مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۱، ۲۱-۱۵

شناسایی کریپتوسپوریدیوم پاروم با روش PCR و تعیین الگوی پروتئینی وآنتی ژن‌های ایمونوژنیک آن

الهه ابراهیم زاده[۱] پرویز شایان[۱] صدیقه نبیان[۱] صادق رهبری[۱]* محمد رضا مخبر دزفولی[۲]

۱) گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران- ایران.

۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران- ایران.

(دریافت مقاله: ۹ دی ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۳ خرداد ماه ۱۳۸۷)

چکیده

کریپتوسپوریدیوم تک یاخته‌ای ازشاخه اپی کمپلکسا است که در بسیاری از حیوانات و انسان موجب اسهال می‌شود. از آنجایی که این تک یاخته خسارات اقتصادی قابل توجهی به صنعت دامپروری ایران وارد می‌سازد، شناسایی مولکولی تک یاخته وتعیین الگوی پروتئینی وآنتی‌ژن‌های امیونوژنتیک آن هدف این مطالعه می‌باشد. در این مطالعه ازمدفوع اسهالی گوساله مشکوک به کریپتوسپوریدیوز پس از تشخیص میکروسکوپی اوسیستهای کریپتوسپوریدیوم جداسازی وتخلیص شد. استخراج DNA از اووسیستها انجام پذیرفت وبا پرایمرهای اختصاصی منشعب از ژن ribosomal RNA 18S کریپتوسپوریدیوم پاروم با روش Semi-nested PCR اختصاصی بودن اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم پاروم تایید گردید. یک راس گوساله سرم منفی از نظر آنتی بادیهای ضد کریپتوسپوریدیوم با ۶۱۰ x ۵ اووسیست کریپتوسپوریدیوم تخلیص شده به طریق تجربی آلوده شد. ۵ روز بعد اووسیستها ازمدفوع جمع‌آوری وتخلیص گردید. پس از جداسازی وتخلیص، تعیین الگوی پروتئینی با استفاده از روش SDS-PAGE انجام پذیرفت. باندهای پروتئینی اسپروزوئیتها در محدوده‌ای بین ۱۰ تا ۱۰۰ کیلودالتون قرارگرفتند. ده باند قابل تشخیص در محدوده ۲۰ تا ۴۰ کیلودالتون قرارگرفت. در محدوده ۴۰ تا ۷۰ کیلودالتون شش باند قابل رویت بودند. شناسایی پروتئینهای ایمونوژنیک با روش وسترن بلات انجام پذیرفت.، باندهای ایمنوژنیک در محدوده‌ای بین ۱۷ تا ۲۶۰ کیلودالتون مشاهده‌شد که وزن مولکولی نسبی سه باندآن در محدوده ۲۰ تا ۳۰ کیلودالتون، سه باند در محدوده ۳۰ تا ۴۰ کیلودالتون، سه باند در محدوده ۴۰ تا ۶۰ کیلودالتون، ودوباند در محدوده ۸۰-۷۰ کیلودالتون وچهار باند سنگین به اندازه نسبی ۱۳۰، ۱۷۰، ۲۱۶ و ۲۵۷ کیلودالتون بودند.

واژه‌های کلیدی: کریپتوسپوریدیوپاروم، ایمنوبلات، SDS-PAGE، PCR، Seminested-PCR.

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم تک یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکسا است که لایه مسواکی سلولهای روده‌ای اکثر مهره داران را مورد تهاجم قرار می‌دهد. تا چندی پیش به عنوان یک انگل فرصت طلب غیر متداول مطرح بود ولی اکنون به عنوان یک آنتروپاتوژن دربیماریهای مشترک انسان و دام بویژه در مبتلایان به نقص ایمنی مورد توجه قرار گرفته است. بیش از نیمی از گوساله‌های تازه متولد شده از گاوهای گوشتی و شیری در معرض خطر آلودگی با کریپتوسپوریدیوم می‌باشند که در هفته اول آلودگی دچار اسهال شدید، از دست دادن آب بدن، کاهش رشد و بعضا مرگ ومیرمی گردند(۴). Nouri وهمکاران درسال ۱۹۹۱ میزان فراوانی آلودگی در گوساله‌های اسهالی را ۸۲/۵ درصد و در گوساله‌های غیر اسهالی ۹ درصد اعلام نمودند. همچنین Rahbati و همکاران درسال ۱۹۹۳ میزان آلودگی در بره‌ها، بزغاله‌ها و افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی را به ترتیب ۳۱، ۳۴ و ۶۹ در صد گزارش نموده‌اند(۱۹). با توجه به عدم وجود درمان موثر و مقاومت ااسیستها به ضدعفونی کننده‌ها ی متداول، این بیماری درگوساله‌ها یکی از مشکلات مهم گاوداریهای صنعتی می‌باشد. این امرایجاب می‌نماید که از روشهای ایمن سازی و یا تجویز آنتی بادی‌های منوکلونال و یا پلی کلونال جهت پیشگیری و درمان استفاده شود. Fayer وهمکاران در سال ۱۹۸۹ اثرات آغوزهایپر ایمیون گاو را در حفاظت نسبی علیه کریپتوسپوریدیوم در گوساله تازه متولد شده نشان دادند(۵). Reperant و همکاران در سال ۱۹۹۴ بر این باورند که آنتی ژنهای عمده ایمنوژنیک کریپتوسپوریدیوم درانسان و حیوان آنتی ژن‌هایی با وزن مولکولی ۱۵-۱۷ و ۲۳ کیلودالتون می‌باشند (۲۱). هدف از این مطالعه تشخیص و تعیین آنتی ژنهای ایمنوژنیک کریپتوسپوریدیوم پاروم جدایه ایران می‌باشد.

مواد وروش کار

تهیه نمونه وخالص سازی ااسیستهای انگل: تعداد ۱۲ نمونه مدفوع اسهالی گوساله از یک گاوداری صنعتی جمع آوری و در آزمایشگاه پس از تهیه گسترش با روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی گردید(۸). در صورت وجود آلودگی بیش از ۲۵ ااسیست درمیدان میکروسکپ (بزرگنمایی ۴۰ x) اقدام به جداسازی و خالص سازی اووسیستها با استفاده از روش Lorenzo و همکاران درسال ۱۹۹۳ از مدفوع شد(۱۰).

استخراج DNA از اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم: استخراج DNA از اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم با استفاده از کیت (MBST-Iran) بر اساس دستورالعمل سازنده انجام پذیرفت. پس از جداسازی و تخلیص جهت سترون شدن و کاستن سختی دیواره اووسیست، ابتدا اووسیستها(حدود ۱۰ میلیون اووسیست) را به مدت ۲ دقیقه درمجاورت ۱ سی

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: srahbari@ut.ac.ir

سی محلول سرد هیپوکلریت سدیم ۲۸ درصد تحت شرایط لرزش قرارداده و رسوب آن با اضافه کردن ۹ سی سی آب مقطر و سانتریفوژنمودن، شستشو داده شد. عمل شستشومجددا تکرار گردید. سپس برروی رسوب حاصل ۱۸۰ میکرولیتر بافر لیز کننده کیت اضافه گردید و به مدت ۲۰دقیقه با قدرت ۷۰ درصد و توالی‌های ۵ ثانیه‌ای تحت شرایط برودت با دستگاه سونیکیتوربا سیکل ۰/۴-۰/۵ و آمپلیتود ۳۰-۲۰ درصد (Germany, GmbH Dr.Hielscher) دیواره اووسیست شکسته شد. سپس به سلایه بدست آمده ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه نموده و به مدت یک ساعت تحت شرایط ۵۵ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. در خاتمه زمان هضم پروتئین به این محلول ۳۴۰ میکرولیتر محلول پیوندی داده و مجددا تحت شرایط ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری گردید. سپس با اضافه کردن ۲۷۰ میکرولیتراتانول ۹۶ درصدومخلوط کردن به کمک ورتکس محلول حاصله به داخل ستون‌های مخصوص کیت که قبلا روی میکرو تیوب استریل قرارداده شده بود، انتقال داده شد و به مدت ۱دقیقه و ۸۰۰۰g سانتریفوژ گردید. در این مرحله DNA استخراج شده به غشاء داخل ستون به طور اختصاصی متصل می‌گردد. پس از دو بار شستشو با بافر شستشو دهنده در خاتمه برای جداسازی DNA از غشاء میزان ۵۰ میکرولیتر بافر حلال اضافه شده و پس از قرار دادن ستون بر روی میکرو تیوب استریل به مدت ۱ دقیقه و ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شد.

PCR: جهت تعیین ساختار مولکولی کریپتوسپوریدیوم از نمونه‌های جمع آوری شده، از روش تکثیر مکرر DNA استفاده گردید. بدین منظور پرایمرهای اختصاصی منشعب از ژن 18S ribosomal RNA جنس کریپتوسپوریدیوم طراحی گردید (جدول ۱). به میزان ۱،۵، ۰/۱،۰/۰۱،۰/۰۰۱و ۰/۰۰۰۱ از DNA استخراج شده جهت تکثیر استفاده گردید. به هر یک از رقت‌های DNA میزان ۱۰ میکرولیتر 10 x PCR buffer، ۲ میکرولیتر (each dNTP (10 mM، ۳ میکرولیتر Mgcl2 (50 mM)، ۲ میکرولیتراز هر پرایمر Forward (20 µM) و Reverse (20 µM)، ۰.۵ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز (5Uµl) و آب دوبار تقطیرشده استریل به اندازه‌ای که حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیترباشد، اضافه شده و در دستگاه ترموسیکلر (MWG ,Germany) با برنامه زیر تکثیر مکرر DNA انجام پذیرفت. این برنامه به شرح ذیل می‌باشد:

(۱)۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتیگراد (Denaruration) (۲) مرحله دوم که شامل ۳۵ چرخه است ابتدا ۴۵ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد (Denaruration) اعمال می‌گردد، سپس ۴۵ ثانیه دمای ۵۸ درجه سانتیگراد جهت اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در الگو (annealing) اعمال گشت و در نهایت آخرین مرحله هر چرخه ۴۵ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد که مرحله طویل شدن آغازگرهاست بود. (۳) پس از اتمام ۳۵ چرخه ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال شد که زمان طویل شدن نهایی است.

سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از تانک الکتروفورز Biorad (Mini-SubCell GT) وبافر (0.5M EDTA 40ml, 0.5xTBE(10XTBE Buffer= Tris base108gr ,Boric acid 55gr جداسازی و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از اشعه UV باندهای جداشده قابل رویت گردیدند.

semi-nested PCR: جهت تعیین ساختار بیولوژی مولکولی کریپتوسپوریدیوم پاروم ابتدا محصول PCR از ژل آگارز پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV استخراج و تخلیص گردید. بدین منظور کیت استخراج و تخلیص DNA از ژل (MBST-Iran) استفاده گردید. سپس محصول PCR تخلیص شده با استفاده از پرایمر اختصاصی منشعب از ژن 18S ribosomal RNA جنس کریپتوسپوریدیوم گونه پاروم که از ترادفی محصور شده از دو پرایمر قبلی تشکیل شده است (جدول ۱)، مورد ارزیابی قرار گرفت. ترادف نوکلئوتیدی این پرایمر فقط در گونه پاروم موجود بوده و در گونه‌های دیگر این قسمت از ژن از ترادف نوکلئوتیدی دیگری تشکیل شده است. تکثیر مکرر DNA تحت شرایط ذکر شده با پرایمرهای F2 و R1 انجام گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد و در بافر 0.5 x TBE الکتروفورز شده و بعد با استفاده از اتیدیوم بروماید و تحت اشعه UV مورد ارزیابی قرار گرفت.

آلوده سازی تجربی گوساله به کریپتوسپوریدیوم پاروم: پس ازتشخیص وتایید کریپتوسپوریدیوم پاروم، به منظور دستیابی به تعداد زیادی از اووسیستها، یک راس گوساله تازه متولد شده هولشتاین از موسسه تحقیقاتی امین آباد انتخاب گردید. شرط اصلی انتخاب گوساله در این بررسی علاوه برعاری بودن سرم آن از پادتن‌های ضد کریپتوسپوریدیوم، عاری بودن شیر و سرم مادر از پادتن نیز بود. بدین منظور کلیه سرمها همراه با ده سرم مثبت موجود در گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی و سرم گوساله قبل و بعد از تلقیح با روش ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت(۲۰). بنابراین گوساله انتخاب شده علاوه بر آنکه سرم آن عاری از پادتن‌های اختصاصی علیه کریپتوسپوریدیوم پاروم بود سرم و شیر مادرش نیز عاری از پادتن‌های اختصاصی بود.

گوساله مذکور از آغوز محروم و ۲۴ ساعت پس از تولد جهت تضعیف سیستم ایمنی ۰/۱mg/kg دگزامتازون تزریق گردید. چهل و هشت ساعت پس از تولد به گوساله تعداد ۵×۱۰^{۶} اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم خورانیده شد و ۶۰ ساعت پس از تولد نیز به همان میزان مجددا دگزامتازون تزریق گردید. جهت پیشگیری از آلودگی‌های باکتریایی ۴۸ ساعت پس از تولد به گوساله میزان 10 mg/Kg انروفلوکساسین تزریق گردید. پنج روز بعد از آن با بروز اولین علائم اسهال، نمونه مدفوع جمع آوری و پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده، حضور اووسیستها در مدفوع تایید شد. از روز پنجم تا ۱۱روز پس از آلودگی اقدام به جمع آوری مدفوع گردید. اووسیستها با استفاده از روش Lorenzo و همکاران در سال ۱۹۹۳ از مدفوع استخراج و تخلیص گردید(۱۰).

کنترل ژنتیکی اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم پاروم: از اووسیستهای تخلیص شده از گوساله آلوده شده به روش تجربی، طبق روشهای ذکر شده DNA استخراج شده و با پرایمرهای اختصاصی برای ژن

18 S rRNA اکریپتوسپوریدیوم پارووم مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه آنتی ژن کریپتوسپوریدیوم پارووم: ابتدا بر روی رسوب اووسیستها PBS حاوی ۱ میلی مولار Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) به عنوان ماده مهارکننده فعالیت پروتئاز اضافه گردید. با استفاده از عمل ورتکس همراه ساچمه شیشه‌ای استریل به مدت نیم ساعت و سونیکیتور با سیکل ۰/۵-۰/۴ و آمپلیتود ۳۰-۲۰ درصد (Germany, GmbH Dr.Hielscher) در مجاورت یخ و سپس عمل انجماد - ذوب (پنج الی شش بار در نیتروژن مایع) اقدام به خرد نمودن جداره اسیستها شد. به منظور جدا سازی آنتی ژن، محلول هموژنیزه شده ابتدا با دور ۱۲۰۰۰ در ثانیه به مدت 15 دقیقه تحت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید و مایع رویین به عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرار گرفت. سپس غلظت پروتئین به روش Bradford در سال ۱۹۷۶ تعیین گردید (۱۰).

تعیین الگوی پروتئینی وشناسایی پروتئینهای ایمونوژنیک کریپتوسپوریدیوم پارووم: تعیین الگوی پروتئینی با استفاده از روش SDS-PAGE و شناسایی پروتئینهای ایمونوژنیک با روش وسترن بلات بر اساس روش Reperant و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام پذیرفت (۲۱).

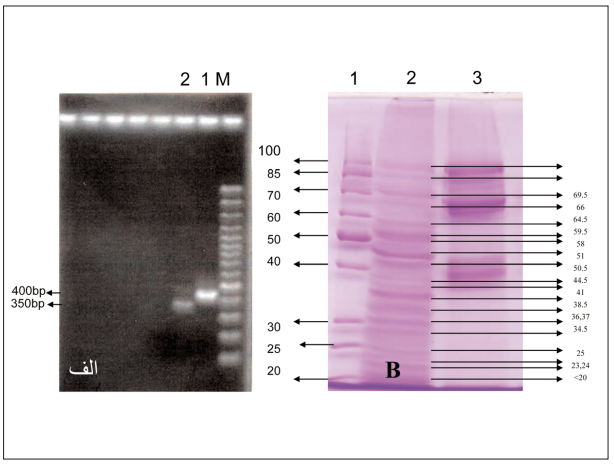
جداسازی آنتی ژن‌های تهیه شده از اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم پاروم بر اساس وزن مولکولی بر روی ژل پلی آکریلامید ۱۲/۵ درصد صورت گرفت. پس از اضافه کردن بافر نمونه (Bromophenol blue25mg, uffer=Tris3/75,SDS10gr,Mercapthoethanol25ml,Glycerol35ml 5XSample) به نسبت (V/V)۱:۴ به ۱۷ میکروگرم آنتی ژن و قرار دادن آن به مدت ۵ دقیقه تحت شرایط دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد، نمونه‌ها جهت جداسازی الکتروفورز گردیدند. جهت تعیین الگوی پروتئینی کریپتوسپوریدیوم پارووم در تمام آزمایشات از مارکر معمولی (SMO661,Fermentas) و برای تعیین الگوی پروتئین‌های ایمونوژنیک از مارکر قبلا رنگ شده (SMO671,Fermentas) استفاده گردید. در خاتمه الکتروفورز، ژل با کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و نتایج آن با مارکر مقایسه گردید.

به منظور تعیین الگوی ایمنوژنیک آنتی ژن‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم پس از جداسازی آنتی ژن‌ها بر روی ژل آکریل آمید ۱۲/5 درصد، آنتی ژن‌ها مستقیما از ژل به غشاء نیتروسلولز (Porablot,NCP,Germany) انتقال داده شدند. بدین منظور از دستگاه انتقال مولکولی (BioRad) استفاده و عمل انتقال در بافر انتقال (Methanol400ml, Glycine14/4gr, Trisbase3/03gr) به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. جهت اشباع کردن محل‌های پیوندی به پروتئین‌ها نوار نیتروسلولز به مدت یک ساعت با محلول ۳ درصد Skim milk مجاور گردید. سپس پنج بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در بافر (base20mM 2/42gr/lit,Nacl0.15m8/76gr/lit,Tween0.5ml-Tris) TBS-T شستشو انجام شد. با توجه به اینکه نمونه‌ها بصورت دو تکرار در ژل جداسازی شده بودند، صفحه نیتروسلولز به دو قسمت تقسیم، یک قسمت با سرم مثبت با رقت ۱/۱۵۰ و دیگری با سرم منفی با رقت ۱/۱۵۰ مجاور گردیدند. در ادامه هر یک از صفحات با TBS-T پنج بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو گردید. سپس صفحات نیتروسلولز در مجاورت با bovine-Ig anti (DAKO,Denmark) که به آن آنزیم پراکسیداز کونژوگه شده بود، به مدت ۱ ساعت قرار داده شده و در ادامه صفحات نیتروسلولز ۵ بار هر بار ۵ دقیقه در بافر TBS-T شستشو گردیدند. در پایان آنتی ژنهای ایمونوژن کریپتوسپوریدیوم پارووم با سوبسترا DAB (in 20mlTBS +20µlH2O2 0.006grDAB) مشخص گردیدند (۲۱).

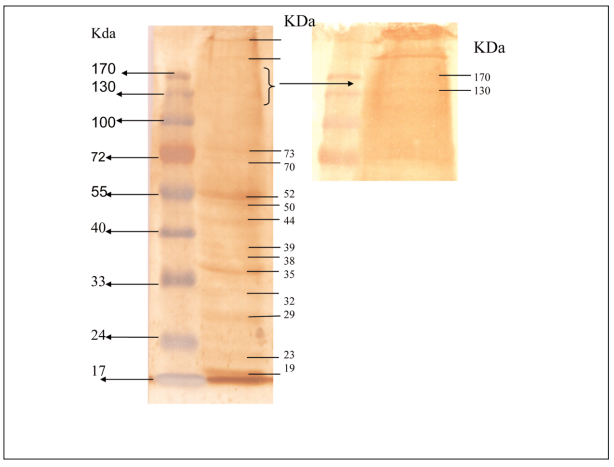
نتایج

جداسازی اووسیست کریپتوسپوریدیوم و تعیین جنس گونه پاروم بالغ بر ۲۰۰ میلیون اووسیست از مدفوع گوساله آلوده شده به روش تجربی در طول شش روز متوالی جمع آوری و طبق روش Lorenzo و همکاران جداسازی و تخلیص و تحت برودت ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. برای تایید مولکولی کریپتوسپوریدیوم ابتدا DNA استخراج شده روی ژل ۱/۵ درصد به میزان ۱۰ میکرولیترالکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت اشعه U.V بررسی شد هیچگونه باندی مشاهده نشد. جهت تعیین جنس کریپتوسپوریدیوم از روش تکثیر مکرر DNA (PCR) استفاده شد. ابتدا با استفاده از دو پرایمر اختصاصی Forward و Reverse که از روی ژن 18srRNA طراحی شده بودند تکثیر داده شد. توالی نوکلئوتیدی این دو پرایمر در کریپتوسپوریدیوم پاروم (Accession no .AF093496) وکانیس (Accession no .AF093489)، فلیس (Accession no .AF112575)، مله آگریدیس (Accession no .AF112574) و بیله‌ای (Accession no .AF093495) مشترک بودند. در واکنش زنجیره‌ای DNA با دو پرایمر مذکور محصولی به اندازه ۴۱۲ جفت باز به دست آمد که از لحاظ اندازه با تعداد نوکلئوتیدهای متشکله از توالی پرایمرها و قطعه مابین آنها برابری داشت. آنالیز محصول واکنش تکثیر زنجیره‌ای DNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از اتیدیوم بروماید و تحت اشعه UV انجام گرفت (تصویر ۱-الف - شماره ۱).

برای تعیین گونه کریپتوسپوریدیوم پاروم، ابتدا پرایمری از قسمت متفاوت با بقیه گونه‌های کریپتوسپوریدیوم طراحی گردید که به صورت اختصاصی در ژن 18srRNA کریپتوسپوریدیوم پاروم موجود بود (2 Primer Forward). در ادامه قطعه ژل حاوی محصول 412 PCR جفت بازی پس از جداسازی بر روی ژل آگارز بریده شده و محصول PCR از طریق کیت استخراج DNA از ژل آگارز (MBST) استخراج و تخلیص گردید سپس یک میکرولیتر از آن در واکنش تکثیر زنجیره‌ای DNA با پرایمر اختصاصی کریپتوسپوریدیوم پاروم (Primer Forward 2) و پرایمر مشترک Reverse آنالیز شد. نتیجه این واکنش محصولی از DNA بود که قبلا اندازه آن از ژن 18srRNA کریپتوسپوریدیوم پاروم به دست آمده و از 354 جفت باز تشکیل می‌شد (تصویر ۱ الف -، شماره ۲). به این طریق اووسیستهای جدایه ایران با انجام آزمایشات مذکور تشخیص داده شد.



تصویر۱-



تصویر۲-

نتایج SDS-PAGE: پروتئین‌های محلول روی ژل ۱۲/۵ درصد براساس وزن مولکولی جدا گردید. رنگ آمیزی ژل اکریل آمید یاکوماسی بلو و مقایسه باندهای حاصل با باندهای مارکر پس از رسم منحنی لگاریتمی و محاسبه وزن مولکولی باندهای آن نسبت به مارکر نشان داد باندها ی آنتی ژنهای اووسیستها در محدوده‌ای بین ۲۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون قرار دارند(تصویر ۱- ب). محدوده ۲۰ تا ۴۰ کیلودالتون تشکیل شده بود از ۱۰ باند قابل تشخیص با وزنهای مولکولی تقریبی:۲۰، ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۵، ۳۷، ۳۹ کیلودالتون. در محدوده ۴۰ تا ۷۰ کیلودالتون ۶ باند با وزن مولکولی تقریبی ۴۲، ۴۵، ۵۱، ۵۳، ۵۸ و ۶۶ کیلودالتون قابل رویت بودند و به علت ظرفیت پایین جداسازی ژل اکریل آمید ۱۲/۵ درصد، باندهای بالاتر از ۷۰ کیلودالتون موجود اما برای آنالیز نسبی از کیفیت خوبی برخوردار نبودند و فقط باندهایی با وزن مولکولی ۷۰، ۸۶ و ۱۰۰ کیلودالتون قابل محاسبه بودند. همچنین جداسازی آنتی ژن‌ها بر روی ژل اکریل آمید ۱۰ درصد نیز نتایج قابل مقایسه با ژل ۱۲/۵ درصد داشت.

نتایج وسترن بلات: پس از انتقال باندها روی ورقه نیترو سلولز و مجاورت آن با سرم مثبت و انجام مراحلی که در روش کار ذکر شد باندهای ایمنوژنیک آشکار گشت. مقایسه باندها با مارکر نشان داد، باندهای ایمنوژنیک در محدوده‌ای بین ۱۷ تا ۲۶۰ کیلودالتون قرار دارد. که وزن مولکولی نسبی ۳ باند آن در محدوده ۲۰ تا ۳۰ کیلودالتون (۱۹، ۲۳ و ۲۹ کیلودالتون)، ۳ باند در محدوده ۳۰ تا ۴۰ کیلودالتون (۳۲، ۳۵ و ۳۸ کیلودالتون)، ۳ باند در محدوده ۴۰ تا ۶۰ کیلودالتون (۴۴، ۵۳ و ۵۵ کیلودالتون)، و ۲ باند در محدوده ۸۰-۷۰ کیلودالتون (۷۰ و ۷۵ کیلودالتون) و ۴ باند به بزرگی ۱۳۰، ۱۷۰، ۲۱۶ و ۲۵۷ کیلودالتون بودند (تصویر ۲).

بحث

کریپتوسپوریدیوم پاروم، تک یاخته کوکسیدیایی داخل سلولی خارج سیتوپلاسمی مخاط سلول‌های اپیتلیال روده باریک پستانداران می‌باشد. مشاهدات محققان نشان می‌دهد که این تک یاخته در سنین اولیه پس از تولد می‌تواند به عنوان یکی از عوامل اصلی مشارکت کننده و یا زمینه ساز سندرم اسهال واقع گردد. این امر در صنعت پرورش گاو شیری واجد اهمیت خاصی می‌باشد و سالانه خسارات هنگفتی را به این صنعت وارد می‌سازد (۱۷). تجربیات محققان حاکی از آن است که هیچ یک از ترکیبات ضد کوکسیدیا و یا آنتی بیوتی کهای وسیع الطیف نمی‌تواند بر مراحل رشد انگل تاثیر بگذارد (۱). در سالهای اخیر عمده بررسی‌ها به منظور کنترل و پیشگیری این انگل معطوف به ایمن سازی و یا تجویز آنتی بادیهای منوکلونال جهت ایمنی پسیو گشته است(۱۷،۲۴). بررسی حاضر می‌تواند به عنوان پایه تحقیقات بیولوژی مولکولی در کاربرد ایمن سازی گوساله‌ها تلقی گردد. ابتدا اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم از مدفوع گوساله مبتلا به اسهال در یک گاوداری صنعتی واقع در حومه تهران جداسازی گردید. به منظور شناسایی آن پس از رنگ آمیزی با ذیل نیلسون اصلاح شده به عنوان جدایه تهران مورد بررسی بیولوژی مولکولی قرار گرفت. نتایج آنالیز DNA استخراج شده، از طریق پرایمر اختصاصی مشتق از ژن 18S rRNA در کریپتوسپوریدیوم و همچنین پرایمر اختصاصی برای گونه پاروم از همین ژن به طریق semi-nested PCR جدایه مذکور را به عنوان کریپتوسپوریدیوم پاروم مورد تایید قرار داد. همین جدایه از طریق داخل دهانی به گوساله یک روزه آغوز نخورده به منظور تکثیر، تلقیح شد و در دوران عفونت ضمن جمع آوری اووسیست خون گیری به منظور بررسی‌های سرمی نیز انجام پذیرفت. شیر مادر گوساله همراه با ده سرم مثبت موجود در گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی و سرم گوساله قبل و بعد از تلقیح با روش ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شیر مادر گوساله و سرم گوساله قبل از تلقیح منفی و سایر سرم‌ها مثبت می‌باشند. پروتئین‌های تخلیص شده از اووسیستهای جدایه تهران از کشت دوم بر روی ژل آکرول آمید ۱۰ و ۱۲/۵ در صد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بررسی Lumb و همکاران در سال ۱۹۸۸ از جداره اووسیستهای نشاندار شده با ید رادیواکتیو حاکی از آن است که ۶ باند پروتئینی به اندازه‌های ۱۵.۵ تا ۹۶ کیلودالتون در تمام آیزولت‌ها همواره موجود می‌باشد(۱۲) در حالی که Tilley و همکاران در سال ۱۹۹۰ نشان دادند

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR و Semi-Nested PCR.

شماره پرایمر	Accession No.	نام ژن	ترادف نوکلئوتیدها	دمای ذوب
F1	AF112573, AF093495, AF112574, AF112575, AF093496, AF093489, Canis	18 S rRNA genes	Crypt-rRNA-Sense1 5` aagctcgtagttggatttctg 3`	۶۰
R1	AF093489	18 S rRNA gene	Crypt-rRNA-Antisense 5` taaggaacaacctccaatctc 3'	۶۰
F2	AF112573, AF093495, AF112574, AF112575, AF093496, AF093489, Canis	18 S rRNA genes	Crypt-rRNA-Sense 2 5` catattactatttttttttttag 3`	۵۲

که ۱۸ باند پروتئینی به اندازه‌های ۱۸ تا ۲۹۰ کیلودالتون از جدایه‌های اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پاروم قابل شناسایی بودند که باندهای پروتئینی ۱۶، ۳۲، ۵۷، ۶۲، ۶۷-۶۹، ۸۶، ۱۴۸-۱۴۵ در جدایه با بیان بیشتری از باندهای دیگر ارائه شده بودند(۲۶). در بررس حاضر در محدوده ۲۰ تا ۷۰ کیلو دالتون ۱۶ باند متمایز با وزن مولکولی ۲۰، ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۵، ۳۷، ۳۹، ۴۲، ۴۵، ۵۱، ۵۳، ۵۸، ۶۶ کیلودالتون قابل تفکیک میباشند. باندهای موجود در محدوده بالاتر از ۷۰ کیلودالتون بر روی ژل آکریل آمید ۱۰ و ۱۲/۵ درصد از تعدادکمتری برخوردار و وزن‌های مولکولی ۷۰، ۸۶ و ۱۰۰ کیلودالتون داشتند.

در وسترن بلات باندهای آنتی ژنی ایمنوژنیک در محدوده ۱۷ تا ۴۰ کیلودالتون ۶ باند قابل شناسایی بوده که از آنها هر ۶ باند بطور تقریبی برروی ژل آکریل آمید قابل رویت بودند. ۴ باند مخصوصا باندهای با وزن مولکولی ۲۲، ۲۵، ۳۰ کیلودالتون در این محدوده به عنوان آنتی ژن‌های غیر ایمونوژنیک قابل شناسایی بودند.

در محدوده ۴۰ تا ۶۰ کیلودالتون فقط ۳ باند به عنوان آنتی ژن‌های ایمنوژنیک شناسایی شده که با توجه به غیر حساس بودن محاسبه لگاریتمی آین باندها در SDS-PAGE نیز موجود بودند. در محدوده ۷۰ تا ۸۰ کیلودالتون دو باند با وزن مولکولی ۷۰ و ۷۵ کیلودالتون با سرم مثبت واکنش نشان داده که بنظر می‌رسد که یکی از آنها (۷۰ کیلودالتون) احتمالا همان باند ۷۰ کیلودالتون در SDS-PAGE بوده و باند ۷۵ کیلودالتون یر روی SDS-PAGE قابل محاسبه نبود. باندهای ایمونوژنیک با وزن مولکولی ۱۳۰، ۱۷۰، ۲۱۶ و ۲۵۷ برروی SDS-PAGE قابل شناسایی نبودند. به نظر می‌رسد که این آنتی ژن‌ها دراووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم از بیان کمتری برخوردار بوده اما قابلیت ایمونوژنسیتی بالایی را به خود اختصاص می‌دهند. از آنجایی که بسیاری از پروتئین‌های دیواره اسپوروزایتها و مروزوآیتها دارای قسمت‌های کربوهیدراتی بوده، می‌توان چنین تصور نمود که قندهای تشکیل دهنده بخش کربوهیدراتی این گلیکوپروتئین‌ها ساختار اپیتوپهای آنتی ژنیک این انتی ژن‌ها را تشکیل می‌دهند(۲۵). در این صورت این مولکول‌ها می‌توانند با داشتن ساختار مشترک کربوهیدراتی با پادگن‌های دیگر که وزن مولکولی متفاوت دارند واکنش همسان ایمنو ژنیک داشته باشند.

در برخی مطالعات آنتی بادی سرم گاوهای آلوده در وسترن بلات آنتی ژنهایی با وزن مولکولی ۱۱ تا ۱۴، ۱۷ تا ۲۰، ۲۰ تا ۲۳، ۳۸، ۴۴، ۴۷ تا ۴۹، ۵۵ تا ۶۹، ۹۰، ۱۴۰ و ۲۰۰ کیلودالتون را شناسایی کردند(۱۲،۱۶،۱۷،۳۱). برخی از خانواده‌های این پروتئین‌ها (۴۰-۱۹، ۷۰-۴۰ و بالاتر از ۷۰ کیلودالتون) در مطالعه حاظر نیز به عنوان آنتی ژنهای ایمنوژنیک شناسایی شدند.

جالب توجه اینکه نشان داده شده است ایمنوگلوبولین آغوزهایپر ایمیون گاو علیه کریپتوسپوریدیوم پاروم می‌تواند علائم بالینی کریپتوسپوریدیوز را در انسان بهبود ببخشد(۶،۲۲،۲۳،۲۴،۲۹،۳۰) تجربیات انجام یافته با این انگل بر روی مدلهای حیوانی حاکی از آن است که ایمنوگلوبولین موجب نوترالیزاسیون عفونت اسپروزوئیت می‌گردد. همچنین مشاهدات نشان داده است که این آنتی بادی‌ها در برون بدن موجب ممانعت از آلوده سازی سلول میزبان با اسپروزوئیت می‌شود(۳،۲۱،۲۲،۲۷). اگرچه تاکنون به طور دقیق آنتی ژنهای خنثی کننده این انگل مشخص نشده است ولیکن چندین مولکول انتخابی تعیین و معرفی گردیده‌اند (۲،۹،۲۱،۲۲،۲۷) اکثریت پروتئین‌ها و گلیکو پروتئین‌ها مربوط به این آنتی ژنها بر روی سطح اسپروزوئیت و یا اندامکهای ترشحی بخش کمپلکس راسی قرار دارند. البته برخی از این آنتی ژن‌ها در هنگام حرکت اسپروزوئیت جهت ورود به سلول اپیتلیال ترشح می‌گردند. تاکنون به طور دقیق بیست پروتئین به وزن مولکولی نسبی ۱۱ تا ۹۰۰ کیلودالتون از کریپتوسپوریدیوم پاروم معرفی شده‌اند که برخی از اینها که برروی پلاسما لما اسپروزوئیت قرار گرفتند از طریق ایمنوگلوبولین آغوزهایپر ایمیون شناسایی می‌گردند. این مولکولها می توانند انتخاب مناسبی برای آنتی ژنهای خنثی کننده باشند (۳،۲۱،۲۶). تجربیات میکروسکوپ فلورسانس با برخی از آنتی بادیهای مونوکلونال یا پلی کلونال توانسته است هفت پروتئین سطحی اسپروزوئیت و مروزوئیت را با وزن مولکولی نسبی ۱۵ تا بیش از ۱۲۰۰ کیلودالتون شناسایی نماید(۷،۲۶،۲۸) که اکثریت این آنتی ژنها گلیکوپروتئین بوده که بخش کربوهیدرات مولکول یا از طریق N-linkage و یا O-linkage به اسیدهای آمینه مربوطه (serin/threonine ,asparagine) پیوند برقرار می‌کنند. بعضی از این پروتئین‌ها، پروتئین‌های ۱۵ تا ۱۷، ۲۳ تا ۲۷ و ۹۰۰ کیلودالتون می‌باشند. که اکثر این پروتئینها در سطح غشاء و یا محتوای سیتوپلاسم اسپروزوئیت وجود دارند. پروتئینهای ۱۷-۱۵ و ۲۷-۲۳ کیلودالتون توسط ایمنوگلوبولین انسانی و حیوانی به خوبی شناسایی می‌گردند(۱۳،۱۴،۱۸،۲۰) و باور عمومی بر این است که تیتر بالای این آنتی بادی‌ها مرتبط با مصونیت از شکل بالینی بیماری است.

به نظر می‌رسد که پروتئینهای با وزن مولکولی پایین در محدوده ۱۹ تا ۳۸ کیلودالتون و پروتئین‌های سنگین‌تر از ۷۰ کیلودالتون که از بیان بالایی برخوردار نبوده اما از لحاظ ترغیب ایمونوژنیک بسیار موثر بوده‌اند، می‌توانند به عنوان کاندیداهایی برای تحریک کافی سیستم ایمنی جهت مبارزه با

کریپتوسپوریدیوم پاروم مورد استفاده قرار گیرند. در تایید نتایج فوق و بر اساس نظریه Fayer درسال ۱۹۹۷ مولکولهای سطحی مهم اسپروزوئیت و مروزوئیتها با وزن مولکولی ۱۱ تا ۲۳ کیلودالتون که ظاهر بسیار متفاوت در وسترن بلات دارند، یکی از ایمنوژن ترین آنتی ژنهای کریپتوسپوریدیوم پاروم است واین پروتئین‌ها غالبا ضعیف ترین باند را در ایمنوبلات آشکار می‌سازند(۳).

تشکر وقدردانی

این طرح با اعتبارات صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران انجام پذیرفته است. نگارندگان بدینوسیله مراتب امتنان و تشکر خود را اعلام می‌دارند. همچنین مساعدت آقای دکتر گرجی دوز در تهیه نمونه‌های مزرعه‌ای موجب تشکر و قدردانی است.

References

1. Arrowood, M. J., Mead, J.R., Mahrt, J.L., Sterling, C. R. (1989) Effects of immune colostrum and orally administered antisporozoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. Infect. Immun. 57: 2283-2288.
2. Barnes, D.A., Bonnin, A., Huang, J.X., Gousset, L., Wu, J., Gut, J., Doyle, P., Dubremetz, J.F., Ward, H., Peterson, C. (1998) Anovel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion.Mol.Biochem.parasitol.96: 93-110.
3. Doyle, P.S., Crabb, J., Petersen, C. (1993) Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity in vitro and in vivo. Infect. Immun. 61: 4079-4084.
4. Fayer, R. (1997) Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC press. NewYork. USA. pp. 235-255.
5. Fayer, R., Andrews, C., Ungar, BLP., Blagburn, B. (1989) Efficacy of hyper immune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. J. parasitol. 75: 393-397.
6. Greenberg, P.D., Koch, J., Cello, JP. (1996) Diagnosis of *Cryptosporidium parvum* in patients with severe diarrhea and Aids. Dig. Dis. Sci. 41: 2286-2290.
7. Gut, J., Nelson, R.G. (1994) *Cryptosporidium parvum* sporozoites deposit trails of 11A5 antigen during gliding locomotion and shed 11A5 antigen during invasion of MDCK cells invitro. J. Eukaryot. Microbial. 41: 42s-43s.
8. Henriksen, SV.Aa., Poglenz, JF. (1981) Staining of Cryptosporidium by a modified Ziehl Nelson technique. Acta. Vet. Scand. 22: 594-596.
9. Jenkins, M.C. O., Brien, C., Trout, J., Guidry, A., Fayer, R. (1999) Hyperimmune bovine colostrums specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. Vaccine. 17: 2453-2460.
10. Lorenzo, M. J., Ares-Mazas, E., Villacorta Martinez de Maturana, I. (1993) Detection of Oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asmptomatic adult cattle.Vet. Parasitol. 47: 9-15.
11. Lorenzo, MJ., Ben, B., Mendez, F., Villacorta, I., Ares -Mazas, M E. (1995) *Cryptosporidium parvum* oocyst antigens recognized by sera from infected asymptomatic adult Cattle. Vet. Parasitol. 60: 17.
12. Lumb, R., Lanser, JA., ODonoghue, PJ. (1988) Electrophoretic and immunoblot analysis of cryptosporidium oocytes. Immunol.Cell Biol. 66: 369-384.
13. McLauchlin, J., Casemore, DP., Moran, S., Patel, S. (1998) The epidemiology of Cryptosporidiosis: application of experimental sub-typing and and antibody detection systems to the investigation of water -borne outbreaks.Folia parasitol.(praha) 45: 83-92.
14. Mead, JR., Arrowood, MJ., Sterling, CR. (1998) Antigens of Cryptosporidium sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. J. Parasitol. 74: 135-143.
15. Mosier, DA., Kuhls, TL., Simons, KR., Oberst, RD. (1992) Bovine Humoral immune response to *Cryptosporidium parvum*. J. Clin. Microbiol. 30: 3277.
16. Peeters, JE., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vandergheynst, D., Naciri, M., Ares-Mazas, E., YYvore, P. (1992) *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific

serum and local antibody responses (immunoglobulin A(IgA), IgG and IgM) after natural and experimental infections. Infect. Immun. 60: 2309.

17. Perryman, LE., Kapil, SJ., Jones, ML., Hunt, EL. (1999) Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrums induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. Vaccine. 17: 2142-49.
18. Priest, JW., Kwon, JP., Moss, DM., Roberts, JM., Arrowood, MJ., Dworkin, MS., Juranek, DD., Lammie, PJ. (1999) Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. J. Clin. Microbiol. 37: 1385-1392.
19. Rahbari, S., Djamshidi, Sh., Keivani, H. (1993) Study on cryptosporidiosis in animal and human. J. Vet. Med. Univ. Tehran. 48: 39-47.
20. Rahbari, S., Nabian,S., Azizi, HR., Rezazade, A., Mokhber-Dezfouli, MR. (2005) Detection of IgG Antibodies to Cryptosporidum parvum using Eimeria tenella and Cryptosporidum parvum Antigens. J. Appl. Anim. Res. 28: 141-143.
21. Reperant, JM., Naciri, M., Iochmann, S., Tilley, M., Bout, DT. (1994) Major antigens of Cryptosporidim parvum recognized by serum antibodies from different infected animal species and man. Vet. Parasitol. 55: 1-13.
22. Riggs, MW., McGurire, TC., Mason, PH., Perryman, LE. (1989) Neutralization-sensitive epitopes are exposed on the surface of infectious *Cryptosporidium parvum* sporozoites. J. Immunol. 143: 1340-1345.
23. Rump, JA., Arndt, R., Arnold, A., Bendick, C., Dichtelmuller, H., Franke, M., Helm, EB., Jager, H., Kampmann, B., Kolb, P., Kreuz, W. (1992) Treatment of diarrhea in human immunodeficiency virus -infected patints with immunoglobulins from bovine colostrums. Clin. Investig. 70: 588-594.
24. Shield, JC., Melville, C., Novelli, V., Anderson, G., Scheimberg, I., Gibb, D., Milla, P. (1993) Bovine colostrum immunoglobulin concentrate for cryptosporidiosis in Aids. Arch. Dis. Child. 69: 451-453.
25. Strong,WB., Gut, J., Nelson, RG. (2000) Cloning and sequence Analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* Gene Encoding a 60-kilodalton Glycoprotein and Characterization of Its 15-and45-kilodalton Zoite surface Antigen products. Infect. Immun. 68: 4117-4134.
26. Tilley, M., Upton, SJ., Blagburn, BL., Anderson, BC. (1990) Identification of Outer Oocyst wall proteins of three Cryptosporidium (Apicomplexa: Cryptosporiidae) species by surface labeling. Infect. Immun. 58: 252-253.
27. Tilley, M., Upton, SJ. (1991) sporozoite and merozoites of *Cryptosporidium parvum* share a common epitope recognized by a monoclonal antibody and two-dimensional electrophoresis. J. Protozool. 38: 48s-49s.
28. Tilley, M., Upton, SJ., Fayer, R., Barta, JR., Chrisp, CE., Freed, PS., Blagburn, BL., Anderson, C., Barnard, SM. (1991) Identification of a 15-kilodalton surface glycoprotein on sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. Infect. Immun. 59: 1002-1007.
29. Tilley, M., Eggleston, MT., Upton, SJ. (1994) Multiple oral inoculation with *Cryptosporidium parvum* as a means of immunization for production of monoclonal antibodies. FEMS Microbial. Lett. 113: 235-240.
30. Tzipori, S., Roberton, D., Chapman, C. (1986) Remission of diarrhea du to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. Br. Med. J. 293: 1276-1277.
31. Ungar, BL., Ward, DJ., Fayer, R., Quinn, CA. (1990) Cessation of Cryptosporidium associated diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient after treatment with hyperimmune bovine colostrum. Gastroenterol. 98: 486-489.

J.Vet.Res. 64,1:15-21,2009

IDENTIFICATION OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* BY PCR AND ITS DETERMINATION OF PROTEIN PATTERN AND IMMUNOGENIC ANTIGENS

Ebrahimzade, E.[1], Shayan, P.[1], Nabian, S.[1], Rahbari, S.[1]*, Mokhber dezfouli, M.R.[2]

[1]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[2]*Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 30 December 2007 , Accepted 12 June 2008)

Abstract:

Cryptosporidium parvum is an apicomplexan protozoan parasite which causes diarrhea in both human and wide range of animals. Since this protozoa causes remarkable economic losses in cattke industry in Iran, the molecular determination of porotozoa and characterization of its protein pattern and immunogenic antigend are the aim of this study. In this study, diarheatic fecal samples of calves suspected for cryptosporidiosis were collected and identified. Purification and concentration of cryptosporidial oocysts from fecal samples was performed. Oocysts were confirmed as *Cryptosporidium parvum* by semi-nested PCR using specific primers designed from 18srRNA gene of *Cryptosporidium parvum*. A calf with negative antibodies against Cryptosporidium parvunm was infected with 5×10^6 oocysts. 5 days after inoculation, oocysts were isolated and purified . Soluble proteins from sporozoites were prepared and analyzed by SDS-PAGE and western blotting. There was an intense recognition of some10 to 100 kDa, ten low molecular weight proteins were recognized between 20-40 kDa, six separated protein bands was recognized between 40-70 kDa, immunoreactive proteins were present at different molecular weights between 17-260 kDa. Three antigens of apparent molecular weights 20-30 kDa, three antigen bands between 40-60 kDa and 2 bands 70-75 kDa were identified. Antibody responses to cryptosporidial antigens at high molecular weights were successfully diagnosed with apparent molecular weights 130,170,216 and 257kDa.

Key words: *Cryptosporidium parvum*, Immunoblot, SDS-PAGE, PCR, Semi-nested PCR.

***Corresponding author's email: srahbari@ut.ac.ir, Tel: 021-61117045, Fax: 021-66933222**