پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۳۸۷، صفحات ۵ تا ۱۱

مقاله اصلی
(Original Article)

تمایز ایزوله‌های کریپتوسپوریدیوم جداشده از انسان و گاو با استفاده از قطعه ۱۰۵۵bp ژن 18S rRNA

دکتر فرید تحویلدار بیدرونی*، دکتر عبدالحسین دلیمی‌اصل*، 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 کریپتوسپوریدیوم 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 کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان و گاو با استفاده از قطعه ۱۰۵۵ جفت نوکلئوتید ژن 18S rRNA بود.*

روش بررسی: *تعداد ۱۰۲۰ نمونه مدفوع انسانی و۹۴۰ 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 باروش Nested- PCR تکثیر شد و محصول PCR دوم برای تعیین گونه کریپتوسپوریدیوم توسط آنزیمهای Ssp1 و Vsp1 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 گاوی۲۳ 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 الکتروفورتیک مشابه بر روی ژل آگاروز ۲/۵٪ بود که تائیدکننده گونه کریپتوسپوریدیوم پاروم گاوی بود ولی ۲ نمونه انسانی دارای باندهای متفاوت بودند که تعیین سکانس شد و تمایزشان با نمونه‌های گاوی و انسانی بدست آمده تأئید گردید.*

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

واژگان کلیدی: *کریپتوسپوریدیوم پاروم، کریپتوسپوریدیوم هومینیس، ژن 18S rRNA.*

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم تک یاخته‌ای از گروه اپی‌کمپلکس‌ها می‌باشد که اغلب درکودکان 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 کریپتوسپوریدیوم پاروم و هومینیس می‌باشد (۳،۲).

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

Archive of SID
www.SID.ir

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

تاکنون بیش از ۲۰ گونه مختلف از کریپتوسپوریدیوم در انواع مختلف حیوانات شناسایی شده است (۷). موضوع حائز اهمیت آگاهی به چگونگی انتقال این تک‌یاخته به انسان می‌باشد لذا کریپتوسپوریدیوم انسانی را با نام کریپتوسپوریدیوم پاروم انسانی یا ژنوتیپ ۱ که غالبا انسان را آلوده کرده (۸) و کریپتوسپوریدیوم گاوی یا پاروم را ژنوتیپ ۲ نامگذاری کرده‌اند که نه تنها انسان بلکه سایر پستانداران را مبتلا می‌سازد. این‌دو 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 کریپتوسپوریدیوم 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 اووسیست بودند در محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵٪ و در دمای یخچال نگهداری شدند. دلیل انتخاب کودکان بیمار ۶ ماهه تا ۸ ساله وگوساله‌های ۶- ۱ماهه 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 اووسیست تشخیص داده شدند و از میان ۹۴۰ نمونه جمع‌آوری شده از دامداریها تعداد ۲۳ مورد واجد اووسیست 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 ۲میلی‌لیتری ریخته مقدار۱/۴ 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 کیاامپ را به دقت شماره‌گذاری کرده سپس تمام محلول لیزت را به داخل آن ریختیم و به مدت یک دقیقه در ۱۴۰۰۰دور سانتریفوژ کردیم. سپس ستون کیاامپ 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 کیاامپ 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 کیاامپ 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 دقیق در ۱۴۰۰۰دور 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 rRNAموجود در اووسیست توسطروش Nested-PCR تکثیر شد. علت استفاده از روش Nested کم بودن مقدار

Archive of SID

www.SID.ir

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)
CRYP1R5`-ACGAAACTTTCCTTACATGTA-3`(1658-1678)

در هر واکنش PCR به حجم ۳۰µL مقدار ۳µL از بافر 10x و ۲µL از محلول MgCl2 با غلظت ۵۰mM و مقدار ۱µL از dNTP با غلظت ۱۰mM و ۰/۲۵µL از taq polymerase و ۲µL از DNA ژنومیک و ۱µL از هر یک از پرایمرهای F و R که به حجم کلی محلول اضافه شد و بقیه آن تا ۳۰µL 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 ۱۰۵۵جفت باز را تکثیر کردیم

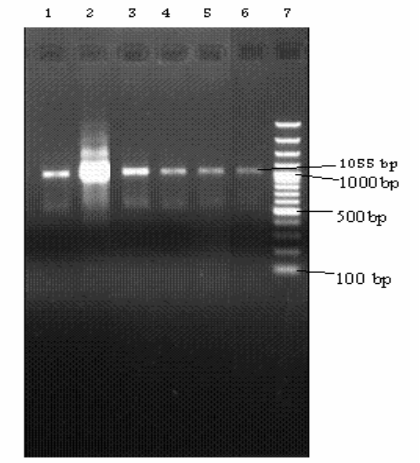
CRYP2 F 5`-TTTAGACGGTAGGGTATTG-3`(299- 317)
CRYP2 R 5`-ACAAAGTCCCTCTAAGAAG-3`(1333- 1351)

شرایط واکنش مشابه شرایط فوق بود و تفاوت فقط در دمای annealing بود که دما به ۵۴ درجه کاهش یافت و بجای DNAژنومیک از محصول PCR اول به مقدار ۲µL 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.

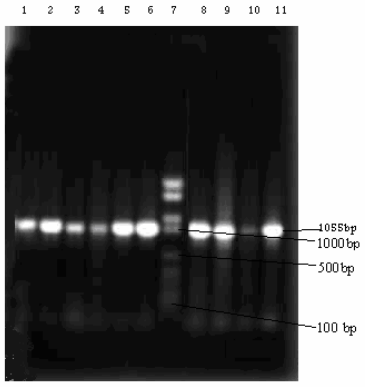
محصولات DNA بدست آمده که دارای باند قوی و خوب بودند را توسط دو آنزیم برشی Ssp1 وVsp1 شرکت فرمنتاز برش زده شدند. برای انجام اینکار در یک واکنشµL ۳۰ مقدار µL ۱۰ از محصول دوم PCR را با ۳µL از بافر آنزیم و ۱۰واحد از آنزیم مورد نظر (تقریباً ۰/۵ میکرولیتر) و ۱۷/۵ ماکرولیتر از آب مقطر دیونیزه اضافه کرده و مدت ۳ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه قرار دادیم سپس با غیر فعال کردن آنزیم 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 تائید 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.



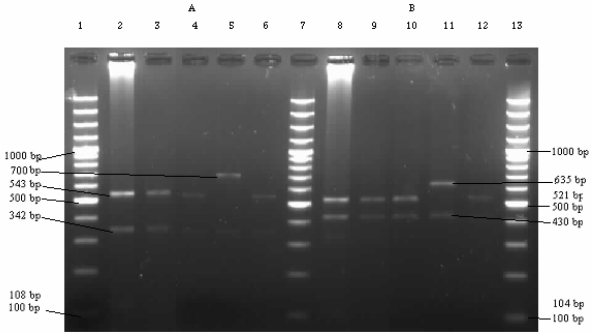
شکل ۱- قطعه ۱۰۵۵bp نمونه‌های گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان (۶-۱). چاهک شماره ۷، ۱۰۰ bp Size marker می‌باشد



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

www.SID.ir

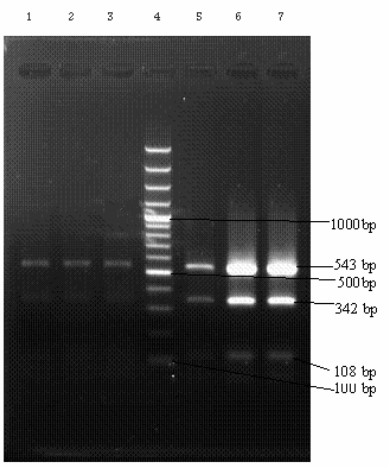
از مجموع ۱۲ نمونه انسانی که توسط آنزیم Ssp1 هضم شدند، ۱۰ نمونه الگوی برشی یکسانی را نشان دادند که بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ و با استفاده از اتیدیوم بروماید سه باند قابل مشاهده با اندازه‌های ۱۰۸، ۳۴۲ و ۵۴۳ جفت نوکلئوتید تولید نمودند ولی نمونه چاهک شماره ۵ در اثر این آنزیم ایجاد دو باند ۳۴۲ و ۷۰۰ جفت نوکلئوتیدی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



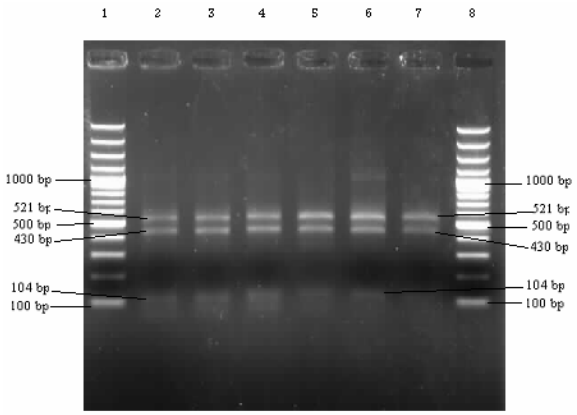
شکل ۳- قسمت A قطعه۱۰۵۵bp نمونه‌های گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان (چاهک ۶-۲) بریده شده با آنزیم Ssp1 و قسمت B چاهک شماره (۶-۲) بریده شده با آنزیم Vsp1 می‌باشد. چاهکهای شماره ۱، ۷ و ۱۳ Size marker ۱۰۰bp می‌باشد

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 الکتروفورتیک نمونه چاهک شماره ۱۱نشان 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 Vsp1باندهائی 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 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 کریپتوسپوریدیوم جدا شده از گاو (چاهک ۷-۱) بریده شده با آنزیمSsp1. چاهک شماره ۴، Size marker ۱۰۰bp می‌باشد.



شکل ۵- قطعه ۱۰۵۵bp نمونه‌های گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از گاو (چاهک ۷-۲) بریده شده با آنزیمVsp1. چاهک شماره ۱ و ۸ 100 bp Size marker می‌باشد.

بحث

با توجه به مطالعات انجام شده اهمیت کریپتوسپوریدیوم 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 کریپتوسپوریدیوم‌های آلوده کننده سایر موجودات را متمایز نمود و یا تک‌یاخته‌های دیگری را که در زیر نام کریپتوسپوریدیوم پنهان شده‌اند، آشکار ساخت. کریپتوسپوریدیوم در انسان برای اولین بار یک مورد در سال

www.SID.ir

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 کریپتوسپوریدیوز 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 ژژونوم 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، اووسیست‌هایی را که تولید می‌کنند، اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم هستند (۲۰،۱۹).

آلودگی انسان و گاو به این انگل و همزیستی نزدیک میان این‌دو موجب گردید تا محققین درصدد برآیند تا با استفاده از روشهای مولکولی بتوانند در مرحله اول انگل را مستقیما در نمونه تشخیص دهند و بعد مشخصات ژنتیکی هریک از این انگلها را تعیین نموده و سپس در یک فرایند تکمیلی قرابت میان این‌دو 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 اووسیست 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 گاوی، 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 rRNAرا برای شناسائی 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 تائید آن توسط PCR–Nested صورت گرفت. ژنوتایپ آن توسط آنزیم برشی اندونوکلئاز بر روی محصول PCR که توسط سکانس نوکلئوتیدی ادامه یافته بود، انجام گرفت. در میان ۶۳ ایزوله مورد بررسی، ۴ ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم شناسائی شد. ۵۷٪ ایزوله‌ها C.parvum انسانی بودند در حالیکه ۲۱/۷٪ گونه‌های حیوانی C.parvum با ژنوتیپ گاوی 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 شناسائی TATATTT را معرفی می‌کنند در حالیکه ۷ ایزوله از ۱۰ ایزوله انسانی توالی شناسائی TTTTTTTTTTTرا 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).

Archive of SID

www.SID.ir

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 حالی‌که 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 کریپتوسپوریدیوم 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 تفکیک گونه‌های مورد نظر سود جست که با طول قطعه ما (۱۰۵۵ نوکلئوتید) متفاوت است. از آنجا که طول بلند قطعه می‌تواند به انتخاب اختصاصی‌تر گونه‌ها کمک کند، این قطعه تمایز ایزوله‌ها را دقیق‌تر نشان می‌دهد. ابتلا 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 کریپتوسپوریدیوم 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

بدین‌وسیله 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.

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.

Archive of SID

www.SID.ir

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 کریپتوسپوریدیوز در انسان و دام در شهرستان سنندج. پایان‌نامه دکترا. دانشگاه شهید چمران اهواز، سال ۱۳۷۴.

۱۶. دبیرزاده م، بقایی م، بکائیان م، گودرزی مر. شیوع کریپتوسپوریدیوم در کودکان زیر پنج سال مبتلا به اسهال مراجعه‌کننده به بیمارستان تخصصی اطفال حضرت علی اصغر (ع) شهر زاهدان در طی سالهای ۷۷-۱۳۷۶. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان، ۱۳۸۲؛ دوره ۵، شماره ۱۱: صفحات ۵۴ تا ۵۹.

۱۷. مسیبی م. بررسی شیوع کریپتوسپوریدسیوزیس در کودکان زیر ۵ سال بیمارستان امیرکبیر اراک. فصلنامه ره‌آورد دانش، ۱۳۸۰؛ دوره ۴، شماره ۱۴: صفحات ۳۰ تا ۳۶.

۱۸. خوش‌زبان ف. بررسی شیوع کریپتوسپوریدیم در کودکان ۰-۵ سال مبتلا به اسهال در بیمارستانهای تهران. مجله علمی پژوهشی دانشگاه شاهد، ۱۳۷۷؛ دوره ۵، شماره ۱۹: 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 Parsitol 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 Imst 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.

Archive of SID

www.SID.ir