

Genotyping of Giardia Duodenalis by β -giardin Gene in Asymptomatic Patients

Leyla Nasiri Goorabi¹,
Majid Pirestani²,
Javid Sadraei³

¹ MSc in Medical Parasitology, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received February 20, 2016 Accepted May 8, 2017)

Abstract

Background and purpose: Giardiasis is a major diarrheal disease and the major symptoms include diarrhea, bloating, abdominal cramps, weight loss, and abdominal pain. In developing countries, some patients can carry giardia parasites without experiencing any symptoms and some genotypes are believed to be responsible for that. The aim of this study was the genotyping of giardia duodenalis in asymptomatic patients.

Materials and methods: A total of 320 stool samples was collected from people attending Baharestan health centers in Tehran, Iran and investigated for giardia cyst by microscopic method. Positive samples were stored in Potassium dichromate 2.5% and 4°C. DNA extraction was performed using CTAB method and genotyping was carried out by PCR-RFLP on β -giardin gene.

Results: Among the samples, 25 were positive (7.8%). All patients suffering from giardiasis were asymptomatic and the appearance and color of samples were normal and brown, respectively. Four samples were found in women (16%) and 21 in men (84%). The results of RFLP on these samples revealed that 16 samples (64%) had infections with assemblage A and 9 samples (36%) were assemblage B. The phylogenetic tree revealed sub-assemblage AII, BIII, and BIV to be present in Baharestan.

Conclusion: The most common genotype of *Giardia duodenalis* is assemblage A in asymptomatic people in Baharestan, Iran. Identification of AII, BIII, and BIV genotypes in this area indicates the possibility of anthroponotic and anthrozoönotic transmission cycles.

Keywords: giardia, genotype, β -giardin, Baharestan

بررسی ژنوتیپ های ژیا ردیا دئودنالیس در بیماران بدون علامت با استفاده از ژن بتاژیا ردین

لیلا نصیری گورابی¹

مجید پیرستانی²

جاوید صدراپی³

چکیده

سابقه و هدف: ژیا ردیازیس یک بیماری کلینیکی خود محدود شونده را ایجاد می کند که علائم مشخصه آن اسهال، کرامپ های شکمی، نفخ، کاهش وزن و سوء جذب مواد می باشد. مواردی از ژیا ردیازیس بدون علائم بالینی در کشورهای در حال توسعه گزارش شده است که برخی از ژنوتیپ ها در ایجاد آن دخیل هستند. هدف از این مطالعه بررسی ژنوتیپ تک یاخته ژیا ردیا در بیماران فاقد علامت مبتلا به ژیا ردیازیس می باشد.

مواد و روش ها: تعداد 320 نمونه مدفوع از مراجعه کنندگان به مراکز بهداشتی شهرستان بهارستان (استان تهران) جمع آوری و با روش میکروسکوپی از نظر کیست ژیا ردیا مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های مثبت در دی کرومات پتاسیم 2/5 درصد در یخچال نگهداری و با استفاده از روش CTAB تخلیص DNA انجام گرفت. تعیین ژنوتیپ انگل های ژیا ردیا به روش PCR-RFLP بر روی ژن بتاژیا ردین انجام گرفت.

یافته ها: از 320 نمونه مورد بررسی، 25 نمونه از لحاظ کیست ژیا ردیا مثبت بود (7/8 درصد). کلیه بیماران مبتلا به ژیا ردیازیس فاقد علامت بوده و ظاهر و رنگ نمونه ها نیز دارای قوام و قهوه ای بود. 4 نمونه مربوط به زنان (16 درصد) و 21 نمونه مربوط به آقایان (84 درصد) بود. پس از تکثیر بخشی از ژن بتاژیا ردین و هضم با آنزیم HaeIII، به ترتیب 16 نمونه (64 درصد) مربوط به مجموعه A و 9 نمونه (36 درصد) مربوط به مجموعه B شناسایی شد. پس از تعیین توالی مشخص شد که ژنوتیپ های AII، BIII و BIV در شهرستان بهارستان شایع می باشند.

استنتاج: شایع ترین ژنوتیپ آلوده کننده ژیا ردیا دئودنالیس در افراد فاقد علامت شهرستان بهارستان، مجموعه A می باشد. با توجه به شناسایی ژنوتیپ های AII، BIII و BIV در این منطقه احتمال وجود چرخه های انتقال آنتروپونوتیک و آنتروپوزونوتیک وجود دارد.

واژه های کلیدی: ژیا ردیا، ژنوتیپ، بتاژیا ردین، بهارستان

مقدمه

وحشی و دریایی را آلوده می کند. ژیا ردیا دارای شیوع جهانی بوده، و یکی از شایع ترین انگل های مسبب اسهال در انسان می باشد که عفونت ناشی از آن فاقد علامت

ژیا ردیا دئودنالیس (مترادف: ژیا ردیا لامبلیا، ژیا ردیا اینتستینالیس) تک یاخته انگلی است که طیف وسیعی از مهره داران از جمله انسان، حیوانات خانگی، اهلی،

Email: pirestani@modares.ac.ir

مؤلف مسئول: مجید پیرستانی - تهران: تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی

1. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2. استادیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3. دانشیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1395/11/13 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/11/20 تاریخ تصویب: 1396/2/18

یا علامت‌دار بوده است. که به صورت بیماری مزمن و یا حاد نمایان می‌شود (1, 2). ژیاوردیازیس یکی از نگرانی‌های عمده سلامت در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه محسوب می‌شود (3, 4). براساس پیش بینی‌ها، در حدود 200 میلیون نفر در سراسر جهان دارای علائم ژیاوردیازیس روده ای بوده و سالانه 500 هزار مورد جدید گزارش می‌شود (5). فقر اقتصادی هم به‌طور مستقیم و غیر مستقیم عاملی در گسترش این عفونت انگلی محسوب می‌شود. کودکان، پرخطرترین قشر به ویژه در کشورهای در حال توسعه و جوامع مناطق محروم می‌باشند (6). بر اساس اهمیت بهداشتی این انگل به ویژه در میان کودکان کشورهای در حال توسعه، با ابتکار سازمان بهداشت جهانی از سال 2004 ژیاوردیا در زمره بیماری‌های فراموش شده قرار گرفت (7).

ژیاوردیا دئودنالیس دارای 8 ژنوتیپ یا مجموعه (A-H) می‌باشد که از لحاظ ژنتیک متفاوت بوده ولیکن از لحاظ ریخت شناسی کاملاً به یکدیگر شبیه هستند. مجموعه‌های A و B قادر به آلوده نمودن انسان و سایر پستانداران بوده در حالی که مجموعه‌های C تا H اختصاصیت میزبانی دارند (8). از سال 1979 سازمان بهداشت جهانی، ژیاوردیازیس را به عنوان یک عفونت زئونوز احتمالی طبقه‌بندی نمود.

در مطالعات اخیر، تنوع ژنتیکی و پراکنندگی جغرافیایی ژیاوردیا دئودنالیس با منشاء انسانی و حیوانی و بالقوه برای انتقال زئونوز توسط روش‌های ژنوتایپینگ مولکولی مختلف ارزیابی شده است. راه‌های انتقال ژیاوردیا دئودنالیس (ژئونوتیک یا آنتروپونوتیک) و منابع بالقوه آلودگی با تشخیص ژنوتیپ‌های آلوده کننده در یک منطقه جغرافیایی امکان پذیر می‌باشد. جهت مشخص شدن پتانسیل ژئونوتیک، اختلاف ژنتیکی و راه‌های انتقال، Multilocus Genotyping (MLG)، به عنوان روشی استاندارد در همه گیر شناسی مولکولی ایزوله‌های ژیاوردیا، همراه با داده‌های اپیدمیولوژیکی مطرح می‌باشد. در بررسی‌های مولکولی از ژن‌های

بتاژیاورین، گلو تامات دئیدروژناز و تریوز فسفات ایزومراز به منظور تعیین ژنوتیپ به صورت انفرادی یا ترکیبی استفاده می‌شود (9). از آنجایی که مطالعات مولکولی هزینه‌بر بوده، و استفاده همزمان سه ژن در تعیین ژنوتیپ ژیاوردیا زمان بر است لذا استفاده از یک ژن با توانایی شناسایی تمامی ژنوتیپ‌های ژیاوردیا مقرون به صرفه می‌باشد. هتروژنیسیته موجود در توالی لوکوس ژنی بتاژیاورین، در ردیابی منبع عفونت بسیار مفید بوده است. به ویژه اگر ژیاوردیا دارای یک ساختار جمعیتی کلونال باشد (به طور مثال در شرایط شیوع بیماری) (10, 11). نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ براساس آنالیز توالی یک لوکوس ژنی با هتروژنیسیته بسیار بالا نظیر بتاژیاورین و یا تریوز فسفات ایزومراز، نتایج مشابهی همانند مطالعات MLG به دست می‌آید (12). در بحث همه گیرشناسی افراد فاقد علامت نقش به‌سزایی در انتقال مستقیم و غیر مستقیم ژیاوردیا داشته‌اند. و در برخی از مطالعات ارتباط بین علائم بالینی و ژنوتیپ آلوده کننده مشاهده شده است (13). از این رو به دلیل اهمیت ناقلین بدون علامت و شناسایی ژنوتیپ‌های آلوده کننده در آن‌ها، در این مطالعه ژنوتیپ‌های ژیاوردیا دئودنالیس در افراد بدون علامت با استفاده از ژن بتاژیاورین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی می‌باشد. جامعه مورد مطالعه از مراجعه کنندگان به مراکز بهداشتی جهت دریافت کارت بهداشت در شهرستان بهارستان (جنوب غربی استان تهران) بودند. نمونه‌گیری از دی ماه 1394 الی اردیبهشت 1395 از مراکز بهداشتی شهرستان دارای آزمایشگاه انجام گرفت. تمامی افراد مراجعه کننده بالای 25 سال بودند که فقط افراد بدون علامت انتخاب شدند. در این مطالعه تعداد 320 نمونه مدفوع با روش میکروسکوپی از نظر کیست ژیاوردیا مورد بررسی قرار گرفته شده‌اند. و نمونه‌های مثبت در محلول دی کرومات پتاسیم 2/5 درصد در 4 درجه سانتی گراد

دانشگاه تربیت مدرس به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در خاتمه محصول PCR بر روی ژل آگارز 1 درصد رنگ آمیزی شده با safe DNA stain الکتروفورز گردید.

آنالیز RFLP با هضم 5 میکرولیتر از محصول PCR ثانویه با استفاده از 10 واحد از آنزیم HaeIII (Thermo Scientific) در 2 میکرو لیتر از بافر X10 و حجم نهایی 20 میکرو لیتر به مدت 2 ساعت در 37°C، به منظور تعیین ژنوتیپ A و B ژیا ردیا دئودنالیس انجام شد. سپس جهت بررسی الگوهای حاصل از RFLP، محصول واکنش بر روی ژل 3/5% الکتروفورز گردید. در نهایت به منظور تایید نهایی ژنوتیپ های شناسایی شده 4 ایزوله برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد. پس از هم ترازی چند گانه با موارد ثبت شده در بانک ژن، با استفاده از نرم افزار MEGA نسخه 7 و الگوریتم Maximum Likelihood و 1000 تکرار درخت فیلوژنی ترسیم شد. در رسم درخت فیلوژنی از ژیا ردیا مورس به عنوان گروه خارجی استفاده شد.

یافته ها

در این تحقیق از تعداد 320 نمونه مدفوع افراد مراجعه کننده به مراکز بهداشتی که با روش میکروسکوپی و گسترش مرطوب مورد ارزیابی قرار گرفتند، تعداد 25 نمونه (7/8 درصد) از نظر کیست ژیا ردیا مثبت بودند. از 25 نمونه، 4 نمونه مربوط به بانوان (16 درصد) و 21 نمونه مربوط به آقایان (84 درصد) بود که محدوده سنی آنها بین 60-25 سال متغیر بود. هیچ یک از این افراد علامت گوارشی خاصی نداشته و سابقه ای از اسهال نداشتند. ظاهر و رنگ نمونه ها طبیعی و قوام دار بود. پس از استخراج DNA نمونه های مثبت، در آزمایشات مولکولی با استفاده از ژن بتاژیا ردین، PCR بر روی تمامی نمونه ها انجام شد و محصول PCR با باند 510bp~ مشاهده شد (تصویر شماره 1).

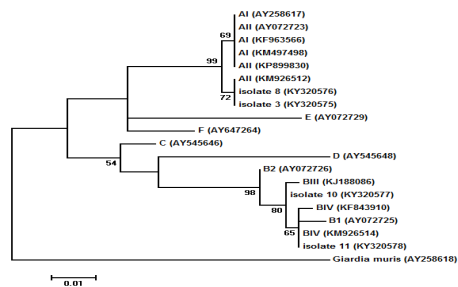
نگهداری شدند. جهت بررسی مولکولی پس از شستشوی نمونه های مثبت با نرمال سالین با استفاده از روش CTAB استخراج DNA صورت گرفت (14). واکنش زنجیره پلیمرز در این مطالعه از نوع-nested PCR به منظور افزایش دقت در تعیین ژنوتیپ ایزوله های انسانی ژیا ردیا دئودنالیس بوده است. پرایمرهای اختصاصی ژن بتاژیا ردین قابلیت تکثیر قطعه 510 bp~ را داشتند. لیست پرایمر های مورد استفاده در جدول 1 آمده است.

جدول شماره 1: فهرست پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه

منبع	طول قطعه تکثیری (bp)	نام و توالی پرایمر
(15)	-750	PCR1 G7: 5'- AAGCCCGACGACCTCACCCGAG TGC-3'
		G759: 5'- AGGCCGCCCTGGATCTTCGAGAC GAC-3'
	-510	F2: 5'- GAACGAACGAGATCGAGGTCGG- 3'
		R2: 5'-CTCGACGAGCTTCGTGT- 3'

واکنش PCR اولیه در حجم نهایی 15 میکرو لیتر شامل 5/5 میکرو لیتر (100-50 نانو گرم) از DNA انگل، 7/5 میکرو لیتر مسترمیکس شرکت (Ampliqon) (150301 A)، 1 میکرو لیتر از هر یک از پرایمرهای G7 و G759 با غلظت 10 پیکو مول انجام شد. حجم واکنش PCR ثانویه همانند PCR اولیه بود و در این مرحله از پرایمرهای F2 و R2 استفاده شد. در این مرحله از محصول PCR اولیه به عنوان الگو استفاده شد. شرایط چرخه حرارتی جهت انجام PCR اولیه بدین شرح بود: واسرشت اولیه در دمای 95°C به مدت 5 دقیقه، 35 چرخه با دمای واسرشت 95°C به مدت 30 ثانیه، دمای اتصال 52/5°C به مدت 30 ثانیه، دمای تکثیر 72°C به مدت 30 ثانیه و در نهایت 72°C به مدت 10 دقیقه. شرایط چرخه حرارتی در PCR ثانویه به استثنای دمای اتصال همانند مرحله اول بود. دمای اتصال در PCR ثانویه 55°C بود. در این مطالعه از نمونه انگل ژیا ردیای موجود در گروه انگل شناسی

یک ایزوله در شاخه BIII و یک ایزوله در شاخه BIV قرار می گیرند.



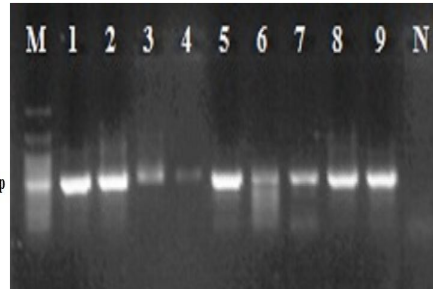
تصویر شماره 3: درخت فیلوژنی ژنوتیپ‌های شناخته شده ژیا ردیا دودنالیس و ایزوله های شناسایی شده بر اساس ژن BG با استفاده از الگوریتم Maximum Likelihood، مدل Tamura 3-parameter و 1000 تکرار

جدول شماره 2: مقایسه نتایج تعیین توالی ایزوله‌های شهرستان بهارستان با نمونه های موجود در بانک ژنی

ژنوتیپ شناسایی شده	درصد شباهت به ایزوله های ثبت شده	شماره دسترسی ژن	ایزوله شماره
AII	(100) FJ472824	KY320575	3
AII	(100) AY072724	KY320576	8
BIII	(100) KU504732	KY320577	10
BIV	(100) JF918489	KY320578	11

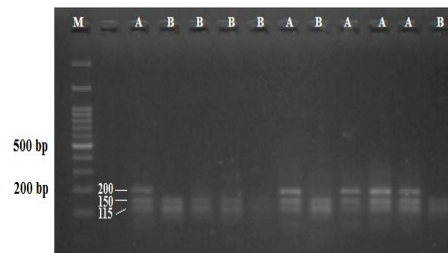
بحث

تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی شیوع عفونت ژیا ردیا در منطقه بهارستان تهران صورت نگرفته ولیکن در مطالعات گذشته در شهر تهران شیوع عفونت بین 7/5 الی 25/8 درصد گزارش شده است (16، 17). در این مطالعه میزان شیوع در افراد بزرگسال 7/8 درصد بود که این میزان در مقایسه با 25/8 درصد گزارش شده توسط آرانی و همکاران در سال 2005 از منطقه جنوب تهران، کاهش چشمگیری داشته که احتمالاً ناشی از افزایش آگاهی مردم نسبت به بهداشت فردی و اجتماعی می‌باشد. جهت شناسایی و تعیین ژنوتیپ‌های مختلف ژیا ردیا در نمونه های مدفوع، روش های مولکولی بر اساس PCR به طور چشمگیری افزایش یافته است. از ژن‌های مختلفی جهت تعیین ژنوتیپ ژیا ردیا در نمونه‌های بالینی و محیطی به خصوص آب استفاده



تصویر شماره 1: الکتروفورز محصول PCR ژن بتاژیا ردین برخی از ایزوله‌های ژیا ردیا دودنالیس بر روی ژل آگارز 1 درصد

نتایج RFLP نشان داد که در بین مبتلایان شیوع ژنوتیپ A ژیا ردیا (64 درصد) در مقایسه با ژنوتیپ B (36 درصد) بیشتر می‌باشد (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 2: تاثیر آنزیم HaeIII بر روی محصول PCR ژن بتاژیا ردین بر روی ژل آگارز 3/5 درصد. حرف A نشان‌دهنده ژنوتیپ A و حرف B نشان‌دهنده ژنوتیپ B می‌باشد. (باند های قابل مشاهده در ژنوتیپ A: 200A، 150 و 115 جفت باز. باندهای قابل مشاهده در ژنوتیپ B: 150B، 115 و 85 جفت باز)

با استفاده از توالی‌های مربوط به 4 ایزوله ارسالی و بلاست نمودن هر یک از داده‌ها، مشخص شد که توالی‌ها دارای 100 درصد همولوژی با موارد ثبت شده ژیا ردیا دودنالیس در بانک ژنی هستند (جدول شماره 2). 4 توالی مورد نظر با شماره دسترسی 78- KY320575 در بانک ژن ثبت شدند. با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه 7 و توالی ژنوتیپ‌های مختلف ثبت شده در بانک ژن درخت فیلوژنی رسم گردید (تصویر شماره 3). درخت فیلوژنی رسم شده نشان می‌دهد که دو ایزوله در شاخه مربوط به ژنوتیپ AII

می شود که می توان به ژن های بتاژیا ردین، گلو تامات دهیدروژناز و تریوز فسفات ایزومراز اشاره نمود. مطالعات مولکولی مختلفی در ایران صورت گرفته که از ژن های GDH و TPI در آن ها استفاده شده و از ژن بتاژیا ردین جهت تعیین ژنوتیپ ژیا ردیا دئودنالیس استفاده نشده است. با توجه به هتروژنیسیته موجود در توالی ژن بتاژیا ردین، این ژن کاندید مناسبی برای مطالعات همه گیر شناسی مولکولی بوده و می توان تمامی مجموعه های شناسایی شده از این انگل را از یکدیگر تفکیک نمود. نتایج RFLP با استفاده از آنزیم HaeIII نشان داد که ژنوتیپ A نسبت به ژنوتیپ B از شیوع بالاتری برخوردار بوده که با نتایج اعتمادی و همکاران در کرمان، رایانی و همکاران در شیراز، اکبری و همکاران در خرم آباد، سرکاری و همکاران در استان فارس، پسته چیان و همکاران در اصفهان، بابایی و همکاران در تهران و نهاوندی و همکاران در آذربایجان شرقی مطابقت دارد (24-18). در مورد ارتباط بین ژنوتیپ و علائم بیماری گزارش های ضد و نقیضی وجود دارد. در مطالعه ای در اتیوپی ارتباط قوی بین ژنوتیپ B و عفونت بدون نشانه مشاهده شده است (25). در مطالعه ای هاکیو و همکاران در بنگلادش مشخص شد که اگر چه ژنوتیپ B شایع تر است، اما در ایجاد اسهال نقشی نداشته، و ژنوتیپ A باعث ایجاد اسهال های پیش رونده می شود (26). با وجود تنوع ژنتیک یافت شده در مطالعه حاضر هیچ یک از افراد، علائم گوارشی نظیر اسهال نداشته که در تضاد با نتایج برخی از محققان ایرانی است. رحیمی و همکاران در شهرستان کرج ارتباط مستقیمی بین نمونه های اسهالی و ژنوتیپ A گزارش کردند (27). در مطالعه اعتمادی و همکاران بین ژنوتیپ A و اسهال ملایم و ژنوتیپ B و اسهال پایدار رابطه معنی داری وجود داشت (18). در مطالعه منوچهری و همکاران همبستگی آماری بین عفونت های بدون علامت و ژنوتیپ B و اسهال و ژنوتیپ A مشاهده شد (28). به هر حال، فاکتورهای

مربوط به میزبان نیز در ایجاد بیماری نقش داشته و برای درک بهتر نقش ژنوتیپ های مختلف در ایجاد علائم بالینی به مطالعات گسترده تری نیاز می باشد. پس از تعیین توالی، هم ترازوی آن ها با توالی های ثبت شده در بانک ژن و ترسیم درخت فیلوژنی حضور ژنوتیپ های AII، BIII و BIV در این منطقه به اثبات می رسد. در سال های گذشته اعتقاد بر این بود که ژنوتیپ AII تنها از میزبان انسانی یافت شده بنابراین انتقال آنتروپونوتیک را برای آن متصور بودند. با افزایش مطالعات بر روی میزبان های حیوانی مشخص شد که این ژنوتیپ در گاو، سگ، گربه، گوسفند و بز نیز آلوده کننده می باشد که حاکی از انتقال آنتروپونوتیک آن دارد (29). از طرفی تنها میزبان ژنوتیپ BIV نیز انسان شناخته می شد که با استفاده از تکنیک های ایزو آنزیمی مشخص شد که در حیوانات وحشی نظیر خرس و موسکارت به کرات وجود داشته و به طور کلی ماهیت زئونوتیک ژنوتیپ های AII، BIII و BIV به اثبات رسید (30). لذا امکان انتقال عفونت ژیا ردیا در این منطقه به صورت آنتروپونوتیک و آنتروپوزئونوتیک وجود دارد. مطالعه حاضر نشان داد که در شهرستان بهارستان مجموعه A در افراد فاقد علامت از فراوانی بیش تری برخوردار بوده که بر خلاف سایر نقاط جهان می باشد که مجموعه B بیش ترین شیوع را دارد. یکی از پدیده های بارز جمعیتی در شهرستان بهارستان، تراکم بالای جمعیتی و مهاجرت است که می تواند منجر به تنوع ژنتیکی ژیا ردیا دئودنالیس در این منطقه شود. با این وجود مطالعات جامع تری نیاز است تا رابطه دقیق بین علائم بیماری و مجموعه های شناسایی شده ژیا ردیا در این شهرستان مشخص شود.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و همکاری مرکز

قدردانی می‌نماییم.

بهداشت شهرستان بهارستان به انجام رسیده است. لذا بدین وسیله از همکاری‌های ارزنده آنان تشکر و

References

1. Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol.* 2010; 40(9): 1063-1074.
2. Thompson RA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12): 1259-1267.
3. Buret AG. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite.* 2008; 15(3):261-265.
4. Bundy DA, Hall A, Medley GF, Savioli L. Evaluating measures to control intestinal parasitic infections. *World health Stat Q.* 1992; 45(2-3):168-179.
5. World Health Organization. The World Health Report 1996: fighting disease, fostering development. Geneva .W H O; 1996.
6. Crompton DW, Savioli L. Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bull World Health Organ.* 1993; 71(1):1-7.
7. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. *Trends Parasitol.* 2006; 22(5): 203-208.
8. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, et al. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(8): e1262.
9. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009; 25(2): 93-100.
10. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1990; 87(7):2414-2418.
11. Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RC. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J Parasitol.* 1995 ; 81(3):368-383.
12. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Diseases.* 2003; 9(11): 1444-1452.
13. Cordón GP, Soldan OC, Vásquez FV, Soto JV, Bordes LS, Moreno MS, et al. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res.* 2008;103(2):459-465
14. Ali MA, Al-Herrawy AZ, El-Hawaary SE. Detection of enteric viruses, *Giardia* and *Cryptosporidium* in two different types of drinking water treatment facilities. *Water Res.* 2004; (18):3931-3939.

15. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardiaduodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 2005; 35(2), 207-213.
16. Alborzi A, Zerafati Z. Asymptomatic *Giardia* infection in children in a hyperendemic area, *Iranian J Med Sci.* 1994; 2-1(19). 6-1.
17. Arani AS, Alaghebandan R, Akhlaghi L, Shahi M, Lari AR. Prevalence of intestinal parasites in a population in south of Tehran, Iran. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; 50(3):145-149.
18. Etamadi S, Zia-Ali N, Babai Z, Fasihi Harandi M, Zia-Ali A. The correlation between clinical signs and genotypes of *Giardia duodenalis* isolated from patients with Giardiasis in Kerman city. *J Kerman Univ Med Sci.* 2014; 18(4): 330-338.
19. Rayani M, Unyah NZ, Hatam G. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from Fars province, Iran. *Iran J Parasitol.* 2014; 9(1):70-78.
20. Akbarian A, Sadraei J, Forouzandeh M. Evaluation of *Giardia lamblia* genetic differences in Khorramabad City and surrounding villages by use of PCR and sequencing. *SJKU.* 2012; 17(2):61-71.
21. 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(3):366-371.
22. Pestehchian N, Rasekh H, Babaei Z, Yousefi HA, Eskandarian AA, Kazemi M, et al. Identification of genotypes of *Giardia duodenalis* human isolates in Isfahan, Iran, using polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length polymorphism. *Adv Biomed Res.* 2012;1(1):84.
23. Babaei Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Rezaie S, Razmjou E, Soltani-Arabshahi SK, et al. Molecular characterization of the Iranian isolates of *Giardia lamblia*: application of the glutamate dehydrogenase gene. *Iranian J Pub Health.* 2008; 37(2):75-82.(Persian)
24. Nahavandi KH, Fallah E, Jamali R. Genetic characterization of *Giardia intestinalis* strains from patients having sporadic giardiasis by using PCR assay. *J Med Sci.* 2008; 8(3):310-315.
25. 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.
26. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia assemblage A* infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis.* 2005; 192(12): 2171-2173.
27. Rahimian F. Genotyping of human isolates of *Giardia* in Karaj city using PCR. Master Thesis. Tarbiat Modarres University, Faculty of Medical Sciences. 2013 (Persian).
28. Manouchehri Naeini K, Hosseini SA, Gholipour A, Babaei Z, Taghipoor S. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in individuals with and without chronic diarrhea using Polymerase Chain Reaction. *J Mazand Univ Med Sci.* 2012; 22(95):39-46 (Persian).
29. Luján HD, Svärd S, editors. *Giardia: A model organism.* Verlag Vienna :Springer; 2011.
30. Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(12):e558.