پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال چهاردهم، شماره ۶، پی در پی۷۲، صفحات ۲۹۹ تا ۳۰۶
بهمن و اسفند ۱۳۸۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۳/۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۹/۱۱

بررسی تنوع ژنتیکی کریپتوسپوریدیوم بر اساس آنالیز ژنهای پلی‌مورف COWP، SSU-rRNA و TRAP-C2 در کودکان مبتلا به اسهال در استانهای تهران و قزوین

دکتر اکبر کشاورز ریاضی [1*]، احسان ناظم‌المسینی مجرد [2]، دکتر علی مقیمی [3]، نیلوفر تقی‌پور [4]، نوید صاحب‌اختیاری [2]، زهرا نوچی [2]، دکتر بهرام کاظمی [5]

۱. مسئول فنی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی ۶۶۰ نزاجا، اداره بهداشت و درمان نیروی زمینی ارتش جمهوری اسلامی ایران
۲. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴. کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: کریپتوسپوریدیوم تک‌یاخته‌ای با انتشار جهانی و به عنوان یکی از عوامل مهم اسهال در کودکان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی شناخته شده است. عمده تحقیقات انجام گرفته در خصوص این انگل در ایران به بررسی شیوع آن در جوامع مختلف پرداخته است. هدف از این مطالعه تعیین تنوع ژنتیکی کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال بر اساس آنالیز ژنهای پلی‌مورف COWP، SSU-rRNA و TRAP-C2 با استفاده از تکنیک PCR- RFLP می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، طی دو سال (آذر ماه ۱۳۸۴ تا فروردین ماه ۱۳۸۷)، نمونه‌های مدفوع از ۱۲۶۳ کودک مبتلا به اسهال که به بیمارستانهای کودکان استانهای تهران و قزوین مراجعه کردند، جمع‌آوری شد. با مشاهده لام مستقیم، فرمل اتر و رنگ آمیزی اسیدفاست اصلاح شده، بررسی لازم جهت شناسایی عوامل انگلی صورت گرفت. در نهایت بر روی DNA استخراج شده از ایزوله‌ها، PCR-RFLP انجام شد.

یافته‌ها: از مجموع ۱۲۶۳ نمونه مدفوع، ۳۱ ایزوله با استفاده از روشهای مستقیم و رنگ‌آمیزی‌های تخصصی کریپتوسپوریدیوم تشخیص داده شدند، که از بین آنها پس از بررسی‌های مولکولی ۲۵ ایزوله کریپتوسپوریدیوم پاروووم، ۵ ایزوله کریپتوسپوریدیوم هومینیس و یک ایزوله هردو ژنوتیپ را نشان داد که نتایج در هر سه ژن یکسان بوده است.

نتیجه‌گیری: هر دو ژنوتیپ انسانی و گاوی در کودکان مبتلا به اسهال دیده می‌شود ولی با توجه به این که گونه غالب، کریپتوسپوریدیوم پاروووم می‌باشد، انتقال زئونوز شایعتر از انتقال انسانی بوده و تماس با دام بخصوص گوساله به عنوان مهمترین منبع آلودگی انسانی به شمار می‌رود.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، کریپتوسپوریدیوم،کودکان مبتلا به اسهال

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم یک عامل بیماریزای روده‌ای مهم با پراکندگی گسترده در دامهای جوان و انسان است (۱). با ظهور پاندمی ایدز در دهه ۱۹۸۰ بود که این تک‌یاخته به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در بیماران دچار نقص ایمنی و یکی از عوامل اسهال کودکان اهمیت جهانی یافت (۲و۳).

یک معضل بزرگ در درک انتقال عفونت کریپتوسپوریدیوم، نبودن خصوصیات مورفولوژی واضح در افتراق یک گونه کریپتوسپوریدیوم از دیگر گونه‌هاست. همچنین مشکلات در

*نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر اکبر کشاورز ریاضی؛ تهران، بزرگراه شهید بابایی، اداره بهداشت و درمان نیروی زمینی ارتش جمهوری اسلامی ایران، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی ۶۶۰ نزاجا؛ پست الکترونیک: keshavarz_akbar@yahoo.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

تشخیص باعث سردرگمی در تاکسونومی کریپتوسپوریدیوم شده است. اگر چه آنالیز سکانس DNA نشان می‌دهد که این جنس پیچیده بوده و دارای بیش از ۱۸ گونه متفاوت است، شناخت ژنوتیپ‌های متنوع در نمونه‌های به دست آمده از نقاط مختلف جهان، یک راه قطعی برای بررسی اپیدمیولوژی کریپتوسپوریدیوم است. این اطلاعات دانش ما را از چگونگی انتشار و وقوع آلودگی توسط گونه‌های انسانی و حیوانی افزایش می‌دهد (۴و۵). در ایران بر اساس روشهای مولکولی مطالعات محدودی انجام گرفته است که دو مطالعه معمار و همکاران در سال ۲۰۰۶ در افراد HIV مثبت و منفی و مطالعه پیرستانی و همکاران در سال ۲۰۰۸ در شهریار در انسان و گاو از آن جمله است (۶و۷).

در مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism یا PCR- RFLP که یک روش بسیار کارامد، نسبتاً ساده و به‌صرفه می‌باشد، تنوع ژنتیکی کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال با توجه به آنالیز ژنهای پلی‌مورف شامل Cryptosporidium Oocyst Wall Protein (COWP)، (SSU-rRNA) small subunit ribosomal RNA و (TRAP-C2) Thrombospondin Related Adhesive Protein C2 در فاصله زمانی آذر ماه ۱۳۸۴تا فروردین ماه ۱۳۸۷ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های انسانی از کودکان مبتلا به اسهال که به بیمارستان کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و تهران و مرکز طبی کودکان قزوین مراجعه کرده بودند، اخذ گردید. در بررسیهای انگل‌شناسی، پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه با یکی از روشهای مستقیم، تغلیظ (فرمالین- اتر) گسترش نازکی از نمونه روی لام تهیه شد و با رنگ‌آمیزی اسیدفاست ذیل نیلسون رنگ‌آمیزی و با عدسی ۴۰X بررسی و با ۱۰۰X از نظر وجود اووسیست کریپتوسپوریدیوم بررسی شد و نمونه‌های مثبت در محلول دی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

برای استخراج DNA با روش کیت DNA Zol، بافر DNA Zol (Invitrogene,Cat. No 10503-027.USA) که به صورت محلول آماده برای استخراج DNA ژنومیک از نمونه‌های جامد و مایع حیوانات، گیاهان، قارچ، باکتری و انگل می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت. این محلول حاوی گوانیدین است. فرایند جداسازی شامل لیز نمونه‌های بیولوژیک در محلول DNA Zol بود و سپس DNA ژنومیک با اتانول رسوب داده شد. در جریان شستشو با اتانول، DNA در آب یا NaOH ۸ میلی‌مولار حل شد.

جهت انجام nested PCR برای ژن SSU-rRNA از دو جفت پرایمر استفاده شد (جدول ۱) (۱۰). جفت پرایمر اول یک فراگمنت ۱/۳ kb از ژن SSU-rRNA را تکثیر کرد و محصول PCR اول به عنوان الگو در دور دوم PCR مورد استفاده قرار گرفت، در این مرحله از جفت پرایمر دوم استفاده شد که یک قطعه (۸۶۴-۸۲۶ bp) را بسته به نوع گونه تکثیر نمود. واکنش زنجیره پلیمراز، با شرایط زیر و به تعداد ۳۲ سیکل صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه ۹۴ درجه سانتیگراد، دناتوراسیون ۴۵ ثانیه ۹۴ درجه سانتیگراد، آنیلینگ ۴۵ ثانیه ۵۵ درجه سانتیگراد، طویل شدن ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتیگراد ، طویل شدن نهایی۷ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد. در PCR دوم فقط دمای annealing از ۵۵ درجه به ۵۸ درجه تغییر داده شد و به جای DNA از محصول PCR اول و از پرایمرهای داخلی استفاده شد.

برای انجام nested PCR با ژن (TRAP-C2) همانند روش قبل از دو جفت پرایمر استفاده شد (۱۱). جفت پرایمر اول یک قطعه ۳۶۶ bpو جفت پرایمر دوم یک قطعه ۲۶۶ bp را تکثیر کرد. واکنش زنجیره پلیمراز، با شرایط زیر و به تعداد ۳۰ سیکل صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه ۹۴ درجه سانتیگراد، دناتوراسیون ۴۵ ثانیه ۹۴ درجه سانتیگراد، آنیلینگ ۴۵ ثانیه ۵۴ درجه سانتیگراد، طویل شدن۶۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتیگراد، طویل شدن نهایی ۷ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد. در PCR دوم فقط دمای annealing از ۵۴ به ۵۶ درجه تغییر داده شد و به جای DNA از محصول PCR اول و از پرایمرهای داخلی استفاده شد.

برای انجام nested PCR با ژن COWP همانند دو روش قبل از دو جفت پرایمر استفاده شده است (۱۲). جفت پرایمر اول یک قطعه ۷۶۵ bp از ژن COWP و جفت پرایمر دوم یک قطعه ۵۵۳ bp را تکثیر نمود. واکنش زنجیره پلیمراز، با شرایط زیر و به تعداد ۳۰ سیکل صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه ۹۴ درجه سانتیگراد، دناتوراسیون ۴۵ ثانیه ۹۴ درجه سانتیگراد، آنیلینگ۴۵ ثانیه ۵۲ درجه سانتیگراد، طویل شدن۶۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتیگراد، طویل شدن نهایی۷ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد. در PCR دوم فقط دمای annealing از ۵۲ به ۵۶ درجه تغییر داده شد و در این جا به جای DNA از محصول PCR اول و از پرایمرهای داخلی استفاده شد.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

جهت بررسی نتایج PCR و اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی بوسیله اتیدیوم بروماید استفاده شد. وزن مولکولی قطعه مورد نظر در کنار یک DNA مارکر مشخص گردید (۱۳). جهت تعیین گونه و ژنوتیپ‌های کریپتوسپوریدیوم توسط ژن SSU-rRNA از آنزیمهای Ssp-I، Vsp-I، برای ژن COWP از آنزیم RsaI (GT/AC) و برای ژن TRAP-C2 از آنزیم HaeIII، BstEII استفاده شد، که آنزیم HaeIII برای ژنوتیپ انسانی و آنزیم BstEII برای ژنوتیپ گاوی جایگاه شناسایی دارد (۱۲-۱۰). جهت بررسی، نتایج بر روی ژل ۳/۲٪ مخلوط با اتیدیوم بروماید و در کنار مارکر، الکتروفورز گردید (۱۳). جهت انجام RFLP مخلوط اصلی (Master mix) را از مجموع ۲µl بافر، ۵µl محصول PCR و۱U از آنزیم را در حجم ۲۰µl رسانیده به مدت یک شبانه‌روز در بن ماری ۳۷درجه قرار داده شد. سپس ۵ میکرولیتر از محصول روی ژل ۲٪ مخلوط با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و باندهای مورد نظر در کنار مارکرDNA با دستگاه ترانس‌ایلومیناتور مشاهده شدند.

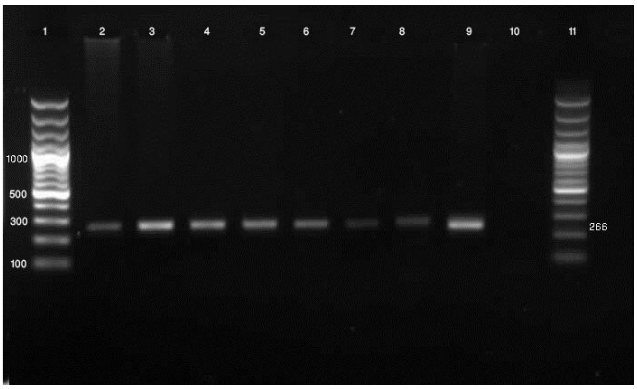
جدول ۱- ترادف توالی پرایمرهای تشخیصی کریپتوسپوریدیوم

نام پرایمرها	ترادف از ´۵ به ´۳
SSU-rRNAC1F1	5´TTCTAGAGCTAATACATGCC 3´
SSU-rRNA C1R1	5´CCCATTTCCTTCGAAACACGA 3´
SSU-rRNA C2F2	5´GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAG 3´
SSU-rRNA C2R2	5´CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA 3´
TRAP C1F1	5´CATATTCCCTGTCCCTTGAGTTGT 3´
TRAP C1R1	5´TGGACAACCCAAATGCAGAC 3´
TRAP C2F2	5´GGTAATTGGTCACGA 3´
TRAP C2R2	5´CCAAGTTCAGGCTTA 3´
EX-COWP-C1F1	5´TGTCCTCCAGGTACTACA 3´
EX-COWP-C1R1	5´ACCTGTTCCCACTCAATG 3´
Cry-15	5´GTAGATAATGGAAGAGATTGTG 3´
Cry-9	5´GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG 3´

یافته‌ها

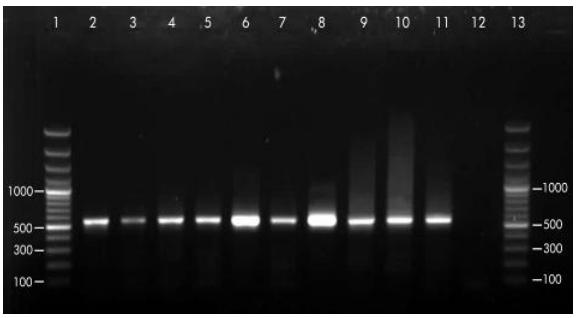
از مجموع ۱۲۶۳ کودک مبتلا به اسهال (۷۴۹ پسر و ۵۱۴ دختر) که مورد بررسی قرار گرفتند، ۳۱ نفر (۲/۵٪) از نظر اووسیست کریپتوسپوریدیوم مثبت ارزیابی شدند. از این تعداد به ترتیب ۱۶ مورد از گروه مذکر و ۱۵ مورد از گروه مؤنث آلوده به کریپتوسپوریدیوم بودند. از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده تعداد ۴۶۹ نمونه از استان قزوین و تعداد ۷۹۴ نمونه از استان تهران گرفته شد که به ترتیب ۱۲و۱۹ مورد آلوده به کریپتوسپوریدیوم بودند.

تمام ایزوله‌های انسانی با این سه ژن با نتایج مثبت همراه بودند. پرایمرهای به‌کاررفته توانستند قطعه‌ای در حدود bp ۸۵۱-۸۲۶ بسته به نوع گونه برای ژن SSU-rRNA، قطعه‌ای در حدود bp ۵۵۳ برای ژن COWP و قطعه‌ای در حدود bp ۲۶۶ برای ژن TRAP-C2 تکثیر نمایند. از ۳۱ ایزوله انسانی مورد بررسی، ۲۵ ایزوله ژنوتیپ گاوی کریپتوسپوریدیوم پاروم (C. parvum)، ۵ ایزوله ژنوتیپ انسانی (C. hominis) و یک ایزوله عفونت همزمان با هر دو ژنوتیپ را نشان داد (شکلهای ۱ تا ۵).

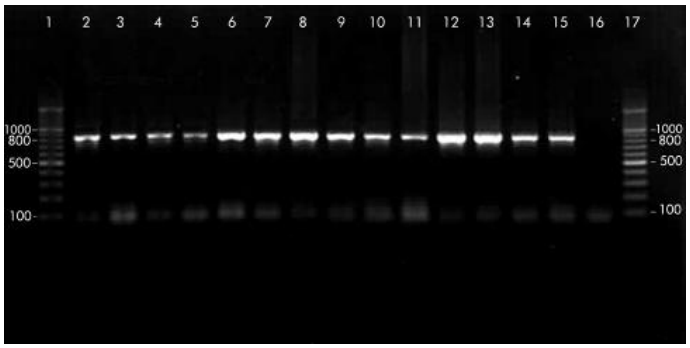


شکل ۱- الکتروفورز ۵ میکرولیتر از محصول nested PCR بر روی ژل آگارز ۳/۲٪ توسط ژن TRAP-C2 (ستون ۱و ۱۱: DNA مارکر bp ۱۰۰، ستون ۹-۲: نمونه مثبت کریپتوسپوریدیوم با پرایمرهای TRAP-C2، ستون ۱۰: کنترل منفی (D.W)

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

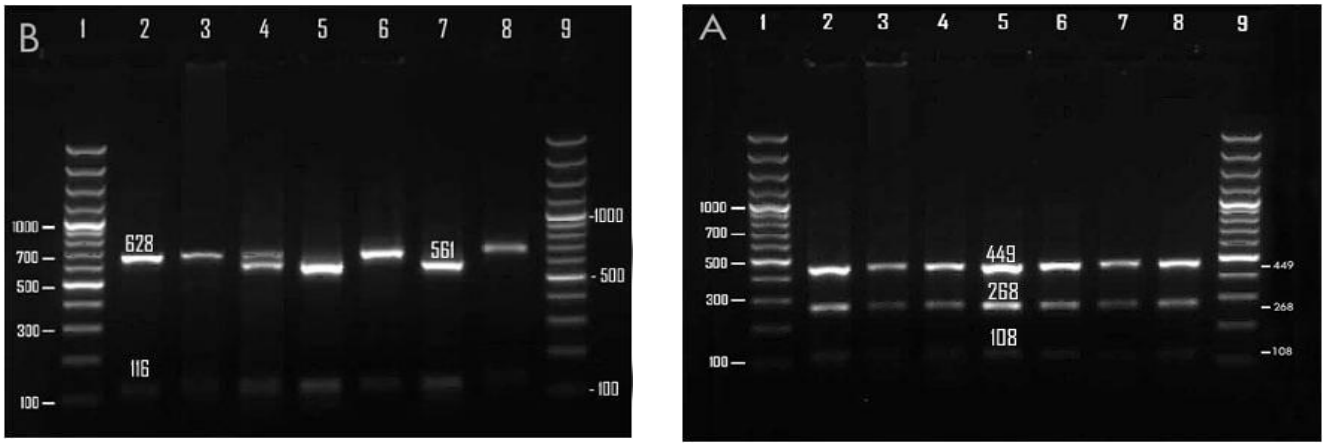


شکل ۲- الکتروفورز ۵ میکرولیتر از محصول nested PCR بر روی ژل آگارز ۳/۲٪توسط ژن COWP (ستون ۱و ۱۳: DNA مارکرbp ۱۰۰، ستون ۱۱-۲: نمونه مثبت کریپتوسپوریدیوم با پرایمرهای COWP، ستون ۱۲: کنترل منفی (D.W)



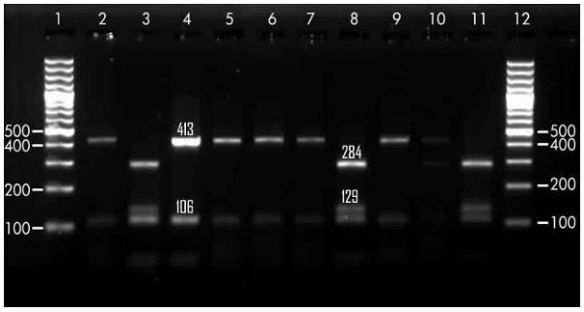
شکل ۳- الکتروفورز ۵ میکرولیتر از محصول nested PCR توسط ژن SSU-rRNA بر روی ژل آگارز ۲٪ (ستون ۱و ۱۷: DNA مارکر ۱۰۰bp، ستون ۱۵-۲: نمونه مثبت کریپتوسپوریدیوم با پرایمرهای SSU-rRNA، ستون ۱۶: کنترل منفی (D.W).

شکل ۴، الگوی برش محصول nested PCR ژن SSU-rRNA را در ایزوله‌های انسانی با آنزیم VspI (B)، Ssp-I (A) و شکل ۵ الگوی برش محصول nested PCR ژن COWP در ایزوله‌های انسانی را با آنزیم RsaI نشان می‌دهد. همانطور که در تصویر مشخص است، الگوی برش ژنوتیپ‌های انسانی و گاوی کریپتوسپوریدیوم پاروم با آنزیم Ssp-I دارای باندهای bp ۴۴۹، ۲۶۸ و ۱۱۱-۱۰۸ می‌باشد. در حالی که الگوی آن با آنزیم Vsp-I متفاوت بوده و در کریپتوسپوریدیوم پاروم دارای باندهای bp ۶۲۸، bp ۱۰۴ و bp ۱۱۶ بوده در حالی که در کریپتوسپوریدیوم هومنیس دارای باندهایbp ۵۶۱، bp ۱۱۶، bp ۱۰۴ و bp ۷۰ می‌باشد.



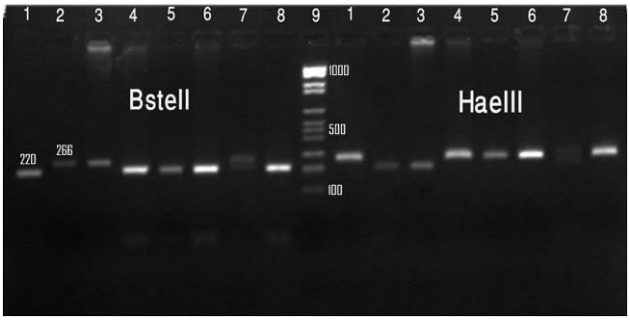
شکل ۴- الگوی برش محـصول nested PCR ژن SSU-rRNA در ایزوله‌های انسانی با آنزیم VspI (B)و Ssp-I (A)
(A: ستون ۱و ۹: مارکر DNA، ستون ۸-۲: نمونه مثبت کریپتوسپوریدیوم پاروم با آنزیمSsp-I، B: الگوی برش محصول PCR دوم ژن SSURNA رابا آنزیم VspI: ستون۱و۹ مارکر DNA، ستون ۲، ۳، ۶ و ۸ نمونه مثبت کریپتوسپوریدیوم پاروم، ستون ۵ و ۷ نمونه مثبت کریپتوسپوریدیوم هومنیس، ستون ۴ عفونت همزمان از هردو ژنوتیپ)

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]



شکل۵- الگوی برش محصول nested PCR ژن COWP در ایزوله‌های انسانی را با آنزیم RsaI (ستون ۱ و ۱۲ مارکر DNA، ستون ۲، ۷-۴ و ۹ نمونه مثبت کریپتوسپوریدیوم پاروم، ستون ۳، ۸ و ۱۱: نمونه مثبت کریپتوسپوریدیوم هومنیس، ستون ۱۰: عفونت همزمان از هر دو گونه)

کریپتوسپوریدیوم پاروم برای آنزیم RsaI دارای دو جایگاه برش می‌باشد که پس از هضم انزیمی قطعاتی به طول bp ۴۱۳، ۱۰۴ و۳۴ را تولید می‌کندکه پس از الکتروفورز باندهای bp ۴۱۳ و ۱۰۴ قابل رؤیت است. کریپتوسپوریدیوم هومنیس برای آنزیم RsaI دارای ۳ جایگاه برش می‌باشد که پس از هضم آنزیمی قطعاتی به طول ۲۸۵ ،۱۲۹ ،۱۰۴ و ۳۴ را تولید می‌کند که پس از الکتروفورز باند های ۲۸۵، ۱۲۹، ۱۰۴ قابل رؤیت است (شکل ۶).



شکل ۶ - الگوی برش محصول nested PCR ژن TRAP-C2 در ایزوله انسانی با آنزیم HaeIII و BstEII (آنزیم HaeIII برای ژنوتیپ انسانی و BstEII برای ژنوتیپ گاوی جایگاه دارد؛ ستون شماره ۱، ۶-۴ و ۸ کریپتوسپوریدیوم پاروم، ستون شماره ۲ و۳ کریپتوسپوریدیوم هومنیس، ستون شماره ۷ عفونت همزمان، ستون شماره ۹ مارکر DNA)

بحث

کریپتوسپوریدیوزیس یک بیماری با انتشار جهانی است و یکی از چهار پاتوژن مهم عامل اسهال در کودکان بوده که به عنوان یکی از مشکلات عمده بهداشتی مطرح است (۲). امروزه در اکثر نقاط جهان تحقیقات گسترده‌ای بر روی خصوصیات مختلف کریپتوسپوریدیوم از جمله بیولوژی، اپیدمیولوژی و تشخیص آن انجام گرفته است. در کشور ما اکثریت مطالعات انجام گرفته بر روی جنبه‌های اپیدمیولوژی انگل معطوف بوده و مطالعات محدودی در زمینه مولکولی انجام گرفته است. لذا این بررسی با هدف تعیین گونه‌ها و ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال انجام شد تا اطلاعات دقیقتری در مورد اپیدمیولوژی، کنترل و پیشگیری از این انگل به دست آید.

در این بررسی مجموعاً ۱۲۶۳ نمونه مدفوع اسهالی از کودکان مبتلا به اسهال که به مراکز طبی کودکان استان تهران و قزوین مراجعه کردند در طی مدت ۲ سال جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. از میان این تعداد نمونه، نتیجه آزمایش مدفوع ۳۱ نفر از آنها از نظر اووسیست کریپتوسپوریدیوم با استفاده از روش میکروسکوپی مثبت بود، بنابراین می‌توان شیوع کریپتوسپوریدوزیس را ۲/۵٪ گزارش نمود، این میزان از شهرهای اهواز و غرب تهران بیشتر بوده ولی از سایر مناطق مورد مطالعه کمتر می‌باشد (۱۸-۱۴).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که از میان ۳۱ ایزوله مورد بررسی در کودکان مبتلا به اسهال، تعداد ۲۵ ایزوله (۸۰/۶٪) ژنوتیپ گاوی کریپتوسپوریدیوم پاروم (C. parvum)، ۵ ایزولـه (۱۶/۱٪) ژنوتیپ انسـانی کریپتوسپـوریدیوم پاروم (C. hominis) و یک ایزوله عفونت همزمان از هردو ژنوتیپ را نشان داده است.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ژنوتیپ گاوی کریپتوسپوریدیوم پاروم گونه غالب در کودکان مبتلا به اسهال در این مطالعه بوده است. با توجه به محدود بودن تنوع

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

میزبانی که می‌توانند به ژنوتیپ انسانی مبتلا شوند و به عنوان مخزن عمل نمایند، یافته فوق چندان دور از انتظار نیست.
در جدول ۲ یافته‌های چند مطالعه از نقاط مختلف جهان نشان داده شده است. یافته‌های مطالعه حاضر با پاره‌ای از بررسی‌های صورت گرفته مشابه بوده ولی با بعضی از نتایج دیگر همخوانی ندارد.

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپ انسانی و ژنوتیپ گاوی کریپتوسپوریدیوم در انسان در مطالعات مختلف

Location	No. of isolates	*C.hominis*	*C.parvum*	Transmission Pattern	Reference
UK	1705	654(37.8%)	1049 (61.5%)	Zoonotic	19
Australia	36	30 (83%)	6 (17%)	Anthrponotic	23
Japan	20	14 (%70)	3 (15%)	Anthroponotic	25
Kuwaite	62	3 (5%)	59(94%)	Zoonotic	20
Lima,Peru	127	91 (71.7%)	16(12.6%)	Anthroponotic	27
France	47	18 (38%)	29(62%)	Zoonotic	21
Kenya	175	153(87%)	15(9%)	Anthroponotic	26
Switzerland	9	2 (22.2%)	7 (77.7%)	Zoonotic	22
Uganda		72.8%	18.4%	Anthroponotic	29
Iran	17	4 (24%)	13 (76%)	Zoonotic	6
The Netherlands	91	64 (70)	18(19%)	Anthroponotic	24
England	2414	1005 (41.7%)	1354(56.1%)	Zoonotic	28
Iran	24	7 (29.1%)	17(70.8%)	Zoonotic	7

در این بررسی ژنوتیپ گاوی کریپتوسپوریدیوم پاروم گونه غالب بوده که الگوی ژنوتیپ بدست آمده با کشورهایی مثل انگلستان ۶۱/۵٪ (۱۹)، کویت ۹۴٪ (۲۰)، فرانسه ۶۲٪ (۲۱)، سویس ۷۷٪ (۲۲) و دو مطالعه در ایران۷۶٪ (۶)،۷۰٪ (۷) همخوانی داشته است. درحالی که در کشورهایی مثل استرالیا ۸۳٪ (۲۳)، هلند ۷۰٪ (۲۴)، ژاپن ۷۰٪ (۱)، کنیا ۸۷٪(۲۵)، پرو ۷۱/۷٪ (۲۶) و تعداد دیگری ژنوتیپ انسانی کریپتوسپوریدیوم پاروم غالب بوده است.
معمار و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی گونه‌ها و ژنوتیپ‌های کریپتوسپوریدیوم در افراد HIV مثبت و HIV منفی، با استفاده از روش PCR-RFLP و نواحی هدف ژن 18SrRNA، پرداخته و نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که از ۱۷ ایزوله مورد بررسی ۱۳ ایزوله (۷۶٪) کریپتوسپوریدیوم پاروم و ۴ ایزوله کریپتوسپوریدیوم هومینیس بوده است (۶).
تفاوت در منبع عفونت یکی از مهمترین عوامل تفاوت در انتقال ژنوتیپ‌های کریپتوسپوریدیوم می‌باشد. به طوری که در کشورهایی که کریپتوسپوریدیوم هومینیس غالب است، انتقال از راه آب مهمترین منبع آلودگی به شمار می‌آید ولی در کشور ما و برخی از کشورهای اروپایی و کویت غالب بودن کریپتوسپوریدیوم پاروم در نتیجه انتقال زئونوز می‌باشد (۲۸و۲۷و۲۱و۱۹).
Mclauchlin و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و تارگت COWP به بررسی آنالیز مولکولی گونه کریپتوسپوریدیوم در ۱۷۰۵ نمونه انسانی و ۱۰۵ نمونه گاوی در انگلستان پرداختند. در این مطالعه ۳۷/۵٪ ژنوتیپ نوع ۱ (انسانی) و ۶۱/۵٪ ژنوتیپ نوع ۲ (گاوی) و۰/۳٪ ژنوتیپ نوع C. meleagridis را نشان داد (۱۹).
Elwin و همکاران در سال ۲۰۰۱ با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و استفاده از ژن TRAP-C2 و آنالیز هضم آنزیمی RFLP یک روش ساده و حساس را برای تأیید تنوع ژنتیکی ایزوله‌های کریپتوسپوریدیوم به کار بردند. TRAP-C2 یک ژن بسیار خوب برای اثبات طبیعت پلی‌مورفیک این انگل است. این روش هم چنین برای تأیید کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های غیر از مدفوع مثل لاواژ برونش در بیماران با سرکوب سیستم ایمنی مبتلا به عفونت ریوی در جریان پیوند مغز استخوان وبد استفاده می‌شود (۲۹).
در سال ۲۰۰۱ Xiao و همکارانش ۵ گونه کریپتوسپوریدیوم را در کودکان شهر لیمای پرو با روش PCR-RFLP برروی ژن SSU-rRNA تشخیص دادند. آنها در این تحقیق نتایج زیر را به دست آوردند: گونه‌های زئونوز کریپتوسپوریدیوم مثل کریپتوسپوریدیوم فلیس، کریپتوسپوریدیوم مله اگریدیس و کریپتوسپوریدیوم کنیس می‌توانند کودکان HIV منفی را نیز آلوده کنند. گونه‌های زئونوز همانند گونه انسانی در ۲۸ تا ۳۳ درصد موارد باعث اسهال می‌شوند. طول دوره اسهال در برخی از کودکان بیش از یک هفته و بیشتر در کودکان زیر ۳ سال بوده است (۲۶).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

نتیجه‌گیری

اکثریت عفونت انسانی توسط دو گونه کریپتوسپوریدیوم پاروووم و کریپتوسپوریدیوم هومنیس ایجاد می‌شود. کریپتوسپوریدیوم هومنیس فقط در انسان بیماریزااست در حالی که کریپتوسپوریدیوم پاروووم انسان و سایر پستانداران را مبتلا می‌کند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هر دو ژنوتیپ انسانی و گاوی در کودکان مبتلا به اسهال دیده می‌شود ولی با توجه به این که گونه غالب کریپتوسپوریدیوم پاروووم می‌باشد بنابراین انتقال زئونوز شایعتر از انتقال انسانی بوده و تماس با دام بخصوص گوساله به عنوان مهمترین منبع آلودگی انسانی به شمار می‌رود.

REFERENCES

1. Yagita K, Izumiyama Sh, Tachbana H, Masuda G, Iseku M, Furuya K, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. Parasitol Res.2001;87(11):950-5.

2. keshavars A, Haghighi A, Athari A, Kazemi B, Nazemalhosseini Mojarad E. Genetic variation of *Cryptosporidium* spp. among children with Diarrhea in Iran. Iranian J Parasitol 2008;3(3):30-6.

3. Sorvillo FJ, Liebl E, Kerndt PR, ash LR. Epidemiology of Cryptosporidiosis among person with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles country. American J Trop Med Hyge 1994;51:331-63.

4. Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. Curr Opin Infect 2004;17:483-90.

5. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes Infect 2002;4(10):1047-58.

6. Meamar AR, Guyot K, Certad G, Dei-Cas E, Mohraz M, Mohebali M, et al. SSU-rRNA gene analysis of Cryptosporidium spp. in HIV positive and negative patients. Iranian J Public Health 2006;35:1-7.

7. Pirestani M, Sadraei J, Dalimi Asl A., Zavvar M, Vaeznia H. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from human and bovine using 18S rRNA gene in Shahriar county of Tehran, Iran. Parasitol Res 2008;103(2):447-67.

8. Carcia LS, Brewer TC, Bruckner DA, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocycts from stool specimens. J Clin Microbiol 1983;18:185-90.

9. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Clin Pathol 1985;38:1337-41.

10. Xiao L, Escalante L, Yang CF, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on SSU-rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol 1999a;65:1578-83.

11. Sulaiman IM, Xiao L, Yang C, Escalante L, Moore A, Beard CB, et al. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. Emerging infectious diseases 1998 4(4):681-5.

12. Kato S, Lindergard G, Mohammed HO. Utility of the *Cryptosporidium* oocysts wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. Vet Parasitol 2003;13,111(2-3):153-9.

13. Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. NY:Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

14. Hoghooghi-Rad N. Some epidemiological aspects of cryptosporidiosis in Ahvaz, Capital of Khoozestan province, Islamic Republic of Iran. Med J Islam Repub Iran 1994;1:17-22.

15. Khoshzaban F, Dalimi-Asl A. Epidemiological study on cryptosporidiosis children. Sci Res J Sahed Univ (Iran)1998;19:21-6.

16. Maleki F, Sadeg-Hasani S. Prevalence of cryptosporidiosis in students of elementary schools in the west Tehran-Iran from 1999-2001. J Iran Univ Med Sci 2003;33:105-10.

17. Hamedi Y, Safa O Haydari M. *Cryptosporidium* infection in diarrheic children in southeastern Iran. Pediatr Infect Dis J 2005;24:86-8.

18. Mirzaei M. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. Infection in diarrheic and non-diarrheic humans in Iran. Korean Journal of Parasitology 2007;45(2):133-7.

19. Mclauchlin J, Pedraza -Diaz S, Amar-Hoetzeneder C, Nichols GL. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp.in Uinted Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1705 fecal samples from human and 105 fecal samples from livestock animals. J Clin Microbiol 2000;38:3984-90.

20. Sulaiman IM, Hira PR, Zhou I, Al-Ali Shelahi FM, Shweiki HM, Iqbal J, et al. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. J Clin Microbiol 2005;43:2805-9.

21. Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelievre E, Sarfati C, Rabodonirina M, Nevez G. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. J Clin Microbiol 2001;39:3472–34.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

22. Morgan U, Weber R, Xiao L, Sulaiman I, Thompson RCA, Ndiritu W, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus –infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United states. J Clin Microbiol 2000;38(3):1180-3.

23. Morgan UM, Xiao L, Monis P, Fall A, Irwin PJ, Fayer R, et al. Cryptosporidium spp. in domestic dogs: the "dog" genotype. Appl Environ Microbiol 2000;66(5):2220-3.

24. Wielinga PR, Vries ADE, Vandercoot TH, Mankmars MH, Kortbeek LM, Vandorgiessen JWB. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in the Netherlands. Int J Parasitology 2008;38:809-17.

25. Gatei W, Wamae C, Waruru A, Mbae C, Mulige E, waithera T, et al. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis and symptoms associated with infections and children in Kenya. Ant J Trop Med Hyg 2006;75(1):78-82.

26. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J Infect Dis 2001;183:492-7.

27. Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Diaz S, Mclauchlin J. Genetic analysis of Cryptosporidium 2414 humans with diarrhea in England between 1985 and 2000. J Med Microbiol 2006;55(6):703-7.

28. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmar G , et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. Am J Trop Med Hyge 2003;68:710-5.

29. Elvin K, Chalmer RM, Robert R, Guy EC, Casemore DP. Modification of rapid method for the identification of gene specific polymorphisms in *Cryptosporidium Parvum* and its application to clinical and epidemilogical investigations. J Clin Microbiol 2001;60(12):5581-4.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]