



نخستین ارزیابی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های انسانی ژیا ردیا دئودنالیس با استفاده از تکنیک Multilocus Sequence Typing (MLST) در استان خوزستان

مهدی تولا^۱، فاطمه عسگریان^{۳*}

۱- گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۳- دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

چکیده

مقدمه: ژیا ردیا دئودنالیس یکی از مهمترین عوامل انگلی منتقله از مصرف آب و مواد غذایی آلوده می‌باشد. از عوامل مؤثر در بیماری‌زایی این انگل، ویژگی‌های ژنتیکی آن می‌باشد. بررسی حاضر اولین مطالعه تعیین ژنوتایپ ژیا ردیا دئودنالیس انسانی با استفاده از تکنیک تایپینگ چندین جایگاه (MLST) از ژن‌های *Housekeeping* است که در استان خوزستان انجام شده است.

مواد و روش‌ها: DNA ژنومی کیست‌های تخلیص شده از ۱۲۹ نمونه مدفوع انسانی استخراج و با تکثیر قطعه ۳۵۰bp از ژن *SSU-rRNA* ژیا ردیا دئودنالیس تأیید گردید. *Nested-PCR* با هدف ژن‌های *tpi* و *β-giardin* و *Semi-Nested PCR* ژن *gdh* به ترتیب جهت تکثیر قطعات ۵۳۰bp، ۵۱۱bp و ۴۳۲bp از ژن‌های فوق انجام و قطعات تکثیر یافته تعیین توالی شدند. سپس اسمبلیج‌ها و ساب اسمبلیج‌ها با تجزیه و تحلیل فیلوژنی شناسایی شدند. **نتایج:** از مجموع ۲۹ نمونه‌ای که در یکی از سه ژن تعیین توالی شدند، ۲۳ نمونه مربوط به اسمبلیج A (۷۹/۳۱ درصد) و ۶ نمونه متعلق به اسمبلیج B (۲۰/۶۹ درصد) بودند. در این مطالعه بین اسمبلیج‌ها با علایم بالینی و محل سکونت ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. تجزیه و تحلیل فیلوژنی، ساب اسمبلیج‌های *AII* و *BIV* را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج اسمبلیج A و ساب اسمبلیج *AII* را به‌عنوان ژنوتایپ غالب استان خوزستان نشان داد و شناسایی ساب اسمبلیج‌های *AII* و *BIV* انتقال از مسیر آنتروپونوتیک را پیشنهاد نمود. تعیین نقش حیوانات در پویایی انتقال ژیا ردیا دئودنالیس نیازمند مطالعات بیشتر و دقیق‌تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ژیا ردیا دئودنالیس، MLST، اسمبلیج، خوزستان.

*نویسنده مسئول: شاهرود، میدان هفتم تیر- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، دانشکده پیراپزشکی، تلفن: ۰۲۳۲۲۳۹۵۰۵۴، نمابر: ۰۲۳۲۲۳۹۵۰۰۹. Email: fa57asgarian@gmail.com

ارجاع: تولا مهدی، فاطمه عسگریان. نخستین ارزیابی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های انسانی ژیا ردیا دئودنالیس با استفاده از تکنیک Multilocus Sequence Typing (MLST) در استان خوزستان. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۹:۱۴۰۳ (۳): ۲۵-۳۸.



مقدمه

ژیاردیا دژودنالیس (اسامی متعارف: ژياردیا لامبلیا و ژياردیا اینتستینالیس) شایع‌ترین عامل گاستروانتریت انگلی در سراسر جهان، تک‌یاخته‌ای تاژکدار متعلق به راسته دیپلوموناد که عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان شایع می‌باشد (۴-۱). شیوع این تک‌یاخته در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه به ترتیب ۷/۵-۰/۴ و ۳۰-۸ درصد با ابتلا سالانه حدود ۲۸۰ میلیون نفر در سراسر جهان می‌باشد و به‌عنوان عامل ایجادکننده ۲ الی ۳ درصد از موارد اسهال مسافرتی نیز شناخته شده است (۱ و ۳-۶). برآورد شیوع ژياردیازیس در ایران حدود ۱۴/۷ درصد است که در نواحی روستایی استان خوزستان به میزان ۱۰/۹۱ درصد گزارش شده است (۷ و ۸). ژياردیازیس از بیماری‌های عفونی منتقله با مصرف آب و مواد غذایی آلوده به کیست به‌عنوان فرم مقاوم و آلوده‌کننده این انگل می‌باشد که در شرایط محیطی ماه‌ها زنده مانده و قابلیت آلوده نمودن انسان و حیوانات را دارد که تاکنون مواردی از آلودگی‌های ناشی از مصرف آب آلوده به آن گزارش شده است (۱ و ۹-۱۱). در تعامل این تک‌یاخته روده‌ای با میزبان اشکال فاقد علائم بالینی و دارای علائم بالینی مشاهده می‌گردد که از اصلی‌ترین علائم ژياردیازیس می‌توان به تهوع، اسهال چرب، استفراغ، درد شکم و نفخ اشاره نمود. از گروه‌هایی که در معرض خطر زیاد آلودگی با این انگل قرار دارند می‌توان به کودکان اشاره نمود که سوء جذب مواد غذایی که به دنبال آلودگی به ژياردیا دژودنالیس در آنها ایجاد می‌گردد می‌تواند منجر به کاهش رشد گردد. در ایجاد علائم و پیشرفت آنها عوامل مختلفی از جمله پاسخ سیستم ایمنی و تغذیه میزبان، میزان آلودگی و ویرولانسی انگل دخیل هستند (۱، ۴، ۶، ۱۲ و ۱۳). علاوه بر وضعیت بدن میزبان در زمان آلودگی، ممکن است یکی از عوامل مؤثر در ایجاد بیماری توسط ژياردیا مربوط به ویژگی‌های ژنتیکی این انگل باشد. کمپلکس گونه‌ای ژياردیا دژودنالیس متشکل از ۸ اسمبلیج (A-H) با اختصاصیت میزبان در برخی از این اسمبلیج‌ها که A و B به‌طور عمده منجر به آلودگی‌های انسانی می‌گردند و هر کدام شامل چندین ساب اسمبلیج (AI-AIV و BI-BIV) می‌باشند که ساب اسمبلیج AI اکثراً از حیوانات جداسازی شده است در حالی که ساب اسمبلیج‌های AII و BIV معمولاً آنتروپونوتیک هستند. از اسمبلیج‌هایی که در حیوانات شناسایی شدند می‌توان به اسمبلیج‌های C و D در سگ‌ها، اسمبلیج E در نشخوارکنندگان و خوک‌ها، F در گربه‌ها، G در جوندگان و H در پستانداران دریایی اشاره نمود که اگرچه اسمبلیج‌های A و B به‌عنوان پاتوژن‌های مشترک بین انسان و دام در نظر گرفته می‌شوند اما مواردی از آلودگی انسانی با اسمبلیج‌های C، D، E و F نیز گزارش شده است (۳، ۶، ۱۵-۱۳). بار واقعی ژياردیازیس به ویژه در کشورهای

در حال توسعه به درستی مشخص نمی‌باشد و فقط با تمرکز بر موارد دارای علائم بالینی برآورد می‌شود و با توجه نقش افراد فاقد علائم به‌عنوان ناقلین انگل در انتشار این آلودگی در بین افراد خانواده و جامعه، تشخیص به موقع آلودگی جهت کنترل و پیشگیری از آن ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه اسمبلیج‌های مختلف ژياردیا از نظر بررسی میکروسکوپی خصوصیات مورفولوژیک از یکدیگر قابل افتراق نیستند و از آنجایی که در شناسایی دقیق موارد ابتلا به این انگل ابزارهای دقیق تشخیصی حائز اهمیت هستند در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی جهت شناسایی آن مورد استفاده قرار گرفتند (۱۸-۱۵). آگاهی از تنوع ژنتیکی ژياردیا دژودنالیس سبب افزایش دانش ما در اپیدمیولوژی، طبقه‌بندی، ژنتیک جمعیت این انگل، نظارت بر شیوع آن، ردیابی منبع آلودگی، شناسایی مشترک بودن بین انسان و حیوان، چگونگی انتقال آن به انسان و تعامل ژنوتایپ‌ها با میزبان می‌گردد. از تکنیک‌های مورد استفاده در ارزیابی مولکولی این انگل می‌توان به تعیین ژنوتایپ چندین جایگاه ژنی (Multilocus Genotyping) اشاره نمود (۱۹). Multilocus Sequence Typing (MLST) تکنیکی بر مبنای داده‌های توالی چندین جایگاه ژنی است که بر اساس تعیین توالی مستقیم قطعاتی از ژن‌های Housekeeping، آلل‌های مربوط به میکروارگانیزم‌های مورد بررسی را شناسایی می‌نماید. از مارکرهای ژنتیکی مورد استفاده در این تکنیک می‌توان به small subunit ribosomal DNA (SSU-rDNA)، glutamate dehydrogenase (gdh)، beta giardin (bg) یا triose phosphate isomerase (tpi) اشاره نمود. روش PCR بر پایه استفاده از ژن SSU-rRNA در تشخیص اسمبلیج‌های مختلف ژياردیا روشی حساس می‌باشد اما توجه به این نکته ضروری است که تنوع داخل اسمبلیج آن محدود می‌باشد. ژن‌های tpi، beta-giardin و gdh از قابلیت بالاتری در شناسایی تنوع داخل اسمبلیج به‌عنوان مارکرهای متمایزکننده برخوردار هستند (۳، ۱۳ و ۱۴). پایه‌ریزی هرگونه طرح و برنامه به‌منظور کنترل و پیشگیری از عفونت‌های انگلی مستلزم شناخت نحوه گسترش آلودگی انگل‌ها در هر منطقه است. با توجه به موقعیت استان خوزستان، موضوع مهاجرت نیروی کار از سایر استان‌ها به این منطقه، فرهنگ رایج استفاده از سلف سرویس در فست فودها، ارتباط نزدیک افراد در مناطق روستایی و نیز ارتباط آنها با دام، شناسایی ایزوله‌های ژياردیا دژودنالیس و الگوی انتقال آن در این استان ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه مطالعات صورت گرفته در استان خوزستان محدود و در سطح شهرستان بوده است، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های انسانی ژياردیا دژودنالیس موجود در نمونه‌های مدفوع، شناسایی روابط فیلوژنی آنها و ارزیابی روابط موجود بین این ایزوله‌ها و ژياردیازیس و الگوی انتقال آن بر اساس تعیین توالی چندین جایگاه



ژنی شامل ژن‌های tpi، β -giardin و gdh که نخستین بار در استان خوزستان انجام شد، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با کد IR.AJUMS.Rec.OG-94150 توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپو اهواز تأیید شده است. در این مطالعه توصیفی-تحلیلی که در مناطق شهری و روستایی استان خوزستان از سال ۱۳۹۴ الی ۱۳۹۵ صورت گرفت، با توجه به مطالعه Rafiei و همکاران (۲۰) و با استفاده از فرمول تعیین حجم نمونه ($n = [Z^2 \cdot p(1-p)] / d^2$)، با $P=0.14$ و $d=0.06$ و $\alpha=0.05$ ، تعداد ۱۲۹ نمونه مدفوع از افراد آلوده به ژیا ردیا پس از کسب مجوز و هماهنگی‌های لازم با مسئولین آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی-درمانی مناطق تحت مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌هایی که در آزمایش مستقیم از نظر میکروسکوپی آلوده به ژیا ردیا بودند و از نظر آلودگی به باکتری و سایر انگل‌های روده ای ایجادکننده علائمی مشابه ژیا ردیازیس منفی گزارش شدند، جمع‌آوری و به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز انتقال یافتند. پرسشنامه‌ای نیز توسط محقق که شامل اطلاعات دموگرافیک و علائم بالینی فرد آلوده به ژیا ردیا بود تکمیل گردید. در آزمایشگاه شدت آلودگی بر اساس تعداد کیست در هر میدان میکروسکوپی با مشاهده گسترش مرطوب تهیه شده از سوسپانسیون مدفوع و یک قطره سرم فیزیولوژی با بزرگنمایی $40\times$ تعیین و نمونه‌ها به سه گروه ۱-۵ کیست (+۱)، ۶-۱۰ کیست (+۲) و بیشتر از ۱۰ کیست (+۳) تقسیم‌بندی شدند (۲۰). نمونه‌هایی با تعداد بیش از ۵ عدد کیست در هر میدان میکروسکوپی با روش فلوتاسیون سوکروز ۱ مولار (۲۱) تخلیص و کیست‌های جداسازی شده تا زمان انجام استخراج DNA در فریزر -20 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در این مطالعه شکستن دیواره کیست با تکرار ۷ مرحله انجماد-ذوب (Freeze-thaw) با استفاده از نیتروژن مایع (به مدت ۵ دقیقه) و بن ماری جوش (به مدت ۷ دقیقه) انجام شد (۲۲). استخراج DNA از کیست‌های تخلیص شده با استفاده از کیت استخراج DNA از مدفوع کبازن (QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN, Germany)) مطابق توصیه‌های کارخانه سازنده با اندکی تغییرات (۲۳) به این ترتیب انجام شد که در مرحله اول ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده کیست‌ها که با تکرار مراحل انجماد-ذوب برای استخراج DNA آماده‌سازی شدند به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل، ۱۴۰۰ میکرولیتر بافر ASL به هر نمونه اضافه، به مدت ۱ دقیقه ورتکس و با تغییر زمان بن‌ماری به مدت ۱۵ دقیقه در 95 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع‌رویی به میکروتیوب جدید منتقل و قرص InhibitEX به منظور حذف آلاینده‌های مدفوع و مهارکننده‌های

PCR اضافه، سوسپانسیون سانتریفیوژ و مایع رویی با پروتئیناز K و بافر AL به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 70 درجه سانتیگراد برای هضم آنزیمی و آزادسازی DNA انکوبه شد. اتانول مطلق از مرحله قبل اضافه و مخلوط گردید و محتویات فوق با دقت از غشاء سیلیسی ستون موجود در کیت جهت اتصال DNA عبور داده شد. به منظور به دست آوردن DNA خالص و حذف عوامل بازدارنده و آلاینده‌ها، ۲ مرحله شستشو با استفاده از بافرهای AW1 و AW2 انجام شد. در نهایت DNA استخراج شده در 100 میکرولیتر بافر AE شسته و جهت انجام مراحل بعدی در فریزر -20 درجه سانتیگراد نگهداری شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از جهت اختصاصیت توالی با استفاده از نرم‌افزار BLAST موجود در پایگاه داده بانک ژنی NCBI بررسی و پس از تأیید، توسط شرکت تکاپوزیست (Metabion, Germany) سنتز شدند (جدول ۱). در این مطالعه، برای تأیید تشخیص نمونه‌های ژیا ردیا دئودنالیس روش PCR ژن SSU-rRNA با استفاده از پرایمرهای GiF (5'-AGCCGGACACCGCTGGCAACC-3') و GiR (5'-CGGCTGCTGGCACCAGACCTT-3') بر اساس مطالعه Rai و همکاران (۲۴) با اندکی تغییرات جهت تکثیر قطعه 350 bp از این ژن به شرح زیر انجام شد:

واکنش PCR برای هر نمونه شامل ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۲۵ پیکومول)، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۱۲/۵ میکرولیتر 2x Master Mix (Ampliqon, Denmark) (متشکل از dNTP، 2 میلی‌مولار)، آنزیم Taq polymerase tracking dye (با فر و واکنش) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, My Cycler) Denaturation اولیه در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و 30 سیکل شامل Denaturation در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، Annealing در دمای 67 درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و extension در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و سپس extension نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. به منظور اطمینان از نتایج PCR، یک نمونه DNA مثبت ژیا ردیا و آب مقطر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت محصولات واکنش با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد (Merck, Germany) و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از یک دستگاه ژل داگ (Syngene, G: Box, UK) ارزیابی گردیدند. برای تعیین ژنوتایپ با استفاده از تکنیک مولتی لوکوس، Nested-PCR ژن‌های tpi و β -giardin و Semi-Nested PCR ژن gdh بر روی نمونه‌های تأیید شده به ترتیب جهت تکثیر قطعات 530 bp، 511 bp و 432 bp از ژن‌های فوق انجام شد (۲۵-۲۸). جهت تکثیر قطعات ذکر شده از ژن‌های tpi، β -giardin و gdh مقادیر به کار

مشخص گردید و در صورت مشاهده دو پیک در یک جایگاه نوکلئوتیدی تصحیح انجام شد. جهت همردیفی چندگانه توالی‌ها، نرم‌افزار ClustalW برنامه MEGA6 (www.megasoftware.net) استفاده گردید. برای مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی، BLASTn و برای مقایسه اسیدهای آمینه توالی‌ها، BLASTx در نرم‌افزار BLAST انجام شد و موتاسیون‌ها و جایگزینی‌ها در ژن‌های مورد مطالعه بررسی گردید. اسمبلیج‌ها و ساب اسمبلیج‌ها با ترسیم درخت فیلوژنی هر ژن به‌طور مجزا و درخت مربوطه مولتی لوکوس که شامل توالی‌های کانتینگ شده از سه ژن بود بر اساس روش‌های آماری (NJ) Neighbour-Joining و یا Maximum Likelihood شناسایی شدند. برای اطمینان‌پذیری درخت‌های ترسیم شده، از روش آماری Bootstrap method با تکرارپذیری ۱۰۰۰ استفاده گردید. توالی‌های به‌دست آمده از این مطالعه و پروتئین آنها به‌وسیله Accession Numbers (AN) در بانک ژنی NCBI ثبت شدند.

رفته از مواد واکنش به‌ترتیب در جداول ۲، ۳ و ۴ آورده شده است. در تکثیر قطعه ۵۳۰bp از ژن tpi دستگاه ترموسایکلر مطابق شرایط ذکر شده توسط محققین قبلی (۲۸) با اندکی تغییر (استفاده از دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در Initial denaturation هر دو مرحله PCR و دمای ۵۸ درجه سانتیگراد در Annealing مرحله دوم PCR) (جدول ۵) برنامه‌ریزی گردید. در بررسی ژن β -giardin دستگاه ترموسایکلر مطابق شرایط ذکر شده در مطالعات محققین قبلی (۲۶ و ۲۷) با اندکی تغییرات (استفاده از دمای ۹۶ درجه سانتیگراد در Initial denaturation هر دو مرحله PCR به مدت ۵ دقیقه، دمای ۹۶ درجه سانتیگراد در Denaturation مرحله دوم به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در Annealing مرحله اول PCR) (جدول ۶) استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در تکثیر قطعه ۴۳۲bp از ژن gdh نیز مطابق مطالعات قبلی (۲۵ و ۲۹) (جدول ۷) انجام شد. قطعه مربوط به مرحله دوم PCR هر ژن با برش ژل آگاروز جداسازی و جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. با بررسی کروماتوگرام مربوط به هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار Chromas، کیفیت پیک‌ها و جایگزینی و یا جابجایی نوکلئوتیدی

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی قطعات ژنی tpi و bg و gdh

ژن	اسم پرایمر	نوع پرایمر	توالی پرایمر
tpi	AL3543	اولیه	5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3'
	AL3546	اولیه	5'-CAAACCTTITCCGAAAACC-3'
	AL3544	ثانویه	5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCT-3'
	AL3545	ثانویه	5'-GTGGCCACCACICCCCGTGCC-3'
bg	G7	اولیه	5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3'
	G759	اولیه	5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'
	BG511F	ثانویه	5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'
	BG511R	ثانویه	5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'
gdh	GDHeF	اولیه	5'-TCAACGYAAYC GYGGYT TCCGT-3'
	GDHiR	اولیه	5'-GTTRTC CTTGCACAT CTCC-3'
	GDHiF	ثانویه	5'-CAGTACAACCTCYGCTCTCGG-3'
	GDHiR	ثانویه	5'-GTTRCCTTGCACATCTCC-3'

جدول ۲- مقادیر مواد به‌کار رفته برای انجام آزمایش Nested PCR ژن tpi

مواد مورد نیاز	مرحله اول PCR حجم (میکرولیتر)	مرحله دوم PCR حجم (میکرولیتر)
Master Mix	۱۲/۵	۱۲/۵
پرایمر اولیه	۱	۱
پرایمر ثانویه	۱	۱
آب مقطر دوبار تقطیر	۵/۵	۹/۵
DNA الگو	۵	۱
حجم نهایی	۲۵	۲۵

جدول ۳- مقادیر مواد به‌کار رفته برای انجام آزمایش Nested PCR ژن β -giardin

مواد مورد نیاز	مرحله اول PCR حجم (میکرولیتر)	مرحله دوم PCR حجم (میکرولیتر)
Master Mix	۱۲/۵	۱۲/۵
پرایمر اولیه	۱	۱

۱	۱	پرایمر ثانویه
۹/۵	۹/۵	آب مقطر دوبار تقطیر
۱	۱	الگو DNA
۲۵	۲۵	حجم نهایی

جدول ۴- مقادیر مواد به کار رفته برای انجام آزمایش Semi-Nested PCR ژن gdh

مواد مورد نیاز	مرحله اول PCR حجم (میکرولیتر)	مرحله دوم PCR حجم (میکرولیتر)
Master Mix	۱۲/۵	۱۲/۵
پرایمر اولیه	۱	۱
پرایمر ثانویه	۱	۱
آب مقطر دوبار تقطیر	۹/۵	۹/۵
الگو DNA	۱	۱
حجم نهایی	۲۵	۲۵

جدول ۵- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام آزمایش Nested PCR ژن tpi (۲۸)

مراحل PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (دقیقه: ثانیه)	تعداد سیکل
مرحله اول PCR			
Initial denaturation	۹۵	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴	۴۵ ثانیه	
Annealing	۵۰	۴۵ ثانیه	۳۵
Extension	۷۲	۱ دقیقه	
Final extension	۷۲	۱۰ دقیقه	۱
مرحله دوم PCR			
Initial denaturation	۹۵	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴	۴۵ ثانیه	
Annealing	۵۸	۴۵ ثانیه	۳۵
Extension	۷۲	۱ دقیقه	
Final extension	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

جدول ۶- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام آزمایش Nested PCR ژن β-giardin (۲۶ و ۲۷)

مراحل PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (دقیقه : ثانیه)	تعداد سیکل
مرحله اول PCR			
Initial denaturation	۹۶	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵	۳۰ ثانیه	
Annealing	۵۰	۳۰ ثانیه	۳۵
Extension	۷۲	۱ دقیقه	
Final extension	۷۲	۷ دقیقه	۱
مرحله دوم PCR			
Initial denaturation	۹۶	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۶	۴۵ ثانیه	
Annealing	۵۵	۳۰ ثانیه	۳۵
Extension	۷۲	۱ دقیقه	
Final extension	۷۲	۷ دقیقه	۱

جدول ۷- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام آزمایش Semi-Nested PCR ژن gdh (۲۵ و ۲۹)

مراحل PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (دقیقه: ثانیه)	تعداد سیکل
مرحله اول PCR			
Initial denaturation	۹۵	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴	۲ دقیقه	

۵۶	Annealing	۱ دقیقه
۷۲	Extension	۲ دقیقه
۹۴	Denaturation	۳۰ ثانیه
۵۶	Annealing	۲۰ ثانیه
۷۲	Extension	۴۵ ثانیه
۷۲	Final extension	۷ دقیقه
	مرحله دوم PCR	
۹۵	Initial denaturation	۵ دقیقه
۹۴	Denaturation	۲ دقیقه
۵۶	Annealing	۱ دقیقه
۷۲	Extension	۲ دقیقه
۹۴	Denaturation	۳۰ ثانیه
۵۶	Annealing	۲۰ ثانیه
۷۲	Extension	۴۵ ثانیه
۷۲	Final extension	۷ دقیقه

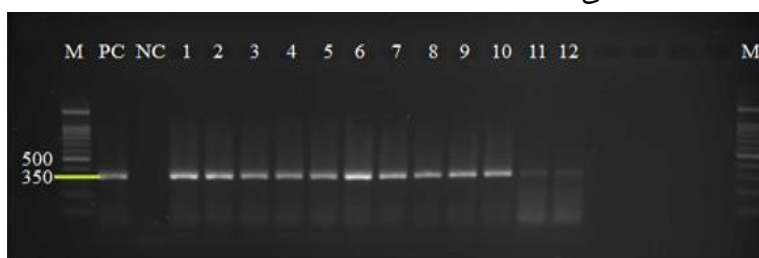
نتایج

TPI7, TPI11, TPI12, TPI24 و TPI29-TPI27) در اسمبلیج A و ساب اسمبلیج AII، ۲ نمونه (TPI5 و TPI9) در اسمبلیج B و ساب اسمبلیج BIII، نمونه TPI18 در اسمبلیج B و ساب اسمبلیج BIV و نمونه‌های TPI10 و TPI20 نیز در اسمبلیج B قرار گرفتند که ساب اسمبلیج آنها مشخص نگردید (شکل ۵). مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ۲۱ نمونه تعیین توالی شده در ژن β -giardin با استفاده از blastn با ایزوله‌های اسمبلیج A و B موجود در بانک ژنی، ۱۰ نمونه (BG2, BG3, BG7, BG11, BG15, BG21, BG23, BG19, BG26) و ۱۰۰ درصد تشابه و ۵ نمونه (BG4, BG6, BG12, BG17, BG24) و ۹۹ درصد تشابه را با ایزوله ۸۶ اسمبلیج A (Accession number=KJ363393.1) و ۶ نمونه (BG5, BG9, BG10, BG14) و ۹۹ درصد تشابه را با ایزوله ۳۱ اسمبلیج B (Accession number=KJ363390.1) نشان دادند. تفاوت نمونه‌ها با ایزوله‌های ذکر شده از بانک ژنی در جایگزینی نوکلئوتیدی در ۱، ۲، ۳ و یا ۴ موقعیت بود. در مقایسه توالی‌های آمینواسیدی با استفاده از blastx، در نمونه‌های مربوط به اسمبلیج A و B مطالعه حاضر، ۱۰۰ درصد تشابه با اسمبلیج A (Accession number=AHY00798.1) و اسمبلیج B (Accession number=AHY00796.1) موجود در بانک ژنی مشاهده گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن- β -giardin نمونه‌های مطالعه حاضر با Accession number های MF503643-MF503629 و MF503646-MF503651 در بانک ژنی NCBI به ثبت رسیدند. رسم درخت فیلوژنی ژن β -giardin، ۴ نمونه (BG4, BG6, BG15, BG22) را در اسمبلیج A و ساب اسمبلیج AI، ۹ نمونه (BG7, BG11, BG12, BG17, BG19, BG21, BG23, BG24, BG26) را در اسمبلیج A و ساب اسمبلیج AII و ۶ نمونه (BG5, BG9, BG10, BG14, BG18, BG20) را در اسمبلیج B و ساب اسمبلیج BIV قرار داد (شکل ۶).

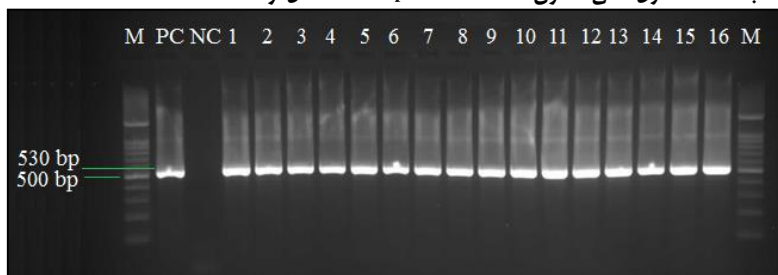
از مجموع ۱۲۹ نمونه مدفوع حاوی کیست ژیا ردیا دئودنالیس که DNA آنها استخراج و از نظر تکثیر قطعه ۳۵۰ bp ژن SSU-rRNA مورد بررسی قرار گرفتند در ۱۰۲ نمونه (۷۹ درصد)، تکثیر این ژن با موفقیت انجام شد (شکل ۱). از ۱۰۲ نمونه تکثیر یافته در ژن SSU-rRNA، ۸۸ نمونه (۸۶/۳ درصد) در Nested-PCR ژن tpi، ۶۲ نمونه (۶۰/۸ درصد) در Nested-PCR ژن β -giardin و ۷۶ نمونه (۷۴/۵ درصد) در Semi-Nested PCR ژن *gdh* با موفقیت تکثیر یافتند (شکل ۴-۲). مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ۲۰ نمونه تعیین توالی شده در ژن *tpi* با استفاده از blastn با ایزوله‌های اسمبلیج A و B موجود در بانک ژنی، ۱۵ نمونه (TPI2, TPI3, TPI7, TPI11, TPI12, TPI15, TPI19, TPI21, TPI24, TPI26) و ۹۹ درصد تشابه را با ایزوله TY اسمبلیج A (Accession number=KY554832.1) و ۵ نمونه (TPI5, TPI9, TPI10, TPI18) و ۹۹ درصد تشابه را با ایزوله INI 50 اسمبلیج B (AN=KX085492.1) نشان دادند. تفاوت این نمونه‌ها با ایزوله‌های اشاره شده از بانک ژنی در جایگزینی نوکلئوتیدی در ۲ یا ۳ موقعیت بود. مقایسه توالی‌های آمینواسیدی ۱۵ نمونه با توالی‌های موجود در بانک ژنی با استفاده از blastx، در تعدادی از آنها ۱۰۰ درصد و در تعدادی دیگر ۹۹ درصد تشابه با اسمبلیج A (AN=AEK78812.1) مشاهده گردید. مقایسه توالی‌های آمینواسیدی ۵ نمونه با اسمبلیج B (AN=AOR05770.1)، ۹۹ درصد تشابه را نشان داد. جایگزینی‌های نوکلئوتیدی در ژن *tpi* در نمونه‌ها، منجر به جابجایی یک یا دو اسید آمینه در آنها گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن *tpi* نمونه‌های مطالعه حاضر با Accession number های MF535508- MF535494 و MF535511-MF535515 در بانک ژنی NCBI به ثبت رسیدند. با رسم درخت فیلوژنی ژن *tpi*، ۹ نمونه (TPI2, TPI3،

در مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ۲۶ نمونه تعیین توالی شده در ژن *gdh* با استفاده از blastn با ایزوله‌های اسمبلیج A و B موجود در بانک ژنی، ۵ نمونه (GD2, GD4, GD6, GD7, GD13) و ۱۰۰ درصد تشابه با ایزوله H.QLD47 اسمبلیج A (Accession number=KY655479.1) و ایزوله KGgH2-IR ساب اسمبلیج AII (Accession number=KY444770.1)، ۱۵ نمونه (GD11, GD12, GD15, GD16, GD17, GD19, GD21) و ۹۹ درصد شباهت با ایزوله H.QLD47 اسمبلیج A و ۱۰۰ درصد شباهت با ایزوله KGgH2-IR ساب اسمبلیج AII و ۶ نمونه (GD5, GD9, GD10, GD14, GD18, GD20) ۹۹ درصد شباهت با ایزوله H.QLD76 اسمبلیج B (Accession number= KY655477.1) را نشان دادند. تفاوت نمونه‌های مطالعه حاضر با ایزوله‌های ذکر شده از بانک ژنی در جایگزینی نوکلئوتیدی در ۱، ۳ و ۴ موقعیت بود. در مقایسه توالی‌های آمینواسیدی با استفاده از blastx، در نمونه‌های مربوط به اسمبلیج A و B مطالعه حاضر، ۱۰۰ درصد تشابه با اسمبلیج A (Accession number=ARS22473.1) و ساب اسمبلیج AII (Accession number=ATJ34015.1) و اسمبلیج B (Accession number=ARS22471.1) مشاهده گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن *gdh* با Accession number های MF535485-

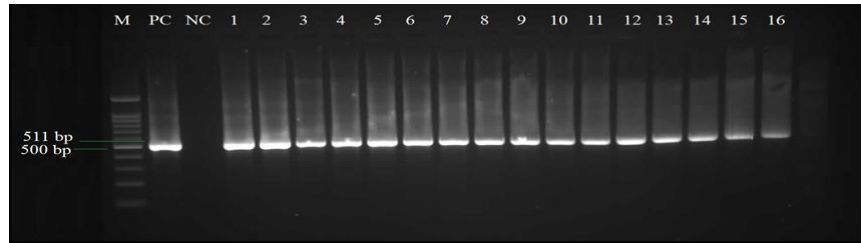
MF535466 و MF535493-MF535488 در بانک ژنی NCBI به ثبت رسیدند. رسم درخت فیلوژنی ژن *gdh* نشان داد که ۲۰ نمونه (GD2, GD4, GD6, GD7, GD11, GD12, GD13, GD15) و ۱۵ نمونه (GD17, GD19, GD21) متعلق به اسمبلیج A و ۳ نمونه (GD5, GD9, GD14) متعلق به اسمبلیج AII، ۱ نمونه (GD18) متعلق به اسمبلیج B و ساب اسمبلیج BIII، ۲ نمونه (GD10 و GD20) متعلق به اسمبلیج B و ساب اسمبلیج BIV و ۲۹ نمونه (GD1, GD3, GD8, GD16, GD18, GD22) متعلق به اسمبلیج B بودند که ساب اسمبلیج آنها مشخص نشد (شکل ۷). در این مطالعه در نهایت رسم درخت فیلوژنی توالی‌های کانتینگ شده سه لوکوس، کلیه نمونه‌های متعلق به اسمبلیج A را در ساب اسمبلیج AII و نمونه‌های اسمبلیج B را در ساب اسمبلیج BIV قرار داد (شکل ۸). نتایج نشان داد که از مجموع ۲۹ نمونه مربوط به افراد آلوده به این انگل که در یکی از سه ژن تعیین توالی شدند و اسمبلیج آنها شناسایی گردید، ۲۳ نمونه مربوط به اسمبلیج A (۷۹/۳۱ درصد) و ۶ نمونه متعلق به اسمبلیج B (۲۰/۶۹ درصد) بودند. در این بررسی بین میانگین سن افراد و فراوانی دو اسمبلیج A و B، شدت آلودگی، محل زندگی افراد (شهری یا روستایی) و بروز علائم بالینی با نوع اسمبلیج ارتباط معنی‌داری مشاهده نگردید.



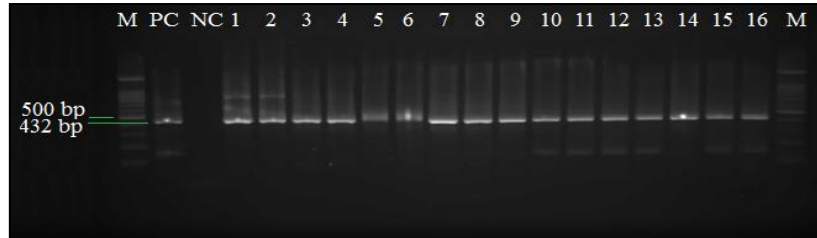
شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR ژن SSU-rRNA بر روی ژل آگاروز ۲ درصد
ستون M: مارکر ۱۰۰ bp، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ستون ۱-۱۲: قطعات ۳۵۰ bp حاصل از PCR



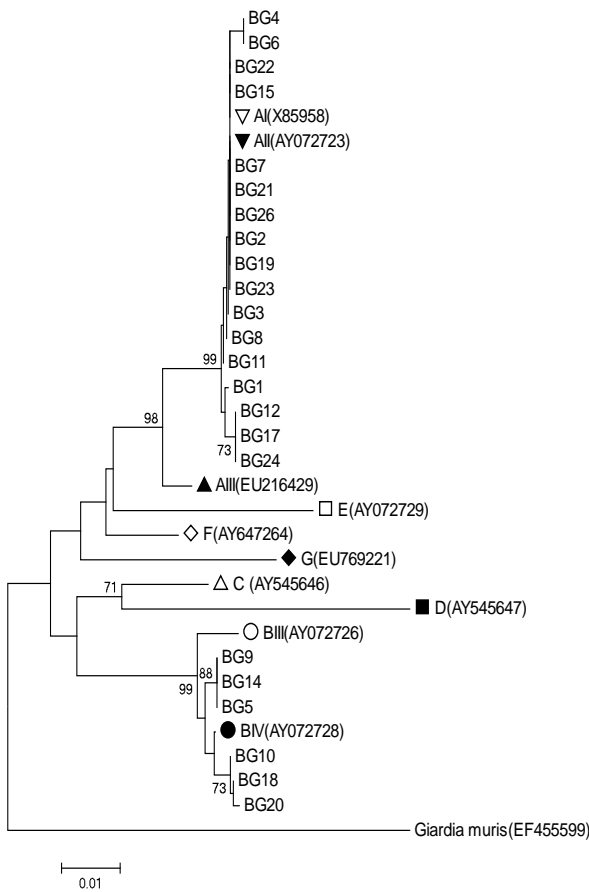
شکل ۲- الکتروفورز محصولات Nested-PCR ژن *tpi* بر روی ژل آگاروز ۲ درصد
ستون M: مارکر ۱۰۰ bp، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ستون ۱-۱۶: قطعات ۵۳۰ bp حاصل از Nested-PCR



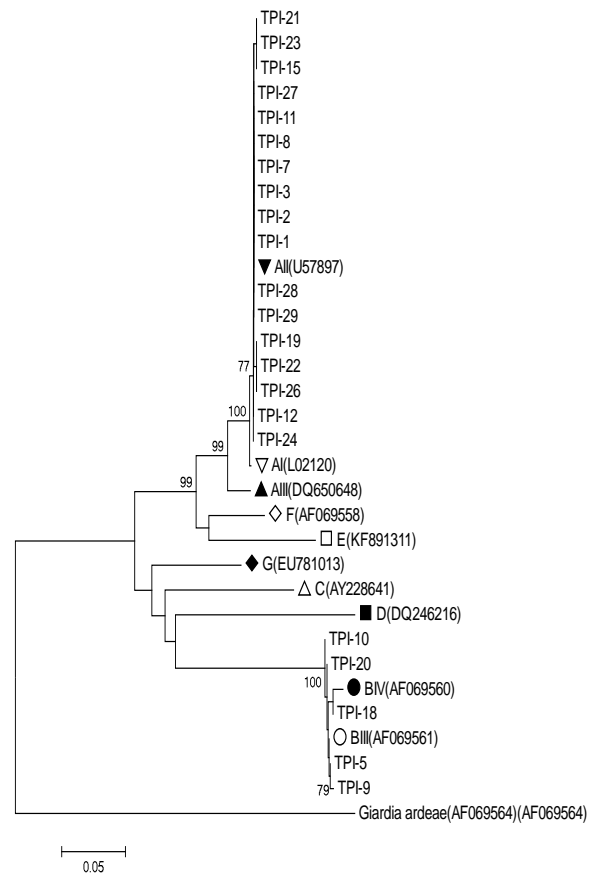
شکل ۳- الکتروفورز محصولات Nested-PCR ژن β -giardin بر روی ژل آگاروز ۲ درصد
 ستون M: مارکر ۱۰۰ bp، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ستون ۱-۱۶: قطعات ۵۱۱ bp حاصل از Nested-PCR



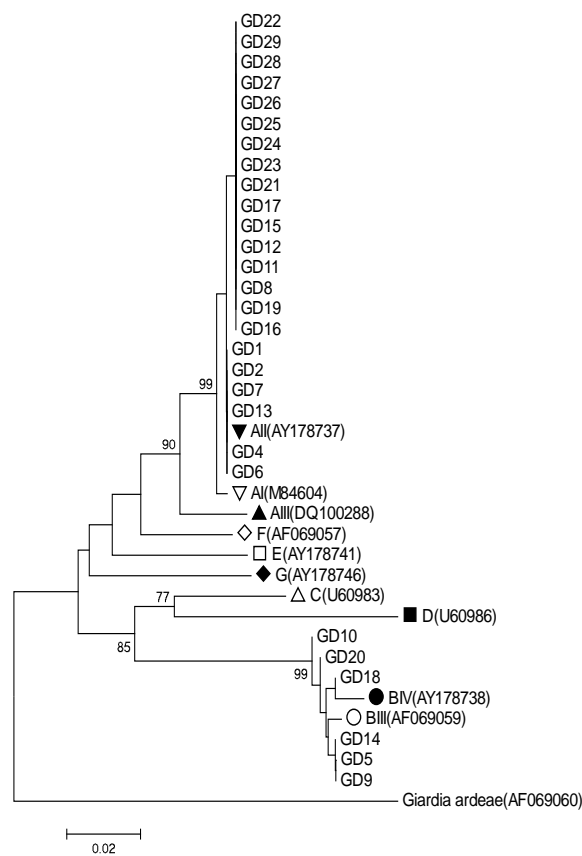
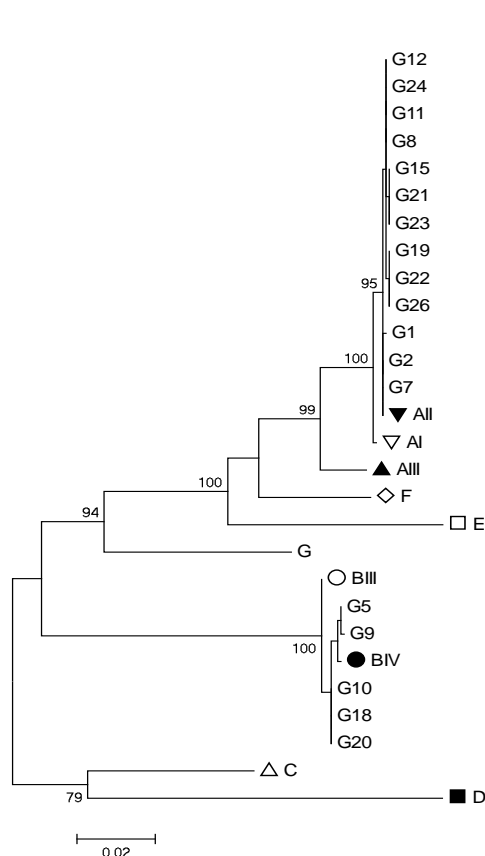
شکل ۴- الکتروفورز محصولات Semi-Nested PCR ژن gdh بر روی ژل آگاروز ۲ درصد
 ستون M: مارکر ۱۰۰ bp، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ستون ۱-۱۶: قطعات ۴۳۲ bp حاصل از Semi-Nested PCR



شکل ۶- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده از ژن β g با استفاده از روش Neighbor-Joining (NJ) در نرم‌افزار MEGA6 با استفاده از مدل Kimura 2-
 parameter (K2P) با pairwise-deletion و تکرار 1000 bootstrap



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده از ژن tpi با استفاده از روش Neighbor-Joining (NJ) در نرم‌افزار MEGA6 با استفاده از مدل Kimura 2-
 parameter (K2P) با pairwise-deletion و تکرار 1000 bootstrap



شکل ۸- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده از سه ژن (MLST) با استفاده از روش Maximum likelihood با استفاده از مدل Kimura 2-parameter (K2P) با pairwise-deletion و تکرار 1000 bootstrap در نرم‌افزار MEGA6

شکل ۷- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده از ژن *gdh* با استفاده از روش Neighbor-Joining (NJ) در نرم‌افزار MEGA6 با استفاده از مدل Kimura 2-parameter (K2P) با pairwise-deletion و تکرار 1000 bootstrap

بحث

ژیا ردیا، روش PCR ژن SSU-rRNA روشی حساس با تنوع داخل اسمبلیج محدود است اما مارکرهای *tpi*، β -giardin و *gdh* تنوع داخل اسمبلیج را بیشتر نشان می‌دهند (۳، ۱۳، ۱۴، ۱۸ و ۱۹). موفقیت در استراتژی‌های کنترل، پیشگیری و درمان عفونت‌های انگلی نیازمند شناخت نحوه گسترش آلودگی آنها در هر منطقه مانند مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و نیز مطالعات بیولوژی و مقاومت دارویی می‌باشد. در بررسی حاضر نمونه‌ها بر اساس تکنیک MLST لوکوس‌های *tpi*، β -giardin و *gdh* نخستین بار در سطح استان خوزستان تعیین ژنوتایپ شدند. از مجموع ۱۲۹ نمونه حاوی کیست ژیا ردیا دئودنالیس که مورد بررسی قرار گرفتند، در ۱۰۲ نمونه (۷۹ درصد)، قطعه ۳۵۰bp از ژن SSU-rRNA با موفقیت تکثیر یافت که این ژن به علت دارا بودن نسخه‌های متعدد، در نمونه‌هایی با DNA الگو کم و یا مقادیر بالای مهارکننده‌های PCR، از میزان تکثیر بالایی برخوردار است (۳۰) و در مواردی که تکثیر ژن‌های *tpi*، β -giardin و *gdh* در نمونه‌ای موفقیت‌آمیز نباشد می‌توان به نتیجه PCR این ژن اطمینان نمود از این‌رو در مطالعه حاضر جهت تأیید تشخیص ژیا ردیا

کمپلکس گونه‌ای ژیا ردیا دئودنالیس شامل ۸ اسمبلیج (A-H) با اختصاصیت مختلف میزبان که آلودگی انسان به‌طور عمده با اسمبلیج‌های A و B ایجاد می‌شود و ساب اسمبلیج‌های AII و BIV این دو اسمبلیج معمولاً آنتروپونوتیک هستند (۳، ۶، ۱۵-۱۳). میزان کم تنوع در مرفولوژی انگل، تمایز گونه‌ها یا اسمبلیج‌های مختلف ژیا ردیا و تعیین پتانسیل مشترک انسان و دام با استفاده از روش‌های فنوتایپی را با مشکل مواجه نموده است (۱۸-۱۵)، بنابراین روش‌های مولکولی از جمله تکنیک MLST رویکردی جهت تعیین ژنوتایپ یا تشخیص زیر گونه‌های جدید ایزوله‌های باکتریایی و سایر ارگانسیم‌ها بر اساس داده‌های توالی قطعاتی از چندین جایگاه ژنی از ژن‌های Housekeeping می‌باشد که به بررسی چندین جایگاه ژنی می‌پردازند. برای روشن ساختن موضوع انتقال مشترک انسان و دام و پویایی انتقال، تعامل ژنوتایپ‌ها با میزبان و تعیین روابط اسمبلیج و الگوی بیماری مورد نیاز هستند. برای شناسایی اسمبلیج

قرار گرفتند. در این لوکوس نیز ساب اسمبلیج نمونه‌های TPI10 و TPI20 مشخص نگردید. در ارزیابی انطباق سه لوکوس در تعیین ژنوتایپ در سطح اسمبلیج، در هر سه لوکوس توافق وجود داشت و نمونه‌ها به دو اسمبلیج A و B طبقه‌بندی شدند. در داخل اسمبلیج اختلاف‌هایی در لوکوس‌ها به ویژه در طبقه‌بندی ایزوله‌های اسمبلیج B مشاهده گردید. لوکوس bg در طبقه‌بندی ۴ نمونه به‌عنوان ساب اسمبلیج AI، در ۲ نمونه BG4 و BG6 با لوکوس gdh و در ۲ نمونه BG15 و BG22 با هر دو لوکوس gdh و tpi و نیز با درخت فیلوژنی MLST سازگار نبود. در تعیین ایزوله‌های اسمبلیج B، لوکوس bg مشابه درخت MLST، همه نمونه‌ها را در ساب اسمبلیج BIV قرار داد. در طبقه‌بندی نمونه BG18 به‌عنوان ساب اسمبلیج BIV توافق در سه لوکوس وجود داشت در حالی‌که نمونه‌های GD5 و GD9 در دو لوکوس gdh و tpi در ساب اسمبلیج BIII قرار گرفتند. بر خلاف لوکوس bg، دو لوکوس gdh و tpi قادر به شناسایی ساب اسمبلیج در دو نمونه GD10 و GD20 نبودند. لوکوس gdh، نمونه GD14 را در ساب اسمبلیج BIII قرار داد که با طبقه بندی لوکوس bg سازگار نبود. عدم توافق لوکوس‌ها در شناسایی ژنوتایپ‌های ژنوتایپ‌های دئودنالیس در برخی از مطالعات گزارش گردید (۴۴ و ۴۵). در این مطالعه حضور پیک‌های دوتایی و Ambiguous nucleotides در برخی از موقعیت‌های نوکلئوتیدی، الگوهای هتروژنی را در کروماتوگرام توالی‌های تعدادی از نمونه‌ها به ویژه در اسمبلیج B نشان داد که وقوع آنها در سه لوکوس متفاوت بود. دو مکانیسم اصلی آلودگی‌های مختلط و هتروزیگوسیتی توالی آلی (ASH) allelic sequence heterozygosity در وقوع همپوشانی در برخی توالی‌های نوکلئوتیدی و عدم انطباق لوکوس‌ها در تعیین اسمبلیج‌ها و ساب اسمبلیج‌ها می‌توانند نقش داشته باشند که متمایز نمودن این دو مکانیسم از هم بسیار دشوار می‌باشد. دیپلوئید بودن دو هسته ژنوتایپ که ممکن است جهش‌های خاصی را به‌طور مستقل در خود حفظ نمایند و این امر منجر به ASH شود و وقوع آلودگی‌های مختلط در یک فرد با حضور کیست‌هایی از نظر ژنتیکی متفاوت که می‌تواند در سطوح درون اسمبلیج و بین اسمبلیج ایجاد گردد. وقوع نوترکیبی میوزی از دلایل احتمالی دیگر جهت حضور پیک‌های دو تایی است که تولید مثل جنسی را در ژنوتایپ مطرح می‌سازد، هرچند هنوز شواهدی دال بر تکثیر جنسی این انگل در دسترس نیست (۴۸-۴۶). در این مطالعه هیچ گونه آلودگی مختلطی از A و B مشاهده نگردید. در صورتی‌که عدم وقوع آلودگی مختلط با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اسمبلیج تأیید گردد می‌توان پیشنهاد نمود که پیک‌های دوتایی ممکن است ناشی از وجود چندین ساب اسمبلیج در یک نمونه یا وقوع ASH باشد (۱۵). در این مطالعه از مجموع ۱۸ نمونه که در هر سه لوکوس با موفقیت تعیین

دئودنالیس در نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. از عوامل مؤثر بر عدم تکثیر موفق ژن‌های NA-SSU، tpi، din-β و gdh در بعضی از نمونه‌های این مطالعه می‌توان به کیفیت و کمیت DNA الگو اشاره نمود. شرایط نگهداری نمونه‌ها قبل از استخراج DNA و قابلیت روش استخراج به‌کار رفته در حذف و یا به حداقل رساندن حضور مهارکننده‌های PCR موجود در نمونه مدفوع که می‌تواند بر نتیجه PCR مؤثر باشد (۳۴-۳۱). عدم انطباق نوکلئوتیدی پرایمرها با DNA الگو که در پی تخریب DNA به ویژه در ژن‌های تک نسخه‌ای نظیر tpi، β-giardin و gdh ایجاد می‌گردد (۳۵ و ۳۶). در بررسی اسمبلیج و ساب اسمبلیج‌های ژنوتایپ‌های دئودنالیس در استان خوزستان، اسمبلیج A (۷۹/۳۱ درصد) با فراوانی بیشتری نسبت به اسمبلیج B (۲۰/۶۹ درصد)، به‌عنوان اسمبلیج غالب شناسایی شد و در هیچ یک از نمونه‌ها مخلوط این دو اسمبلیج مشاهده نگردید. برخی از محققین در بررسی‌های خود اسمبلیج A را با فراوانی بیشتری نسبت به اسمبلیج B گزارش کردند (۲۱، ۳۷ و ۳۸) در صورتی‌که محققین دیگر غالب بودن اسمبلیج B را نشان دادند (۱۹، ۲۰ و ۳۰).

در این مطالعه جایگزینی‌های نوکلئوتیدی، حضور پیک‌های دوتایی و Ambiguous nucleotides در اسمبلیج B بیشتر از A مشاهده شد که در بعضی از نمونه‌ها مانع طبقه‌بندی ساب اسمبلیج‌ها به‌طور واضح گردید. در لوکوس gdh، به جز دو نمونه از اسمبلیج B (GD10 و GD20) که به ساب اسمبلیج خاصی اختصاص داده نشدند سایر نمونه‌ها در یکی از ساب اسمبلیج‌های AII، BIII (GD5، GD9 و GD14) و BIV (GD18) قرار گرفتند که قبلاً در مطالعات محققین دیگر (۳۰، ۳۹ و ۴۰) توصیف شدند. در بررسی لوکوس bg، نمونه‌ها به ساب اسمبلیج‌های AI، AII و BIV تعلق داشتند که قبلاً به وسیله محققین دیگر توصیف و گزارش شدند (۲۶، ۳۰، ۴۰ و ۴۱). از چهار نمونه‌ای (BG4، BG6، BG15 و BG22) که با استفاده از رسم درخت فیلوژنی این لوکوس در ساب اسمبلیج AI قرار گرفتند دو نمونه BG15 و BG22 در درخت فیلوژنی لوکوس‌های gdh و tpi و نیز درخت مربوط به MLST، در ساب اسمبلیج AII طبقه‌بندی شدند. دو نمونه BG4 و BG6 از سه ژن مورد مطالعه تنها در لوکوس‌های bg و gdh با موفقیت تکثیر و تعیین توالی شدند که در درخت فیلوژنی لوکوس gdh در ساب اسمبلیج AII قرار گرفتند و به علت عدم تکثیر لوکوس tpi، در درخت MLST طبقه‌بندی نشدند. در لوکوس bg، کلیه نمونه‌های اسمبلیج B در ساب اسمبلیج BIV قرار گرفتند. در لوکوس tpi، نمونه‌ها در ساب اسمبلیج‌های AII، BIII و BIV طبقه‌بندی شدند که قبلاً در مطالعات محققین دیگر توصیف و گزارش شدند (۳۰، ۳۹، ۴۲ و ۴۳). در اسمبلیج B، نمونه‌های TPI5 و TPI9 مشابه ژن gdh در ساب اسمبلیج BIII و نمونه TPI18 در ساب اسمبلیج BIV

تعیین ژنوتایپ تروفوزوئیت‌های حاصل از کشت آگزینیک ژیا‌ردیا دئودنالیس در شهر اهواز نشان دادند که قابلیت درخت فیلوژنی هر یک از ژن‌های *gdh*، *bg* و *tpi* در شناسایی اسمبلیج و ساب اسمبلیج این نمونه‌ها مشابه درخت فیلوژنی توالی‌های کانتینگ شده سه ژن (MLST) بود. پیشنهاد دادند که دستیابی به جمعیت خالصی از تروفوزوئیت‌ها در محیط کشت و به‌کارگیری ژن‌های فوق در تعیین ژنوتایپ آنها می‌تواند راهکاری مناسب جهت شناسایی دقیق‌تر اپیدمیولوژی انگل باشد (۵۷). مطالعه حاضر هیچگونه ارتباطی را بین ژنوتایپ انگل و علایم بالینی نشان نداد که ممکن است به علت تعداد نمونه‌های مورد بررسی در ارزیابی فیلوژنی باشد. به نظر می‌رسد برای تأیید یا عدم وجود این ارتباط، تعداد بیشتری از نمونه‌های تعیین توالی شده مورد نیاز بود. در بررسی پویبلا و همکاران جهت شناسایی اسمبلیج‌ها و ساب اسمبلیج‌های ژیا‌ردیا دئودنالیس در کودکان کوبایی، اسمبلیج B به‌طور معنی‌داری بیشتر از اسمبلیج A در کودکان با علایم اسهال، نفخ یا درد شکمی مشاهده شد و در اکثر موارد مطالعه آنها ساب اسمبلیج AII گزارش گردید (۵۸). رفیعی و همکاران در ارزیابی ارتباط بین ژنوتایپ ژیا‌ردیا دئودنالیس و علایم بالینی در اهواز با استفاده از روش PCR-RFLP ژن *gdh*، اسمبلیج‌های AII و BIII را گزارش نمودند و نشان دادند که هیچ رابطه معنی‌داری بین اسمبلیج و علایم بالینی وجود نداشت (۲۰). در مطالعه پسته‌چیان و همکاران جهت شناسایی مولکولی ژیا‌ردیا لامبلیا و بررسی ارتباط بین اسهال و ژنوتایپ این انگل در استان اصفهان با استفاده از روش PCR-RFLP ژن *tpi*، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتایپ A و اسهال، ژنوتایپ B و عفونت‌های فاقد علامت گزارش شد (۳۸).

بررسی حاضر نخستین مطالعه جهت تعیین ژنوتایپ ایزوله‌های انسانی ژیا‌ردیا دئودنالیس در استان خوزستان با استفاده از تکنیک MLST است که با شناسایی اسمبلیج و ساب اسمبلیج‌های این انگل توزیع ژنتیکی آن را مشخص می‌نماید. این مطالعه بینش جدیدی از تنوع ژنتیکی انگل را فراهم نموده و با توضیح پویایی انتقال ژیا‌ردیازیس در جمعیت مورد بررسی سبب ارتقاء آگاهی ما در زمینه اپیدمیولوژی بیماری می‌گردد. در این مطالعه در اختصاص دادن نمونه‌ها به یک اسمبلیج خاص در هر سه لوکوس توافق وجود داشت در صورتی که در شناسایی ساب اسمبلیج‌ها، اختلاف‌هایی در لوکوس‌ها به‌ویژه در اسمبلیج B مشاهده گردید. اسمبلیج A و ساب اسمبلیج AII با بالاترین فراوانی نسبت به اسمبلیج B به‌عنوان ژنوتایپ غالب در استان خوزستان مشاهده شدند. شناسایی ساب اسمبلیج‌های AII و BIV، انتقال از مسیر آنتروپونوتیک را پیشنهاد می‌نماید و تعیین نقش حیوانات در پویایی انتقال ژیا‌ردیازیس در استان خوزستان نیازمند

توالی شدند، ترکیب توالی‌های آنها به‌صورت MLST و بررسی‌های فیلوژنی، کلیه ایزوله‌های اسمبلیج A را در ساب اسمبلیج AII (۷۲ درصد) و ایزوله‌های اسمبلیج B را در ساب اسمبلیج BIV (۲۸ درصد) طبقه‌بندی نمود. تعداد کمی از مطالعات اپیدمیولوژیک، اهمیت انتقال ژن‌نوز در وقوع ژیا‌ردیازیس انسانی را ارزیابی نمودند و با توجه به مشاهده این دو ساب اسمبلیج که شایع‌ترین ایزوله‌های جداسازی شده از موارد ژیا‌ردیازیس انسانی هستند (۳)، الگوی انتقال در استان خوزستان ممکن است آنتروپونوتیک باشد که تأیید آن نیازمند بررسی‌های جامع در حیوانات همزمان با مطالعه بر روی نمونه‌های انسانی در این منطقه می‌باشد. در بعضی از مطالعات انجام شده در جهان و از جمله ایران، اکثر ایزوله‌های اسمبلیج A در ساب اسمبلیج AII نشان داده شدند (۱۵، ۱۹، ۲۱، ۳۰ و ۴۹). در صورتی که محققین دیگر ایزوله‌های اسمبلیج B را با فراوانی بیشتری نسبت به اسمبلیج A گزارش کردند (۴۴ و ۵۰). از دلایل احتمالی اختلاف مشاهده شده بین نتایج ما با داده‌های گزارش شده از برخی مطالعات انجام شده در ایران و از جمله اهواز (۲۰، ۵۱ و ۵۲) می‌توان به نوع روش مورد استفاده جهت شناسایی ژنوتایپ‌های این انگل اشاره نمود که بر اساس PCR-RFLP و یا Nested-PCR و تعیین توالی تنها یک یا دو مارکر ژنتیکی صورت گرفتند، علاوه بر آن می‌توان به پهناور بودن کشور و تنوع فرهنگی، رفتاری و اجتماعی جمعیت مورد مطالعه نیز اشاره نمود. نتایج بررسی انجام شده، ارتباط معناداری را بین محل زندگی افراد در مناطق شهری و روستایی و نوع اسمبلیج نشان نداد. تاکنون در ایران مطالعات جامعی جهت بررسی شیوع ژیا‌ردیا دئودنالیس در مناطق شهری و روستایی صورت نگرفته و در این زمینه تنها بررسی‌های محدودی با حجم کم نمونه انجام شده است (۵۳). در مطالعه‌ای که در مالزی به‌وسیله انورا و همکاران در بین بومیان (Orang Asli) انجام شد هر دو اسمبلیج A و B، با فراوانی قابل‌توجهی از اسمبلیج A گزارش شدند (۵۴). در بررسی صورت گرفته به‌وسیله معین و همکاران در مصر، انتشار وسیع اسمبلیج E اختصاصی دام را در افراد مناطق روستایی نشان دادند و اظهار نمودند که کنترل ژیا‌ردیازیس در این منطقه مستلزم توجه به چرخه انتقال ژن‌نوز آن نیز می‌باشد (۵۵). مولینا و همکاران در بررسی کودکان شهری و روستایی در آرژانتین، در کودکان روستایی، فقط اسمبلیج B ژیا‌ردیا دئودنالیس را شناسایی کردند (۵۶). در مطالعه زاهدی و همکاران در استرالیا جهت تعیین ژنوتایپ ژیا‌ردیا دئودنالیس در ۸۸ نمونه مدفوع از افراد مبتلا به ژیا‌ردیازیس از مناطق شهری و روستایی جنوب شرقی کوئینزلند، اسمبلیج‌های A، B و E شناسایی شدند. در بررسی آنها، اسمبلیج E در افراد مبتلا به اسهال از هر دو منطقه شهری و روستایی مشاهده گردید که چرخه انتقال ژن‌نوز را پیشنهاد کردند (۴۵). یوسفی و همکاران در

- isolates from humans in Romania. *Parasit Vectors* 2020;13:387 doi: 10.1186/s13071-020-04248-2. 2020.
5. Sprong H, Caccio SM, van der Giessen JWB, on behalf of the Zn partners. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2009;3:e558.
 6. Asghari A, Mahdavi F, Karimi K, Mohammadi MR, Shamsi L, Asgari Q, et al. Molecular epidemiology and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in individuals attending major public hospitals in Shiraz, southwestern Iran: A public health concern. *Parasite Epidemiol Control* 2024;25:e00354 doi: 10.1016/j.parepi.2024.e00354e
 7. Abasian L, Talebi FdMfBUoMST, Bazyar A, Shirbazo S, Sayehmiri K, Ahmad N. Prevalence of *Giardia lamblia* in Iran: a systematic review and Meta analysis study. *Pejouhesh dar Pezeshki (Research in Medicine)*. 2013;36:111-6.
 8. Mowlavi G, Mirahmadi H, Rezaeian M, Kia E, Daryani N, Rokni M, et al. Prevalence of intestinal parasites in tribal parts of Khuzestan province during 2005-2007. *Govaresh* 2008;12:219-28.
 9. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 2007;5:1-38 doi: 10.2166/wh.2006002
 10. Nygård K, Schimmer B, Søbstad Å, Walde A, Tveit I, Langeland N, et al. A large community outbreak of waterborne giardiasis—delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health* 2006;6:141. doi: 10.1186/1471-2458-6-141
 11. Cheun HI, Kim CH, Cho SH, Ma DW, Goo BL, Na MS, et al. The first outbreak of giardiasis with drinking water in Korea. *Osong Public Health Res Perspect* 2013;4:89-92 doi: 10.1016/j.phrp.2013.03.003
 12. Fantinatti M, Cascais-Figueroa T, Austriaco-Teixeira P, Carvalho-Costa FA, Da-Cruz AM. *Giardia lamblia*-infected preschoolers present growth delays independent of the assemblage A, B or E. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2023;118:e230043 doi: 10.1590/0074-02760230043
 13. Hashemi-Hafshejani S, Meamar AR, Moradi M, Hemmati N, Solaymani-Mohammadi S, Razmjou E. Multilocus sequence typing of *Giardia duodenalis* genotypes circulating in humans in a major metropolitan area. *Front Med (Lausanne)* 2022;9:976956 doi: 10.3389/fmed.2022.976956
 14. Klotz C, Sannella AR, Weisz F, Chaudhry U, Sroka J, Tůmová P, et al. Extensive testing of a multi-locus sequence typing scheme for *Giardia duodenalis* assemblage A confirms its good discriminatory power. *Parasites & Vectors* 2022;15:489.
 15. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, Sousa MDC. New multilocus genotypes of *Giardia lamblia* human isolates. *Infect Genet Evol* 2017;54:128-37 doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.028
 16. Plutzer J, Lassen B, Jokelainen P, Djurković-Djaković O, Kucsera I, Dorbek-Kolin E, et al. Review of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the eastern part of Europe, 2016. *Euro Surveill* 2018;23:16-00825 doi: 10.2807/1560-7917ES20182316-00825
 17. Hellard ME, Sinclair MI, Hogg GG, Fairley CK. Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:290-3 doi: 10.1046/j1440-1746200002089x
 18. Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, Stevens MA, Gasser RB. *Giardia/giardiasis* — A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances* 2014;32:280-9.
 19. Wegayehu T, Karim MR, Li J, Adamu H, Erko B, Zhang L, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from children in Oromia Special Zone, central Ethiopia. *BMC Microbiol* 2016;16:89 doi: 10.1186/s12866-016-0706-7
 20. Rafiei A, Roointan ES, Samarbarfzadeh AR, Shayesteh AA, Shamsizadeh A, Pourmahdi Borujeni M. Investigation of Possible Correlation between *Giardia duodenalis* Genotypes and Clinical Symptoms in Southwest of Iran. *Iran J Parasitol* 2013;8:389-95.
 21. Rayani M, Zasmy Unyah N, Hatam G. Molecular Identification of *Giardia duodenalis* Isolates from Fars Province, Iran. *Iran J Parasitol* 2014;9:70-8.

مطالعات بیشتر و دقیق‌تر در نمونه‌های انسانی و حیوانی با استفاده از تکنیک MLST می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز جهت حمایت مالی کمال تشکر را داریم. همچنین از مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز و از پرسنل محترم آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی-درمانی و بیمارستان‌های استان خوزستان که در این امر ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان این مقاله در پژوهش و آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

حمایت مالی

این مقاله قسمتی از پایان‌نامه مقطع دکترای تخصصی رشته انگل‌شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز می‌باشد. بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با کد طرح تحقیقاتی مصوب به شماره ۹۴۱۵۰-OG قدردانی می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق با اصول اخلاقی معاهده هلسینکی و منشور اخلاق پژوهش معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام شد. تهیه نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با کد اخلاق IR.AJUMS.Rec.OG-94150 است.

کد اخلاق

این مقاله دارای کد اخلاق IR.AJUMS.Rec.OG-94150 می‌باشد.

References

1. Rodney DA. *Giardia duodenalis*: biology and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 2021;34:e00024-19.
2. Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 2004;126:15-35. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.008
3. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:110-40 doi: 10.1128/CMR0033-10.2011.
4. Costache C, Kalmár Z, Colosi HA, Baciu AM, Opreș RV, Györke A, et al. First multilocus sequence typing (MLST) of *Giardia duodenalis*



22. Elham K, Mahdi S, Mahdi F, Ahmad D, Abdol Sattar P. Assessing Different Methods of DNA Extraction from Giardia Lambliia Cysts. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2013;22:67-74.
23. Asgarian F, Tavalla M, Teimoori A, Zebardast N, Cheraghian B. Evaluation of three protocols of dna extraction for detection of giardia duodenalis in human fecal specimens. *Jundishapur J Microbiol* 2018;11:e63096.
24. Rai AK, Chakravorty R, Paul J. Detection of giardia, entamoeba, and cryptosporidium in unprocessed food items from northern India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008;24:2879-87.
25. Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of giardia duodenalis at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 2004;4:125-30 doi: 101016/jmeegid200402001
26. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype Giardia duodenalis cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* 2002;32:1023-30 doi: 101016/s0020-7519(02)00068-1
27. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of Giardia duodenalis and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 2005;35:207-13. doi: 101016/jijpara200410022
28. Sulaiman IM, Fayer R, Bem C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of Giardia duodenalis. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1444-52 doi: 103201/eid0911030084. 2003.
29. Huey CS, Mahdy MAK, Al-Mekhlafi HM, Nasr NA, Lim YAL, Mahmud R, et al. Multilocus genotyping of Giardia duodenalis in Malaysia. *Infection, Genetics and Evolution* 2013;17:269-76.
30. Minetti C, Lamden K, Durband C, Cheesbrough J, Fox A, Wastling JM. Determination of Giardia duodenalis assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasites & Vectors* 2015;8:444.
31. Uda-Shimoda CF, Colli CM, Pavanelli MF, Falavigna-Guilherme AL, Gomes ML. Simplified protocol for DNA extraction and amplification of 2 molecular markers to detect and type Giardia duodenalis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2014;78:53-8.
32. Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of Giardia duodenalis in stool specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:581-3 doi: 101128/JCM01823-06
33. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012;113:1014-26 doi: 101111/j1365-2672201205384x
34. Wilke H, Robertson LJ. Preservation of Giardia cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Methods* 2009;78:292-6 doi: 101016/jmimet200906018
35. Broglia A, Weitzel T, Harms G, Cacciò SM, Nöckler K. Molecular typing of Giardia duodenalis isolates from German travellers. *Parasitol Res* 2013 Oct;112(10):3449-56 doi: 101007/s00436-013-3524-y
36. Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium infections. *Infect Genet Evol* 2016 Jun;40:315-323 doi: 101016/jmeegid201509028
37. Babaei Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Rezaie S, Razmjou E, Arabshahi SKS-, et al. Molecular characterization of the Iranian isolates of Giardia lamblia: application of the glutamate dehydrogenase gene. *Iranian Journal of Public Health* 2008;37:75-82.
38. Pestechian N, Rasekh H, Rostami-Nejad M, Yousofi HA, Hosseini-Safa A. Molecular identification of Giardia lamblia; is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2014;7:168-72.
39. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. *Mol Biol Evol* 1999;16:1135-44 doi: 101093/oxfordjournals/molbeva026204
40. Pallant L, Barutzki D, Schaper R, Thompson RC. The epidemiology of infections with Giardia species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit Vectors* 2015;8:2 doi: 101186/s13071-014-0615-2
41. Holberton DV, Marshall J. Analysis of consensus sequence patterns in Giardia cytoskeleton gene promoters. *Nucleic Acids Res* 1995;23:2945-53. doi: 101093/nar/23152945
42. Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. The molecular epidemiology of Giardia lamblia: a sequence-based approach. *J Infect Dis* 1996;174:233-6 doi: 101093/infdis/1741233
43. Jerez Puebla LE, Núñez FA, Santos LP, Rivero LR, Silva IM, Valdés LA, et al. Molecular analysis of Giardia duodenalis isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. *Parasite Epidemiol Control* 2017;2:105-13. doi: 101016/jparepi201705003
44. Lee MF, Auer H, Lindo JF, Walochnik J. Multilocus sequence analysis of Giardia spp. isolated from patients with diarrhea in Austria. *Parasitol Res* 2017;116:477-81 doi: 101007/s00436-016-5306-9
45. Zahedi A, Field D, Ryan U. Molecular typing of Giardia duodenalis in humans in Queensland - first report of Assemblage E. *Parasitology* 2017;144:1154-61 doi: 101017/S0031182017000439
46. Cacciò SM, Sprong H. Giardia duodenalis: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol* 2010;124:107-12 doi: 101016/jexppara200902007
47. Ankarklev J, Franzén O, Peirasmaki D, Jerlström-Hultqvist J, Lebbad M, Andersson J, et al. Comparative genomic analyses of freshly isolated Giardia intestinalis assemblage A isolates. *BMC Genomics* 2015;16:697.
48. Birky C. Giardia Sex? Yes, but how and how much? *Trends in Parasitology* 2009;26:70-4.
49. 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;29:366-71.
50. Ramírez JD, Heredia RD, Hernández C, León CM, Moncada LI, Reyes P, et al. Molecular diagnosis and genotype analysis of Giardia duodenalis in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infect Genet Evol* 2015;32:208-13 doi: 101016/jmeegid201503015
51. Fallah E, Hatam-Nahavandi K, Rasul J, Poor B, Mohammad A. Molecular Identification of Giardia duodenalis Isolates from Human and Animal Reservoirs by PCR-RFLP. *Journal of Biological Sciences* 2008;8.
52. Bahrami F, Zamani G, Haghghi A, Khademerfan MB. Detection and molecular identification of human giardia isolates in the west of Iran. *Biomedical Research (India)* 2017;28:5687-92.
53. Akbarian A, Sadraie J, Forozandeh M. Evaluation of Giardia lamblia genetic differences in Khorramabad City and surrounding villages by use of PCR and sequencing. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2012;17:61-71.
54. Anuar TS, Nor Azreen S, Salleh FM, Moktar N. Molecular epidemiology of giardiasis among Orang Asli in Malaysia: application of the triosephosphate isomerase gene. *BMC Infectious Diseases* 2014;14:78.
55. Abdel-Moein KA, Saeed H. The zoonotic potential of Giardia intestinalis assemblage E in rural settings. *Parasitol Res* 2016;115:3197-202 doi: 101007/s00436-016-5081-7
56. Molina N, Minville M, Grenóvero S, Salomón C, Basualdo J. High prevalences of infection with Giardia intestinalis genotype B among children in urban and rural areas of Argentina. *Ann Trop Med Parasitol* 2011;105:299-309 doi: 101179/136485911X129876649665
57. Yousefi HA, Asgarian F, Tavalla M, Ghafari S, Kohansal K. In vitro Culture and Multilocus Genotyping of Giardia duodenalis Trophozoites Obtained from Human Fecal Samples in Southwest of Iran. *Curr Comput Aided Drug Des* 2024;20:145-54.
58. Puebla LJ, Núñez FA, Fernández YA, Fraga J, Rivero LR, Millán IA, et al. Correlation of Giardia duodenalis assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. *Infect Genet Evol* 2014;23:7-12 doi: 101016/jmeegid201401007



The First Evaluation of Genetic Diversity of Human *Giardia Duodenalis* Isolates Using Multilocus Sequence Typing (MLST) in Khuzestan Province

Mehdi Tavalla (Ph.D.)^{1,2}, Fatemeh Asgarian (Ph.D.)^{3*}

1- Dept. of Parasitology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2- Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3- School of Allied Medical Sciences, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 5 July 2024, Accepted: 21 October 2024

Abstract:

Introduction: *Giardia duodenalis* is one of the most important agents of water- and food-borne parasites. The genetic characteristics of this parasite play a crucial role in its pathogenesis. This study represents the first genotyping of *Giardia duodenalis* in humans using the MLST technique on housekeeping genes, performed in Khuzestan province.

Methods: The genomic DNA was extracted from cysts isolated from 129 human fecal specimens, and the diagnosis of *G. duodenalis* was verified by amplifying a 350 bp fragment of the SSU-rRNA gene. Nested PCR targeting the *tpi* and β -giardin genes, as well as semi-nested PCR of the *gdh* gene, were carried out to amplify the 530 bp, 511 bp, and 432 bp fragments of these genes, respectively, followed by sequencing of the amplified fragments. Phylogenetic analysis was then performed to determine the assemblages and sub-assemblages present.

Results: Among the 29 specimens that were successfully genotyped for one of the three genes, assemblages A and B were identified in 23 (79.31%) and 6 (20.69%) specimens, respectively. The present study found no significant correlations between assemblages and clinical symptoms, nor with the place of residence. Phylogenetic analysis indicated the presence of sub-assemblages AII and BIV.

Conclusion: The results showed that assemblage A and sub-assemblage AII are the dominant genotypes in Khuzestan province. The identification of sub-assemblages AII and BIV suggests an anthroponotic transmission route. However, further study is necessary to determine the transmission route of *Giardia* infection from animals to humans.

Keywords: *Giardia duodenalis*, Assemblage, MLST, Khuzestan.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: F. Asgarian, Email: fa57asgarian@gmail.com

Citation: Tavalla M, Asgarian F. The first evaluation of genetic diversity of human *Giardia duodenalis* isolates using Multilocus Sequence Typing (MLST) in Khuzestan province. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2024;19(3):25-38.

