

بررسی شیوع انگل ژیا ردیا دئودنالیس در سگ های خانگی ناحیه دزفول به روش PCR

مرتضی رزاقی منش^{۱*}، لیلا درخشان^۱، نگار صفی خانی^۲، حمیدرضا پیش بین^۳

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر ایران

۲- دانش آموخته عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۳- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

*نویسنده مسئول: Morteza_vet@yahoo.com

چکیده

علی رغم وجود گزارش هایی از آلودگی با ژیا ردیا دئودنالیس در سگ در ایران، مطالعات کمی در مورد تعیین ژنوتیپ های ژیا ردیا دئودنالیس صورت گرفته است. هدف این مطالعه تعیین میزان شیوع آلودگی و تعیین ژنوتیپ های ژیا ردیا در سگ های خانگی ناحیه دزفول می باشد. تعداد ۲۴۶ نمونه مدفوع به صورت تصادفی از سگ های خانگی مبتلا به اسهال و غیر اسهالی شهرستان دزفول جمع آوری گردید و به آزمایشگاه دامپزشکی منتقل شد. پس از ثبت مشخصات حیوان، نمونه ها با روش شناورسازی با سولفات روی اشباع از نظر وجود کیست ژیا ردیا بررسی شدند. برای استخراج DNA از کیست از روش بابایی و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. به منظور تأیید تشخیص میکروسکوپی از روش PCR استفاده گردید. به این منظور از دو پرایمر GDHiR و GDHiF جهت تکثیر قطعه ی ۴۳۲ جفت باز از ژن gah ژیا ردیا دئودنالیس استفاده شد. تمام نمونه های مثبت در PCR تحت بررسی در آنالیز RFLP قرار گرفت. در نهایت در بررسی میکروسکوپی، ۷ نمونه آلوده به انگل ژیا ردیا دئودنالیس بودند. بنابراین شیوع انگل (۲/۸۴ درصد) بود. بررسی نمونه ها با استفاده از آنزیم NLAIV نشان داد که به ترتیب ۳ نمونه (۴۲/۸۵) ژنوتیپ C، ۲ نمونه ژنوتیپ D (۲۸/۵۷) و ۲ نمونه متعلق به ژنوتیپ AI (۲۸/۵۷) می باشد. یافته های ما حاکی از این است که آلودگی به ژیا ردیا دئودنالیس در سگ های دزفول شایع است. بر اساس این یافته ها، نتیجه گیری می شود که ژنوتیپ C و D ژیا ردیا دئودنالیس، شایعترین ژنوتیپ منطقه ی مورد مطالعه است. اما آلودگی با ژنوتیپ زئونوز A هم دیده می شود. بنابراین می توان سگ ها را به عنوان منبع بالقوه ژیا ردیای انسانی از طریق تماس مستقیم یا از طریق آلودگی آب سطحی معرفی کرد.

واژگان کلیدی: ژیا ردیا دئودنالیس، سگ، دزفول، PCR

مقدمه

ژيارديا دام هاي اهلي مورد مصرف انساني، سگ ها، گربه ها و گونه هاي متعددي از پستانداران وحشي را ميتلا مي کند (۱). ژياردیوزیس انسانی شیوع جهانی داشته و شایع ترین انگل روده ای انسانی در کشور های توسعه یافته است. در ایران هم ژياردیوزیس شایع ترین بیماری انگلی انسان است و تقریباً در تمام نقاط کشور دیده می شود. این تک یاخته شایع ترین عامل بیماری انگلی در ایران است که در اکثر مناطق با شیوع ۱۰-۴۰٪ گزارش شده است (۲). ژيارديا سبب بروز اسهال و گاستروآنتریت در انسان می شود، ولی نقش ژيارديا در ایجاد اسهال در گوساله ها کاملاً مشخص نشده است. گوساله هاي ميتلا به ژياردیوزیس یس گاهی اسهال، کاهش وزن و علايم عمومي از بیماری را نشان می دهند که به نوبه خود منجر به خسارات اقتصادي هنگفتي در صنعت دامداری می شود. با توجه به این که بیماری از طریق آب و مواد غذایی آلوده به کیست و حتی تماس انتقال می یابد، لذا از دیدگاه سلامت عمومی، سگ، گربه و دام های اهلی می توانند محزن مهمی برای ژياردیوزیس انسانی تلقی می شود. آلودگی با این تک یاخته در سراسر دنیا دیده می شود. طبقه بندی ژيارديا بر مبنای خصوصیات ژنتیکی و ریخت شناسی صورت می گیرد. ژياردیادئودنالیس تنها گونه ای است که در انسان و سایر پستانداران از جمله حیوانات اهلی مانند سگ، گربه، گاو، گوسفند، اسب و خوک یافت می شود. مطالعات مولکولی اثبات کرده اند که ژياردیادئودنالیس

شامل ۷ ژنوتیپ اصلی می باشند. ژنوتیپ A و B دارای وسیع ترین طیف میزبانی شامل انسان، گاو و سایر حیوانات اهلی و وحشی می باشد. ژنوتیپ D و C موجب آلودگی سگ و گربه شده و ژنوتیپ E در نشخوارکنندگان و ژنوتیپ F در گربه ها و ژنوتیپ G در رت های آلوده دیده می شود. ژنوتیپ A به دو دسته تقسیم می شود. AI شامل مخلوطی از ژياردیای جدا شده از انسان و حیوان است که از لحاظ جغرافیایی گسترش دارد و در جنبه ژنوتیک ژيارديا بر زیر گروه AI آن بیشتر تاکید می شود. در مقابل، زیر گروه بعدی AII شامل ژياردیاهای نوع انسانی می باشد. ژنوتیپ B شامل دو زیر گروه III و IV می باشد (۳،۴،۵). علی رغم وجود گزارش هایی از آلودگی با ژيارديا دئودنالیس در سگ در ایران، مطالعات کمی در مورد تعیین ژنوتیپ های ژيارديا دئودنالیس صورت گرفته است. این مطالعه برای تعیین شیوع میزان آلودگی در سگ های خانگی ناحیه دزفول و تعیین ژنوتیپ های ژياردیادئودنالیس در سگ های خانگی دزفول صورت گرفته است.

مواد و روش کار

تعداد ۲۴۶ نمونه مدفوع به صورت تصادفی از سگ های خانگی مبتلا به اسهال و غیر اسهالی شهرستان دزفول جمع آوری گردید. نمونه های مدفوع با استفاده از دستکش لاتکس یکبار مصرف از رکتوم هر حیوان جمع آوری شد. هر نمونه در ظرف نمونه گیری پلاستیکی در پیچ دار قرار گرفت برچسب اطلاعات اخذ زده شد و بعد جمع آوری به آزمایشگاه دامپزشکی منتقل شد. مشخصات حیوان، سن، جنس و ابتلا به اسهال در پرسش نامه ثبت شد. نمونه ها در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شد.

نمونه های مدفوع با روش شناورسازی با سولفات روی اشباع برای تشخیص کیست بررسی شدند. پس از مخلوط کردن نمونه با آب مقطر و عبور از الک ۱۰۰، مایع حاصله سانتریفوژ شده و محلول سولفات روی اشباع به آن اضافه گردید. پس از سانتریفوژ مجدد، نمونه ها با لوگول رنگ آمیزی شده و زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ و در صورت نیاز با عدسی روغنی ۱۰۰ بررسی شدند. تمامی وسایل پس از استفاده شسته می شدند.

کیست های ژیا ردیا با روش شناورسازی در محلول ساکارز ۰.۸۵ مولار جداسازی و خالص سازی نسبی شدند. نمونه های مدفوع پس از مخلوط شدن با آب مقطر و فیلتراسیون، به محلول ساکارز افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۷۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند. کیست های تجمع یافته در لایه حد واسط با دقت جداسازی، مجدداً با آب مقطر شست و شو و در

۴۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب نهایی در لوله های ایندروف جمع آوری و در دمای منفی ۲۰ درجه برای انجام آزمایش PCR نگهداری شد.

استخراج DNA از کیست با روش بابایی و همکاران (۲۰۰۸) و با استفاده از شیب غلظتی ساکارز و فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل (PCI) انجام شد (۶). برای تخریب دیواره کیست از مهره های شیشه ای استفاده گردید. نمونه های تغلیظ شده با بافر لیزکننده حاوی SDS، EDTA، تریس-HCl و پروتئیناز K مخلوط و به مدت یک ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس DNA با روش PCI استخراج، با اتانول رسوب داده و در آب مقطر حل گردید. برای تأیید تشخیص میکروسکوپی، از روش PCR با پرایمرهای GDHiR و GDHiF جهت تکثیر قطعه ۴۳۲ جفت باز از ژن gdh استفاده شد. برای الکتروفورز PCR از ژل آگارز ۱.۵٪ استفاده شد. پس از حل کردن آگارز در بافر TBE و افزودن Safe Stain، محصولات PCR با بافر بارگذاری مخلوط و به چاهک ها منتقل شدند. الکتروفورز به مدت ۷۰ دقیقه با ولتاژ ۵ ولت/سانتیمتر انجام شد و باند ۴۳۲ جفت باز با تابش UV مشاهده شد. تمام نمونه های مثبت PCR تحت آنالیز RFLP قرار گرفتند. برای هضم آنزیمی از آنزیم NlaIV استفاده شد (۷).

بدین ترتیب که ۸ میکرولیتر از محصول PCR به ۱/۵ آنزیم NlaIV و ۲ میکرولیتر ۱۰X بافر آنزیم اضافه و با حجم

نهایی ۲۰ میکرولیتر در ۳۷ درجه و برای ۳ ساعت هضم انجام شد و پروفایل ها در آگارز ۲٪ مشاهده شد. ۲ نمونه (۲۸/۵۷) درصد متعلق به زیر گروه AI می باشد. ژنوتیپ B در این مطالعه مشاهده نشد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده ها بیانگر عدم وجود تفاوت معنی دار بین فراوانی آلودگی حیوانات به ژیا ردیا دئودنالیس در جنس نر و ماده دام بود. ($P>0.05$)

همچنین تفاوت معنی دار بین فراوانی آلودگی حیوانات به ژیا ردیا دئودنالیس در سنین مختلف دام و در دام اسهالی و غیر اسهالی وجود داشت ($P<0.05$). (جدول ۱)

در بررسی میکروسکوپی ۲۴۶ نمونه مدفوع ۷ مورد (۲/۸۴) درصد از نمونه ها آلوده به ژیا ردیا دئودنالیس بودند. نتایج روش مولکولی حاکی از آن بود که تمامی نمونه های مدفوع مثبت گزارش شده در روش میکروسکوپی (۷ مورد)، با روش PCR نیز آلوده به ژیا ردیا دئودنالیس بودند. آنالیز PCR-RFLP روی نمونه ها نشان داد که به ترتیب ۳ نمونه (۴۲/۸۵) درصد و ۲ نمونه (۲۸/۵۷) درصد به ژنوتیپ C و D و

جدول ۱- فراوانی آلودگی به ژیا ردیا در سگهای خانگی شهرستان دزفول با پارامترهای مطالعه شده مرتبط با ویژگیهای حیوان

سن دام (سال)		جنس دام		ابتلا به اسهال		نمونه
کمتر از یکسال	بیشتر مساوی یک	ماده	نر	+	-	
۸۷	۱۵۹	۱۰۶	۱۴۰	۱۸	۲۲۸	تعداد دام (قلاده)
۵ (۵/۷۴)	۲ (۱/۲۵)	۴ (۳/۷۷)	۳ (۲/۱۴)	۵ (۲/۷۷)	۲ (۰/۸۷)	تعداد دام الوده (درصد)
$X^2 = 4.099$ $P = 0.043$		$X^2 = 0.580$ $P = 0.446$		$X^2 = 43.669$ $P = 0.000$		P

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آلودگی به *Giardia duodenalis* در سگ‌های شهرستان دزفول شایع بوده و می‌تواند تهدیدی بالقوه برای سلامت عمومی محسوب شود. این انگل، یک تک‌یاخته زئونوز است که از طریق حیوانات اهلی مانند سگ، گربه، گاو و گوسفند به انسان منتقل می‌شود و عمدتاً از راه تماس مستقیم با حیوان آلوده یا از طریق آب و غذای آلوده به کیست‌های انگل انتشار می‌یابد. اهمیت اپیدمیولوژیک و بهداشتی *G. duodenalis* طی سال‌های اخیر به دلیل شیوع بالای آن و مقاومت نسبی کیست‌های انگل در برابر روش‌های رایج تصفیه آب، مورد توجه ویژه قرار گرفته است.

بر اساس نتایج بررسی‌های میکروسکوپی، ۲/۸۴ درصد از نمونه‌های مدفوع سگ‌های بررسی‌شده در این مطالعه آلوده به *G. duodenalis* بودند. مقایسه این داده‌ها با مطالعات پیشین مانند تحقیق همایونی و همکاران (۸) در سال (۲۰۱۹) که شیوع ۹/۱ درصدی را در منطقه شیراز گزارش کرده بودند، نشان‌دهنده شیوع بالاتر در منطقه دزفول است. عواملی نظیر تفاوت‌های جغرافیایی، زمان و فصل نمونه‌گیری، تعداد نمونه‌ها، ترکیب سنی جمعیت مورد مطالعه و روش‌های مدیریتی می‌توانند بر میزان آلودگی تأثیرگذار باشند. همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند که دفع کیست‌های انگل ممکن است به صورت متناوب انجام شود (۹)، که این

موضوع احتمال کاهش واقعی برآورد شیوع را در صورت استفاده از تنها یک نمونه مدفوع برای بررسی افزایش می‌دهد. در این مطالعه رابطه معناداری بین سن سگ‌ها و میزان آلودگی به *G. duodenalis* مشاهده شد، به‌طوری‌که آلودگی در سنین پایین‌تر شیوع بیشتری داشت. همچنین نمونه‌های مدفوع اسهالی در مقایسه با نمونه‌های بدون علائم گوارشی، نرخ آلودگی بالاتری را نشان دادند که هم‌راستا با فرضیه نقش پاتوژنیک انگل در بروز اسهال می‌باشد.

از نظر مولکولی، برای شناسایی ژنوتیپ‌های *G. duodenalis* از روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم NlaIV استفاده شد (۱۰). نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های C و D – که معمولاً محدود به سگ‌ها هستند و پتانسیل زئونوز پایین‌تری دارند – در اکثر نمونه‌ها به ترتیب ۸۵/۴۲ و ۵۷/۲۸ درصد مشاهده شدند با این حال، شناسایی ژنوتیپ زئونوز AI در نمونه‌ها، نشان‌دهنده پتانسیل نقش سگ‌ها در انتقال بیماری به انسان است، به‌ویژه در شرایط تماس مستقیم یا آلودگی منابع آبی سطحی.

نتیجه گیری نهایی

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که آلودگی به *Giardia duodenalis* در سگ‌های شهرستان دزفول نسبتاً شایع است و ژنوتیپ‌های غالب در این منطقه، ژنوتیپ‌های C و D می‌باشند که به‌طور معمول در سگ‌ها دیده می‌شوند.

با این حال، شناسایی ژنوتیپ ژئونوز A در برخی نمونه‌ها حاکی از آن است که سگ‌ها می‌توانند به‌عنوان یکی از منابع بالقوه انتقال بیماری ژیاردیوزیس به انسان مطرح باشند، به‌ویژه در شرایط تماس مستقیم یا آلودگی منابع آبی. با توجه به نقش مهم حیوانات در چرخه انتقال ژیاردیا و همچنین مقاومت کیست‌های انگل در محیط، لزوم شناسایی دقیق ژنوتیپ‌ها از طریق روش‌های مولکولی برای تدوین راهکارهای مؤثر در پیشگیری و کنترل بیماری ضروری است.

این نتایج می‌تواند به مسئولین بهداشت عمومی در تعیین منابع احتمالی آلودگی، مدیریت ریسک‌های ژئونوتیک و طراحی برنامه‌های نظارتی و کنترلی کمک کند. از سوی دیگر، با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه ژنوتیپ‌های *G. duodenalis* در سایر دام‌های اهلی، توصیه می‌شود که مطالعات گسترده‌تری در این زمینه انجام شود تا نقش آن‌ها در اپیدمیولوژی ژیاردیوزیس و تهدیدات احتمالی برای سلامت عمومی به‌درستی ارزیابی گردد.

منابع:

1. Emtiazi, G. (1399)., Fundamentals of molecular biology and genetic engineering, 10th Edition., Mani Publications, 2-6.
2. Tavassoli, M. (1385), Veterinary protozoology, 1st Edition, 62-63.
3. Björkman, C., Svensson, C., Christensson, B. and De Verdier, K., 2003. Cryptosporidium parvum and Giardia intestinalis in calf diarrhoea in Sweden. Acta Veterinaria Scandinavica, 44 (3), pp.1-8.
4. Calderaro, A., Gorrini, C., Montecchini, S., Peruzzi, S., Piccolo, G., Rossi, S., Gargiulo, F., Manca, N., Dettori, G. and Chezzi, C., 2010. Evaluation of a real- time polymerase chain reaction assay for the detection of Dientamoeba fragilis. Diagnostic microbiology and infectious disease, 67 (3), pp.239-245.
5. Coklin, T., Farber, J., Parrington, L. and Dixon, B., 2007. Prevalence and molecular characterization of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. Veterinary parasitology, 150 (4), pp.297-305.
6. Babaei, Z., OURMAZDI, H., Akhlaghi, L., REZAEI, S., Razmjou, E., SOLTANI, A.S., MEMAR, A. and Hadighi, R., 2008. Molecular characterization of the Iranian isolates of Giardia lamblia: application of the glutamate dehydrogenase gene. Iranian Journal of Public Health, 37 (2), pp.75-82.
7. Zimmerman, S.K. and Needham, C.A., 1995. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor Cryptosporidium/Giardia Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT Giardia EZ Microplate Assay for detection of Giardia lamblia. Journal of clinical microbiology, 33 (7), pp.1942-1943.
8. Homayouni, M.M., Razavi, S.M. and Asadpour, M., 2019. Prevalence and molecular characterization of Cryptosporidium spp. and Giardia intestinalis in household dogs and cats from Shiraz, Southwestern Iran. Veterinaria italiana, 55 (4), pp.311-318.
9. Wielinga, C.M. and Thompson, R.C.A., 2007. Comparative evaluation of Giardia duodenalis sequence data. Parasitology, 134 (12), pp.1795 1821.
10. Foronda, P., Bargues, M.D., Abreu-Acosta, N., Periago, M.V., Valero, M.A., Valladares, B. and Mas-Coma, S., 2008. Identification of genotypes of Giardia intestinalis of human isolates in Egypt. Parasitology research, 103 (5), pp.1177- 1181.

Prevalence of *Giardia Duodenalis* Parasite in Domestic Dogs of Dezful Region by PCR Method

Morteza Razaghi Manesh^{1*} Leila Derakhshan¹, Negar Safikhani², Hamid Reza Pishbin³

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar, Iran.
2. Doctor of Veterinary Medicine Student, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Shushtar, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine Student, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Iran

* Corresponding Author: Morteza_vet@yahoo.com

Abstract

Despite reports of *Giardia duodenalis* infection in dogs in Iran, few studies have been conducted on determining the genotypes of *Giardia duodenalis*. The purpose of this study was to determine the prevalence of infection in domestic dogs in the Dezful region and to determine the genotypes of *Giardia duodenalis* in domestic dogs in Dezful. PCR-RFLP method was used for the presence of *Giardia duodenalis* parasite and also to determine its genotypes. In this method, the target fragment of 432 base pairs was amplified. Finally, in microscopic examination, 7 samples were infected with *Giardia duodenalis* parasite. Therefore, the prevalence of parasites was (2.84%). The samples using NLAIV enzyme showed that 3 samples (42/85) of genotype C, 2 samples belonging to subgroup D (28/57) and 2 samples belonging to subgroup D respectively. AI is (28/57). Our findings indicate that *Giardia duodenalis* infection is common in Dezful dogs. Based on these findings, it is concluded that *Giardia duodenalis* genotype C and D are the most common genotypes in the study area. But contamination with zoonosis genotype A is also seen. Therefore, dogs can be introduced as a potential source of human giardia through direct contact or through surface water contamination.

Keywords: *Giardia Duodenalis*, Dog, Dezful, PCR