

جداسازی و شناسایی کیست ژیاردیا لامبلیا از آب‌های سطحی شهر رشت

الهام سعیدی^۱، نعمت‌الله جنیدی جعفری^۲، علی صالح‌زاده^۳، رضا کاظمی درسنگی^۴

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران ۲- مرکز تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران.
۳- گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. نویسنده مسئول. ۴- باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله پژوهشی تاریخچه مقاله دریافت: ۹۶/۷/۱۰ پذیرش: ۹۶/۹/۲۲ کلید واژگان ژيارديا لامبليا، کيست، PCR، رشت. نویسنده مسئول Email: salehzadehmb@yahoo.com	مقدمه: ژيارديا لامبليا تک‌ياخته بيماري‌زاي انگلي با گسترش جهاني در جوامع انساني مي‌باشد. شناسايي، تشخيص و تعيين شيوع گونه عامل عفوني براي جوامع انساني مي‌تواند بسيار با ارزش باشد. هدف اين مطالعه جداسازي و تشخيص کيست ژيارديا از آب‌هاي سطحی شهر رشت بر پايه روش میکروسکوپی و مولکولی است. روش کار: طی اين مطالعه مقطعی بر روی ۴۵ نمونه آب سطحی جمع‌آوری شده از رودخانه‌ها و تالاب‌های اطراف شهر رشت، جداسازي و شناسايي کيست ژيارديا از روی رسوب تغليظ شده به روش رنگ‌آمیزی با لوگل و تکثير ژنوم توسط پرايمرهای اختصاصی از روی ژنوم استخراج شده، انجام گرديد. یافته‌ها: از ۴۵ نمونه آب سطحی، تعداد ۱۵ نمونه (۳۳/۳۳٪) بر پايه روش تغليظ و میکروسکوپی و تعداد ۱۸ نمونه (۴۰٪) با استفاده از روش واکنش زنجيره‌ای پليمراز (PCR) مثبت تشخيص داده شد. روش PCR در مقايسه با روش استاندارد رنگ‌آمیزی کيست و میکروسکوپی دارای حساسيت ۱۰۰٪ و اختصاصيت ۹۰٪ بود. نتیجه‌گیری: شناسايي کيست ژيارديا لامبليا با روش PCR حساس‌تر و اختصاصی‌تر از روش میکروسکوپی مي‌باشد. با توجه به اينکه استفاده از منابع آبی برای صنعت کشاورزی امری رایج است، استفاده از روش‌های کنترل بهداشتی عوامل بيماري‌زا، از جمله جلوگیری از ورود هرگونه فاضلاب انساني به داخل اين منابع آبی پيشنهاده مي‌گردد.

مقدمه

تک‌ياخته ژيارديا لامبليا یکی عوامل عفوني مهم از خانواده تاژکداران روده‌ای با گسترش جهاني مي‌باشد که منجر به معمول‌ترین عفونت انگلي انسان در جهان می‌شود (۱). تخمین زده می‌شود که حدود ۲۰۰ میلیون نفر در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین به ژيارديا لامبليا آلوده‌اند و سالیانه حدود ۵۰۰۰۰۰ مورد جدید بيماری در بچه‌ها گزارش می‌شود (۲). کيست‌های ژيارديا لامبليا به شدت برای انسان بيماری‌زا هستند. در یک مطالعه کلينيکی که بر روی افراد داوطلب انجام گرفت مشخص گرديد که خوردن کپسول‌های ژلاتینی حاوی ۱۰ عدد کيست ژيارديا می‌تواند منجر به ژياردیازیس گردد. علايم بيماری ژياردیازیس از یک اسهال مزمن، سوء تغذيه و کاهش وزن تا ابتلا به بيماری بدون هیچ علامتی متغیر می‌باشد (۳). تشخيص ژياردیازیس در کشور ما بر اساس جستجوی کيست‌های ژيارديا لامبليا در مدفوع صورت می‌گیرد که اين روش برای تشخيص انگل در سطوح پایین بيماری حساسيت کافی را دارا نمی‌باشد (۴). اولین بار فیلیس در سال ۱۹۵۲ توانست با اندازه‌گیری ابعاد ترفوزیت‌های ژيارديا و نوع مدین

بادی سه گونه ژيارديا دنودنالیس، ژيارديا موریس و ژيارديا آرژیلیس را از هم تفکیک کند. ولی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی کيست نمی‌توان گونه‌های ژيارديا را از هم تفکیک کرد (۵). در مطالعات مقایسه‌ای بر روی روش‌های رنگ‌آمیزی کيست ژيارديا، رنگ‌آمیزی تری کروم به عنوان حساس‌ترین و بهترین روش شناسايي کيست ژيارديا معرفی شده است (۶). در کشورهای در حال توسعه، انگل‌های بيماری‌زای دستگاه گوارش که از راه آب منتقل می‌شوند از جمله آنتاموبا هیستولیتیکا، ژيارديا لامبليا و کریپتوسپوردیوم پاروم غالباً به عنوان عامل مرگ و میر به ویژه در کودکان مطرح می‌باشند. این انگل‌ها شایع‌ترین عامل عفونت زایی در سراسر جهان هستند (۷). اگر چه آب محیط مناسبی برای رشد ژيارديا نیست، اما پتانسیل بالایی را برای انتقال این انگل دارد و با وجود کاهش تعداد کيست‌ها ورودی به منابع آبی به علت مرگ و ترقیق، این انگل‌های تک‌ياخته‌ای می‌توانند در آب سرد برای مدت طولانی قابلیت حیات خود را حفظ کنند (۸). عوامل عفوني موجود در منابع آبی در صورت عدم کنترل به‌خصوص در مواقع بروز بحران از قبیل سيل و زلزله می‌تواند بسیار خطرناک باشند. سالانه

مطالعات بسیاری در سراسر جهان در راستای غربالگری عوامل بیماری‌زایی عفونی منتقل شونده از آب انجام می‌شود. اطلاعات حاصل از این مطالعات می‌تواند تأثیرات به‌سزایی در کنترل این عوامل عفونی ایفا کند. با توجه به جایگاه تشخیص مولکولی و اهمیت بیماری ژیا‌ردیازیس به خصوص در بین کودکان مطالعه فوق در راستای شناسایی مولکولی انگل ژیا‌ردیا لامبلیا در نمونه آب‌های سطحی شهر رشت انجام می‌گیرد.

روش کار

جمع‌آوری نمونه: طی این مطالعه مقطعی ۴۵ نمونه آب ۱ لیتری از ۱۲ رودخانه و ۸ تالاب مختلف حومه رشت بین مهر و آبان ۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها از عمق ۳۰ سانتی‌متری و فاصله ۱ متری از کنار رودخانه برداشت شد و در هنگام نمونه‌گیری سعی شد حداقل امکان از نواحی آلوده برداشت شود. همه نمونه‌ها در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و طی ۴۸ ساعت پس از نمونه‌گیری مورد پردازش قرار گرفتند.

پردازش نمونه‌ها و آماده‌سازی

نمونه‌های آب با فیلتر Wattman-scheicher and schuell با منافذ ۰/۲ میکرومتر فیلتر شد و بلافاصله با استفاده از بافر PBS مورد شستشو قرار گرفت. جستجوی میکروسکوپی کیست‌های ژیا‌ردیا در نمونه‌های فیلتر شده بعد از سانتی‌فیوژ در ۱۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از رنگ آمیزی لوگول انجام گردید.

استخراج ژنوم

به منظور شکستن دیواره کیست قبل از استخراج DNA، از روش Freeze-Thaw شامل ۱۵ سیکل دمایی ۳ دقیقه‌ای در دمای ۸۱- و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. برای خالص‌سازی ژنوم نمونه‌های آب تغلیظ شده از روش فنل-کلروفرم استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

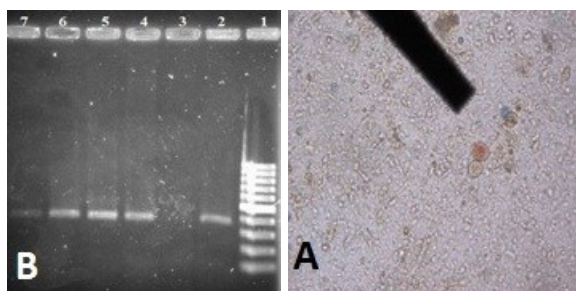
در راستای تشخیص مولکولی ژیا‌ردیا لامبلیا پرایمرهای اختصاصی برای ژن heat shock protein به طول ۳۵۰ جفت باز و با توالی 5'-GCATGTCGTCAGTATAGGCG-3' و 5'-GCTTCACTGACTCGGCCTTA-3' طراحی گردید. PCR با استوک نهایی در ۲۵ میکرولیتر تهیه و پروتکل دمایی با استفاده از ترموسایکلر اپندروف به ترتیب در ۳۵ سیکل شامل: ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به عنوان مرحله اولیه دناتوراسیون، شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به عنوان مرحله ثانویه دناتوراسیون، ۳۰ ثانیه دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک مرحله دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه انجام گردید. مشاهده و تفسیر

نمونه‌های تکثیر شده پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ در زیر دستگاه ترانس لومیناتور صورت گرفت.

کنترل مثبت و منفی: کیست ژیا‌ردیا از نمونه استول بیماران مبتلا به ژیا‌ردیوزیس به روش Percoll/Sucrose جدا و پس از استخراج ژنوم و PCR از نمونه فوق به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

یافته‌ها

از ۴۵ نمونه آب سطحی، ۱۵ نمونه (۳۳/۳۳٪) از نظر وجود کیست ژیا‌ردیا با استفاده از روش میکروسکوپی مثبت تشخیص داده شدند. جستجوی کیست با استفاده از لوگول رقیق شده انجام گردید، به طوری که بعد از ورود لوگول به داخل کیست، کیست‌ها رنگ قهوه‌ای به خود گرفتند. تعداد (۴۰/۱۸٪) نمونه نیز با استفاده از PCR مثبت گزارش شدند (شکل و جدول شماره ۱).



شکل - ۱: A: کیست ژیا‌ردیا در نمونه آب تغلیظ شده. شکل شماره B: نتایج تکثیر ژنوم بر روی نمونه‌های آب: چاهک شماره ۱ Ladder 100 bp، چاهک شماره ۲: کنترل مثبت، چاهک شماره ۳: کنترل منفی، چاهک‌های ۴، ۵، ۶، ۷: نمونه‌های مثبت ژیا‌ردیا در آب‌های سطحی

با توجه به اینکه روش طلایی استاندارد تشخیص ژیا‌ردیا روش میکروسکوپی می‌باشد، محاسبه حساسیت و اختصاصیت آزمون نشان داد که روش تشخیصی PCR در مقایسه با روش میکروسکوپی دارای ۱۰۰٪ حساسیت و ۹۰٪ اختصاصیت می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

آب عمومی‌ترین ماده مصرفی انسان می‌باشد و کیفیت آب نقش مهمی در سلامت افراد جامعه دارد. امروزه بسیاری از مشکلات بهداشتی کشورهای در حال توسعه، عدم برخوردای از آب آشامیدنی سالم است. یکی از مهمترین معضلات بهداشتی آب، وجود عوامل بیماری‌زا در آن است. شناسایی این عوامل بیولوژیک در راستای حذف و کنترل، از مسایل مهم بهداشتی آب به شمار می‌آیند (۹).

جدول ۱- نمونه‌های آب تغلیظ شده مثبت بر اساس مکان نمونه‌گیری

شماره نمونه	مکان نمونه‌گیری	روش میکروسکوپی	واکنش زنجیره ای پلیمرز
۱	جاده پیر بازار-رودخانه طش(۱)	-	+
۲	رودخانه پل طالشان(۱)	+	+
۳	رودخانه باربند(۲)	+	+
۴	رودخانه خوبک(۲)	+	+
۵	خمام رود(۱)	-	+
۶	خمام رود(۳)	+	+
۷	رودخانه پسیخان(۲)	+	+
۸	رودخانه سیاه صوفیان(۲)	+	+
۹	جعفر آباد -رودخانه ۲ سیاه صوفیان(۱)	+	+
۱۰	جعفر آباد -رودخانه ۲ سیاه صوفیان(۲)	+	+
۱۱	رودخانه ۱ نیشاوندان-داروسازی(۲)	+	+
۱۲	رودخانه ۲ نیشاوندان-داروسازی(۱)	+	+
۱۳	تالاب عینک(۱)	+	+
۱۴	تالاب عینک(۲)	-	+
۱۵	احمد گوراب - رودخانه (۲)	+	+
۱۶	احمد گوراب - رودخانه (۱)	+	+
۱۷	اشکیک -توبان انزلی کیلومتر ۳(۱)	+	+
۱۸	اشکیک -توبان انزلی کیلومتر ۳(۳)	+	+

جداسازی کیست‌های ژیاوردیا از آب شرب که تحت فرآیند تصفیه و کلرزدنی قرار گرفته‌اند، اهمیت پیدا می‌کند(۱۳). انجام مطالعات اپیدمیولوژیکی بر روی منابع آبی در زمانی که ژیاوردیازیس به صورت همه‌گیری بروز کند، می‌تواند بسیار با ارزش باشد. در سال ۱۹۷۴ ردیابی کیست ژیاوردیا به دنبال شیوع ژیاوردیازیس روی منابع آب در نیویورک انجام شد(۱۴). ردیابی و تشخیص کیست‌های ژیاوردیا در نمونه‌های منابع آبی، مستلزم انجام سه مرحله تغلیظ، خالص‌سازی، بازیابی و شناسایی می‌باشد. امروزه در بیشتر مطالعات برای تغلیظ نمونه آب جمع‌آوری شده، از روش فیلتر کردن کردن نمونه‌ها استفاده می‌شود. در میان انواع فیلترهای کاربردی همچون (Slow Sand filtration) و (Precoat filtration)، میکروفیلترها به عنوان مناسب‌ترین روش مطرح می‌باشند که دارای منافذ با اندازه ۱/۰ میکرومتر یا

به‌وسیله کیست‌های ژیاوردیا رابطه مستقیمی با سطح بهداشت و وضعیت اقتصادی جامعه دارد، به‌خصوص در مواردی که دفع بهداشتی فاضلاب‌ها در محیط صورت گیرد. که به‌ویژه در فصل‌های بارندگی این روان آب‌ها موجب انتقال کیست‌ها به آب و آلودگی شدید آن می‌شود و در صورت عدم رسیدگی خطر انتقال بیماری به انسان نیز وجود دارد(۱۰). بسیاری از آب‌های سطحی پس از فرآیند تصفیه مورد مصرف خانگی قرار می‌گیرند. یکی از روش‌های مهم در تصفیه آب، کلرزدنی است(۱۱). با توجه به مقاومت بالای پروتوزوآها از جمله کیست‌های ژیاوردیا نسبت به کلرزدنی، اهمیت حذف انگلی به‌وسیله فیلتراسیون منابع آبی بیش از کلرزدنی توصیه می‌گردد(۱۲). استفاده از صافی‌های شنی و یا دیاتومه‌ای می‌تواند بخش عمده تک‌یاختگان را از آب آلوده جدا کند. با این شرایط مطالعات

بیشتر می باشند (۱۵). برای خالص سازی و بازیابی کیست های ژياردیای از نمونه های آب تغلیظ شده از روش های شناورسازی با استفاده از محلول های سولفات روی، ساکارز، Percoll/Sucrose و سیترات پتاسیم استفاده می شود. در این مطالعه ما برای بازیابی کیست ها از روش Percoll/Sucrose استفاده شد (۱۶). تا قبل از دهه ۹۰ میلادی در بیشتر مطالعات انجام شده بیشترین کاربرد را روش های میکروسکوپی و ایمونوفلوروسنس (IFA) برای شناسایی کیست ژياردیای در منابع آبی داشتند. در سال ۱۹۷۹ استفاده از روش IFA در شناسایی ژياردیای توسط Visvesvara و همکاران مطرح گردید. در روش IFA مرحله تغلیظ و شناسایی ژياردیای با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال فلورسنت انجام می گیرد (۱۷). در مطالعات کنونی از روش فوق کمتر استفاده می شود چرا که کار آبی بازیابی، تحت تاثیر کیفیت آب به ویژه کدورت قرار دارد. علاوه بر این روش IFA روشی وقت گیر، خسته کننده و پرهزینه بوده و نیاز به افراد بسیار ماهر و با تجربه دارد. واکنش زنجیره ای پلیمرز یک روش تشخیص با حساسیت و اختصاصیت بالا در شناسایی عوامل بیولوژیک می باشد که در سال ۱۹۸۷ توسط کری مولیس ابداع شد. اولین بار در سال ۱۹۹۶ عباس زادگان و همکارانش موفق به شناسایی و تشخیص ژياردیای در نمونه های آب شدند (۱۸). در مطالعات بعدی ردیابی ژياردیای تا سطح حساسیت یک کیست بر پایه روش واکنش زنجیره ای پلیمرز عملی شد (۱۹). از مزایای روش PCR می توان به تشخیص کیست های زنده از کیست مرده و تشخیص و افتراق گونه های ژياردیای را از هم اشاره کرد (۲۰-۲۱). در این مطالعه با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن heat shock protein ژياردیای لامبلیا، آلودگی آب های سطحی رشت را به ژياردیای لامبلیا ۴۰٪ گزارش گردید. محمودی و همکاران با استفاده از روش های IFA, LAMP و واکنش PCR در شناسایی کیست ژياردیای، آلودگی دو رودخانه

استان گیلان را تا ۳۷/۵٪ گزارش نمودند که نتایج فوق با نتایج این تحقیق هم خوانی دارد (۲۲). در مطالعه Fernandes و همکاران در کشور برزیل آلودگی آب های سطحی، کشاورزی و فاضلاب به ژياردیای دئودناله با استفاده از روش PCR ۴۱/۶٪ گزارش شد. با رعایت اصول بهداشتی در راستای جلوگیری از ورود عامل عفونی به منابع آبی آلودگی منابع فوق به صورت چشم گیری در منابع آبی کاهش پیدا می کند، به طوری که در کشورهای پیشرفته نظیر آلمان و فنلاند آلودگی به کیست ژياردیای در منابع آبی به ترتیب ۴/۲٪ و ۱۳/۷٪ گزارش شده است (۲۳-۲۴).

استان گیلان با داشتن زمین های حاصل خیز سهم قابل توجهی را در صنعت کشاورزی ایران را دارا می باشد. سیستم آبیاری کشاورزی در این منطقه بیشتر بر پایه روش سنتی و استفاده از آب های سطحی می باشد. استفاده از آب های آلوده در صنعت کشاورزی می تواند سبب آلودگی محصولات تولید شده و در نهایت منجر به بروز طیف وسیعی از بیماری های عفونی در بین مصرف کنندگان گردد. چنین مطالعاتی به آلودگی با کیست ژياردیای در میوه و سبزیجاتی که با آب های آلوده آبیاری شده اند، اهمیت پیدا می کند (۲۵). نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که حضور کیست ژياردیای در آب های سطحی رشت قابل توجه می باشد. استفاده از روش PCR می تواند در کنار روش های روتین غربالگری دیگر آب بسیار با ارزش واقع گردد. با توجه به اهمیت سلامت این ماده حیاتی مهم ترین عملکرد بهداشتی یعنی دفع بهداشتی فاضلاب های انسانی پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه همکاران دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال تشکر را دارند.

References

- 1-Wolfe MS. Giardiasis. Clinical microbiology reviews. 1992;5(1):93-100.
- 2-Thompson R. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis. Veterinary parasitology. 2004;126(1):15-35.
- 3-Rendtorff RC. The Experimental Transmission Of Human Intestinal Protozoan Parasites II. Giardia Lamblia Cysts GWEN In Capsules. American Journal of Epidemiology. 1954;59(2):209-22.
- 4-Flanagan P. Giardia--diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. Epidemiology and Infection. 1992;109(1):1.
- 5-Filice FP. Studies on the Eytology and Lige History of a Giardia from the Laboratory Rat: University of California Press; 1952.
- 6-Nieminski EC, Schaefer F, Ongerth JE. Comparison of two methods for detection of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in water. Applied and Environmental Microbiology. 1995;61(5):1714-7
- 7-Cráun GF, Meyer E. Waterborne giardiasis. Giardiasis. 1990:267-93.
- 8-Rose JB, Haas CN, Regli S. Risk assessment and control of waterborne giardiasis. American journal of public health. 1991;81(6):709-13.
- 9-Gray NF. Water technology: an introduction for environmental scientists and engineers: IWA Publishing; 2010.
- 10-Staff WHO. Guidelines for drinking-water quality: Surveillance and control of community supplies: World Health Organization; 1997.
- 11-Serodes J, Rodriguez M. Method of predicting residual chlorine in water supply systems. Google Patents; 1997.
- 12-Betancourt WQ, Rose JB. Drinking water treatment processes for removal of Cryptosporidium and Giardia. Veterinary parasitology. 2004;126(1):219-34.
- 13-Wallis P, Erlandsen S, Isaac-Renton J, Olson M, Robertson W, Van Keulen H. Prevalence of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts and characterization of Giardia spp. isolated from drinking water in Canada. Applied and environmental microbiology. 1996;62(8):2789-97.
- 14-Rendtorff R. Giardia in water. Annals of Internal Medicine. 1975;82(2):280-1.
- 15-Jacangelo JG, Rhodes Trussell R, Watson M. Role of membrane technology in drinking water treatment in the United States. Desalination. 1997;113(2):119-27.
- 16-LeChevallier MW, Norton WD, Lee RG. Evaluation of a method to detect Giardia and Cryptosporidium in water. ASTM Special Technical Publication. 1991(1102):483-98.
- 17-Visvesvara G, Healy G, editors. The possible use of an indirect immunofluorescent test using axenically grown Giardia lamblia antigens in diagnosing giardiasis. Proceedings, symposium on waterborne transmission of giardiasis US Environmental Protection Agency, Cincinnati; 1979.
- 18-Abbaszadegan M, Gerba C, Rose J. Detection of Giardia cysts with a cDNA probe and applications to water samples. Applied and environmental microbiology. 1991;57(4):927-31.
- 19-Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Pepper IL. Detection of viable Giardia cysts by amplification of heat shock-induced mRNA. Applied and environmental microbiology. 1997;63(1):324-8.
- 20-Mahbubani M, Bej A, Perlin M, Schaefer F, Jakubowski W, Atlas R. Detection of Giardia cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. Applied and environmental microbiology. 1991;57(12):3456-61.
- 21-Weiss JB, van Keulen H, Nash TE. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. Molecular and biochemical parasitology. 1992;54(1):73-86.
- 22-Mahmoudi M-R, Kazemi B, Mohammadiha A, Mirzaei A, Karanis P. Detection of Cryptosporidium and Giardia (oo) cysts by IFA, PCR and LAMP in surface water from Rasht, Iran. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2013.
- 23-Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J, Karanis P. Prevalence and distribution of Cryptosporidium and Giardia in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. Epidemiology and infection. 2013;141:9-21.
- 24-Hörman A, Rimhanen-Finne R, Maunula L, von Bonsdorff C-H, Torvela N, Heikinheimo A, et al. Campylobacter spp., Giardia spp., Cryptosporidium spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. Applied and environmental microbiology. 2004;70(1):87-95.
- 25-Robertson L, Gjerde B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. Journal of Food Protection. 2001;64(11):1793-8.

Isolation and identification of *Giardia lamblia* cysts from surface waters of Rasht city

Saeedi. E (MSc), Joneidi Jafari. N (PhD), Saleh Zadeh. A (PhD)*, Kazemi. R (MSc)

Abstract

Introduction: *Giardia Lamblia* is a protozoan parasite with global spread in the human population. Identification, diagnosis and determination of the incidence of the infectious agent can be valuable to control the possible sources of spread of this infectious agent in human communities. Therefore, the aim of this study was isolation and diagnosis of *Giardia* cysts from surface waters of Rasht based on microscopic and molecular methods.

Methods: This Cross-sectional study was performed on 45 samples of surface water collected from rivers and wetlands in the vicinity of Rasht. The samples were concentrated using nitrocellulose membrane filters. *Giardia* cysts were sought in concentrated deposits using Lugol staining. *Giardia lamblia* genome amplification was done by specific primers on DNA extracted from sediment samples using phenol-chloroform method.

Results: From 45 surface water samples, 15 (33.33%) were positive based on concentration and microscopic observation and 18 (40%) were positive in PCR. PCR had 100% sensitivity and 90% specificity in comparison with the standard staining method.

Conclusion: In detection of *Giardia lamblia* cysts from concentrated water samples, PCR is more sensitive and specific than microscopy. Given the common use of water resources for agriculture, use of sanitary methods of pathogen control including preventing human sewage from entering into any water source is recommended.

Keywords: *Giardia lamblia*, cysts, PCR, Rasht

*Corresponding Author, Department of biology, Rasht Islamic Azad University, Rasht, Iran. Email: salehzadehmb@yahoo.com