

# 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<sup>۱</sup>، بهار شمشادی\*<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲</sup>

### چکیده

گونه‌های کریپتوسپوریدیوم به شاخه اپی کمپلکس‌ها تعلق دارد و پرتوزوهای 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 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) در گوساله‌های شهرستان شاهرود انجام شد. ۲۵۶ نمونه‌ی مدفوع از گوساله‌های زیر ۲ ماه جمع‌آوری شد و نمونه‌های مثبت با استفاده از روش ذیل-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 (۱۰/۵۴٪) از نمونه‌های مورد بررسی مثبت بودند. نتایج برای روش Nested PCR نشان داد که از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، به ترتیب ۹۲/۵۹٪ و ۷/۴۱٪ به ترتیب برای کریپتوسپوریدیوم پارووم و کریپتوسپوریدیوم اندرسونی مثبت بودند. نتایج نشان داد که ۲۵ نمونه تحت تأثیر آنزیم VSP در نواحی ۱۰۴ و ۶۲۸ جفت باز قرار گرفتند، که نشان دهنده‌ی که تأیید کننده‌ی زیرگونه‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم گاوی و زیرگونه‌ی ژن A بودند. نمونه‌های تحت تأثیر آنزیم Ssp I قرار گرفتند و نتایج باندهایی را در ۳۸۵ و ۴۴۸ جفت باز نشان داد که نشان دهنده‌ی زیر گونه‌های *C. muris/C. andersoni* بودند. نتایج توسط آنزیم *dde* باندهایی را در ۱۵۶، ۱۸۶ و ۲۲۴ 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 عمدتاً 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 نامعمول 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 (۴). مهم‌ترین نشانه‌های بالینی در گوساله‌ها، افسردگی، بی‌اشتهایی، 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 گوساله‌های آلوده به‌عنوان یک منبع بالقوه آلودگی در انسان مورد توجه می‌باشد، این انگل در افراد سالم معمولاً مشکل خاصی ایجاد نمی‌کند و خود محدود شونده است (۶). دو گونه از جنس کریپتوسپوریدیوم با نام‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم 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

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 (۱۰ و ۱۱). بر طبق جست و جوی انجام شده تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی تشخیص و شناسایی گونه‌های 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 روش کار

### 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 گوساله‌ها یا از لایه ی بالایی مدفوع تازه ریخته شده نمونه‌ها اخذ شد و به ظروف نمونه‌گیری 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

کریپتوسپوریدیوم پارووم 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 پارووم بین کشورها و مطالعات متفاوت است. به‌عنوان مثال، نرخ شیوع کریپتوسپوریدیوم پارووم قبل از شیر گرفتن در گوساله‌های در محدوده انگلستان از ۲۸ تا ۸۰ درصد گزارش شده است (۸). مطالعات بعدی نیز به کرات مویید این مطلب بودند و بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که در گوساله‌های شیرخوار بیشترین میزان ابتلا با کریپتوسپوریدیوم پارووم 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 می‌شوند بسیار حساس‌تر هستند و اطلاعات بسیار بیشتری در مورد این انگل، همانند گونه‌ها و ژنوتیپ ارائه می‌دهند (۹). گونه‌ها را می‌توان با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه یا Multiplex polymerase chain reaction و پلی-مورفیسیم 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 مورفیسیم‌ها 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

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 داخلی‌تری 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 Nested PCR

برای انجام مرحله اول PCR از جفت پرایمرهای 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 Nested PCR

در این مرحله همه شرایط مانند مخلوط واکنش‌گرها و برنامه زمانی و دمایی مطابقت با 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 به عنوان 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 می‌کند و شامل *C. parvum*، *C. C. Andersoni*، *C. ryanae*،

سپس با استفاده از اسید سولفوریک ۵٪ برای ۳۰ ثانیه دی‌کلریزه 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 اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم مورد بررسی قرار گرفت. در این رنگ آمیزی اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم به رنگ قرمز براق و زمینه به رنگ آبی در آمد.

تکنیک گرادینانت منقطع ساکارز برای جداسازی و تخلیص اولیه اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم براساس شناورسازی نمونه درمحلول قندی استفاده شد، که با مخلوط نمودن ۳۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۵۰۰ گرم ساکارز و ۹ میلی‌لیتر فنل محلول شیترا (Scheather) انجام شد.

#### استخراج DNA

برای استخراج DNA اووسیست 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 گونه‌های 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،

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 CCCATTTCCTCGAAACAGGA	1370	Genus-specific external
AL1598 (IF) AL3032 (IR)	GAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	840	Genus-specific internal
CaF AL3032 (IR)	GCAAATTACCCAATCCTGAC AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	625	<i>C. Andersoni</i>
Cr AL 3032 (IR)	TGTTAATTTTTATATCAATRCTACGG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	415	<i>C. ryanae</i>
Cph F AL3032 (IR)	AGAGTGCTTAAAGCAGGCATA AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	305	<i>C. parvum</i>
CbF AL3032 (IR)	CTTCTTATTCCTTCTAGAATAAAAAATG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	241	<i>C. bovis</i>

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

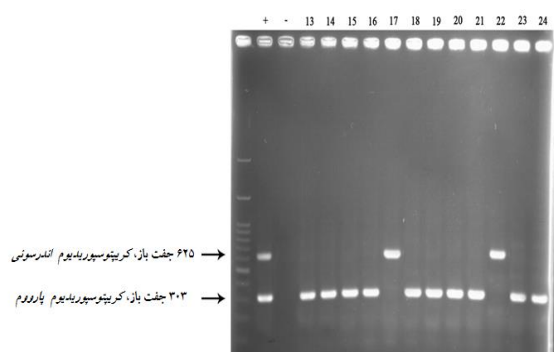
خارجی و پرایمرهای داخلی در جدول ۲ ذکر شده است. روش انجام واکنش و ترکیب واکنشگرها برای هر دو مرحله اول و دوم برابر با روش Nested PCR در مرحله قبلی بود. مرحله‌ی واسرشت ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله‌ی اتصال پرایمرها ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی طولیل شدن زنجیره ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ۳۵ سیکل و در نهایت یک سیکل ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محصولات DNA بدست آمده از Nested PCR دوم که دارای باند قوی و خوب بودند، توسط سه آنزیم برشی *SspI* و *VspI* و *DdeI* شرکت فرمتاز برش داده شدند و محصولات آنها در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. گونه‌های کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و کریپتوسپوریدیوم موریس بعد از RFLP بوسیله آنزیم-

*bovis* بودند. پس از هر مرحله PCR، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ همراه با سایبر سیف (اینیترورژن cat.NO S33102 الکتروفورز شده و با ژل داکيومنت باندهای مربوطه در کنار سایزمارکر DNA یا Ladder مشاهده شدند. در تمام واکنش‌ها از سویه‌های 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 rRNA انجام 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 پرایمرهای

درصد نمونه‌ها با کریپتوسپورییدیوم اندرسونی مثبت بودند (نگاره ۱).

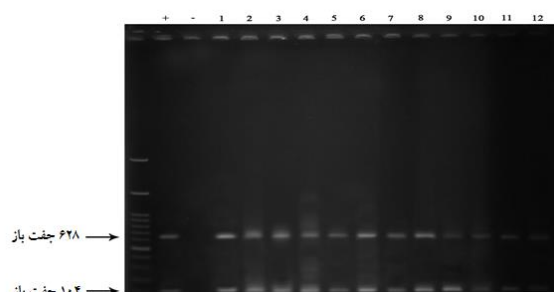


نگاره ۱ نتایج Nested-PCR. چاهک اول (مارکر)، چاهک + (کنترل مثبت)، چاهک - (کنترل منفی). چاهک‌های ۱۶-۱۳ و ۲۱-۱۸ و ۲۴-۲۳ مثبت برای کریپتوسپورییدیوم پارووم و چاهک‌های ۱۷ و ۲۲ مثبت برای کریپتوسپورییدیوم اندرسونی مثبت بودند.

بررسی وقوع آلودگی و تعیین گونه‌ها در نمونه‌های مورد

بررسی با استفاده از روش RFLP

نتایج باندهایی را برای ۲۵ نمونه تحت تأثیر آنزیم VSP را در ۱۰۴ و ۶۲۸ نشان داد که نشان دهنده‌ی کریپتوسپورییدیوم پارووم 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).



نگاره ۲ نتایج برای RFLP و با استفاده از آنزیم VSP. چاهک اول (مارکر)، چاهک + (کنترل مثبت)، چاهک - (کنترل منفی). چاهک‌های ۱۲-۱ مثبت برای کریپتوسپورییدیوم پارووم genotype A gene بودند.

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 فوق‌الذکر را نشان دادند تحت تأثیر آنزیم Dde I قرار گرفتند تا دقیقاً تعیین گونه شوند. نمونه‌هایی که تحت تأثیر آنزیم I Dde قرار گرفتند، همانند محصولات RFLP با آنزیم‌های I Ssp و I Vsp، در ژل ۲٪ الکتروفورز می‌شدند. آنزیم SspI جهت تعیین گونه‌ها و VspI جهت تعیین ژنوتیپ‌های گاوی و انسانی کریپتوسپورییدیوم پارووم مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴).

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 ۲۵۶ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۲۷ نمونه مثبت بودند، به عبارتی دیگر میزان وقوع آلودگی در نمونه‌های مورد بررسی ۱۰/۵۴ درصد بود.

بررسی وقوع آلودگی و تعیین گونه‌ها در نمونه‌های مورد

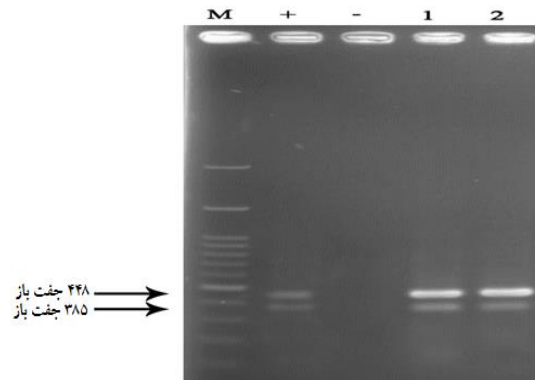
بررسی با استفاده از روش Nested PCR

نتایج نشان داد که از ۲۷ نمونه‌ی مورد بررسی دو نمونه برای گونه‌ی کریپتوسپورییدیوم اندرسونی با طول قطعات ۶۲۵ جفت باز مثبت و ۲۵ نمونه برای کریپتوسپورییدیوم پارووم با طول قطعات ۳۰۳ جفت باز مثبت بودند. دیگر گونه‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه یافت نشدند. بنابراین، ۹۲/۵۹ درصد نمونه‌های مورد با کریپتوسپورییدیوم پارووم و تنها ۷/۴۱

## بحث

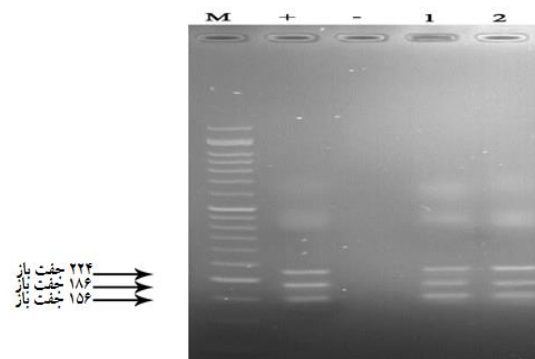
امروزه بررسی‌ها نشان داده است که عوامل تک سلولی به-عنوان از مهمترین علل دخیل در بروز اسهال در گوساله‌ها هستند که هر ساله آسیب بسیاری را به صنعت دامداری تحمیل مینمایند. داده‌ها نشان داده است که مهم‌ترین تک یاخته ایجاد کننده اسهال در گوساله‌ها، کریپتوسپوریدیوم‌ها می‌باشند. بنا براین شناسایی و تشخیص دقیق این ارگانسیم‌ها 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 ۲۵۶ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۲۷ نمونه به عنوان کریپتوسپوریدیوم شناسایی شدند، به عبارتی دیگر میزان وقوع آلودگی در نمونه‌های مورد بررسی ۱۰/۵۴ درصد بود. نتایج نشان داد که از ۲۷ نمونه‌ی مورد بررسی دو نمونه برای گونه‌ی *C. Andersoi* با طول قطعات ۶۲۵ 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 دامداری‌های اطراف شهرستان نیشابور اعم از سنتی و صنعتی اخذ شد. میزان وقوع آلودگی به این تک یاخته در نمونه‌های مورد بررسی ۱۱/۸۰٪ بود. این نتایج نشان می‌دهد که میزان شیوع

نگاره ۳ باندها را تحت تأثیر آنزیم ssp نشان می‌دهد، همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد، باندهایی ۴۴۸ و ۳۸۵ 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 ۱۵۶، ۱۸۶ و ۲۲۴ نشان داد که نشان دهنده‌ی زیر گونه‌ی *C. muris* بود (نگاره ۴).



نگاره ۴: 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.

تاکنون دو گونه از جنس کریپتوسپوریدیوم با نام‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم و کریپتوسپوریدیوم اندرسونی شایع‌ترین گونه‌های شناسایی شده در گاوها و گوساله‌ها بوده‌اند. گونه اول یعنی کریپتوسپوریدیوم پارووم شیوع بیش‌تری داشته و در دام‌های شیرخوار بیش‌تر با اسهال همراه است، اما کریپتوسپوریدیوم اندرسونی در گوساله‌های 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 ۹۴۰ 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 الکتروفوریتیک مشابه بر روی ژل آگاروز ۲٪ بود که تأیید کننده گونه کریپتوسپوریدیوم پارووم گاوی بود ولی ۲ نمونه انسانی دارای باندهای متفاوت بودند که تعیین سکانس شد و تمایزشان با نمونه‌های گاوی و انسانی به دست آمده تأیید 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 پارووم ژنوتیپ گاوی و همچنین یکی از نمونه‌ها با کریپتوسپوریدیوم ژنوتیپ خوک (*Cryptosporidium Pig genotype*) بود. روش‌های مولکولی بدلیل این‌که علاوه بر تشخیص کریپتوسپوریدیوم، قادر به

کریپتوسپوریدیوز در شهرهای این نزدیک به هم بوده است. مغایر با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، چنگیزی و همکاران (۱۶) 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 جمع‌آوری شد تا علل اسهال از جمله کریپتوسپوریدیوزیس در گاوداری‌های شهرستان سمنان بررسی شود. میزان شیوع کلی کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های اخذ شده ۱۷/۵٪ و در گوساله‌های مبتلا به اسهال، تعداد نمونه‌های 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 به علت نژاد گوساله‌ها، شرایط بهداشتی، شرایط آب و هوایی و ... بوده باشد.

براساس نتایج به دست آمده، ۹۲/۵۹ درصد نمونه‌های مورد باکریپتوسپوریدیوم پارووم و تنها ۷/۴۱ 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 پارووم، کریپتوسپوریدیوم بوویس، و کریپتوسپوریدیوم ریان در گوساله‌های بیش از سه ماه دیده شد (۱۷). این مطالعه نشان داد که گونه‌ی کریپتوسپوریدیوم پارووم بیشترین شیوع را داشت که همسو با نتایج این مطالعه می‌باشد. بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان بیان نمود که گونه‌های اندرسونی و پارووم بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند. در توضیح این نتایج می‌توان بیان نمود که

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, Puttalakshamma 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.

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

شیوع بیشتر گونه‌ی پارووم 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 در حد انتظارات است

#### نتیجه گیری

با توجه نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که گرچه گونه پارووم 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 کریپتوسپورییدیوم 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. 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.



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.

