انگشت‌نگاری DNA ایزوله‌های کریپتوسپوریدیوم گاوی در استان قزوین، ایران

احسان ناظم‌الحسینی مجرد [*۱](M.Sc)، نیلوفر تقی‌پور [۲](M.Sc)، علی حقیقی [۲](Ph.D)، اکبر کشاورز [۳](Ph.D)، محمد رستمی‌نژاد [۱](M.Sc)، محمدرضا زالی [۱](M.D)

۱- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی*

۳- *اداره بهداشت و درمان نیروی زمینی ارتش جمهوری اسلامی ایران، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی ۶۶۰ نزاجا*

چکیده

سابقه و هدف: کریپتوسپوریدیوم تک یاخته‌ای کوچک از کوکسیدیاها است که دامنه گسترده‌ای شامل انسان، حیوانات اهلی و وحشی را آلوده می‌کند. از آن‌جایی‌که هیچ اطلاعاتی از ساب تایپ‌های ایزوله‌های جداشده از ایران وجود ندارد، هدف این مطالعه انگشت‌نگاری DNA ایزوله‌های جدا شده از گاوهای آلوده در استان قزوین بر اساس بررسی توالی به دست آمده از ژن GP60 بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مجموعاً ۲۵ ایزوله کریپتوسپوریدیوم پاروووم جدا شده از گاوهای آلوده در دام‌داری‌های استان قزوین مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی ساب ژنوتایپ، نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن GP60 تکثیر و سپس، توالی آنها تعیین شد.

یافته‌ها: بررسی توالی ژن GP60 در ۲۵ ایزوله C. parvum وجود دو ساب ژنوتایپ اصلی (۲۳/۲۵)IIa و (۲/۲۵) IId را مشخص نمود، هم‌چنین، وجود سه ساب ژنوتایپ فرعی شامل (۲۲/۲۵)IIa A15G2R1، (۱/۲۵) IIa A16G3R1 و (۲/۲۵) IId A15G1 در این ایزوله‌ها مشخص گردید.

نتیجه‌گیری: امروزه گونه‌های زئونوز جدیدی مشخص شده است که هم از نظر شدت آلودگی نسبت به نوع انسانی بیماری شدیدتری ایجاد کرده و هم راه انتقال و مخزن آن‌ها مشخص نیست. لذا تعیین گونه، ژنوتایپ و ساب ژنوتایپ‌های کریپتوسپوریدیوم جهت مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و به خصوص تعیین مخازن حیوانی و بهبود روش‌های کنترل و پیش‌گیری به دلیل عدم داروی موثر برای این عفونت لازم و ضروری است.

واژه‌های کلیدی: کریپتوسپوریدیوم- انگشت نگاری DNA – ژن gp60

مقدمه

کریپتوسپوریدیوزیس یک بیماری انگلی است که توسط تک یاخته‌ای کوچک از کوکسیدیاها از جنس کریپتوسپوریدیوم ایجاد می‌شود. این تک یاخته طیف وسیعی از میزبانان شامل پستانداران از جمله انسان، پرندگان، خزندگان و ماهی را آلوده می‌نماید [۱].

اهمیت مشترک بودن آن بین انسان و دام باعث شده است که در دنیای پزشکی و دامپزشکی جایگاه خاصی را به خود اختصاص دهد و آگاهی از این که بیش از ۹۰٪ گاوداری‌ها و بیش از ۵۰٪ گوساله‌های یک گاوداری می‌تواند آلوده باشند، به وضوح اهمیت زیاد این انگل را نشان می‌دهد. تنها در یک اپیدمی در شهر میلواکی ایالات ویسکانسین آمریکا، بیش از

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۱۸ نمابر: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۱۷

Email: ehsanmojarad@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱۵

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

۴۰۳ هزار نفر اختلال ناشی از این عامل را بروز دادند [۲]. یک معضل بزرگ در درک چگونگی انتقال عفونت کریپتوسپوریدیوم نبودن خصوصیات مورفولوژی واضح در افتراق یک گونه از کریپتوسپوریدیوم از سایر گونه‌ها است. علاوه بر این، مشکلات در تشخیص باعث سردرگمی در تاکسونومی کریپتوسپوریدیوم شده است. اگر چه آنالیز ترتیب DNAنشان داده است که این جنس پیچیده بوده و دارای بیش از ۱۸ گونه متفاوت است و روش‌های معمول برای تمایز گونه‌ها قابل اعتماد نیستند [۴،۳].

مطالعات مولکولی مختلفی طی سال‌های اخیر در ایران به بررسی ژنوتایپ‌های این انگل در انسان و دام پرداخته است. که از مهم‌ترین آن‌ها مطالعه کشاورز و همکاران است که به بررسی ژنوتایپ این انگل در گاوهای آلوده و کودکان اسهالی با استفاده از ژن SSU rRNA می‌باشد [۶،۵]. هم‌چنین معمار و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ به بررسی گونه‌های آلوده‌کننده در افراد HIV مثبت با استفاده از ناحیه 18S rRNA پرداخت [۷].

اخیراً برخی محققین روش‌های مولکولی بسیار اختصاصی را مورد استفاده قرار داده‌اند که قادر است این انگل را در حد ساب ژنوتایپ متمایز نماید. انجام مطالعات انگشت‌نگاری DNA جهت تعیین الگوی ژنتیکی کریپتوسپوریدیوم و نهایتاً آشکار شدن الگوی انتقال این انگل از ضروریات است [۸].

یکی از این روش‌ها، استفاده از آنالیز توالی‌های ژن گلیکوپروتئین GP60 (Cpgp15/45) می‌باشد، که امکان شناسایی ساب تایپ‌های اصلی (Subtype families) و فرعی (Subtypes) را در هر نمونه فراهم می‌سازد. این ژن یک پروتئین اولیه را کد می‌کند که از شکافته شدن پرتئولیتیک آن، دو گلیکوپروتئین سطحی کامل به نام gp45 و gp15 (Cp17) حاصل می‌شود [۹].

توالی‌های DNA ژن GP60، هتروژنسیته ژنتیکی گسترده‌ای را میان ژنوتیپ‌های دامی و انسانی کریپتوسپوردیوم نشان داده است که نهایتاً منجر به شناسایی ساب تایپ‌های اصلی Ia, Ib, Id, Ie, If برای ژنوتیپ انسانی و IIa, IIb, IIc, IId, IIe IIf برای ژنوتیپ گاوی شده است [۱].

گزارشات متعددی در مورد بررسی ساب ژنوتایپ این انگل با استفاده از ژن GP60 در سراسر دنیا وجود دارد که از آن موارد می‌توان به مطالعه Peng و همکاران در سال ۲۰۰۳ اشاره نمود. در این مطالعه ۲۴۸ نمونه انگل جدا شده از دام، ۱۷ نمونه انگل از انسان و ۱۶ نمونه کریپتوسپوریدیوم جداشده از آب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان از توانایی این ژن به منظور بررسی ساختار اپیدمیولوژی انگل، نحوه انتقال و شناسایی منبع عفونت دارد [۱۰].

از آن‌جایی که هیچ اطلاعاتی از ساب تایپ‌های ایزوله‌های جداشده از ایران بر اساس ژن GP60 وجود ندارد، هدف از این مطالعه بررسی توالی به دست آمده از این ژن در ایزوله‌های جدا شده از گاوهای آلوده در استان قزوین به منظور تعیین ساب تایپ‌های اصلی و فرعی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مجموعاً ۲۵ ایزوله از گاوهای آلوده ۱۶ دامداری استان قزوین جمع‌آوری شده و مورد بررسی قرار گرفت. تمامی نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی برای گونه کریپتوسپوریدیوم مثبت تشخیص داده شدند، هم‌چنین ژنوتایپ این ایزوله‌ها با ژن SSU rRNA مورد تائید قرار گرفته است [۶].

به منظور بررسی ساب تایپ ایزوله‌ها، واکنش Nested PCR برای ژن GP60 با استفاده از دو جفت پرایمر انجام گرفت. محصول PCR اول به عنوان الگو در دور دوم PCR مورد استفاده قرار گرفت، در این مرحله از جفت پرایمر دوم (پرایمرهای داخلی) استفاده شد که یک قطعه bp500-400 را بسته به نوع ساب تایپ ایزوله تکثیر نمود. توالی پرایمرها و شرایط PCR برای GP60 در جدول ۱ مشخص شده است. قابل ذکر است که دناتوراسیون اولیه در هر دو مرحله، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت۳ دقیقه و طویل شدن نهایی در هر دو ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۷ دقیقه بوده است (جدول ۱).

محصول نهایی PCR متعاقب الکتروفورز بر روی ژل ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید، با دستگاه (Upland, CA,

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

Transilluminator (UV USA) مشاهده گردید. تعیین توالی محصول PCR با استفاده از دستگاه 3130x1 Genetic Analyzer (شرکت Applied Biosystems (ABI)، آمریکا) و با استفاده از کیت BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing انجام گرفت.

قسمت‌های پلی‌مرف ژن، با استفاده از نرم‌افزار multalin http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

بررسی توالی ژن GP60 در ۲۵ ایزوله کریپتوسپوریدیوم پاروم وجود دو ساب تایپ اصلی (۲۳/۲۵) IIa و (۲/۲۵) Id را مشخص نمود.

با بررسی نواحی تکرار شونده در میان ایزوله‌های موجود در هر ساب تایپ اصلی، ساب تایپ فرعی ایزوله‌ها مشخص گردید. دو ساب تایپ فرعی IIa A15G2R1 و IIa A16G3R1 در میان ساب تایپ اصلی IIa و ساب تایپ فرعی IId A15G1 در میان ساب تایپ اصلی IIa مشاهده گردید. میزان شیوع ساب تایپ‌های اصلی و فرعی در بین ایزوله‌های جداشده از گاوهای آلوده در جدول ۲ آمده است. ترادف نوکلئوتید ساب تایپ‌های فرعی مشاهده شده با شماره‌های AB560739, AB560740 و AB560741 در بانک اطلاعات ژنی GenBank/DDBJ/EMBL ثبت شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در میان ایزوله‌های C. parvum جدا شده از گاوهای آلوده در استان قزوین دو ساب تایپ IIa و IId شناخته شد، که ساب تایپ IIa گونه غالب در این منطقه است. این نتیجه مشابه یافته اکثر کشورهای دنیا مانند پرتغال، کانادا، انگلستان، ایرلند و امریکا است [۱۰-۱۴]. از طرفی در مطالعه‌ای در مصر IIdA20G1 گونه غالب معرفی شده است [۱۵]. در مطالعه ای که در کشور پرتغال انجام شد با بررسی ساب ژنوتایپ ۴۱

جدول ۱. توالی پرایمرها و شرایط PCR برای *GP60*

Primer	Sequence[a]	Temp (°C)/time (sec) Denaturing	Annealing	Extension	Product size (bp)	Cycles	Ref
PCR 1							
F(5′-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3′)		94/45	40/45	72/60	850-950	32	(10)
R(5′-GCAGAGGAACCAGCATC-3′)							
PCR2							
F (5′-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3′)		94/35	42/35	72/60	400-500	32	(10)
R (5′-GAGATATATCTTGGTGCG-3′)							

جدول ۲ . میزان شیوع ساب تایپ ها ی اصلی و فرعی در بین ایزوله های جداشده از گاو

strains	subtype families/ subtype		
bovine Cryptosporidium (No. of isolates 25)	IIa A15G2R1	IId A15G1	IIa A16G3R1
	22 (88%)	2(8%)	1(4%)
Accession number	(AB 560741)	(AB 560740)	(AB 560739)

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

ایزوله‌ی جدا شده از نشخوارکنندگان اهلی و وحشی وجود تنها دو ساب ژنوتایپ اصلی IIa و IId گزارش گردید [۱۶]. بر اساس مطالعه‌ای که توسط Sulaiman و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی نمونه‌های کودکان اسهالی صورت گرفت نیز این دو ساب ژنوتایپ (IIa و IId) شیوع بالاتری داشتند [۱۷].

غالب بودن ساب تایپ IIa در گاوهای آلوده اکثر کشورها از جمله ایران و مشخص شدن نقش مستقیم این ساب تایپ کریپتوسپوریدیوم در چندین همه‌گیری با منشا آب، اهمیت این مطالعات را در سلامت محیط پررنگ‌تر می‌سازد [۱۴].

شایع‌ترین ساب تاپ فرعی در این مطالعه (۸۸٪) IIaA15G2R1 بوده که این یافته با اکثر مطالعات دنیا هم‌خوانی دارد [۱۰-۱۴]، البته در برخی مطالعات IIaA16G1R1 و IIaA18G3R1 را به عنوان ساب تایپ فرعی غالب معرفی می‌کند [۱۸،۱۹].

بیش از نیمی از حیوانات مورد مطالعه در ایرلند به ساب ژنوتایپ IIaA18G3R1 مبتلا بودند این ساب ژنوتایپ در دو همه‌گیری با منشا آب نیز در سال‌های ۲۰۰۰ و ۲۰۰۱ در ایرلند گزارش شده‌اند [۱۴،۱۹].

اختصاصیت این ساب ژنوتایپ‌ها برای مزارع مختلف نیز گزارش شده در ایالات متحده تمام ساب ژنوتایپ‌های به‌دست آمده از یک دامداری IIaA16G1R1 و ساب ژنوتایپ به‌دست آمده از دامداری دیگر IIaA16G2R1 گزارش شده است [۲،۴،۱۰].

محققین با انگشت‌نگاری میکروب‌ها و ایجاد بانک اطلاعاتی ژنتیکی آن‌ها در حد ساب ژنوتایپ نقش مهمی در کنترل همه‌گیری‌ها، کاهش گسترش پاتوژن‌های مدفوعی بین و هم‌چنین کاهش آلودگی محیط زیست با عوامل بالقوه زئونوز، مانند کریپتوسپوریدیوم را ایفا می‌کنند.

آنالیز ژن GP60 و شیوع گسترده ساب ژنوتایپ اصلی IIa و IId مشخص ساخت که انتقال زئونوز از اهمیت قابل توجهی در ایران برخوردار است. با توجه به محدودیت‌های این مطالعه از قبیل عدم وجود اطلاعات یافته‌های بالینی و حجم کم نمونه‌ها و به منظور تعیین میزان انتقال زئونوز کریپتوسپوریدیوزیس، مطالعه مولکولی گسترده‌تری در انسان و حیوانات اهلی و وحشی در مناطق جغرافیایی گوناگون مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از کلیه همکاران در مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش وکبد و گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که زمینه لازم برای اجرای این طرح را فراهم نموده‌اند تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

[1] Abe N, Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M. Subgenotype analysis of cryptosporidium parvum isolates from humans and animals in Japan using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. Parasitol Res 2006; 99: 303-305.

[2] Center for Disease Control. Cryptosporidiosis among children attending day care centers Georgia, Pennsylvanian, Michigan, California, and New Mexico. Morbid–mortal weakly Rep 1984; 33: 559-601.

[3] Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. Cryptosporidium Taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 72-97.

[4] Plutzer J, Karanis P. Genetic polymorphism in Cryptosporidium species: An update. Vet Parasitol 2009; 165: 187-199.

[5] Keshavarz A, Athari A, Haghighi A, Kazami 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: 30-36. (Persian).

[6] Keshavarz A, Haghighi A, Athari A, Kazemi B, Abadi A, Nazemalhosseini-Mojarad E. Prevalence and molecular characterization of bovine Cryptosporidium in Qazvin province. Iran. Vet. Parasitol 2009; 160: 316-318. (Persian).

[7] Meamar AR, Guyot K, Certad G, Dei-Cas E, Mohraz M, Mohebali M, et al. Molecular characterization of Cryptosporidium isolates from humans and animals in Iran. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 1033-1035,

[8] Xiao L. Molecular epidemiology of Cryptosporidiosis: an update. Exp Parasitol 2010; 124: 80-89,

[9] Leav BA, Mackay MR, Anyanwu A, O' Connor RM, Cevallos AM, Kindra G, et al. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among Cryptosporidium isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. Infect Immun 2002; 70: 3881-3890.

[10] Peng MM, Wilson ML, Holland RE, Meshnick SR, Lal AA, Xiao L. Genetic diversity of Cryptosporidium spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol Res 2003; 90: 175-180.

[11] Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and zoo ruminants in Portugal. J Clin Microbial 2003; 41: 2744-2747.

[12] Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, et al. Genotype and subtype analyses of isolates from dairy calves and humans in Ontario. Parasitol Res 2006; 99: 346-352.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

[13] Brook EJ, Anthony Hart C, French NP, Christley RM. Molecular epidemiology of Cryptosporidium subtypes in cattle in England. Vet J 2009; 179: 378-382 .

[14] Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, et al. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. Emerg Infect Dis 2002; 8: 631-633.

[15] Amer S, Honma H, Ikarashi M, Tada C, Fukuda Y, Suyama Y, Nakai Y. Cryptosporidium genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. Vet Parasitol 2010; 169: 382-386.

[16] Alves M, Xiao L, Antunes F, Matos O. Distribution of Cryptosporidium subtypes in humans, domestic and wild ruminants in Portugal. Parasitol Res 2006; 99: 287-292.

[17] Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, et al. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. J Clin Microbiol 2005; 43: 2805-2809.

[18] Plutzer J. and Karanis P. Genotype and subtype analyses of Cryptosporidium isolates from cattle in Hungary. Vet Parasitol 2007; 146: 357-362.

[19] Thompson HP, Dooley JS, Kenny J, McCoy M, Lowery CJ, Moore JE, Xiao L. Genotypes and subtypes of Cryptosporidium spp. in neonatal calves in Northern Ireland. Parasitol Res 2007; 100: 619-624.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

DNA fingerprinting of bovine Cryptosporidium isolates in Qazvin province, Iran

Ehsan Nazemalhosseini Mojarad (M.Sc)[*1], Niloofare Taghipour (M.Sc)[2], Ali Haghighi (Ph.D)[2], Akbar Keshavarz (Ph.D)[3], Mohammad Rostami Nejad (M.Sc)[1], Mohammad Reza Zali (M.D)[1]

1 - Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 - Department of Medical Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - 660 laboratory Research Center for office of health and treatment, Tehran, Iran

(Received: Accepted:)

Introduction: *Cryptosporidium* is an Apicomplexa parasite that infects humans and a wide range of domestic and wild animals. However, the sub-genotypes of the species infecting animals in Iran are unclear. The aim of the present study isto identify DNA fingerprinting of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province using sequences of GP60 gene.

Materials and Methods: In this study we investigated 25 *C. parvum* isolated form bovine in Qazvin animal husbandries. Subgenotypes were determined by DNA sequencing of 60-kDa glycoprotein gene.

Results: Using DNA sequencing of GP60 gene, two subtype families within the C. parvum included IId (15/22) and IIa (7/22) were recognized. Also three subtypes in these two subtype families included *IIa A15G2R1* (22/25), *IIa A16G3R* (1/25), *IId A15G1* (2/25) were determined.

Conclusion: Today, new zoonose strains are identified which based on severity of infection compared with human strains are more sever and the source and transmission of their infection are unclear. Therefore, determination of *C .parvum* strains, genotypes and sub-genotypes for epidemiological studies are quite necessary specially to identify the animal sources and to improve the control and prevention programs due to the lake of effective drugs for this infection.

Keywords: Cryptosporidium- DNA Fingerprinting, gp60

* Corresponding author: Fax: +98 21 22432517 ; Tel: +98 21 22432518
ehsanmojarad@gmail.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]