Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۵: ۲۷-۱۹

گزارش کریپتوسپوریدیوم آندرسونی از گوسفندان تهران بر مبنای تکثیر ژن HSP70

عبدالحسین دلیمی [۱*]، فرید تحویلدار بیدرونی [۲] و فاطمه غفاری فر [۳]

۱- استاد گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استادگروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۱۱

چکیده

کریپتوسپوریدیوزیس از عفونت‌های انگلی شایع در گوسفندان بشمار می‌آید. هدف از انجام مطالعه حاضر تعیین گونه‌های کریپتوسپوریدیوم شایع در گوسفندان تهران بر مبنای ژن HSP70 با استفاده روش Nested PCR-RFLP است. در مرحله اول تعداد ۱۴۸۵ نمونه مدفوع از گوسفندان استان تهران جمع آوری شد سپس نمونه‌ها با روش اسید فاست تغییر یافته رنگ آمیزی گردیدند. در مرحله دوم DNA نمونه‌های مثبت استخراج و ژن HSP70 با روش Nested-PCR تکثیر، سپس برای تشخیص گونه، محصول PCR با آنزیم محدود کننده Hind II برش داده شد. با روش اسید فاست تعداد ۲۲ نمونه مثبت تشخیص داده شد. همه این نمونه‌ها با روش مولکولی مورد تأیید قرار گرفتند. باند تکثیر یافته ۸۰۰ جفت بازی ژن HSP70 با آنزیم برش داده شد. بر روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد، باندهای بیست نمونه دارای الگوی مشابه و دو نمونه دارای الگوی متفاوت بودند. بر مبنای ترادف بازی این دو الگو گروه اول گونه آندرسونی و گروه دوم پاروم تشخیص داده شد. بطور کلی گرچه گونه پاروم بعنوان گونه شایع در گوسفندان شناخته شده است ولی در این مطالعه گونه آندرسونی بعنوان گونه غالب بوده است.

کلمات کلیدی: *کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و پاروم، ژن HSP70، Nested-PCR، گوسفند.*

* *نویسنده مسئول: عبدالحسین دلیمی اصل*

آدرس: گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. تلفن: ۸۲۸۸۳۸۳۸

پست الکترونیک: dalimi_a@modares.ac.ir

مقدمه

تک یاخته کریپتوسپوریدیوم از عوامل ایجاد کننده اسهال در حیوانات و انسان است این انگل انتشار جهانی دارد (۴). بر مبنای خصوصیات اووسیست، محل عفونت، اختصاصیت میزبان و خصوصیات ژنتیکی تاکنون یازده گونه کریپتوسپوریدیوم شناخته شده است این گونه‌ها عبارتند از: موریس درجوندگان، آندرسونی در گاو، پاروم در انسان، گاو و سایر پستانداران، سویس در خوک، هومنیس در انسان، مله اگردیس در پرندگان و انسان، بایلی و گالی در پرندگان، سرپنتیس و ساروفیلوم در مار و مارمولک، مولناری در ماهیان، ورایری در خوکچه هندی، فلیس در گربه و کانیس در سگ (۳، ۴، ۵، ۹، ۱۰، ۱۳،۱۴ و ۱۹). گرچه آلودگی گوسفند به کریپتوسپوریدیوم از سراسر دنیا گزارش شده است ولی برای اولین بار با گزارش اسهال بره‌های ۳-۱ هفته‌ای در سال ۱۹۷۴ از یک مزرعه دامداری در استرالیا آغاز شد به دنبال آن از نقاط مختلف دنیا نیز گزارشات متعددی به چاپ رسید (۴).

در ایران گرچه موارد متعددی از آلودگی‌های گوسفند به این انگل گزارش شده است ولی ماهیت اکثر این مطالعات مبتنی بر تشخیص انگل بر مبنای روش میکروسکوپی و با مشاهده اووسیست در لامهای گسترش مدفوع رنگ‌آمیزی شده با روش ذیل نلسون بوده است. امروزه روشهای مولکولی بعنوان روش‌های رایج و معتبر برای تشخیص آلودگی و تعیین ژنوتیپ شناخته شده‌اند. **Helmy** و همکاران (۲۰۰۴) نتایج روش میکروسکوپی را با آزمایش Nested-PCR در نمونه مدفوع مقایسه نمودند. طبق نتایج آنها روش میکروسکوپی با ۷۸/۵٪ حساسیت و ۱۰۰٪ اختصاصیت در مقایسه با PCR که ۱۰۰٪ حساسیت و ۱۰۰٪ اختصاصیت داشته قرار گرفت که نتیجتاً PCR را حساس‌تر و تفسیر آن را آسان‌تر ولی هزینه‌های آن را بالاتر اعلام نمودند (۸).

تاکنون در مورد ژنوتیپ کریپوسپوریدیوم گوسفندی مطالعات کمی در جهان انجام شده است (۱۲). در ایران نیز کمتر در زمینه تعیین ژنوتیپ انگل بخصوص گونه‌های شایع در گوسفند مطالعه‌ای صورت گرفته است. لذا هدف از انجام این مطالعه تعیین گونه‌های کریپتوسپوریدیوم شایع در گوسفندان تهران بر مبنای تکثیر ژن HSP70با استفاده روش Nested PCR-RFLP است

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

نمونه گیری ازگله های تحت نظارت شبکه دامپزشکی غرب تهران و منطقه شهریار انجام و مجموعاً ۱۴۸۵ نمونه تهیه و در محلول دی کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد در شرایط یخچال نگهداری شدند.

بررسی میکروسکوپی

پس از رقیق سازی مدفوع وتهیه گسترش نازک از آن روی لام و فیکس کردن با متانول، گسترش با استفاده از رنگ امیزی ذیل نلسون اصلاح شده آمیزی گردید سپس لامهای رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی مولکولی

ابتدا با استفاده از روش سوسپانسیون سوکوروز اووسیست ها تغلیظ شدند سپس بر روی اووسیست های بررسی مولکولی انجام شد.

استخراج DNA

استخراج DNA انگل با روش فنل کلروفرم انجام گردید.

واکنش Nested – PCR

برای تکثیر ژن HSP70 از روش Nested-PCR و از دو زوج پرایمرخارجی و داخلی استفاده شد.

پرایمرهای خارجی جهت تکثیر کردن یک قطعه ژن ۱۰۷۷ نوکلئوتیدی HSP70 کریپتوسپوریدیوم گوسفندی:

F: 5`- GCT TAT GGT CTT GAT AAG AAA-3`
R: 5`- ACC TGG CAT ACC TCC TGG CAT -3`

پرایمرهای داخلی جهت تکثیر کردن یک قطعه ژن ۸۰۰ نوکلئوتیدی HSP70 کریپتوسپوریدیوم گوسفندی:

F: 5`- TGG ATT CTT TGT TCG AAG GTA-3`
R: 5- CTC ATA TTG TAC AAG TAA TTT T -3`

واکنش PCR در دو مرحله انجام گردید. در هر دو مرحله PCR به حجم ۳۰µl شامل ۳µl از x PCR ۱۰buffer و مقدار ۲µl از محلولMgCl2 با غلظت ۵۰mM و مقدار۱µl از dNTP با غلظت ۱۰mM و ۰/۲۵µl از Taq polymeras و ۲µl از DNA ژنومی (محصول PCR در مرحله دوم) و ۱µl ازهر یک از پرایمر های F, R که به حجم کلی محلول اضافه می‌شود و بقیه آن تا ۳۰µl با آب مقطر تکمیل می‌شود.

مرحله‌ی واسرشت ابتدایی °C ۹۴ به‌مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی واسرشت°C ۹۴ به‌مدت ۴۵ ثانیه، مرحله‌ی اتصال پرایمرها ۵۷°C به‌مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی طویل شدن زنجیره ۷۲°C به‌مدت ۶۰ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ۳۵ سیکل و در نهایت یک سیکل ۷ دقیقه در °C ۷۲ انجام گرفت. در مرحله دوم برنامه دستگاه مشابه مرحله اول بوده وفقط درجه annealing کاهش یافته و به ۵۰ می‌رسد. پس از انجام PCR دوم ۴ µl محصول PCR داخل چاهک‌های ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار مارکر وزنی ۱۰۰ bp (Fermentas) DNAبارگذاری و در ولتاژ ۸۰ به‌مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از ترانس لومیناتور، باندهای تشکیل شده مشاهده و با مارکر مقایسه شد.

تعیین سکانس انگل

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 سکانس‌های موجود در بانک مورد مقایسه قرار گرفت.

انجام واکنش RFLP

محصول حاصل از تکثیر ژن که دارای باند قوی و خوب بودند توسط آنزیم برشی *Hind II* شرکت فرمنتاز برش زده شدند. برای انجام اینکار در یک واکنش ۳۰ میکرولیتری مقدار ۱۰ µl ازمحصول دوم با ۳µl از بافر آنزیم و ۱۰ واحد از آنزیم مورد نظر و ۱۷/۵ میکرولیتر ازآب مقطر دیوناز مخلوط و مدت ۳ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس با غیر فعال کردن آنزیم در ۶۰ درجه، نمونه‌های برش خورده بر روی ژل اگاروز ۲٪ مورد مطالعه و نتایج با تعیین سکانس مورد تائید قرار گرفت.

نتایج

بررسی میکروسکوپی

از مجموع ۱۴۸۵ نمونه رنگ آمیزی شده با روش اسید فاست، در تعداد ۲۲ مورد اووسیست کریپتوسپوریدیوم تشخیص داده شد.

نتایج Nested – PCR

ژن HSP70 نمونه‌های مثبت گوسفندی با پرایمر های طراحی شده تکثیر شدند و یک باند ۸۰۰ نوکلئوتیدی بر روی ژل آگاروز ظاهر گردید (شکل شماره ۱).

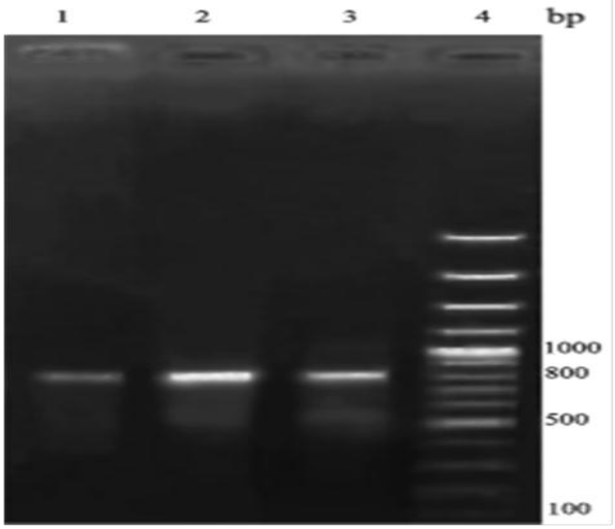
نتایج RFLP

در اثر آنزیم *Hind II*، قطعه تکثیر یافته برش داده شد و باندهای ۶۲۶ و ۱۱۳ نوکلئوتیدی بر روی ژل آگاروز ظاهر گردید (شکل شماره ۲).

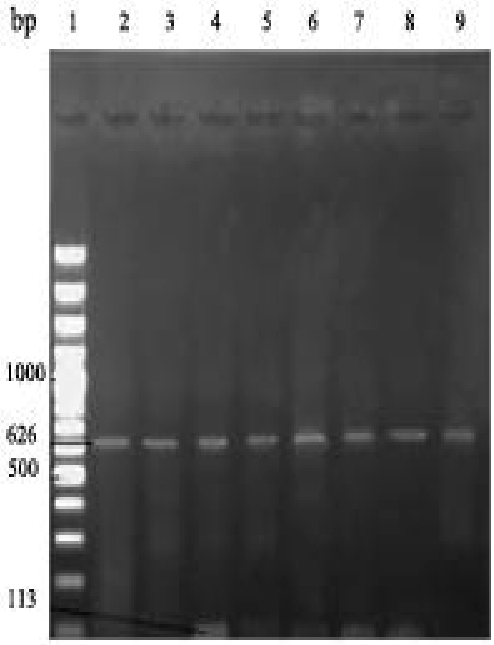
نتایج سکانس

ژنوتایپ بیست ایزوله کریپتوسپوریدیوم جدا شده ازگوسفند در بانک ژن با شماره‌هایEU407239 به ثبت رسانده‌ایم که ۱۰۰ درصد با ایزوله کریپتوسپوریدیوم آندرسونی ثبت شده به شماره [DQ0604260.1] در بانک ژن مشابه است.

و دوایزوله دیگر از نوع کریپتوسپوریدیوم پاروم و متفاوت از سایرین بوده ولی مشابه نمونه ثبت شده در بانک ژن به شماره ثبت [XM_625373] می‌باشد



شکل شماره ۱: قطعه ۸۰۰bp ژن HSP70 نمونه‌های کریپتوسپوریدیوم جدا شده از گوسفند. باندهای ۱، ۲ و ۳ قطعات تکثیر یافته و باند شماره ۴ مارکر 100 bp است.



شکل شماره ۲: قطعه bp ۸۰۰ از ژن HSP70 نمونه‌های کریپتوسپوریدیوم جدا شده ازگوسفند که با آنزیم*Hind II* هضم شده است. باندهای [۹-۲]: نمونه‌های برش خورده (۶۲۶ و ۱۱۳ جفت بازی) و باند شماره ۱ مارکر 100 جفت بازی می‌باشد

DQ060426.1| Cryptosporidium andersoni strain zzca heat shock protein 70-like gene, partial sequence
Length=1968, Score = 1478 bits (800), Expect = 0.0, Identities = 800/800 (100%), Gaps = 0/800 (0%)

```
EU407239 1 TGGATTCTTTGTTCGAAGGTATTGACTACTTTGTATCTATAAGTCGTGCAAGATTTGAGG 60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 831 TGGATTCTTTGTTCGAAGGTATTGACTACTTTGTATCTATAAGTCGTGCAAGATTTGAGG 890

EU407239 61 AACTTTGTTCTGATATTTCCGTGGCACATTAGCTCCAGTAGAGAAGGTATTAAAAGATTC 120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 891 AACTTTGTTCTGATATTTCCGTGGCACATTAGCTCCAGTAGAGAAGGTATTAAAAGATTC 950

EU407239 121 TGGAATGGATAAGAGGTCAGTACCATGATGTTGTATTAGTAGGTGGTTCAACCCGGTATT 180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 951 TGGAATGGATAAGAGGTCAGTACCATGATGTTGTATTAGTAGGTGGTTCAACCCGGTATT 1010

EU407239 181 CCAAAGGTACAACAATTAATTCAAGAATTCTTTAATGGTAAGGAACCATGCAAGGCAATT 240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1011 CCAAAGGTACAACAATTAATTCAAGAATTCTTTAATGGTAAGGAACCATGCAAGGCAATT 1070

EU407239 241 AATCCAGATGAAGCTGTTGCTTATGGTGCTGCAGTTCAAGCAGCAATCTTAAATGGTGAA 300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1071 AATCCAGATGAAGCTGTTGCTTATGGTGCTGCAGTTCAAGCAGCAATCTTAAATGGTGAA 1130

EU407239 301 CAGTCATCAGTAGTGCAAGATTTATTGTTATTGGATGTTGCTCCACTATCTTTAGGTTTG 360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1131 CAGTCATCAGTAGTGCAAGATTTATTGTTATTGGATGTTGCTCCACTATCTTTAGGTTTG 1190

EU407239 361 GAAACAGCAGGTGGTGTTATGACAAAACTTATTGAACGTAATACTACCATTCCAGCAAAG 420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1191 GAAACAGCAGGTGGTGTTATGACAAAACTTATTGAACGTAATACTACCATTCCAGCAAAG 1250

EU407239 421 AAAACTCAAGTATTCACAACATATGCTGATAACCAGAGTGGTGTACTTATTCAAGTATTT 480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1251 AAAACTCAAGTATTCACAACATATGCTGATAACCAGAGTGGTGTACTTATTCAAGTATTT 1310

EU407239 481 GAAGGTGAACGTGCAATGACAAAAGATAATCACTTACTAGGTAAATTCCATTTAGATGGT 540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1311 GAAGGTGAACGTGCAATGACAAAAGATAATCACTTACTAGGTAAATTCCATTTAGATGGT 1370

EU407239 541 ATTCCACCAGCTCCACGTGGTGTACCACAAATTGAAGTAACTTTTGATATTGATGCAAAT 600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1371 ATTCCACCAGCTCCACGTGGTGTACCACAAATTGAAGTAACTTTTGATATTGATGCAAAT 1430

EU407239 601 GGCATTTTAAATGTATCAGCAGTTGACAAGAGTACCGGTAAGAGCAGCAAGATTACGATT 660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1431 GGCATTTTAAATGTATCAGCAGTTGACAAGAGTACCGGTAAGAGCAGCAAGATTACGATT 1490

EU407239 661 ACTAATGATAAAGGTCGTTTATCAAAGGAAGATATTGAACGTATGGTTAATGATGCTGAG 720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1491 ACTAATGATAAAGGTCGTTTATCAAAGGAAGATATTGAACGTATGGTTAATGATGCTGAG 1550

EU407239 721 AAATATAAAAATGAGGATGAACAGAATCGTGAAAAGATTGAAGCTAAGAATTCTTTGGAA 780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1551 AAATATAAAAATGAGGATGAACAGAATCGTGAAAAGATTGAAGCTAAGAATTCTTTGGAA 1610

EU407239 781 AATTACTTGTACAATATGAG 800
             ||||||||||||||||||||
DQ060426.1 1611 AATTACTTGTACAATATGAG 1630
```

شکل شماره ۳: سکونس ایزوله کریپتوسپوریدیوم جدا شده از گوسفند که در بانک ژن با شماره‌های EU407239 به ثبت رسانده شد در مقایسه با ایزوله کریپتوسپوریدیوم آندرسونی ثبت شده به شماره DQ0604260.1 در بانک ژن.

بحث

درمورد ژنوتیپ کریپتوسپوریدوم گوسفند اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد. در ایران نیز مطالعات مختصری بر روی آلودگی گوسفندها به این تک یاخته انجام شده است که از جمله آن‌ها می‌توان از بررسی مقدماتی فراوانی آلودگی کریپتوسپوریدیایی در بره‌ها (۳ ماهه) و گوساله‌ها (۶ ماهه) در شهرستان اسدآباد نام برد (۱) ویا به بررسی مقدماتی میزان آلودگی

کریپتوسپوریدیای گوارشی در بره‌ها (تا ۳ ماه) و گوساله‌ها (تا ۶ ماهه) در شهرستان آمل اشاره کرد (۲). اغلب مطالعات انجام شده در مورد این انگل در گوسفندان کشورمان جنبه اپیدمیولوژیک داشته واهداف آن‌ها با تحقیق حاضرمتفاوت است.

در سالهای گذشته استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی گونه‌های این انگل رایج شده است. تا کنون از تکثیر ژن‌های مختلفی برای این منظور استفاده شده است. که از این میان ژن‌هایی مانند ژن 18S rRNA، ژن دیواره پروتئینی اووسیست(COWP) (۱۱) و ژن شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) را می‌توان نام برد.

گرچه روش مبتنی بر تکثیر ژن ساب یونیت‌های کوچک (SSU rRNA) کریپتوسپوریدیوم که توسط Xiao و همکاران (۱۹۹۹) ارائه شده در تشخیص گونه‌ها و ژنوتیپ های انگل دارای حساسیت فوق العاده ای است (۱۸ و ۲۰). ولی Gobet & Toze در سال ۲۰۰۱ از ژنHSP70 و روش PCR-RFLP برای مطالعه ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم پاروم استفاده نمودند (۶). ایشان با استفاده از پرایمر های طراحی شده توسط Stinear وهمکاران (۱۷) در سال ۱۹۹۶ بر مبنای سکوانس اعلام شده توسط Sulaiman و همکاران (۱۸) در سال ۱۹۹۹ این مطالعه را انجام و اعلام نمودند که این ژن بعلت داشتن هتروژنیستی بالا در سکوانس، برای تعیین ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم پاروم بسیار مناسب است (۶).

در مطالعه حاضر نیز با استفاده از ژن HSP70 برای مطالعه نمونه‌های گوسفندی نتایج جالب توجه حاصل گردید زیرا از میان ۲۲ نمونه گوسفندی پس از برش زدن آنزیم، ۲۰ نمونه باندهایی با اندازه‌های مشابه ایجادکردند. ژنو تا یپ این گروه در بانک ژن با شماره EU407239 به ثبت رسید که ۱۰۰٪ با ایزوله کریپتوسپوریدیوم اندرسونی ثبت شده به شماره [DQ0604260.1] در بانک ژن مشابه است. ولی سکانس ۲ نمونه دیگر که باندهایشان با بقیه متفاوت بود کریپتوسپوریدیوم پاروم شناسایی گردید. این گروه با نمونه ثبت شده با شماره[XM_625373] مشابه می‌باشد.

Cryptosporidium andersoni اولین بار توسط Lindsay و همکاران (۲۰۰۰) توصیف گردید (۹). این گونه که از گاو جداسازی شده بود با روش مولکولی از گونه موریس تفکیک گردید. اووسیست این گونه‌ها از لحاظ مرفولوژی کاملاً مشابه می‌باشند این گونه علاوه بر گاو از شتر دوکوهانه *Camelus bactrianus* و میمون مارموت *Marmota bobac* و ژربیل مغولی *Meriones unguiculatus* (۱۵) و همچنین از یک بیمار مبتلا به HIV نیز گزارش شده است (۷). آلودگی گوسفند به گونه آندرسونی سابقاً در ایران گزارش نشده بود و این اولین گزارش این گونه بر مبنای مطالعه مولکولی در ایران است.

در مطالعه Ryan و همکاران (۲۰۰۵) که بر روی ژن S rRNA۱۸ انجام شد یک مورد آلودگی گوسفندان استرالیایی به *Cryptosporidium andersoni* گزارش شده است (۱۲). گرچه این گونه زونوتیک نیست ولی باعث ایجاد بیماری مزمن و بلند مدت و در نهایت باعث کاهش وزن در گوسفندان می‌گردد (۹). لذا دارای اهیمت زیاد بوده و لازم است مطالعات بیشتری بر روی این گونه در کشور انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی انگل شناسی است که کلیه هزینه‌های آن توسط دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است. نویسندگان از کلیه همکاران بخش انگل شناسی و مسئولین پژوهشی

دانشکده علوم پزشکی بخاطر همکاری و مساعدت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. فصیحی هرندی، م.، فتوحی اردکانی، ر. (۱۳۸۷). کریپتوسپوریدیوم در گوسفند و بز در شهرستان کرمان : اپیدمیولوژی و آنالیز فاکتورهای خطر آلودگی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۳، شماره ۱، صفحات ۳۳-۳۷.

۲. واحدی نوری، ن.، دلیمی ع.، سعادت آملی، م. (۱۳۸۸). بررسی مقدماتی میزان آلودگی کریپتوسپوریدیایی گوارشی در بره‌ها و گوساله‌ها در شهرستان آمل- ایران. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۴، شماره ۲، صفحات ۱۰۱-۱۰۲.

3. Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla A. (2002). *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal of Parasitology* **32**:1007–1021.

4. Fayer, R., Morgan U. M., Upton S. J. (2000). *Cryptosporidium* as a parasitic zoonotic. *International Journal of Parasitology* (Special Issue) **30**:1305–1321.

5. Fayer, R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U.M., Lal A.A., Dubey J.P. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp from domestic dogs. *Journal of Parasitology* **87**:1415–1422.

6. Gobet P, Toze S. (2001). Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *FEMS Microbiology Letters* **12**: 37-41.

7. Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarfati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailliez J.C., Camus D., Dei-Cas E. (2001). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *Journal of Clinical. Microbiology* **39**: 3472–3480.

8. Helmy MM, Rashed LA, el-Garhy MF. (2004). Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates obtained from humans. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* **34**:447-58

9. Lindsay, D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**:91–95.

10. Morgan-Ryan, U., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C.A., Olson M., Lal A., Xiao L. (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**: 433–440.

11. Patel S, Pedraza-Diaz S, McLauchlin J. (1999). The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. *International Journal of Parasitology* **29**:1241-7.

12. Ryan UM, Bath C, Robertson I, Read C, Elliot A, Mcinnes L, Traub R, Besier B (2005) Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:4992–4997

13. Ryan, U.M., Monis P., Enemark H. L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C.A., Xiao L. (2004). *Cryptosporidium suis*. n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology* **90**:769–773.

14. Ryan, U.M., Xiao L., Read C., Sulaiman I.M., Monis P., Lal A.A., Fayer R., Pavlasek I. (2003). A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek 1999, 2001 (Apicomplexa: Cryptospodiidae) from birds. *Journal of Parasitology* **89**:809– 813.

15. Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavla-Sek I. (2003). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:4302–4307.

16- Satoh M, Hikosaka K, Sasaki T, Suyama Y, Yanai T, Ohta M, Nakai Y. (2003). Characteristics of a Novel Type of Bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:691-2.

17. Stinear, T., Matusan, A., Hines, K., Sandery, M. (1996) Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. *Applied and*

Environmental Microbiology **62**:3385-3390.

18. Sulaiman, I.M., Xiao, L. and Lal, A.A. (1999) Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4431-4435.
19. Xiao, L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clinical Microbiology Reviews **17**:72–97.
20. Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, L., Arrowood, M.J., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R., Lal, A.A. (1999) Genetic diversity within *Cryptosporidium* parvum and related Cryptosporidium species. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3386-3391.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 2, 2017

Report of *Cryptosporidium Andersoni* Based on HSP70 Gene Amplification Isolated from Sheep in Tehran

Dalimi, A.*[1], Tahvildar, F.[2], Ghaffarifar, F.[3]

1. Professor, Department of Parasitology, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, P. Box: 14115-331, Tehran, I.R.Iran.
2. Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Shahid Beheshty Medical Sciences University
3. Professor, Department of Parasitology, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, P. Box: 14115-111, Tehran, I.R.Iran.

Received Date: 23 June2015 *Accepted Date: 3October 2017*

Abstract: *Cryptosporidiosis is one of the most important parasitic infection in sheep. The aim of the present study, was to identify species of Cryptosporidium isolated from sheep in Tehran province based on HSP70 gene by Nested PCR-RFLP assay. In the first step 1485 faecal samples were collected form sheep in Tehran province then the samples were examined for Cryptosporidium detection using modified acid fast staining. In the second step DNA of the positive samples were extracted, then gene of HSP70 was amplified by Nested-PCR in order to differentiate between species. The PCR product was digested by Hind II restriction enzyme. According to the result, 22 positive sheep samples were detected by modified acid fast method. The results were confirmed by molecular technique. The 800 bp fragment of HSP70 digested by restriction enzymes. Twenty samples showed similar band on 2.5% agarose gel whereas 2 samples demonstrated different pattern. Based on sequence results, the first and second groups were identified as Cryptosporidium andersoni and C.parvum respectively. Generally, in spite of Cryptosporidium parvum introduced as the major agent of cryptosporidiosis in sheep but in our study Cryptosporidium andersoni was dominant.*

Keywords: *Cryptosporidium andersoni, parvum, HSP70 gene, Nested-PCR, sheep.*

**Corresponding author: Dalimi, A.*
Address: Department of Parasitology, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, P. Box: 14115-331, Tehran, I.R.Iran. Tel: +989123047931
Email: dalimi_a@modares.ac.ir