Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال هجدهم، بهار، شماره ۱، ۱۴۰۰، ۳۴۸۶-۳۴۷۷

تشخیص و شناسایی گونه‌های کریپتوسپوریدیوم با استفاده از روش‌های Nested PCR (Nested polymerase chain reaction) و (RFLP) Restriction fragment length polymorphism در گوساله‌های شهرستان شاهرود

مصطفی مشکات[۱]، بهار شمشادی*[۱]، کیومرث امینی[۲]

چکیده

گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* به شاخه اپی کمپلکس‌ها تعلق دارد و پروتوزواهای فرصت طلبی هستند که سیستم‌های تنفسی و گوارشی در انسان و حیوان‌ها را آلوده می‌کند. این مطالعه به منظور بررسی شیوع، تشخیص و شناسایی گونه‌های کریپتوسپوریدیوم با استفاده از روش‌های Nested PCR و (RFLP) Restriction Fragment Length Polymorphism در گوساله‌های شهرستان شاهرود انجام شد. ۲۵٦ نمونه‌ی مدفوع از گوساله‌های زیر ۲ ماه جمع‌آوری شد و نمونه‌های مثبت با استفاده از روش زیل-نلسون رنگ آمیزی شدند. پرایمرهای اختصاصی برای بررسی Nested PCR استفاده شد و زیرگونه‌ها توسط روش RFLP بررسی شدند. نتایج مطالعه میکروسکوپی نشان داد که ۲۷ نمونه (۱۰/٥٤ ٪) از نمونه‌های مورد بررسی مثبت بودند. نتایج برای روش Nested PCR نشان داد که از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، به‌ترتیب ۹۲/۵۹ ٪ و ۷/٤۱ ٪ به‌ترتیب برای *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* و *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* مثبت بودند. نتایج نشان داد که ۲۵ نمونه تحت تأثیر آنزیم VSP در نواحی ۱۰٤ و ٦۲۸ جفت باز قرار گرفتند، که نشان دهنده‌ی که تأیید کننده‌ی زیرگونه‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* گاوی و زیرگونه‌ی ژن A بودند. نمونه‌های تحت تأثیر آنزیم Ssp I قرار گرفتند و نتایج باندهایی را در ۳۸۵ و ٤٤۸ جفت باز نشان داد که نشان دهنده‌ی زیر گونه‌های *C. muris/C. andersoni* بودند. نتایج توسط آنزیم dde، باندهایی را در ۱۵٦، ۱۸٦ و ۲۲٤ جفت باز نشان داد که نشان دهنده‌ی زیر گونه‌ی *C. muris* بود. گونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف با استفاده از روش‌های مختلف شناسایی شدند که می‌تواند به کنترل کریپتوسپوریدیوز کمک کند.

واژگان کلیدی: کریپتوسپوریدیوز، گوساله‌ها، RFLP، شاهرود.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۱

مقدمه

عوامل تک یاخته‌ای به‌عنوان یکی از عوامل مهم در بروز اسهال گوساله‌ها همواره مورد مطالعه قرار گرفته است و مهم ترین تک یاخته‌ها که موجب اسهال در گوساله‌ها می‌شوند، کریپتوسپوریدیوم‌ها می‌باشند(۱). *کریپتوسپوریدیوم*، کوکسیدای کوچک است که به شاخه اپی کمپلکس‌ها تعلق دارد و دارای انتشار جهانی می‌باشد که بافت پوششی روده اکثر مهره داران را مورد تهاجم قرار می‌دهد(۲). *کریپتوسپوریدیوز* یک بیماری انگلی است عمدتا" از طریق آب آشامیدنی، تماس انسان با حیوان و نیز انسان با انسان انتقال می‌یابد(۳). مرفولوژی که در اووسیت *کریپتوسپوریدیوم* دیده می‌شود به گونه‌ای نا معمول است، زیرا اووسیت‌های این انگل فاقد اسپوروسیت و حاوی اسپوروزوئیت‌های باریک و لوزی شکل هستند(۳). این انگل می‌تواند طیف وسیعی از میزبانان را آلوده کنند و به‌عنوان یک ارگانیزم بیماریزای مشترک بین انسان و دام مطرح شود(٤). مهم‌ترین نشانه‌های بالینی در گوساله‌ها، افسردگی، بی اشتهایی، اسهال،کاهش وزن و گاهی تلفات می‌باشد(۵).

تاکنون بیش از ۲۰ گونه مختلف از *کریپتوسپوریدیوم* در انواع مختلف حیوانات شناسایی شده است.گاوها و گوساله-های آلوده به‌عنوان یک منبع بالقوه آلودگی در انسان مورد توجه می‌باشد، این انگل در افراد سالم معمولا مشکل خاصی ایجاد نمی‌کند و خود محدود شونده است(٦). دو گونه از جنس *کریپتوسپوریدیوم* با نام‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* و *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* شایع‌ترین گونه‌های شناسایی شده در گاوها و گوساله‌ها بوده‌اند. گونه اول یعنی

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران(bshemshadi@yahoo.com)

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، ساوه، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

کریپتوسپوریدیوم پاروم شیوع بیش‌تری داشته و در دام‌های شیرخوار بیش تر با اسهال همراه است، اما *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* در گوساله‌های بالغ و جوان شیوع بیش‌تری دارد(۷). شیوع عفونت *کریپتوسپوریدیوم پاروم* بین کشورها و مطالعات متفاوت است. به‌عنوان مثال، نرخ شیوع *کریپتوسپوریدیوم پاروم* قبل از شیر گرفتن در گوساله‌های در محدوده انگلستان از ۲۸ تا ۸۰ درصد گزارش شده است(۸). مطالعات بعدی نیز به کرات موید این مطلب بودند و بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که در گوساله‌های شیرخوار بیشترین میزان ابتلا با *کریپتوسپوریدیوم پاروم* دیده می‌شود(۵).

تکنیک‌های زیادی برای بررسی *کریپتوسپوریدیوز* استفاده می‌شود. یکی از متداول‌ترین روش‌های تشخیص دامپزشکی بیماری *کریپتوسپوریدیوز*، روش بررسی میکروسکوپی است که یکی از مقرون به‌صرفه‌ترین روش‌ها برای تشخیص انگل‌ها نیز به شمار میرود اما استفاده از آن به تخصص فنی نیازمند است و امکان تعیین مشخصات انگل را نیز ندارد. ابزارهای مولکولی که معمولاً در پژوهش‌ها، استفاده می شوند بسیار حساس‌تر هستند و اطلاعات بسیار بیشتری در مورد این انگل، همانند گونه‌ها و ژنوتیپ ارائه می‌دهند(۹). گونه‌ها را می توان با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه یا Multiplex polymerase chain reaction و پلی-مورفیسم طولی قطعات محدود شده یا RFLP تشخیص داد(۱۰). مزیت PCR، توانایی سنجش ژنوم انگل است که دقت و صحت تشخیصی را به شدت افزایش میدهد، از سوی دیگر تکنیک RFLP نیز نوعی از PCR است که برای تشخیص زیرگونه‌ها و پلی مرفیسم‌ها استفاده می‌شود (۱۱). شناسایی گونه‌ها و زیر گونه‌ها برای درمان بیماری می‌تواند کمک کند و همچنین با شناسایی گونه‌ها می‌توان اقدامات کنترلی و پیشگیرانه را نیز انجام داد. Nested PCR روشی بر مبنای PCR است که هدف از انجام گرفتنش، کاهش احتمال ایجاد محصولات غیراختصاصی واکنش و افزایش حساسیت آن است. این تکنیک در سال ۱۹۹۸ توسط Strom و Rechitsky ارائه شده است و کلمه Nested اشاره به طرز قرارگیری پرایمرهای مورد استفاده در واکنش اول و دوم نسبت به هم دارد (۱۰و۱۱). بر طبق جست‌وجوی انجام شده تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی تشخیص و شناسایی گونه-های *کریپتوسپوریدیوم* با استفاده از روش‌های Nested PCR و RFLP در گوساله‌های ایران نپرداخته است و این مطالعه برای اولین بار به بررسی تشخیص و شناسایی گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* با استفاده از روش‌های Nested PCR و RFLP در گوساله‌های شهرستان شاهرود می‌پردازد.

مواد و روش‌کار

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه، ابتدا با توجه به نقشه، شهرستان به سه منطقه تقسیم شد و در این بررسی از ۲۵۶ گوساله نمونه مدفوع اخذ شد به این ترتیب که بعد از گرفتن رضایت صاحب دام به صورت مستقیم از رکتوم گوساله ها یا از لایه ی بالایی مدفوع تازه ریخته شده نمونه‌ها اخذ شد و به ظروف نمونه-گیری منتقل شد. سپس از هریک از مناطق تحت بررسی به شکل تصادفی چند دامداری (خوشه) انتخاب شد و از هر یک از دامداری‌های انتخاب شده به شکل تصادفی ساده از ۱۲ درصد کل گوساله‌های زیر ۲ ماه سن، نمونه گیری بعمل آمد و پس از ثبت مشخصات، نمونه‌ها جهت تغلیظ، تهیه گسترش و رنگ آمیزی به آزمایشگاه انتقال داده شد.

رنگ آمیزی ذیل-نلسون

رنگ آمیزی ذیل-نلسون با استفاده از گسترش‌های مدفوعی و بر طبق گزارشات قبلی انجام شد(۱۲). گسترش‌ها با استفاده از رنگ کربول فوشین رنگ آمیزی شدند. گسترش‌ها با استفاده از آب برای یک تا دو دقیقه شسته شدند. اسلایدها

www.SID.ir

Archive of SID

سپس با استفاده از اسید سولفوریک ۵ ٪ برای ۳۰ ثانیه دی کلریزه شدند و سپس با استفاده از متیلن بلو ۳ ٪ برای یک دقیقه رنگ آمیزی مجدد شدند. پس از رنگ آمیزی نمونه‌ها با روش ذیل-نلسون، نمونه‌های مثبت از لحاظ وجود اووسیست های کریپتوسپوریدیوم مورد بررسی قرار گرفت. در این رنگ آمیزی اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم به رنگ قرمز براق و زمینه به رنگ آبی در آمد.

تکنیک گرادیانت منقطع ساکارز برای جداسازی و تخلیص اولیه اووسیست های *کریپتوسپوریدیوم* براساس شناورسازی نمونه درمحلول قندی استفاده شد، که با مخلوط نمودن ۳۲۰ میلی‌لیترآب مقطر، ۵۰۰ گرم ساکارزو ۹ میلی لیترفنل محلول شیتر(Scheather) انجام شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA اووسیت از کیت شرکت QIAGEN QIAamp 180-220 DNA stool mini kit طبق پروتکل کیت استفاده شد. محلول حاوی DNA را در یخچال برای استفاده کوتاه مدت و در فریزر ۲۰ – برای مدت طولانی نگهداری شد.

روش Nested PCR

روش Nested PCR برای تعیین گونه های مختلف *کریپتوسپوریدیوم* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، بر اساس مطالعات قبلی(۱۰) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد (جدول ۱). این روش به این دلیل به کار رفت که مدفوع حیوانی محتوای موارد بسیاری از عوامل مختل کننده PCR معمولی است و در این مطالعه از رقت ۱ به ۵۰ مدفوع استفاده شد تا این اختلال به حداقل برسد. در Nested PCR، دو فرایند PCR متوالی که هر کدام متشکل از حدود ۳۰ چرخه است، انجام می‌گیرد. در واکنش PCR اول، از یک جفت پرایمر که نواحی خارجی‌تر نسبت به توالی موردنظر را هدف قرار می‌دهند، استفاده می‌شود. در واکنش دوم، جفت پرایمرهای Nested که به نواحی داخلی تری نسبت به پرایمرهای اول متصل می‌شوند، مورد استفاده قرار می‌گیرند و در نتیجه محصولات PCR کوتاه‌تر از واکنش اول خواهند بود. در واقع، دو جفت پرایمر برای تکثیر یک لوکوس واحد به کار می‌رود.

PCR مرحله اول NestedPCR

برای انجام مرحله اول PCR از جفت پرایمر های اول (جدول ۱، با سایز محصول ۱۳۷۰ جفت باز) استفاده شد. واکنش‌گرهای مربوط به PCR مرحله اول شامل ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTP mix، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$ و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR به همراه ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase که همگی از شرکت سیناژن ایران تهیه شده بودند در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و بر روی یخ مخلوط شدند. بلافاصله نمونه در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف، آلمان) قرار داده شدند و برنامه حرارتی مورد استفاده شامل ، ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب در ۹۴ درجه سانتیگراد در ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه در ۶۰ ثانیه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد در ۵ دقیقه تنظیم گردید.

PCR مرحله دوم NestedPCR

در این مرحله همه شرایط مانند مخلوط واکنش‌گرها و برنامه زمانی و دمایی مطابه مرحله اول بود با این تفاوت که پس از انجام مرحله اول PCR تحت شرایط استاندارد، ۱ میکرولیتر از محصول PCR اول پس از رقیق سازی به نسبت ۱۰۰ به ۱ به‌عنوان DNA الگو در مرحله دوم PCR استفاده شد. در این مرحله از جفت پرایمرهای دوم استفاده شد که یک قطعه به طول ۲۴۱ تا ۸۴۰ بازی (بسته به گونه انگل) را تکثیر می کند و شامل *C. parvum, C. C. Andersoni, C. ryanae,*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: توالی های پرایمری گونه های مختلف *کریپتوسپوریدیوم* جداسازی شده

Primer Pair	Sequence 5-3	Fragment size	Species detected
AL1687 (EF) AL1691 (ER)	TTCTAGAGCTAATACATGCG CCCATTTCTTCGAAACAGGA	1370	Genus-specific external
AL1598 (IF) AL3032 (IR)	GAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	840	Genus-specific internal
CaF AL3032 (IR)	GCAAATTACCCAATCCTGAC AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	625	*C. Andersoni*
Cr AL 3032 (IR)	TGTTAATTTTTATATCAATRCTACGG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	415	*C. ryanae*
Cph F AL3032 (IR)	AGAGTGCTTAAAGCAGGCATA AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	305	*C. parvum*
CbF AL3032 (IR)	CTTCTTATTCCTTCTAGAATAAAAATG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	241	*C. bovis*

جدول ۲: پرایمر های مورد استفاده برای تکثیر 18srRNA در Nested PCR برای RFLP

Primer Pair	Sequence 5-3	Fragment size
18s rRNA internal	Forward primer1: TTCTAGAGCTAA TACATGCG Reverseprimer1:CCCATTTCCTTCGAAACAGGA	868
18s rRNA external	ForwardPrimer2:5'-GGAAGGGTT TTTATTAGATAAAG ReversePrimer2:AAGGAGTAAGGAACAACC TCCA	864

bovis بودند. پس از هر مرحله PCR، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ همراه با سایبر سیف (اینویتروژن cat.NO) S33102 الکتروفورز شده و با ژل داکیومنت باندهای مربوطه در کنار سایزمارکر DNA یا Ladder مشاهده شدند. در تمام واکنش ها از سویه های شناسایی شده استاندارد به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و کنترل منفی حاوی تمام موارد مورد نیاز PCR بدون DNA الگو بود.

روش *RFLP*

جهت تعیین هویت مجدد گونه‌های انگلی شناسایی شده عملیات تعیین توالی ژنوم (sequencing) بر روی ژن 18s rRNAانجام شد. در مرحله بعد DNA ژنومی استخراج و قطعه ژن 18S rRNA جدایه‌ها با روش Nested-PCR تکثیر گردید. برای تکثیر قطعه ۸۶۸ جفت نوکلئوتیدی از ژن 18S rRNA کریپتوسپوریدیوم از پرایمرهای طراحی شده توسط مطالعات قبلی استفاده شد(۱۳). توالی پرایمر های خارجی و پرایمرهای داخلی در جدول ۲ ذکر شده است. روش انجام واکنش و ترکیب واکنشگرها برای هر دو مرحله اول و دوم برابر با روش Nested PCR در مرحله قبلی بود. مرحله‌ی واسرشت ابتدایی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی واسرشت ثانویه ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤۵ ثانیه، مرحله ی اتصال پرایمرها ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤۰ ثانیه، مرحله‌ی طویل شدن زنجیره ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ۳۵ سیکل و در نهایت یک سیکل ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. محصولات DNA بدست آمده از Nested PCR دوم که دارای باند قوی و خوب بودند، توسط سه آنزیم برشی *Ssp1* و*Vsp* ,**I***Dde* شرکت فرمنتاز برش داده شدند و محصولات آنها در ژل آگـارز ۲ ٪ الکتروفـورز شد. گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم آندرسـونی* و *کریپتوسـپوریدیوم مـوریس* بعـد از RFLP بوسـیه آنزیم-

www.SID.ir

Archive of SID

های I Ssp و I Vsp ، قطعات و در نتیجه باندهای مشابهی را ایجاد می‌کنند و پس از الکتروفورز و مشاهده باندهای مربوطه قابل تشخیص از همدیگر نیستند، نمونه‌هایی که باندهای مربوط به دو گونه فوق الذکر را نشان دادند تحت تاثیر آنزیم Dde I، قرار گرفتند تا دقیقاً تعیین گونه شوند. نمونه هایی که تحت تاثیر آنزیم Dde I قرار گرفتند، همانند محصولات RFLPبا آنزیم‌های Ssp I و Vsp I ،در ژل ۲٪ الکتروفورز می‌شدند. آنزیم SspI جهت تعیین گونه‌ها و VspI جهت تعیین ژنوتیپ های گاوی و انسانی *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱٤).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تعیین فراوانی‌ها و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ استفاده شد.

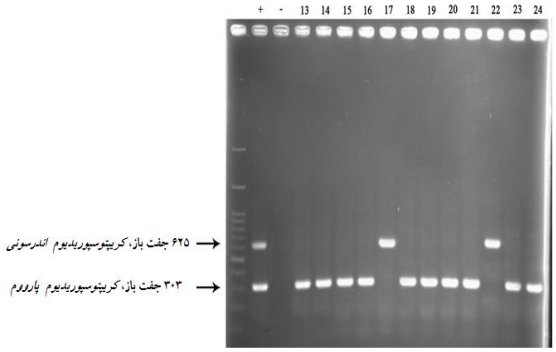
نتایج

شیوع

در این مطالعه تعداد ۲٥٦ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۲۷ نمونه مثبت بودند، به‌عبارتی دیگر میزان وقوع آلودگی در نمونه‌های مورد بررسی ۱۰/٥٤ درصد بود.

بررسی وقوع آلودگی و تعیین گونه‌ها در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از روش Nested PCR

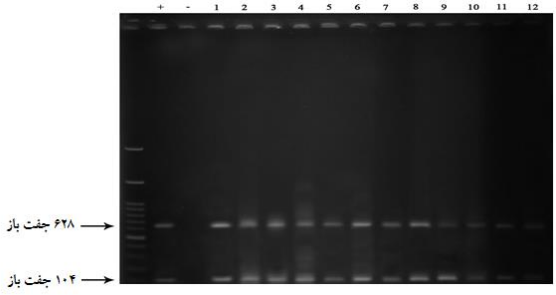
نتایج نشان داد که از ۲۷ نمونه‌ی مورد بررسی دو نمونه برای گونه‌ی *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* با طول قطعات ٦۲٥ جفت باز مثبت و ۲٥ نمونه برای *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* با طول قطعات ۳۰۳ جفت باز مثبت بودند. دیگر گونه‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه یافت نشدند. بنابراین، ۹۲/٥۹ درصد نمونه‌های مورد با *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* و تنها ۷/٤۱ درصد نمونه‌ها با *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* مثبت بودند (نگاره ۱).



نگاره ۱ نتایج Nested-PCR. چاهک اول (مارکر)، چاهک + (کنترل مثبت)، چاهک – (کنترل منفی). چاهک‌های ۱٦–۱۳ و ۲۱–۱۸ و ۲٤–۲۳ مثبت برای *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* و چاهک‌های ۱۷ و ۲۲ مثبت برای *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* مثبت بودند.

بررسی وقوع آلودگی و تعیین گونه‌ها در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از روش RFLP

نتایج باندهایی را برای ۲٥ نمونه تحت تأثیر آنزیم VSP را در ۱۰٤ و ٦۲۸ نشان داد که نشان دهنده‌ی *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* bovine و genotype A gene بود. این نتایج به‌نوعی تأیید کننده‌ی نتایج برای روش Nested-PCR بود و تنها زیر گونه‌ی آن (genotype A gene) را مشخص نمود (نگاره ۲).

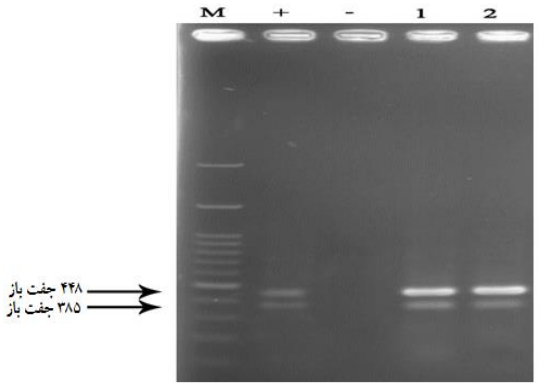


نگـاره ۲ نتـایج بـرای RFLP و بـا اسـتفاده از آنـزیم VSP. چاهـک اول (مارکر)، چاهک + (کنترل مثبت)، چاهک – (کنترل منفی). چاهـک‌هـای ۱–۱۲ مثبت برای *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* genotype A gene بودند.

www.SID.ir

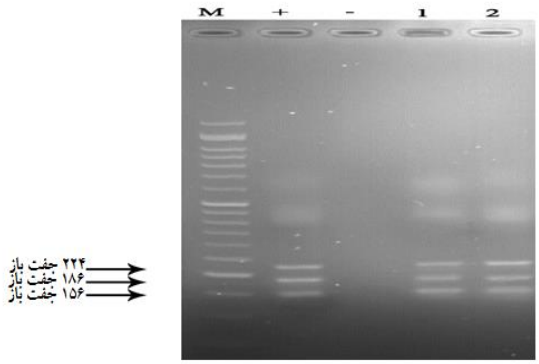
Archive of SID

نگاره‌ی ۳ باندها را تحت تأثیر آنزیم ssp نشان می‌دهد، همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد، باندهایی ۳۸۵ و ٤٤٨ برای دو نمونه در مشاهده می‌شود که نشان دهنده‌ی زیر گونه‌ی *C. muris*/*C. andersoni* بود.



نگاره ۳ نتایج برای RFLP و با استفاده از آنزیم SSP. چاهک اول (مارکر)، چاهک + (کنترل مثبت)، چاهک – (کنترل منفی). چاهک‌های ۱ و ۲ برای زیر گونه‌ی *C. muris*/*C. andersoni* مثبت بودند.

نتایج برای برش تحت تأثیر آنزیم dde باندهایی را در ١٥٦، ١٨٦ و ٢٢٤ نشان داد که نشان دهنده‌ی زیر گونه‌ی *C. muris* بود (نگاره ٤).



نگاره ٤: نتایج برای RFLP و با استفاده از آنزیم dde. چاهک اول (مارکر)، چاهک + (کنترل مثبت)، چاهک – (کنترل منفی). چاهک‌های ۱ و ۲ برای زیر گونه‌ی *C. muris* بودند.

بحث

امروزه بررسی ها نشان داده است که عوامل تک سلولی به‌عنوان از مهمترین علل دخیل در بروز اسهال در گوساله‌ها هستند که هر ساله آسیب بسیاری را به صنعت دامداری تحمیل مینمایند. داده ها نشان داده است که مهم‌ترین تک یاخته ایجاد کننده اسهال در گوساله‌ها، کریپتوسپوریدیوم‌ها می‌باشند. بنا براین شناسایی و تشخیص دقیق این ارگانیسم ها میتواند قدم مهمی را در جهت درمان و ریشه‌کنی آنها ایفا کند. به علت مشکلات تشخیص میکروسکوپی این موجودات که با دقت و صحت کمی همراه است، مطالعه حاضر برآن بوده است تا به بررسی کارایی روشهای مولکولی بر پایه ژنوم و PCR در تشخیص آنها بپردازد. در این مطالعه تعداد ٢٥٦ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۲۷ نمونه به عنوان کریپتوسپوریدیوم شناسایی شدند، به‌عبارتی دیگر میزان وقوع آلودگی در نمونه‌های مورد بررسی ١٠/٥٤ درصد بود. نتایج نشان داد که از ۲۷ نمونه‌ی مورد بررسی دو نمونه برای گونه‌ی *C. Andersoi* با طول قطعات ٦٢٥ جفت باز مثبت و ۲۵ نمونه برای *C. parvum* با طول قطعات ۳۰۳ جفت باز مثبت بودند. دیگر گونه‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه یافت نشدند. همسو با یافته‌های این مطالعه، رنجبر بهادری و تونی (۱۵) مطالعه‌ای با عنوان بررسی آلودگی به *کریپتوسپوریدیوم* در گوساله‌های اسهالی در خراسان جنوبی انجام دادند. در این مطالعه، ۱۷۰ راس گوساله مبتلا به اسهال در دامداری های اطراف شهرستان نیشابور اعم از سنتی و صنعتی اخذ شد. میزان وقوع آلودگی به این تک یاخته در نمونه‌های مورد بررسی ١١/٨٠٪ بود. این نتایج نشان می‌دهد که میزان شیوع

www.SID.ir

Archive of SID

کریپتوسپوریدیوز در شهرهای این نزدیک به‌هم بوده است. مغایر با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، چنگیزی و همکاران (١٦) در مطالعه‌ای به بررسی بروز آلودگی با کریپتوسپوریدیوم رایانی در گاوهای ایران پرداختند. در این مطالعه در مجموع از ۲۰۰ راس گاو و گوساله، نمونه مدفوع جمع آوری شد تا علل اسهال از جمله کریپتوسپوریدیوزیس در گاوداری‌های شهرستان سمنان بررسی شود. میزان شیوع کلی کریپتوسپوریدیوم در نمونه های اخذ شده ۱۷/۵٪ و در گوساله‌های مبتلا به اسهال، تعداد نمونه های مثبت به صورت معنی‌داری بیشتر از بقیه گاوهای تحت مطالعه بود. بین نتایج مطالعه‌ی حاضر و نتایج چنگیزی و همکاران، اختلاف معنی‌داری وجود دارد که ممکن است به‌علت نژاد گوساله‌ها، شرایط بهداشتی، شرایط آب و هوایی و .... بوده باشد.

براساس نتایج به‌دست آمده، ۹۲/۵۹ درصد نمونه‌های مورد با *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* و تنها ۷/٤١ درصد نمونه‌ها با *C. کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* مثبت بودند. همسو با یافته‌های این مطالعه، در مطالعه‌ای با عنوان الگوهای سنی گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* در گوساله‌های شیری انجام شد و نشان داده شد که سه گونه‌ی *کریپتوسپوریدیوم*، شامل *کریپتوسپوریدیوم پاروووم*، *کریپتوسپوریدیوم بوویس*، و *کریپتوسپوریدیوم ریان* در گوساله‌های بیش از سه ماه دیده شد(۱۷). این مطالعه نشان داد که گونه‌ی *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* بیشترین شیوع را داشت که همسو با نتایج این مطالعه می‌باشد. بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان بیان نمود که گونه‌های *اندرسونی* و *پاروووم* بیشترین میزان را به‌خود اختصاص دادند. در توضیح این نتایج می‌توان بیان نمود که تاکنون دو گونه از جنس *کریپتوسپوریدیوم* با نام‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* و *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* شایع‌ترین گونه‌های شناسایی شده در گاوها و گوساله‌ها بوده‌اند. گونه اول یعنی *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* شیوع بیش‌تری داشته و در دام‌های شیرخوار بیش تر با اسهال همراه است، اما *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* در گوساله-های بالغ و جوان شیوع بیش‌تری دارد.

نتایج RFLP تأیید کننده‌ی نتایج بخش Nested-PCR بود، با این تفاوت که در روش RFLP زیرگونه‌ها مشخص شدند، ولی در روش Nested-PCR چنین نتایجی بدست نمی‌آید. مشابه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، تحویلدار بیرونی و همکاران (۱۸) با بررسی ۱۰۲ نمونه مدفوع انسانی ۹٤۰ نمونه مدفوع گاوی با استفاده از روش اسید فست اصلاح شده ،نمونه‌های مثبت را تعیین و نشان دادند تمام نمونه‌های گاوی و ۱۰ نمونه انسانی دارای حرکت الکتروفورتیک مشابه بر روی ژل آگاروز ۲/۵٪ بود که تایید کننده گونه *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* گاوی بود ولی ۲ نمونه انسانی دارای باندهای متفاوت بودند که تعیین سکانس شد و تمایزشان با نمونه های گاوی و انسانی به دست آمده تایید گردید. نتایج مشابهی توسط محمدی قلعه بین و همکاران (۱۹) گزارش شد که به شناسایی گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* در منابع آبی استان اردبیل به روش PCR- RFLP پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که از هشت نمونه‌ی مورد مطالعه، پنج نمونه مربوط به *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* و دو نمونه مربوط به *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* ژنوتیپ گاوی و همچنین یکی از نمونه‌ها با *کریپتوسپوریدیوم* ژنوتیپ خوک (*Cryptosproidium Pig genotype*) بود. روش‌های مولکولی بدلیل این‌که علاوه بر تشخیص کریپتوسپوریدیوم، قادر به

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها نیز می‌باشند، دارای ارزش بالایی هستند.

شیوع بیشتر گونه‌ی *پاروووم* در هر دو روش تأیید شد که این ممکن است مربوط به شرایط ژنتیکی، تغذیه‌ای، بهداشتی و اجتماعی فرد یا ویژگی‌های خاص این گونه تک یاخته در منطقه‌ی مورد مطالعه باشد که 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 درحد انتظارات است

نتیجه گیری

با توجه نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که گرچه گونه *پاروووم* به‌عنوان گونه شایع در گوساله‌ها شناخته شده است ولی ممکن است گوساله‌ها به گونه‌های *موریس* و *آندرسونی* نیز مبتلا شوند. همانند سایر مناطق دنیا در ایران نیز آلودگی انسان به دیگر گونه‌های حیوانی *کریپتوسپوریدیوم* دور از انتظار نیست، بنابراین کسب اطلاعات کافی و برنامه ریزی برای کنترل این آلودگی در حیوانات، کمک بزرگی برای پیشگیری از ابتلا حیوانات به این انگل است.

فهرست منابع

1. 1. Cho Y-i, Yoon K-J. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. J Vet Sci. 2014;15(1):1-17.
2. Tyzzer E. Cryptosporidium parvum (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch Protistenkd. 1912;26:394-412.
3. Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. Cryptosporidium andersoni n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, Bos taurus. J Eukaryot Microbiol. 2000;47(1):91-5.
4. Ralston B, Thompson R, Pethick D, McAllister T, Olson M. Cryptosporidium andersoni in Western Australian feedlot cattle. Aust Vet J. 2010;88(11):458-60.
5. Zambriski JA, Nydam DV, Bowman DD, Bellosa ML, Burton AJ, Linden TC, et al. Description of fecal shedding of Cryptosporidium parvum oocysts in experimentally challenged dairy calves. Parasitol Res. 2013;112(3):1247-54.
6. Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. Exp Parasitol. 2010;124(1):138-46.
7. Chalmers R, Giles M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK–challenges for control. J Appl Microbiol. 2010;109(5):1487-97.
8. Wells B, Shaw H, Hotchkiss E, Gilray J, Ayton R, Green J, et al. Prevalence, species identification and genotyping Cryptosporidium from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. Parasites & vectors. 2015;8(1):66.
9. Chalmers RM, Katzer F. Looking for Cryptosporidium: the application of advances in detection and diagnosis. Trends in parasitology. 2013;29(5):237-51.
10. Thomson S, Innes EA, Jonsson NN, Katzer F. A multiplex PCR test to identify four common cattle-adapted Cryptosporidium species. Parasitology Open. 2016;2.
11. Smith R, Clifton-Hadley F, Cheney T, Giles M. Prevalence and molecular typing of Cryptosporidium in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. Vet Parasitol. 2014;204(3-4):111-9.
12. Rekha K, Puttalakshmamma G, D'Souza PE. Comparison of different diagnostic techniques for the detection of cryptosporidiosis in bovines. Veterinary world. 2016;9(2):211.
13. 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.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Xiao L, Lal AA, Jiang J. Detection and differentiation of Cryptosporidium oocysts in water by PCR-RFLP. Public Health Microbiology: Springer; 2004. p. 163-76.
15. Ranjbar-Bahadon S, Toni S. Infection to Cryptosporidium in diarrheic calves: a provincial study in southern Khorasan. Journal of Veterinary Research. 2013;68(1):13-9.
16. Changizi E, Salimi-Bejestani M, Vayeghan A. The Cryptosporidium ryanae infection commence in Iranian cattle. Journal of Veterinary Research. 2012;67(2):127-33.
17. Utaaker KS, Chaudhary S, Bajwa RS, Robertson LJ. Prevalence and zoonotic potential of intestinal protozoans in bovines in Northern India. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. 2018;13:92-7.
18. Tahvildar Bidrooni F, Dalimi Asl A, Kazemi D B. Using a 1055 bp fragment of 18s rRNA for differentiation of human and cattle Cryptosporidiosis. Research in Medicine. 2008;32(1):5-10.
19. Mohammadi Ghaleh Bin B, Fallah E, Asgharzadeh M, Kazemi A. Detection of Cryptosporidium species in water resources of Ardabil Province by PCR, RFLP. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2007;7(2):177-83.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir