

## مطالعه الگوی دفع اوویسیست و تغییرات وزن ناشی از آلوده‌سازی تجربی گوساله‌های نوزاد با کریپتوسپوریدیوم پارووم

فیصل ضرغامی<sup>۱</sup>، محمدرضا مخبردزفولی<sup>۱\*</sup>، صادق رهبری<sup>۲</sup>، پرویز شایان<sup>۲</sup>، الهه ابراهیم زاده<sup>۲</sup>، محمود بلورچی<sup>۳</sup>، صمد لطف اله زاده<sup>۱</sup>

(۱) گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۲) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۳) گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۲۸ اردیبهشت ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱۶ تیر ماه ۱۳۹۴)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** کریپتوسپوریدیوم پارووم تک یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکساست که دام‌های اهلی و وحشی و همچنین انسان را آلوده می‌کند. هدف: مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی ایجاد اسهال و دفع اوویسیست در کریپتوسپوریدیوز تجربی و ارتباط آن با کاهش وزن گوساله‌های نوزاد انجام گرفت. روش کار: ۱۲ گوساله نوزاد در یک گاوداری شیری انتخاب و به صورت تصادفی به ۲ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. ۶ گوساله (گروه آزمایش) ۱۲ ساعت پس از تولد با  $10^7 \times 1$  اوویسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم آلوده شدند و ۶ گوساله دیگر (گروه شاهد) با اوویسیست مواجهه نشدند. روزانه ۲ بار نشانه‌های بالینی بررسی و به منظور تعیین حضور و شمارش اوویسیست‌های موجود، نمونه مدفوع از طریق رکتوم برداشت می‌گردید. جهت تعیین اثرات کریپتوسپوریدیوز بر افزایش وزن، تمامی گوساله‌ها از روز ۰ تا ۳۰ پس از عفونت با فواصل سه روز وزن می‌شدند. نتایج: تمامی گوساله‌های آلوده علیرغم دریافت آغوز مادری، از روز ۳ پس از عفونت نشانه‌های دپرسیون و کاهش اشتها را نشان دادند و به دنبال آن اسهال آبکی همراه با توده‌هایی از موکوس و تغییر رنگ آن به زرد یا بی رنگ ظاهر شد. اسهال ۸-۵ روز ادامه داشت که این منجر به دهیدراتاسیون شدید گردید. بیشترین شدت اسهال ۴-۶ روز پس از عفونت بود. دفع اوویسیست از روز ۴ پس از عفونت شروع و تا روز ۱۱ ادامه داشت. بیشترین میزان آن در روز  $(9/03 \pm 10^6 \times 60/48)$  اوویسیست در هر گرم مدفوع بود. نشانه‌های بالینی در گوساله‌های شاهد مشاهده نگردید. میانگین افزایش وزن گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از گروه آزمایش بود ( $P < 0/001$ ). وزن گوساله‌های آلوده تا سن ۹ روزگی کاهش و بعد از آن افزایش را نشان داد. نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر علاوه بر تعیین الگوی دفع اوویسیست نقش کریپتوسپوریدیوم پارووم را به عنوان عامل اولیه در ایجاد اسهال و کاهش وزن گوساله‌های نوزاد نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** کریپتوسپوریدیوم پارووم، اوویسیست، تغییرات وزن، اسهال، گوساله‌ها

### مقدمه

پرزها، تغییر شکل سلول‌های پوششی و کوچک شدن میکروویلی‌های روده شده و ایجاد اسهال می‌نماید (۶، ۲۴). کریپتوسپوریدیوم پارووم به عنوان عامل مهم اسهال در انسان و دام‌های اهلی معرفی گردیده و اخیراً بویژه در افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و کودکان به عنوان یک عامل آسیب رسان روده ای مشترک بین انسان و دام مورد توجه قرار گرفته است (۸، ۲۶، ۲۷). رقم بالای کریپتوسپوریدیوز در مبتلایان به نقص ایمنی در جهان و شیوع آن به میزان  $33/4\%$  و  $11/1\%$  به ترتیب در مبتلایان به ایدز و بدخیمی‌های خونی دارای اسهال در ایران نشان دهنده اهمیت این انگل در بهداشت انسانی است (۲۰). حدود  $10\%$  مرگ و میر در مبتلایان به ایدز مربوط به این بیماری است (۲۲). گاوها و گوساله‌های آلوده به عنوان یک منبع بالقوه آلودگی در انسان مورد توجه قرار گرفته‌اند که می‌توانند از طریق دفع اوویسیست انگل در مدفوع، منابع آب آشامیدنی انسان را آلوده کنند. عفونت‌زایی این انگل مدت‌های طولانی در محیط‌های مرطوب حفظ می‌شود و نسبت به اغلب ضد عفونی کننده‌های رایج مقاوم می‌باشد (۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳). مهم‌ترین نشانه‌های بالینی در گوساله‌ها دپرسیون، بی اشتها، اسهال، کاهش وزن و گاهی تلفات می‌باشد (۸، ۱۱، ۱۶). در دنیا، چندین مطالعه در زمینه نشانه‌های بالینی و تأثیر کریپتوسپوریدیوز بر وزن

کریپتوسپوریدیوم پارووم تک یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکس با انتشار جهانی می‌باشد که بافت پوششی روده اکثر مهره داران را مورد تهاجم قرار می‌دهد (۱۹، ۲۱، ۲۷، ۳۲). با گذشت بیش از یک قرن از شناسایی کریپتوسپوریدیوم توسط تاینز در سال ۱۹۰۷، ۱۹ گونه از جنس کریپتوسپوریدیوم از حیوانات مختلف جدا شده است که دو گونه آن شامل کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و پارووم در گاو دارای اهمیت است. کریپتوسپوریدیوم آندرسونی در سلول‌های پوششی مخاط شیردان جایگزین می‌گردد و با کاهش تولید در گاوهای شیری در ارتباط است (۶، ۱۷، ۲۴). کریپتوسپوریدیوم پارووم یکی از مشکلات مهم گاوداری‌های صنعتی است که خسارات اقتصادی فراوانی در صنعت گاوداری به دلیل هزینه‌های درمانی، خدمات دامپزشکی و همچنین اسهال، کاهش وزن و بروز مرگ و میر در گوساله‌ها ایجاد می‌کند (۹، ۱۹). بیش از نیمی از گوساله‌های تازه متولد شده در معرض خطر آلودگی به کریپتوسپوریدیوم قرار دارند (۱۰). چرخه زندگی این انگل در فضای زیر غشایی سلول‌های پوششی روده بویژه در بخش انتهایی روده کوچک طی می‌گردد. تهاجم کریپتوسپوریدیوم پارووم به سلول‌های روده منجر به آتروفی



همچنین به کمک پرایمر اختصاصی برای گونه پارووم تأیید گونه انجام شد. پس از تأیید مولکولی، اوسیسیت‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم مذکور تحت عنوان جدایه ایران تا مرحله آلوده سازی در PBS (PH= ۷/۲) و در دمای ۴°C نگهداری شد. درست قبل از آلوده سازی، تعداد اوسیسیت‌ها با استفاده از لام هموسیئومتر و با درشت‌نمایی ۴۰ برابر میکروسکوپ نوری مجدداً شمارش و محاسبه گردید.

**حیوانات مورد استفاده:** ۱۲ گوساله تازه متولد شده در مؤسسه تحقیقاتی امین آباد وابسته به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت انجام تحقیق در نظر گرفته شد. چند ساعت قبل از زایمان، گاوهای آبستن به سالن زایش که از قبل شستشو و ضد عفونی شده و کف آن کاه ریخته شده بود منتقل می‌شدند و ناحیه زیر دم و پربنه گاو آبستن بخوبی شسته می‌شد تا آلودگی محیطی گوساله به حداقل برسد. گوساله‌های تازه متولد شده بلافاصله بعد از تولد (۳۰ دقیقه بعد از تولد) از مادران جدا شده و بند ناف آنها با استفاده از محلول ۷٪ بتادین به روش غوطه‌وری ضد عفونی می‌گردید. سپس گوساله‌ها، وزن‌کشی شده و به باکس‌های انفرادی که قبلاً تمیز و ضد عفونی شده و کف آن با کاه پوشانده شده بود منتقل می‌شدند. به منظور ضد عفونی، باکس‌های نگهداری شعله افکنی شده و به دنبال آن با استفاده از فرمالین ۱۰٪ شستشو گردید (۲۴). گوساله‌ها بطور تصادفی به ۲ گروه ۶ تایی کنترل و آزمایش تقسیم شدند. گروه‌های آزمایش و شاهد ۳L آغوز در ۲ ساعت اول بعد از تولد از طریق بطری سر پستانک دار دریافت کردند و در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تولد نیز به ترتیب ۲L و ۱L آغوز به آنها داده شد. بعد از ۲۴ ساعت همه گوساله‌ها به میزان ۱۰٪ وزن بدن و سه بار در روز از شیر بدون آنتی بیوتیک و از یک منبع تغذیه می‌شدند. در ساعت ۱۲ پس از تولد به شش گوساله (گروه آزمایش)  $1 \times 10^7$  اوسیسیت کریپتوسپوریدیوم پارووم همراه با ۵۰mL آغوز (از آغوز ساعت ۱۲) خوراندند (۳، ۲۸). ۶ گوساله دیگر به عنوان گروه شاهد، اوسیسیت کریپتوسپوریدیوم پارووم را دریافت نکردند. ۲۰mL از آغوز دوشش اول گاوهای شاهد و آزمایش جهت ارزیابی سطح آنتی بادی ضد کریپتوسپوریدیوم جمع‌آوری و در دمای ۲۰°C - نگهداری شد.

**ارزیابی بالینی:** معاینات سلامت گوساله شامل تعداد ضربان قلب و تعداد تنفس در دقیقه، درجه حرارت رکتوم، بررسی رفتار تغذیه‌ای، میزان افسردگی و درجه دهیدراتاسیون دوبار در روز به فاصله هر ۱۲ ساعت انجام می‌شد و وجود اسهال و سایر نشانه‌های بالینی در آنها مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. از روز صفر تا روز ۱۵ پس از آلوده سازی، دو بار در روز به فاصله هر ۱۲ ساعت، نمونه مدفوع از طریق رکتوم برداشت و جمع‌آوری می‌شد و رنگ و قوام آن و همچنین وجود یا عدم وجود اسهال ارزیابی می‌گردید. قبل از آلوده سازی و در صورت بروز اسهال نیز نمونه‌های مدفوعی جهت بررسی حضور سایر عوامل مولد اسهال نوزادان (کرونا، ویروس، سالمونلا، روتا و ویروس و *Escherichia Coli* K۹۹) از گوساله‌ها اخذ می‌شد.

نوزاد حیوانات مختلف انجام شده است (۱۵، ۱۱، ۹). تحقیق حاضر، اولین مطالعه‌ای در کشور است که در این زمینه و با هدف تعیین الگوی ایجاد اسهال و دفع اوسیسیت در آلودگی تجربی کریپتوسپوریدیوم پارووم و ارتباط آن با کاهش وزن گوساله‌های نوزاد و مقایسه آن با یافته‌های سایر محققین طراحی گردید.

## مواد و روش کار

**آماده سازی نمونه مثبت:** جهت آلوده ساختن گوساله‌ها، اوسیسیت‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم از مدفوع یک گوساله ۱۲ روزه مبتلا به اسهال در مؤسسه تحقیقاتی امین آباد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. نمونه مدفوع به طور مستقیم از رکتوم گوساله مورد نظر برداشت و هم حجم آن بی کرومات پتاسیم ۲/۵٪ اضافه شد و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی تهران منتقل گردید. به منظور شناسایی اولیه از نمونه مدفوع گسترش تهیه و با روش ذیل - نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی گردید (۱۲). در بررسی میکروسکوپی بیش از ۲۰ اوسیسیت در هر میدان دید (بزرگنمایی  $\times 40$ ) مشاهده گردید. به منظور خالص سازی اوسیسیت‌های انگل از روش اصلاح شده Winter و همکاران استفاده گردید (۳۱). ابتدا نمونه مدفوع به ترتیب از الک‌های ۱۰۰، ۱۴۰ و ۲۰۰ گذرانده شد تا اجزاء درشت مدفوع از آن جدا گردد و سپس مدفوع الک شده تحت  $\times 3000$  و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ آب اضافه و مجدداً سانتریفیوژ گردید و سپس این مرحله ۲ بار دیگر تکرار شد تا بی کرومات پتاسیم از مدفوع زوده شود. در مرحله بعد، در یک فالكون ۵۰mL، ۱۰mL از نمونه با یک حجم از اتر سرد بعلاوه سه حجم بی کرینات سدیم ۱٪ سرد خوب مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه تحت  $\times 3000$  سانتریفیوژ گردید. توده ضخیمی از چربی در بالای ظرف تشکیل شد که آن را دور ریخته و لایه رسوب نگه داشته شد. سپس بافر Tris-EDTA (۳/۷۲g EDTA و ۶/۰۵۷g Tris-Hcl در ۱L آب مقطر) بر روی نمونه ریخته و جهت شستشو به مدت ۱۰ دقیقه تحت  $\times 3000$  سانتریفیوژ گردید. این مرحله دو بار تکرار شد. سپس به رسوب حاوی اوسیسیت ۴۰mL ساکارز ۵۵٪ در فالكون ۵۰mL اضافه و خوب مخلوط گردید سپس ۱۰mL آب مقطر بسیار خنک روی آن ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه تحت  $\times 3000$  سانتریفیوژ گردید و در نهایت لایه میانی حاوی اوسیسیت‌های خالص از ۲ لایه دیگر جدا و جمع‌آوری شد. در مرحله بعد اوسیسیت‌های خالص شده با ۱۰ برابر حجم PBS (PH= ۷/۲) خوب مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه تحت  $\times 3000$  سانتریفیوژ شد و دو بار دیگر این مرحله تکرار شد تا ساکارز از اوسیسیت‌های خالص شده زوده شود. از  $1 \times 10^7$  اوسیسیت کریپتوسپوریدیوم پارووم ماده وراثتی به کمک کیت استخراج DNA (MBST, Iran) استخراج شد و به کمک پرایمرهای مشتق از ژن ۱۸SrRNA در کریپتوسپوریدیوم تأیید جنس و



به دنبال آن به مدت ۵ دقیقه تحت  $1000 \times g$  در دمای  $25^\circ C$  سانتریفوژ شد. در نهایت لایه رویی میکروتیوب که حاوی پروتئین‌های محلول بود با استفاده از سمپلر برداشت و در یک میکروتیوب استریل ریخته شد (۱۰). در مرحله بعد، آزمایش دات بلات بر روی سرم‌های آغوز انجام گردید (۲۹). تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶/۰ و با استفاده از رویه مدل عمومی خطی (GLM) برای داده‌های تکراری و آزمون t مستقل (Independent samples t test) انجام گردید. سطح معنی داری ۵٪ در نظر گرفته شد.

### نتایج

**نشانه‌های بالینی:** در گوساله‌های گروه آزمایش از روز ۳ پس از آلوده‌سازی تجربی، نشانه‌های افسردگی (متوسط تا شدید) و کاهش اشتها به میزان قابل توجهی ظاهر گردید، اگرچه اشتها به طور کامل قطع نشد. به دنبال این نشانه‌ها، اسهال آبکی ظاهر شد که به مدت ۸-۵ روز ادامه داشت (میانگین دوره اسهال، ۶/۵ روز بود). قوام مدفوع آبکی و رنگ آن به زرد یا بی رنگ تغییر یافت و توده‌های فراوانی از موکوس در آن قابل مشاهده بود. اسهال در فاصله روزهای ۴ تا ۶ پس از آلوده‌سازی شدید (آبکی و شدید آبکی) بود. به دنبال اسهال، میزان از دست دادن آب بدن در گوساله‌های گروه آزمایش قابل توجه (۱۰-۸٪ دهیدراتاسیون) و رفلکس مکش در آنها ضعیف گردید و تعداد ضربان قلب و تنفس در آنها افزایش یافت. تب از نشانه‌های بیماری نبود. در گروه شاهد، هیچ کدام از نشانه‌های ذکر شده مشاهده نشد.

**یافته‌های انگل‌شناسی:** در گوساله‌های آزمایش دفع اوویست از روز ۴ پس از آلوده‌سازی شروع شد و تا روز ۱۱ پس از عفونت ادامه یافت. روز ۶ پس از آلودگی میانگین دفع اوویست به بیشترین میزان ( $60/48 \times 10^6 \pm 9/03$ ) اوویست در هر گرم مدفوع رسید (نمودار ۱). بعد از قطع دفع اوویست، حضور مجدد آن در مدفوع گوساله‌ها مشاهده نگردید. دفع اوویست در گروه شاهد، مشاهده نشد. براساس نتایج کشت میکروبی و آزمایش الایزا هیچکدام از عوامل سالمونلا، روتاویروس، کروناویروس و *E.coli* K۹۹ در مدفوع یافت نگردید.

**نتایج دات بلات آغوز:** در آزمایش دات بلات، آغوز گاوهای گروه شاهد و آزمایش تارقت  $1/500$  با آنتی ژن P۲۳ کریپتوسپوریدیوم واکنش داد و تفاوتی بین ۲ گروه وجود نداشت.

**تغییرات وزن:** وزن تولد گوساله‌های دو گروه بین  $37/5$  تا  $38/8$  KG بود. پس از ۳۰ روز، وزن گوساله‌های تیمار به  $44/21 \pm 0/81$  KG رسید در حالیکه وزن گوساله‌های گروه شاهد بطور معنی‌داری بیشتر از گروه تیمار بود ( $p < 0/001$ ) و میانگین وزن در گروه شاهد به  $50/75 \pm 0/59$  KG در روز ۳۰ رسید (نمودار ۲). میانگین افزایش وزن روزانه در گروه آزمایش به طور معنی‌داری کمتر از میانگین افزایش وزن روزانه در گروه شاهد بود

معیارهای بالینی شامل بررسی قوام مدفوع (جامد، خمیری، آبکی، شدیداً آبکی)، رنگ مدفوع (زرد، سبز، متمایل به سفید، قهوه‌ای)، غیر طبیعی‌های مدفوع (موکوس، خون)، بررسی وضعیت اشتها (خوب و نرمال، ضعیف، بی اشتها)، وضعیت دهیدراتاسیون و وضعیت افسردگی بالینی بود (۲۵، ۱۳).

**بررسی حضور اشریشیا کولی، سالمونلا روتاویروس و کروناویروس در مدفوع:** به منظور بررسی حضور سالمونلا در مدفوع گوساله‌ها، نمونه مدفوع را جهت کشت میکروبی در یک لوله استریل ریخته و بلافاصله بعد از اخذ، با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال می‌گردید. جهت بررسی حضور روتاویروس، کرونا ویروس و *E.coli* K۹۹، ردیابی آنتی ژن این عوامل با استفاده از آزمایش الایزا (کیت الیزای تشخیص آنتی ژن روتاویروس، کروناویروس و *E.coli* K۹۹ ساخت شرکت pourquier فرانسه) بر روی نمونه‌های مدفوع که بلافاصله بعد از اخذ از رکتوم تحت برودت  $20^\circ C$  - منجمد شده بودند، انجام گرفت.

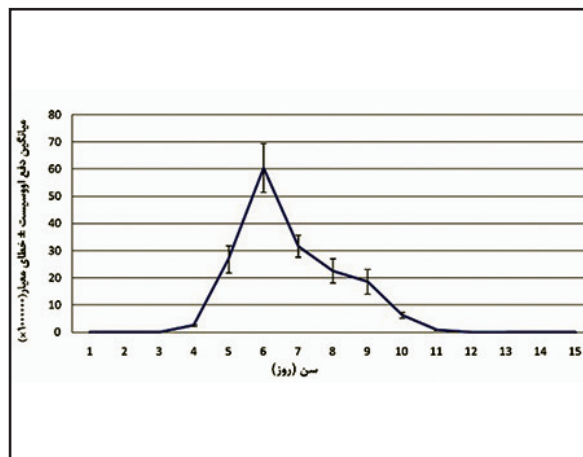
**شمارش اوویست‌های مدفوع:** روزانه نمونه مدفوع گوساله‌های هر دو گروه از طریق رکتوم اخذ شده و به منظور بررسی حضور اوویست‌ها در مدفوع از هر نمونه گسترش تهیه شده و پس از رنگ آمیزی آن به روش ذیل - نلسون اصلاح شده مورد بررسی میکروسکوپی قرار می‌گرفت. در صورت مشاهده اوویست‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم در مدفوع، به منظور شمارش تعداد اوویست‌ها، ۱g از مدفوع مورد نظر وزن شده و در فالكون ۵۰mL ریخته و با استفاده از روش winter و همکاران در سال ۲۰۰۰ اقدام به خالص سازی اوویست‌ها می‌گردید (۳۱) و در نهایت اوویست‌های خالص شده با استفاده از لام هموسیتومتر نتوبار و با بزرگنمایی ۴۰ برابر میکروسکوپ نوری شمارش می‌شد و به این صورت میزان اوویست دفع شده در هر گرم مدفوع بدست می‌آمد.

**ارزیابی تغییرات وزن:** جهت تعیین اثرات کریپتوسپوریدیوز بر روی وزن، گوساله‌ها از روز ۰ تا روز ۳۰ پس از آلوده سازی به فاصله هر سه روز یکبار وزن کشی می‌شدند و بنابراین وزن حیوانات قبل و در زمان دفع اوویست و همچنین بعد از اتمام دفع اوویست در دو گروه آزمایش و شاهد مورد بررسی قرار می‌گرفت.

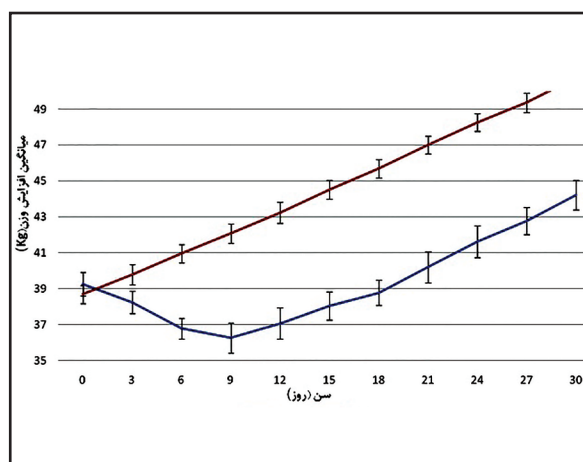
**بررسی سطح آنتی بادی ضد P۲۳ کریپتوسپوریدیوم پارووم در آغوز با استفاده از دات بلات:** ابتدا از آغوز دوشش اول گاوهای هر دو گروه شاهد و آزمایش سرم تهیه گردید. بدین منظور ابتدا آغوز را از دمای  $20^\circ C$  - به یخچال  $4^\circ C$  منتقل کرده سپس در دمای معمولی اتاق قرار داده شد تا به آرامی از انجماد خارج شود. در مرحله بعد این آغوزها را در میکروتیوب‌های ۱mL استریل ریخته و به مدت نیم ساعت تحت  $1000 \times g$  و دمای  $2^\circ C$  سانتریفیوژ شد تا لایه چربی از آغوز جدا شود. بعد از چربی زدایی، ۱۰۰μL از آنزیم رنین ۱units/mg به مجموعه اضافه شد. سپس میکروتیوب را خوب تکان داده و به مدت ۱/۵ ساعت در بن ماری  $17^\circ C$  قرار داده شد و



موارد کریپتوسپوریدیوم پارووم تنها عامل پاتوژن ایجاد اسهال گزارش شد و در ۳۹٪ موارد این انگل همراه با روتاویروس و کرونوویروس یافت شد (۲۴). در مطالعه حاضر نیز به استثناء کریپتوسپوریدیوم پارووم سایر عوامل معمول آسیب رسان روده ای نوزادان (سالمونلا، روتاویروس، کرونوویروس و *E. coli* K۹۹) در گوساله‌ها یافت نشد. این نشان می‌دهد که کریپتوسپوریدیوم به تنهایی و بدون همراهی سایر عوامل معمول اسهال نوزادان قادر به ایجاد اسهال شدید در گوساله‌های نوزاد می‌باشد. این در حالی است که همه این گوساله‌ها آغوز مادری به میزان کافی و در زمان مناسب دریافت کردند. این یافته نشان می‌دهد که آغوز مادرانی که ایمن نشده اند نمی‌تواند نوزادان آنها را در برابر اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم در صورت آلودگی محافظت کند حتی اگر این مادران سابقه آلودگی با انگل را داشته باشند. بنابراین جهت محافظت گوساله‌های نوزاد در برابر کریپتوسپوریدیوز استفاده از آغوزهایپر ایمن ضروری می‌باشد. این یافته با نتایج چندین مطالعه مطابقت دارد. Arrowood و همکاران در سال ۱۹۸۹ و Moon و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که آغوز موش‌های بهبود یافته از کریپتوسپوریدیوز قادر نیست نوزاد آنها را در صورت آلودگی برابر کوریپتوسپوریدیوم پارووم محافظت کند (۲، ۱۸). همچنین Naciri و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که آغوز میش‌های ایمن نشده، بره‌های آنها را در برابر کریپتوسپوریدیوز محافظت نمی‌کند و جهت محافظت نوزادان در برابر کریپتوسپوریدیوز ایمن سازی آغوز مادران ضروری است (۱۹). نشانه‌های بالینی مشاهده شده در این مطالعه شامل بی‌اشتهایی، اسهال آبکی و دهیدراتاسیون با مطالعه تجربی Fayer و همکاران در سال ۱۹۹۸ که بر روی گوساله‌ها انجام شد مطابقت دارد (۱۱). دوره اسهال در عفونت تجربی یا طبیعی کریپتوسپوریدیوز از چند روز تا ۲-۱ هفته متفاوت است (۳). در مطالعه حاضر دوره نهفته ۴ روز بود و گوساله‌ها از روز ۴ پس از آلوده سازی، دفع اووسیست و نشانه‌های اسهال را نشان دادند Blewett و همکاران در سال ۱۹۹۳ در آلوده سازی تجربی با  $1 \times 10^7$  اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم در گوساله‌های شیری دوره نهفته را ۵-۴ روز بیان کردند (۳). اختلاف در دوره نهفته و دوره اسهال در مطالعات مختلف، ممکن است به دلیل تفاوت در میزان اووسیست استفاده شده جهت آلوده سازی باشد. نشان داده شده است بره‌هایی که با میزان کمتری اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم آلوده شده‌اند دوره نهفته طولانی‌تری داشته‌اند. در مطالعه Naciri و همکاران در سال ۱۹۹۴ بره‌هایی که به صورت تجربی با  $1 \times 10^6$  اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم آلوده شدند از روز ۴ تا ۱۱ پس از عفونت اووسیست را از طریق مدفوع دفع کردند، اگر چه دوره اسهال در این بره‌ها کوتاه بود (۲ روز) (۲۱). در مطالعه Xiao و همکاران در سال ۱۹۹۴، دفع اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم از روز ۴ پس از عفونت شروع شد و در ۷ روزگی به بیشترین میزان دفع رسید (۳۱). در حالیکه در مطالعه حاضر، حداکثر دفع اووسیست در روز ۶ پس از عفونت مشاهده گردید و تا روز ۱۱



نمودار ۱. میانگین دفع اووسیست ± خطای معیار در گروه آزمایش.



نمودار ۲. میانگین افزایش وزن ± خطای معیار در گروه آزمایش (خط آبی) و گروه شاهد (خط قرمز).

( $p < 0.001$ ). کاهش وزن گوساله‌های آزمایش تا روز ۹ پس از چالش ادامه داشت و بعد از آن به تدریج وزن آنها افزایش یافت. اگرچه اثرات منفی کریپتوسپوریدیوز بر روی وزن گوساله‌های تیمار به گونه‌ای بود که وزن آنها در سن ۱۸ روزگی با وزن تولد آنها برابر شد و بعد از بهبودی نیز تفاوت افزایش وزن بین دو گروه شاهد و آزمایش معنی‌دار بود ( $p < 0.001$ ).

## بحث

در مطالعه حاضر تمامی گوساله‌هایی که به صورت تجربی با اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم آلوده شدند، بعد از ۴ روز اووسیست‌های این انگل را از طریق مدفوع دفع کردند و نشانه‌های بالینی بیماری شامل: دیرسیون متوسط تا شدید، کاهش موقتی اشتها و اسهال که به مدت چند روز ادامه داشت را نشان دادند در حالیکه در گوساله‌های شاهد نشانه‌های بیماری و دفع اووسیست مشاهده نگردید. نقش کریپتوسپوریدیوم پارووم به عنوان عامل اولیه ایجاد اسهال در بره‌ها و بزغال‌ها ثابت شده است (۸) در دو مطالعه بر روی گوساله‌های مبتلا به اسهال، در ۵۱ و ۵۵٪



حاضر، گوساله‌های گروه آزمایش تا سن ۹ روزگی، کاهش وزن را نشان دادند و بعد از این سن نیز (روز ۱۰ تا ۳۰) افزایش وزن در گوساله‌های آلوده، به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ( $p < 0.001$ ). در مطالعه Martin-Gomez و همکاران در سال ۲۰۰۵ کریپتوسپوریدیوز تجربی در بره‌ها منجر به کاهش وزن و رشد شد که بعد از بهبودی نیز این تأثیر منفی بر افزایش وزن بره‌ها باقی ماند (۱۶). بیشترین شدت نشانه‌های بالینی شامل اسهال و کاهش وزن و همچنین بیشترین میزان دفع اووسیست تا سن ۹ روزگی مشاهده گردید. این یافته نشان می‌دهد که همستگی زیادی بین کاهش وزن و کریپتوسپوریدیوز وجود دارد. کاهش اشتها، اسهال، آسیب شدید روده و به دنبال آن اختلال در هضم و جذب مواد مغذی عامل کاهش وزن و لاغری مفرط در کریپتوسپوریدیوز است (۲۴). کریپتوسپوریدیوز تجربی در حیوانات مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با رویکرد الگوی دفع اووسیست و ایجاد اسهال و ارتباط آن با تغییرات وزن برای اولین بار در کشور بر روی کریپتوسپوریدیوم پارووم انجام می‌شود. با توجه به اینکه گوساله مبتلا به کریپتوسپوریدیوز میزان زیادی اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم در دوره بیماری دفع می‌کند، محققین جهت کارهای تحقیقاتی معمولاً از آلوده‌سازی تجربی گوساله جهت دستیابی به میزان زیادی اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم استفاده می‌کنند. این مطالعه به طور دقیق و کامل، جزئیات نشانه‌های بالینی، الگوی اسهال و دفع اووسیست و همچنین ارتباط آن با تغییرات وزن در گوساله‌های آلوده شده به اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم را مشخص کرد. همانطور که در این مطالعه نشان داده شد، گوساله‌ها در دوره بیماری میلیون‌ها اووسیست در هر گرم مدفوع دفع می‌کنند که رها سازی مدفوع آلوده در محیط و یا استفاده مستقیم از آن در زمین‌های کشاورزی باعث آلودگی آب‌ها، زنجیره غذایی و محصولات کشاورزی می‌شود که این، خطر عامل مهم و تهدید کننده بهداشت عمومی است و افراد زیادی بویژه کودکان، سالمندان و مبتلایان به ضعف سیستم ایمنی ممکن است در معرض آلودگی قرار گیرند.

### تشکر و قدر دانی

نویسندگان مقاله از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، پژوهشکده طب تجربی دانشگاه تهران و قطب علمی ایمونوپاتولوژی برای پشتیبانی مالی در ارتباط با طرح ملی طراحی و کسب دانش فنی تولید واکسن بر علیه کریپتوسپوریدیوز قدر دانی می‌نمایند. همچنین از همکاری موسسه تحقیقاتی امین آباد قدر دانی می‌گردد.

### References

- Anderson, B.C. (1981) Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. J Am Vet Med Assoc. 78: 982-984.

پس از عفونت، اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در مدفوع قابل مشاهده بود. Quilez و همکاران در سال ۱۹۹۶ اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم را در سن سه روزگی در عفونت طبیعی مشاهده کردند (۲۴). همچنین Fayer و همکاران در سال ۱۹۹۸ دوره نهفته بیماری را در گوساله‌ها، ۳-۶ روز پس از آلوده سازی تجربی با اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم گزارش کردند. در مطالعه این محققین در بیش از نیمی از گوساله‌ها شروع دفع اووسیست از روز ۴ پس از عفونت مشاهده گردید و ۸-۶ روز پس از عفونت به حداکثر رسید و گوساله‌ها از روز ۳ پس از آلوده سازی نشانه‌های اسهال را نشان دادند که ۴ تا ۱۶ روز ادامه داشت (۱۳). در مطالعه حاضر اسهال در گوساله‌های آزمایش در روز ۴ پس از عفونت مشاهده گردید که به مدت ۸-۵ روز ادامه داشت. بر خلاف مطالعه Fayer و همکاران در سال ۱۹۹۸، در مطالعه حاضر اسهال گوساله‌ها متناوب نبود. در این مطالعه بیشترین شدت اسهال در دوره‌ای که حداکثر دفع اووسیست (روز ۵ و ۶ پس از عفونت) رخ داد، مشاهده گردید. این یافته همستگی بین شدت اسهال و دفع اووسیست را بیان می‌کند. Causape و همکاران در سال ۲۰۰۲ همستگی بین شدت عفونت و حضور نشانه‌های بالینی و اسهال را نشان دادند (۴). در مطالعه حاضر دوره اسهال در گوساله‌ها کوتاه‌تر از دوره دفع اووسیست بود و دفع اووسیست تا چند روز پس از قطع اسهال نیز ادامه داشت. این یافته نشان می‌دهد که الزاماً، همیشه دفع اووسیست کریپتوسپوریدیوم با نشانه‌های بالینی کریپتوسپوریدیوز مانند اسهال همراه نمی‌باشد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تب نشانه ثابت در کریپتوسپوریدیوز نمی‌باشد. Enemark و همکاران در سال ۲۰۰۳ تب را در کریپتوسپوریدیوز تجربی گوساله‌ها مشاهده کردند. این محققین بیان کردند این تب ممکن است به دلیل همزمانی با عفونت روتاویروسی یا به دلیل تفاوت‌های فردی باشد (۹). در مطالعه حاضر، افزایش وزن گوساله‌های گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از گروه آزمایش بود ( $p < 0.001$ ). این یافته با نتایج مطالعه Enemark و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد. آنها نشان دادند که افزایش وزن روزانه در خوکچه‌های شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از گروه آلوده شده با اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم بود (۹). در مطالعه Sagodira و همکاران در سال ۱۹۹۹ کریپتوسپوریدیوز تجربی منجر به کاهش رشد و وزن در بزغاله‌های نوزاد گردید (۲۷). مطالعه‌ای نشان داد بزغاله‌های مبتلا به کریپتوسپوریدیوز، اختلاف وزن ۲ Kg در ۴ هفته اول زندگی در مقایسه با گروه شاهد داشتند (۸). در کودکان نیز کریپتوسپوریدیوز منجر به کاهش رشد و وزن می‌گردد. Chekley و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که کودکان دارای کریپتوسپوریدیوز بالینی و تحت بالینی به ترتیب ۳۴۲g و ۱۹۲ افزایش وزن کمتری در مقایسه با نوزادان فاقد عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم در یک ماه اول داشتند (۷). میزان دفع اووسیست، درجه اسهال و دهیدراتاسیون و تغییرات وزن بدن مشخص‌ترین نشانه‌های حدت در کریپتوسپوریدیوز می‌باشد (۹). در مطالعه



2. Arrowood, M.J., Mead, J.R., Mahrt, J.L., Sterling, C.R. (1989) Effects of immune colostrum and orally administered antisporezoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. *Infect Immun.* 57: 2283-2288
3. Blewett, D.A., Wright, S.E., Casemore, D.P., Booth, N.E., Jones, C.E. (1993) Infective dose size studies on *Cryptosporidium parvum* using gnotobiotic lambs. *Water Sci Technol.* 27: 61.
4. Causape, A.C., Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., Del Cacho, E., Lopez-Bernad, F. (2002) Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet Parasitol.* 104: 287-298.
5. Chalmers, R.M., Davies, A.P. (2010) Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol.* 124: 138-146.
6. Changizi, E., Salimi-Bejestani, M.R., Javaheri Vayeghan, A. (2012) The *Cryptosporidium ryanae* infection commence in Iranian cattle. *Tehran. J Vet Res.* 67: 127-133.
7. Checkley, W., Gilman, R.H., Epstein, L.D., Suarez, M., Diaz, J.F., Cabrera, L., Black, R.E., Sterling, C.R. (1997) Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: Their acute effect on weight gain in Peruvian children. *Am J Epidemiol.* 145: 156-164.
8. de Graaf, D.C., Vanopdenboscha, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E. (1999) A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol.* 29: 1269-1287.
9. Enemark, H.L., Bille-Hansen, V., Lind, P., Heegaard, P.M.H., Vigre, H., Ahrens, P., Thamsborg, S.M. (2003) Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*—evaluation of an animal infection model. *Vet Parasitol.* 113: 35-57.
10. Fayer, R. (2008) General biology. In: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Fayer, R., Xiao, L. (eds.). (2<sup>th</sup> ed.) CRC Press. New York, USA. p. 1-35.
11. Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D. (1998) *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int J Parasitol.* 28: 49-56.
12. Henrikson, S.V., Poglenn, J.F. (1981) Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl Nelson technique. *Acta Vet Scand.* 22: 594-596.
13. House, J.K., Gunn, A.A. (2009) Manifestations and management of disease in neonatal ruminants. In: *Large Animal Internal Medicine*. Smith, B. (ed.). (4<sup>th</sup> ed.). Mosby, Inc. Philadelphia, USA. p. 336-366.
14. Jenkins, M.C., O'Brien, C., Trout, J., Guidry, A., Fayer, R. (1998) Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. *Vaccine.* 17: 2453-2460.
15. Koudela, B., Jiri, V. (1997) Experimental cryptosporidiosis in kids. *Vet Parasitol.* 71: 273-81.
16. Martin-Gomez, S., Alvarez-Sanchez, M.A., Rojo-Vazquez, F.A. (2006) Obtaining hyperimmune anti-*Cryptosporidium parvum* ovine colostrum. A study of the humoral immune response in immunized sheep. *Parasitol Res.* 98: 119-129.
17. Mokhber Dezfooli, M.R., Sadeghiannasab, A., Akbarein, H., Tajik, P., Nadalian, M., Khajenasiri, Sh. (2005) Cryptosporidia infection and associated bacterial enteropathogens in diarrheic calves and cows in dairy farms around Tehran. *J Vet Res (University of Tehran).* 60: 131-135.
18. Moon, H.W., Woodmansee, D.B., Harp, J.A., Abel, S., Ungar, B.L.P. (1988) Lacteal immunity to enteric cryptosporidiosis in mice: Immunities do not protect their suckling pups. *Infect Immun.* 56: 649-653.
19. Naciri, M., Mancassolo, R., Reprant, J.M., Canivez, O., Quinque, B., Yovore, P. (1994) Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrum. *Vet Parasitol.* 53: 173-190.
20. Nahrevanian, H., Assmar, M. (2006) A case report of Cryptosporidiosis and isosporiasis in AIDS patients in Iran. *J Tropic Med Parasitol.* 29: 33-36.
21. Perryman, L.E., Kegerreis, K., Mason, P.H. (1993) Effect of orally administered monoclonal



- antibody on persistent *Cryptosporidium Parvum* infection in scid mice. *Infect Immune*. 61: 4906-4908
22. Petersen, C. (1992) Cryptosporidiosis in patient infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 15: 903-909.
  23. Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., del Cacho, E., Clavel, A., Causape, A.C. (1996) Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). *Vet Parasitol*. 66: 139-146.
  24. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007) *Veterinary Medicine*. (10<sup>th</sup> ed.) WB. Saunders Company. Philadelphia, USA.
  25. Rezazadeh, F., Zahraei-salehi, T., Mokhber Desfouli, M.R. Rahbari, M., Morshedi, A., Khaki, Z., Nabian, S., Rahbari, S., Bahonar, A. (2004) Clinical, biochemical and microbiological findings Of calves diarrhea in a dairy herd in suburbs of Tehran. *J Vet Med (University of Tehran)*. 59: 301-308.
  26. Riggs, M.W. (2002) Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microb. Infect*. 4: 1067-1080.
  27. Sagodira, S., Buzoni-Gatela, D., Iochmanna, S., Naciri, M., Bout, D. (1999) Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine*. 17: 2346-2355.
  28. Schnyder, M., Kohler, L., Hemphill, A., Deplazes, P. (2009) Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Vet Parasit*. 160: 149-154.
  29. Shayan, P., Ebrahimzadeh, E. (2008) Recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 as a target for the detection of cryptosporidium- specific antibody in calf sera. *Parasitol Res*. 103: 1207-1211.
  30. Trotz-Williams, L.A., Wayne Martin, S., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. (2008) Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Prevent Vet Med*. 83: 11-23.
  31. Winter, G., Andrew, A.G., Williams, L.K., Slade, M.B. (2000) Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*. *Funct Integr Genom*. 1: 207-217.
  32. Xiao, L., Herd, R.P. (1994) Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet Parasitol*. 55: 257-262.



## A study of oocyst shedding pattern and weight changes in neonatal calves experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*

Zarghami, F.<sup>1</sup>, Mokhber Dezfouli, M.R.<sup>1\*</sup>, Rahbari, S.<sup>2</sup>, Shayan, P.<sup>2</sup>, Ebrahimzadeh, E.<sup>2</sup>, Bolourchi, M.<sup>3</sup>, Lotfolahzadeh, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

<sup>2</sup>Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Genital Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

(Received 18 May 2015, Accepted 7 July 2015)

### Abstract:

**BACKGROUND:** *Cryptosporidium parvum* is a protozoan parasite which belongs to apicomplexa phylum. The parasite infects both wild and domesticated animals and human beings as well. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to detect oocyst shedding and diarrhea pattern in experimental cryptosporidiosis and their correlation with weight loss in neonatal calves. **METHODS:** Twelve Holstein calves of both sexes were obtained at birth from dairy farm and randomly divided into two groups of 6 calves. Six calves were orally infected with  $10^7$  *C.Parvum* oocysts at the 12h post parturition. The control group was not infected. Clinical signs were examined and fecal samples were collected by the rectal examination twice a day. All calves were weighed from day 0 to day 30 with 3 days intervals to determine effects of cryptosporidiosis on weight gain. **RESULTS:** All infected calves were noticeably depressed and had a decreased appetite from 3 days post inoculation (DPI) while they received colostrum. Subsequently, watery diarrhea with clumps of mucus and yellow or pale changes of feces color were observed. The infected calves have had diarrhea for 5-8 days that remarkably had got dehydrated. The most severity of diarrhea was 4-6 DPI. Oocyst excretion started 4 DPI, peaked at 6 DPI ( $60.48 \times 10^6 \pm 9.03$  oocysts/g feces) and continued until 11 DPI. Control calves had no diarrhea and other clinical signs during the whole period of the trial. The mean weight gain of control group was significantly higher than inoculated group during experiment ( $p < 0.001$ ). The Weight of the infected calves was retarded until 9 days old and then risen subsequently. **CONCLUSIONS:** Present study showed the role of *C.Parvum* as the primary cause of diarrhea and weight loss among neonatal calves.

**Keyword:** calves, *Cryptosporidium parvum*, diarrhea, oocyst, weight changes

### Figure Legends and Table Captions

**Graph 1.** Oocyst shedding mean  $\pm$  SE in test group.

**Graph 2.** Weight gain mean  $\pm$  SE in test group (blue line) and control group (red line).

\*Corresponding author's email: mokhberd@ut.ac.ir, Tel: 021-66431103, Fax: 021-66933222

J. Vet. Res. 70, 3:241-248, 2015

