DOI: 10.22092/VJ.2020.342110.1694
شماره ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی آلودگی به تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم در گاوداری‌های صنعتی استان خراسان شمالی

• **علیرضا صدربزاز (نویسنده مسئول)**

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، مشهد،ایران

• **حامد حسینیون**

دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

• **محمدرضا یوسفی**

دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

• **وحید نعمان**

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازي رازي ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۰۶-۱۲-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۱۰-۰۲-۱۳۹۹

Email: a.sadr@rvsri.ac.ir

چکیده

کریپتوسپوریدیوم از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای تک‌یاخته‌ای روده‌ای در پستانداران به ویژه حیوانات اهلی و انسان است. این انگل یکی از عوامل اصلی بیماری و مرگ و میر در دام‌ها به ویژه دام‌های جوان می‌باشد. به‌منظورتعیین میزان شیوع انگل کوکسیدیائی کریپتوسپوریدیوم در گوساله‌های زیر ۶ ماه و بالای ۶ ماه استان خراسان شمالی در سال ۹۷-۱۳۹۶، در یک مطالعه Cross sectional تعداد ۱۶۰ نمونه مدفوع بصورت تصادفی از سه گاوداری تهیه گردید. نمونه‌های مدفوع مستقیما از رکتوم گوساله‌ها اخذ و بعد از تهیه گسترش به روش ذیل نیلسون اصلاح‌یافته رنگ‌آمیزی شده و مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. تعداد ۹ نمونه (۵,۶ درصد) از ۱۶۰ نمونه تهیه شده واجد اووسیست کریپتوسپوریدیوم بودند.پس از استخراج DNA از نمونه‌های مثبت مشاهده شده، آزمایش Nested PCR بر اساس تکثیر قطعه ژن SrRNA ۱۸ انجام گردید که از نظر مولکولی مورد تایید قرار گرفتند. ارتباط بین میزان آلودگی و سن از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p-value=۰,۱۶)، اگرچه بیشترین میزان شیوع در گوساله‌های بالای ۶ ماه مشاهده گردید. بین آلودگی و جنس ارتباط معنی‌دار وجود نداشت (p-value=۰,۸۵). ضمنا میزان آلودگی در گاوهای اسهالی و غیراسهالی از نظر آماری معنی‌دار نبود. کریپتوسپوریدیوم به عنوان یکی از عوامل عفونت‌های روده‌ای در گاوهای استان خراسان شمالی تعیین گردید.

کلمات کلیدی: کریپتوسپوریدیوم، گاو، اسهال، Nested PCR، استان خراسان شمالی

● Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 62-69

Evaluation of *Cryptosporidium spp.* infection in cattle in industrial farms in North Khorasan Province, Iran

By: Sadrebazzaz, A., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. Hoseinioun, H., Islamic Azad University, Babol Branch, Iran. Yousefi, M., Veterinary medicine faculty, Islamic Azad University, Babol Branch, Iran. and Noaman, V., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2020-02-25 **Accepted: 2020-04-29**

Emali: a.sadr@rvsri.ac.ir

Cryptosporidium is one of the main enteric protozoan pathogens of mammals, notably domestic animals and human. This protozoan parasite is known as one of the leading causes of livestock mortality, mostly young animals. In order to determine prevalence of coccidian *Cryptosporidium* infection in North Khorasan province, a cross-sectional survey was conducted on Cattle younger than six months and Cattle aged more than six months between 2017 and 2018 years. A total of 160 rectal fecal samples were randomly collected from three dairy farms and were evaluated microscopically after modified ziehl neelsen staining. Of the 160 samples examined, only nine (5.6%) were positive for Cryptosporidium oocysts. Positive samples, after DNA extraction, were further tested using nested PCR targeting the 18S rRNA gene. All positive sample were confirmed by Nested PCR Although the highest prevalence rate was observed in calves aged more than six months, neither age(p-value=0.16) nor sex (p-value=0.85) had significant relationship with prevalence of *Cryptosporidium* in Cattle. Moreover, no differences were found in prevalence rate of Cryptosporidium between calves with or without diarrhea (p-value=0.78). It is concluded that *Cryptosporidium* has a role in the intestinal infection of cattle in North Khorasan province, Iran.

Key words: Cryptosporidium spp., Cattle, North Khorasan province, Diarrhea, Nested PCR

مقدمه

تک‌یاخته‌ها در تمام نقاط سطح زمین یافت می‌شوند. آن‌ها در دریاها، اقیانوس‌ها و در تمام طبقات آب حتی در کف دریاها وجود دارند. همچنین در آب‌های شیرین و خاک زندگی می‌کنند (۳). کریپتوسپوریدیوم (*Cryptosporidium*) انگل تک‌یاخته‌ای داخل سلولی شاخه آپی کمپلکسا *(Apicomplexa)* می‌باشد. این انگل باعث ایجاد یک گاسترو آنتریت حاد و خود محدود شونده در افراد سالم (از نظر دستگاه ایمنی) و یک عفونت پایدار و کشنده در افراد با نقص دستگاه ایمنی در سراسر جهان می‌شود. بر اساس تحقیقات انجام شده، سالانه میلیون‌ها مورد از بیماری در کشورهای مختلف با سطوح بهداشتی غیر همسان رخ می‌دهد. در تعداد زیادی از آزمایشگاه‌ها این انگل یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای روده‌ای گزارش شده در انسان است (۱۳). در دام‌ها، عفونت باعث بیماری و گاهی اوقات مرگ و میر شده، لذا از نظر بالینی و اقتصادی دارای اهمیت است (۴, ۵, ۱۳).

کریپتوسپوریدیوزیس (Cryptosporidiosis) به عنوان تهدیدی برای بیماران مبتلا به ایدز و دیگر افراد مبتلا به نقص دستگاه ایمنی مطرح بوده و نسبت عفونت در سطح جهان کمتر از یک درصد تا بیشتر از ۵۰ درصد است (۴, ۷). سیمای اپیدمیولوژیک در افراد با دستگاه ایمنی کارا و افراد با نقص دستگاه ایمنی با هم متفاوت است (۹).

جنس کریپتوسپوریدیوم دارای گونه‌های مختلفی می‌باشد که در شمار زیادی از حیوانات اهلی و انسان یافت شده‌اند (۱۱). این تک‌یاخته با شیوع اسهال در گوساله‌ها، بره‌ها، بچه خوک‌ها، کره اسب‌ها، توله سگ و بچه گربه‌ها و جوجه بوقلمون‌ها همراه بوده است. این انگل از این دیدگاه شایان توجه است که بر خلاف دیگر اعضاء خانواده‌های آیمری ئیده به درون سیتوپلاسم سلول‌های میزبان نمی‌رود و نسبت به میزبان اختصاصی نیست، به همین علت باعث می‌شود آلودگی متقاطع بین دام‌های اهلی و حیوانات آزمایشگاهی و انسان رخ دهد (۱۳).

با عنایت به فقدان اطلاعات مستند در خصوص شیوع آلودگی کریپتوسپوریدیوم در گاوهای استان خراسان شمالی لذا برای اولین بار سعی در شناسایی این انگل گرفته شد. امید است که ارائه این تحقیق به شناخت هر چه بیشتر انگل‌های جدا شده از گاوهای اسهالی و غیراسهالی استان خراسان شمالی کمک نماید تا بتوان با این شناخت، قدم‌های موثرتری در پیشگیری و درمان آلودگی برداشت (۲).

مواد و روش کار

موقعیت جغرافیایی نمونه‌گیری

استان خراسان شمالی با مساحتی حدود ۲۸۱۷۹ کیلومتر مربع از ۸ شهرستان بجنورد (مرکز استان)، شیروان، اسفراین، مانه و سملقان، راز وجرگلان، جاجرم، فاروج و گرمه تشکیل شده‌است. این استان از نظر موقعیت جغرافیایی؛ از شمال با کشور ترکمنستان، از شرق و جنوب با استان خراسان رضوی، از جنوب غربی با استان سمنان و از غرب با استان

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای PCR اولیه.

پرایمر	توالی پرایمر	Tm
Forward۱	۵ -TTCTAGCTAATACATGCGCG - ۳	۵۳,۲
Reverse۱	۳ - CCCATTTCCTTCGAAACAGGA - ۵	۵۷,۲

جدول ۲- برنامه دمایی PCR اولیه.

	مرحله	دما	زمان
۱	Initial Denaturation	۹۴	۳ ′
۳۵	Denaturation	۹۴	۴۵ ′
	Annealing	۵۵	۴۵ ′
	Extension	۷۲	۱ ′
۱	Final Extension	۷۲	۷ ′

جدول ۳- مشخصات پرایمرهای PCR ثانویه.

پرایمر	توالی پرایمر	Tm
F۲	۵ -GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG- ۳	۵۶,۹
R۲	۳-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGT- ۵	۵۸,۴

جدول۴- برنامه دمایی PCR ثانویه.

	مرحله	دما	زمان
۱	Initial Denaturation	۹۴	۳ ′
۳۵	Denaturation	۹۴	۴۵ ′
	Annealing	۵۸	۴۵ ′
	Extension	۷۲	۱ ′
۱	Final Extension	۷۲	۷ ′

گلستان هم‌مرز است. تعداد گاو و گوساله در استان خراسان شمالی طبق اطلاعات منتشره در سایت سازمان مدیریت و برنامه ریزی آمار (www.khorasansh.mporg.ir) در سال ۱۳۹۴ به تعداد ۴۳۸۷۰ راس ثبت شده است.

نمونه‌گیری

نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق، تعداد۱۶۰ نمونه مدفوع از گوساله‌های زیر ۶ ماه و گاوهای بالای ۶ ماه بطور تصادفی و بر اساس میزان آلودگی در استان های مجاور از سه گاوداری شهرستان های بجنورد، شیروان و مانه و سملقان در استان خراسان شمالی بودند. این نمونه‌ها تحت شرایط مناسب با استفاده از دستکش یکبار مصرف اخذ گردید و نمونه‌ها در ظروف درب‌دار پلاستیکی جهت آزمایش به موسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد منتقل گردید. پس از تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی، نمونه‌های مدفوع در فریزر در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

رنگ‌آمیزی

جهت شناسایی اووسیست‌ها از روش رنگ‌آمیزی ذیل نلسون تغییر یافته به روش سرد استفاده گردید (۳). در این رنگ‌آمیزی اووسیست‌ها به رنگ قرمز روشن در یک زمینه سبز_آبی قرار می‌گیرند.

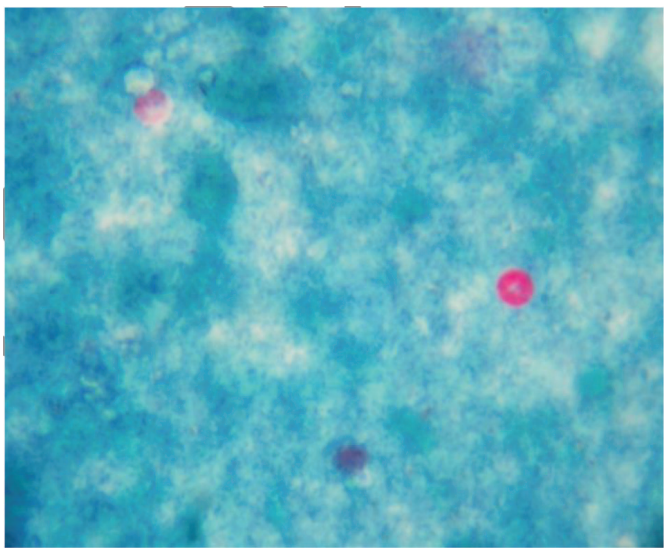
روش رنگ‌آمیزی اسید فست اصلاح شده ذیل نلسون تغییریافته سرد

ابتدا گسترش نازکی از نمونه‌های مدفوع بر روی لام تهیه شده و پس از قرار گرفتن در مجاورت هوا و خشک شدن مراحل رنگ‌آمیزی بصورت زیر انجام گرفت. بعد از خشک‌شدن گسترش روی لام، جهت تثبیت نمونه از متانول استفاده گردید. در مرحله بعد از کربول فوشین ۱ ٪ استفاده گردید و لام کاملا در محلول کربول فوشین به مدت ۲۰-۱۵ به صورت غوطه‌ور قرار گرفت.

بعد از این مرحله لام‌ها را خارج کرده با آب شستشو می‌دهیم. سپس روی لام‌ها اسید الکل ریخته شد بطوری که رنگ‌های خارج سلولی کربول فوشین کاملا شسته گردد. رنگ کربول فوشین که به داخل اووسیست نفوذ کرده از شسته شدن توسط الکل محفوظ می‌ماند. بعد از شستشو با آب از رنگ مالاشیت گرین ۰٫۴٪ حدود ۱ تا ۲ دقیقه استفاده شد و سپس با آب شستشو و در مجاورت هوا خشک گردید. بعد از مرحله رنگ‌آمیزی می‌توان اووسیست‌ها را با عدسی ۴۰ و یا ۱۰۰ مشاهده کرد. در صورت وجود، اووسیست‌ها به رنگ قرمز در زمینه سبز قابل مشاهده هستند. کلیه نمونه‌های مثبت و منفی درفریزر ۲۰- نگهداری شدند.

استخراج DNA
freeze & Thawing

برای استخراج DNA، ابتدا باید دیواره اووسیست، شکسته گردد. به دلیل اینکه دیواره اووسیست کریپتوسپوریدیوم بسیار سخت و محکم می‌باشد، لذا از روش (freeze & thawing) استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا یک گرم نمونه مدفوع را داخل لوله آزمایش ریخته، سپس مقدار کمی حدود ۵ میلی‌لیتر محلول Pbs به آن اضافه کرده و کاملا تکان داده شد. آنگاه از گاز استریل عبور داده تا کاه و ذرات مدفوع از نمونه جدا شود. سپس لوله آزمایش حاوی نمونه صاف شده، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحله مایع رویی را دور ریخته و به رسوب آن مقداری Pbs اضافه کرده و به کرایوتیوب ۱/۵ سی‌سی



شکل ۱- اووسیست کریپتوسپوریدیوم **بعد از رنگ آمیزي ذیل نیلسون تغییریافته ، بزرگ نمایی ۱۰۰ X.**

انتقال داده شد. با استفاده از میله‌ای بلند و نخ کرایوتیوب حاوی نمونه را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در تانک ازت قرار داده تا نمونه کاملا فریز گردد. سپس کرایوتیوب را خارج کرده و فورا، به مدت ۳ دقیقه داخل ظرف حاوی آب جوش قرار داده شد. این عمل حدود ۳ تا ۵ بار انجام گردید. جهت استخراج DNA بعد از مرحله Freeze & Thawing، از کیت (MN) Machery - Nagel® و ROCH® استفاده شد.

انجام PCR اولیه

مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR اولیه به شرح جدول زیر بر اساس تحقیق Xiao و همکاران در سال ۱۹۹۹ طراحی شده است (۱۷). مراحل PCR اولیه، دما و مدت زمان آنها در جدول زیر خلاصه شده است.

تهیه ژل آگارز و الکتروفورز محصولات PCR اولیه

پس از تهیه ژل آگارز ۱,۵ درصد در بافر TBE (x۰,۵) و افزودن سایر سیف اقدام به بارگذاری محصول PCR گردید. برای مشخص شدن اندازه باند DNA از مارکری با مشخصه (۱۰۰ bp plus) استفاده گردید.

PCR ثانویه

پس از انجام PCR اولیه از محصول آن به عنوان الگو در PCR ثانویه استفاده گردید. در این مرحله از جفت پرایمر دوم ۲F و ۲R استفاده شد (۱۷). مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR ثانویه در جدول زیر مشاهده می‌شود.

مراحل PCR ثانویه، دما و مدت زمان آنها در جدول زیر مشاهده می‌شود. پس از انجام PCR ثانویه همانند PCR اولیه، ژل آگارز ۱,۵ درصد تهیه و محصول PCR ثانویه در چاهک‌ها بارگذاری شدند. این بار نیز از مارکر ۱۰۰ pb plus استفاده گردید.

نتایج

از ۱۶۰ نمونه منتقله به آزمایشگاه پس از تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی ذیل نلسون تغییر یافته تعداد ۹ نمونه از نظر اووسیست کریپتوسپوریدیوم مثبت بودند. اووسیست‌ها با لنز ۱۰۰x میکروسکوپ مشاهده گردید.

جدول ۵- میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم **در جنس نر و ماده.**

نوع حیوان	مثبت	منفی	مجموع	درصدآلودگی
نر	۱	۱۴	۱۵	۶,۶
ماده	۸	۱۳۷	۱۴۵	۵,۵
مجموع	۹	۱۵۱	۱۶۰	۵,۶

جدول ۶- میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم **درگاوهای زیر ۶ ماه و بالای ۶ ماه.**

نوع حیوان	مثبت	منفی	مجموع	درصدآلودگی
زیر ۶ ماه	۱	۴۹	۵۰	۲
بالای ۶ ماه	۸	۱۰۲	۱۱۰	۷,۲
مجموع	۹	۱۵۱	۱۶۰	۵,۶

جدول ۷- میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم **درگاوهای اسهالی و غیراسهالی.**

نوع حیوان	مثبت	منفی	مجموع	درصدآلودگی
اسهالی	۲	۲۸	۳۰	۶,۶
غیر اسهالی	۷	۱۲۳	۱۳۰	۵,۳
مجموع	۹	۱۵۱	۱۶۰	۵,۶

اندازه اووسیست‌ها ۴-۶ میکرون تخمین زده شد. این اووسیست‌ها با رنگ قرمز در زمینه سبز آبی قابل مشاهده بودند.

میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در جنس نر و ماده در جدول زیر قابل مشاهده است.

از تعداد ۱۵ راس گاو نر تعداد یک نمونه مثبت و از تعداد ۱۴۵ راس گاو ماده تعداد ۸ نمونه مثبت گردید.

میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در گاوهای زیر ۶ ماه و بالای ۶ ماه در جدول زیر قابل مشاهده است.

از تعداد ۵۰ نمونه گاو زیر ۶ ماه ۱ نمونه مثبت و از ۱۱۰ نمونه گاو بالای ۶ ماه ۸ نمونه مثبت شدند.

میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در گاوهای اسهالی و غیراسهالی در جدول زیر قابل مشاهده است.

از تعداد ۳۰ نمونه گاو اسهالی ۲ نمونه مثبت و از تعداد ۱۳۰ گاو غیراسهالی ۷ نمونه مثبت گردید.

آنالیز آماري آلودگي کریپتوسپوریدیوم در گروه‌های مختلف

از ۱۶۰ نمونه مورد بررسی، ۹ نمونه (۵,۶ درصد) مثبت ارزیابي شد. با استفاده از آزمون کاي اسکوار p value ≤۰/۰۵ میزان آلودگی در گروه‌های سنی زیر ۶ ماه و بالای ۶ ماه و گروه با علائم اسهال و بدون علامت و همچنین نر با ماده اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

نتایج تکثیر قطعه حاصل از PCR اولیه

با استفاده از پرایمرهای F۱ و R۱ به تکثیر قسمتی از ژن SSU-rRNA با استفاده از روش PCR پرداختیم. حاصل ازآن قطعه‌ای به اندازه bp۱۳۲۵ بود. در شکل بالا، ۲ نمونه باند ۱۳۲۵ جفت باز معادل باند مثبت را نشان می‌دهند.

نتایج حاصل از PCR۲

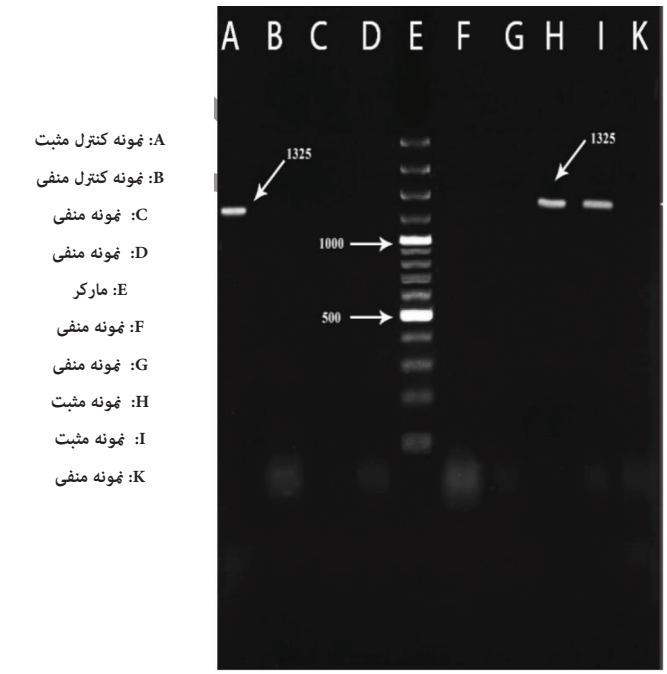
محصول PCR اولیه، جهت PCR ثانویه به کار گرفت که نتیجه حاصل قطعه‌ای به اندازه ۸۳۰ جفت باز بود. از مجموع نه نمونه PCR اولیه، از کلیه نمونه‌ها باند۸۳۰ بدست آمد. شکل زیر نتیجه حاصل از PCR ثانویه را نشان می‌دهند.

بحث

کریپتوسپوریدیوم انگل روده‌ای کوکسیدیایی می‌باشد که معمولا به عنوان یک عامل ایجاد اسهال در گوساله‌های تازه به دنیا آمده شیری در اغلب نقاط جهان شناخته شده است. کریپتوسپوریدیوزیس اغلب بیشتر گوساله‌های زیریک ماه را تحت تاثیر قرار داده و ممکن است آنها تعداد زیادی اووسیست از طریق مدفوع دفع نمایند. در حالی که عفونت معمولا بصورت خود محدود است. اما گزارشاتی از کشنده‌بودن آن وجود دارد (۱۳).

عوامل اپیدمیولوژیک متعددی از قبیل جنس، سن عوامل اقلیمی و جغرافیایی، تعداد دام در گله و شرایط نگهداری دام‌ها در میزان شیوع کریپتوسپوریدیوزیس نقش موثری دارند (۲، ۱۱).

شایع‌ترین علایم کلینیکی اسهال است که معمولا ۱۳-۲ روز طول کشیده



A: نمونه کنترل مثبت
B: نمونه کنترل منفی
C: نمونه منفی
D: نمونه منفی
E: مارکر
F: نمونه منفی
G: نمونه منفی
H: نمونه مثبت
I: نمونه مثبت
K: نمونه منفی

شکل۲- تصویر ژل الکتروفورز ژن ۱۸S کریپتوسپوریدیوم پس از PCR اولیه.

و بی‌اشتهایی، کم‌آبی، افسردگی، اختلال رشد و کاهش مصرف شیر همراه است.

هر چند کریپتوسپوریدیوم برای اولین بار در کشور آمریکا مورد توجه قرار گرفته ولی امروزه حضور این تک‌یاخته در تمامی کشورهای جهان به اثبات رسیده است و اهمیت مشترک بودن آن بین انسان و دام باعث شده که در دنیای پزشکی و دامپزشکی جایگاه خاصی را به خود اختصاص دهد (۱۳).

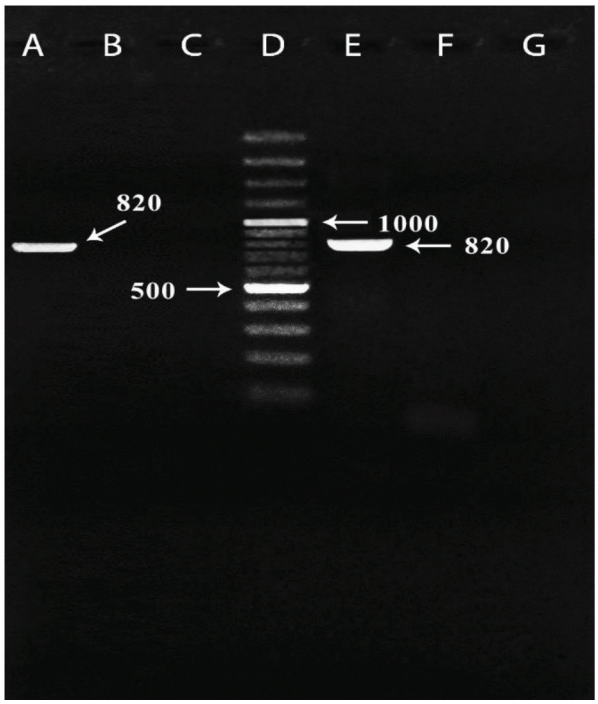
اندرسون طی مطالعه‌ای در ۸۵۳۹ راس گاو نر در ۱۴ گاوداری کالیفرنیا تعداد ۱۴۹ راس (۷۴/۱٪) مثبت به کریپتوسپوریدیوم را گزارش نمود.در تعدادی از گاوداری‌های مورد مطالعه به طور انفرادی آلودگی‌های ۸/۷۵٪ توسط این محقق گزارش گردید (۱).

در ۵ بررسی در گوساله‌های مبتلا به عفونت طبیعی در انگلستان و هلند از گوساله‌ها به طور یک روز در میان به مدت ۳ تا ۴ هفته نمونه مدفوع اخذ و گسترش‌های مدفوعی تهیه شده از نظر وجود اووسیست مورد آزمایش قرار گرفتند. نسبت فراوانی از ۶۰ تا ۱۰۰٪ متغیربود (۱۲, ۱۳).

در کشور ما ایران با عنایت به اهمیت و نقش کریپتوسپوریدیوم در ایجاد اسهال در گوساله‌ها که موجب بروز خسارت اقتصادی به دامداران می‌شود، مطالعات و تحقیقات متعددی بر روی انگل کریپتوسپوریدیوم صورت گرفته است. اولین بار قره‌گزلو و خداشناس در سال ۱۹۸۵ وجود این انگل را در یک خروس بومی شناسایی کردند (۸). در مطالعه‌ای توسط حیدر نژادی و همکاران در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ بر روی ۴۵ نمونه مدفوع گاو ۸ نمونه گاومیش و ۳۵ نمونه گوساله و ۲۲ نمونه ماکیان و ۳ نمونه گوسفند و ۶۲ نمونه انسان در مناطق مختلف استان خوزستان میزان آلودگی ۵۹ درصد در حیوانات اهلی و ۱۴,۵ درصد در انسان گزارش گردید (۶). در بررسی انجام شده توسط صدربزاز در شهرستان مشهد میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در گاوها ۲,۸۷ درصد بوده است (۱۴).

با توجه به تحقیق حاضر، از ۱۶۰ نمونه مورد بررسی در گاوداری‌های استان خراسان شمالی تعداد ۹ نمونه (۵,۶ درصد) با روش مولکولی مورد تایید قرارگرفت که این میزان با تحقیقات در کشورهای سوئد (۱,۸ درصد)، چین (۵,۱۲درصد)، پرتغال (حدود ۶ درصد) مشابهت دارد (۱۰, ۱۵, ۱۶). میزان آلودگی در خراسان شمالی (بجنورد) کمی بیشتر از مطالعات قبلی در استان خراسان رضوی (مشهد) بود، که این اختلاف شاید بدلیل شرایط جغرافیایی و آب و هوایی منطقه می‌باشد.

در مطالعه صورت گرفته درصد آلودگی در جنس نر نسبت به ماده و همچنین گاوهای اسهالی نسبت به گاوهای غیراسهالی بیشتر بود ولی با استفاده از آزمون مربع کای این اختلاف معنی‌دار نبود. با توجه به مشابهت نتایج مولکولی و مشاهده مستقیم با رنگ‌امیزی ذیل نیلسون



A: نمونه کنترل مثبت
B: نمونه کنترل منفی
C: نمونه منفی
D: مارکر
E:نمونه مثبت
F: نمونه منفی
G: نمونه منفی

شکل۳ - تصویر ژل الکتروفورز ژن ۱۸S کریپتوسپوریدیوم پس از PCR ثانویه.

تغییر یافته، لذا می‌توان در آزمایشگاه‌های پزشکی و دامپزشکی از هر دو روش به صورت مکمل استفاده نمود. جهت بررسی دقیق تر ایزوله‌های موجود و گونه‌های دخیل در آلودگی منطقه می‌بایست گونه‌ها در تحقیقات دیگر از نظر ژنوتیپ مورد ارزیابی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از کلیه همکاران موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مشهد و دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل و همچنین اداره کل دامپزشکی استان خراسان شمالی به جهت مساعدت در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند. ضمنا قابل ذکر است این تحقیق با حمایت طرح تحقیقاتی مصوب موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات) انجام شده است.

منابع مورد استفاده

1- Anderson, B. C. 1998. Cryptosporidiosis in Bovine and Human Health. *Journal of Dairy Science* 81: 3036-3041.

2- Beheshtipour, J. and M. Raeeszadeh. 2020. Evaluation of Interleukin-10 and Pro-inflammatory Cytokine Profile in Calves Naturally Infected with Neonatal Calf Diarrhea Syndrome. *Archives of Razi Institute*. 75: 213-218.

3- Casemore, D. P., M. Armstrong and R. L. Sands. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Clin Pathol* 38: 1337-1341.

4- Dillingham, R. A., A. A. Lima and R. L. Guerrant. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect* 4: 1059-1066.

5- Fayer, R. and B. L. Ungar. 1986. *Cryptosporidium spp*. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev* 50: 458-483.

6- Heidarnegadi, S., M. Mohebali, S. Maraghi, Z. Babaei, S. Farnia, A. Bairami and M. Rezaeian. 2012. *Cryptosporidium spp*. Infection in human and domestic animals. *Iran J Parasitol* 7: 53-58.

7- Khalili, B., G. Shahabi, S. Khayeri, B. Sarkari, M. Khalili and M. Samadzadeh. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* and Risk Factors Related to Cryptosporidiosis in Hospitalized Children under 5 Years of Age Due to Diarrhea (Shahrekord- 2005). *Armaghane danesh* 12: 105-115.

8- Khodashenas, G. M. Y. a. 1985. M 1985; Cryptosposporidiosis in a native rooster with choric proliferative enteritis. *Arch*

9- Meamar AR, G. K., Certad G, Dei-Cas E, Mohraz M, Mohebali M, et al. 2006. SSU-rRNA gene analysis of Cryptosporidium spp. in HIV Positive and negative patients. *Iranian j public Health*.

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

11- Nair, P., J. A. Mohamed, H. L. DuPont, J. F. Figueroa, L. G. Carlin, Z.-D. Jiang, J. Belkind-Gerson, F. G. Martinez-Sandoval and P. C. Okhuysen. 2008. Epidemiology of cryptosporidiosis in North American travelers to Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 79: 210-214.

12- Ramirez, N. E., L.A. Ward and S.Sreevatsan. 2004. A review of the biology and epidemiology og Cryptosporidiosis in human and animals. *Microbes infect*.

13- Ronald Fayer, L. X. 2007. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd Edition ed.

14- Sadrebazzaz, A. 2017. *Cryptosporidium* infection in cattle and rodents in dairy cattle farms in Mashhad, northeast of Iran. *J Bacteriol Parasitol* 8: 48.

15- Silverlas, C., K. Naslund, C. Bjorkman and J. G. Mattsson. 2010. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Vet Parasitol* 169: 289-295.

16- Wang, R., H. Wang, Y. Sun, L. Zhang, F. Jian, M. Qi, C. Ning and L. Xiao. 2011. Characteristics of Cryptosporidium transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. *J Clin Microbiol* 49: 1077-1082.

17- Xiao, L., L. Escalante, C. 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.