

Molecular Identification of Giardia intestinalis and Blastocystis hominis Genotypes from Fecal Samples in Khuzestan Province, Iran

Mohammad Bagheri¹,
Shirzad Gholami²,
Seyed Abdollah Hosseini³,
Ahmad Daryani²,
Shahabeddin Sarvi⁴

¹ MSc Student in Parasitology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 10, 2021 ; Accepted October 31, 2021)

Abstract

Background and purpose: *Giardia* and *Blastocystis* are common parasites of humans with a wide range of hosts. The aim of this study was to identify the genotypes of *Giardia intestinalis* and *Blastocystis hominis* in individuals attending Bavi health centers in Khuzestan province, Iran.

Materials and methods: In this study, 30 positive stool samples of *Giardia* and *Blastocystis* were collected from individuals attending Bavi health centers in 2019-2020. Then DNA extraction was performed on fecal samples. PCR was performed using GDH gene for *Giardia* and 18S rRNA region for *Blastocystis* and PCR products were drawn to determine sequence type and phylogenetic tree.

Results: Sequence analysis was performed on PCR products from *Giardia* based on amplification of GDH gene. Based on the results of DNA sequence, all identified samples belonged to assemblage BIV. Sequence analysis was performed on PCR products from *Blastocystis* according to amplification of 18S rRNA gene and all identified samples belonged to ST3 subtype.

Conclusion: The study showed that the predominant genotype of *Giardia* in Bavi was BIV which indicates a zoonotic cycle in this region. In addition, the predominant subtype of *blastocystis* was previously reported in this region (ST3) often seen in human-to-human transmission cycle, although there have been reports of animal-to-human cycle. Therefore, alongside health measures to control these two parasites in this area, molecular epidemiology studies in local animals is necessary to determine the zoonotic transmission of *Giardia* and *Blastocystis* parasites in this region.

Keywords: genotypes, *Giardia*, *Blastocystis*, Khuzestan

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (203): 73-82 (Persian).

* **Corresponding Author: Shahabeddin Sarvi** - Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: shahabesarvi@yahoo.com)

شناسایی ژنوتیپ های انگل های ژیا ردیا اینتستینالیس و بلاستوسیستیس هومینیس در نمونه های مدفوع در استان خوزستان

محمد باقری¹
شیرزاد غلامی²
سید عبدالله حسینی³
احمد دریانی²
شهاب الدین سروی⁴

چکیده

سابقه و هدف: ژیا ردیا و بلاستوسیستیس انگل های شایع انسان با طیف گسترده ای از میزبانان است. هدف از مطالعه حاضر شناسایی مولکولی ژنوتیپ های انگل های ژیا ردیا لامبلیا و بلاستوسیستیس هومینیس از نمونه های مدفوع مراجعه کنندگان به مراکز بهداشتی و درمانی در شهرستان باوی استان خوزستان در سال 98-1399 بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تعداد 30 نمونه مدفوع از مراجعه کنندگان به مراکز بهداشتی در شهرستان باوی استان خوزستان از آبان ماه 1398 تا دی ماه 1399 که با روش میکروسکوپی از نظر هر کدام از انگل های ژیا ردیا و بلاستوسیستیس مثبت شده بودند، جمع آوری شد. سپس استخراج DNA از نمونه های انگل های مدفوع انجام شد. PCR با استفاده از پرایمرهای ژن GDH برای ژیا ردیا و 18 S rRNA برای بلاستوسیستیس انجام شد و محصولات PCR برای تعیین ژنوتایپ، سکانس شد و درخت فیلوژنیک ترسیم شد.

یافته ها: پس از تکثیر ژن نواحی مورد نظر، آنالیز سکانس روی محصول PCR از ژیا ردیا براساس ژن GDH صورت گرفت. براساس نتایج سکانس همه نمونه های شناسایی شده به B assemblage (BIV) تعلق داشتند. آنالیز سکانس روی محصولات PCR از بلاستوسیستیس براساس ژن 18 S rRNA نشان داد که همه نمونه های شناسایی شده به ساب تایپ ST3 تعلق داشت.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتایپ غالب ژیا ردیا در شهرستان باوی استان خوزستان از نوع BIV بوده، که حاکی از وجود چرخه زئونوتیک انگل در این منطقه می باشد. علاوه بر این ساب تایپ غالب انگل بلاستوسیستیس در این منطقه ST3 بوده، که اغلب در چرخه انتقال انسان به انسان مشاهده می شود، هر چند گزارشاتی از وجود چرخه بین حیوان و انسان نیز وجود دارد. بنابراین ضمن انجام اقدامات بهداشتی برای کنترل این دو انگل در این منطقه، بررسی های اپیدمیولوژی در حیوانات آن منطقه برای تعیین چگونگی انتقال این انگل ها به آن ها توصیه می شود.

واژه های کلیدی: ژنوتیپ، ژیا ردیا، بلاستوسیستیس، خوزستان

مقدمه

سراسر جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه به دلیل رشد جمعیت، تنوع آب و هوایی، پایین بودن سطح

علی رغم پیشرفت های بهداشتی، عفونت های انگلی یکی از شایع ترین و مهمترین مشکلات بهداشتی در

مؤلف مسئول: شهاب الدین سروی - ساری ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: shahabesarvi@yahoo.com

1. کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 2. استاد، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 3. استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 4. دانشیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: 1400/3/20 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/4/30 تاریخ تصویب: 1400/8/9

به طور موفقیت آمیز برای جداسازی ژنوتایپ‌های ژیا ردیا لامبلیا تعدادی از میزبان‌های مهره‌دار مورد استفاده قرار گرفته است. با استفاده از این ژن می‌توان بین ساب ژنوتایپ‌های مختلف ژیا ردیا لامبلیا تفاوت قائل شد (8). اپیدمیولوژی مولکولی ژیا ردیا لامبلیا در بسیاری از مناطق ایران هنوز کاملاً مشخص نیست (9، 10). مطالعات صورت گرفته در مناطق مختلف استان خوزستان نشان از تنوع ژنتیکی ژیا ردیا در این منطقه دارد (11-13). بلاستوسیتیس هومینیس نیز یکی از تک‌یاخته‌های انگلی شایع دستگاه گوارش انسان و بسیاری از حیوانات بوده و انتشار جهانی دارد. تخمین زده می‌شود که یک میلیون نفر در سراسر جهان آلوده به این تک‌یاخته هستند. شیوع این تک‌یاخته از 1/6 الی 16 درصد در کشورهای توسعه یافته تا بیش از 60 درصد در کشورهای در حال توسعه متغیر می‌باشد (9). این انگل دارای دو مرحله کیستی و تروفوزوییت است و انتقال انگل از طریق فرم کیستی آن همراه آب و مواد غذایی و با به صورت مستقیم صورت می‌گیرد و می‌تواند علائم بالینی هم‌چون اسهال، استفراغ، کرامپ‌های شکمی و نفخ ایجاد کند (10). بلاستوسیتیس براساس پلی مورفیسم ژن 18 S rRNA به ساب تایپ‌های مختلفی (ST) تقسیم‌بندی می‌شود و تاکنون 17 ساب تایپ از این انگل شناسایی شده است. بیماری‌زایی این ارگانیزم عمدتاً به دلیل دارا بودن حاملان بدون علامت، تفاوت در حساسیت میزبانی، میکروبیوتای روده و تفاوت در پتانسیل‌های بیماری‌زایی در ساب تایپ‌های ژنتیکی مختلف است (11).

مطالعاتی به منظور تعیین ژنوتایپ بلاستوسیتیس در مناطق مختلف استان خوزستان انجام شده است و ژنوتایپ‌های ST1، ST3، ST4 گزارش شدند (17-19). این شواهد نشان‌دهنده آن است که الگوی ژنوتایپی بلاستوسیتیس در استان خوزستان متفاوت است. با وجود قرار گرفتن شهرستان باوی در منطقه آب و هوایی گرمسیری تا نیمه گرمسیری، شرایط جهت انتقال و گسترش این دو انگل افزایش یافته و تاکنون مطالعه‌ای

آگاهی و همچنین تغذیه نامناسب است. دو انگل ژیا ردیا و بلاستوسیتیس از مهم‌ترین و شایع‌ترین تک‌یاخته‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش می‌باشند (1). انگل ژیا ردیا از نظر تاکسونومی به شش گونه: *Giardia intestinalis (lamblia)* در پستانداران از جمله انسان، *G. agilis* در دوزیستان، *G. ardeae* و *G. psittaci* در پرندگان و *G. muris* در جوندگان تقسیم‌بندی می‌شود (2). ژیا ردیا لامبلیا دارای توزیع جهانی بوده به طوری که سالانه حدوداً باعث آلودگی 280 میلیون نفر می‌شود. این انگل انتشار جهانی داشته و بیش‌ترین شیوع آن در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر به ویژه در شرایط بهداشتی ضعیف و تراکم بالای جمعیت می‌باشد. این انگل یکی از شایع‌ترین انگل‌های روده‌ای در ایران است (3، 4). مطالعات اپیدمیولوژیکی مختلفی در زمینه شیوع انگل ژیا ردیا در نواحی متنوع آب و هوایی ایران انجام شده است. انتقال این انگل از طریق کیست و به‌طور مستقیم عوامل و شرایط و یا به‌وسیله‌ی آب و مواد غذایی صورت می‌گیرد (5). اجتماعی، فرهنگی، فقر اقتصادی، وضعیت اقلیمی، عدم امکانات بهداشتی، عدم توجه به بهداشت فردی و اجتماعی در افزایش بروز این بیماری نقش مهمی دارد (6). علائم بالینی متنوع بوده و از عفونت‌های بدون علائم تا اسهال مزمن متغیر است. به علت وجود ناقلین سالم انگل، این مساله مطرح شده که احتمالاً تفاوت‌های ژنتیکی در این گونه وجود دارد (7). ژیا ردیا لامبلیا یک گونه پیچیده با هشت ژنوتایپ اصلی A تا H می‌باشد. ژنوتایپ‌های A و B در انسان و حیواناتی مثل سگ وجود دارد ولی ژنوتایپ‌های C تا G دارای میزبان اختصاصی هستند. مطالعات تعیین توالی نمایانگر شمار زیادی از ساب تایپ‌ها یا assemblage های A و B بود. آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از ژن‌های RNA ریوزومی کوچک (SSU rRNA)، گلو تامات دهیدروژناز (GDH)، بتا ژیا ردین (BG) و تریوز فسفات ایزومراز (TPI) برای بررسی تنوع ژنتیکی و ژوتایپ‌های ژیا ردیا لامبلیا در میزبان‌های مختلف، استفاده شده است. GDH

درصد در 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند و به آزمایشگاه تحقیقاتی انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انتقال داده شدند. جهت بررسی مولکولی پس از شستشوی نمونه‌های مثبت با نرمال سالین، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (یکتا تجهیز آزما، ایران) طبق دستور عمل کیت انجام شد. واکنش زنجیره پلیمرز در این مطالعه از نوع semi-nested PCR به منظور افزایش دقت در تعیین ژنوتایپ ایزوله‌های انسانی ژیا ردیا و بلاستوسیسیتیس انجام شد. پرایمرهای اختصاصی ژن GDH ژیا ردیا قابلیت تکثیر قطعه 432 جفت بازی را داشتند و همچنین از پرایمرهای ناحیه ژن 18 S rRNA به طول 316 جفت باز جهت تشخیص انگل بلاستوسیسیتیس استفاده شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره 1 آمده است.

واکنش PCR اولیه در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 5 میکرولیتر DNA، 12/5 میکرولیتر از مستر میکس شرکت Ampliqon، 1 میکرولیتر از هریک از پرایمرهای داخلی ژیا ردیا (GDHiR و GDHeF) و پرایمرهای بلاستوسیسیتیس (18s-R و 18s-F) با غلظت 10 پیکومول انجام شد. حجم واکنش PCR ثانویه برای تشخیص ژیا ردیا همانند PCR اولیه بود و در این مرحله از پرایمرهای داخلی ژیا ردیا (GDHiF و GDHiR) استفاده شد. این مرحله از محصول PCR اولیه به عنوان DNA الگو استفاده شد. شرایط چرخه حرارتی جهت انجام PCR اولیه ژیا ردیا 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 57°C به مدت 30 ثانیه، دمای تکثیر 72°C به مدت 30 ثانیه و در نهایت 72°C به مدت 7 دقیقه. شرایط چرخه حرارتی

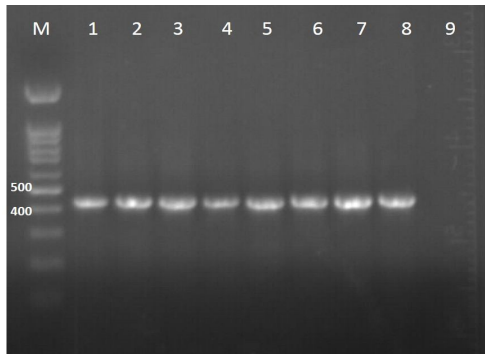
در زمینه انگل‌های روده‌ای در این شهرستان انجام نشده و به علت مجاورت این منطقه در کنار رودخانه کارون و تخلیه فاضلاب شهری در رودخانه کارون و عدم تصفیه صحیح آب شرب مردم منطقه، این منطقه می‌تواند به عنوان کانونی برای عفونت‌های انگلی باشد (12). با توجه به این که مطالعه‌ای در زمینه شیوع تک یاخته‌های روده‌ای در منطقه باوی انجام نشده است و از آنجایی که ژیا ردیا و بلاستوسیسیتیس به عنوان شایع‌ترین انگل‌های روده‌ای در ایران به شمار می‌آیند و از طرفی ژنوتایپ‌ها نقش مهمی در بیماری‌زایی و شناسایی ساختار جمعیتی انگل‌ها و انتقال بیماری دارند، بنابراین هدف از مطالعه حاضر مشخص کردن ژنوتیپ‌های تک یاخته‌های ژیا ردیا لامبلیا و بلاستوسیسیتیس هومینیس در این منطقه بود تا ژنوتیپ غالب منطقه و چرخه احتمالی این انگل‌ها در این منطقه روشن شود. نتایج این مطالعه می‌تواند به شناخت راه مفید در انتقال و مدیریت پیشگیری موثر علیه این انگل‌ها کمک کند.

مواد و روش‌ها

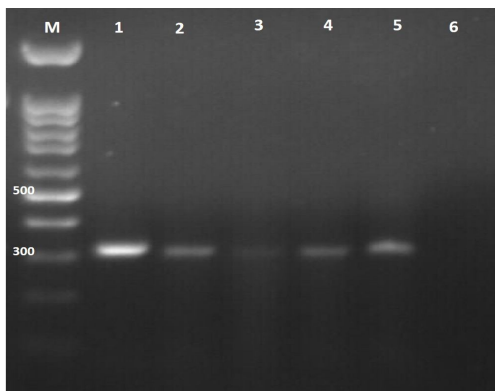
این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی می‌باشد که پس از تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد IR.MAZUMS.REC.1399.8714 انجام شد. جامعه مورد مطالعه، مراجعه‌کنندگان به مراکز بهداشتی در شهرستان باوی از آبان ماه 1398 تا دی ماه سال 1399 بودند. در این مطالعه تعداد 30 نمونه مدفوع متعلق به مراجعه‌کنندگان این مراکز که با روش میکروسکوپی بررسی شدند و از نظر حضور هر کدام از انگل‌های ژیا ردیا و بلاستوسیسیتیس مثبت شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها در محلول دی کرومات پتاسیم 2/5

جدول شماره 1: پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژیا ردیا و بلاستوسیسیتیس در مطالعه حاضر

Band size	Gene	3' 5'	Primer	Parasite
458 bp	GDH	TCAACGTCAACCGGGTTCCGT GTTATCCITGCACATCTCC	GDHeF GDHiR	<i>G. intestinalis</i>
432 bp		CAGTACAACCTCCGCTCTCGG	GDHiF	
316 bp	18S rRNA	GGAATCCTATTAGGGGACACTATACAT TTACTAAAATCCAAAGTTCATCGGAC	18s-F 18s-R	<i>B. hominis</i>



تصویر شماره 1: الکتروفورز محصول PCR ژن GDH ژیرادیا، باند 423 بازی. (M: مارکر وزنی 100 bp، شماره 1: کنترل مثبت، شماره 2 تا 8: نمونه های مثبت، شماره 9: کنترل منفی)



تصویر شماره 2: الکتروفورز محصول PCR ژن 18S rRNA بلاستوسیتیس باند 316 جفت بازی، (M: مارکر وزنی 100، شماره 1: کنترل مثبت، شماره 2 تا 5 نمونه مثبت، شماره 6: کنترل منفی)

آنالیز سکانس ژن GDH ژیرادیا

آنالیز سکانس روی 4 محصول PCR از ژیرادیا براساس amplification از ژن GDH صورت گرفت. براساس نتایج سکانس DNA از ژن GDH، هر 4 نمونه شناسایی شده به B assemblage (BIV) تعلق داشتند. نتایج آنالیز سکانس نشان داد که 3 ایزوله جدا شده 100 درصد و یک ایزوله 99/24 درصد شباهت به BIV sub-assemblage داشتند (GenBank Accession number MT292447.1).

در PCR ثانویه به استثنای دمای اتصال (56°C) همانند مرحله اول بود. شرایط چرخه حرارتی جهت انجام PCR اولیه بلاستوسیتیس بدین شرح بود: واسرشت اولیه در دمای 95°C به مدت 5 دقیقه، 35 چرخه با دمای واسرشت 95°C به مدت 60 ثانیه، دمای اتصال 75°C به مدت 60 ثانیه، دمای تکثیر 72°C به مدت 60 ثانیه و در نهایت 72°C به مدت 10 دقیقه. شرایط چرخه حرارتی در PCR ثانویه به استثنای دمای اتصال (56°C) همانند مرحله اول بود. در ادامه، محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد رنگ آمیزی شده با DNA safe stain الکتروفورز شد. در نهایت به منظور تایید نهایی ژنوتایپ های شناسایی شده 4 ایزوله از ژیرادیا و 3 ایزوله از بلاستوسیتیس برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد. پس از همترازی چند گانه با موارد ثبت شده در بانک ژن، با استفاده از نرم افزار MEGA نسخه 7 و الگوریتم تکرار درخت 1000 و Maximum Likelihood فیلوژنی ترسیم شد.

یافته ها

در مطالعه حاضر تعداد 30 نمونه مدفوع میکروسکوپی مثبت از هر کدام از انگل های ژیرادیا و بلاستوسیتیس از مراجعه کنندگان به مراکز بهداشتی در شهرستان باوی استفاده شد و پس از تایید نتایج میکروسکوپی با روش مولکولی، آنالیز مولکولی و تعیین ژنوتایپ این انگل ها انجام شد. تمامی نمونه ها از لحاظ ژن GDH در semi-nested PCR مثبت بودند. تصویر شماره 1 قطعه ی 423 بازی تکثیر شده از محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای GDH را نشان می دهد.

همچنین همه نمونه ها از لحاظ ژن 18S rRNA در PCR مثبت بودند. تصویر شماره 2 قطعه ی 312 جفت بازی تکثیر شده از محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای 18S rRNA را نشان می دهد.

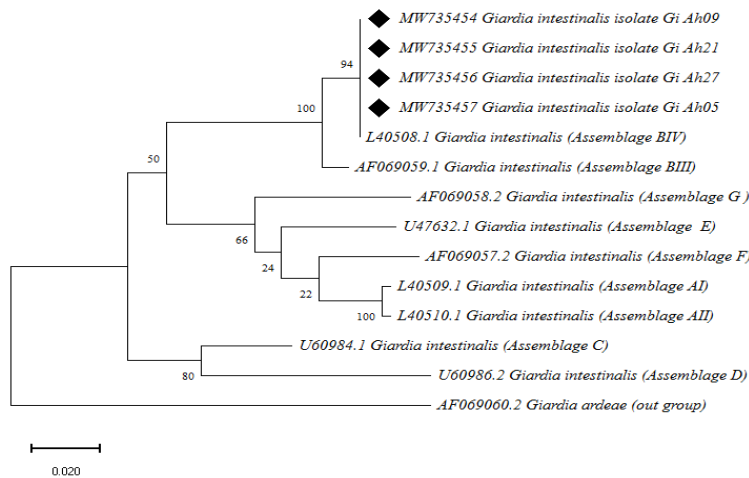
آنالیز سکانس ژن 18S rRNA بلاستوسیستیس

آنالیز سکانس بر روی 3 محصول PCR از بلاستوسیستیس بر اساس amplification از ژن 18S rRNA صورت گرفت. بر اساس نتایج سکانس DNA از ژن 18S rRNA هر 3 نمونه شناسایی شده به ساب تایپ ST3 تعلق داشته و 100 درصد با آن شباهت دارند (GenBank Accession number MK801409.1).

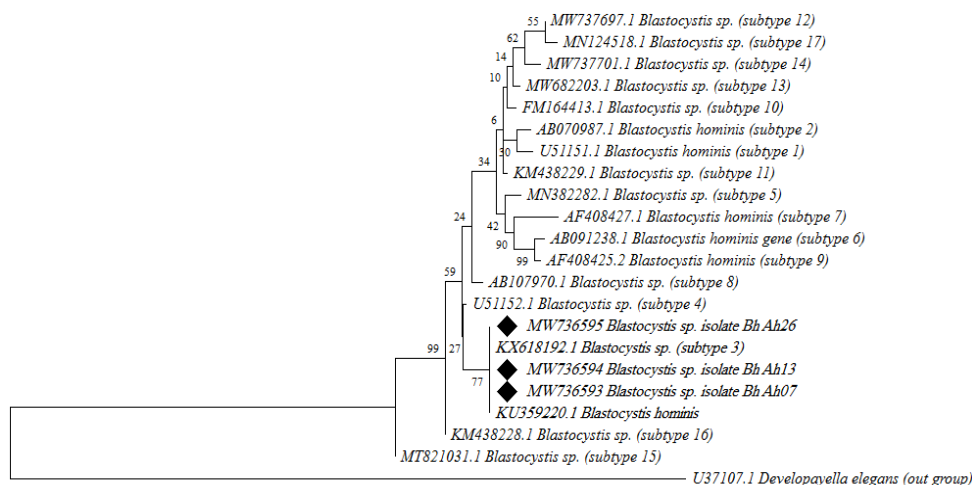
آنالیز فیلوژنیک

تجزیه و تحلیل فیلوژنیک توالی ژن GDH

ژیا ردیا و ژن 18S rRNA بلاستوسیستیس برای روشن شدن بیش تر رابطه ژنوتایپ های شناسایی شده در مطالعه حاضر با ژنوتایپ های جدا شده از مطالعات دیگر تعیین شد. تصویر شماره 3 و 4 درخت فیلوژنیک را در روش neighbor-joining از توالی های ژن GDH ژیا ردیا و ژن 18S rRNA بلاستوسیستیس جدا شده از بیماران در این مطالعه و جدا شده های مرجع GenBank نشان می دهد. در این تصاویر سکانس های علامت دار سویه های مطالعه حاضر بوده که با فاصله ی ژنتیکی از سایر سویه ها و ریشه درخت مشخص شده است.



تصویر شماره 3: ترسیم درخت فیلوژنیک با استفاده از روش Maximum Likelihood بر روی ژن GDH انگل ژیا ردیا با استفاده از نرم افزار MEGA X



تصویر شماره 4: ترسیم درخت فیلوژنیک با استفاده از روش Maximum Likelihood بر روی ژن 18S rRNA انگل بلاستوسیستیس با استفاده از نرم افزار MEGA X

بحث

ژیاوردیازیس یکی از دلایل اصلی اسهال در سنین مختلف به ویژه در کودکان زیر پنج سال در کشورهای در حال توسعه به شمار می آید. در ایران، ژیاوردیازیس انسانی با میزان عفونت از 5 درصد تا 23 درصد در مناطق مختلف کشور گزارش شده است (15). داده‌های مولکولی موجود در مورد ژیاوردیازیس در ایران محدود به مطالعات کمی است که با استفاده از روش‌های PCR-RFLP و Nested PCR در محل‌های GDH یا TPI انجام شده است (16).

توزیع جغرافیایی ژنوتایپ‌ها یا همان assemblages ژیاوردیا برحسب مکان، میزان و عوامل محیطی بسیار متغیر است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه شناسایی assemblages و sub-assemblages ژیاوردیا درک ما از زیست‌شناسی و رابطه میزان و انگل را به‌طور چشم‌گیری افزایش داده است. ژنوتایپ مولکولی جدا شده‌های انسانی ژیاوردیا از مناطق مختلف جهان نشان می‌دهد که تقریباً در همه موارد فقط A و B assemblages به عفونت‌های انسانی مربوط می‌شوند. ساب ژنوتایپ‌های C و D در سگ، گربه، و گرگ، E assemblage در گاو، گوسفند، بز، خوک، گاو میش و F و G assemblage به ترتیب در گربه و موش شناسایی شده است (16).

در مطالعه حاضر هی ایزوله‌های جدا شده ژیاوردیا مربوط به BIV sub-assemblages بودند. در آمریکای مرکزی و جنوبی، مناطقی با توزیع متفاوتی از assemblage وجود دارد. برخی گزارش‌ها از مکزیک، برزیل و کلمبیا توزیع بالاتر A assemblage را مشخص می‌کند، در حالی که در نیکاراگوئه، آرژانتین و همچنین کلمبیا assemblage غالب B است. این نشان می‌دهد که توزیع و تنوع ژنتیکی بیش‌تر از آن که متاثر از موقعیت جغرافیایی باشد، با عوامل اجتماعی - اپیدمیولوژیکی جمعیت مورد مطالعه مرتبط است (17).

در مطالعه سرکاری و همکاران در سال 2012 در جنوب ایران فراوان‌ترین ایزوله AII (74 درصد) و پس

از آن BII (17/44 درصد) و BIV (4 درصد) بود (18). در مطالعه‌ی بابایی و همکاران در تهران در AII sub-assemblages (87 درصد) عمده‌ترین ایزوله و BII (7/8 درصد) دومین ایزوله فراوان بود (19). در یک مطالعه در استان اصفهان، 59/7 درصد نمونه‌ها متعلق به ژنوتایپ AII، 34/32 درصد نمونه‌ها به‌عنوان ژنوتایپ B III و 2/98 درصد نمونه‌ها به‌عنوان ژنوتایپ BIV شناسایی شدند (26-28). در مجموع A assemblages بیش‌تر در شمال، جنوب، غرب، جنوب غربی و مرکز ایران دیده می‌شود، در حالی که مناطق شمال غربی کشور B assemblages را به‌عنوان ژنوتایپ غالب گزارش کرده‌اند (7). این تفاوت‌ها ممکن است به تفاوت در تعداد کل نمونه‌ها مربوط باشد که در هر منطقه به‌طور موفقیت‌آمیز تعیین ژنوتایپ شده باشد، یا به عوامل خاص اپیدمیولوژیکی جمعیت مورد مطالعه مرتبط باشد (7).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر که همه ایزوله‌های جدا شده مربوط به BIV بودند، که با سایر مطالعات در مناطق مجاور همخوانی داشت و با توجه به مطالعات قبلی که نشان دادند که ژنوتایپ BIV پتانسیل انتقال زئونوتیک بیش‌تری دارد، چنین استنباط می‌شود که لگوی انتقال اتروپوتیک و زئونوتیک در این منطقه وجود دارد. در بسیاری از مناطق روستایی شهرستان‌های خوزستان، مردم حیوانات را در خانه نگهداری می‌کنند، این حیوانات ممکن است به‌عنوان منبع عفونت‌های انسانی نقش داشته باشند و این امر بحث انتقال و برقراری چرخه زئونوتیک انگل ژیاوردیا را در این منطقه از کشور مطرح می‌سازد.

بلاستوسیتیس نیز یکی از رایج‌ترین تک یاخته‌هایی است که در نمونه‌های مدفوع انسانی افراد علامت‌دار و بدون علامت در سراسر جهان یافت می‌شود و طیف وسیعی از حیوانات از جمله پستانداران، پرندگان، خزندگان و بندپایان را آلوده می‌کند (20).

در مطالعه حاضر همانند بسیاری از مطالعات انجام شده در سایر مناطق جهان، ST3 به‌عنوان متداول‌ترین زیرگروه ژنوتایپی بلاستوسیتیس گزارش شد. این

میزبان تأثیر گزار باشد و بحث برقراری یک چرخه زئونوز از این ژنوتایپ (ساب تایپ) را در ایران مطرح می‌سازد (25). یکی از دلایل تنوع ساب تایپ در مناطق مختلف دنیا نوع روش شناسایی ساب تایپ‌ها است. تعیین ساب تایپ در مطالعات قبلی اغلب توسط PCR-RFLP انجام شده است، که یک روش دقیق برای شناسایی زیرگروه بلاستوسیستیس در نظر گرفته نمی‌شود، بلکه روش دقیق تعیین توالی به روش‌های مختلف از جمله سنگر می‌باشد. در مطالعه حاضر، نیز برای تعیین ژنوتایپ‌های مختلف این دو انگل از تعیین توالی دو طرفه به روش سنگر استفاده شد.

نتایج نشان داد که ژنوتایپ غالب انگل ژاردا در شهرستان باوی BIV بود که حاکی از وجود چرخه زئونوتیک در این منطقه می‌باشد. علاوه بر این، ساب تایپ غالب انگل بلاستوسیستیس در این منطقه ST3 گزارش شد که اغلب در چرخه انتقال انسان به انسان مشاهده می‌گردد هر چند گزارشات از وجود چرخه بین حیوان و انسان برای این ساب تایپ در ایران نیز وجود دارد. بنابراین ضمن انجام اقدامات بهداشتی برای کنترل این دو انگل در این منطقه، بررسی‌های اپیدمیولوژی مولکولی در حیوانات آن منطقه برای تعیین و بررسی انتقال زئونوتیک آن‌ها توصیه می‌شود.

ساب تایپ، به عنوان زیرگروه غالب در بیش تر مناطق جهان مانند ژاپن، پاکستان، بنگلادش، آلمان، سنگاپور، یونان، ترکیه، عربستان، تایلند و ایران است (21، 22). در مطالعه Hisao Yoshikawa و همکاران نشان داده شد که غالب ترین ژنوتایپ در 4 جمعیت مختلف در کشور ژاپن، ST3 (41 تا 92 درصد) بود (23). همچنین مطالعه مشابه دیگر توسط صالحی و همکاران (2021) در جنوب غرب ایران انجام شد که نشان داد که ST3 غالب است. آن‌ها گزارش کردند که 20/83 درصد، 20/83 درصد و 58/34 درصد نمونه‌ها به ترتیب ساب تایپ‌های ST1، ST2 و ST3 بودند. اعتقاد بر این است که ST3 زیرمجموعه اصلی انسان است (24). علاوه بر این مطالعات، در مطالعه‌ی خشنود و همکاران در ایران (2015) نشان داده شد که ساب تایپ‌های شناسایی شده در این مطالعه ST3، ST4، ST5 و ST7 بودند و بیش ترین ساب تایپ شناسایی شده ST4 بود (22). موسوی و همکاران (2012) همچنین ST1، ST2 و ST3 را در انسان شناسایی کردند. با این حال هم چنین موارد کمی از ST7 گزارش شده، که در سایر مطالعات به‌طور پراکنده در انسان یافت شده است. 13/3 درصد از زیرگروه‌های بلاستوسیستیس در گاوهای ایران ST3 هستند (81) که ممکن است در انتشار و انتقال بین دو

References

- Cernikova L, Faso C, Hehl AB. Five facts about *Giardia lamblia*. PLoS Pathog 2018; 14(9): e1007250.
- Abozahra R, Mokhles M, Baraka K. Molecular genotyping of *Giardia lamblia* assemblages by conventional PCR in rural and urban areas in Egypt. Microbes and Infectious Diseases 2021; 2(2): 378-385.
- Pan W, Wang M, Abdullahi AY, Fu Y, Yan X, Yang F, et al. Prevalence and genotypes of *Giardia lamblia* from stray dogs and cats in Guangdong, China. Vet Parasitol Reg Stud Reports 2018; 13: 30-34.
- Zylberberg HM, Green PH, Turner KO, Genta RM, Lebowhl B. Prevalence and predictors of giardia in the united states. Dig Dis sci 2017; 62(2): 432-440.
- Hooshyar H, Ghafarinasab S, Arbabi M, Delavari M, Rasti S. Genetic variation of *Giardia lamblia* isolates from food-handlers in Kashan, Central Iran. Iran J Parasitol 2017; 12(1): 83-89.

6. Bahrami F, Zamini G, Haghighi A, Khademerfan MB. Detection and molecular identification of human Giardia isolates in the West of Iran. *Biomed Res India* 2017; 28(13): 5687-5692.
7. AL-huchaimi SN, AL-hassani MK, Khattar A, Alhatemi S, Alshammari MMM, Mahmood TA. The Association Between Genotypes And Clinical Symptoms Of Giardia Lamblia In Patients With Symptomatic Giardiasis. *International Journal of Pharmaceutical Research* 2020; 12(4): 1642-1647.
8. Faria CP, Zanini GM, Dias GS, da Silva S, do Céu Sousa M. New multilocus genotypes of Giardia lamblia human isolates. *Infect Genet Evol* 2017; 54: 128-137.
9. Mohamed AM, Ahmed MA, Ahmed SA, Al-Semany SA, Alghamdi SS, Zagloul DA. Predominance and association risk of Blastocystis hominis subtype I in colorectal cancer: a case control study. *Infect Agent cancer* 2017; 12(21): 1-8.
10. Angelici MC, Nardis C, Scarpelli R, Ade P. Blastocystis hominis transmission by non-potable water: a case report in Italy. *New Microbiol* 2018; 41(2): 173-177.
11. Shaker D, Anvari D, Hosseini SA, Fakhar M, Mardani A, Hezarjaribi HZ, et al. Frequency and genetic diversity of Blastocystis subtypes among patients attending to health centers in Mazandaran, northern Iran. *J Parasit Dis* 2019; 43(4): 537-543.
12. Baghlaninezhad R, Beiromvand M, Veisi MS. Analysis of knowledge and attitudes related to parasitic infections among inhabitants of Ahvaz County, Khuzestan Province, Iran. *Acta Trop* 2019; 193: 211-216.
13. Góra-Gebka M, Liberek A, Sikorska-Wiśniewska G, Jankowska A, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Bako W, et al. Giardiasis in children-clinical diversity and diagnostic problems based on own experience. *Med Wieku Rozwoj* 2006; 10(2): 529-538.
14. Tavares RG, Staggemeier R, Borges A, Rodrigues M, Castelan L, Vasconcelos J, et al. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2011; 17(3): 239-248.
15. Siyadatpanah A, Sharif M, Daryani A, Sarvi S, Kohansal MH, Barzegari S, et al. Spatial distribution of Giardia lamblia infection among general population in Mazandaran Province, north of Iran. *J Parasit Dis* 2018; 42(2): 171-176.
16. Fakhar M, Kialashaki E, Sharif M. An overview on the present situation of giardiasis in Iran and the world with emphasis on zoonotic aspects. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24(113): 235-251 (Persian).
17. Puebla LEJ, 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(3): 105-113.
18. 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.
19. Babaei Z, Ourmazdi H, Akhlaghi L, Rezaei S, Razmjou E, Soltani AS, et al. Molecular characterization of the Iranian isolates of Giardia lamblia: application of the glutamate dehydrogenase gene. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(2): 75-82.
20. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, et al. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of Blastocystis hominis. *Parasitol Res* 2010; 106(5): 1033-1038.

21. Badparva E, Ezatpour B, Mahmoudvand H, Behzadifar M, Behzadifar M, Kheirandish F. Prevalence and genotype analysis of blastocystis hominis in Iran: a systematic review and meta-analysis. Arch Clin Infect Dis 2017; 12(1): e36648.
22. Khoshnood S, Rafiei A, Saki J, Alizadeh K. Prevalence and genotype characterization of Blastocystis hominis among the baghmalek people in southwestern Iran in 2013-2014. Jundishapur Journal of Microbiology 2015; 8(10): e23930.
23. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, et al. Genomic analysis of Blastocystis hominis Strains isolated from two long-term health care facilities. J Clin Microbiol 2000; 38(4): 1324-1330.
24. Salehi M, Mardaneh J, Niazkar HR, Minooeianhaghighi M, Arshad E, Soleimani F, et al. Prevalence and Subtype Analysis of *Blastocystis hominis* Isolated from Patients in the Northeast of Iran. Journal of Parasitology Research 2021; 2021: 8821885, 8.
25. Moosavi A, Haghighi A, Nazemalhosseini Mojarad E, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, et al. Genetic variability of Blastocystis sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. Parasitol Res 2012; 111(6): 2311-2315.