تعیین گونه های انگل کریپتوسپوریدیوم با استفاده از آنالیز PCR-RFLP ژن 18s rRNA

*[1]دکتر داود درستکار مقدم ، [2]مهدی اعظمی ، [3]دکتر رسول صالحی ، دکتر منصور صالحی

تاریخ دریافت: ۸۴/۶/۱۳
تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۰/۲۲

Archive of SID

چکیده

هدف

کریپتوسپوریدیوم یکی از مهمترین انگل های پاتوژن روده ای است که سبب اسهال در انسان و حیوانات می شود. در افراد با سیستم ایمنی کارآمد عفونت ناشی از انگل خودبخود بهبود می یابد اما در اشخاص مبتلا به نقص سیستم ایمنی عفونت ناشی از انگل طولانی مدت بوده و می تواند منجر به مرگ این افراد شود. به دلیل اهمیت بیماری مذکور و تاثیر تنوع گونه های انگل در طراحی استراتژیهای کنترل بیماری، ایزوله های انسانی و حیوانی کریپتوسپوریدیوم جهت تعیین نوع گونه ها با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش کار

در این بررسی نمونه های مدفوع انسانی و دامی جمع آوری شده از نقاط مختلف استان اصفهان با استفاده از روشهای آزمایشگاهی ویژه مورد بررسی و تخلیص قرار گرفتند و در نهایت بر رویDNA استخراج شده از ایزوله ها عملیات PCR-RFLP انجام گردید. جهت تعیین هویت گونه های انگلی شناسایی شده عملیات تعیین توالی ژنوم (sequencing) بر روی ژن 18s rRNA انجام شد. نتایج بررسی های میکروسکوپی نشان داد که ۴/۷ درصد از نمونه های انسانی و ۶/۲ درصد از نمونه های دامی آلوده به انگل هستند. نتایج PCR-RFLP نشان داد که نمونه های مورد آزمایش آلوده به *Cryptosporidium parvum II*، *C. baileyi*، *C. serpentis*، *C. muris*، *C. wrairi* و سه ژنوتیپ جدید کریپتوسپوریدیوم می باشند. با انجام تعیین توالی هویت واقعی این گونه های انگلی تعیین شد.

نتایج

با توجه به الگوی PCR-RFLP ژن 18s rRNA ایزوله های انسانی و حیوانی در اثر هضم آنزیمی با آنزیم های برش دهنده *SpeI* و *SspI* می توان نتیجه گرفت که در استان اصفهان اکثر ژنوتیپ های کریپتوسپوریدیوم به ویژه *C. parvum* وجود دارد . همچنین ممکن است تغییرات شدید پلی مرفیک در انگل های کریپتوسپوریدیوم این منطقه وجود داشته باشد و یا موتانهایی از این جنس نیز در منطقه وجود داشته باشند که الگوهای متفاوتی را ایجاد می کنند و پی بردن به هویت این موتانها نیاز به تعیین توالی ژنوم آنها دارد. علاوه بر این وجود سویه های دامی در ایزوله های به دست آمده از انسان تداخل سیکل انسان- دام - انگل و اهمیت سویه های دامی را در کنار سویه های انسانی در منطقه نشان می دهد.

کلمات کلیدی : کریپتوسپوریدیوم، گونه، PCR-RFLP، 18s rRNA.

۱- استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
*نویسنده مسئول، تلفن: ۲۴۹۱ ۷۹۲-۰۳۱۱ ، نمابر: ۸۵۹۷ ۶۸۸-۰۳۱۱، moghaddam@med.mui.ac.ir
۲- کارشناس ارشد انگل شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۳- استادیارگروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

www.SID.ir

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم یکی از مهمترین انگل های پاتوژن روده ای است که سبب اسهال در انسان و حیوانات می شود. در افراد با سیستم ایمنی کارآمد، عفونت ناشی از انگل خودبخود بهبود می یابد اما در اشخاص مبتلا به نقص سیستم ایمنی عفونت ناشی از انگل طولانی مدت بوده و می تواند منجر به مرگ این افراد شود (۱، ۲). گونه های انگل کریپتوسپوریدیوم در بافت های اختصاصی میزبان از جمله روده، شکم و ریه ها مستقر می شوند و بیماری ایجاد می کنند.

تشخیص و تمایز گونه های کریپتوسپوریدیوم بر اساس شکل (morphology) کاری دشوار و غیر ممکن بوده و مشخص شده است که اکثر گونه ها دارای تفاوت های جزئی در توالی DNA با دیگر گونه ها هستند و به همین علت برای تشخیص گونه های انگل نیاز به بررسی های ژنوتایپینگ می باشد (۳). امروزه مشخص شده است که چندین گونه کریپتوسپوریدیوم از جمله:

Cryptosporidium parvum, C . hominis, C. muris, C. canis, C. felis,C. meleagridis,C. andersoni

قادرند در انسان عفونت ایجاد کنند (۷-۴). کریپتوسپوریدیوم هومینیس (*C. hominis*) که قبلاً *C. parvum I* (انسانی) نامیده می شد، امروزه به طور آشکاری در سراسر جهان گزارش می شود (۸). *C. parvum II* (ژنوتیپ دامی) به طور قابل ملاحظه ای باعث عفونت در بسیاری از پستانداران می شود (۲). با این وجود، ژنوتیپ های مختلفی از کریپتوسپوریدیوم در نقاط مختلف جهان وجود دارند که هنوز شناسایی نشده اند و یا اینکه میزبان های اختصاصی آنها مورد شناسایی و بررسی قرار نگرفته است (۳، ۱۱-۹).

ژنوتایپینگ ایزوله های کریپتوسپوریدیوم سبب فراهم آوردن اطلاعات با ارزشی در مورد تشخیص ایزوله های موجود در میزبانهای مختلف می شود و به شناخت اپیدمیولوژی کریپتوسپوریدیوزیس نیز کمک می کند (۵، ۷، ۱۵-۱۲). اطلاعات موجود بر اساس شکل و ساختمان اووسیست، میزبان های اختصاصی انگل، محل استقرار انگل و دوره عفونت اغلب جهت مطالعات اپیدمیولوژی گونه های کریپتوسپوریدیوم مناسب و کافی نمی باشند (۱۶، ۱۷). آنالیز و بررسی چندین ناحیه بر روی مولکول DNA در جنس کریپتوسپوریدیوم نشان داده است که مارکرهای مولکولی مختلفی مانند: زیر واحد کوچک ریبوزم (18s rRNA)، ژنهای کد کننده پروتئین دیواره اووسیست انگل (COWP)، پروتئین حساس به حرارت ۷۰ کیلو دالتونی انگل و پروتئین اکتین انگل می تواند جهت بررسی های اپیدمیولوژیک و پاتولوژیک انگل مورد استفاده قرار گیرد (۳). هدف از این بررسی تعیین گونه های انگل کریپتوسپوریدیوم با استفاده از روش PCR-RFLP ژن 18s rRNA می باشد.

مواد و روشها

جمع آوری و جداسازی انگل: در این بررسی ۶۴۲ نمونه مدفوع از کودکان زیر پنج سال، بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و افراد در معرض خطر بیماری و ۴۸۰ نمونه مدفوع به طور مستقیم از رکتوم گاوها و گوساله های دامداریهای مناطق مختلف استان اصفهان جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها پس از جمع آوری در دی کرومات پتاسیم ۵٪ و در حرارت ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور بررسی وجود یا عدم وجود انگل، تمامی نمونه ها با روش آزمایشگاهی شناورسازی در محلول قندی (Sheater's) (۱۸) تغلیظ شدند و در نهایت گسترش های تهیه شده با روش ذیل – نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی و با میکروسکوپ مورد بررسی قرارگرفتند.

نمونه های آلوده به انگل با روش های گرادیانت منقطع ساکارز و گرادیانت پرکول مورد تخلیص و جداسازی قرار گرفتند (۱۹). ایزوله های انگلی تخلیص شده در دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ و در حرارت ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج و تخلیص DNA: DNA ژنومی انگل از اووسیست های تخلیص شده و به کمک روش Boom (۲۰) استخراج و تخلیص شد. به طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده L_6 شامل:

۵۰ mM Tris-HCl ،۷ M guanidinium thiocyanate (pH= ۶/۴)، ۲۵ mM EDTA (pH=۸) ، ۱/۵٪ Triton X – 100 و ۱۵ میکرولیتر پودر سیلیس (شرکت سیگما) به ۱۰۰ میکرولیتر از اووسیست های تخلیص شده اضافه گردید و پس از ورتکس کوتاه، به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد) انکوبه شد. پس از این مرحله نمونه ها به مدت ۳۰ ثانیه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند و دو مرتبه با بافر شستشو

Archive of SID

www.SID.ir

دهنده L_2 حاوی: ۷ M guanidinium thiocyanate، ۵۰ mM Tris-HCl (pH= ۶/۴)، یک مرتبه با اتانول ۸۰٪ سرد و یک مرتبه با استن خالص شسته شدند و در پایان به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد خشک شدند. برای جداسازی DNA از سیلیس، به نمونه های خشک به دست آمده ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل اضافه شد و نمونه ها به خوبی در آن حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد انکوبه و در پایان به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. در مایع رویی حاصل از سانتریفوژ DNA وجود داشت که جداسازی شد و برای مراحل بعدی آزمایش در حرارت ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

PCR-RFLP: ژن 18S rRNA ایزوله های کریپتوسپوریدیوم با استفاده از پرایمرهای A و B تکثیر شد.

A (forward primer: 5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AG-3')

B (reverse primer: 5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TA-3')

این ژن شامل یک قسمت متغییری است که می تواند در تشخیص گونه های کریپتوسپوریدیوم استفاده شود. تکثیر با روش PCR و در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر با شرایط زیر انجام شد: ۲/۵ میکرو لیتر بافر 1X PCR ، ۰/۲ میلی مولار mixed dNTP، ۰/۸ میکرو مول پرایمر A ، ۰/۸ میکرو مول پرایمر B، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلی مراز، ۱ میکرو لیتر (۲۰ نانوگرم) DNA نمونه، ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$

با استفاده از ترموسایکلر (Hybaid, Teddington, UK) پروفایل حرارتی زیر تنظیم و مورد استفاده قرار گرفت:

۱ سیکل (Primary denaturation stage با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه)، سپس ۳۵ سیکل (Denaturation stage با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه: Annealing stage با دمای ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه: Extension stage با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه) سپس ۱ سیکل (Finaly extension stage با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه). محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند و باندهای موجود در آن به کمک نور UV مشخص و مشاهده شدند. در این بررسی از DNA کریپتوسپوریدیوم پاروم ISSC6 (تهیه شده توسط Dr. F. Tosini از کشور ایتالیا) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جهت انجام RFLP، ۱۰ میکرولیتر از محصولات تکثیر شده توسط PCR با ۱۰ میکرولیتر مخلوط برش دهنده حاوی ۱۰ واحد از هر کدام از آنزیم های *SspI* و *SpeI* و ۳ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم مخلوط شدند و به مدت ۱ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. محصولات RFLP شده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند و در نهایت با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با نور UV مشاهده و بررسی شدند.

تعیین توالی نمونه ها: محصولات PCR ناحیه ژنومی 18s rRNA با استفاده از کیت QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hiden, Germany) تخلیص و پاک سازی شدند و با کمک کیت ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Crop., USA) و دستگاه سکانس کننده اتوماتیک (ABI Prism 310 model, Perkin-Elmer Crop., USA) مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

نتایج آزمایشات میکروسکوپی

گونه های کریپتوسپوریدیوم به کمک رنگ آمیزی ذیل-نلسون اصلاح شده در ۳۰ نمونه از ۶۴۲ نمونه مدفوع انسانی (۴/۷ درصد) و ۳۰ نمونه از ۴۸۰ نمونه مدفوع دامی (۶/۲ درصد) تشخیص داده شدند. مرفولوژی اووسیست های موجود در نمونه های مورد بررسی در مقایسه با نمونه کریپتوسپوریدیوم پاروم کنترل مثبت (تهیه شده توسط Dr.Y. Omata از دانشکده دامپزشکی ژاپن) مورد بررسی و تائید قرار گرفتند.

نتایج PCR-RFLP

اندازه ژن 18s rRNA تمام ایزوله های انسانی و حیوانی (گاو وگوساله) پس از PCR با پرایمرهای اختصاصی A و B دارای باندهای مشابه و اندازه ای حدود ۱۷۵۰ bp بود. نتایج PCR-RFLP تمامی ایزوله های مذکور با آنزیم *SpeI* نیز دارای باندهای مشابه و یکسان و اندازه ای حدود ۱۷۵۰bp بود. نتایج PCR-RFLP ایزوله های انسانی با آنزیم *SspI* حاکی از آن بود که ۱۳ نمونه (۴۳/۴٪) آلوده به *C. parvum* تیپ دو، ۴ نمونه (۱۳/۴٪) آلوده به *C. muris*، یک نمونه (۳/۳٪) آلوده به *C. wrairi*، ۲ نمونه (۶/۶٪) آلوده به ژنوتیپ های *C. parvum* و *C. muris* و یک نمونه (۳/۳٪) آلوده به *C. parvum* همراه با

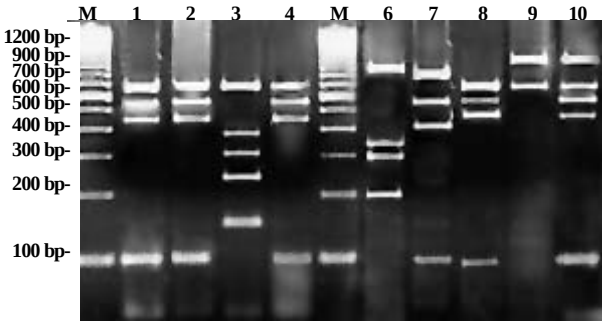
Archive of SID

www.SID.ir

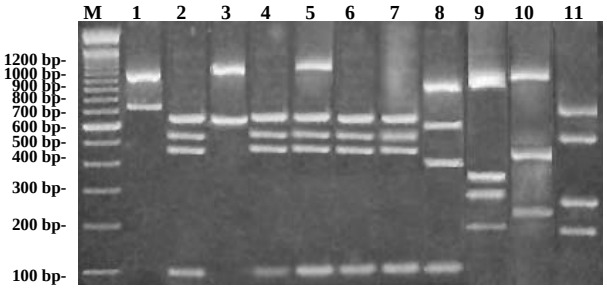
ژنوتیپ جدیدی از انگل می باشد. در ۹ ایزوله (۳۰٪) انسانی الگوی PCR-RFLP حاصل از برش با آنزیم *SspI* متفاوت از الگوهای گزارش شده قبلی بود. از ۹ ایزوله فوق، ۳ ایزوله (۱۰٪) الگوهای مشابه هم و ۶ ایزوله (۲۰٪) الگوهای شبیه هم و متفاوت از سه ایزوله مذکور ایجاد کردند که با هیچ یک از گونه های انگل کریپتوسپوریدیوم گزارش شده در جهان شباهت ژنوتیپی نداشتند. بررسی الگوی PCR-RFLP ایزوله های حیوانی برش داده شده با آنزیم *SspI* نیز نشان داد که ۹ ایزوله (۳۰٪) دارای *C. parvum* تیپ دو، ۲ ایزوله (۶/۶٪) دارای *C. baileyi*، یک ایزوله (۳/۴٪) حاوی *C. serpentis*، ۳ ایزوله (۱۰٪) حاوی *C. muris*، ۳ ایزوله (۱۰٪) دارای *C. wrairi* و ۲ ایزوله (۶/۶٪) دارای *C. parvum* و *C. muris* می باشند.

همچنین در ۱۰ ایزوله (۳۳/۴٪) الگوهای حاصل از برش با آنزیم *SspI* متفاوت از الگوهای قبلی بود. از ۱۰ ایزوله مذکور، ۴ ایزوله (۱۳/۴٪) الگوهای مشابه هم و ۶ ایزوله (۲۰٪) الگوهای شبیه هم و متفاوت از چهار ایزوله قبلی ایجاد نمودند که با هیچ یک از گونه های انگل کریپتوسپوریدیوم گزارش شده در نقاط مختلف جهان شباهت ژنتیکی نداشتند.

شکل ۱ و ۲ نتایج PCR-RFLP ژن 18s rRNA ایزوله های کریپتوسپوریدیوم را در نمونه های انسانی و حیوانی نشان می دهد.



شکل ۱: الگوی PCR-RFLP قطعه 18S rRNA ایزوله های کریپتوسپوریدیوم انسانی برش داده شده با آنزیم *SspI*. شماره ۱ و ۲ و ٤ و ۸ مربوط به ژنوتیپ *C. parvum*، شماره ۷ مربوط به ژنوتیپ *C. wrairi*، شماره ۹ مربوط به ژنوتیپ *C. muris*، شماره ۱۰ مربوط به ژنوتیپ های *C. parvum* و *C. muris*، شماره ۳ و ٦ مربوط به ژنوتیپ های جدید Cryptosporidium شناسایی شده در استان اصفهان، M مربوط به نشانگر (100-1200 bp).



شکل ۲: الگوی PCR-RFLP قطعه 18S rRNA ایزوله های کریپتوسپوریدیوم حیوانی برش داده شده با آنزیم *SspI*. شماره ۱ مربوط به ژنوتیپ *C. baileyi*، شماره های ۲ و ٤ و ٦ و ۷ مربوط به ژنوتیپ *C. parvum*، شماره ۳ مربوطه به ژنوتیپ *C. muris*، شماره ۵ مربوط به ژنوتیپ های *C. parvum* و *C. muris*، شماره ۸ مربوط به ژنوتیپ *C. wrairi*، شماره ۹ و ۱۱ مربوط به ژنوتیپ های جدید Cryptosporidium شناسایی شده در استان اصفهان، شماره ۱۰ مربوط به ژنوتیپ *C. serpentis*، M مربوط به نشانگر (100-1200 bp)

نتایج تعیین توالی ژن 18s rRNA

نتیجه تعیین توالی ژن 18s rRNA ایزوله های به دست آمده از نمونه های انسانی مشابه با نتایج گزارش شده در بانک جهانی ژن و به شرح زیر بود: *C. parvum II* (شماره دسترسی در بانک ژن L 16997)، *C. muris* (شماره دسترسی در بانک ژن AF 093497)، *C. wrairi* (شماره دسترسی در بانک ژن AF 115378). دو ایزوله کریپتوسپوریدیوم انسانی دارای توالی ژنتیکی جدیدی بودند که با هیچ یک از گزارشات منتشر شده در بانک جهانی ژن مشابهت نداشتند و به عنوان ژنوتیپ های جدید گزارش شدند (شکل ۳، A و B).

نتیجه آنالیز تعیین توالی ژن 18s rRNA ایزوله های حیوانی نیز مشابه با نتایج گزارش شده در بانک جهانی ژن و به شرح زیر بود: *C. parvum II* (شماره دسترسی در بانک ژن L 16997)، *C. muris* (شماره دسترسی در بانک ژن AF 093497)، *C. wrairi* (شماره دسترسی در بانک ژن AF 115378)، *C. baileyi* (شماره دسترسی در بانک ژن L 19068) و *C. serpentis* (شماره دسترسی در بانک ژن AF 093500). یک ایزوله کریپتوسپوریدیوم حیوانی نیز دارای توالی ژنتیکی جدیدی بود که با هیچ یک از گزارشات منتشر شده در بانک جهانی ژن شباهت نداشت و به عنوان ژنوتیپ جدید کریپتوسپوریدیوم در اصفهان گزارش شد (شکل ۳، C).

Archive of SID

www.SID.ir

(A)
1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct
61 aagtataaac ttttatacgg ttaaactgcg aatggctcat tataacagtt atagtttact
121 tgataatctt tacttacatg gataaccgtg gtaattctag agctaataca tgcgaaaagg
181 ggtgactcta tcgtatcgtt gaaaatacta gctagagtac ttttatagtt ggtgcctgac
241 aataacttta cggatcacat aaattgtgac atatcattca agtttctgac ctatcagctt
301 tagacggtag ggtattggcc taccgtggca atgacgggta acggggaatt agggttcgat
361 tccggagagg gagcctgaga aacggctacc acatctaagg aaggcagcag gcgcgcaaat
421 tgctcaatcc tggtactcgg tcgtagtgac aagttatagc aatgcaggtc atcttgtttc
481 tgtaattgga atgagttaag tataaacccc tttacaagta tcaattggag ggcaagtctg
541 gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagttaaa
601 aagctcgtag ttggatttct gttaataatt tatatataat attttgaaaa tatttatata
661 atattaacat aattcatatt actatatatt tttagtatat gaaattttac tttgagaaaa
721 ttagagtgct taaagcaggc atatgccttg aatactccag catggaataa tattaaagat
781 aactatcttt cttattggtt ctaagataag aataatgatt aatagggaca gttgggggca
841 tttgtattta acagtcagag gtgaaattct tagatttgtt aaagacaaac tagtgcgaaa
901 gcataagcca aggatgtttt cattaatcaa gaacgaaagt taggggatcg aagacgatca
961 gataccgtcg tagtcttaac cataaactat gccaactaga gattggaggt tgttccttac
1021 tccttcagca ccttatgaga aatcaaagtc tttgggttct ggggggagta tggtcgcaag
1081 gctgaaactt aaaggaattg acggaagggc accaccagga gtggagcctg cggcttaatt
1141 tgactcaaca cgggaaaact caccaggtcc agacatagga aggattgaca gattgatagc
1201 tctttcttga ttctatgggt ggtggtgcat ggccgttctt agttggtgga gtgatttgtc
1261 tggttaattc cgttaacgaa cgagacctta acctgctaaa tagacataag aaatattata
1321 ttttttatct gtcttcttag agggactttg tatgtttaat acagggaagt tttaggcaat
1381 aacaggtctg tgatgccctt agatgtcctg ggccgcgcgc gcgctacact gatgcatcca
1441 tcaagtatat attcctgttt cgaaggaaat gggtaatctt ttgaatatgc atcgtgatgg
1501 ggatagatca ttgcaattat tgatcttgaa cgaggaattc ctagtaagcg caagtcatca
1561 gcttgcgctg attacgtccc tgcccctttgt acacaccgcc cgtcgctcct accgattgaa
1621 cgatttggtg aatcgttcgg aagatacttt gtttcaatac atctaaggaa agtaacgtaa
1681 accttatcat ttagaggaag gagaagtcgt aacaaggttt ccgtaggtga acctgcagaa
1741 tcatcatta

(B)
1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct
61 aagtataagc ttttatacgg cgaaactgcg aatggctcat taaaacagtt atagtttact
121 ttctaatcaa actaacattg atagtcgtgt taatttctaa gctaatacat gcgaaaaaac
181 ccaactttgc ggaagggttg tatttattag ataaagaacc aatgagcttg gtgattcata
241 gttactttac ggatcgcatc tctgatgcga catatcattc aagtttctga cctatcagct
301 cctgacggta gggtattggc ctaccgtggc tatgacgggt aacggggaat tagggttcga
361 atccgcagag tgagcctgag aaacggctac cacatctaag gaaggcagca ggcgcgcaaa
421 ccacctgatc gtgacacagg gaggtagtga caagaaataa caatacaggg cctaacggtc
481 tttgaattgg tctgagtgaa gtataaaccc ctttacgagt atcaattgga gggcaagtct
541 aatgccagca gttgcggtaa taacagctcc aatagcgtat attaaagttg ttgcagttaa
601 aaagctcgta gttggatttc tgttgtataa tctataatat tactaaggta tatattatat
661 tggctacatc cggcctatta tatgzctaaa tatataggaa actttacttt gagaaaatta
721 aagtgcttaa agcaggcaac tgccttgaat actccagcat gaaataataa gtaaggactt
781 tagaaacctt tattggttct aggacaaaag taatggttaa tagggacagt tgggggcatt
841 cgtatttaac agccagaggt gaaattctta gatttgttaa agacgaacta ctgcgaaagc
901 aactgccaag gatgttttca ttttcgaaga acgggcgtta aggtatcgaa gacgatcaga
961 taaaaacgta ccttgcaata ttaactatgc cgactagaga ttggaggttg ttccttactc
1021 cttcagcacc ttatgagaaa tcaaagtctt tgggttctgg ggggagtatg gtcgcaaggc

1081 aaaaatttaa aggaattgac ggaagggcac caccaggagt ggagcctgcg gcttaatttg
1141 atttcccacg ggaaaactca ccaggtccag acataggaag gattgacaga ttgatagctc
1201 cctcttgatt ccctaggtgg tggtgcatgg ccgttcttag ttggtggagt gatttgtctg
1261 cttaattccg aaaccgaacg agaccttaac ctgctaaata ggtaatagaa atttatttttt
1321 ctatattatc ttcttagagg gactttgcgt gtctaacgcg aggaagtttg aggcaataac
1381 aattctgtga tgcccttaga tgtcctgggc cgcacgcgcg ctacactgat gcatccaacg
1441 agtatatatc ctgcttcgaa ggaagtgggt aatcttatga gtatgcatcg tgatggggat
1501 agatcattgt aattattgat ctttaacgag gaattcctag taagcgcaag tcatcagctt
1561 ttgctgatta cgtccctgcc ctttgtacac accgcccgtc gctcctaccg attgagtgat
1621 cttgtgaata attcggacca tgctacgagt agcaaataca tagcaaggaa agtttcgtaa
1681 aaactatcac ttagaggaag gagaagtcgt aacaaggttt ccgtaggtga acctgcagaa
1741 ttatcac

(C)
1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct
61 aagtataagc ttttatacgg cgaaactgcg aatggctcat taaaacagtt atagtttact
121 tgatttttcaa acccccatgg ataaccgtgg taattctaga gctaatacat gcgaaaaaac
181 aaatcttgcg ggctctgttg tatttattag ataactaacc aatgagcttg gtgattcata
241 aactatcttc tctcatccga catatcattc acctaaatga cctatcagct ctttgcagga
301 aacctttta ggggtttggc cttccgtggc tatgacgggt aacggggaat tagggttcga
361 aagttgagag ggttccaaag aaacggctac cacatctaag gaaggcagca ggcgcgcaaa
421 tcccggtatc ctttccaagg ggaaatgtga cttaaaataa cttaccaggg cttaacactc
481 ttgtaattgg aatgagtgaa gtataaaccc ctttacgagt atcaattgga gggcaagtct
541 ttacagagca gttcaggtaa tggagatccc ttggaggtat aaagaagttg tggatattaa
601 aaagctcgta gttggatttc tgttgtataa tctataatat tactaaggta tatattatat
661 taatatcctc ccctaggtta taggactaaa taattccaaa actttacttt gagaaaatta
721 gagtgcttaa agcaggcaac tgccttgaat actccagcat ggaataataa gtaaggactt
781 ttgtctttct tattggttct aggacaaaag taatggttaa tagggacagt tgggggcatt
841 ttggaccagc aggctatggt gatatcctta gcctatttaa agtttttcta ccccgaaagc
901 atttgccaag gatgttttca ttaatcaaga acgaaagtta ggggatcgaa gacgatcaga
961 cctggtcgta gggcagagca taatctatgc aatagagaga aaggaggttg taacttactc
1021 cttcagcacc ttatgagaaa tcaaagtctt tgggttctgg ggggagtatg gtcgcaaggc
1081 tttaacttaa attaattgac gaagggcacg caccaggagt ggagcc7tgcg gcttaatttg
1141 attcacaccg ttaaaactca ccccgcccag acttaggaag gaatgacaga ttgatagctc
1201 aaccttgatt ttatgggtgg aagtgcatgg tatatcttag aaggtggagt gaattgtctg
1261 gttaattccg ttaacgaacg tttcattaac tcactaaata aataatagaa aaatattttt
1321 cactaggatc tggctagagg tactgtgcgt gtgtaacgcg attaagtttg attcaataac
1381 ttctctgtga tggacttaga tgacctgggc tctacgcgcg ttccactgat ttcgccaacg
1441 agagtacgtc aggcttcgaa ttagtgggta attcatatga ttatgcatcg ttatggggat
1501 attacattgt aattattgat ctttaacgag gaattcctag taagcgcaag tcatcagctt
1561 gcgctgatta cgtccctgcc ctttgtacac accgcccgtc gctcctaccg attgagtgat
1621 tcggtgaata attcggacca tgctacgagt agcaaataca tagcaaggaa agtttcgtaa
1681 attatatcac tagaccgaag cccttgtcgt ttcaaggttt tcgtaggtga acctgcagaa
1741 cctaaata

شکل ۳: نتایج تعیین توالی ژن 18s rRNA ایزوله های انسانی و حیوانی: A. ایزوله انسانی شماره یک (جدید)، B. ایزوله انسانی شماره دو (جدید) و C. ایزوله حیوانی (جدید)

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

تکنیک های مولکولی برای تشخیص و تمایز ایزوله های کریپتوسپوریدیوم همراه با روشهای متداولی مانند تغلیظ و رنگ آمیزی گسترش های نمونه مدفوع به طور قابل ملاحظه ای دانسته های ما را در مورد پراکندگی و اپیدمیولوژی انگل افزایش داده است. انتخاب هدف های مولکولی برای ژنوتایپینگ انگل باید به طور مناسب انجام گیرد، چرا که در تفسیر اطلاعات به دستآمده از روش PCR ، ژنوم انگل نقش مهمی را ایفا خواهد کرد.

جهت شناسایی نقش این ارگانیسمهای انگلی در آلودگی محیط، تشخیص آنها تا سطح گونه امری ضروری به نظر می رسد. به علاوه، بررسی هایی در جهت گسترش یک روش مناسب که بتواند گونه های کریپتوسپوریدیوم را تا سطح گونه تشخیص دهد مورد نیاز است. گامهای حیاتی در جهت این هدف برداشته شده است. اولین قدم در این رابطه توسط Leng و همکاران (۲۱) برداشته شد که با استفاده از روش PCR-RFLP بر روی ژن 18s rRNA و با کمک آنزیمهای محدودالاثر *DraI* و *VspI* توانست سه گونه کریپتوسپوریدیوم از جمله *C. parvum*، *C. muris* و *C. baileyi* را تشخیص دهد. با این وجود، استفاده از آنزیم های *VspI* و *DraI* در تشخیص *C. muris* از *C. serpentis* دارای نقص بود، زیرا این آنزیمها موقعیت مشابهی را بر روی توالی ژن 18s rRNA شناسایی می کردند.

مطالعات انجام گرفته توسط Leng و همکاران (۲۱) نشان داد که استفاده از آنزیمهای برش دهنده محدودالاثر *DraI* و *VspI* قادر به تفکیک و تمایز گونه *C. parvum II* (ژنوتیپ دامی) از *C. wrairi* نمی باشد. همچنین در بررسی Xiao و همکاران (۱۱) نیز معلوم شد که به کارگیری آنزیم های برش دهنده محدود الاثر *VspI* و *SpeI* قادر به تمایز گونه های *C. wrairi* از *C. parvum II* نمی باشد. بر خلاف روشهای فوق، Xiao و همکاران با استفاده از آنزیم محدود الاثر *SspI* توانست *C. wrairi* را از *C. parvum II* تمیز دهد (۱۱). در مطالعه ای که توسط Sulaiman و همکاران در سال ۱۹۹۹ بر روی ایزوله های انسانی جدا شده از مناطق جغرافیایی مختلف انجام شده است، الگوی PCR-RFLP ایزوله های مذکور هضم شده با آنزیم *SpeI* مشابه هم و شبیه به الگوی حاصل از ایزوله های این مطالعه می باشد که این تایید کننده نتایج به دست آمده از مطالعه ما می باشد (۲۳)، اما با نتایج مطالعه Rahol مغایرت دارد (۲۴). در بررسی اخیر که در ناحیه Manhattan آمریکا انجام شده است، محصولات PCR نمونه های انسانی و حیوانی (گوساله) پس از هضم آنزیمی با *SpeI* قطعات مختلفی ایجاد نموده اند (۲۴).

بعد از انجام RFLP ژن 18s rRNA بر روی تمامی گونه هایی کریپتوسپوریدیوم به دست آمده از انسان و دام، توانستیم ژن 18s rRNA را توسط آنزیم *SspI* برش دهیم و در نتیجه ۸ گونه از انگل کریپتوسپوریدیوم را شناسایی نماییم. *C. parvum*، *C. muris*، *C. wrairi*، *C. baileyi*، *C. serpentis* و سه ژنوتیپ جدید دیگر کریپتوسپوریدیوم، نمونه های از انگل بودند که با استفاده از آنزیم برش دهنده محدود الاثر *SspI* و انجام عمل تعیین توالی شناسایی شدند (شکل ۳- A، B، C). ژنوتایپینگ ایزوله های کریپتوسپوریدیوم به دست آمده از میزبانهای مختلف نشان داد که طیف وسیعی از انگل کریپتوسپوریدیوم در استان اصفهان وجود دارد. در این منطقه، کریپتوسپوریدیوم پاروم ژنوتیپ دامی (*C. parvumII*) به طور عمده در ایزوله های به دست آمده وجود داشت و به عنوان اولین عامل عفونت انسانی شناسایی شد.

تقدیر و قدردانی

از دکتر Fabio Tosini (Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanita, Viale Regina Elena 299, 00161, Rome, Italy) و دکتر Y. Omata (Department of Veterinary Physiology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro 080-8555, Japan) به خاطر همکاری با این طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی می نماییم.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Chen X. M., Keithly J. S., Paya C. V., LaRusso N. F., 2002, Current concepts: Cryptosporidiosis, N. Engl. J. Med., 346, 1723–1731.
2. Fayer R., Morgan U., Upton S. J., 2000, Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification, Int. J. Parasitol., 30, 1305–1322.
3. Xiao L., Sulaiman I. M., Ryan U. M., Zhou L., Atwill E. R., Tischler M. L., Zhang X., Fayer R., Lal A. A., 2002, Host adaptation and host-parasite co-evolution in Cryptosporidium: implications for taxonomy and public health, Int. J. Parasitol., 32,1773–1785.
4. Akiyoshi D. E., Dilo J., Pearson C., Chapman S., Tumwine J., Tzipori S., 2003, Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species, Infect. Immun., 71, 828-1832.
5. Gatei W., Greensill J., Ashford R. W., Cuevas L. E., Parry C. M., Cunliffe N. A., Beeching N. J., Hart C. A., 2003, 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., 41,1458–1462.
6. Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarfati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailliez J. C., Camus D., Dei-Cas E., 2001, Molecular characterization of Cryptosporidium isolates obtained from humans in France, J. Clin. Microbiol., 39, 3472–3480.
7. Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R. H., Lal A. A., 2001, Identification of 5 types of Cryptosporidium parasites in children in Lima, Peru, J. Infect. Dis., 183, 492–497.
8. Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R. C., Olson M., Lal A., Xiao L., 2002, *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens, J. Eukaryot. Microbiol., 49, 433–440.
9. Morgan U. M., Xiao L., Fayer R., Lal A. A., Thompson R. C., 1999, Variation in Cryptosporidium: towards a taxonomic revision of the genus, Int. J. Parasitol., 29,1733–1751.
10. Xiao L., Morgan U. M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R. C., Fayer R., Lal A. A., 1999, Genetic diversity within Cryptosporidium parvum and related Cryptosporidium species, Appl. Environ. Microbiol., 65,3386–3391.
11. Xiao L., Singh, A., Limor J., Graczyk T. K., Gradus S., Lal A., 2001, Molecular characterization of Cryptosporidium oocysts in samples of raw surface water and wastewater, Appl. Environ. Microbiol., 67,1097–1101.
12. Blears M. J., Pokorny N. J., Carreno R. A., Chen S., De Grandis S. A., Lee H., Trevors J. T., 2000, DNA fingerprinting of *Cryptosporidium parvum* isolates using amplified fragment length polymorphism (AFLP), J. Parasitol., 86, 838–841.
13. Perz J. F., Le Blancq S. M., 2001, *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State, Appl. Environ. Microbiol., 67, 1154–1162.
14. Straub T. M., Daly D. S., Wunshel S., Rochelle P. A., DeLeon R., Chandler D. P., 2002, Genotyping *Cryptosporidium parvum* with an hsp70 single-nucleotide polymorphism microarray, Appl. Environ. Microbiol., 68, 1817–1826.
15. Sulaiman I. M., Lal A. A., Xiao L., 2002, Molecular phylogeny and evolutionary relationships of Cryptosporidium parasites at the actin locus, J. Parasitol., 88, 388–394.
16. Carreno R. A., Pokorny N. J., Lee H., Trevors J. T., De Grandis S. A., 2001, Phenotypic and genotypic characterization of Cryptosporidium species and isolates, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 26, 95–106.
17. Okhuysen P. C., Chappell C. L., Crabb J. H., Sterling C. R., DuPont H. L., 1999, Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults, J. Infect. Dis., 180, 1275–1281.
18. Arrowood M. J., Sterling C. R, 1987, Isolation of Cryptosporidium oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients, J. Parasit., 73, 314-319.
19. درستکار مقدم داود، اعظمی مهدی، جداسازی و تخلیص اووسیست ها و اسپروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم با استفاده از روشهای گرادیانت منقطع ساکارز و گرادیانت پرکول. مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۸، شماره ۱ ، ۱۳۸۴، ۲۴-۱۸.
20. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-Van Dillen P. M. E., Van der Noordaa J., 1990, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, J. Clin. Microbiol., 28, 495-503.
21. Leng X., Mosier D. A., Oberst R. D., 1996,, Differentiation of *Cryptosporidium parvum*, *C. muris* and *C. baileyi* by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene, Vet. Parasitol., 62, 1-7.
22. Kimbell L. M., Miller D. L., Chavwz W., Altman N., 1999, Molecular analysis of the 18S rRNA gene of Cryptosporidium serpentis in a Wild-Caught Corn Snake (Elaphe guttata guttata) and a five species restriction fragment length polymorphism based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*, Appl. Environ. Microbiol., 65, 5345-5349.
23. Sulaiman I. M., Xiao L., Lal A. A., 1999, Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques, Appl. Environ. Microbiol., 64, 4431-4435.
24. Rhol S., Pakishderma A. T., Derek Mosier A., McKenzie W. R, 1995, Identification of Cryptosporidium species in human and animal by morphological and molecular methods, J. R. Soc. Med., 52, 203-206.

Archive of SID

www.SID.ir