

تمایز ایزوله‌های کریپتوسپوریديوم جدا شده از انسان و گاو با استفاده از قطعه ۱۰۵۵bp ژن 18S rRNA

دکتر فرید تحویلدار بیدرونی*، دکتر عبدالحسین دلیمی اصل*، دکتر بهرام کاظمی دمنه**

* گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
** مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به شیوع انواع کریپتوسپوریديوم در اشخاص با سیستم ایمنی کارآمد و ناکارآمد و ضرورت تمایز گونه‌های انسانی و حیوانی و اهمیت استفاده از ژن 18S rRNA این پژوهش در شهر تهران انجام گرفت. هدف این تحقیق تمایز ایزوله‌های کریپتوسپوریديوم جدا شده از انسان و گاو با استفاده از قطعه ۱۰۵۵ جفت نوکلئوتید ژن 18S rRNA بود.

روش بررسی: تعداد ۱۰۲۰ نمونه مدفوع انسانی و ۹۴۰ نمونه مدفوع گاوی با استفاده از روش اسید فست اصلاح شده مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌های مثبت تعیین شد. DNA نمونه‌های مثبت توسط کیت Qia Amp استخراج گردید و بعد با استفاده از ۴ پرایمر طراحی شده یک قطعه DNA به تعداد ۱۰۵۵ جفت نوکلئوتید از ژن 18S rRNA با روش Nested-PCR تکثیر شد و محصول PCR دوم برای تعیین گونه کریپتوسپوریديوم توسط آنزیمهای SspI و VspI هضم شد و روی ژل آگاروز ۲/۵٪ و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید.

یافته‌ها: در مطالعه فوق، تعداد موارد مثبت انسانی ۱۲ و موارد مثبت گاوی ۲۳ نمونه تعیین شد. تمامی نمونه‌های مثبت با روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج روش اول تأیید شد. همه نمونه‌های گاوی و ۱۰ نمونه انسانی دارای حرکت الکتروفوریک مشابه بر روی ژل آگاروز ۲/۵٪ بود که تأییدکننده گونه کریپتوسپوریديوم پاروم گاوی بود ولی ۲ نمونه انسانی دارای باندهای متفاوت بودند که تعیین سکناس شد و تمایزشان با نمونه‌های گاوی و انسانی بدست آمده تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: با وجودی که محققین در سایر کشورها کریپتوسپوریديوم پاروم را بعنوان عامل اصلی کریپتوسپوریديوزیس انسانی معرفی کرده‌اند، آلودگی به نوع هومینیس را نیز حائز اهمیت دانسته‌اند. در این تحقیق نیز آلودگی انسان به دو نوع کریپتوسپوریديوم پاروم و هومینیس مشاهده شد که گونه غالب آن کریپتوسپوریديوم پاروم بود.

واژگان کلیدی: کریپتوسپوریديوم پاروم، کریپتوسپوریديوم هومینیس، ژن 18S rRNA.

مقدمه

کریپتوسپوریديوم تک یاخته‌ای از گروه اپی‌کمپلکس‌ها می‌باشد که اغلب در کودکان و افراد با سیستم ایمنی سالم به صورت یک ناراحتی گوارشی ساده تا اسهال حاد خود محدود

شونده بروز می‌نماید ولی در افراد با ایمنی ناکارآمد اکتسابی و یا غیراکتسابی می‌تواند موجب اسهال شدید و مرگ شود (۱). شیوع این بیماری در نقاط مختلف دنیا از ۶۰٪ تا ۸۳٪ در بیماران با علائم گوارشی گزارش شده که شامل افراد با ایمنی سالم و ناکارآمد می‌باشد که عامل آن اغلب دو گونه کریپتوسپوریديوم پاروم و هومینیس می‌باشد (۲، ۳).

این تک‌یاخته که یک کوکسیدیا است علاوه بر انسان می‌تواند حیوانات اهلی و سایر مهره‌داران را نیز مبتلا نماید (۴). از میان

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی،

دکتر عبدالحسین دلیمی اصل (email: Dalimi4@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۲/۱

انواع کریپتوسپورییدیوم نوع پاروم بعنوان عامل اصلی بیماری در افراد با ایمنی سرکوب شده معرفی شده است و این نتیجه بدلیل مشابهت ظاهری بین کریپتوسپورییدیوم بدست آمده از انسان و گاو و انتقال متقابل بین آنها به دست آمده است (۶،۵).

تاکنون بیش از ۲۰ گونه مختلف از کریپتوسپورییدیوم در انواع مختلف حیوانات شناسایی شده است (۷). موضوع حائز اهمیت آگاهی به چگونگی انتقال این تک‌یاخته به انسان می‌باشد لذا کریپتوسپورییدیوم انسانی را با نام کریپتوسپورییدیوم پاروم انسانی یا ژنوتیپ ۱ که غالباً انسان را آلوده کرده (۸) و کریپتوسپورییدیوم گاوی یا پاروم را ژنوتیپ ۲ نامگذاری کرده‌اند که نه تنها انسان بلکه سایر پستانداران را مبتلا می‌سازد. این دو گونه بدلیل تفاوت ترادف و همچنین تفاوت الگوی الکتروفورزی بعد از هضم ژن با آنزیمهای برشی، از نظر ژنتیکی دو گونه مجزا بحساب می‌آیند (۹). انتقال این تک‌یاخته از راههای مختلف امکان‌پذیر است ولی مهمترین راه انتقال که می‌تواند موجب بروز اپیدمی‌های بزرگ شود انتقال آن توسط آب آشامیدنی آلوده است (۱۰). لازم به ذکر است انتقال آلودگی توسط آب از سراسر دنیا گزارش شده و یکی از مشکلات بهداشتی محسوب می‌شود (۱۱). هدف این تحقیق تمایز ایزوله‌های کریپتوسپورییدیوم جدا شده از انسان و گاو با استفاده از قطعه ۱۰۵۵bp ژن 18S rRNA بود.

مواد و روشها

لامهای مستقیم و فرمل اتر تهیه شده کلیه نمونه‌های مدفوعی که از کودکان مراجعه کننده به مراکز بیمارستانی (مرکز طبی کودکان، بیمارستان کودکان مفید، بیمارستان حضرت علی اصغر) و گوساله‌های یک تا شش ماهه دامداریهای اطراف تهران جمع‌آوری شدند با روش اسید فاست اصلاح شده رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند و نمونه‌هایی که واجد اوویست بودند در محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵٪ و در دمای یخچال نگهداری شدند. دلیل انتخاب کودکان بیمار ۶ ماهه تا ۸ ساله و گوساله‌های ۶-۱ ماهه عدم تکمیل سیستم ایمنی آنها بوده که به تک‌یاخته اجازه فعالیت می‌دهند و به تدریج با فعال شدن آن بیماری کنترل می‌شود. از میان ۱۰۲۰ نمونه انسانی بدست آمده از مراکز بیمارستانی تعداد ۱۲ مورد واجد اوویست تشخیص داده شدند و از میان ۹۴۰ نمونه جمع‌آوری شده از دامداریها تعداد ۲۳ مورد واجد اوویست تشخیص داده شدند.

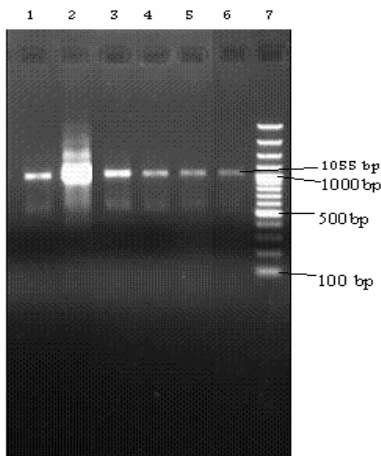
برای استخراج DNA از کیت شرکت QIAGEN (QIAamp DNA stool mini kit) استفاده شد. بدین منظور ۲۲۰-۱۸۰ میکرولیتر از مدفوعی که توسط آب یا نرمال سالین رقیق شده بود بداخل لوله سانتریفوژ ۲ میلی‌لیتری ریخته مقدار ۱/۴ میلی‌لیتر از بافر ASL به آن اضافه گردید. پس از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و بعد از ورتکس در ۱۴۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار ۱/۲ میلی‌لیتر از مایع رویی را به یک لوله ۲ میلی‌لیتری منتقل کرده و یک قرص موجود در کیت به نام inhibit را به لوله اضافه کرده و ورتکس کردیم تا قرص حل شود و پس از گذشت یک دقیقه در دمای اطاق لوله را در ۱۴۰۰۰ دور به مدت سه دقیقه سانتریفوژ نموده و بعد تمام مایع رویی را به لوله ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل کرده و مدت سه دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. در همین زمان مقدار ۱۵ میکرولیتر پروتئیناز k به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد. بعد مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از مایع مرحله ۳ را به لوله حاوی پروتئیناز k اضافه کردیم و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول AL نیز به آن اضافه شد پس از ۱۵ ثانیه مخلوط کردن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه قرار دادیم. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانل مطلق به محلول اضافه کرده مخلوط نموده سپس به آرامی سانتریفوژ کردیم تا تمام محلول در ته لوله جمع شود. آنگاه درب لوله کیامپ را به دقت شماره‌گذاری کرده سپس تمام محلول لیزت را به داخل آن ریختیم و به مدت یک دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفوژ کردیم. سپس ستون کیامپ را به لوله ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل کرده و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول بافر AW1 به آن اضافه کرده و مدت یک دقیقه سانتریفوژ نمودیم و سپس ستون کیامپ را به لوله ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل کرده و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر AW2 به آن اضافه کرده و مدت سه دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفوژ نمودیم. در ادامه ستون کیامپ را به داخل لوله ۱/۵ میلی‌لیتر برده مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از بافر AE را به آن اضافه کرده مدت یک دقیقه در حرارت اطاق ماند سپس به مدت یک دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفوژ کرده تا DNA از آن خارج شده ستون را دور انداختیم و محلول حاوی DNA را در یخچال برای استفاده کوتاه مدت و در فریزر ۲۰- برای مدت طولانی نگهداری کردیم.

ژن 18S rRNA موجود در اوویست توسط روش Nested-PCR تکثیر شد. علت استفاده از روش Nested کم بودن مقدار

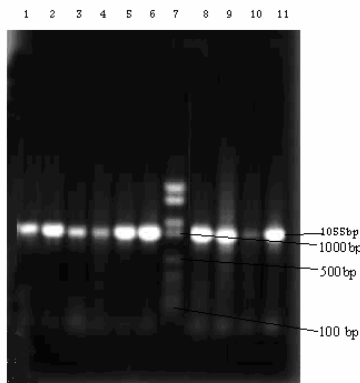
در ۶۰ درجه، نتایج الگوی هضم شده نمونه‌ها روی ژل آگارز ۲/۵٪ الکتروفورز و مشاهده شد سپس نتایج را با تعیین ترادف توسط شرکت MWG Biotech در کشور آلمان مورد تأیید قرار دادیم.

یافته‌ها

از مجموع ۱۰۲۰ نمونه انسانی، ۱۲ نمونه مثبت و از تعداد ۹۴۰ نمونه گاوی، ۲۳ نمونه مثبت بود. سپس یک قطعه ۱۰۵۵ جفت بازی از ژن 18S rRNA را که محصول دوم روش Nested-PCR می‌باشد، تکثیر نمودیم (شکل‌های ۱ و ۲). آنگاه با استفاده از دو آنزیم Ssp1 و Vsp1 تمایز موجود در بین گونه‌ها را تشخیص دادیم.



شکل ۱- قطعه ۱۰۵۵bp نمونه‌های گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان (۱-۶). چاهک شماره ۷، ۱۰۰ bp Size marker می‌باشد



شکل ۲- قطعه ۱۰۵۵bp نمونه‌های گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از گاو (۱-۱۱)، چاهک شماره ۷، ۱۰۰bp Size marker می‌باشد

DNA و در نتیجه کمبود مقدار ژن مورد نظر در نمونه بود (۱۲).

برای تکثیر این ژن در کریپتوسپوریدیوم ما ملزم به انجام دو PCR متوالی بودیم لذا می‌بایست چهار پرایمر طراحی کنیم که یک جفت آن که شامل یک F و یک R بود برای PCR اول و یک جفت آن برای PCR دوم استفاده شود. توسط پرایمرهای اولیه یک قطعه به طول ۱۵۵۷ جفت باز تکثیر شد.

CRYP1 F 5'-TTACTTACATGGATAACCGTG-3' (130-150)
CRYP1 R 5'-ACGAAACTTTCCTTACATGTA-3' (1658-1678)

در هر واکنش PCR به حجم ۳۰ μL مقدار ۳ μL از بافر 10x و ۲ μL از محلول MgCl2 با غلظت ۵۰ mM و مقدار ۱ μL از dNTP با غلظت ۱۰ mM و ۲ μL از taq polymerase و ۲ μL از DNA ژنومیک و ۱ μL از هر یک از پرایمرهای R و F که به حجم کلی محلول اضافه شد و بقیه آن تا ۳۰ μL با آب مقطر دیونایز تکمیل شد.

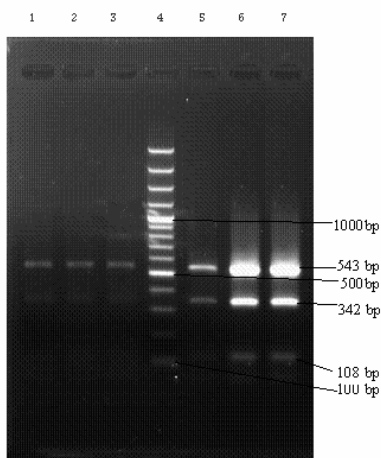
برای انجام PCR از روش 3step PCR استفاده کردیم که شامل شرایط زیر می‌باشد و این سیکل ۳۵ بار تکرار شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، annealing در دمای ۵۸ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در نهایت extension نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه. سپس در Nested توسط یک زوج پرایمر دوم یک قطعه به طول ۱۰۵۵ جفت باز را تکثیر کردیم

CRYP2 F 5'-TTTAGACGGTAGGGTATTG-3' (299-317)
CRYP2 R 5'-ACAAAGTCCCTCTAAGAAG-3' (1333-1351)

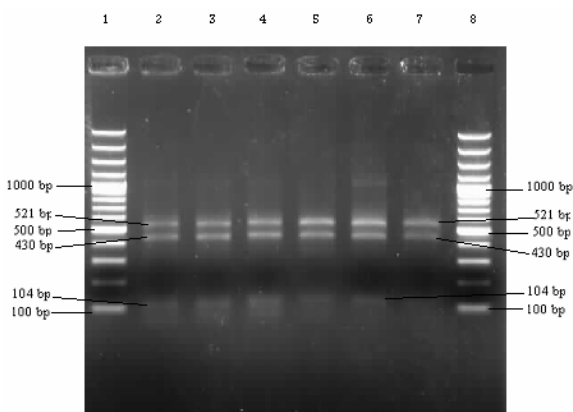
شرایط واکنش مشابه شرایط فوق بود و تفاوت فقط در دمای annealing بود که دما به ۵۴ درجه کاهش یافت و بجای DNA ژنومیک از محصول PCR اول به مقدار ۲ μL استفاده شد. پس از انجام PCR دوم محصول تولید شده را بر روی ژل ۲/۵٪ آگاروز شرکت فرمنتاز برده و توسط اتیدیوم بروماید و دستگاه UV.transilluminator مدل LHR (Syngen, UK) قابل مشاهده گردید.

محصولات DNA بدست آمده که دارای باند قوی و خوب بودند را توسط دو آنزیم برشی Ssp1 و Vsp1 شرکت فرمنتاز برش زده شدند. برای انجام اینکار در یک واکنش ۳۰ μL مقدار ۱۰ μL از محصول دوم PCR را با ۳ μL از بافر آنزیم و ۱۰ واحد از آنزیم مورد نظر (تقریباً ۰/۵ میکرولیتر) و ۱۷/۵ ماکرولیتر از آب مقطر دیونیزه اضافه کرده و مدت ۳ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه قرار دادیم سپس با غیر فعال کردن آنزیم

توجه به تمایز موجود به Gene bank گزارش گردید و با access number شماره EU311203 به ثبت رسیده است.



شکل ۴- قطعه ۱۰۵۵bp از نمونه‌های گونه کریپتوسپورییدیوم جدا شده از گاو (چاهک ۱-۷) بریده شده با آنزیم Ssp1. چاهک شماره ۴، Size marker ۱۰۰bp می‌باشد.

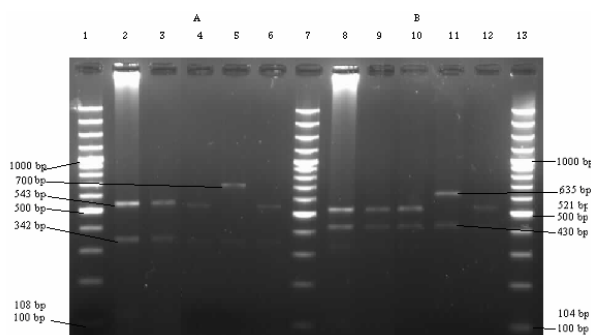


شکل ۵- قطعه ۱۰۵۵bp از نمونه‌های گونه کریپتوسپورییدیوم جدا شده از گاو (چاهک ۲-۷) بریده شده با آنزیم Vsp1. چاهک شماره ۱ و ۸، Size marker 100 bp می‌باشد.

بحث

با توجه به مطالعات انجام شده اهمیت کریپتوسپورییدیوم و تشخیص آن ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات میکروسکوپی تا حدودی در مرفولوژی این تک‌یاخته موثر بوده ولی تمایز میان گونه‌ها نیاز به روشهای جدیدتر دارد تا بتوان کریپتوسپورییدیوم‌های آلوده کننده سایر موجودات را متمایز نمود و یا تک‌یاخته‌های دیگری را که در زیر نام کریپتوسپورییدیوم پنهان شده‌اند، آشکار ساخت. کریپتوسپورییدیوم در انسان برای اولین بار یک مورد در سال

از مجموع ۱۲ نمونه انسانی که توسط آنزیم Ssp1 هضم شدند، ۱۰ نمونه الگوی برشی یکسانی را نشان دادند که بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ و با استفاده از اتیدیوم بروماید سه باند قابل مشاهده با اندازه‌های ۱۰۸، ۳۴۲ و ۵۴۳ جفت نوکلئوتید تولید نمودند ولی نمونه چاهک شماره ۵ در اثر این آنزیم ایجاد دو باند ۳۴۲ و ۷۰۰ جفت نوکلئوتیدی نمود که با بقیه متفاوت بود (شکل ۳، قسمت A).



شکل ۳- قسمت A قطعه ۱۰۵۵bp از نمونه‌های گونه کریپتوسپورییدیوم جدا شده از انسان (چاهک ۲-۶) بریده شده با آنزیم Ssp1 و قسمت B چاهک شماره (۲-۶) بریده شده با آنزیم Vsp1 می‌باشد. چاهکهای شماره ۱، ۷ و ۱۳، Size marker ۱۰۰bp می‌باشد

از مجموع ۱۸ نمونه گاوی که توسط آنزیم برشی Ssp1 تحت تاثیر قرار گرفتند جملگی الگوی برشی یکسانی را نشان دادند که بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ و با استفاده از اتیدیوم بروماید سه باند قابل مشاهده با اندازه‌های ۱۰۸، ۳۴۲ و ۵۴۳ جفت نوکلئوتید تولید نمودند (شکل ۴). تمامی نمونه‌های فوق‌الذکر در مرتبه دوم مورد تاثیر آنزیم Vsp1 قرار داده شدند که نمونه انسانی بر روی آگارز ۲/۵٪ این‌بار تفاوتی را در حرکت الکتروفوریتیک نمونه چاهک شماره ۱۱ نشان داد و باندهایی با اندازه‌های ۱۰۴، ۴۳۰ و ۵۶۳ جفت نوکلئوتید را ایجاد نمود ولی نمونه‌های سایر چاهکها باندهای مرئی با اندازه‌های ۱۰۴، ۴۳۰ و ۵۲۱ جفت نوکلئوتید را ایجاد نمودند. لازم به یادآوری است که این نمونه همان نمونه‌ای است که در اثر آنزیم اول باندهایی متفاوت با بقیه ایجاد نمود (شکل ۳، قسمت B). نمونه‌های گاوی در اثر آنزیم Vsp1 باندهایی با اندازه مشابه (چاهکهای ۱ تا ۷ باندهایی با اندازه‌های ۱۰۴، ۴۳۰ و ۵۲۱ جفت نوکلئوتید) را نشان دادند (که مبین یکسان بودن آنها است) (شکل ۵).

با توجه به متفاوت بودن باندهای مشاهده شده از نمونه چاهک شماره ۵ نمونه مذکور تعیین ترادف شود. سپس نتایج آن با

۱۹۷۶ و ۶ سال بعد برای بار دوم ۱۱ مورد گزارش گردید و تاکنون از ۹۰ کشور جهان گزارش شده است (۱۳).

اغلب اطلاعات که در مجلات پزشکی به چاپ رسیده حاکی از بروز اپیدمی‌ها و یا موارد انفرادی بوده است و بجز اپیدمی‌ها اغلب موارد در کشورهای مترقی شامل مواردی است که اشخاص بدلیل مشکل گوارشی به آزمایشگاهها ارجاع داده می‌شوند. برآورد آلودگی از ایالات متحده آمریکا نشانگر آلودگی در حدود ۲٪ از کل نمونه‌های مدفوع مورد آزمایش توسط مراقبین بهداشتی می‌باشد. از ۱۵ میلیون موردی که برای اسهال مورد آزمایش قرار گرفتند، حدود ۳۰۰/۰۰۰ مورد مشکوک به ابتلا به کریپتوسپوریدیوم می‌باشد (۱۴). در ایران نیز گزارشات متعددی از این تک‌یاخته به چاپ رسیده است که از این جمله می‌توان از مطالعات بررسی فراوانی کریپتوسپوریدیوم در انسان و دام در شهرستان سنندج نام برد (۱۵) و یا بررسی وجود و فراوانی کریپتوسپوریدیوم در بین کودکان اسهالی مراجعه‌کننده به بیمارستان حضرت علی‌اصغر شهر زاهدان را نام برد (۱۶). گروهی از محققین در سال ۱۳۷۸ در شهر اراک اقدام به بررسی کریپتوسپوریدیازیس در کودکان زیر ۵ سال در بیمارستان امیرکبیر با استفاده از روش زیل‌نلسون اصلاح شده نمودند. (۱۷). در شهر تهران نیز بررسی شیوع کریپتوسپوریدیوم در کودکان صفر تا ۵ سال مبتلا به اسهال بیمارستانهای این شهر با استفاده از روش زیل‌نلسون انجام گردید (۱۸). کریپتوسپوریدیوم در گاو برای اولین بار در سال ۱۹۷۱ گزارش شد. مراحل اندوژنوز آن در ژوئنوم گاو به واسطه گوساله ۸ ماهه‌ای که دچار اسهال شده بود، تعریف گردید (۱). مطالعات بعدی نشان داد که کریپتوسپوریدیوم پاروم در گوساله‌های جوان شیوع دارد و در گوساله‌های ۴ روزه نیز گزارش شده است (۱). در کشورهای فرانسه، کانادا، آمریکا و انگلستان گاوها و گوسفندهای بالای سن ۲۰ هفته، اوویست‌هایی را که تولید می‌کنند، اوویست کریپتوسپوریدیوم پاروم هستند (۲۰، ۱۹).

آلودگی انسان و گاو به این انگل و همزیستی نزدیک میان این دو موجب گردید تا محققین درصد برآیند تا با استفاده از روشهای مولکولی بتوانند در مرحله اول انگل را مستقیماً در نمونه تشخیص دهند و بعد مشخصات ژنتیکی هریک از این انگلها را تعیین نموده و سپس در یک فرایند تکمیلی قرابت میان این دو انگل را تعیین کنند. یکی از ژنهایی که محققین بدلیل داشتن کپی زیاد برای این مطالعه مناسب دانسته‌اند 18S rRNA است که بر روی آن در جهان مطالعات زیاد و در ایران نیز در سالهای اخیر مطالعات محدودی صورت گرفته

است. در سال ۱۹۹۹، روش Multiplex PCR برای تکثیر ژن 18S rRNA تکامل یافت. قطعات تکثیر شده DNA مخصوص *C.parvum*، *C.wrairi* (422bp)، *C.baileyi* (11106bp) و *C.muris* (1346bp) بودند. *C.parvum* و *C.wrairi* را می‌توان توسط یک PCR-RFLP با آنالیز ژن پروتئین دیواره خارجی اوویست کریپتوسپوریدیوم از یکدیگر تفکیک نمود (۲۱). در سال ۲۰۰۲، DNA ژنومی ایزوله *C.parvum* انسانی توسط 18S rRNA لوکوس DNA تایپ شده (*C.parvum* ژنوتیپ گاو، *C.parvum* ژنوتیپ انسانی، *C.melegrides* و *C.felis*) که برای تکثیر یک قطعه تشخیصی توسط لاکسر و همکاران تعریف شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. نمونه حاصل با استفاده از یک قطعه ۴۵۲bp تکثیر شد و آن را سکانس نمودند. سپس با همولوگ خودش یعنی با سکانس *C.wrairi*، موازی و هم‌محور نمودند و از روش RFLP که توانایی جداسازی انواع کریپتوسپوریدیوم و ژنوتیپ *C.parvum* را دارد، برای ارزیابی پلی‌مورفیسم استفاده کردند (۲۲).

گروه دیگری یک قطعه از ژن 18S rRNA را برای شناسایی انواع کریپتوسپوریدیوم در بیماران آلوده به HIV و افراد غیرآلوده از کنیا، مالزی، برزیل، انگلستان و ویتنام مورد استفاده قرار دادند. اولین شناسایی توسط تکنیک رنگ‌آمیزی اسید فاست صورت گرفت و تأیید آن توسط PCR-Nested صورت گرفت. ژنوتایپ آن توسط آنالیز برشی اندونوکلاز بر روی محصول PCR که توسط سکانس نوکلئوتیدی ادامه یافته بود، انجام گرفت. در میان ۶۳ ایزوله مورد بررسی، ۴ ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم شناسایی شد. ۵۷٪ ایزوله‌ها *C.parvum* انسانی بودند در حالیکه ۲۱/۷٪ گونه‌های حیوانی *C.parvum* با ژنوتیپ گاو بودند، یک ایزوله (۱/۶٪) از ایزوله‌ها از *C. melagrides* یا نوع بوقلمونی بوده و یک ایزوله (۱/۶٪) از نوع *C.muris* بود (۲۳).

از سوئی دیگر گروهی از دانشمندان توالی ۴۲۸bp از ژن 18S rRNA کریپتوسپوریدیوم پاروم ۱۰ ایزوله انسانی و ۹ ایزوله حیوانی را که توسط روش PCR تکثیر شده بود، مورد آنالیز قرار دادند و این نتایج به دست آمد: ۸ ایزوله از ۹ ایزوله حیوانی و ۳ ایزوله انسانی توالی شناسایی TATATTT را معرفی می‌کنند در حالیکه ۷ ایزوله از ۱۰ ایزوله انسانی توالی شناسایی TTTTTTTTTTTT را نشان می‌دهند (۱۸).

از جانب دیگر تحقیقات بیشتر در سال ۱۹۹۹ با سکانس کردن 18S rRNA در ۷ گونه مختلف از کریپتوسپوریدیوم اثبات کرد که حداقل ۴ گونه مشخص *C.parvum*، *C.baileyi*، *C.muris* و *C.serpentis* از این تک‌یاخته وجود دارد (۲۴).

تفکیک گونه‌های مورد نظر سود جست که با طول قطعه ما (۱۰۵۵) نوکلئوتید) متفاوت است. از آنجا که طول بلند قطعه می‌تواند به انتخاب اختصاصی تر گونه‌ها کمک کند، این قطعه تمایز ایزوله‌ها را دقیق‌تر نشان می‌دهد. ابتدا به *C. parvum* و *C. hominis* نیز مشابه تحقیقات فوق در این پژوهش به اثبات رسید.

در مجموع، در این پژوهش نشان داده شد قطعه ۱۰۵۵ نوکلئوتیدی از ژن 18S rRNA می‌تواند کاندید مناسبی برای تمایز ایزوله‌های کریپتوسپورییدیوم باشد. گونه غالب آلوده‌کننده نمونه‌های بدست آمده از انسان و گاو *C. parvum* می‌باشد. علاوه بر آن ایزوله‌های دیگری نیز تشخیص داده شد که انسان را آلوده کرده است. این ایزوله‌ها مشابه ایزوله *C. hominis* است ولی دارای تفاوت‌هایی از نظر ژنتیکی با سایر گونه‌های انسانی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقایان دکتر صدرائی مدیر گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و دکتر حقیقی مدیر گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و سرکار خانم کاشی کارشناس آزمایشگاه بیمارستان کودکان تشکر و قدردانی می‌گردد.

G.Windmer و همکاران آخرین آنالیز ژنتیکی *C. parvum* انسانی را که می‌تواند مبین ۲ گروه ژنتیکی مجزا باشد، معرفی کردند. یکی از این ژنوتایپ‌ها که ژنوتیپ C گفته می‌شود انسان و حیوان را آلوده می‌کند در حالی که ژنوتیپ دیگر که H نامیده می‌شود فقط در انسان یافت می‌شود. تفاوت آلوده‌سازی میان H&C در مدل‌های حیوانی مشاهده شد. این مشاهدات این فرضیه را مطرح کرد که *C. parvum* از راه‌های مختلف انتقال می‌یابد. نظریه دیگر این است که هر دو ژنوتیپ در میان گونه‌های مختلف میزبان در چرخش هستند و جمعیت‌های مختلف ژنوتیپی می‌توانند از آلودگی‌های مخلوط میزبان‌های مختلف ایجاد شوند (۲۵).

در ایران نیز محققین در سال ۲۰۰۷ با استفاده از 18SrRNA و *Laxer locus* موفق به متمایز نمودن ۳ ایزوله *C. hominis*، *C. parvum* و *C. meleagridis* از انسان شده و اثبات نمودند که *C. parvum* حیوانی گونه غالب در آلودگی‌های انسانی می‌باشد (۲۶). به نظر می‌رسد برای تعیین انواع دیگر گونه‌های آلوده‌کننده انسانی نیاز به جمع‌آوری نمونه‌های بیشتر از سایر شهرها و روستاها کشور می‌باشد.

با توجه به نظرات فوق ژن 18S rRNA کاندید مناسبی برای تمایز ایزوله‌های کریپتوسپورییدیوم است. در خصوص اندازه قطعه مورد نظر از ژن مذکور، تفاوت سلیقه وجود داشته بعنوان مثال لاکسر یک قطعه ۴۵۲ نوکلئوتیدی را برای تمایز انتخاب کرد ولی Fayer از یک قطعه ۴۲۲ نوکلئوتیدی برای

REFERENCES

1. Fayer R, editor. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. New York, CRC Press Inc. 1997;p:23-27.
2. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 2001;183:492-7.
3. Caccio S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E. A micro satellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 2000;120:237-44.
4. Bird RG, Smith MD. *Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology*. *J Pathol* 1980;132:217-33.
5. Tzipori S, Angus KW, Campbell I, Gray EW. *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. *Infect Immun* 1980;30:884-6.
6. Tzipori S, Angus KW, Campbell I, Gray EW. Experimental infection of lambs with *Cryptosporidium* isolated from a human patient with diarrhea. *Gut* 1982;23:71-4.
7. O'Donoghue PJ. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals*. *Int J Parasitol* 1995;25:139-95.
8. Rose JB. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Ann Rev Public Health* 1997; 18:135-61.
9. Smith HV, Rose JB. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol Today* 1998;14:14-22.
10. LeChevallier MW, Norton WD, Lee RG. *Giardia and Cryptosporidium sp. in filtered drinking water supplies*. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:2617-21.

11. U.S. Environmental Protection Agency. Method 1622: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA. Office of Research and Development, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C, 1997.
12. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small subunit ribosomal RNA gene locus. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:1578–83.
13. Ungar BLP. Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R, editors. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Florida, Boca Raton, CRC Press 1990;p:59–82.
14. Mead PS, Slutsker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; p:607–24.
۱۵. مبارکی ع. بررسی فراوانی کریپتوسپورییدیوز در انسان و دام در شهرستان سنندج. پایان نامه دکترا. دانشگاه شهید چمران اهواز، سال ۱۳۷۴.
۱۶. دبیرزاده م، بقایی م، بکائیان م، گودرزی مر. شیوع کریپتوسپورییدیوم در کودکان زیر پنج سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان تخصصی اطفال حضرت علی اصغر (ع) شهر زاهدان در طی سالهای ۷۷-۱۳۷۶. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان*، دوره ۵، شماره ۱۱: صفحات ۵۴ تا ۵۹.
۱۷. مسیبی م. بررسی شیوع کریپتوسپورییدیوسیزیس در کودکان زیر ۵ سال بیمارستان امیرکبیر اراک. *فصلنامه ره‌آورد دانش*، دوره ۱۳۸۰؛ شماره ۴. شماره ۱۴: صفحات ۳۰ تا ۳۶.
۱۸. خوش‌زبان ف. بررسی شیوع کریپتوسپورییدیوم در کودکان ۰-۵ سال مبتلا به اسهال در بیمارستانهای تهران. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه شاهد*، دوره ۱۳۷۷؛ شماره ۵، صفحات ۲۱ تا ۲۶.
19. Scott CA, Smith HV, Gibbs HA. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckle cows. *Vet Res* 1994;134:207-11.
20. Scott CA, Smith HV, Mtambo MMA, Gibbs HA. An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herd of adult beef cattle. *Vet Parasitol* 1995;57:277-81.
21. Fayer R, Morgan U, Upton JS. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000;30(8):850-65.
22. Guyot K, Follet-Dumoulin A, Recourt C, Lelievre E, Cailliez JC, Dei-Cas E. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair DNA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(4):2071-6.
23. Gatei W, Greensill J R. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1458–62.
24. Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA, Thompson RC. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J Parasitol* 1997;83(5):825-30.
25. Widmer G, Tchack L, Spano F, Tzipori S. A study of *Cryptosporidium parvum* genotypes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 1998; 93(5):685-86.
26. Meamar A, Guyot K, Certad G, Dei-Cas E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(3):1033–35.