

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

Abdolhossein Dalimi^{1*}, Farid Tahvildar², Fatemeh Ghaffarifar³, Bahram Kazemi⁴

- 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 Molecular 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 hominis* 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

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

عبدالحسین دلیمی^{۱*}، فرید تحویلدار بیدرونی^۲، فاطمه غفاری فر^۳، بهرام کاظمی دمنه^۴

- 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: تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی
 Email: dalimi_a@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۳/۰۷

دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۰۷

چکیده

هدف: کریپتوسپورییدیوزیس 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 کریپتوسپورییدیوم 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 18s rRNA با روش Nested-PCR تکثیر، سپس برای تشخیص گونه، محصول PCR با آنزیم محدود کننده VspI 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 ۸۴۵ جفت‌بازی ژن 18s rRNA با آنزیم VspI برش داده شد. پس از برش آنزیمی روی ژل آگارز ۲/۵ درصد، ۱۰ نمونه به‌عنوان کریپتوسپورییدیوم پاروم و بر مبنای الگوی برش آنزیمی و ترداف بازی یک نمونه به‌عنوان کریپتوسپورییدیوم آندرسونی و یک نمونه به‌عنوان کریپتوسپورییدیوم 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، کریپتوسپورییدیوم آندرسونی، ژن 18s rRNA، Nested-PCR، تهران

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

مقدمه

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

تشخیص گونه کریپتوسپورییدیوم جدا شده از انسان در تهران

گونه‌های کریپتوسپورییدیوم را از یکدیگر تفکیک نمودند [۱۸]. مورگان (Morgan) و همکاران (۱۹۹۷)، گاتنی (Gatei) و همکاران (۲۰۰۳)، لئونی (Leoni) و همکاران (۲۰۰۶) والدرون (Waldron) و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از ژن 18s rRNA کریپتوسپورییدیوم، 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 کریپتوسپورییدیوم 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 کریپتوسپورییدیوم 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 ۶۴۲ نمونه از بیمارستان مفید و بیمارستان حضرت علی اصغر و ۴۵۶ 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 از انتقال 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

بیماری تک یاخته‌ای به نام کریپتوسپورییدیوم (*Cryptosporidium*) است که از کوکسیدیایها (*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، جامع‌تر و 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 کریپتوسپورییدیوم 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 کریپتوسپورییدیوم استفاده از روش‌های مولکولی رایج شد. میلر (Miller) و همکاران (۲۰۰۱) موفق به ابداع تکنیکی برای استخراج DNA ژنی از اووسیست کریپتوسپورییدیوم پاروم (*C. parvum*) از مدفوع انسان شدند با توجه به ساده، سریع، حساس و ارزان بودن این روش، به‌عنوان یک روش مناسب برای شناسایی کریپتوسپورییدیوم 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 کریپتوسپورییدیوم

تغلیظ و با روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی اختصاصی شد.

استخراج DNA

ابتدا اوویست‌ها با روش شناورسازی با سوکورز روش Current تغلیظ شدند [۱]. برای استخراج DNA از اوویست‌های 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 ۴ 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 ژیانو (Xiao) و همکاران (۲۰۰۱) [۳۱] برای Nested-PCR به منظور تکثیر قطعه ۸۴۵ 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 به طول ۸۴۵ 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 ۱۰x PCR و مقدار ۲ میکرولیتر از محلول $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار

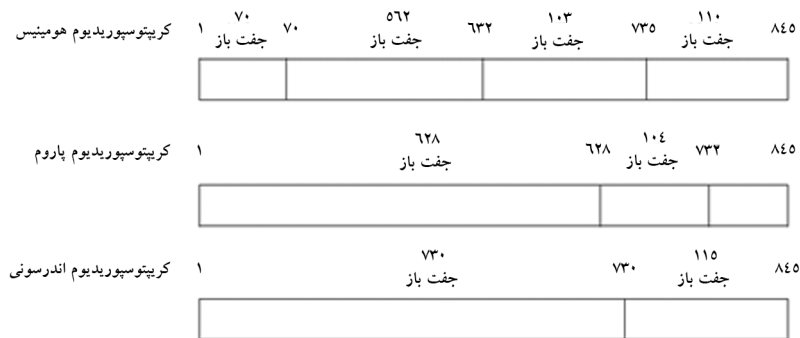
و مقدار ۱ میکرولیتر از dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار و ۰/۲۵ میکرولیتر از *Taq polymerase* و ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی (محصول PCR در مرحله دوم) و ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای F و R که به حجم کلی محلول اضافه شد و بقیه آن تا ۳۰ میکرولیتر با آب مقطر تکمیل شد.

مرحله واسرشت ابتدایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله طویل شدن زنجیره ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه که این ۳ مرحله به تعداد ۳۲ چرخه و در نهایت یک چرخه ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. در مرحله دوم برنامه دستگاه مشابه مرحله اول بود و فقط درجه اتصال (Annealing) کاهش یافت و به ۵۰ رسید. پس از انجام PCR دوم ۴ میکرولیتر محصول PCR داخل چاهک‌های ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت‌بازی DNA (Fermentas، آلمان) بارگذاری و در ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. سپس با استفاده از ترانس لومیناتور (Transilluminator) باندهای تشکیل شده مشاهده و با نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی مقایسه شد.

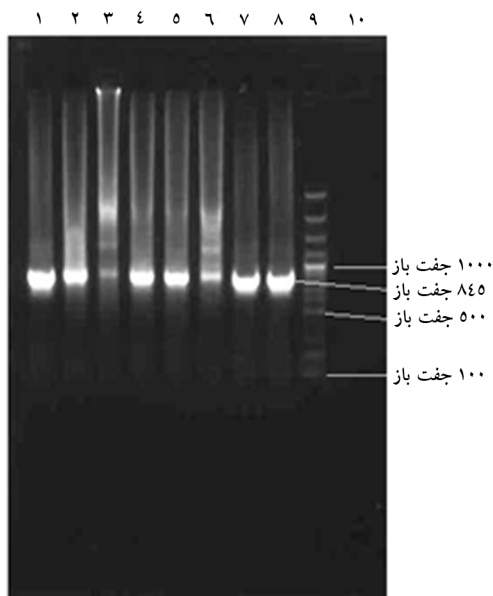
هضم آنزیمی

محصولات DNA به دست 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 ۰/۵ میکرولیتر) و ۱۷/۵ میکرولیتر از آب مقطر دیونایز اضافه شد و مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس با غیر فعال کردن آنزیم در ۶۰ درجه سانتی گراد، باندهای بریده شده روی ژل آگارز ۲ درصد مطالعه شد.

تشخیص گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان در تهران



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



شکل ۲ قطعه ۸۴۵ جفت‌بازی ژن 18s rRNA نمونه‌های گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان (چاهک ۱-۸)، چاهک شماره ۹ نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت‌بازی 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

تعیین ترادف ژن

محصول PCR با استفاده از کیت (Roche، آلمان) طبق دستورالعمل سازنده خالص‌سازی شد. برای تعیین توالی محصول به شرکت ژن فناوری 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

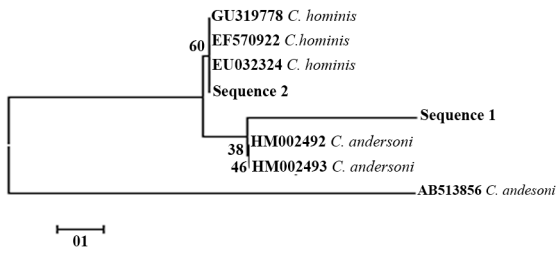
درخت فیلوژنی نمونه جدا شده در این مطالعه با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega6 و روش Neighbor Joining Tree رسم شد.

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 ۴ 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

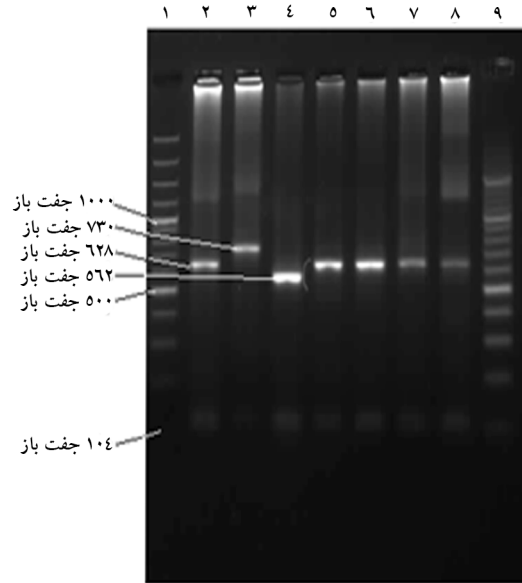
gccttgcgatgaagggtacgggattagggttcgattccggagaggagcctg
 agaaacggctaccacatctaaggaagcagcagcgcgcaatacccaatcc
 tgacacagggagtagtgacaagaataacaatcagggcctaacggctctgta
 attggaatgagtgagataaaccccttacgagatcaattggaggcaagtct
 ggtgccagcagccgctaattccagctcaatagcgtatataaagtgttgca
 gtataaaagctcgtattggttctgtgtataattattatattaccagggaattat
 tatattatcaacatcctctctattatttaaatataggaattttctttgaaaaa
 ttgagtggttaaagcaagcaactgcctgaataactcccgcgcaataataag
 aaggactttgtcttctattgttctaggaacaaagtaattgtaataaggacagt
 tgggggcatcctatttaacagcccgaaggaaattcttagattgttaaagacca
 actactccaagaagcatttccaaggatgtttcattaatcaagaacaaagttagg
 ggatccaagaccatcagataccgctctagcttaaccattaactatgccgactag
 agattggagggttctctactctcagcacctatgag

شکل ۵ ترادف جدایه کریپتوسپورییدیوم 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 کریپتوسپورییدیوم پاروم بود (یک جدایه که از بیماران HIV مثبت به دست آمد نیز در این گروه قرار گرفت)، در ۲ جدایه دیگر انسانی ژنوتایپ کریپتوسپورییدیوم انسانی یا هومینیس مشاهده شد و جدایه آخر دارای مشخصات کریپتوسپورییدیوم 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، هومینیس و مله آگردیس (*C. meleagridis*) از انسان شدند و اثبات نمودند کریپتوسپورییدیوم پاروم حیوانی گونه غالب در آلودگی‌های انسانی است [۲۸].

جفت نوکلئوتیدی به عنوان کریپتوسپورییدیوم آندرسونی (*C. andersoni*) و یک نمونه با چهار باند ۵۶۲، ۱۰۳، ۱۰۷، ۷۰ جفت نوکلئوتیدی به عنوان کریپتوسپورییدیوم هومینیس (*C. hominis*) تشخیص داده شد (شکل ۲ و ۳).



شکل ۳ قطعه ۸۴۵ جفت‌بازی از ژن 18s rRNA نمونه‌های گونه کریپتوسپورییدیوم جدا شده از انسان هضم شده با آنزیم Vsp1 (چاهک ۲-۸) چاهک ۹ و ۱) نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی، باندهای ۵، ۲، ۶، ۷ و ۸ کریپتوسپورییدیوم پاروم، باند ۳ کریپتوسپورییدیوم آندرسونی و باند ۴ کریپتوسپورییدیوم هومینیس است.

ترادف جدایه کریپتوسپورییدیوم هومینیس مشابه جدایه کریپتوسپورییدیوم هومینیس‌های ثبت شده در بانک ژن به شماره دسترسی EU032324، GU319778، EF570922.1 و EU311203 است. ترادف جدایه کریپتوسپورییدیوم آندرسونی جدا شده از انسان به عنوان *Cryptosporidium* sp در بانک ژن با شماره EU311203 به ثبت رسید. این مورد اولین گزارش آلودگی انسان به گونه آندرسونی در کشور به شمار می‌آید. این ترادف با ترادف ژن گونه آندرسونی با شماره‌های دسترسی HM002492، HM002493 و AB513856 مشابهت دارد (شکل ۴ و ۵).

تشخیص گونه کریپتوسپوریدیوم جدا شده از انسان در تهران

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 می‌دانند از

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.

گاتتی 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 ویژگی‌های 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 در حد انتظارات است.

منابع

- [1] Thompson RC¹, 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, Goodarzi 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] Hamedy 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, Makhdomi 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, Mohebbali 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 (Shahrekorde-2005). Armaghane 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 Infect 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 gastroenteritis 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 Riazzi A, Nazemalhosseini Mojarad E, Haghighi A, Taghipour N, Sahebkhitiari 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, Mohebalı 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, Mohebalı 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.