



A Survey on Giardia and Cryptosporidium Infection and Genotyping Common Giardia in Children in Alborz Province

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Effati F.¹ MSc,
Dalimi A.H.* PhD,
Pirestani M.¹ PhD

How to cite this article

Effati F, Dalimi A H, Pirestani M. A Survey on Giardia and Cryptosporidium Infection and Genotyping Common Giardia in Children in Alborz Province. Pathobiology Research. 2018;21(3):133-139.

*Parasitology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

¹Parasitology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Parasitology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jaleh-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82883838
Fax: +98 (21) 82883568
dalimi_a@modares.ac.ir

Article History

Received: February 5, 2018

Accepted: April 21, 2018

ePublished: September 03, 2018

ABSTRACT

Aims Giardia and Cryptosporidium are enteric protozoans, causing gastrointestinal infection in humans and animals such as mammalian and birds worldwide. Both protozoans cause diarrhea and nutritional disorders in human. The present research aimed at investigating the Giardia and Cryptosporidium infection and genotyping common Giardia in children in Alborz province.

Materials & Methods In this descriptive cross sectional study, 160 stool samples of children aged 2-10 years old in Alborz province were first stained with the modified Ziehl-Neelsen staining method for Cryptosporidium and trichrome staining method for Giardia, and they were evaluated for infection with these two protozoans. Then, positive samples were analyzed by molecular method to genotype. *Giardia duodenalis* based on the TPI gene and Cryptosporidium based on the 18SrRNA gene were investigated by Nested PCR and to determine the groups and subgroups by sequencing. For drawing phylogenetic tree, MEGA 7 software and Maximum likelihood algorithm with 1000 replications were used.

Findings Cryptosporidium was detected in 4 (2.50%) samples, while Giardia was detected in 15 (9.37 %) samples with staining method. In no sample of patients with clinical symptoms of diarrhea, Cryptosporidium was observed. Among 4 isolates of *Giardia duodenalis*, 1 BIV, 2 BIII, and 1 All isolates were detected, some of which belonged to asymptomatic children and the drawn phylogenetic tree confirmed it. Attempts to determine genotype Cryptosporidium failed.

Conclusion Identification of AII, BIV, and BIII genotypes in 2-10 years old children in Alborz province indicates anthroponotic and anthrozoonotic transmission of Giardia infection, respectively, in this province.

Keywords Giardia; Cryptosporidium; Genotyping; Children

CITATION LINKS

[1] Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic ... [2] Prevalence of enteric pathogens among community based ... [3] The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia ... [4] Epidemiology of cryptosporidium: Transmission, detection and ... [5] Update on human infections caused by intestinal ... [6] Low-level environmental lead exposure and intellectual impairment—the current concepts of risk assessment [7] Genetic modification of the diarrhoeal pathogen ... [8] Molecular identification of Giardia duodenalis ... [9] Molecular characterization of the Iranian isolates ... [10] Genetic characterization of Giardia intestinalis strains ... [11] Evaluation of Giardia lamblia genetic differences ... [12] Genotyping of Giardia lamblia isolates ... [13] Identification of genotypes of Giardia duodenalis ... [14] Genotyping of Giardia duodenalis isolates in individuals ... [15] Genotyping of human isolates of Giardia ... [16] The correlation between clinical signs and genotypes ... [17] Molecular identification of Giardia duodenalis ... [18] Genotyping of Giardia duodenalis by β -giardin gene in ... [19] The Prevalence of giardiasis infections among people admitted ... [20] Detection of enteric viruses, Giardia and Cryptosporidium in two different ... [21] Multilocus genotyping of Giardia duodenalis isolates from ... [22] Giardia assemblage A infection and diarrhea in ... [23] Giardia and Cryptosporidium and public health: The epidemiological ... [24] Triosephosphate isomerase gene characterization and ... [25] Study of Cryptosporidium in children below five years of age with diarrhea ... [26] Cryptosporidial infection in the children referred to ... [27] The prevalence of Cryptosporidium Parvum infection in adults presenting ... [28] Prevalence of Cryptosporidium in children suffering ... [29] A survey study of Cryptosporidium infection in children under 10 years old referred to the health care centers ... [30] Prevalence of cryptosporidium in children under 5 years of age, immunocompromised patients and ...

بررسی آلودگی به ژیا ردیا و کریپتوسپوریدیوم و تعیین ژنوتیپ ژیا ردیای شایع در کودکان استان البرز

فاطمه عفتی MSc

گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

عبدالحسین دلیمی PhD*

گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مجید پیرستانی PhD

گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: ژیا ردیا و کریپتوسپوریدیوم، تک‌یاخته‌های روده‌ای بیماری‌زا هستند که انسان و حیوانات مختلف از قبیل پستانداران و پرندگان را در تمام دنیا آلوده می‌کنند. هر دو تک‌یاخته از عوامل ایجادکننده اسهال و اختلال‌های تغذیه‌ای در جوامع انسانی هستند. هدف این پژوهش، بررسی آلودگی به ژیا ردیا و کریپتوسپوریدیوم و تعیین ژنوتیپ ژیا ردیای شایع در کودکان استان البرز بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش توصیفی-مقطعی حاضر، ۱۶۰ نمونه مدفوع کودکان ۱۰-۲ ساله استان البرز، ابتدا با روش زیل‌نلسون اصلاح‌شده برای کریپتوسپوریدیوم و تری‌کروم برای ژیا ردیا، رنگ‌آمیزی و از لحاظ آلودگی به این دو تک‌یاخته بررسی شدند. سپس برای تعیین ژنوتیپ، نمونه‌های مثبت به‌وسیله روش مولکولی مورد مطالعه قرار گرفتند. ژیا ردیا *دئودنالایس* براساس ژن TPI و کریپتوسپوریدیوم براساس ژن 18SrRNA با روش Nested PCR و برای تعیین گروه‌ها و زیرگروه‌ها به‌وسیله تعیین توالی بررسی شدند. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار MEGA 7 و الگوریتم Maximum likelihood با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد.

یافته‌ها: کریپتوسپوریدیوم در ۴ نمونه (۲/۵۰٪) و ژیا ردیا در ۱۵ نمونه (۹/۳۷٪) با روش رنگ‌آمیزی یافت شدند. در هیچ نمونه‌ای از افراد دارای علائم بالینی اسهال، انگل کریپتوسپوریدیوم مشاهده نشد. از مجموع چهار ایزوله ژیا ردیا *دئودنالایس*، یک ایزوله BIV، دو ایزوله BIII و یک ایزوله AII تشخیص داده شد که بعضی از آنها مربوط به کودکان بدون علائم بالینی بود و درخت فیلوژنی رسم شده آن را تایید کرد. تلاش برای تعیین ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم به نتیجه نرسید.

نتیجه‌گیری: شناسایی ژنوتیپ‌های AII، BIV و BIII در کودکان ۱۰-۲ ساله استان البرز به‌ترتیب نشان‌دهنده چرخه انتقال آنتروپونوتیک و آنتروپوزئونوتیک عفونت ژیا ردیا در این استان است.

کلیدواژه‌ها: ژیا ردیا، کریپتوسپوریدیوم، تعیین ژنوتیپ، کودکان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۱

*نویسنده مسئول: dalimi_a@modares.ac.ir

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم تک‌یاخته‌ای از گروه اپی‌کمپلکس‌ها است که اغلب در کودکان و افراد با سیستم ایمنی سالم به‌صورت یک ناراحتی گوارشی ساده تا اسهال حاد خودمحدودشونده بروز می‌نماید، ولی در افراد با سیستم ایمنی ناکارآمد اکتسابی یا غیراکتسابی می‌تواند موجب اسهال شدید و مرگ شود^[1, 2]. این تک‌یاخته اهمیت پزشکی و دامپزشکی دارد و سبب گاستروآنتریت در میزبان‌های مختلف مهره‌دار می‌شود. گزارش‌هایی از درجات مختلفی از پاتوژنیسیته و ویروالانس گونه‌ها و ایزوله‌های مختلف آن در میزبانان مشکوک به این عفونت رسیده است^[3]. بیماری اسهال دومین عامل مرگ در بچه‌های زیر ۵ سال در سراسر جهان است. بعد از روتاویروس‌ها، کریپتوسپوریدیوم به‌عنوان دومین عامل اسهال متوسط تا شدید است. کودکان با سوء تغذیه در معرض اسهال مزمن با این انگل هستند. عفونت ماه‌ها و حتی سال‌ها در

افراد با نقص سیستم ایمنی یا نقص مادرزادی آن باقی می‌ماند^[4]. از طرفی عفونت ژیا ردیایی به‌عنوان اصلی‌ترین عامل اسهالی غیرویروسی در کشورهای غیرصنعتی محسوب می‌شود. عفونت ژیا ردیایی به‌دلیل شیوع و بیماری‌زایی بالا و اثرات آن بر رشد و عملکرد ادراکی کودکان آلوده، نقش بسیار مهمی در بهداشت عمومی دارد. تشخیص آلودگی براساس تهیه گسترش و مشاهده میکروسکوپی رسوب مدفوع صورت می‌گیرد، ولی روش‌های مولکولی از حساسیت و اختصاصیت بالایی نسبت به روش میکروسکوپی برخوردار هستند. در واقع با استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی می‌توان ماهیت ژنوتیک ژیا ردیا را بیشتر آشکار کرد. بر همین اساس در سال‌های اخیر، ژیا ردیازیس را به‌عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام مطرح کرده‌اند^[5, 6]. برای درک صحیح این نکته، اطلاع از نقش حیوانات مزرعه و خانگی در انتقال و انتشار ژیا ردیازیس نوع انسانی، عفونت‌زایی کیست‌های ژیا ردیایی آلوده‌کننده انسان و توان آلوده‌سازی این کیست‌ها در منابع آبی و آب‌های آشامیدنی، تفاوت‌های بیولوژیک، تظاهرات بالینی و قدرت انتشار ژنوتایپ‌ها و ساب‌تایپ‌های ژیا ردیا *دئودنالایس* ضروری است^[7]. مطالعات انجام‌شده در مناطق مختلف جهان در خصوص تعیین ژنوتایپ ایزوله‌های ژیا ردیا گواه بر این است که تقریباً انسان غالباً با ژنوتایپ‌های A یا B آلوده می‌شود. ژنوتایپ‌های دیگری که به‌ندرت در انسان دیده شده‌اند شامل ژنوتایپ‌های C و D هستند. ژنوتایپ A دارای سه زیرژنوتایپ AII، AIII و AIII هستند که در انسان و سگ، فقط در انسان و AIII فقط در حیوانات دیده می‌شود. ژنوتایپ B دارای دو زیرژنوتایپ BII و BIV است که ژنوتایپ BIII بین انسان، سگ، بوزینه، خرگوش و غیره مشترک است، در حالی که ژنوتایپ BIV فقط در انسان گزارش شده است^[8].

در ایران نیز تعدادی از مطالعات در این زمینه در برخی مناطق و استان‌های مختلف کشور انجام شده است که می‌توان به مطالعات *بابایی و همکاران* در تهران^[9]، *فلاح و همکاران* در آذربایجان شرقی^[10]، *اکبریان و همکاران* در خرم‌آباد^[11]، *سرکاری و همکاران* در استان فارس^[12]، *پسته‌چیان و همکاران* در اصفهان^[13]، *منوچهری‌نائینی و همکاران* در شهرکرد^[14]، *رحیمیان‌خرمازرد* در کرج^[15]، *اعتمادی و همکاران* در کرمان^[16]، *رایانی و همکاران* در شیراز^[17] و *نصیری گورآبی و همکاران*^[18] اشاره کرد. نظر به اینکه در سطح استان البرز تاکنون چنین مطالعه‌ای صورت نگرفته است، بنابراین هدف پژوهش حاضر بررسی آلودگی به ژیا ردیا و کریپتوسپوریدیوم و تعیین ژنوتیپ ژیا ردیای شایع در کودکان استان البرز بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه توصیفی-مقطعی حاضر روی ۱۶۰ نمونه مدفوع کودکان ۲ تا ۱۰ ساله که به بیمارستان کودکان شهیدباهنر کرج و آزمایشگاه تشخیص طبی شهرستان فردیس، نظرآباد و اشتهارد مراجعه کرده بودند، اجرا شد. استان البرز دارای ۶ شهرستان کرج، نظرآباد، فردیس، ساوجبلاغ، طالقان و اشتهارد است که در این مطالعه با روش نمونه‌گیری هدفمند، یک بیمارستان کودکان در مرکز استان البرز یعنی شهرستان کرج و چهار آزمایشگاه مرکزی و رازی فردیس و تشخیص طبی نظرآباد و اشتهارد انتخاب شد. ۱۶۰ نمونه طی یک دوره ۶ ماهه (اسفند سال ۱۳۹۴ الی مرداد ۱۳۹۵) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از کودکان ۲ تا ۱۰ ساله از هر دو جنس دختر و پسر که به تشخیص پزشک و بدون در نظر گرفتن خصوصیات خاص برای

PCR استفاده شد. طول قطعه تکثیر یافته به وسیله این پرایمرها ۷۵۰ جفت بازی بود.

1. Primary PCR primers

a. Forward (F1): HSP1 5'-ATG AGA TTG TCG CTC ATT ATC-3'

b. Reverse (R1): HSP2 5'-TTA CAA CAC GAATAA GGC TGC-3'

2. Secondary PCR primers

c. Forward (F2): R3 5'-CCA CAT TAC AAA TGA AGT GCC GC-3'

d. Reverse (R2): HSP3 5'-GCC GTT CCA CTC AGA GGA AC-3'

پرایمرها (ماکروژن؛ کره جنوبی) با غلظت ۱۰ پیکومول برای PCR استفاده شدند. واکنش PCR اولیه در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر از DNA انگل، ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس و یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای HSP1 و HSP2 با غلظت ۱۰ پیکومول انجام شد. حجم واکنش PCR ثانویه همانند PCR اولیه بود و در این مرحله از پرایمرهای R3 و HSP3 و از محصول PCR اولیه به عنوان الگو استفاده شد.

شرایط چرخه حرارتی برای انجام PCR اولیه بدین شرح بود که واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه با دمای واسرشت ۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر در ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. شرایط چرخه حرارتی در PCR ثانویه به استثنای دمای واسرشت که در ۹۵°C به مدت یک دقیقه و اتصال که در ۶۱°C به مدت یک دقیقه انجام شد، همانند مرحله اول بود. در این مطالعه نمونه انگل کریپتوسپوریدیوم موجود در گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در خاتمه محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده با Safe DNA stain رنگ آمیزی شد. بعد از انجام عمل PCR محصول حاصل توسط ژل الکتروفورز و رنگ آمیزی safe stain شناسایی شد.

پس از PCR ثانویه ژن SRNA18، قطعه ۵۳۰-جفت بازی روی ژل ۱/۵٪ بارگذاری و باند مورد نظر با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده شد.

برای تعیین توالی، پس از انجام الکتروفورز روی محصولات PCR دوم و استخراج باندهای مشاهده شده توسط کیت استخراج (GeneAll؛ کره جنوبی)، نمونه‌ها برای تعیین توالی (پیشگام؛ ایران) ارسال شدند. پس از دریافت فایل‌های مربوط به تعیین توالی با استفاده از نرم افزار v5.4.6 Gene Codes Sequencer اقدام به استخراج اطلاعات به صورت فایل‌هایی با پسوند FASTA شد تا در مرحله بعد با استفاده از ابزار جست و جوی هم تراز پایه (BLAST) سایت NCBI، اقدام به تعیین همولوژی داده‌های به دست آمده با موارد ثبت شده در بانک ژن شود. سپس محصولات تخلیص شده برای تعیین توالی (پیشگام؛ ایران) ارسال شدند.

به منظور تعیین هم تراز توالی‌های ژن از برنامه ClustalW2 (www.ebi.ac.uk) و نرم افزار 7.2 BIOEDITE استفاده شد.

ترسیم درخت فیلوژنتیک توالی‌ها: پس از بلاست کردن توالی نمونه‌ها در سایت <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>، با تحلیل و آنالیز اطلاعات، تعداد محدودی از توالی‌ها برای ترسیم درخت فیلوژنتیک انتخاب شد. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار MEGA 7 و الگوریتم Maximum likelihood با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد.

آزمایش مدفوع به آزمایشگاه معرفی شده بودند، جمع آوری شد. نمونه‌های مدفوع به صورت تازه از کودکان ارجاع داده شده به مراکز فوق جمع آوری و در ظروف حاوی PVA (پلی وینیل الکل)، دی کرومات پتاسیم ۲٪، الکل ۷۵٪ و فرمالین ۵٪ به صورت جداگانه نگهداری می شدند. محاسبه تعداد نمونه‌ها بر اساس فرمول تعیین نمونه و با در نظر گرفتن نسبت آلودگی ۶۰/۳٪ کودکان زیر ۱۰ سال کرج گزارش شده توسط علمی و همکاران^[19] محاسبه شد.

نمونه‌ها پس از جمع آوری به دو بخش تقسیم شدند. یک قسمت درون مواد نگهدارنده دی کرومات ۲/۵٪ برای بررسی انگل کریپتوسپوریدیوم و قسمت دیگر درون مواد نگهدارنده PVA برای بررسی انگل تکثیر ژیا ردیا قرار گرفتند. از رنگ آمیزی تری کروم برای بررسی میکروسکوپی ژیا ردیا و از رنگ آمیزی زیل نلسون برای تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم استفاده شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) استفاده شد. پس از استخراج، DNA به دست آمده در دمای ۲۰°C - نگهداری شد^[20]. غلظت DNA نمونه‌های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل الکتروفورز اندازه گیری شد.

تکثیر ژن TPI ژیا ردیا: در این مطالعه از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای (nested-PCR) به منظور تکثیر قطعه ۵۳۰ جفت بازی ژن TPI ژیا ردیا و تعیین ژنوتایپ‌های ایزوله‌های انسانی ژیا ردیا نمودنالیس استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق برای ژن TPI، عبارت از موارد زیر بودند:

1. Primary PCR primers

a. Forward (F1): AL3543: AAATATGCCTGCTCGTGC

b. Reverse (R1): AL3546: CAAACCTTITCCGCAAACC

2. Secondary PCR primers

c. Forward (F2): AL3544: CCCTTCATCGGIGGTAACCTT

d. Reverse (R2): AL3545: GTGGCCACCACICCCGTGCC

پرایمرها (ماکروژن؛ کره جنوبی) با غلظت ۱۰ پیکومول برای PCR استفاده شدند. واکنش PCR اولیه در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر از DNA انگل، ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس و یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F1 و R1 با غلظت ۱۰ پیکومول انجام شد. حجم واکنش PCR ثانویه همانند PCR اولیه بود. در این مرحله از پرایمرهای F2 و R2 و از محصول PCR اولیه به عنوان الگو استفاده شد.

شرایط چرخه حرارتی برای انجام PCR اولیه بدین شرح بود که واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه با دمای واسرشت ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۲/۵۰°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. شرایط چرخه حرارتی در PCR ثانویه به استثنای دمای اتصال همانند مرحله اول بود. دمای اتصال در PCR ثانویه ۵۵°C بود. در این مطالعه نمونه انگل ژیا ردیای موجود در گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در خاتمه محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده با Safe DNA stain رنگ آمیزی شد.

پس از PCR ثانویه ژن TPI، قطعه ۵۳۰-جفت بازی روی ژل ۱/۵٪ بارگذاری و باند مورد نظر با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده شد.

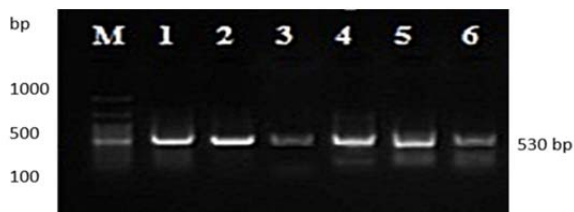
تکثیر ژن srRNA 18 کریپتوسپوریدیوم: برای تکثیر ژن srRNA 18 کریپتوسپوریدیوم از پرایمر اختصاصی زیر و از روش Nested-

یافته‌ها

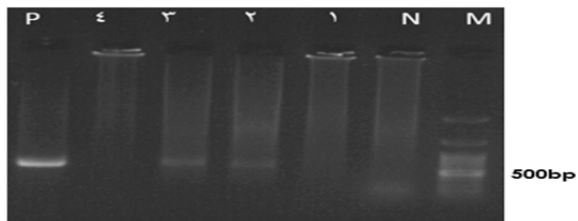
یافت شد. پس از PCR ثانویه ژن SRNA18، باند مورد نظر در قطعه ۵۳۰-جفت‌بازی روی ژل مشاهده شد (شکل ۲). تلاش برای تعیین ژنوتایپ کریپتوسپورییدیوم به نتیجه نرسید.

پس از بلاست‌نمودن هر یک از داده‌ها نتایج به‌گونه‌ای بود که در مورد ژنوتایپ *دئوندالیسیس* ۹۹ تا ۱۰۰٪ همولوژی با موارد ثبت شده در بانک ژنی تحت عناوین KY613604، KY613607، KY613605 و KY613605 وجود داشت.

پس از مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با ژنوتایپ‌های ثبت شده در بانک ژنی مشخص شد که سه ایزوله متعلق به ژنوتایپ B و یک ایزوله متعلق به ژنوتایپ A بودند. همچنین براساس نتایج هم‌ترازی چندگانه CLUSTAL OMEGA سایت EBI مشخص شد که ایزوله شماره ۵ متعلق به زیرگروه AII، ایزوله شماره ۲ و ۳ متعلق به زیرگروه BIII و ایزوله شماره ۱ متعلق به زیر گروه BIV بودند (شکل ۳).



شکل ۱) تصویر ژل ۱/۵٪ الکتروفورز مربوط به محصولات PCR ژن TPI ژنوتایپ از چپ به راست به ترتیب M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی، ۱: کنترل مثبت، شماره‌های ۲ تا ۶ باندهای مربوط به نمونه مثبت ۵۳۰ جفت‌بازی هستند.



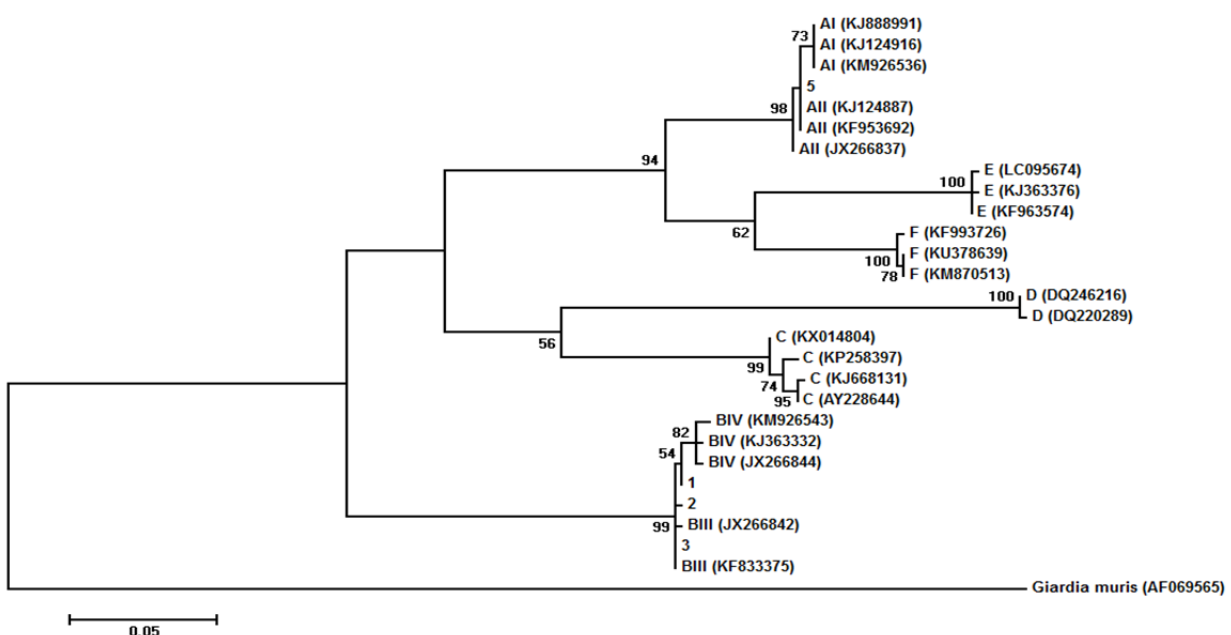
شکل ۲) تصویر ژل ۱/۵٪ الکتروفورز مربوط به محصولات PCR ژن SRNA18 کریپتوسپورییدیوم از راست به چپ به ترتیب M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی، N: کنترل منفی، شماره‌های ۲ و ۳ قطعات ۵۳۰ جفت‌بازی، P: کنترل مثبت

از ۱۶۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده، ۱۴۵ نمونه از لحاظ قوام و علایم بالینی، غیراسهالی و ۱۵ نمونه به‌صورت آبکی و اسهالی بود. از مجموع نمونه‌ها، ۱۵ نمونه (۹/۳۷٪) با روش رنگ‌آمیزی تری‌کروم و مشاهده میکروسکوپی و ۷ نمونه (۴/۳۷٪) با روش PCR از نظر آلودگی به کیست ژنوتایپ مثبت بودند. همچنین ۲/۵۰٪ و ۱/۲۵٪ از افراد تحت مطالعه دارای علایم بالینی اسهال به‌ترتیب با روش رنگ‌آمیزی و مشاهده میکروسکوپی و با روش PCR، آلوده تشخیص داده شدند (جدول ۱). پس از PCR ثانویه ژن TPI، باند مورد نظر در قطعه ۵۳۰-جفت‌بازی روی ژل مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۱) توزیع فراوانی مطلق و نسبی (تعداد و درصد) آلودگی به ژنوتایپ و کریپتوسپورییدیوم با روش رنگ‌آمیزی، مشاهده میکروسکوپی و PCR ۱۶۰ کودک ۱۰-۲۰ ساله استان البرز (اعداد داخل پرانتز به‌صورت درصد هستند)

علایم بالینی (اسهال)	کل نمونه‌ها	روش رنگ آمیزی و مشاهده میکروسکوپی		روش PCR	
		نمونه مثبت	نمونه منفی	نمونه مثبت	نمونه منفی
ژنوتایپ دارد	۱۵ (۹/۳۷)	۴ (۲/۵۰)	۱۱ (۶/۸۷)	۲ (۱/۲۵)	۱۳ (۸/۱۲)
ندارد	۱۴۵ (۹۰/۶۳)	۱۱ (۶/۸۷)	۸۳ (۷۵/۱۳۴)	۵ (۳/۱۲)	۱۴۰ (۸۷/۵۰)
جمع	۱۶۰ (۱۰۰)	۱۵ (۹/۳۷)	۱۴۵ (۹۰/۶۳)	۷ (۴/۳۷)	۱۵۳ (۹۵/۶۳)
کریپتوسپورییدیوم دارد	۱۵ (۹/۳۷)	۱۵ (۹/۳۷)	۱۵ (۹/۳۷)	۰	۱۵ (۹/۳۷)
ندارد	۱۴۵ (۹۰/۶۳)	۴ (۲/۵۰)	۱۴۱ (۸۸/۱۲)	۲ (۱/۲۵)	۱۴۳ (۸۹/۳۷)
جمع	۱۶۰ (۱۰۰)	۴ (۲/۵۰)	۱۵۶ (۹۷/۵۰)	۲ (۱/۲۵)	۱۵۸ (۹۸/۷۵)

از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۴ نمونه (۲/۵۰٪) با روش رنگ‌آمیزی اسیدفست و مشاهده میکروسکوپی و ۲ نمونه (۱/۲۵٪) با روش PCR از نظر اوسیسیت کریپتوسپورییدیوم، مثبت بودند. در هیچ نمونه‌ای از افراد دارای علایم بالینی اسهال، انگل کریپتوسپورییدیوم با هر دو روش تشخیصی مشاهده نشد (جدول ۱). در رنگ‌آمیزی اسیدفست یک نمونه سیکلوسپورای مثبت نیز



شکل ۳) درخت روابط فیلوژنیک ژنوتایپ‌های TPI ایزوله‌های ژنوتایپ *دئوندالیسیس* استنباط شده با الگوریتم Maximum Likelihood ژنوتایپ‌های این مطالعه با اعداد ۱، ۲، ۳ و ۵ مشخص شده است

با ژنوتایپ A نداشته است^[23]. در مطالعه منوچهری نائینی و همکاران همبستگی آماری بین عفونت‌های بدون علامت و ژنوتایپ B و همچنین اسهال و ژنوتایپ A گزارش شده است^[14]. در مطالعه رحیمیان خرم‌آورد در شهرستان کرج نیز ارتباط مستقیمی بین نمونه‌های اسهالی و ژنوتایپ A گزارش شده است^[15]. در مطالعه اعتمادی و همکاران نیز ارتباطی بین ژنوتایپ و علایم بالینی مشاهده نشده است^[16]. در مطالعه نصیری گورآبی و همکاران نیز هیچ یک از افراد آلوده، علایم گوارشی نظیر اسهال نداشته‌اند^[18]. این نتایج، یافته‌های پژوهش حاضر را تایید کرد که حداقل این دو ژنوتایپ در ایجاد علایم بالینی با یکدیگر تفاوتی ندارند. به هر حال، فاکتورهای مربوط به میزبان نیز در ایجاد بیماری نقش دارند و این موضوع، مطالعه بین ژنوتایپ و علایم بیماری را دشوار می‌کند. از طرفی علایم بالینی در عفونت‌های انگلی روده‌ای معمولاً غیراختصاصی و شامل مجموعه‌ای از نشانه‌ها است. در این تحقیق نیز نمی‌توان با توجه به مبهم بودن نحوه سنجش علایم بالینی و معیارهای مربوط به آن و تفاوت آشکار تعداد نمونه‌ها در دو گروه اسهالی (۱۵ نفر) و غیراسهالی (۱۴۵ نفر) از یک طرف و عدم تعیین هر گونه ارتباط آماری بین آنها، تفاوت آلودگی انگلی را بین کسانی که علایم بالینی دارند با آنها که ندارند، قضاوت درستی نمود. برای دستیابی به چنین ارتباطی نیاز به یک مطالعه تحلیلی است تا نقش ریسک فاکتوری یک عامل خطر در بروز یک مشکل مشخص شود.

برای شناسایی منبع عفونت در انسان و توانایی زئونوزبودن ژیا ردیا *نئودنالیس*، سلیمان و همکاران از روش nested-PCR و از طریق تکثیر ژن تریوزفسفات ایزومراز و زیرواحد کوچک ریبوزومی RNA، ۳۷ نمونه انسانی، ۱۵ نمونه از سگ، ۸ نمونه از موش آبی، ۷ نمونه گاو، ۷ نمونه از سگ آبی، یک نمونه خرگوش و یک نمونه از موش صحرایی را مورد آزمایش قرار داده‌اند. ژنوتایپ B در انسان، موش آبی و همچنین در خرگوش غالب بود. نتیجه اعلام شده این بود که ژیا ردیا *نئودنالیس* می‌تواند از برخی حیوانات به انسان منتقل و باعث آلودگی انسان شود^[24].

در ایران به خصوص در سال‌های اخیر در مورد آلودگی کودکان به کریپتوسپوریدیوم گزارش‌های متعددی ارائه شده است. از جمله در مطالعه دبیرزاده و همکاران که در زاهدان روی ۵۲۸ بیمار مبتلا به اسهال زیر ۵ سال مراجعه‌کننده به مرکز انگل‌شناسی بیمارستان کودکان علی‌اصغر^(۶) انجام شده، شیوع بیماری و ارتباط آن با فصل، جنس، سن، تغذیه از شیر مادر، ابتلا به ژیا ردیا و استفاده از مهد کودک مورد بررسی قرار گرفته و شیوع کریپتوسپوریدیوم در این مطالعه ۴/۷٪ تعیین شده است. انگل در گروه سنی ۲-۱ سال از شیوع بیشتری برخوردار بود. پسرها (۱۷ مورد) از دخترها (۸ مورد) آلودگی بیشتری داشتند. کودکانی که از شیر مادر تغذیه نمی‌کردند به‌طور معنی‌داری از آلودگی بیشتری برخوردار بودند و نیز کودکانی که به مهد کودک سپرده شده بودند، آلودگی بیشتری داشتند^[25]. در مطالعه قریشی و همکاران که به‌منظور تعیین شیوع آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال مراجعه‌کننده به بیمارستان قدس قزوین انجام شده است، شیوع آلودگی به این انگل ۰/۳٪ بود^[26]. مطالعه کارگرچهرمی و همکاران با هدف تعیین فراوانی آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال در شهرستان جهرم انجام شده است و در آن ۱۰۶ نمونه مدفوع کودکان زیر ۱۲ سال مبتلا به اسهال که به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان جهرم مراجعه کرده بودند، از نظر آلودگی به تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه دو کودک

پژوهش حاضر با هدف بررسی آلودگی به ژیا ردیا و کریپتوسپوریدیوم و تعیین ژنوتایپ ژیا ردیای شایع در کودکان استان البرز انجام شد. در بسیاری از مطالعات انجام شده در جهان، ژنوتایپ‌های A یا B ژیا ردیا *نئودنالیس* به‌عنوان ژنوتایپ‌های غالب در انسان شناخته شده‌اند. در مطالعه حاضر براساس نتایج حاصل از تعیین توالی ژن TPI روی چهار ایزوله ژیا ردیا، سه ایزوله، متعلق به ژنوتایپ B و یک ایزوله، متعلق به ژنوتایپ A تشخیص داده شد. درخت فیلوژنی رسم شده نیز نتایج فوق را تایید نمود. همان طور که پیش از این ذکر شد، وجود گروه‌های A و B و زیرگروه‌های مختلف از آنها در نمونه‌های بررسی شده حاکی از تنوع ژنتیکی ایزوله‌های این انگل در استان البرز بود. مطالعه حاضر، اولین مطالعه برای تعیین ژنوتایپ ژیا ردیاهای آلوده‌کننده کودکان در سطح استان البرز بود. از طرفی شناسایی ژنوتایپ‌های AII، BIV و BIII به ترتیب نشان‌دهنده چرخه انتقال آنتروپوونوتیک و آنتروپوزئونوتیک عفونت ژیا ردیا در این استان بود. یکی از پدیده‌های بارز جمعیتی در استان البرز، تراکم بالای جمعیتی و مهاجرت است که موجب دگرگونی ساختارهای اجتماعی، اقتصادی، فرهنگی و بهداشتی در آن شده است و تنوع ژنتیکی مشاهده شده در نتایج فوق می‌تواند به‌نوعی با پدیده مهاجرت در ارتباط باشد. در نتیجه کنترل‌ها و تدابیر بهداشتی در این زمینه بایستی به شیوه مطلوب صورت گیرد.

در مطالعه حاضر، نمونه‌های مثبت هم در کودکان مبتلا به اسهال و هم غیرمبتلا به اسهال دیده شد. ایزوله‌های گروه B در سنین مهد کودک بودند که دو ایزوله در سنین ۳ و ۵ سال قرار داشتند و مبتلا به ژنوتایپ A، ۱۰ساله بود. همچنین در یک نمونه، فرد مبتلا به اسهال ژنوتایپ B شناسایی شد. در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده در ایران، در مطالعه نصیری گورآبی و همکاران از ۳۲۰ نمونه مورد بررسی در شهرستان بهارستان (جنوب غربی استان تهران)، ۲۵ نمونه از لحاظ کیست ژیا ردیا مثبت (۷/۸٪) و کلیه بیماران مبتلا به ژیا ردیا زیست فاقد علامت بودند. پس از تکثیربخشی از ژن بتاژیا ردین و هضم با آنزیم HaeIII، به ترتیب ۶۴٪ نمونه‌ها مربوط به ژنوتایپ A و ۳۶٪ مربوط به مجموعه بوده است. پس از تعیین توالی، ژنوتایپ‌های AII، BIII و BIV در شهرستان بهارستان تشخیص داده شده است^[18]. علاوه بر این، طبق گزارش‌های بابایی و همکاران در تهران^[9]، فلاح و همکاران در آذربایجان شرقی^[10]، اکبریان و همکاران در خرم‌آباد^[11]، سرکاری و همکاران در استان فارس^[12]، پسته‌چیان و همکاران در اصفهان^[13]، اعتمادی و همکاران در کرمان^[16] و رایانی و همکاران در شیراز^[17]، ژنوتایپ غالب در همه این مطالعات A بوده است که مطالعه حاضر با آنها متفاوت بود.

در مورد ارتباط بین ژنوتایپ و بروز علایم اسهال گزارش‌های متفاوتی وجود داشته است. در مطالعه وگایه و همکاران در اتیوپی ارتباط قوی بین ژنوتایپ B و عفونت بدون نشانه بیان شده است^[21]. در مطالعه انجام شده در بنگلادش توسط هاک و همکاران، نشان داده شده است که اگر چه ژنوتایپ B شایع‌تر است، اما در ایجاد اسهال نقشی ندارد و ژنوتایپ A باعث ایجاد اسهال‌های پیش‌رونده می‌شود^[22]. بررسی ژیا *نگاسپرو* و همکاران نیز به‌وضوح نشان داده که اگر چه در برخی مطالعات ارتباط قوی بین عفونت با نشانه‌های بالینی و ژنوتایپ AII گزارش شده، ولی نتایج برخی مطالعات دیگر موید این بوده که ژنوتایپ B در ایجاد اسهال فرقی

مقدمه/روشن شناسی/پژوهشگر اصلی (۳۵٪): عبدالحسین دلیمی (نویسنده دوم)، روشن شناسی/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۵٪): مجید پیرستانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۳۰٪)

منابع مالی: کلیه هزینه‌های آن توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

منابع

- 1- Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1259-67.
- 2- Hellard ME, Sinclair MI, Hogg GG, Fairley CK. Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15(3):290-3.
- 3- Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis. *Vet Parasitol.* 2004;126(1-2):15-35.
- 4- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of cryptosporidium: Transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1305-22.
- 5- Pierce KK, Kirkpatrick BD. Update on human infections caused by intestinal protozoa. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25(1):12-7.
- 6- Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. Cryptosporidium pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):115-34.
- 7- Vinayak S, Pawlowic MC, Sateriale A, Brooks CF, Studstill CJ, Bar-Peled Y, et al. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Nature.* 2015;523(7561):477-80.
- 8- Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, et al. Molecular identification of Giardia duodenalis isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol.* 2007;149(3-4):258-64.
- 9- 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. *Iran J Public Health.* 2008;37(2):75- 82.
- 10- Fallah E, Nahavandi KH, Jamali R, Mahdavi B, Asgharzadeh M. Genetic characterization of Giardia intestinalis strains from patients having sporadic giardiasis by using PCR assay. *J Med Sci.* 2008;8(3):310-5.
- 11- Akbarian A, Sadraie J, Forouzandeh M. Evaluation of Giardia lamblia genetic differences in Khorramabad city and surrounding villages by use of PCR and sequencing. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci.* 2012;17(2):61-71. [Persian]
- 12- 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):366-71.
- 13- 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;1:84.
- 14- Manouchehri Naeni K, Hosseini SA, Gholipour A, Babaei Z, Taghipoor S. Genotyping of Giardia duodenalis isolates in individuals with and without chronic diarrhea

(۱/۹٪) مبتلا به کریپتوسپورییدیوم بودند که یک مورد مربوط به یک پسر یک ساله و مورد دوم مربوط به یک دختر سه ساله بود. بین میزان آلودگی به کریپتوسپورییدیوم با سن، جنس، استفاده از شیر مادر در کودکان زیر دو سال، منطقه جغرافیایی و آب آشامیدنی ارتباط معنی‌داری دیده نشد^[27]. در مطالعه محمدی قلعه‌بین و همکاران که با هدف بررسی شیوع کریپتوسپورییدیوم بین کودکان بستری در بیمارستان‌های اردبیل طراحی و اجرا شده است، مجموعاً ۳۷۱ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال تحت آزمایش قرار گرفت. اوسیسیت‌های کریپتوسپورییدیوم در ۱۵ نمونه (۴/۰۴٪) به دست آمد. ۷/۶۶٪ افراد آلوده در رده سنی ۶ تا ۲۴ ماه، ۲۰٪ در رده سنی ۲۵ تا ۴۸ ماه و ۳/۱۳٪ در رده سنی بین ۴۹ تا ۷۲ ماه قرار داشتند^[28]. در مطالعه اسدی و همکاران که روی ۴۲۰ کودک مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی و درمانی شهرستان همدان انجام پذیرفته است، از کل کودکان مورد مطالعه، دو نفر (۰/۴۷٪) مبتلا به عفونت ناشی از کریپتوسپورییدیوم و هر دو ساکن روستا و در تماس مستقیم با دام بودند^[29]. در مطالعه /عظمی و همکاران در استان اصفهان تعداد ۶۴۲ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال، بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و افراد در معرض خطر بیماری جمع‌آوری شده و از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، ۳۰ نمونه (۴/۷٪) آلوده به انگل کریپتوسپورییدیوم تشخیص داده شده‌اند. میزان آلودگی در کودکان زیر ۵ سال، بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و افراد در معرض خطر به ترتیب ۴/۶، ۳/۵ و ۵/۴٪ برآورد شد. بیشترین میزان آلودگی در کودکان در گروه سنی یک تا دو سال (۱۰٪)، در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی در گروه سنی ۳-۴ ساله (۶/۲٪) و در افراد در معرض خطر بیماری در گروه سنی ۱۰-۵ سال (۱۴/۸٪) مشاهده شده است^[30]. در مطالعه حاضر که روی نمونه‌های افراد اسهالی و غیراسهالی انجام شد، هر دو نمونه مثبت متعلق به افراد غیراسهالی و کودکان پسر در سن قبل از پیش‌دبستان بود و می‌تواند گواهی باشد که این عفونت در کودکان بدون علایم بالینی نیز دیده می‌شود. از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم دسترسی آسان و کافی به نمونه‌های بالینی بود.

نتیجه‌گیری

کریپتوسپورییدیوم در ۲/۵۰٪ و ژیاودییا در ۹/۳۷٪ نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده وجود دارند. از مجموع ۴ ایزوله ژیاودییا *نئودنالیس* یک ایزوله BIV دو ایزوله BIII و یک ایزوله AII تشخیص داده می‌شود که بعضی از آنها مربوط به کودکان بدون علایم بالینی اسهال است. شناسایی ژنوتیپ‌های AII، BIV و BIII به ترتیب نشان‌دهنده چرخه انتقال آنتروپونوتیک و آنتروپوزئونوتیک عفونت ژیاودییا در این استان است.

تشکر و قدردانی: مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی با کد ۱۲۲۸۱۹۸ در دانشگاه تربیت مدرس بوده و کلیه هزینه‌های آن توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است. نویسندگان از اعضای محترم گروه انگل‌شناسی به خصوص خانم دکتر غفاری‌فر و آقای دکتر صدرایی نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

تأییدیه اخلاقی: این تحقیق با مجوز کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفت.

تعارض منافع: نویسندگان فاقد هرگونه تعارض منافع هستند.

سهم نویسندگان: فاطمه عفتی (نویسنده اول)، نگارنده

- scenario from the Italian perspective. *Parasitol Res.* 2007;101(5):1169-82.
- 24- 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 Dis.* 2003;9(11):1444-52.
- 25- Dabirzadeh M, Baghaei M, Bokaeyan M, Goodarzi MR. Study of *Cryptosporidium* in children below five years of age with diarrhea in referring Ali Asghar Pediatric Hospital of Zahedan. *J Gorgan Univ Med Sci.* 2003;5(11):54-9. [Persian]
- 26- Ghoreishi SGh, Delirani R, Daneshi MM, Leghaie Sh, Barikbin M, Saffarizadeh H. *Cryptosporidial* infection in the children referred to Qazvin Qods Hospital (2003). *J Qazvin Univ Med Sci.* 2008;12(3):95-8. [Persian]
- 27- Kargar Jahromi Z, Davami M.H, Solhjoo K, Khajei M, Kargar Jahromi H. The prevalence of *Cryptosporidium Parvum* infection in adults presenting with acute diarrhea to diagnostic medical laboratories in Jahrom in 2014. *Pars J Med Sci.* 2016;13(4):7-13. [Persian]
- 28- Mohammadi Ghalehbin B, Falah E, Asghar Zadeh M, Kazemi AH, Daryani A, Amani F, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* in children suffering from gastroenteritis in Ardabil Hospitals. *J Ardabil Univ Med Sci.* 2006;6(2):176-82. [Persian]
- 29- Asadi M, Sedighi I, Fallah M, Saidijam M, Maghsood AH. A survey study of *Cryptosporidium* infection in children under 10 years old referred to the health care centers of Hamadan district in 2013. *Sci J Hamadan Univ Med Sci.* 2014;21(3):211-7. [Persian]
- 30- Azami M, Dorostkar Moghadam D. Prevalence of *cryptosporidium* in children under 5 years of age, immunocompromised patients and high risk persons in Isfahan province. *Iran South Med J.* 2008;11(1):47-54. [Persian]
- using Polymerase Chain Reaction. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2012;22(95):39-46. [Persian]
- 15- Rahimian Khormazard F. Genotyping of human isolates of *Giardia* in Karaj city using PCR [Dissertation]. Tehran: Tarbiat Modarres University, Faculty of Medical Sciences; 2013. [Persian]
- 16- Etamadi S, Zia Ali N, Babaei Z, Fasihi Harandi M, Zia Ali A, Salari Z, et al. The correlation between clinical signs and genotypes of *Giardia duodenalis* isolated from patients with giardiasis in Kerman city. *J Kerman Univ Med Sci.* 2011;18(4):330-8. [Persian]
- 17- Rayani M, Zasmy Unyah N, Hatam G. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from Fars province, Iran. *Iran J Parasitol.* 2014;9(1):70-8.
- 18- Nasiri Goorabi L, Pirestani M, Sadraei J. Genotyping of *Giardia duodenalis* by β -giardin gene in asymptomatic patients. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2017;27(150):27-34. [Persian]
- 19- Elmi T, Ziaie H, Gholami Sh, Mortazavi M, Tabasi M, Geraili Z. The Prevalence of giardiasis infections among people admitted to Karaj laboratories in 2013: A short report. *J Rafsanjan Univ Med Sci.* 2014;13(8):725-30. [Persian]
- 20- 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;38(18):3931-9.
- 21- 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.
- 22- 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):2171-3.
- 23- Giangaspero A, Berrilli F, Brandonisio O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: The epidemiological