Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۷ تابستان ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.101267

شناسایی مولکولی کریپتوسپوریدیوم آندرسونی در گوساله‌های شهرستان شهریار

• **عبدالحسین دلیمی (نویسنده مسئول)**
گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
• **فرید تحویلدار بیدرونی**
گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
• **بهرام کاظمی دمنه**
گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۲ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۳
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

چکیده

تک یاخته کریپتوسپوریدیوم آندرسونی از کوکسیدیاهای بیماری‌زا در گاو و گوسفند است. در مطالعه حاضر ۹۴۰ نمونه مدفوع گوساله‌های ۲ ماهه تا یک ساله شهرستان شهریار به روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی شدند. سپس جهت مطالعه مولکولی DNA انگل استخراج گردید و قطعه ۸۴۵ جفت بازی ژن 18S rRNA کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های مثبت با روش Nested PCR تکثیر گردید و محصول توسط دو آنزیم Ssp1 و Vsp1برش داده شد. قطعه تکثیرشده تعیین توالی نیز گردید. طبق نتایج حاصله، ۲۳ نمونه (۲/۴۴٪) در روش رنگ‌آمیزی از نظر آلودگی به کریپتوسپوریدیوم مثبت بودند. تمامی نمونه‌های مثبت با روش Nested PCR تکثیر یافتند. نمونه تکثیر یافته دارای حرکت الکتروفورتیک مشابه بر روی ژل آگاروز و دارای الگوی مشابه با کریپتوسپوریدیوم آندرسونی بودند. نتایج حاصل با مقایسه ترادف بازی قطعه ژن نمونه مذکور با داده‌های ثبت شده در بانک ژن مورد تایید قرار گرفت..

کلمات کلیدی: کریپتوسپوریدیوم اندرسونی، گوساله ، ژن PCR _RFLP ، 18S rRNA، شهریار، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 107 pp: 24-30

Molecular identification of *Cryptosporidium andersoni* in Shahriar calves

By: Dalimi , A. (Corresponding Author), Parasitology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tahvildar, f,. Parasitology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University and Kazemi, B,. Parasitology and Mycology Department, Medical School of Shahid Beheshty, Medical Sciences University.

Received: August 2013 Accepted: July 2013

Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Cryptosporidium andersoni is a pathogenic coccidia of cattle and sheep. In the present study, 940 fecal samples were investigated from calves aged from 2 months to 1 year old of Shahriar city. The smears of the samples were stained with modified Ziehl Neelsen technique. For molecular study, DNA was extracted by phenol-chloroform from stool positive samples, then 18s rRNA gene of Cryptosporidium was amplified by Nested PCR method. The resulted band was cut with two restriction enzymes (Vsp1 and Ssp1). Finally the resulting amplicon of Nested PCR was sequenced.The results indicated that, 23 cases were diagnosed to be positive with staining technique. All PCR-RFLP patterns of 18S rRNA gene of calve samples showed similar electrophoretic mobility on agarose gel and identified as *Cryptosporidium andersoni*. The result was also confirmed by sequencing analysis.

Key words: *Cryptosporidium andersoni*, calves, 18S rRNA gene, PCR _RFLP, Shahriar, Iran

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم از تک یاخته های آلوده کننده سلول های پوششی دستگاه گوارش و تنفسی در میزبان های مهره دار بشمار می آید (۲۴). گاو از جمله مهم ترین دام های اهلی است که در معرض آلودگی به این انگل است. اهمیت این انگل در گاو بخاطر خسارت اقتصادی ناشی از آلودگی و مرگ و میر گوساله های نوزاد می باشد. این انگل اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط Panciera و همکاران با مشاهده انگل در مقاطع بافتی ژوژنوم تحتانی و ایلئوم گزارش گردید (۱۶).

تاکنون گزارش های مختلفی از ابتلا گاوها در جهان و استان های مختلف کشور گزارش شده است. پاکباز (۱۳۷۰) فراوانی کریپتوسپوریدیوزیس را در انسان، گوساله و بره در شهرستان یاسوج، مدیری (۱۳۷۲) فراوانی کریپتوسپوریدیوزیس را در اطفال و گوساله‌ها در شهرستان اراک، مبارکی (۱۳۷۴) فراوانی کریپتوسپوریدیوزیس را در انسان و دام در شهرستان سنندج ، نایب زاده و ملکی (۱۳۸۶) میزان شیوع کریپتوسپوریدیوم را در گاوها و گوساله های اسهالی و غیر اسهالی شهرستان خرم آباد، قمری و همکاران (۱۳۸۰) آلودگی کریپتوسپوریدیایی را در توده گاومیش های آذربایجان غربی ، محبعلی و همکاران (۱۳۷۸) میزان شیوع عفونت کریپتوسپوریدیوم را در گاوداری های شهرستان اسلامشهر، واحدی و همکاران (۱۳۸۸) میزان آلودگی کریپتوسپوریدیایی گوارشی را در بره ها و گوساله ها در شهرستان آمل و پیرستانی و همکاران (۱۳۸۸) میزان شیوع عفونت کریپتوسپوریدیایی را در گاوداری های شهرستان شهریار مطالعه نمودند. در همه این مطالعات روش تشخیص انگل مبتنی بر روش میکروسکوپی رنگ‌آمیزی گسترش مدفوع میزبان با استفاده از روش ذیل نلسون اصلاح شده بوده است (۱، ۲، ۷ الی ۱۲).

با توجه به مشابهت اووسیست گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف و عدم کارایی روش‌های رنگ‌آمیزی در تفکیک بین آنها، در سال‌های اخیر روش های مولکولی برای تعیین ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم معرفی و استفاده از آن‌ها رایج شده است. تا کنون با روش‌های مولکولی هشت گونه و سه ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم شایع در گاوها تشخیص داده شده است.

در همین رابطه Leng و همکاران (۱۹۹۶) یک روش تشخیص DNA کریپتوسپوریدیوم در مدفوع گاو ابداع و با استاندارد سازی آن برای انجام PCR و تشخیص انگل اقدام نمود (۲۰). Balatbat و همکاران (۱۹۹۶) روش Nested-PCR را که توانایی شناسایی DNA گونه کریپتوسپوریدیوم پاروم را مستقیما در نمونه مدفوع داشته معرفی نمود(۱۴). در ایران مطالعاتی نیز در این زمینه برای تعیین گونه و ژنوتایپ تعدادی از ایزوله‌ها کریپتوسپوریدیوم توسط درستکار مقدم و همکاران (۱۳۸۴)، فتوحی و همکاران (۱۳۸۸)، تحویلدار بیدرونی و همکاران (۱۳۸۷)، پیرستانی و همکاران (۲۰۰۸) و میرزایی و همکاران (۲۰۱۴) انجام شده است (۳، ۴، ۶، ۲۶و ۲۲).

هدف از انجام این مطالعه تعیین ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم آندرسونی در گوساله های شهریار با استفاده از ژن 18S rRNA به روش PCR-RFLP است.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه های گوساله

در دامداری های صنعتی و غیر صنعتی اطراف شهرستان شهریار نمونه گیری از گوساله های بین سن ۲ماهگی تا یکسالگی انجام شد. در مجموع ۹۴۰ نمونه مدفوع گاوی جمع‌آوری شد که در محلول دی

www.SID.ir

Archive of SID

کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد و در یخچال نگهداری شدند

تغلیظ اووسیست

با استفاده از روش سوسپانسیون سوکوروز اووسیست ها تغلیظ شدند (۱۴). مقدار ۱۰ گرم مدفوع را با آب مقطر رقیق کرده و از پارچه تنظیف عبور داده و با سانتریفیوژ دور g ۴۰۰ بمدت ۵ دقیقه آن را شستشو داده و از رسوب حاصل با آب مقطر سوسپانسیون تهیه شد. سپس سوسپانسیون را با دو غلظت ساکاروز M ۱/۴ و M ۱/۸۵ در دو مرحله مخلوط کرده و پس از سانتریفیوژ کردن کیست ها را جمع آوری گردید.

مراحل انجام آزمایش برروی نمونه‌ها

پس از تهیه گسترش روی لام و فیکس کردن با متانول، گسترش با استفاده از رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی گردید و لام های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری بزرگنمایی ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA: استخراج DNA انگل با روش فنل کلروفرم بصورت دستی انجام گردید. (۱۳)

برای تکثیر قطعه۸۴۵ جفت نوکلئوتیدی از ژن 18S rRNA کریپتوسپوریدیوم از پرایمرهای طراحی شده توسط Xiao و همکاران (۱۹۹۹) کریپتوسپوریدیوماستفاده شد (۲۹).

توالی پرایمر های خارجی:

`Cr18PA: F-5`-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3

`Cr18PB: R-5`-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3

و پرایمرهای داخلی :

Cr18NA: F-5`-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA `AG-3

Cr18NB: R-5`- CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT `A-3

واکنش PCR در دو مرحله انجام گردید. در هر دو مرحله PCR به حجم ۳۰ µl شامل ۳ µl از ۱۰ x PCR buffer و مقدار ۲ µl از محلول $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ mM و مقدار ۱ µl از dNTP با غلظت ۱۰ mM و ۰/۲۵ µl از Taq polymeras و ۲ µl از DNA ژنومی (محصول PCR در مرحله دوم) و ۱ µl ازهر یک از پرایمر های F , R که به حجم کلی محلول اضافه میشود و بقیه آن تا ۳۰µl با آب مقطر تکمیل میشود.

مرحله ی واسرشت ابتدایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله ی واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله ی اتصال پرایمرها ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله ی طویل شدن زنجیره ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ۳۵ سیکل و در نهایت یک سیکل ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. در مرحله دوم برنامه دستگاه مشابه مرحله اول بوده و فقط درجه اتصال کاهش یافته و به ۵۰ ثانیه می رسد. پس از انجام PCR دوم ۴ µl محصول PCR داخل چاهک های ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار مارکر وزنی (Fermentas 100DNA bp) بارگذاری و در ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از ترانس لومیناتور باندها مشاهده شد و با مارکر مقایسه شد.

انجام واکنش RFLP

محصول حاصل از تکثیر ژن که دارای باند قوی و خوب بودند توسط دو آنزیم برشی Ssp1 و Vsp1 (شرکت فرمنتاز) برش داده شدند. برای انجام این کار در یک واکنش ۳۰ میکرولیتری مقدار ۱۰ µl ازمحصول دوم با ۳ µl از بافر آنزیم و ۱۰ واحد از آنزیم مورد نظر و ۱۷/۵ میکرولیتر از آب مقطر دیوناز مخلوط و مدت ۳ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس با غیر فعال کردن آنزیم در ۶۰ درجه، نمونه های برش خورده بر روی ژل اگاروز ۲٪ مورد مطالعه قرار گرفت.

تعیین ترادف ژن

محصول PCR با استفاده از کیت (Roche) طبق دستور العمل سازنده خالص سازی گردید. برای تعیین سکانس محصول به شرکت ژن فناوران ایران ارسال گردید. سکانس بدست آمده پس از ثبت در بانک ژن با برنامه بلاست با سایر سکانس های موجود در بانک مورد مقایسه قرار گرفت.

رسم درخت فیلوژنی

درخت فیلوژنی نمونه جدا شده در این مطالعه با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نرم افزار Mega6 و روش Neighbor Joining Tree رسم گردید.

نتایج

در این تحقیق تعداد ۲۳ نمونه از ۹۴۰ نمونه (۲/۴۴٪) با روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده آلوده به کریپتوسپوریدیوم بودند.

نتایج Nested – PCR برای ژن ۱۸S rRNA

در Nested – PCR همه ۲۳ نمونه مثبتی که تشخیص ریزبینی شده بودند یک باند ۸۴۵ نوکلئوتیدی را روی ژل آگاروز نشان دادند (شکل ۱). در تمایز گونه های گاوی آنزیم 1Ssp کریپتوسپوریدیوم سه باند ۱۱۰و ۲۶۵ و ۴۴۸ جفت نوکلئوتیدی بر روی ژل آگاروز ایجاد نمود (شکل ۲).

آنزیم Vsp1 کریپتوسپوریدیوم نیز سه باند ۱۰۸، ۱۱۵و ۶۲۸ جفت نوکلئوتیدی بر روی ژل آگاروز ایجاد نمود (شکل ۳).

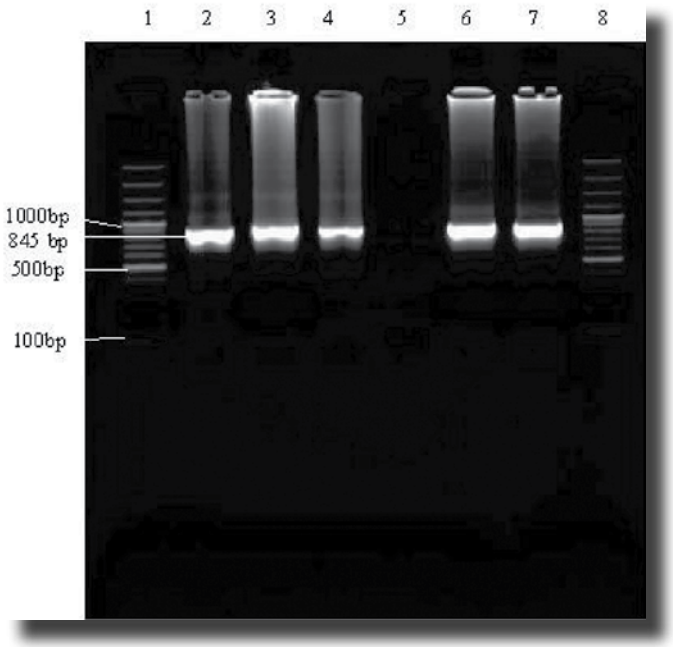
ترادف بازی ایزوله کریپتوسپوریدیوم اندرسونی جدا شده از گوساله ها ۹۹٪ مشابه ایزوله کریپتوسپوریدیوم اندرسونی ثبت شده در بانک ژن (۹۵۴۸۸۵,۱AY) بود. (شکل های ۴ و ۵). با توجه به باندهای ایجاد شده و تطبیق آن با الگوی RFLP این ژن و همچنین ترادف بازی حاصله، گونه ایزوله جدا شده کریپتوسپوریدیوم اندرسونی تشخیص داده شد.

بحث و نتیجه گیری

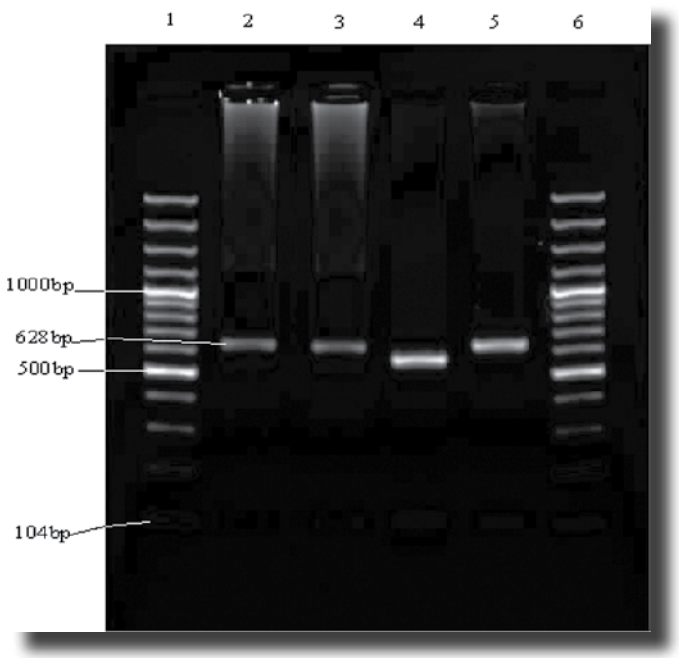
گونه کریپتوسپوریدیوم اندرسونی گرچه سابقا گونه کریپتوسپوریدیوم شبه موریس *C. muris*–like نام گذاری شده بود ولی االوسیست این گونه

www.SID.ir

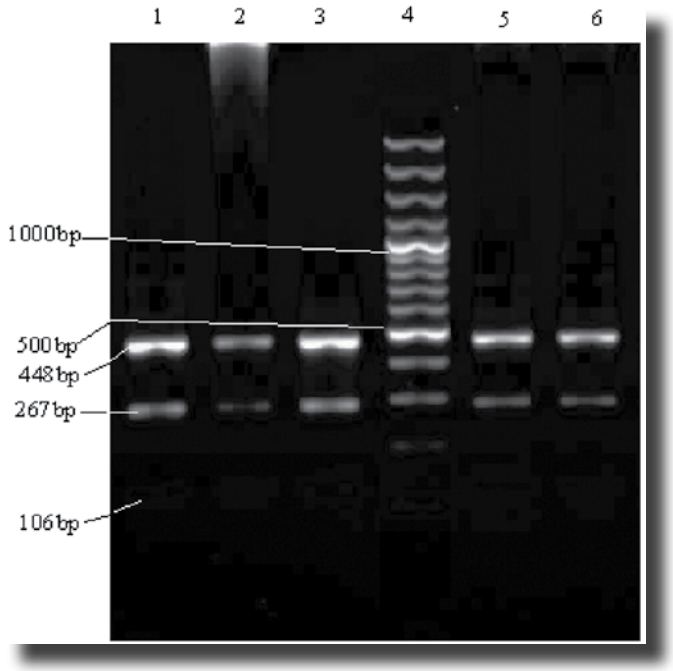
Archive of SID



شکل ۱- قطعه ۸۴۵ جفت بازی ژن 18S rRNA ایزوله‌های گاوی کریپتوسپوریدیوم: چاهک شماره ۲ الی ۷ نمونه مثبت، شماره ۵ کنترل منفی، شماره ۱ و ۸ مارکر ۱۰۰ جفت بازی.



شکل ۳ - برش قطعه ۸۴۵ جفت بازی از ژن 18S rRNA نمونه‌های کریپتوسپوریدیوم جدا شده ازگاو با آنزیم Vsp1: چاهک های شماره ۲ الی ۵ نمونه های مثبت، چاهک‌های شماره ۱ و ۶ مارکر ۱۰۰ جفت بازی.



شکل ۲ - برش قطعه ۸۴۵ جفت بازی از ژن 18S rRNA s نمونه‌های کریپتوسپوریدیوم جدا شده از گاو با آنزیم Ssp1: چاهک های شماره ۲ الی ۵ نمونه های مثبت، چاهک شماره۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

کوچک تر از کریپتوسپوریدیوم موریس و بر خلاف گونه کریپتوسپوریدیوم موریس برای موش، پرندگان و بز عفونی نیست (۳۰). این گونه تاکنون از گاو، شتر دوکوهانه و گوسفند گزارش شده است (۲۳، ۲۹). تاکنون گونه های مختلفی از کریپتوسپوریدیوم از گاو گزارش شده است. در اروپا ۸ گونه کریپتوسپوریدیوم پاروم، کریپتوسپوریدیوم اندرسونی، کریپتوسپوریدیوم بویس، کریپتوسپوریدیوم ریانه، کریپتوسپوریدیوم فلیس، کریپتوسپوریدیوم هومنیس، کریپتوسپوریدیوم ملئ اگریدیس، کریپتوسپوریدیوم سویس و سه ژنوتیپ خوکی، شبه سویس (suis-like) و شبه گوزنی(deer-like) از گاوهای اروپا گزارش شده است (۱۸).

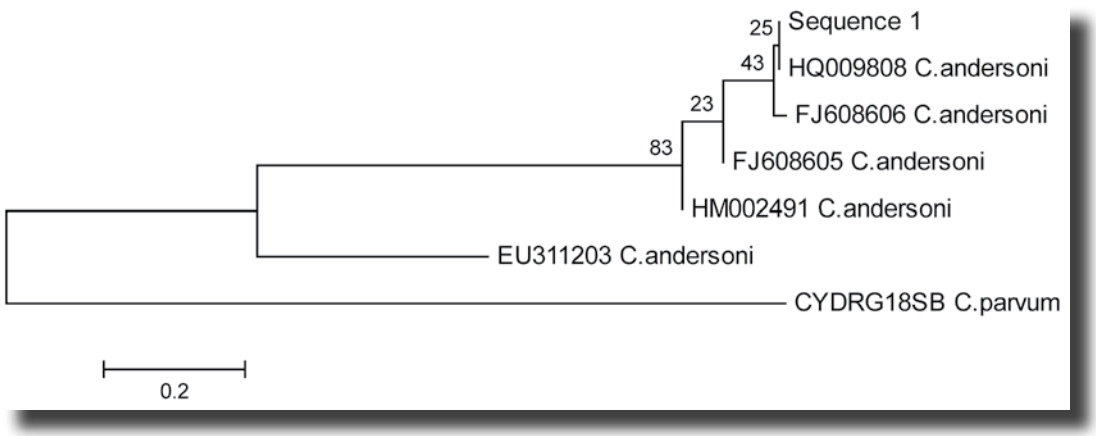
نکته قابل توجه میزان نسبتا بالایی از شیوع گونه کریپتوسپوریدیوم اندرسونی در گاو های مناطق مختلف اروپا است. این گونه شیردان گاوهای جوان و بالغ را آلوده می سازد. در ایرلند در آزمایش نمونه مدفوع ۲۱۸ راس گاو، آلودگی به گونه کریپتوسپوریدیوم اندرسونی ۵/۰۴٪ و به گونه پاروم ۴/۵۸٪ گزارش شده است(۲۴). در دانمارک ۲۳/۶۰٪ نمونه مدفوع آزمایش شده گاوها به گونه اندرسونی و ۱۰/۶۰٪ به گونه کریپتوسپوریدیوم پاروم آلوده بوده اند (۱۵). در جمهوری چک نیز در مطالعه مولکولی Kváč and Vítovec در سال ۲۰۰۳، گونه کریپتوسپوریدیوم اندرسونی در ۵۶/۷۶٪ نمونه مدفوع گوساله ها و ۴۳/۷۵٪ گاوهای بالغ تشخیص و گزارش شده است(۱۹). بالا بودن این میزان در جمهوری چک در سال های بعد توسط Hajdušek و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Ondráčková و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۷،۲۵) تایید گردید. در ولز نیز آلودگی به گونه کریپتوسپوریدیوم اندرسونی در ۶/۹٪ گاوهای مورد مطالعه گزارش شده است (۲۷). علاوه بر این آلودگی گاوها به گونه کریپتوسپوریدیوم اندرسونی در کشورهای سوئد

www.SID.ir

Archive of SID


```
GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATGAGCTTGGTGATTCATAATAACTTTAC  60
GGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTA  120
GGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAG  180
GGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATC  240
CTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGG  300
AATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCA  360
GCTGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTA  420
GTTGGATTTCTGTTGTATAATTTATAATATTACCAAGGTAATATTATAATATTCAACATC  480
CTTCCTATTATATTCTAAATATATAGGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAA  540
GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAATATTGGACTTTTGTCTTTCTT  600
ATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTATTAATGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACA  660
GCCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGG  720
ATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG  780
TCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTTGTTCCTTACTCCTTCAGCACCT
TATGAG  846
```

شکل ۴- ترادف بازی ژن ۱۸S rRNA ایزوله کریپتوسپوریدیوم اندرسونی جدا شده از گاو های شهرستان شهریار.



شکل ۵- درخت فیلوژنی نمونه جدا شده در این مطالعه با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن با روش **Neighbor Joining Tree** (نمونه سکونس شده: **Sequence** ۱، مابقی: **HQ۰۰۹۸۰۸** از گاو، **FJ۶۰۸۶۰۶** از گوسفند، **FJ۶۰۸۶۰۵** از گوسفند، **HM۰۰۲۴۹۱** از گاو همگی از چین، **EU۳۱۱۲۰۳** از انسان ایران و **C.parvum** از کشورهای مختلف.

www.SID.ir

Archive of SID

(۲۸) و پرتغال نیز گزارش شده است(۲۱). در سوئد در مطالعه مولکولی سیلورلاس و همکاران (۲۰۱۰) که با تعیین ترادف بازی قطعه ژنی 18S rRNA انجام شد از مجموع ۱۲۰۲ نمونه مدفوع مورد آزمایش ۱۱۰ نمونه دارای اواوسیست بوده و بترتیب گونه های بویس، پاروم، ریانه و اندرسونی در ۸۳، ۱۰، ۱۵ و ۲ نمونه تشخیص داده شد (۲۸).

در مطالعه حاضر گونه کریپتوسپوریدیوم اندرسونی از گاوهای شهریار با استفاده روش مولکولی و بر مبنای تعیین ترادف بازی قطعه ژنی 18S rRNA گزارش گردید. نتایج بررسی PCR-RFLP برروی ژن 18S rRNA نشان داد که از میان ۲۳ ایزوله گاوی که با استفاده از قطعه ژن 18S rRNA مورد بررسی قرار گرفت تماماً دارای ژنو تایپ کریپتوسپوریدیوم اندرسونی بودند. سابقا این گونه توسط سهرابی حقدوست (۱۳۷۱) و میرزایی و همکاران (۲۰۱۴) در کشور گزارش شده بود (۵ و ۲۲). گرچه در مورد تشخیص صحیح گونه توسط سهرابی حقدوست (۱۳۷۱) نمی‌توان اطمینان کافی داشت. ولی در مطالعه میرزایی و همکاران که با روش مولکولی صورت گرفته بود دو گونه اندرسونی و پاروم در گاوهای شمال غربی کشور گزارش شده است (۲۲).

نتیجه گیری

ژنوتایپ ایزوله کریپتوسپوریدیوم اندرسونی جدا شده ازگاو مشابه ایزوله کریپتوسپوریدیوم ثبت شده آن در بانک ژن [AY954885.1] می باشد.

تشکر و قدردانی

کلیه هزینه های تحقیق حاضر توسط دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است. نویسندگان از کلیه همکاران محترم معاونت پژوهشی دانشکده تشکر می نمایند. ضمناً از همکاران محترم گروه انگل شناسی به ویژه خانم دکتر غفار ی فر و خانم قاسمی نیکو تشکر و قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

۱- پاکباز، ش. (۱۳۷۰). بررسی فراوانی کریپتوسپوریدیوزیز در انسان و دام (گوساله، بره) در شهرستان یاسوج, پایان نامه (دکترا) دانشگاه شهید چمران اهواز.

۲- پیرستانی، م. صدرایی، ج. و دلیمی، ع. (۱۳۸۸). بررسی میزان شیوع عفونت کریپتوسپوریدیایی در گاوداری های شهرستان شهریار، استان تهران و اهمیت بهداشتی آن در انسان. مجله پژوهش و سازندگی (دامپزشکی)، شماره ۸۵، ص ۴۴-۵۳.

۳- تحویلدار بیدرونی، ف. دلیمی، ع.، کاظمی دمنه، ب. (۱۳۸۷). تمایز ایزوله های کریپتوسپوریدیوم پاروم جداشده از انسان و گاو با استفاده از قطعه bp۱۰۵۵ ژن 18S rRNA. پژوهش در پزشکی، دوره ۳۲، شماره۱ ،ص ۵-۱۱.

۴ – درستکارمقدم، د. ، اعظمی، م. ، صالحی، ر. ، صالحی، م. (۱۳۸۴). تعیین گونه های انگل کریپتوسپوریدیوم با استفاده از آنالیز PCR-RFLP ژن s rRNA18 . مجله علوم پایه پزشکی ایران، ؛ دوره ۸، شماره ۴: ص ۲۳۲-۲۳۸

۵- سهرابی حقدوست, ا. (۱۳۷۱). گزارش اولین مورد کریپتوسپوریدیوز شیردان گاو در ایران. دوره: ۴۷، شماره ۱-۲ ص۵۱-۶۰,۶- فتوحی اردکانی، ر. فصیحی هرندی، م. سلیمان بنایی، س.کامیابی، ح. عطاپور، م. شریفی، ا. (۱۳۸۷). اپیدمیولوژی آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در گاوهای شهرستان کرمان و تعیین گونه و ژنوتایپ تعدادی از ایزوله ها، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. دوره پانزدهم، شماره ۴، ص ۳۲۰-۳۱۳.

۷- قمری، م.، دلیمی ، ع.، جعفری، م (۱۳۸۰). آلودگی کریپتوسپوریدیایی در توده گاومیش های آذربایجان غربی، پژوهش و سازندگی، دوره ۱۴، شماره ۵۲، ص ۸۴-۸۷.

۸- مبارکی، ع. (۱۳۷۴). بررسی فراوانی کریپتوسپوریدیوز در انسان و دام در شهرستان سنندج پایان نامه (دکترا)، دانشگاه شهید چمران ، اهواز.

۹- محبعلی، م.، ناطق پور، م.، خرسندی نیا، آ(۱۳۷۸). بررسی میزان شیوع عفونت کریپتوسپوریدیوم در گاوداری های شهرستان اسلامشهر از استان تهران و اهمیت بهداشتی آن در انسان؛ مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۱، ص ۵۹ -۶۲ .

۱۰ - مدیری، د. (۱۳۷۲). بررسی فراوانی کریپتوسپوریدیوز در اطفال و گوساله‌ها در شهرستان اراک ، پایان نامه (دکترا)، دانشگاه شهید چمران اهواز.

۱۱- نایب زاده، ح.، ملکی، ش.)۱۳۸۶(بررسی میزان شیوع کریپتوسپوریدیوم در گاوها و گوساله های اسهالی و غیر اسهالی شهرستان خرم آباد، مجله تحقیقات دامپزشکی، شماره ۲۵۰، ص ۴۳۳.

۱۲-واحدی، ن.، دلیمی، ع.، سعادت آملی، م. (۱۳۸۸). ررسی مقدماتی میزان آلودگی کریپتوسپوریدیایی گوارشی در بره ها و گوساله ها در شهرستان آمل - ایران. مجله تحقیقات دامپزشکی، سال شصت و چهارم، شماره ۲ (پیاپی ۲۵۸)،ص ۱۰۱-۱۰۳.

13- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman JG, Smith J, Struhl K. (1995). Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Unit 2.1: page 2-3.

14- Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ, Silva J Jr. (1996). Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. J Clin Microbiol. 34(7):1769-72.

15- Enemark, H. L., P. Ahrens, C. J. Lowery, S. M. Thamsborg, J. M. Enemark, V. Bille-Hansen, and P. Lind. (2002). Cryptosporidium andersoni from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterization. Vet. Parasitol. 107:37–49.

16- Fayer R. (1997). Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. By CRC Press Inc. CH (1, 8), pp (2-28, 182-200).

17- Hajdušek O., Ditrich O., Šlapeta J. (2004). Molecular identification of Cryptosporidium in animal and humans hosts from the Czech Republic. Vet. Pa

18- Imre K., Dărăbuş Gh. (2011). Distribution of Cryptosporidium species, genotypes and *C. parvum* subtypes in cattle in European countries. Sci Parasitol 12(1):1-9.

19- Kváč M. and Vítovec J. (2003). Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 50:451-457.

www.SID.ir

Archive of SID

20- Leng X, Mosier DA, Oberst RD. (1996). Simplified method for recovery and PCR detection of Cryptosporidium DNA from bovine feces. Appl Environ Microbiol. 62(2):643-7.

21- Mendonça C., Almeida A., Castro A., de Lurdes Delgado M., Soares S., da Costa J.M., Canada N. (2007). Molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia isolates from cattle from Portugal. Vet. Parasitol. 147:47-50.

22- Mirzai Y., Yakhchali M., Mardani K.(2014). C*ryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* infection in naturally infected cattle of northwest Iran. Veterinary Research Forum. 2014; 5 (1) 55 - 60

23- Morgan, U. M., L. Xiao, P. Monis, I. Sulaiman, I. Pavlasek, B. Blagburn, M. Olson, S. J. Upton, N. V. Khramtsov, A. Lal, A. Elliot, and R. C. Thompson. (2000). Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. Parasitology 120:457–464.

24- Moriarty E.M., McEvoy J.M., Lowery C.J., Thompson H.P., Finn M., Sheridan J.J., Blair I.S., McDowell D.A., Duffy G. (2005). Prevalence and characterisation of Cryptosporidium species in cattle faeces and on beef carcases at slaughter. Vet. Rec. 156:165-168.

25- Ondráčková Z., Kváč M., Sak B., Květoňová L., Rost M. (2009). Prevalence and molecular characterization of Cryptosporidium spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. Vet Parasitol. 165:141-144.

26- Pirestani M, Sadraei J, Dalimi asl A, Zavvar M, Vaeznia H. (2008) Molecular characterization of Cryptosporidium isolates from human and bovine using 18s rRNA gene in Shahriar county of Tehran, Iran. Parasitol Res. 103:467-472.

27- Robinson G., Thomas A.L., Daniel R.G., Hadfield S.J., Elwin K., Chalmers R.M. (2006). Sample prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. Vet. Parasitol. 142:163-

28- Silverlås C., Näslund K., Björkman C., Mattson J.G. (2010). Molecular characterisation of Cryptosporidium isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region.Vet. Parasitol. 169:289-295.

29- Xiao, L. H., L. Escalante, C. F. Yang, I. Sulaiman, A. A. Escalante, R. J. Montali, R. Fayer, and A. A. Lal. (1999). Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl. Environ. Microbiol. 65:1578–1583.

30- Xiao L., Fayer R, Ryan U., and Upton S. J. (2004). Cryptosporidium Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. Clin Mirobiol Rev. 17(1): 72–97

www.SID.ir