● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ پانزدهم، شمارهٔ ٤، ص ۳۲۰-۳۱۳، ۱۳۸۷

مقالهٔ پژوهشی

اپیدمیولوژی آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در گاوهای شهرستان کرمان و تعیین گونه و ژنوتایپ تعدادی از ایزوله‌ها

رضا فتوحی اردکانی*[۱]، دکتر مجید فصیحی‌هرندی[۲]، سهیل سلیمان‌بنایی[۳]، حسین کامیابی[٤]، دکتر منیژه عطاپور[٥]، دکتر ایرج شریفی[٦]

خلاصه

مقدمه: کریپتوسپوریدیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی قابل انتقال بین انسان و دام است که در پستانداران شایع می‌باشد و تاکنون گونه‌های مختلفی از این تک‌یاخته گزارش شده است. این مطالعه با هدف شناسایی وضعیت اپیدمیولوژی عفونت کریپتوسپوریدیوم در گاوهای شش منطقه شهرستان کرمان با روش‌های روتین مرفولوژیک و تعیین گونه و ژنوتیپ با روش‌های مولکولی انجام گرفت.

روش: نمونه مدفوع به‌طور مستقیم از رکتوم گاوها جمع‌آوری شد. اُسیست‌های کریپتوسپوریدیوم با روش تغلیظ فرمالین-اتر جدا و با رنگ‌آمیزی کاینیون اسید فست اصلاح شده رنگ‌آمیزی گردید. در تعدادی از ایزوله‌ها DNA با کیت ®QIAamp استخراج و با پروتکل Nested PCR-RFLP بر روی ژن 18S rRNA قطعه حدود ۸۵۰ بازی تکثیر و با دو آنزیم محدود کننده SspI و VspI تعیین گونه و ژنوتایپ گردید. حداقل ۲۰ اُسیست از هر ایزوله اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: از مجموع ۴۱۲ رأس گاو، ۷۸ مورد (۱۸/۹٪) آلوده به کریپتوسپوریدیوم بودند. آلودگی بر حسب قوام نمونه رابطه معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۲۶) به‌طوری که ۳۱/۸٪ گاوهای اسهالی و ۱۷/۴٪ گاوهای غیراسهالی آلوده بودند. سن با آلودگی ارتباط معنی‌دار داشت (P=۰/۰۰۰) به‌طوری که گوساله‌های شیرخوار زیر دو ماه با شیوع ۳۳/۶٪، بیشتر از سایر گروه‌ها آلوده بودند (۴۵/۱۳۴). در این مطالعه چهار ایزوله *C.andersoni* و هشت ایزوله *C.parvum* برای اولین بار در ایران با روش‌های مولکولی شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: کریپتوسپوریدیوم در گاوهای مناطق مختلف شهرستان کرمان به‌ویژه گوساله‌های اسهالی شایع می‌باشد. به‌علاوه علی‌رغم وجود *C.parvum* به‌عنوان گونه غالب همانند سایر کشورها، وجود *C.andersoni* برای اولین بار در ایران با روش‌های مولکولی تأیید می‌گردد. با توجه به خسارات اقتصادی ناشی از این آلودگی لزوم بررسی بیشتر از راه مولکولی در شناسایی آلودگی در سایر نقاط استان و ایران احساس می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کریپتوسپوریدیوم، Nested PCR، *C.andersoni*، شیوع، گاو، کرمان

۱-مربی گروه انگل‌شناسی و مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲-دانشیار گروه انگل‌شناسی و مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- کارشناس ارشد انگل‌شناسی، مرکز بهداشت شماره ۲ اصفهان ۴- کارشناس، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۵-دکترای علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۶-استاد گروه انگل‌شناسی و مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ● **آدرس پست الکترونیک:** fotouhi@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸٦/۹/۱۷ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۷/۱/۲٤ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۷/۳/۲۲

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کریپتوسپوریدیوزیس یکی از بیماری‌های تک‌یاخته‌ای بوده که عامل آن کوکسیدیایی از جنس کریپتوسپوریدیوم می‌باشد. کریپتوسپوریدیوم یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های شایع روده بوده و نقش زئونوتیک آن باعث اهمیت آن از نظر پی‌آمدهای اقتصادی و بهداشتی در جوامع دامی و انسانی گردیده است. میزان شیوع در گاوها از صفر تا ۷۰ درصد در مناطق مختلف دنیا گزارش شده است (۱،۲). مطالعات مختلف در ایران نشان داده که شیوع در گاوها بسته به عوامل مختلف اپیدمیولوژیک بین ۳/۸ تا ۴۲/۸ درصد متغیر بوده است (۵-۳). کریپتوسپوریدیوزیس در ایران از گوسفند و بز نیز گزارش شده است (۶،۷). تاکنون یک مطالعه در مورد شیوع کریپتوسپوریدیوم در منطقه کرمان انجام شده که با توجه به سایر مناطق ایران شیوع بالایی را نشان می‌دهد (۵) و لزوم بررسی بیشتر در سایر نقاط شهرستان احساس می‌گردد.

به‌دلیل تفاوت‌های موجود بین گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف از نظر آلودگی، اپیدمیولوژی و مکانیسم‌های انتقال بیماری، شناسایی گونه و ژنوتیپ‌های کریپتوسپوریدیوم در هر منطقه جغرافیایی خاص از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تا زمانی که گونه یا زیرگونه‌های کریپتوسپوریدیوم در هر منطقه شناسایی و تأیید نگردد، تشخیص اپیدمیولوژی و دامنه میزبان ایزوله‌های بررسی شده فرضی و غیردقیق خواهد بود. از طرفی برای تعیین گونه و زیرگونه‌های کریپتوسپوریدیوم ناچار به استفاده از روش‌های مولکولی می‌باشد (۱،۲).

تاکنون ۱۶ گونه کریپتوسپوریدیوم از ۵ رده مهره‌داران گزارش گردیده که از این میان چهارگونه *C.parvum*, *C.andersoni* ، *C.bovis* و *C.felis* و ژنوتیپ deer-like از گاو گزارش شده است (۱). در ایران اخیراً برای اولین بار *C.parvum* در انسان و گاو گزارش شده است (۸،۹).

C.andersoni اولین بار در سال ۲۰۰۰ از *C.muris* تفکیک داده شد و به‌عنوان یک گونه آلوده کننده گاو معرفی شد. خصوصیات مرفولوژیک آن در مقایسه با *C.parvum* تا حدودی کمک به تشخیص آن می‌کند. به‌طوری که *C.parvum* با اندازه ۵×۴/۵ میکرون در مقابل *C.andersoni* با اندازه ۷/۶×۵/۶ میکرون کوچک‌تر می‌باشد. *C.andersoni* تاکنون از کشورهای مختلف جهان گزارش شده است. گزارشات بیشتر از گاو و مواردی هم از گوسفند و شتر بوده است. *C.andersoni* عفونت‌زای شیردان گاو بوده و معمولاً باعث آلودگی گوساله‌های از شیر گرفته شده و گاوهای جوان می‌شود. عفونت با این گونه می‌تواند متوسط تا شدید باشد و باعث کاهش وزن دام و کاهش شیر دادن به گوساله شده و تولید شیر را در گاوهای شیری کم می‌کند (۲،۱۰).

مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان شیوع کریپتوسپوریدیوم در گاوهای شهرستان کرمان، برای اولین بار با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی *C.andersoni* را در ایران گزارش می‌کند.

روش بررسی

این مطالعه یک بررسی مقطعی بوده و جامعه مورد مطالعه ۴۱۲ رأس گاو از ۶ منطقه مختلف شهرستان در سال‌های ۱۳۸۳-۱۳۸۲ بوده است. برای نمونه‌گیری با مراجعه به هر منطقه نمونه مدفوع هر حیوان با دستکش معاینه برداشته و در ظروف در پیچ‌دار پلاستیکی نگهداری و به آزمایشگاه‌های پژوهشی گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی منتقل گردید. مشخصات هر دام شامل جنس و سن و قوام هر نمونه به‌صورت پرسشنامه پر گردید. نمونه مدفوع با روش تغلیظ فرمالین-اتر تغلیظ گردید سپس لام‌های تهیه شده با روش رنگ‌آمیزی کاینیون اسید فست تغییر یافته (زیل‌نلسون) رنگ‌آمیزی شد (۴). پس از رنگ‌آمیزی

Archive of SID

www.SID.ir

اُاُسیست‌های قرمز رنگ با عدسی ۴۰ پیدا و با عدسی ۱۰۰ تشخیص داده شد. برای هر اسلاید ۲۰ اُاُسیست توسط یک نفر متخصص ماهر با میکروسکوپ کالیبره اندازه‌گیری شد. اُاُسیست‌های جدا شده برای بررسی مولکولی در دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵٪ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای بررسی مولکولی اُاُسیست‌ها دوبار با آب مقطر شسته شدند تا دی‌کرومات پتاسیم آن‌ها خارج گردد. سپس DNAی آنها با استفاده از کیت QiAmp Stool Mini Kit (Qiagen Inc, Mississauga, Ontario) طبق دستورالعمل سازنده کیت استخراج گردید. قبل از شروع مراحل استخراج برای پاره شدن دیواره اُاُسیست‌ها ۵ بار توسط نیتروژن مایع و آب جوش ذوب و انجماد گردید. سپس بر اساس پروتکل nested PCR ژن 18S rRNA کریپتوسپوریدیوم بر اساس رفرنس Jiang و همکاران تکثیر گردید (۱،۱۱). در PCR اول یک قطعه ۱۳۲۵ بازی و در PCR دوم یک قطعه ۸۲۵ تا ۸۶۴ بازی تکثیر گردید. برای تعیین گونه و ژنوتیپ ایزوله‌ها با روش RFLP محصول PCR دوم با آنزیم‌های SspI و VspI طبق پروتکل رفرنس و سازنده آنزیم هضم گردید (۱۱). آنزیم SspI تعیین گونه‌های کریپتوسپوریدیوم و آنزیم VspI برای تعیین ژنوتیپ‌های *C.parvum* به‌کار می‌رود.

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از تست‌های آماری مربع کای و تست‌های ناپارامتریک مانند مان-ویتنی U و کروسکال-والیس H استفاده گردید. فاصله اطمینان ۹۵٪ و معیار معنی‌داری P<۰/۰۵ تعیین گردید.

نتایج

از ۴۱۲ گاو مورد بررسی در مناطق مختلف کرمان در ۷۸ مورد (۱۸/۹٪؛ CI=۱۵/۲۶-۲۲/۰۵٪) اُاُسیست کریپتوسپوریدیوم مشاهده گردید (جدول ۱). از ۴۴ نمونه اسهالی ۱۴ مورد (۳۱/۸٪) و از ۳۶۸ نمونه غیراسهالی ۶۴ مورد (۱۷/۴٪) آلوده به کریپتوسپوریدیوم بوده که اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (P=۰/۰۲۶). همچنین میزان شیوع انگل بر حسب میانگین سن نشان می‌دهد که شیوع در گوساله‌های سنین پایین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های سنی بالا می‌باشد (P=۰/۰۰۰). به‌طوری که شیوع در گوساله‌های زیر دو ماه ۳۳/۶٪ می باشد (جدول یک). نتایج نشان می‌دهد که آلودگی بین گاوهای نر و ماده اختلاف معنی‌داری ندارد.

جدول ۱: *فراوانی میزان عفونت کریپتوسپوریدیوم در گاوهای شهرستان کرمان بر حسب اطلاعات اپیدمیولوژیک*

متغیر	فراوانی تعداد (درصد)	مثبت	منفی	جمع	P.value
جنس	نر	(۲۱/۲)۱۸	(۷۸/۸)٦۷	(۲۰/٦)۸۵	۰/۵۳۸
	ماده	(۱۸/۳)٦۰	(۸۱/۷)۲٦۷	(۷۹/٤)۳۲۷	
سن	زیر ۲ ماه	(۳۳/٦)٤۵	(٦٦/٤)۸۹	(۳۲/۵)۱۳٤	۰/۰۰۰
	۲-۱۲ ماه	(۱۱)۲۳	(۸۹)۱۸٦	(۵۰/۷)۲۰۹	
	بالای ۱۲ ماه	(۱٤/۵)۱۰	(۸۵/۵)۵۹	(۱٦/۷)٦۹	
قوام	اسهالی	(۳۱/۸)۱٤	(٦۸/۲)۳۰	(۱۰/۷)٤٤	۰/۰۲٦
	غیر اسهالی	(۱۷/٤)٦٤	(۸۲/٦)۳۰٤	(۸۹/۳)۳٦۸	
جمع		(۱۸/۹)۷۸	(۸۱/۱)۳۳٤	(۱۰۰)٤۱۲	

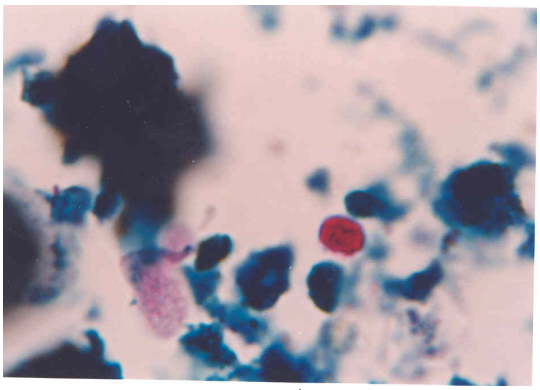
Archive of SID

www.SID.ir

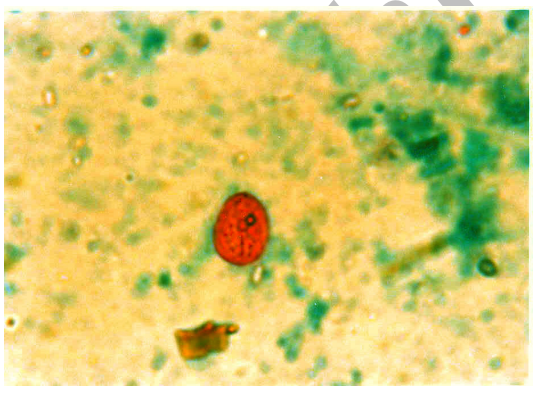
در تمام ۷۸ اسلاید اُاُسیست‌ها اندازه‌گیری شد و متوسط اندازه اکثر اُاُسیست‌ها ۶×۴ میکرون بود (شکل ۱-الف). اُاُسیست‌های ۶ ایزوله با متوسط اندازه ۵/۵×۷/۵ میکرون (شکل ۱-ب) بزرگ‌تر بودند. بررسی مولکولی با روش nested PCR-RFLP نشان داد که چهار ایزوله با اُاُسیست‌های بزرگ‌تر *C.andersoni* می‌باشد (شکل ۲-الف و ب). همچنین بررسی مولکولی هشت ایزوله با اندازه ۶×۴ میکرون *C.parvum* را نشان داد. اطلاعات اپیدمیولوژیک دوازده ایزوله که با بررسی مولکولی تعیین گونه و ژنوتیپ گردیدند در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: *اطلاعات اپیدمیولوژیک گونه‌های کریپتوسپوریدیوم جداشده از گاوهای شهرستان کرمان با روش nested PCR-RFLP شناسایی شده بر اساس ژن 18S rRNA*

ایزوله	جنس	گروه سنی	قوام نمونه	اندازه اُاُسیست (میکرون)	گونه کریپتوسپوریدیوم
۱	ماده	۱	غیراسهالی	٤×٥/٥	*C.parvum*
۲	ماده	۲	اسهالی	٤×٦	*C.parvum*
۳	ماده	۲	اسهالی	٤×٦	*C.parvum*
٤	نر	۱	غیراسهالی	٤×٦	*C.parvum*
٥	ماده	۱	غیراسهالی	٤×٦	*C.parvum*
٦	ماده	۱	غیراسهالی	٤×٦	*C.parvum*
۷	ماده	۱	غیراسهالی	٤×٦	*C.parvum*
۸	نر	۱	غیراسهالی	٤×٦	*C.parvum*
۹	ماده	۲	غیراسهالی	٦×٨	*C.andersoni*
۱۰	ماده	۳	غیراسهالی	٦×٨	*C.andersoni*
۱۱	ماده	۲	اسهالی	٦×٧/٥	*C.andersoni*
۱۲	ماده	۲	غیراسهالی	٦×٧/٥	*C.andersoni*



الف



ب

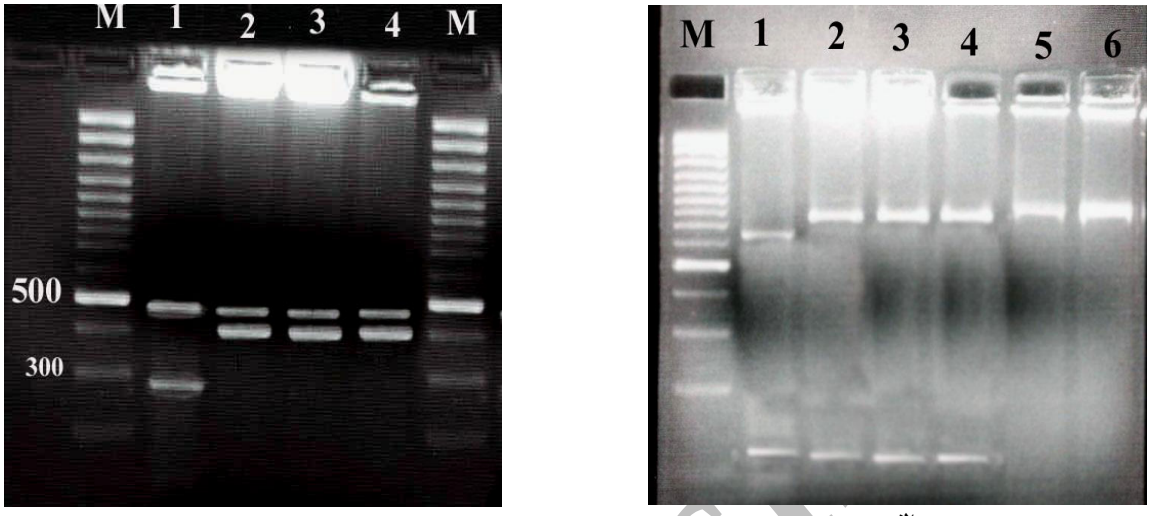
شکل ۱: *اُاُسیست‌های قرمز کریپتوسپوریدیوم با رنگ‌آمیزی کاینیون اسید فست تغییر یافته با اندازه‌های متفاوت (بزرگنمایی ۱۰۰۰)*

الف: متوسط اندازه اُاُسیست ٤×٦ میکرون که در محدوده اندازه *C.parvum* می‌باشد.

ب: اُاُسیست‌های با متوسط اندازه ۵/۵×۷/۵ میکرون که بزرگ‌تر و بیضی‌تر از شکل الف بوده و در محدوده اندازه *C.andersoni* می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



ب الف

شکل ۲: *تعیین گونه و ژنوتیپ ایزوله‌های کریپتوسپوریدیوم از گاوهای شهرستان کرمان با روش* nested PCR-RFLP *با ژن* 18S rRNA.

الف: هضم محصول PCR دوم با آنزیم SspI، ستون شماره یک، *C.parvum* (بند های ۴۴۹، ۲۵۴ و ۱۰۸ بازی)؛ ستون شماره ۲ تا ۴، *C.andersoni* (بندهای ۴۴۸ و ۳۸۵ بازی).

ب: ستون شماره ۱ تا ۴، هضم محصول PCR دوم با آنزیم VspI؛ ستون شماره یک، *C.parvum* (بند های ۱۰۴ و ۶۲۵ بازی)؛ ستون شماره ۲ تا ۴، *C.andersoni* (بند های ۱۰۲ و ۷۳۱ بازی)؛ ستون شماره ۵ و ۶، بند حدود ۸۵۰ بازی حاصل از محصول PCR دوم. M: مارکر اندازه DNA بر اساس ۱۰۰ بازی

بحث

آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در کرمان، در کودکان اسهالی ۴/۱٪ در بز ۱۷/۶٪، در گوسفند ۱۳/۸٪ و در گوساله ۲۱/۶٪ گزارش گردیده است (۵،۶). بررسی حاضر نشان داد که کریپتوسپوریدیوزیس در گاوهای شهرستان کرمان شیوع بالایی دارد. هرچند میزان آلودگی ۱۸/۹ درصدی در این مطالعه نسبت به بررسی رادفر و همکاران (۵) در کرمان کمتر می‌باشد ولی در مقایسه با بررسی اعظمی در اصفهان (۳) خیلی بالاتر بوده که این مسئله می‌تواند به‌دلیل تفاوت در شرایط نگهداری دام، مدیریت بهداشتی گاوداری‌ها و تفاوت در شرایط آب و هوایی باشد.

در این بررسی شیوع عفونت بر حسب سن اختلاف معنی‌داری نشان داد که با سایر مطالعات مطابقت دارد. این مسئله نشان می‌دهد که گوساله‌های جوان نسبت به گاوهای بالغ حساس‌تر بوده و بیشتر در معرض آلودگی قرار می‌گیرند و بایستی تدابیر بهداشتی و مدیریت نگهداری در دام‌های جوان‌تر بهتر اعمال شود (۳،۵،۱۲).

در مقایسه میزان آلودگی بر حسب قوام نمونه رابطه معنی‌داری مشاهده شد به‌طوری که میزان آلودگی در گاوهای اسهالی حدود دو برابر بیشتر بود. این تفاوت در سایر مطالعات هم به چشم می‌خورد و نشان‌دهنده این است که کریپتوسپوریدیوم خود یکی از عوامل مهم مولد اسهال می‌باشد و می‌تواند باعث ضررهای اقتصادی فراوانی شود (۱۰،۱۲). همچنین در این مطالعه شیوع عفونت در گوساله‌های اسهالی ۳۵/۷٪ بود که نشان‌دهنده بالا بودن میزان عفونت در گوساله‌های اسهالی با سن پایین است.

در ایران تاکنون *C.parvum* از انسان و گاو با روش‌های مولکولی گزارش شده است (۸،۹) و مطالعه حاضر نیز وجود *C.parvum* در گاوهای شهرستان کرمان را با روش‌های مولکولی و مورفولوژیکی تأیید می‌کند. *C.parvum* (Senso Stricto یا همان ژنوتیپ گاوی) شایع‌ترین گونه زئونوز و آلوده‌کننده پستانداران است که تاکنون

Archive of SID

www.SID.ir

تعداد زیادی میزبان برای آن گزارش شده است. این گونه دارای ژنوتیپ‌های مختلفی در چندین میزبان می‌باشد که نقش آلوده‌کنندگی آن برای سایر میزبان‌ها جای سؤال دارد. بررسی‌های مولکولی و تعیین گونه و ژنوتیپ‌های کریپتوسپوریدیوم به شناسایی منبع آلودگی و اختصاصیت میزبان و نقش آنها در آلودگی سایر میزبان‌ها کمک می‌کند و باعث جلوگیری از سردرگمی اپیدمیولوژیست‌ها در کنترل و پیشگیری از عفونت می‌گردد (۲).

تاکنون دو گونه شایع از جنس کریپتوسپوریدیوم در گاو شناسایی شده است. این دو گونه *C.parvum* که عفونت‌زای روده کوچک بوده و *C.andersoni* که عفونت‌زای شیردان است، می‌باشند و از نظر اندازه اُسیست تا حدودی قابل تفکیک هستند. *C.parvum* شیوع بیشتری داشته و بیشتر با اسهال در دام‌های شیرخوار همراه است. بیشترین عفونت در دام‌های ۳-۱ هفته‌ای می‌باشد. *C.andersoni* شیوع کمتری داشته و در گوساله‌های بالغ و جوان دیده می‌شود که شیوع آن همراه با کاهش وزن و فرآورده‌های شیری می‌باشد (۱).

در بررسی حاضر برای اولین بار در ایران وجود *C.andersoni* در گاو به اثبات رسید. قبلاً شواهدی از وجود کریپتوسپوریدیوم شبه موریس در گاو، گاومیش و شتر توسط نوری و همکاران از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (۱۳). همچنین *C.andersoni* از سایر مناطق دنیا مانند ویتنام (۵/۶٪)، ژاپن (۱/۵٪) و انگلستان (۱۶٪) گزارش شده است (۱۰). بررسی مولکولی نشان می‌دهد که *C.andersoni* همچون *C.parvum* در دام‌های شهرستان شایع می‌باشد. همه نمونه‌های تأیید شده *C.andersoni* در گروه سنی ۲ تا ۱۲ ماه و بالای ۱۲ ماه بوده در حالی که نمونه‌های *C.parvum* بیشتر در گروه سنی زیر ۲ ماه مشاهده گردید که با سایر مطالعات هم‌خوانی دارد (۱۰).

با توجه به خسارت اقتصادی زیادی که در نتیجه آلودگی با این گونه برای دامداران ایجاد می‌گردد لزوم بررسی بیشتر مولکولی در تشخیص آلودگی در سایر نقاط استان و ایران احساس می‌گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه با بخشی از هزینه طرح شماره ۸۳/۰۱ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گردیده است. بدین‌وسیله از مسؤولین آن معاونت تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

Epidemiology of Cryptosporidium Infection of Cattle in Kerman/Iran and Molecular Genotyping of some Isolates

Fotouhi Ardakani R., M.Sc.[1*], Fasihi Harandi, M., Ph.D.[2], Solayman Banai S., M.Sc.[3], Kamyabi H., B.Sc.[4], Atapour M., D.C.L.[5], Sharifi I., Ph.D.[6]

1. Instructor, Parasitology Department and Leishmaniasis Research Center, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Associate Professor, Parasitology Department and Leishmaniasis Research Center, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Master of Science in Parasitology, Isfahan Health Center 2, Isfahan, Iran
4. Bachelor of Science in Parasitology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5. Professional Doctor in Clinical Laboratory Sciences, Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
6. Professor of Parasitology, Parasitology Department and Leishmaniasis Research Center, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author, e-mail: fotouhi@kmu.ac.ir

(Received 7 Dec. 2007 Accepted 11 June 2008)

Abstract

Background & Aims: Cryptosporidiosis is one of the most important parasitic zoonoses of human and animals. This infection is common in mammals and caused by the coccidian parasites of the genus *Cryptosporidium*. The Present study was designed to determine the epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in Kerman by using conventional morphological as well as molecular methods for molecular characterization**.**

Methods: Fecal samples of cattle were collected fresh and directly from the rectum. *Cryptosporidium* oocysts were isolated by using formalin-ether sedimentation method followed by modified Ziehl-Neelsen staining technique. DNA of a number of isolates was extracted using QIAamp® DNA stool mini kit (Qiagen®). A nested PCR-RFLP protocol amplifying ~ 850 bp fragment of SSU-rRNA gene used to differentiate species and genotypes of the isolates, using SspI and VspI as two restriction endonucleases. For each slide at least 20 oocysts were measured.

Results: Seventy eight of 412 cattle (18.9%) were found to be infected. *Cryptosporidium* infection was associated with diarrhea (P=0.026) in a way that 31.8% of diarrheic cattle (14.44) and 17.4% of non diarrheic cattle (64.368) were infected. The rate of infection in suckling calves <2 months age was significantly higher than others (45.134 vs. 33.6%, P=0.000). In this study 4 isolates of *C. andersoni* and 8 isolates of *C. parvum* were found for the first time in Iran by using molecular techniques.

Conclusion: *Cryptosporidium* infection is common in cattle of Kerman. Moreover, in spite of the presence of *C.parvum* as the dominant species in Iran, the presence of *C.andersoni* in Iran is reported for the first time by molecular techniques. Economic and public health problems resulted from infection by *C.andersoni* require more investigations in other parts of Kerman province and Iran.

Keywords: *Cryptosporidium,* Nested PCR, *C.andersoni*, Prevalence, Cattle, Kerman

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2008; 15(4): 313-320

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Upton S.J. *Cryptosporidium*: they probably taste like chicken. In: Thompson R C A, Armson A, Ryan U M. (editors), *Cryptosporidium:* from Molecules to Disease. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. 2003; pp 3-10.
2. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* Taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(1): 72-97.
3. Azami M. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cattle in Isfahan, Iran. *J Eukaryot Microbiol* 2007; 54(1):100-2.
4. Henriksen SA, Pohlenz JF. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 1981; 22(3-4):594-6.
5. Radfar MH, Molaei MM, Baghbannejad A. Prevalence of *Cryptosporidium SPP*. Oocysts in dairy calves in Kerman, southeastern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research, University of Shiraz*. 2006; 7(2):81-4.
6. Fasihi Harandi M, Fotouhi Ardakani R. *Cryptosporidium* infection of sheep and goats in kerman: epidemiology and risk factor analysis. *J Vet. Res.* 2008; 63(1): 47-51.
7. Nouri M, Mahdavi Rad S. Effect of nomadic shepherds and their sheep on the incidence of cryptosporidiosis in an adjacent town. *J Infect* 1993; 26(1):105-6.
8. Fasihi Harandi M, Fotouhi Ardakani R. *Cryptosporidium* infection of farm animals: first identification of *Cryptosporidium andersoni* and *Cryptosporidium parvum* in Iran. 11th International Congress of Parasitology; 2006 Aug 6-11, Glasgow, Scotland.
9. 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(3):1033-5.
10. Nguyen ST, Nguyen DT, Le DQ, Le Hua LN, Van Nguyen T, Honma H, et al. Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium* spp. In cattle in central Viet Nam. *Vet Parasitol* 2007; 150(4): 357-61.
11. Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(8):4446-54
12. Nouri M, Toroghi R. Asymptomatic cryptosporidiosis in cattle and humans in Iran. *Vet Rec* 1991; 128(15): 358–9.
13. Nouri M. A cryptosporidium muris-like parasite in cattle and camels in Iran. *Indian Veterinary Journal* 2002; 50, 1-5.

Archive of SID

www.SID.ir