

شناسایی کریپتوسپوریدیوم پارووم با روش PCR و تعیین الگوی پروتئینی و آنتی ژن‌های ایمونوژنیک آن

الهه ابراهیم زاده^۱ پرویز شایان^۱ صدیقه نبیان^۱ صادق رهبری^{۱*} محمد رضا مخبر دزفولی^۲

(۱) گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۹ دی ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۳ خرداد ماه ۱۳۸۷)

چکیده

کریپتوسپوریدیوم تک یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکسا است که در بسیاری از حیوانات و انسان موجب اسهال می‌شود. از آنجایی که این تک یاخته خسارات اقتصادی قابل توجهی به صنعت دامپروری ایران وارد می‌سازد، شناسایی مولکولی تک یاخته و تعیین الگوی پروتئینی و آنتی ژن‌های ایمونوژنیک آن هدف این مطالعه می‌باشد. در این مطالعه از مدفوع اسهالی گوساله مشکوک به کریپتوسپوریدیوز پس از تشخیص میکروسکوپی اوسیستهای کریپتوسپوریدیوم جداسازی و تخلیص شد. استخراج DNA از اوسیستها انجام پذیرفت و با پرایمرهای اختصاصی منشعب از ژن **ribosomal RNA 18S** کریپتوسپوریدیوم پارووم با روش **Semi-nested PCR** اختصاصی بودن اوسیستهای کریپتوسپوریدیوم پارووم تایید گردید. یک راس گوساله سرم منفی از نظر آنتی بادیهای ضد کریپتوسپوریدیوم با 610×5 اوسیست کریپتوسپوریدیوم تخلیص شده به طریق تجربی آلوده شد. ۵ روز بعد اوسیستها از مدفوع جمع‌آوری و تخلیص گردید. پس از جداسازی و تخلیص، تعیین الگوی پروتئینی با استفاده از روش **SDS-PAGE** انجام پذیرفت. باندهای پروتئینی اسپروروئیتها در محدوده‌ای بین ۱۰ تا ۱۰۰ کیلودالتون قرار گرفتند. ده باند قابل تشخیص در محدوده ۲۰ تا ۴۰ کیلودالتون قرار گرفت. در محدوده ۴۰ تا ۷۰ کیلودالتون شش باند قابل رویت بودند. شناسایی پروتئینهای ایمونوژنیک با روش وسترن بلات انجام پذیرفت. باندهای ایمونوژنیک در محدوده‌ای بین ۱۷ تا ۲۶۰ کیلودالتون مشاهده شد که وزن مولکولی نسبی سه باند آن در محدوده ۲۰ تا ۳۰ کیلودالتون، سه باند در محدوده ۳۰ تا ۴۰ کیلودالتون، سه باند در محدوده ۴۰ تا ۶۰ کیلودالتون، و دو باند در محدوده ۸۰ تا ۷۰ کیلودالتون و چهار باند سنگین به اندازه‌های ۱۳۰، ۱۷۰، ۲۱۶ و ۲۵۷ کیلودالتون بودند.

واژه‌های کلیدی: کریپتوسپوریدیوم پارووم، ایمونوبلات، **PCR**، **SDS-PAGE**، **Seminested-PCR**.

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم تک یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکسا است که لایه مسواکی سلولهای روده‌ای اکثر مهره داران را مورد تهاجم قرار می‌دهد. تا چندی پیش به عنوان یک انگل فرصت طلب غیر متداول مطرح بود ولی اکنون به عنوان یک آنتروپاتوژن در بیماریهای مشترک انسان و دام بویژه در مبتلایان به نقص ایمنی مورد توجه قرار گرفته است. بیش از نیمی از گوساله‌های تازه متولد شده از گاوهای گوشتی و شیری در معرض خطر آلودگی با کریپتوسپوریدیوم می‌باشند که در هفته اول آلودگی دچار اسهال شدید، از دست دادن آب بدن، کاهش رشد و بعضاً مرگ و میرمی گردند (۴). Nouri و همکاران در سال ۱۹۹۱ میزان فراوانی آلودگی در گوساله‌های اسهالی را ۸۲/۵ درصد و در گوساله‌های غیر اسهالی ۹ درصد اعلام نمودند. همچنین Rahbati و همکاران در سال ۱۹۹۳ میزان آلودگی در بره‌ها، بزغالها و افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی را به ترتیب ۳۱، ۳۴ و ۶۹ درصد گزارش نموده‌اند (۱۹). با توجه به عدم وجود درمان موثر و مقاومت اوسیستها به ضد عفونی کننده‌های متداول، این بیماری در گوساله‌ها یکی از مشکلات مهم گاو‌داریهای صنعتی می‌باشد. این امر ایجاب می‌نماید که از روشهای ایمن سازی و یا تجویز آنتی بادی‌های منوکلونال و یا پلی کلونال جهت پیشگیری و درمان استفاده شود. Fayer و همکاران در سال ۱۹۸۹ اثرات

آغوز هاپیر ایمنی گاو را در حفاظت نسبی علیه کریپتوسپوریدیوم در گوساله تازه متولد شده نشان دادند (۵). Reperant و همکاران در سال ۱۹۹۴ بر این باورند که آنتی ژنهای عمده ایمونوژنیک کریپتوسپوریدیوم در انسان و حیوان آنتی ژن‌هایی با وزن مولکولی ۱۵-۱۷ و ۲۳ کیلودالتون می‌باشند (۲۱). هدف از این مطالعه تشخیص و تعیین آنتی ژنهای ایمونوژنیک کریپتوسپوریدیوم پارووم جدایه ایران می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه و خالص سازی اوسیستهای انگل: تعداد ۱۲ نمونه مدفوع اسهالی گوساله از یک گاو‌داری صنعتی جمع‌آوری و در آزمایشگاه پس از تهیه گسترش با روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی گردید (۸). در صورت وجود آلودگی بیش از ۲۵ اوسیست در میدان میکروسکپ (بزرگنمایی $\times 40$) اقدام به جداسازی و خالص سازی اوسیستها با استفاده از روش Lorenzo و همکاران در سال ۱۹۹۳ از مدفوع شد (۱۰).

استخراج DNA از اوسیستهای کریپتوسپوریدیوم: استخراج DNA از اوسیستهای کریپتوسپوریدیوم با استفاده از کیت (MBST-Iran) بر اساس دستورالعمل سازنده انجام پذیرفت. پس از جداسازی و تخلیص جهت سترون شدن و کاستن سختی دیواره اوسیست، ابتدا اوسیستها (حدود ۱۰ میلیون اوسیست) را به مدت ۲ دقیقه در مجاورت اسی



جداسازی و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از اشعه UV باند های جدا شده فابل رویت گردیدند.

semi-nested PCR: جهت تعیین ساختار بیولوژی مولکولی کریپتوسپوریدیوم پارووم ابتدا محصول PCR از ژل آگارز پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV استخراج و تخلیص گردید. بدین منظور کیت استخراج و تخلیص DNA از ژل (MBST-Iran) استفاده گردید. سپس محصول PCR تخلیص شده با استفاده از پرایمر اختصاصی منشعب از ژن 18S ribosomal RNA جنس کریپتوسپوریدیوم گونه پارووم که از ترادفی محصور شده از دو پرایمر قبلی تشکیل شده است (جدول ۱)، مورد ارزیابی قرار گرفت. ترادف نوکلئوتیدی این پرایمر فقط در گونه پارووم موجود بوده و در گونه های دیگر این قسمت از ژن از ترادف نوکلئوتیدی دیگری تشکیل شده است. تکثیر مکرر DNA تحت شرایط ذکر شده با پرایمر های F2 و R1 انجام گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد و در بافر 0.5 x TBE الکتروفورز شده و بعد با استفاده از اتیدیوم بروماید و تحت اشعه UV مورد ارزیابی قرار گرفت.

آلوده سازی تجربی گوساله به کریپتوسپوریدیوم پاروم: پس از تشخیص و تایید کریپتوسپوریدیوم پارووم، به منظور دستیابی به تعداد زیادی از اووسیستها، یک راس گوساله تازه متولد شده هولشتاین از موسسه تحقیقاتی امین آباد انتخاب گردید. شرط اصلی انتخاب گوساله در این بررسی علاوه بر عاری بودن سرم آن از پادتن های ضد کریپتوسپوریدیوم، عاری بودن شیر و سرم مادر از پادتن نیز بود. بدین منظور کلیه سرما همراه با ده سرم مثبت موجود در گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی و سرم گوساله قبل و بعد از تلقیح با روش ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰). بنابراین گوساله انتخاب شده علاوه بر آنکه سرم آن عاری از پادتن های اختصاصی علیه کریپتوسپوریدیوم پاروم بود سرم و شیر مادرش نیز عاری از پادتن های اختصاصی بود.

گوساله مذکور از آغوز محروم و ۲۴ ساعت پس از تولد جهت تضعیف سیستم ایمنی ۰/۱mg/kg دگزامتازون تزریق گردید. چهل و هشت ساعت پس از تولد به گوساله تعداد 5×10^6 اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم خورانیده شد و ۶۰ ساعت پس از تولد نیز به همان میزان مجدداً دگزامتازون تزریق گردید. جهت پیشگیری از آلودگی های باکتریایی ۴۸ ساعت پس از تولد به گوساله میزان 10 mg/Kg انروفلوکساسین تزریق گردید. پنج روز بعد از آن با بروز اولین علائم اسهال، نمونه مدفوع جمع آوری و پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده، حضور اووسیستها در مدفوع تایید شد. از روز پنجم تا ۱۱ روز پس از آلودگی اقدام به جمع آوری مدفوع گردید. اووسیستها با استفاده از روش Lorenzo و همکاران در سال ۱۹۹۳ از مدفوع استخراج و تخلیص گردید (۱۰).

کنترل ژنتیکی اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم پارووم: از اووسیستهای تخلیص شده از گوساله آلوده شده به روش تجربی، طبق روشهای ذکر شده DNA استخراج شده و با پرایمرهای اختصاصی برای ژن

سی محلول سرد هیپوکلیت سدیم ۲۸ درصد تحت شرایط لرزش قرار داده و رسوب آن با اضافه کردن ۹ سی سی آب مقطر و سانتریفوژ نمودن، شستشو داده شد. عمل شستشو مجدداً تکرار گردید. سپس بر روی رسوب حاصل ۱۸۰ میکرولیتر بافر لیز کننده کیت اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه با قدرت ۷۰ درصد و توالی های ۵ ثانیه ای تحت شرایط برودت با دستگاه سونیکیتور با سیکل ۰/۵-۰/۴ و آپلیتود ۲۰-۳۰ درصد (GmbH, Germany), Dr. Hielscher) دیواره اووسیست شکسته شد. سپس به سلايه بدست آمده ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K اضافه نموده و به مدت یک ساعت تحت شرایط ۵۵ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. در خاتمه زمان هضم پروتئین به این محلول ۳۴۰ میکرولیتر محلول پیوندی داده و مجدداً تحت شرایط ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری گردید. سپس با اضافه کردن ۲۷۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد و مخلوط کردن به کمک ورتکس محلول حاصله به داخل ستون های مخصوص کیت که قبل از روی میکرو تیوب استریل قرار داده شده بود، انتقال داده شد و به مدت ۱ دقیقه و ۸۰۰۰g سانتریفوژ گردید. در این مرحله DNA استخراج شده به غشاء داخل ستون به طور اختصاصی متصل می گردد. پس از دو بار شستشو با بافر شستشو دهنده در خاتمه برای جداسازی DNA از غشاء میزان ۵۰ میکرولیتر بافر حلال اضافه شده و پس از قرار دادن ستون بر روی میکرو تیوب استریل به مدت ۱ دقیقه و ۸۰۰۰g سانتریفوژ شد.

PCR: جهت تعیین ساختار مولکولی کریپتوسپوریدیوم از نمونه های جمع آوری شده، از روش تکثیر مکرر DNA استفاده گردید. بدین منظور پرایمرهای اختصاصی منشعب از ژن 18S ribosomal RNA جنس کریپتوسپوریدیوم طراحی گردید (جدول ۱). به میزان ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ از DNA استخراج شده جهت تکثیر استفاده گردید. به هر یک از رقت های DNA میزان ۱۰ میکرولیتر 10 x PCR buffer، ۲ میکرولیتر (each) 10 mM dNTP، ۳ میکرولیتر 50 mM Mgcl2، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (Forward 20 μM و Reverse 20 μM)، ۰/۰۵ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمرز (5U μl) و آب دو بار تقطیر شده استریل به اندازه ای که حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر باشد، اضافه شده و در دستگاه ترموسیکلر (MWG, Germany) با برنامه زیر تکثیر مکرر DNA انجام پذیرفت. این برنامه به شرح ذیل می باشد:

(۱) ۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتیگراد (Denaruration) (۲) مرحله دوم که شامل ۳۵ چرخه است ابتدا ۴۵ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد (Denaruration) اعمال می گردد، سپس ۴۵ ثانیه دمای ۵۸ درجه سانتیگراد جهت اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در الگو (annealing) اعمال گشت و در نهایت آخرین مرحله هر چرخه ۴۵ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد که مرحله طویل شدن آغاز گرهاست بود. (۳) پس از اتمام ۳۵ چرخه ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال شد که زمان طویل شدن نهایی است.

سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از تانک الکتروفورز (Mini-SubCell GT) Biorad و بافر 0.5M EDTA 40ml، 0.5xTBE (10XTBE Buffer= Tris base 108gr, Boric acid 55gr



گردیدند. در ادامه هر یک از صفحات با TBS-T پنج بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو گردید. سپس صفحات نیتروسولوز در مجاورت با bovine-Ig anti (DAKO, Denmark) که به آن آنزیم پراکسیداز کونژوگه شده بود، به مدت ۱ ساعت قرار داده شده و در ادامه صفحات نیتروسولوز ۵ بار هر بار ۵ دقیقه در بافر TBS-T شستشو گردیدند. در پایان آنتی ژنهای ایمونوژن کریپتوسپوریدیوم پارووم با سوبسترا (DAB (20µlH₂O₂ + 20mlTBS in 0.006grDAB) مشخص گردیدند (۲۱).

نتایج

جداسازی اووسیت کریپتوسپوریدیوم و تعیین جنس گونه پاروم بالغ بر ۲۰۰ میلیون اووسیت از مدفوع گوساله آلوده شده به روش تجربی در طول شش روز متوالی جمع آوری و طبق روش Lorenzo و همکاران جداسازی و تخلیص و تحت برودت ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. برای تایید مولکولی کریپتوسپوریدیوم ابتدا DNA استخراج شده روی ژل ۱/۵ درصد به میزان ۱۰ میکرولیتر الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV بررسی شد هیچگونه بانندی مشاهده نشد. جهت تعیین جنس کریپتوسپوریدیوم از روش تکثیر مکرر DNA (PCR) استفاده شد. ابتدا با استفاده از دو پرایمر اختصاصی Forward و Reverse که از روی ژن 18srRNA طراحی شده بودند تکثیر داده شد. توالی نوکلئوتیدی این دو پرایمر در کریپتوسپوریدیوم پاروم (Accession no. AF093496) و کانیس (Accession no. AF093489)، فلیس (Accession no. AF112575)، مله (Accession no. AF093495) و بیله ای (Accession no. AF112574) مشترک بودند. در واکنش زنجیره ای DNA با دو پرایمر مذکور محصولی به اندازه ۴۱۲ جفت باز به دست آمد که از لحاظ اندازه با تعداد نوکلئوتیدهای متشکله از توالی پرایمرها و قطعه مابین آنها برابری داشت. آنالیز محصول واکنش تکثیر زنجیره ای DNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از اتیدیوم بروماید و تحت اشعه UV انجام گرفت (تصویر ۱-الف - شماره ۱).

برای تعیین گونه کریپتوسپوریدیوم پاروم، ابتدا پرایمری از قسمت متفاوت با بقیه گونه های کریپتوسپوریدیوم طراحی گردید که به صورت اختصاصی در ژن 18srRNA کریپتوسپوریدیوم پاروم موجود بود (2 Primer Forward). در ادامه قطعه ژل حاوی محصول PCR 412 جفت بازی پس از جداسازی بر روی ژل آگارز بریده شده و محصول PCR از طریق کیت استخراج DNA از ژل آگارز (MBST) استخراج و تخلیص گردید سپس یک میکرولیتر آن در واکنش تکثیر زنجیره ای DNA با پرایمر اختصاصی کریپتوسپوریدیوم پاروم (2 Primer Forward) و پرایمر مشترک Reverse آنالیز شد. نتیجه این واکنش محصولی از DNA بود که قبلا اندازه آن از ژن 18srRNA کریپتوسپوریدیوم پاروم به دست آمده و از 354 جفت باز تشکیل می شد (تصویر ۱-الف - شماره ۲). به این طریق اووسیت های جداییه ایران با انجام آزمایشات مذکور تشخیص داده شد.

8 S rRNA کریپتوسپوریدیوم پارووم مورد ارزیابی قرار گرفت.

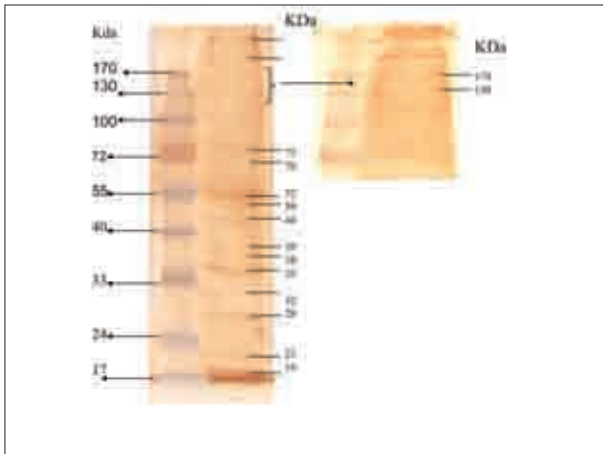
تهیه آنتی ژن کریپتوسپوریدیوم پارووم: ابتدا بر روی رسوب اووسیتها PBS حاوی ۱ میلی مولار Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) به عنوان ماده مهارکننده فعالیت پروتئاز اضافه گردید. با استفاده از عمل ورتکس همراه ساچمه شیشه ای استریل به مدت نیم ساعت و سونیکیتور با سیکل ۰/۵-۰/۴ و آمپلیتود ۲۰-۳۰ درصد (GmbH, Germany), در مجاورت یخ و سپس عمل انجماد - ذوب (پنج الی شش بار در نیتروژن مایع) اقدام به خرد نمودن جداره اووسیتها شد. به منظور جدا سازی آنتی ژن، محلول هموژنیزه شده ابتدا با دور ۱۲۰۰۰ در ثانیه به مدت 15 دقیقه تحت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید و مایع رویین به عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرار گرفت. سپس غلظت پروتئین به روش Bradford در سال ۱۹۷۶ تعیین گردید (۱۰).

تعیین الگوی پروتئینی و شناسایی پروتئینهای ایمونوژنیک کریپتوسپوریدیوم پارووم: تعیین الگوی پروتئینی با استفاده از روش SDS-PAGE و شناسایی پروتئینهای ایمونوژنیک با روش وسترن بلات بر اساس روش Reperant و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام پذیرفت (۲۱).

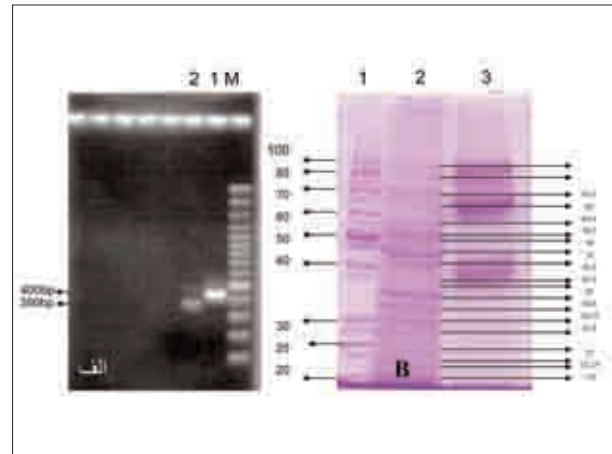
جداسازی آنتی ژن های تهیه شده از اووسیت های کریپتوسپوریدیوم پاروم بر اساس وزن مولکولی بر روی ژل پلی آکرلامید ۱۲/۵ درصد صورت گرفت. پس از اضافه کردن بافر نمونه (Bromophenol blue 25mg, uffer=Tris 3/75, SDS 10gr, Mercapthoethanol 25ml, Glycerol 35ml 5X Sample) به نسبت (V/V) ۱:۴ به ۱۷ میکروگرم آنتی ژن و قرار دادن آن به مدت ۵ دقیقه تحت شرایط دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد، نمونه ها جهت جداسازی الکتروفورز گردیدند. جهت تعیین الگوی پروتئینی کریپتوسپوریدیوم پارووم در تمام آزمایشات از مارکر معمولی (SMO661, Fermentas) و برای تعیین الگوی پروتئین های ایمونوژنیک از مارکر قبلارنگ شده (SMO671, Fermentas) استفاده گردید. در خاتمه الکتروفورز، ژل با کوماسی بلورنگ آمیزی شده و نتایج آن با مارکر مقایسه گردید.

به منظور تعیین الگوی ایمونوژنیک آنتی ژن های کریپتوسپوریدیوم پارووم پس از جداسازی آنتی ژن ها بر روی ژل آکرلامید ۱۲/۵ درصد، آنتی ژن ها مستقیما از ژل به غشاء نیتروسولوز (Porablot, NCP, Germany) انتقال داده شدند. بدین منظور از دستگاه انتقال مولکولی (BioRad) استفاده و عمل انتقال در بافر انتقال (Glycine 14/4gr, Methanol 400ml, Tris base 3/03gr) به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. جهت اشباع کردن محل های پیوندی به پروتئین ها نوار نیتروسولوز به مدت یک ساعت با محلول ۲ درصد Skim milk مجاور گردید. سپس پنج بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در بافر (Tris base 20mM 2/42gr/lit, NaCl 0.15mM 8/76gr/lit, Tween 0.5ml) TBS-T شستشو انجام شد. با توجه به اینکه نمونه ها بصورت دو تکرار در ژل جداسازی شده بودند، صفحه نیتروسولوز به دو قسمت تقسیم، یک قسمت با سرم مثبت بارقت ۱/۱۵ و دیگری با سرم منفی بارقت ۱/۱۵ مجاور





تصویر ۲-



تصویر ۱-

تولد می‌تواند به عنوان یکی از عوامل اصلی مشارکت‌کننده و یا زمینه ساز سندرم اسهال واقع گردد. این امر در صنعت پرورش گاو شیری واجد اهمیت خاصی می‌باشد و سالانه خسارات هنگفتی را به این صنعت وارد می‌سازد (۱۷). تجربیات محققان حاکی از آن است که هیچ یک از ترکیبات ضد کوکسیدیا و یا آنتی بیوتی‌های وسیع الطیف نمی‌تواند بر مراحل رشد انگل تاثیر بگذارد (۱). در سالهای اخیر عمده بررسی‌ها به منظور کنترل و پیشگیری این انگل معطوف به ایمن سازی و یا تجویز آنتی بادیه‌های منوکلونال جهت ایمنی پسیو گشته است (۱۷، ۲۴). بررسی حاضر می‌تواند به عنوان پایه تحقیقات بیولوژی مولکولی در کاربرد ایمن سازی گوساله‌ها تلقی گردد. ابتدا اووسیت‌های کریپتوسپوریدیوم از مدفوع گوساله مبتلا به اسهال در یک گاوداری صنعتی واقع در حومه تهران جداسازی گردید. به منظور شناسایی آن پس از رنگ آمیزی با ذیل نیلسون اصلاح شده به عنوان جدایه تهران مورد بررسی بیولوژی مولکولی قرار گرفت. نتایج آنالیز DNA استخراج شده، از طریق پرایمر اختصاصی مشتق از ژن 18S rRNA در کریپتوسپوریدیوم و همچنین پرایمر اختصاصی برای گونه پارووم از همین ژن به طریق semi-nested PCR جدایه مذکور را به عنوان کریپتوسپوریدیوم پارووم مورد تایید قرارداد. همین جدایه از طریق داخل دهانی به گوساله یک روزه آغوز نخورده به منظور تکثیر، تلقیح شد و در دوران عفونت ضمن جمع آوری اووسیت خون‌گیری به منظور بررسی‌های سرمی نیز انجام پذیرفت. شیر مادر گوساله همراه با ده سرم مثبت موجود در گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی و سرم گوساله قبل و بعد از تلقیح با روش ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شیر مادر گوساله و سرم گوساله قبل از تلقیح منفی و سایر سرم‌ها مثبت می‌باشند. پروتئین‌های تخلیص شده از اووسیت‌های جدایه تهران از کشت دوم بر روی ژل آکرول آمید ۱۰ و ۱۲/۵ در صد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بررسی Lumb و همکاران در سال ۱۹۸۸ از جدایه اووسیت‌های نشاندار شده با یدرادیواکتیو حاکی از آن است که ۶ باند پروتئینی به اندازه‌های ۱۵.۵ تا ۹۶ کیلو دالتون در تمام آیزولت‌ها همواره موجود می‌باشد (۱۲) در حالی که Tilley و همکاران در سال ۱۹۹۰ نشان دادند

نتایج SDS-PAGE: پروتئین‌های محلول روی ژل ۱۲/۵ درصد بر اساس وزن مولکولی جدا گردید. رنگ آمیزی ژل اکریل آمید یا کوماسی بلو و مقایسه باندهای حاصل با باندهای مارکر پس از رسم منحنی لگاریتمی و محاسبه وزن مولکولی باندهای آن نسبت به مارکر نشان داد باندهای آنتی ژنهای اووسیت‌ها در محدوده‌ای بین ۲۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون قرار دارند (تصویر ۱- ب). محدوده ۲۰ تا ۴۰ کیلو دالتون تشکیل شده بود از ۱۰ باند قابل تشخیص با وزنه‌های مولکولی تقریبی: ۲۰، ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۵، ۳۷، ۳۹ کیلو دالتون. در محدوده ۴۰ تا ۷۰ کیلو دالتون ۶ باند با وزن مولکولی تقریبی ۴۲، ۴۵، ۵۱، ۵۳، ۵۸ و ۶۶ کیلو دالتون قابل رویت بودند و به علت ظرفیت پایین جداسازی ژل اکریل آمید ۱۲/۵ درصد، باندهای بالاتر از ۷۰ کیلو دالتون موجود اما برای آنالیز نسبی از کیفیت خوبی برخوردار نبودند و فقط باندهایی با وزن مولکولی ۷۰، ۸۶ و ۱۰۰ کیلو دالتون قابل محاسبه بودند. همچنین جداسازی آنتی ژن‌ها بر روی ژل اکریل آمید ۱۰ درصد نیز نتایج قابل مقایسه با ژل ۱۲/۵ درصد داشت.

نتایج وسترن بلات: پس از انتقال باندهای ورقه نیتروسلولوز و مجاورت آن با سرم مثبت و انجام مراحل که در روش کار ذکر شد باندهای ایمونوژنیک آشکار گشت. مقایسه باندها با مارکر نشان داد، باندهای ایمونوژنیک در محدوده‌ای بین ۱۷ تا ۲۶ کیلو دالتون قرار دارد. که وزن مولکولی نسبی ۳ باند آن در محدوده ۲۰ تا ۳۰ کیلو دالتون (۱۹، ۲۳ و ۲۹ کیلو دالتون)، ۳ باند در محدوده ۳۰ تا ۴۰ کیلو دالتون (۳۲، ۳۵ و ۳۸ کیلو دالتون)، ۳ باند در محدوده ۴۰ تا ۶۰ کیلو دالتون (۴۴، ۵۳ و ۵۵ کیلو دالتون)، ۲ باند در محدوده ۸۰-۷۰ کیلو دالتون (۷۰ و ۷۵ کیلو دالتون) و ۴ باند به بزرگی ۱۳۰، ۱۷۰، ۲۱۶ و ۲۵۷ کیلو دالتون بودند (تصویر ۲).

بحث

کریپتوسپوریدیوم پارووم، تک یاخته کوکسیدیایی داخل سلولی خارج سیتوپلاسمی مخاط سلول‌های اپیتلیال روده باریک پستانداران می‌باشد. مشاهدات محققان نشان می‌دهد که این تک یاخته در سنین اولیه پس از



جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR و Semi-Nested PCR.

شماره پرایمر	Accession No.	نام ژن	ترادف نوکلئوتیدها	دمای ذوب
F1	AF112573, AF093495, AF112574, AF112575, AF093496, AF093489, Canis	18 S rRNA genes	Crypt-rRNA-Sense 5' aagctcgtagttggattctg 3'	۶۰
R1	AF093489	18 S rRNA gene	Crypt-rRNA-Antisense 5' taaggaacaacctccaatctc 3'	۶۰
F2	AF112573, AF093495, AF112574, AF112575, AF093496, AF093489, Canis	18 S rRNA genes	Crypt-rRNA-Sense 2.5' catattactatttttttag 3'	۵۲

با داشتن ساختار مشترک کربوهیدراتی با پادگن های دیگر که وزن مولکولی متفاوت دارند واکنش همسان ایمنوژنیک داشته باشند. در برخی مطالعات آنتی بادی سرم گاوهای آلوده در وسترن بلات آنتی ژنهایی با وزن مولکولی ۱۱ تا ۱۷، ۱۴ تا ۲۰، ۲۰ تا ۳۸، ۳۸، ۴۴، ۴۷ تا ۵۵، ۶۹ تا ۹۰، ۱۴۰ و ۲۰۰ کیلودالتون را شناسایی کردند (۱۲، ۱۶، ۱۷، ۳۱). برخی از خانواده های این پروتئین ها (۴۰-۷۰، ۱۹-۴۰ و بالاتر از ۷۰ کیلودالتون) در مطالعه حاضر نیز به عنوان آنتی ژنهای ایمنوژنیک شناسایی شدند.

جالب توجه اینکه نشان داده شده است ایمنوگلوبولین آغوزهای پرایمر ایمنون گاو علیه کریپتوسپوریدیوم پاروم می تواند علائم بالینی کریپتوسپوریدیوز را در انسان بهبود بخشد (۶، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۹، ۳۰). تجربیات انجام یافته با این انگل بر روی مدل های حیوانی حاکی از آن است که ایمنوگلوبولین موجب نوترالیزاسیون عفونت اسپروژوئیت می گردد. همچنین مشاهدات نشان داده است که این آنتی بادی ها در برون بدن موجب ممانعت از آلوده سازی سلول میزبان با اسپروژوئیت می شود (۳، ۲۱، ۲۲، ۲۷). اگرچه تاکنون به طور دقیق آنتی ژنهای خنثی کننده این انگل مشخص نشده است ولیکن چندین مولکول انتخابی تعیین و معرفی گردیده اند (۲، ۹، ۲۱، ۲۲، ۲۷). اکثریت پروتئین ها و گلیکو پروتئین ها مربوط به این آنتی ژن ها بر روی سطح اسپروژوئیت و یا اندامک های ترشحی بخش کمپلکس راسی قرار دارند. البته برخی از این آنتی ژن ها در هنگام حرکت اسپروژوئیت جهت ورود به سلول اپیتلیال ترشح می گردند. تاکنون به طور دقیق بیست پروتئین به وزن مولکولی نسبی ۱۱ تا ۹۰۰ کیلودالتون از کریپتوسپوریدیوم پاروم معرفی شده اند که برخی از اینها که بر روی پلاسما مال اسپروژوئیت قرار گرفتند از طریق ایمنوگلوبولین آغوزهای پرایمر ایمنون شناسایی می گردند. این مولکولها می توانند انتخاب مناسبی برای آنتی ژنهای خنثی کننده باشند (۳، ۲۱، ۲۶). تجربیات میکروسکوپ فلورسانس با برخی از آنتی بادهای مونوکلونال یا پلی کلونال توانسته است هفت پروتئین سطحی اسپروژوئیت و مروژوئیت را با وزن مولکولی نسبی ۱۵ تا بیش از ۱۲۰۰ کیلودالتون شناسایی نماید (۷، ۲۶، ۲۸) که اکثریت این آنتی ژن ها گلیکو پروتئین بوده که بخش کربوهیدرات مولکول یا از طریق N-linkage و یا O-linkage به اسیدهای آمینه مربوطه (asparagine, serin/threonine) پیوند برقرار می کنند. بعضی از این پروتئین ها، پروتئین های ۱۵ تا ۱۷، ۲۳ تا ۲۷ و ۹۰ کیلودالتون می باشند. که اکثر این پروتئینها در سطح غشاء و یا محتوای سیتوپلاسم اسپروژوئیت وجود دارند. پروتئینهای ۱۷-۱۵ و ۲۷-۲۳ کیلودالتون توسط ایمنوگلوبولین انسانی و حیوانی به خوبی شناسایی می گردند (۱۳، ۱۴، ۱۸، ۲۰) و باور عمومی بر این است که تیترا بالای این آنتی بادی ها مرتبط با مضمونیت از شکل بالینی بیماری است.

به نظر می رسد که پروتئینهای با وزن مولکولی پایین در محدوده ۱۹ تا ۳۸ کیلودالتون و پروتئین های سنگین تر از ۷۰ کیلودالتون که از بیان بالایی برخوردار نبوده اما از لحاظ ترغیب ایمنوژنیک بسیار موثر بوده اند، می توانند به عنوان کاندیداهایی برای تحریک کافی سیستم ایمنی جهت مبارزه با

که ۱۸ باند پروتئینی به اندازه های ۱۸ تا ۲۹۰ کیلودالتون از جدایه های اوو سیست های کریپتوسپوریدیوم پارووم قابل شناسایی بودند که باندهای پروتئینی ۱۶، ۳۲، ۵۷، ۶۲، ۶۷-۶۹، ۸۶، ۱۴۸-۱۴۵ در جدایه با بیان بیشتری از باندهای دیگر ارائه شده بودند (۲۶). در بررسی حاضر در محدوده ۲۰ تا ۷۰ کیلودالتون ۱۶ باند متمایز با وزن مولکولی ۲۰، ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۵، ۳۷، ۳۹، ۴۲، ۴۵، ۵۱، ۵۳، ۵۸، ۶۶ کیلودالتون قابل تفکیک می باشند. باندهای موجود در محدوده بالاتر از ۷۰ کیلودالتون بر روی ژل آکریل آمید ۱۰ و ۱۲/۵ درصد از تعداد کمتری برخوردار و وزن های مولکولی ۷۰، ۸۶ و ۱۰۰ کیلودالتون داشتند. در وسترن بلات باندهای آنتی ژنی ایمنوژنیک در محدوده ۱۷ تا ۴۰ کیلودالتون ۶ باند قابل شناسایی بوده که از آنها هر ۶ باند بطور تقریبی بر روی ژل آکریل آمید قابل رویت بودند. ۴ باند مخصوصا باندهای با وزن مولکولی ۲۲، ۲۵، ۳۰ کیلودالتون در این محدوده به عنوان آنتی ژن های غیر ایمنوژنیک قابل شناسایی بودند.

در محدوده ۴۰ تا ۶۰ کیلودالتون فقط ۳ باند به عنوان آنتی ژن های ایمنوژنیک شناسایی شده که با توجه به غیر حساس بودن محاسبه لگاریتمی این باندها در SDS-PAGE نیز موجود بودند. در محدوده ۷۰ تا ۸۰ کیلودالتون دو باند با وزن مولکولی ۷۰ و ۷۵ کیلودالتون با سرم مثبت واکنش نشان داده که بنظر می رسد که یکی از آنها (۷۰ کیلودالتون) احتمالا همان باند ۷۰ کیلودالتون در SDS-PAGE بوده و باند ۷۵ کیلودالتون بر روی SDS-PAGE قابل محاسبه نبود. باندهای ایمنوژنیک با وزن مولکولی ۱۳۰، ۱۷۰، ۲۱۶ و ۲۵۷ بر روی SDS-PAGE قابل شناسایی نبودند. به نظر می رسد که این آنتی ژن ها در اوو سیست کریپتوسپوریدیوم پارووم از بیان کمتری برخوردار بوده اما قابلیت ایمنوژنیک بالایی را به خود اختصاص می دهند. از آنجایی که بسیاری از پروتئین های دیواره اسپروژوئیتها و مروژوئیتها دارای قسمت های کربوهیدراتی بوده، می توان چنین تصور نمود که قندهای تشکیل دهنده بخش کربوهیدراتی این گلیکو پروتئین ها ساختار اپیتوپهای آنتی ژنیک این آنتی ژن ها را تشکیل می دهند (۲۵). در این صورت این مولکول ها می توانند



References

- Arrowood, M. J., Mead, J.R., Mahrt, J.L., Sterling, C. R. (1989) Effects of immune colostrum and orally administered antisporezoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. *Infect. Immun.* 57: 2283-2288.
- Barnes, D.A., Bonnin, A., Huang, J.X., Gousset, L., Wu, J., Gut, J., Doyle, P., Dubremetz, J.F., Ward, H., Peterson, C. (1998) Anovel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. *Mol. Biochem. parasitol.* 96: 93-110.
- Doyle, P.S., Crabb, J., Petersen, C. (1993) Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 61: 4079-4084.
- Fayer, R. (1997) *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC press. NewYork. USA. pp. 235-255.
- Fayer, R., Andrews, C., Ungar, BLP., Blagburn, B. (1989) Efficacy of hyper immune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *J. parasitol.* 75: 393-397.
- Greenberg, P.D., Koch, J., Cello, JP. (1996) Diagnosis of *Cryptosporidium parvum* in patients with severe diarrhea and Aids. *Dig. Dis. Sci.* 41: 2286-2290.
- Gut, J., Nelson, R.G. (1994) *Cryptosporidium parvum* sporozoites deposit trails of 11A5 antigen during gliding locomotion and shed 11A5 antigen during invasion of MDCK cells invitro. *J. Eukaryot. Microbial.* 41: 42s-43s.
- Henriksen, SV.Aa., Poglensz, JF. (1981) Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl Nelson technique. *Acta. Vet. Scand.* 22: 594-596.
- Jenkins, M.C. O., Brien, C., Trout, J., Guidry, A., Fayer, R. (1999) Hyperimmune bovine colostrums specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. *Vaccine.* 17: 2453-2460.
- Lorenzo, M. J., Ares-Mazas, E., Villacorta Martinez de Maturana, I. (1993) Detection of Oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Vet. Parasitol.* 47: 9-15.
- Lorenzo, MJ., Ben, B., Mendez, F., Villacorta, I., Ares -Mazas, M E. (1995) *Cryptosporidium parvum* oocyst antigens recognized by sera from infected asymptomatic adult Cattle. *Vet. Parasitol.* 60: 17.
- Lumb, R., Lanser, JA., ODonoghue, PJ. (1988) Electrophoretic and immunoblot analysis of cryptosporidium oocytes. *Immunol. Cell Biol.* 66: 369-384.
- McLauchlin, J., Casemore, DP., Moran, S., Patel, S. (1998) The epidemiology of Cryptosporidiosis: application of experimental sub-typing and antibody detection systems to the investigation of water -borne outbreaks. *Folia parasitol. (praha)* 45: 83-92.
- Mead, JR., Arrowood, MJ., Sterling, CR. (1998) Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. *J. Parasitol.* 74: 135-143.
- Mosier, DA., Kuhls, TL., Simons, KR., Oberst, RD. (1992) Bovine Humoral immune response to *Cryptosporidium parvum*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3277.
- Peeters, JE., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vanderghenst, D., Naciri, M., Ares-Mazas, E., YYvore, P. (1992) *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific

کریپتوسپورییدیوم پاروم مورد استفاده قرار گیرند. در تایید نتایج فوق و بر اساس نظریه Fayer در سال ۱۹۹۷ مولکولهای سطحی مهم اسپروزوئیت و مرزونیتهها با وزن مولکولی ۱۱ تا ۲۳ کیلودالتون که ظاهر بسیار متفاوت در وسترن بلات دارند، یکی از ایمنوزن ترین آنتی ژنهای کریپتوسپورییدیوم پاروم است و این پروتئینها غالباً ضعیف ترین باند را در ایمنوبلات آشکار می سازند (۳).

تشکر و قدردانی

این طرح با اعتبارات صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران انجام پذیرفته است. نگارندگان بدینوسیله مراتب امتنان و تشکر خود را اعلام می دارند. همچنین مساعدت آقای دکتر گرجی دوز در تهیه نمونه های مزرعه ای موجب تشکر و قدردانی است.



- serum and local antibody responses (immunoglobulin A(IgA), IgG and IgM) after natural and experimental infections. *Infect. Immun.* 60: 2309.
17. Perryman, LE., Kapil, SJ., Jones, ML., Hunt, EL. (1999) Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrums induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine.* 17: 2142-49.
 18. Priest, JW., Kwon, JP., Moss, DM., Roberts, JM., Arrowood, MJ., Dworkin, MS., Juranek, DD., Lammie, PJ. (1999) Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1385-1392.
 19. Rahbari, S., Djamshidi, Sh., Keivani, H. (1993) Study on cryptosporidiosis in animal and human. *J. Vet. Med. Univ. Tehran.* 48: 39-47.
 20. Rahbari, S., Nabian, S., Azizi, HR., Rezazade, A., Mokhber-Dezfouli, MR. (2005) Detection of IgG Antibodies to *Cryptosporidium parvum* using *Eimeria tenella* and *Cryptosporidium parvum* Antigens. *J. Appl. Anim. Res.* 28: 141-143.
 21. Reperant, JM., Naciri, M., Iochmann, S., Tilley, M., Bout, DT. (1994) Major antigens of *Cryptosporidium parvum* recognized by serum antibodies from different infected animal species and man. *Vet. Parasitol.* 55: 1-13.
 22. Riggs, MW., McGurire, TC., Mason, PH., Perryman, LE. (1989) Neutralization-sensitive epitopes are exposed on the surface of infectious *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *J. Immunol.* 143: 1340-1345.
 23. Rump, JA., Arndt, R., Arnold, A., Bendick, C., Dichtelmuller, H., Franke, M., Helm, EB., Jager, H., Kampmann, B., Kolb, P., Kreuz, W. (1992) Treatment of diarrhea in human immunodeficiency virus -infected patients with immunoglobulins from bovine colostrums. *Clin. Investig.* 70: 588-594.
 24. Shield, JC., Melville, C., Novelli, V., Anderson, G., Scheimberg, I., Gibb, D., Milla, P. (1993) Bovine colostrum immunoglobulin concentrate for cryptosporidiosis in Aids. *Arch. Dis. Child.* 69: 451-453.
 25. Strong, WB., Gut, J., Nelson, RG. (2000) Cloning and sequence Analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* Gene Encoding a 60-kilodalton Glycoprotein and Characterization of Its 15-and 45-kilodalton Zoite surface Antigen products. *Infect. Immun.* 68: 4117-4134.
 26. Tilley, M., Upton, SJ., Blagburn, BL., Anderson, BC. (1990) Identification of Outer Oocyst wall proteins of three *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) species by surface labeling. *Infect. Immun.* 58: 252-253.
 27. Tilley, M., Upton, SJ. (1991) sporozoite and merozoites of *Cryptosporidium parvum* share a common epitope recognized by a monoclonal antibody and two-dimensional electrophoresis. *J. Protozool.* 38: 48s-49s.
 28. Tilley, M., Upton, SJ., Fayer, R., Barta, JR., Chrisp, CE., Freed, PS., Blagburn, BL., Anderson, C., Barnard, SM. (1991) Identification of a 15-kilodalton surface glycoprotein on sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 59: 1002-1007.
 29. Tilley, M., Eggleston, MT., Upton, SJ. (1994) Multiple oral inoculation with *Cryptosporidium parvum* as a means of immunization for production of monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* 113: 235-240.
 30. Tzipori, S., Robertson, D., Chapman, C. (1986) Remission of diarrhea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. *Br. Med. J.* 293: 1276-1277.
 31. Ungar, BL., Ward, DJ., Fayer, R., Quinn, CA. (1990) Cessation of *Cryptosporidium* associated diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient after treatment with hyperimmune bovine colostrum. *Gastroenterol.* 98: 486-489.



IDENTIFICATION OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* BY PCR AND ITS DETERMINATION OF PROTEIN PATTERN AND IMMUNOGENIC ANTIGENS

Ebrahimzade, E.¹, Shayan, P.¹, Nabian, S.¹, Rahbari, S.^{1*}, Mokhber dezfouli, M.R.²

¹Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

²Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 30 December 2007 , Accepted 12 June 2008)

Abstract:

Cryptosporidium parvum is an apicomplexan protozoan parasite which causes diarrhea in both human and wide range of animals. Since this protozoa causes remarkable economic losses in cattke industry in Iran, the molecular determination of porotozoa and characterization of its protein pattern and immunogenic antigend are the aim of this study. In this study, diarrheatic fecal samples of calves suspected for cryptosporidiosis were collected and identified. Purification and concentration of cryptosporidial oocysts from fecal samples was performed. Oocysts were confirmed as *Cryptosporidium parvum* by semi-nested PCR using specific primers designed from 18srRNA gene of *Cryptosporidium parvum*. A calf with negative antibodies against *Cryptosporidium parvunm* was infected with 5×10^6 oocysts. 5 days after inoculation, oocysts were isolated and purified . Soluble proteins from sporozoites were prepared and analyzed by SDS-PAGE and western blotting. There was an intense recognition of some 10 to 100 kDa, ten low molecular weight proteins were recognized between 20-40 kDa, six separated protein bands was recognized between 40-70 kDa, immunoreactive proteins were present at different molecular weights between 17-260 kDa. Three antigens of apparent molecular weights 20-30 kDa, three antigen bands between 40-60 kDa and 2 bands 70-75 kDa were identified. Antibody responses to cryptosporidial antigens at high molecular weights were successfully diagnosed with apparent molecular weights 130,170,216 and 257kDa.

Key words: *Cryptosporidium parvum*, Immunoblot, SDS-PAGE, PCR, Semi-nested PCR.

*Corresponding author's email: srahbari@ut.ac.ir, Tel: 021-61117045, Fax: 021-66933222

