

جداسازی و شناسایی کیست ژیا ردیا لامبلیا از آب های سطحی شهر رشت

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

۱- گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران ۲- مرکز تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران.
۳- گروه زیست شناسی، 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
<p>نوع مقاله پژوهشی</p>	<p>مقدمه: ژیا ردیا لامبلیا تک‌یاخته بیماری‌زای انگلی با گسترش جهانی در جوامع انسانی می‌باشد. شناسایی، تشخیص و تعیین شیوع گونه عامل عفونی برای جوامع انسانی می‌تواند بسیار با ارزش باشد. هدف این مطالعه جداسازی و تشخیص کیست ژیا ردیا از آب‌های سطحی شهر رشت بر پایه روش میکروسکوپی و مولکولی است.</p>
<p>تاریخچه مقاله دریافت: ۹۶/۷/۱۰ پذیرش: ۹۶/۹/۲۲</p>	<p>روش کار: طی این مطالعه مقطعی بر روی ۴۵ نمونه آب سطحی جمع‌آوری شده از رودخانه‌ها و تالاب‌های اطراف شهر رشت، جداسازی و شناسایی کیست ژیا ردیا از روی رسوب تغلیظ شده به روش رنگ‌آمیزی با لوگل و تکثیر ژنوم توسط پرایمرهای اختصاصی از روی ژنوم استخراج شده، انجام گردید.</p>
<p>کلید واژگان ژیا ردیا لامبلیا، کیست، PCR، رشت.</p>	<p>یافته‌ها: از ۴۵ نمونه آب سطحی، تعداد ۱۵ نمونه (۳۳/۳۳٪) بر پایه روش تغلیظ و میکروسکوپی و تعداد ۱۸ نمونه (۴۰٪) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مثبت تشخیص داده شد. روش PCR در مقایسه با روش استاندارد رنگ‌آمیزی کیست و میکروسکوپی دارای حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۰٪ بود.</p>
<p>نویسنده مسئول Email: salehzadehmb@yahoo.com</p>	<p>نتیجه‌گیری: شناسایی کیست ژیا ردیا لامبلیا با روش PCR حساس‌تر و اختصاصی‌تر از روش میکروسکوپی می‌باشد. با توجه به اینکه استفاده از منابع آبی برای صنعت کشاورزی امری رایج است، استفاده از روش‌های کنترل بهداشتی عوامل بیماری‌زا، از جمله جلوگیری از ورود هرگونه فاضلاب انسانی به داخل این منابع آبی پیشنهاد می‌گردد.</p>

مقدمه

تک‌یاخته ژیا ردیا لامبلیا یکی عوامل عفونی مهم از خانواده تاژک‌داران روده‌ای با گسترش جهانی می‌باشد که منجر به معمول‌ترین عفونت انگلی انسان در جهان می‌شود (۱). تخمین زده می‌شود که حدود ۲۰۰ میلیون نفر در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین به ژیا ردیا لامبلیا آلوده‌اند و سالیانه حدود ۵۰۰۰۰۰ مورد جدید بیماری در بچه‌ها گزارش می‌شود (۲). کیست‌های ژیا ردیا لامبلیا به شدت برای انسان بیماری‌زا هستند. در یک مطالعه کلینیکی که بر روی افراد داوطلب انجام گرفت مشخص گردید که خوردن کپسول‌های ژلاتینی حاوی ۱۰ عدد کیست ژیا ردیا می‌تواند منجر به ژیا ردیازیس گردد. علائم بیماری ژیا ردیازیس از یک اسهال مزمن، سوء تغذیه و کاهش وزن تا ابتلا به بیماری بدون هیچ علامتی متغیر می‌باشد (۳). تشخیص ژیا ردیازیس در کشور ما بر اساس جستجوی کیست‌های ژیا ردیا لامبلیا در مدفوع صورت می‌گیرد که این روش برای تشخیص انگل در سطوح پایین بیماری حساسیت کافی را دارا نمی‌باشد (۴). اولین بار فیلیس در سال ۱۹۵۲ توانست با اندازه‌گیری ابعاد ترفوژنیت‌های ژیا ردیا و نوع مدین

بادی سه‌گونه ژیا ردیا دنودنالیس، ژیا ردیا موریس و ژیا ردیا آرژیلیس را از هم تفکیک کند. ولی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی کیست نمی‌توان گونه‌های ژیا ردیا را از هم تفکیک کرد (۵). در مطالعات مقایسه‌ای بر روی روش‌های رنگ‌آمیزی کیست ژیا ردیا، رنگ‌آمیزی تری کروم به عنوان حساس‌ترین و بهترین روش شناسایی کیست ژیا ردیا معرفی شده است (۶). در کشورهای در حال توسعه، انگل‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش که از راه آب منتقل می‌شوند از جمله آنتاموبا هیستولیتیکا، ژیا ردیا لامبلیا 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 ژیا ردیا نیست، اما پتانسیل بالایی را برای انتقال این انگل دارد و با وجود کاهش تعداد کیست‌ها ورودی به منابع آبی به علت مرگ و ترقیق، این انگل‌های تک‌یاخته‌ای می‌توانند در آب سرد برای مدت طولانی قابلیت حیات خود را حفظ کنند (۸). عوامل عفونی موجود در منابع آبی در صورت عدم کنترل به‌خصوص در مواقع بروز بحران از قبیل سیل 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 ژیاوردیازیس به خصوص در بین کودکان مطالعه فوق در راستای شناسایی مولکولی انگل ژیاوردیا 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 ژیاوردیا در نمونه‌های فیلتر شده بعد از سانتریفیوژ 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.

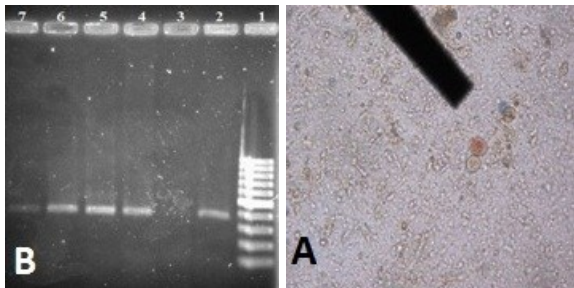
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

در راستای تشخیص مولکولی ژیاوردیا 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 به‌عنوان مرحله اولیه دناتوراسیون، شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان مرحله ثانویه دناتوراسیون، ۳۰ ثانیه در 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 ژیاوردیا از نمونه استول بیماران مبتلا به ژیاوردیوزیس به روش Percoll/Sucrose جدا و پس از استخراج ژنوم و PCR از نمونه فوق به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

یافته‌ها

از ۴۵ نمونه آب سطحی، ۱۵ نمونه (۳۳/۳۳٪) از نظر وجود کیست ژیاوردیا 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٪) نمونه نیز با استفاده از PCR مثبت گزارش شدند (شکل و جدول شماره ۱).



شکل ۱ - A: کیست ژیاوردیا 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 ژیاوردیا در آب‌های سطحی

با توجه به اینکه روش طلایی استاندارد تشخیص ژیاوردیا 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 به‌شمار می‌آیند (۹). آلودگی آب

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 کیست های ژیا ردیا از آب شرب که تحت فرآیند تصفیه و کلر زنی قرار گرفته‌اند، اهمیت پیدا می‌کند(۱۳). انجام مطالعات اپیدمیولوژیکی بر روی منابع آبی در زمانی که ژیا ردیازیس به صورت همه‌گیری بروز کند، می‌تواند بسیار با ارزش باشد. در سال ۱۹۷۴ ردیابی کیست ژیا ردیا به دنبال شیوع ژیا ردیازیس روی منابع آب در نیویورک انجام شد(۱۴). ردیابی و تشخیص کیست‌های ژیا ردیا در نمونه‌های منابع آبی، مستلزم انجام سه مرحله تغلیظ، خالص‌سازی، بازیابی و شناسایی می‌باشد. امروزه در بیشتر مطالعات برای تغلیظ نمونه آب جمع آوری 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

به وسیله کیست های ژیا ردیا رابطه مستقیمی با سطح بهداشت و وضعیت اقتصادی جامعه دارد، به خصوص در مواردی که دفع بهداشتی فاضلاب‌ها در محیط صورت گیرد. که به‌ویژه در فصل های 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، کلر زنی است(۱۱). با توجه به مقاومت بالای پروتوزوآها از جمله کیست‌های ژیا ردیا نسبت به کلر زنی، اهمیت حذف انگلی به وسیله فیلتراسیون منابع آبی بیش از کلر زنی توصیه می‌گردد(۱۲). استفاده از صافی‌های شنی و یا دیاتومه‌ای می‌تواند بخش عمده تک یا ختگان را از آب آلوده جدا کند. با این شرایط مطالعات

بیشتر می باشند (۱۵). برای خالص سازی و بازیابی کیست های ژیا ردیا از نمونه های آب تغلیظ شده از روش های شناور سازی 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 ژیا ردیا در منابع آبی داشتند. در سال ۱۹۷۹ استفاده از روش IFA در شناسایی ژیا ردیا توسط Visvesvara و همکاران مطرح گردید. در روش IFA مرحله تغلیظ و شناسایی ژیا ردیا 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 ژیا ردیا در نمونه های آب شدند (۱۸). در مطالعات بعدی ردیابی ژیا ردیا 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 ژیا ردیا را از هم اشاره کرد (۲۰-۲۱). در این مطالعه با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن heat shock protein ژیا ردیا لامبلیا، آلودگی آب های سطحی رشت را به ژیا ردیا لامبلیا ۴۰٪ گزارش گردید. محمودی و همکاران با استفاده از روش های IFA, LAMP و واکنش PCR در شناسایی کیست ژیا ردیا، آلودگی دو رودخانه

استان گیلان را تا ۳۷/۵٪ گزارش نمودند که نتایج فوق با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (۲۲). در مطالعه Fernandes و همکاران در کشور برزیل آلودگی آب های سطحی، کشاورزی و فاضلاب به ژیا ردیا 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 ژیا ردیا 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 ژیا ردیا 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 ژیا ردیا 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