Original Article

The identification of Human *Cryptosporidium* Species in Tehran by PCR/RFLP

Abdolhossein Dalimi[1*], Farid Tahvildar[2], Fatemeh Ghaffarifar[3], Bahram Kazemi[4]

1- Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology and Research Center of Cellular and Molecular Biology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associated Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Professor, Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology and Research Center of Cellular and Molecullar Biology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Received: 26/Feb/2014, Accepted: 28/May/2014

Abstract

Objective: Cryptosporidiosis is one of the most important parasitic infections in Iran which causes diarrhea in humans and animals. The identification of the *Cryptosporidium* species among humans is necessary. This study aims to identify species of *Cryptosporidium* isolated from patients that referred to three hospitals in Tehran based on the 18s rRNA gene by nested PCR-RFLP assay.

Methods: In the first step of the present descriptive cross-sectional study, 1128 human fecal samples were collected from patients that referred to three hospitals (Ali Asgar, Mofid and Imam Khomeini) in Tehran. The samples were examined for *Cryptosporidium* by modified acid fast staining. In the second step, DNA of the positive samples were extracted, then gene of 18s rRNA was amplified by nested PCR in order to differentiate between species. The PCR products were subsequently digested by Vsp1 restriction enzyme and their sequences determined.

Results: The modified acid fast method detected 12 (1.06%) positive samples which was confirmed by a molecular technique. The 845bp fragment of 18s rRNA was digested by restriction enzymes. There were 10 samples identified as *Cryptosporidium parvum* that showed similar patterns on 2.5% agarose gel; 2 other samples were identified as *Cryptosporidium homonis* and *Cryptosporidium andersoni* based on the different patterns and sequence results.

Conclusion: Although *Cryptosporidium parvum* is introduced as the major agent for cryptosporidiosis in humans, *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium andersoni* may also infect humans.

Keywords: Molecular Identification, *Cryptosporidium andersoni*, 18s rRNA Gene, Nested PCR, Tehran

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 2, Summer 2014, Pages: 39-48

مقاله اصیل

تشخیص گونه‌های کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان با روش PCR-RFLP در تهران

عبدالحسین دلیمی[1*]، فرید تحویلدار بیدرونی[2]، فاطمه غفاری فر[3]، بهرام کاظمی دمنه[4]

۱- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۰۷ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۳/۰۷

چکیده

هدف: کریپتوسپوریدیوزیس از عفونت‌های انگلی شایع در ایران و به‌عنوان عامل ایجاد اسهال در انسان و دام به‌شمار می‌آید. از این رو شناسایی گونه‌های شایع آن در جمعیت‌های انسانی ضروری است. هدف از انجام مطالعه حاضر تعیین گونه‌های کریپتوسپوریدیوم جدا شده از بیماران مراجعه کننده به سه بیمارستان در تهران بر مبنای ژن 18s rRNA با استفاده از روش Nested PCR-RFLP است.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع توصیفی- مقطعی بوده و در مرحله اول جمعاً ۱۱۲۸ نمونه مدفوع انسانی از بیماران مراجعه کننده به سه بیمارستان علی اصغر، مفید و امام خمینی در تهران جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها با روش اسید فاست تغییر یافت و رنگ‌آمیزی و تشخیص داده شد. در مرحله دوم DNA نمونه‌های مثبت استخراج و ژن ۱۸s rRNA با روش Nested-PCR تکثیر، سپس برای تشخیص گونه، محصول PCR با آنزیم محدود کننده Vsp1 برش داده شد در نهایت محصول PCR تعیین ترداف شد.

نتایج: از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با ذیل نلسون تعداد ۱۲ نمونه (۱/۰۶ درصد) مثبت تشخیص داده شد. همه این نمونه‌ها با روش Nested-PCR تأیید شد. قطعه تکثیر یافته ۸٤٥ جفت‌بازی ژن 18s rRNA با آنزیم Vsp1 برش داده شد. پس از برش آنزیمی روی ژل آگارز ۲/۵ درصد، ۱۰ نمونه به‌عنوان کریپتوسپوریدیوم پاروم و بر مبنای الگوی برش آنزیمی و ترادف بازی یک نمونه به‌عنوان کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و یک نمونه به‌عنوان کریپتوسپوریدیوم هومنیس تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: گرچه گونه پاروم به‌عنوان گونه شایع در انسان‌ها شناخته شده است ولی ممکن است افراد به گونه هومنیس و آندرسونی نیز مبتلا شوند.

کلیدواژگان: شناسایی مولکولی، کریپتوسپوریدیوم آندرسونی، ژن 18s rRNA، Nested-PCR، تهران

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحات: ۳۹-۴۸

مقدمه

کریپتوسپوریدیوزیس (Cryptosporidiosis) امروزه به دلایل متعدد از اهمیت خاصی در دنیا برخوردار است. عامل

بیماری تک یاخته‌ای به نام کریپتوسپوریدیوم (*Cryptosporidium*) است که از کوکسیدیاها (Coccidia) بوده و در گذشته به‌عنوان یک تک یاخته غیر بیماری‌زا شناخته شده بود ولی ابتلای افراد دارای نقص سیستم ایمنی (Immune-compromised) و بروز برخی اپیدمی‌ها در نقاط مختلف دنیا موجب افزایش اهمیت و انجام بررسی‌های وسیع‌تر، جامع‌ترو دقیق‌تر شد [۱]. در ابتدا تشخیص این تک یاخته با استفاده از روش‌های آسیب‌شناسی و انگل‌شناسی انجام می‌شد. در روش انگل‌شناسی از روش رنگ‌آمیزی ذیل نلسون (Ziehl–Neelsen) اصلاح شده استفاده می‌شود. این روش خالی از اشکال نبوده است زیرا وجود مخمرها و قارچ‌ها و برخی عوامل دیگر در مدفوع و رنگ گرفتن آن‌ها با فوشین (Fuchsin) می‌تواند موجب بروز اشکالاتی در تشخیص شود. علاوه بر این؛ برای تشخیص و تفکیک اووسیست تجربه کافی لازم است. با توجه به مطالب فوق ارایه راه‌کار و روش‌های نوین در تشخیص این تک یاخته که بتواند علاوه بر تأیید ابتلا به آن، گونه و زیر گونه آن را نیز از یکدیگر متمایز نماید ضروری به‌نظر می‌رسید [۱].

در ایران تاکنون مطالعات متعددی در مورد کریپتوسپوریدیوم انجام گرفته است که اغلب آن‌ها بررسی‌های اپیدمیولوژیک بوده که از جمله آن‌ها می‌توان به چند مطالعه در دو دهه اخیر در تعدادی از استان‌های کشور اشاره کرد [۲-۱۶].

در دو دهه اخیر برای تشخیص گونه و سویه‌های کریپتوسپوریدیوم استفاده از روش‌های مولکولی رایج شد. میلر (Miller) و همکاران (۲۰۰۱) موفق به ابداع تکنیکی برای استخراج DNA ژنی از اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم (*C. parvum*) از مدفوع انسان شدند با توجه به ساده، سریع، حساس و ارزان بودن این روش، به‌عنوان یک روش مناسب برای شناسایی کریپتوسپوریدیوم پاروم توسط انواع مختلف PCR مناسب شناخته شد [۱۷]. پتل (Patel) و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده از روش multiplex PCR و PCR-RFLP (PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism) با آنالیز ژن پروتئین دیواره خارجی اووسیست کریپتوسپوریدیوم گونه‌های کریپتوسپوریدیوم را از یکدیگر تفکیک نمودند [۱۸]. مورگان (Morgan) و همکاران (۱۹۹۷)، گاتئی (Gatei) و همکاران (۲۰۰۳)، لئونی (Leoni) و همکاران (۲۰۰۶) والدرون (Waldron) و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از ژن 18s rRNA کریپتوسپوریدیوم، تنوع گونه‌های انگل را در نمونه‌های انسانی کشورهای خود مورد مطالعه قرار دادند [۱۹-۲۲].

در ایران نیز مطالعاتی در زمینه تشخیص مولکولی و شناسایی ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم صورت گرفته است که از جمله می‌توان به مطالعات ابراهیم‌زاده و همکاران (۲۰۹۹)، درستکار مقدم و همکاران (۲۰۰۵)، کشاورز ریاضی و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۱۰)، قربان‌زاده و همکاران (۲۰۱۰)، ناظم‌الحسینی و همکاران (۲۰۱۱) و معمار و همکاران (۲۰۰۶ و ۲۰۰۷) اشاره کرد [۲۳-۳۰]. در اکثر این مطالعات گونه پاروم به‌عنوان گونه غالب گزارش شده است.

هدف از انجام این مطالعه تعیین گونه‌های شایع کریپتوسپوریدیوم در افراد مراجعه کننده به بیمارستان‌های علی اصغر، مفید و امام خمینی تهران با استفاده از روش PCR-RFLP و از طریق تکثیر و مطالعه ژن 18s rRNA است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی- مقطعی بوده است.

جمع‌آوری نمونه‌های انسانی

در سال ۱۳۸۹ تعداد ۱۱۲۸ نمونه مدفوع انسانی شامل ٦٤٢ نمونه از بیمارستان مفید و بیمارستان حضرت علی اصغر و ٤٥٦ از بیماران بیمارستان امام خمینی و ۳۰ نمونه از بیماران مبتلا به ویروس HIV (Human Immunodeficiency Virus) بستری در بخش عفونی بیمارستان امام خمینی در تهران جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها بلافاصله پس ازانتقال به آزمایشگاه در محلول ۲/۵ درصد بی‌کرومات پتاسیم قرار داده شد و در یخچال نگهداری شد و پس از تهیه لام با روش فرمالین اتر

تغلیظ و با روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی اختصاصی شد.

استخراج DNA

ابتدا اووسیست‌ها با روش شناورسازی با سوکورز روش Current تغلیظ شدند [۱]. برای استخراج DNA از اووسیست‌های انگل از کیت QIA amp و روش فنل کلروفرم استفاده شد.

تکثیر قطعه ژن با PCR

در این پژوهش قطعه ژن 18s rRNA جدایه‌ها با روش Nested-PCR تکثیر گردید. از این رو از ٤ آغازگر (Primer) (دو آغازگر خارجی و دو آغازگر داخلی) برای ژن 18s rRNA استفاده شد.

برای تکثیر این ژن در کریپتوسپوریدیوم از آغازگرهای طراحی شده توسط ژیائو (Xiao) و همکاران (۲۰۰۱) [۳۱] برای Nested-PCR به منظور تکثیر قطعه ۸٤٥ نوکلئوتیدی از همین ژن استفاده شد که توالی آن برای آغازگرهای خارجی به شرح زیر است:

Cr18PA: F-5´- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG -3´

Cr18PB: R-5´-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3´

و آغازگرهای داخلی آن در Nested به شرح زیر است که توسط این زوج آغازگر یک قطعه به‌طول ۸٤٥ نوکلئوتیدی تکثیر شد.

Cr18NA: F-5´- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3´

Cr18NB: R-5´- CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A-3´

واکنش PCR در دو مرحله انجام شد. در هر دو مرحله PCR به حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰x و مقدار ۲ میکرولیتر از محلول $MgCl_2$ با غلظت ٥۰ میلی‌مولار و مقدار ۱ میکرولیتر از dNTP با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و ۰/۲٥ میکرولیتر از *Taq* polymerase و ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی (محصول PCR در مرحله دوم) و ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای F و R که به حجم کلی محلول اضافه شد و بقیه آن تا ۳۰ میکرولیتر با آب مقطر تکمیل شد.

مرحلهٔ واسرشت ابتدایی ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٥ دقیقه، مرحلهٔ واسرشت ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ ثانیه، مرحلهٔ اتصال آغازگرها ٥٦ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۰ ثانیه، مرحلهٔ طویل شدن زنجیره ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦۰ ثانیه که این ۳ مرحله به تعداد ۳۲ چرخه و در نهایت یک چرخه ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در مرحله دوم برنامه دستگاه مشابه مرحله اول بود و فقط درجه اتصال (Annealing) کاهش یافت و به ٥۰ رسید. پس از انجام PCR دوم ٤ میکرولیتر محصول PCR داخل چاهک‌های ژل آگارز ۲/٥ درصد در کنار نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت‌بازی DNA (Fermentas، آلمان) بارگذاری و در ولتاژ ۸۰ به‌مدت ٤٥ دقیقه الکتروفورز شد. سپس با استفاده از ترانس لومیناتور (Transilluminator) باندهای تشکیل شده مشاهده و با نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی مقایسه شد.

هضم آنزیمی

محصولات DNA به‌دست آمده که دارای باند قوی و خوب بود توسط یک آنزیم برشی Vsp1 شرکت Fermentas (آلمان) برش زده شد. الگوهای هضم آنزیمی برای گونه‌های مورد مطالعه با آنزیم Vsp1 در شکل ۱ نشان داده شده است. برای انجام این کار در یک واکنش ۳۰ میکرولیتری مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR دوم به ۳ میکرولیتر از بافر آنزیم و ۱۰ واحد از آنزیم مورد نظر (تقریباً ۰/٥ میکرولیتر) و ۱۷/٥ میکرولیتر از آب مقطر دیونایز اضافه شد و مدت ۳ ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با غیر فعال کردن آنزیم در ٦۰ درجه سانتی‌گراد، باندهای بریده شده روی ژل آگارز ۲ درصد مطالعه شد.

شکل ۱ الگوهای هضم آنزیمی قطعه ۸۴۵ جفت‌بازی ژن 18s rRNA با آنزیم Vsp1 برای گونه‌های مختلف کریپتوسپوریدیوم

تعیین ترادف ژن

محصول PCR با استفاده از کیت (Roche، آلمان) طبق دستورالعمل سازنده خالص‌سازی شد. برای تعیین توالی محصول به شرکت ژن فناوران ایران ارسال شد. توالی به‌دست آمده پس از ثبت در بانک ژن با برنامه بلاست با سایر توالی‌های موجود در بانک مقایسه شد.

رسم درخت فیلوژنی

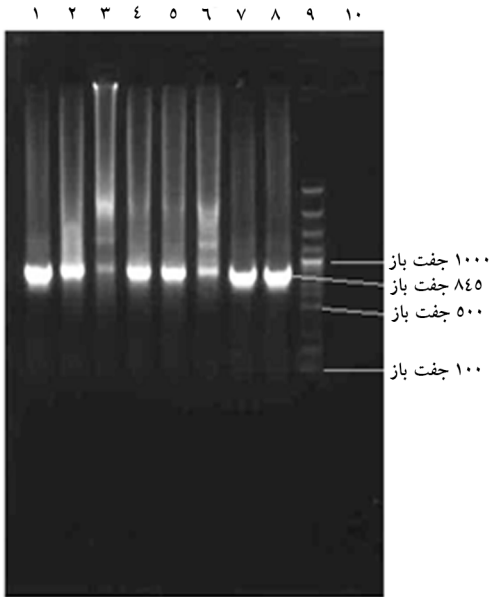
درخت فیلوژنی نمونه جدا شده در این مطالعه با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega6 و روش Neighbor Joining Tree رسم شد.

نتایج

از مجموع ۱۱۲۸ نمونه رنگ‌آمیزی شده با ذیل نلسون تعداد ۱۲ نمونه (۱/۰۶ درصد) مثبت تشخیص داده شد که ۱۱ عدد آن از کودکان و بیماران عادی و یک مورد از فرد مبتلا به HIV بود.

نتایج Nested-PCR برای ژن 18s rRNA

تمامی نمونه‌های مثبت فوق با روش Nested- PCR توانستند قطعه‌ای به‌طول ۸۴۵ نوکلئوتید را تکثیر نمایند (شکل ۲).

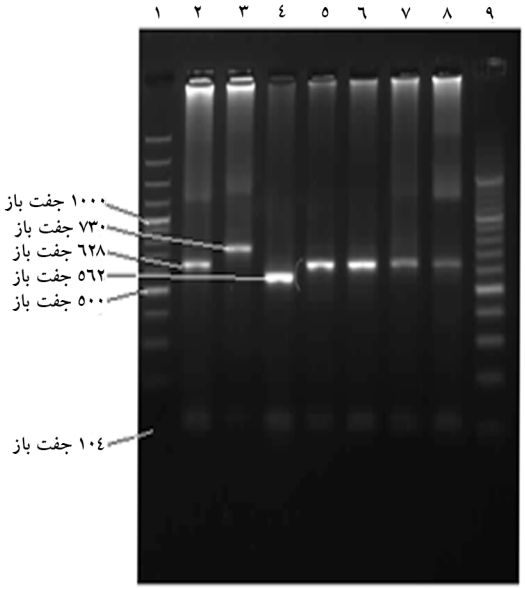


شکل ۲ قطعه ۸۴۵ جفت‌بازی ژن 18s rRNA نمونه‌های گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان (چاهک ۱–۸)، چاهک شماره ۹ نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی و چاهک ۱۰ کنترل منفی است.

نتایج RFLP

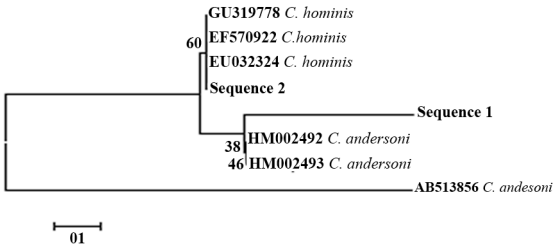
برای تمایز جدایه‌های انسانی از آنزیم Vsp1 استفاده شد. قطعه ۸۴۵ نوکلئوتیدی ژن 18s rRNA در اثر آنزیم Vsp1 شکسته شد و از مجموع ۱۲ نمونه انسانی، ۱۰ نمونه که سه باند ۶۲۸، ۱۱۳ و ۱۰۴ جفت نوکلئوتیدی را نشان داد به‌عنوان کریپتوسپوریدیوم پاروم، یک نمونه با دو باند ۷۳۰ و ۱۱۵

جفت نوکلئوتیدی به‌عنوان کریپتوسپوریدیوم آندرسونی (*C. andersoni*) و یک نمونه با چهار باند ۵۶۲، ۱۰۳، ۱۰۷، ۷۰ جفت نوکلئوتیدی به‌عنوان کریپتوسپوریدیوم هومنیس (*C. hominis*) تشخیص داده شد (شکل ۲ و ۳).



شکل ۳ قطعه ۸٤٥ جفت‌بازی از ژن 18s rRNA نمونه‌های گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان هضم شده با آنزیم Vsp1 چاهک (۲-۸) چاهک ۹ و ۱) نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی ، باندهای ۲، ٥ ، ٦، ۷ و ۸ کریپتوسپوریدیوم پاروم، باند ۳ کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و باند ٤ کریپتوسپوریدیوم هومنیس است.

ترادف جدایه کریپتوسپوریدیوم هومنیس مشابه جدایه کریپتوسپوریدیوم هومنیس‌های ثبت شده در بانک ژن به شماره دسترسی EF570922.1، GU319778 و EU032324 است. ترادف جدایه کریپتوسپوریدیوم آندرسونی جدا شده از انسان به‌عنوان *Cryptosporidium* sp در بانک ژن با شماره EU311203 به ثبت رسید. این مورد اولین گزارش آلودگی انسان به گونه آندرسونی در کشور به‌شمار می‌آید. این ترادف با ترادف ژن گونه آندرسونی با شماره‌های دسترسی HM002492، HM002493 و AB513856 مشابهت دارد (شکل ٤ و ٥).



شکل ٤ درخت فیلوژنی نمونه جدا شده توالی (sequence) ۱ و ۲ در این مطالعه با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن با روش Neighbor Joining Tree

gcctttgcatgaagggtacggggattagggttcgattccggagagggagcctg
agaaacggctaccacatctaaggaaggcagcaggcgcgcaaatacccaatcc
tgacacagggaggtagtgacaagaaataacaatacagggcctaacggtcttgta
attggaatgagtgaagtataaaccccctttacgagtatcaattggagggcaagtct
ggtgccagcagccgcggtaattccagctccaatagcgtatattaaagttgttgca
gttaaaaagctcgtagttggatttctgttgtataatttattatattacccagggaattat
tatattatcaacatccttcctattatattctaaatatataggaaattttactttgaaaaaa
ttagagtggttaaagcaagcaactgccttgaatactcccgcatggaataataagg
aaggacttttgtctttcttattggttctaggacaaaagtaatggttaatagggacagt
tgggggcattcctatttaacagcccgaagggaaattcttagatttgttaaagacca
actactgccaaagcatttgccaaggatgttttcattaatcaagaaccaaagttagg
ggatccaagaccatcagataccgtcctagtcttaaccattaactatgccgactag
agattggagggtgttcct tacttcctcagcaccttatgag

شکل ٥ ترادف جدایه کریپتوسپوریدیوم آندرسونی جدا شده از انسان که به عنوان *Cryptosporidium* sp در بانک ژن با شماره EU311203 به ثبت رسید.

بحث

در مطالعه حاضر نتایج بررسی PCR-RFLP روی ژن 18s rRNA نشان داد که از میان ۱۳ جدایه انسانی ۱۰ جدایه دارای ژنوتایپ کریپتوسپوریدیوم پاروم بود (یک جدایه که از بیماران HIV مثبت به‌دست آمد نیز در این گروه قرار گرفت)، در ۲ جدایه دیگر انسانی ژنوتایپ کریپتوسپوریدیوم انسانی یا هومنیس مشاهده شد و جدایه آخر دارای مشخصات کریپتوسپوریدیوم آندرسونی بود. در ایران نیز معمار و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از 18s rRNA و Laxer locus موفق به متمایز نمودن ۳ جدایه پاروم، هومنیس و مله آگردیس (*C. meleagridis*) از انسان شدند و اثبات نمودند کریپتوسپوریدیوم پاروم حیوانی گونه غالب در آلودگی‌های انسانی است [۲۸].

اپیدمیولوژی کریپتوسپوریدیازیس انسانی پیچیده است و عوامل مختلف محیطی و منابع حیوانی اعم از حیوانات اهلی و وحشی در آلوده‌سازی انسان نقش دارند؛ بنابراین شناخت گونه‌ها و اطلاع از منابع حیوانی آن‌ها حایز اهمیت است. سابقاً گونه پاروم را تنها گونه قابل انتقال از حیوان به انسان می‌شناختند ولی به‌تدریج با به‌کارگیری روش‌های مولکولی اطلاعات بیشتری در زمینه آلودگی انسان به سایر گونه‌ها حاصل شد.

گاتئی و همکاران (۲۰۰۳) قطعه ژن 18s rRNA را برای شناسایی انواع کریپتوسپوریدیوم بررسی کردند. آن‌ها نمونه بیماران آلوده به HIV و غیر آلوده به آن را از کنیا، مالزی، برزیل، انگلستان و ویتنام استفاده کردند. این نتایج موجب تردید بیشتر در تفکر یک شکل بودن انواع کریپتوسپوریدیوم پاروم شد [۲۰]. بر همین اساس از ۳۶ جدایه مورد مطالعه ۷۵ درصد جدایه‌ها را ژنوتیپ انسانی پاروم، ۲۱/۷ درصد جدایه‌ها را ژنوتیپ گاوی پاروم، ۱/۶ درصد جدایه‌ها را گونه مله آگریدیس و ۱/۶ درصد جدایه‌ها را گونه موریس (*C. muris*) گزارش نمودند [۲۰].

به‌نظر می‌رسد برای تعیین انواع دیگر گونه‌های آلوده کننده انسانی نیاز به جمع‌آوری نمونه‌های بیشتری از سایر شهرها و روستاهای کشور است. با توجه به مطالعات انجام شده به‌نظر می‌رسد که نتایج حاصل یعنی غالب بودن ژنوتایپ کریپتوسپوریدیوم پاروم با نتایج گروهی از محققین [۲۹، ۳۲-۳۴] در دنیا مشابه است ولی در برخی بررسی‌ها [۲۰، ۳۱، ۳۵، ۳۶] شیوع بیشتر کریپتوسپوریدیوم هومنیس گزارش شده است. علت این اختلاف می‌تواند شرایط ژنتیکی، تغذیه‌ای، بهداشتی و اجتماعی فرد یا ویژگی های خاص تک یاخته در آن نقاط از دنیا باشد که آن نیز مبتنی بر الگوهای جغرافیایی و شرایط آب و هوایی و تغییرات ژنتیکی است که در اثر داروها یا سموم در نوع خاصی از تک یاخته به وقوع پیوسته و آن را در محیط خود نسبت به سایر انواع غالب یا مغلوب نموده است؛ بنابراین نتایج حاصل درحد انتظارات است.

درخصوص ابتلای انسان به کریپتوسپوریدیوم آندرسونی گزارش‌های انگشت شماری وجود دارد. از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه لئونی و همکاران (۲۰۰۶) اشاره کرد. آن‌ها با تکثیر قطعه ژن 18s rRNA اقدام به شناسایی گونه‌های کریپتوسپوریدیوم در ۲۴۱۴ نمونه مدفوع انسانی جمع‌آوری شده طی سال‌های ۱۹۸۵ الی ۲۰۰۰ در انگلستان نمودند. طبق نتایج این محققان گونه‌های متعددی شامل پاروم، هومنیس، مله آگریدیس، کانیس (*C. canis*)، سویس (*C. suis*)، فلیس (*C. felis*)، آندرسونی و سروین (*C. cervine*) تشخیص داده شد. فراوان‌ترین گونه با ۵۶/۱ درصد متعلق به پاروم بوده و گونه آندرسونی ۰/۱ درصد جدایه‌ها تشکیل داده بود [۲۱].

والدرون و همکاران (۲۰۱۱) نیز با تکثیر قطعه ژن 18s rRNA اقدام به شناسایی گونه‌های کریپتوسپوریدیوم در ۲۶۱ نمونه مدفوع انسانی در نیوساوت ولز استرالیا نمودند. طبق نتایج این محققان چهار گونه [هومنیس، پاروم، آندرسونی و فایری (*C. fayeri*)] تشخیص داده شد. در آنالیز برش آنزیمی ۶۶ درصد جدایه‌ها گونه هومنیس، ۳۳ درصد گونه پاروم، ۰/۵ درصد گونه آندرسونی و ۰/۵ درصد گونه فایری بودند [۲۲].

با توجه نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که گرچه گونه پاروم به‌عنوان گونه شایع در انسان‌ها شناخته شده است ولی ممکن است افراد به گونه هومنیس و آندرسونی نیز مبتلا شوند. همانند سایر مناطق دنیا در ایران نیز آلودگی انسان به گونه‌های حیوانی کریپتوسپوریدیوم دور از انتظار نیست، بنابراین کسب اطلاعات کافی و برنامه‌ریزی برای کنترل این آلودگی در حیوانات، کمک بزرگی برای پیشگیری از ابتلا انسان به این انگل است.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی انگل شناسی است و کلیه اعتبار مالی آن توسط دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است. لذا نویسندگان لازم می دانند از

معاونت پژوهشی دانشکده و دانشگاه نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

[1] Thompson RC[1], Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Adv Parasitol 2005; 59: 77-158.

[2] Azami M. Dorostkar Moghadam D. Prevalence of *Cryptosporidium* in children under 5 years of age, immunocompromised patients and high risk persons in isfahan province. Iranian South Med J (ISMJ) 2008; 11(1): 47-54.

[3] Dehkordy AB, Rafiei A, Alavi S, Latifi S. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients, in South-west of Iran, 2009-10. Iran J Parasitol 2010; 5(4): 42-7.

[4] Dabirzadeh M, Baghaei M, Bokaeyan M, Goodarzei MR. Study of *Cryptosporidium* in children below five years of age with diarrhea in referring Ali-Asghar Pediatric Hospital of Zahedan. J Gorgan Uni Med Sci 2003; 5(1): 54-59. (Persian)

[5] Hamedi Y, Safa O, Haidari M. *Cryptosporidium* infection in diarrheic children in southeastern Iran. Pediatr Infect Dis J 2005; 24(1): 86-8.

[6] Hazrati Tappeh KH, Gharavi MJ, Makhdoumi K, Rahbar M, Taghizadeh A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection in renal transplant and hemodialysis patients. Iranian J Publ Health 2006; 35(3): 54-7.

[7] Heidarnegadi SM, Mohebali M, Maraghi SH, Babaei Z, Farnia SH, Bairami A, Rzaeian M. *Cryptosporidium* spp. infection in human and domestic animals. Iran J Parasitol 2012; 7(1): 53-8.

[8] Khalili B, Shahabi GHA, Khayeri S, Khalili M, Samadizadeh M, Sarkari B. Prevalence of *Cryptosporidium* and risk factors related to cryptosporidiosis in hospitalized children under 5 years of age due to diarrhea (Shahrekord-2005). Armaghan Danesh 2007; 12(3(47): 105-15. (Persian)

[9] Khalili B, Mardani M. Frequency of *Cryptosporidium* and risk factors related to cryptosporidiosis in under 5-year old hospitalized children due to diarrhea. Iranian J Clin Infec Dis 2009; 4(3): 151-5.

[10] Mohammadi Ghalehbin B, Falah E, Asgharzadeh M, Kazemi Abdolhasan, Daryani A, Amani F, Amani S, Agazadeh M, Abdollahi R, Arab R. Prevalence of *Cryptosporidium* in children suffering from gasteroenteritis in Ardabil hospitals. J Ardabil Univer Med Sci (JAUMS) 2006; 6(2):176-82. (Persian)

[11] Mosayebi M, Eslamirad Z. Evaluation prevalence of *Cryptosporidium* in fecal specimens of children under age of 5 in Amir Kabir Hospital- Arak. Arak Medical University Journal (AMUJ) 2001; 4(1): 30-6. (Persian)

[12] Saneian H, Yaghini O, Yaghini A, Modarresi MR, Soroshnia M. Infection rate of *Cryptosporidium parvum* among diarrheic children in Isfahan. Iran J Pediatr 2010; 20(3): 343-7.

[13] Sazmand A, Rasooli A, Nouri M, Hamidinejat

H, Hekmatimoghaddam S. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in camels and involved people in Yazd province, Iran. Iran J Parasitol 2012; 7(1): 80-4.

[14] Sharif M, Ziaee H, Gholami SH. Study on prevalence rate of *Cryptosporidium* in patients receiving immunosuppressive drugs. J Guilan Uni Med Sci 2004; 13(51): 16-22. (Persian)

[15] Talar SA, Momtazmanesh N, Talebian A, Ghasemzadeh M, Taghavi A, Arbabi M, Talari MR. *Cryptosporidium* infection among children referring to central laboratory of Kashan, 1999-2000. Med J Mashad Uni Med Sci 2002; 45(75): 79-84. (Persian)

[16] Millar C, Moore J, Lowery C, McCorry K, Dooley J. Successful PCR amplification of genomic DNA from *Cryptosporidium parvum* oocysts extracted from a human faecal sample: a rapid and simple method suited for outbreak analysis. Int J Hyg Environ Health 2001; 204(2-3): 191-4.

[17] Hazrati Tappeh KH, Rahbar M, Hejazi S, Mostaghim M. *Cryptosporidium* in children referred to oncology center of Urmia, Imam Khomeini hospital, 2001. J Ardabil Uni Med Sci (JAUMS) 2005; 5(4): 327-32. (Persian)

[18] Patel S, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. Int J Parasitol 1999; 29(8): 1241-7.

[19] 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.

[20] Gatei W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA, Beeching NJ, Hart CA. 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.

[21] Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 6): 703-7.

[22] Waldron LS, Dimeski B, Beggs PJ, Ferrari BC, Power ML. Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. Appl Environ Microbiol 2011; 77(21): 7757-65.

[23] Doroskar Moghadam D, Azami M, Salehi R, Salehi M. The identification of *Cryptosporidium* species by analysis of PCR-RFLP of the 18s rRNA gene. Iranian J Basic Med Sci 2005; 8(4):232-8.

[24] Ebrahimzadeh E, Shayan P, Nabian S, Rahbari S, Mokhber Dezfouli MR. Identification of *Cryptosporidium parvum* by PCR and its determination of protein pattern and immunogenic antigens. J Vet Res 2009; 64(1): 15-21.

[25] Keshavarz Riazi A, Nazemalhosseini Mojarad E, Haghighi A,Taghipour N, Sahebekhtiari N, Nouchi Z, Kazemi B. *Cryptosporidium* genetic diversity based on analysis of COWP, SSU-rRNA and TRAP-C2 polymorphic genes in

children with diarrhea in Tehran and Qazvin Provinces: A survey from Iran. Pejouhandeh 2010; 14(6): 299-306. (Persian)

[26] Keshavarz A, Athari A, Haghighi A, Kazemi B, Abadi A, Nazemalhosseini Mojarad E, Kashi L. Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. among children with diarrhea in Tehran and Qazvin Provinces, Iran. Iranian J Parasitol 2008; 3(3): 30-6.

[27] Ghorbanzadeh B, Sadraei J, Emadi H. Diagnosis of *Cryptosporidium* and intestinal Microsporidia in HIV/AIDS patients with staining and PCR methods on 16srRNA gen. Aark Medical University Journal (AMUJ) 2012; 15(66): 37-47. (Persian)

[28] Meamar AR, Guyot K, Certad G, Dei-Cas E, Mohraz M, Mohebali M, Mohammad K, Mehbod AA, Rezaie S, Rezaian M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran. Appl Environ Microbiol 2007; 73(3): 1033-5.

[29] Meamar AR, Rezaian M, Rezaie S, Mohraz M, Mohebali M, Mohammad K, Golestan B, Guyot K, Dei-Cas E. SSU-rRNA gene analysis of *Cryptosporidium* spp. in HIV positive and negative patients. Iranian J Publ Health 2006; 35(4): 1-7.

[30] Nazemalhosseini Mojarad E, Keshavarz A, Taghipour N, Haghighi A, Kazemi B, Athari A. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. in clinical samples: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C2 gene. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2011; 4(1): 29-33.

[31] Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH, Lal AA. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J Infect Dis 2001; 183(3): 492-7.

[32] Guyot K, Follet-Dumoulin A, Recourt C, Lelièvre 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.

[33] Helmy MM, Rashed LA, el-Garhy MF. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates obtained from humans. J Egypt Soc Parasitol 2004; 34(2): 447-58.

[34] Hajdusek O, Ditrich O, Slapeta J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. Vet Parasitol 2004; 122(3): 183-92.

[35] Homan W, van Gorkom T, Kan YY, Hepener J. Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis. Parasitol Res 1999; 85(8-9): 707-12.

[36] Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RC. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. J Clin Microbiol 1998; 36(4): 995-8.