

شناسایی مولکولی کریپتوسپوریدیوم آندرسونی در گوساله‌های شهرستان شهریار

• عبدالحسین دلیمی (نویسنده مسئول)

گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

• فرید تحویلدار بیدرونی

گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

• بهرام کاظمی دمنه

گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۲ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۳

Email: dalimi_a@modares.ac.ir

چکیده

تک یاخته کریپتوسپوریدیوم آندرسونی از کوکسیدیاهای بیماری‌زا در گاو و گوسفند است. در مطالعه حاضر ۹۴۰ نمونه مدفوع گوساله‌های ۲ ماهه تا یک ساله شهرستان شهریار به روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی شدند. سپس جهت مطالعه مولکولی DNA انگل استخراج گردید و قطعه ۸۴۵ جفت‌بازی ژن 18S rRNA کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های مثبت با روش Nested PCR تکثیر گردید و محصول توسط دو آنزیم Ssp1 و Vsp1 برش داده شد. قطعه تکثیرشده تعیین‌توالی نیز گردید. طبق نتایج حاصله، ۲۳ نمونه (۲/۴۴٪) در روش رنگ‌آمیزی از نظر آلودگی به کریپتوسپوریدیوم مثبت بودند. تمامی نمونه‌های مثبت با روش Nested PCR تکثیر یافتند. نمونه تکثیر یافته دارای حرکت الکتروفور تیک مشابه بر روی ژل آگاروز و دارای الگوی مشابه با کریپتوسپوریدیوم آندرسونی بودند. نتایج حاصل با مقایسه ترادف بازی قطعه ژن نمونه مذکور با داده‌های ثبت شده در بانک ژن مورد تایید قرار گرفت.

کلمات کلیدی: کریپتوسپوریدیوم آندرسونی، گوساله، ژن 18S rRNA، PCR_RFLP، شهریار، ایران

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

Molecular identification of *Cryptosporidium andersoni* in Shahriar calves

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

Received: August 2013 Accepted: July 2013

Email: dalimi_a@modares.ac.ir

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

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

مقدمه

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

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

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

مواد و روش کار جمع آوری نمونه‌های گوساله

در دامداری‌های صنعتی و غیر صنعتی اطراف شهرستان شهریار نمونه‌گیری از گوساله‌های بین سن ۲ ماهگی تا یکسالگی انجام شد. در مجموع ۹۴۰ نمونه مدفوع گاوی جمع‌آوری شد که در محلول دی

کریپتوسپورییدیوم از تک یاخته‌های آلوده کننده سلول‌های پوششی دستگاه گوارش و تنفسی در میزبان‌های مهره دار بشمار می‌آید (۲۴). گاو از جمله مهم‌ترین دام‌های اهلی است که در معرض آلودگی به این انگل است. اهمیت این انگل در گاو بخاطر خسارت اقتصادی ناشی از آلودگی و مرگ و میر گوساله‌های نوزاد می‌باشد. این انگل اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط Panciera و همکاران با مشاهده انگل در مقاطع بافتی ژوژنوم تحتانی و ایلئوم گزارش گردید (۱۶).

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

کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد و در یخچال نگهداری شدند

ترانس لومیناتور باندها مشاهده شد و با مارکر مقایسه شد.

تغلیظ اووسیست

با استفاده از روش سوسپانسیون سوکوروز اووسیست ها تغلیظ شدند (۱۴). مقدار ۱۰ گرم مدفوع را با آب مقطر رقیق کرده و از پارچه نظیف عبور داده و با سانتریفیوژ دور ۴۰۰ g بمدت ۵ دقیقه آن را شستشو داده و از رسوب حاصل با آب مقطر سوسپانسیون تهیه شد. سپس سوسپانسیون را با دو غلظت ساکاروز ۰/۴ M و ۰/۸۵ M، در دو مرحله مخلوط کرده و پس از سانتریفیوژ کردن کیست ها را جمع آوری گردید.

انجام واکنش RFLP

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

مراحل انجام آزمایش بروی نمونه ها

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

تعیین ترادف ژن

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

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

رسم درخت فیلوژنی

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

برای تکثیر قطعه ۸۴۵ جفت نوکلئوتیدی از ژن 18S rRNA کریپتوسپوریدیوم از پرایمرهای طراحی شده توسط Xiao و همکاران (۱۹۹۹) کریپتوسپوریدیوم استفاده شد (۲۹).

نتایج

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

توالی پرایمر های خارجی:
 Cr18PA: F-5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3
 Cr18PB: R-5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3
 و پرایمرهای داخلی:
 Cr18NA: F-5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA
 AG-3
 Cr18NB: R-5'- CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT
 A-3

نتایج Nested – PCR برای ژن rRNA ۱۸S

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

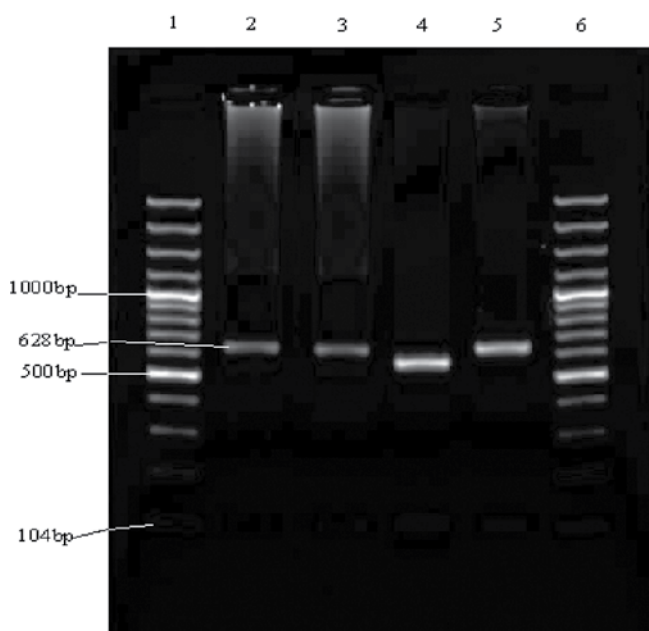
آنزیم Vsp1 کریپتوسپوریدیوم نیز سه باند ۱۰۸، ۱۱۵ و ۶۲۸ جفت نوکلئوتیدی بر روی ژل آگاروز ایجاد نمود (شکل ۳).

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

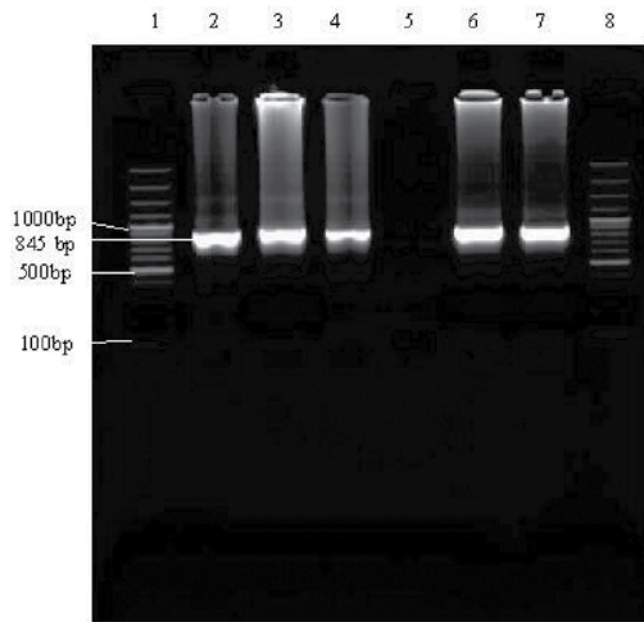
بحث و نتیجه گیری

گونه کریپتوسپوریدیوم آندرسونی گرچه سابقاً گونه کریپتوسپوریدیوم شبه موریس C. muris-like نام گذاری شده بود ولی اوسیست این گونه

واکنش PCR در دو مرحله انجام گردید. در هر دو مرحله PCR به حجم ۳۰ μl شامل ۳ μl از PCR buffer x ۱۰ و مقدار ۲ μl از محلول MgCl_۲ با غلظت ۵۰ mM و مقدار ۱ μl از dNTP با غلظت ۱۰ mM و ۰/۲۵ μl از Taq polymeras و ۲ μl از DNA ژنومی (محصول PCR در مرحله دوم) و ۱ μl از هر یک از پرایمر های F, R که به حجم کلی محلول اضافه میشود و بقیه آن تا ۱۳۰ μl با آب مقطر تکمیل میشود. مرحله ی و اسرشت ابتدایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله ی و اسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله ی اتصال پرایمرها ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله ی طولیل شدن زنجیره ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ۳۵ سیکل و در نهایت یک سیکل ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. در مرحله دوم برنامه دستگاه مشابه مرحله اول بوده و فقط درجه اتصال کاهش یافته و به ۵۰ ثانیه می رسد. پس از انجام PCR دوم ۴ μl محصول PCR داخل چاهک های ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار مارکر وزنی (Fermentas) 100bp DNA بارگذاری و در ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از



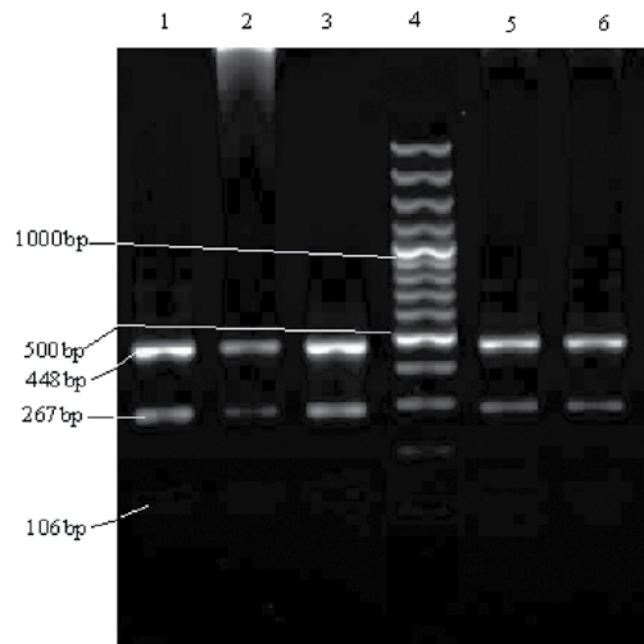
شکل ۳ - برش قطعه ۸۴۵ جفت بازی از ژن 18S rRNA نمونه‌های کریپتوسپورییدیوم جدا شده از گاو با آنزیم Vsp1: چاهک‌های شماره ۲ الی ۵ نمونه‌های مثبت، چاهک‌های شماره ۱ و ۶ مارکر ۱۰۰ جفت بازی.



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

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

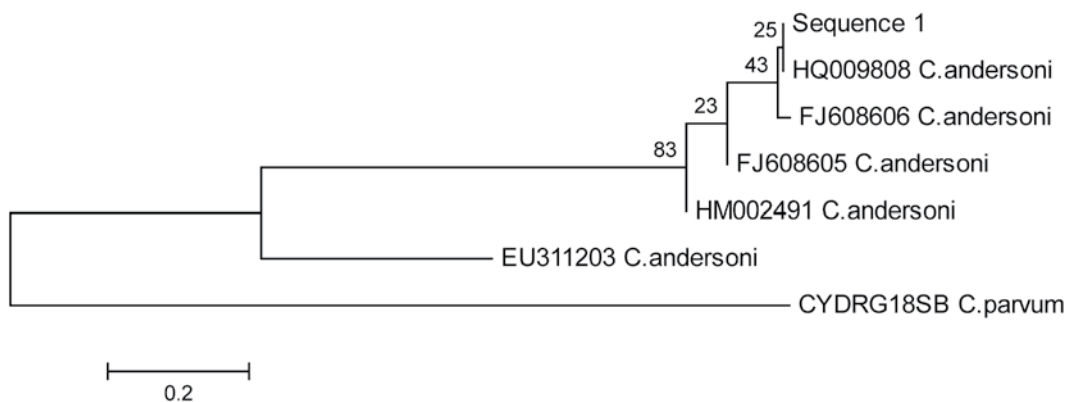
نکته قابل توجه میزان نسبتاً بالایی از شیوع گونه کریپتوسپورییدیوم اندرسونی در گاوهای مناطق مختلف اروپا است. این گونه شیردان گاوهای جوان و بالغ را آلوده می‌سازد. در ایرلند در آزمایش نمونه مدفوع ۲۱۸ راس گاو، آلودگی به گونه کریپتوسپورییدیوم اندرسونی ۵/۰۴٪ و به گونه پاروم ۴/۵۸٪ گزارش شده است (۲۴). در دانمارک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



شکل ۲ - برش قطعه ۸۴۵ جفت بازی از ژن 18S rRNA نمونه‌های کریپتوسپورییدیوم جدا شده از گاو با آنزیم Ssp1: چاهک‌های شماره ۲ الی ۵ نمونه‌های مثبت، چاهک شماره ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATGAGCTTGGTGATTCATAATAACTTTAC 60
 GGATCGCATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTA 120
 GGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAG 180
 GGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATC 240
 CTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGG 300
 AATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCA 360
 GCTGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTA 420
 GTTGGATTTCTGTTGTATAATTTATAAATATACCAAGGTAATATTATAAATATCAACATC 480
 CTCCTATTATATTCTAAATATATAGGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAA 540
 GCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAATATGGACTTTTGTCTTTCTT 600
 ATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTATTAATGGACAGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACA 660
 GCCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTCGCAAGG 720
 ATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 780
 TCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTTGTTTCCTTACTCCTTCAGCACCT
 TATGAG 846

شکل ۴- ترادف بازی ژن 18S rRNA ایزوله کریپتوسپوریدیوم آندرسونی جدا شده از گاو های شهرستان شهریار.



شکل ۵- درخت فیلوژنی نمونه جدا شده در این مطالعه با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن با روش Neighbor Joining Tree (نمونه سکونس شده: Sequence 1، مابقی: HQ009808 از گاو، FJ608606 از گوسفند، FJ608605 از گوسفند، HM002491 از گاو همگی از چین، EU311203 از انسان ایران و C. parvum از کشورهای مختلف).

شیردان گاو در ایران. دوره: ۴۷، شماره ۱-۲ ص ۵۱، ۶۰، ۶۰- فتوحی اردکانی، ر. فصیحی هرنندی، م. سلیمان بنایی، س. کامیابی، ح. عطاپور، م. شریفی، ا. (۱۳۸۷). اپیدمیولوژی آلودگی به کریپتوسپورییدیوم در گاوهای شهرستان کرمان و تعیین گونه و ژنوتایپ تعدادی از ایزوله ها، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. دوره پانزدهم، شماره ۴، ص ۳۲۰-۳۱۳.

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

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

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

۱۰- مدیری، د. (۱۳۷۲). بررسی فراوانی کریپتوسپورییدیوز در اطفال و گوساله ها در شهرستان اراک، پایان نامه (دکتر)، دانشگاه شهید چمران اهواز.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

نتیجه گیری

ژنوتایپ ایزوله کریپتوسپورییدیوم اندرسونی جدا شده از گاو مشابه ایزوله کریپتوسپورییدیوم ثبت شده آن در بانک ژن [AY954885.1] می باشد.

تشکر و قدردانی

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

منابع مورد استفاده

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

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

۳- تحویلدار بیدرونی، ف. دلیمی، ع.، کاظمی دمنه، ب. (۱۳۸۷). تمایز ایزوله های کریپتوسپورییدیوم پاروم جدا شده از انسان و گاو با استفاده از قطعه ۱۰۵۵ bp ژن 18S rRNA. پژوهش در پزشکی، دوره ۳۲، شماره ۱، ص ۵-۱۱.

۴- درستکارمقدم، د.، اعظمی، م.، صالحی، ر.، صالحی، م. (۱۳۸۴). تعیین گونه های انگل کریپتوسپورییدیوم با استفاده از آنالیز PCR-RFLP ژن 18S rRNA. مجله علوم پایه پزشکی ایران؛ دوره ۸، شماره ۴: ص ۲۳۸-۲۳۲

۵- سهرابی حقدوست، ا. (۱۳۷۱). گزارش اولین مورد کریپتوسپورییدیوز

- 20- Leng X, Mosier DA, Oberst RD. (1996). Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Appl Environ Microbiol.* 62(2):643-7.
- 21- Mendonça C., Almeida A., Castro A., de Lurdes Delgado M., Soares S., da Costa J.M., Canada N. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet. Parasitol.* 147:47-50.
- 22- Mirzai Y., Yakhchali M., Mardani K. (2014). *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* infection in naturally infected cattle of northwest Iran. *Veterinary Research Forum.* 2014; 5 (1) 55 - 60
- 23- Morgan, U. M., L. Xiao, P. Monis, I. Sulaiman, I. Pavlasek, B. Blagburn, M. Olson, S. J. Upton, N. V. Khramtsov, A. Lal, A. Elliot, and R. C. Thompson. (2000). Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitology* 120:457-464.
- 24- Moriarty E.M., McEvoy J.M., Lowery C.J., Thompson H.P., Finn M., Sheridan J.J., Blair I.S., McDowell D.A., Duffy G. (2005). Prevalence and characterisation of *Cryptosporidium* species in cattle faeces and on beef carcasses at slaughter. *Vet. Rec.* 156:165-168.
- 25- Ondráčková Z., Kváč M., Sak B., Květoňová L., Rost M. (2009). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. *Vet Parasitol.* 165:141-144.
- 26- Pirestani M, Sadraei J, Dalimi asl A, Zavvar M, Vaeznia H. (2008) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from human and bovine using 18s rRNA gene in Shahriar county of Tehran, Iran. *Parasitol Res.* 103:467-472.
- 27- Robinson G., Thomas A.L., Daniel R.G., Hadfield S.J., Elwin K., Chalmers R.M. (2006). Sample prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* 142:163-
- 28- Silverlås C., Näslund K., Björkman C., Mattson J.G. (2010). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Vet. Parasitol.* 169:289-295.
- 29- Xiao, L. H., L. Escalante, C. F. Yang, I. Sulaiman, A. A. Escalante, R. J. Montali, R. Fayer, and A. A. Lal. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1578-1583.
- 30- Xiao L., Fayer R, Ryan U., and Upton S. J. (2004). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin Microbiol Rev.* 17(1): 72-97

