardia duodenalis* from cats in Japan and genotyping of the isolates to assess the route of infection in cats. Parasitology. 2011 Apr; 138(4): 493-500.
27- Dixon B, Parrington L, Cook A, Pintar K, Pollari F, Kelton D, et al. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and Cryptosporidium spp from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. Vet Parasitol. 2011 Oct; 176(1-2): 20-26.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]

28- Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wethorall JD, Reynoldson JA, Thompson RCA. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotype of Giardia isolates recovered from humans and dogs living is the same locality. J parasitol. 1997 Feb; 83(1): 44-51.
29- Buret A, Denhollander N, Wallis PM, Betus D, Olson ME. zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. J Infect dis. 1990 July; 162(1): 233-236.
30- Siqi LU, Jianfan WEN, jihong L, Fengyun W. DNA sequence analysis of the triose phosphate isomerase gene from isolates of *Giardia lamblia*. Chinese Med J. 2002 Jan; 115(1): 99-102.
31- Corinne FL, Amar CFL, Dear PH, Jim MCL. Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces. J M Microbiol. 2003 Sep; 52: 681-683.
32- Mahbubani MH, Bej AK, Perlin MH, Schaefer FW, Jakubowski W, Atlas RM. Differentiation of Giardia duodenalis from other spp by using Polymerase Chain Reaction an Gene Probes. J Clinic Microbiol. 1992 Jan; 30(1): 74-78.
33- Cerkasovova A, cerkasov J, Kuld J. Metabolic differences between metronidazole resistant and susceptible strains of tri-trichomonas foetus. Mol Bio Parasitol. 1984 Apr; 11: 105-118.
34- Meyer CL, palmar CJ. Evaluation of PCR, Nested PCR and Fluorescent antibodies for detection of Giardia and Cryptosporidium species in waste water. A Env Microbiol. 1996 Jun; 62(6): 2081-2089.
35- Thompson RCA. Parasitic zoonoses problem created by people, not animals. Int J Parasitol. 1992 Aug; 22: 501-505.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-19]