مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره ۳، ۱۳۹۹، ۲۷۹-۲۷۱
مقاله پژوهشی

# جداسازی، شناسایی و تعیین هویت مولکولی گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* در اسهال گوساله‌ها به روش multiplex nested-PCR

**وحید نصیری، فرنوش جامعی، حبیب اله پایکاری**

*آزمایشگاه تک یاخته‌شناسی، بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران*

10.22059/jvr.2019.273077.2886

**تاریخ دریافت:** ۷ اسفند ۱۳۹۸، **تاریخ پذیرش:** ۲۴ اردیبهشت ۱۳۹۹

## چکیده

**زمینه مطالعه:** تشخیص گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* براساس خصوصیات مورفولوژی بسیار محدود بوده و به تنهایی فاقد ارزش تاکسونومیک است، و لذا استفاده از روش‌های مولکولی این محدودیت‌ها را تا حدودی برطرف می‌سازد.

**هدف:** هدف از این مطالعه تعیین ژنوتیپ‌های غالب *کریپتوسپوریدیوم* در گوساله‌های مبتلا به اسهال بود.

**روش کار:** مطالعه در گوساله‌های کمتر از ۳ ماه و برای مدت ۲ سال انجام شد. در طول دوره مطالعه، ۱۶۰ نمونه مدفوع از گوساله‌های جوان جمع‌آوری شده و ابتدا از طریق میکروسکوپی و سپس با استفاده از تکنیک‌های مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. مدفوع از جهت حضور اواوسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* توسط روش شناورسازی با آب شکر شیتر و به دنبال آن روش رنگ‌آمیزی ذیل نلسون مورد بررسی قرار گرفت. دی ان آ انگل استخراج و پروتکل multiplex nested-PCR براساس ژن 18srRNA جهت شناسایی سه گونه سازگار در گاو (یعنی *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی*، *کریپتوسپوریدیوم بوویس* و *کریپتوسپوریدیوم رایانه*) به علاوه گونه مشترک بین انسان و دام یعنی *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* انجام شد.

**نتایج:** ۱۱۰ نمونه مدفوع از دامداری‌های موجود در استان البرز و ۵۰ نمونه مدفوع نیز از دامداری‌های شهر شاهرود جمع‌آوری گردید. از ۱۶۰راس حیوان مورد آزمایش ۹۰ راس ماده و ۷۰ راس نر بودند. در مجموع در میان ۱۶۰ راس دام مورد آزمایش ۸۵ مورد (۵۳/۱۲ درصد) مبتلا به اسهال بودند که ۵۵ مورد (۳۴/۳۷درصد) از این تعداد حیوان تحت آزمایش با استفاده از رنگ‌آمیزی ذیل نلسون مثبت تشخیص داده شدند. از آنجایی‌که تمام موارد مثبت مربوط به نمونه‌های اسهالی و مرتبط با گوساله‌های زیر یک ماه بود، ارتباط معنی‌داری مابین وضعیت اسهال و حضور این انگل مشاهده گردید ($P<0/05$). از نظر توزیع فصلی تفاوتی در میزان موارد اسهالی و موارد مثبت انگلی مشاهده نشد. حضور باند ۳۰۵ جفت بازی در کلیه نمونه‌های مثبت ذیل نلسون موید حضور گونه *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* در تمامی نمونه‌ها بود.

**نتیجه‌گیری نهایی:** گوساله‌های شیرخوار بیشتر با *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* آلوده می‌شوند که تحقیق حاضر نیز موید این مطلب بود.

**کلمات کلیدی:** انگل روده‌ای، کریپتوسپوریدیوم، گوساله، اسهال، جداسازی مولکولی

**کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.**

*نویسنده مسئول: وحید نصیری، آزمایشگاه تک یاخته‌شناسی، بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران*
*پست الکترونیکی: v.nasiri@rvsri.ac.ir*

## مقدمه

*کریپتوسپوریدیوم پاروووم* یک انگل کوکسیدیایی کوچک داخل سلولی متعلق به شاخه اپی‌کمپلکسا با توزیع جهانی و یکی از مهم ترین پاتوژن‌های روده‌ای به خصوص در افراد با نقص ایمنی می‌باشد (۳،۵). در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که چهار گونه اصلی قادر به ایجاد عفونت در گاوها می‌باشند. اولین گونه *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* است که بیش‌تر از ۱۵۰ گونه از پستانداران از جمله گاوها به عنوان میزبان برای آن یا *کریپتوسپوریدیوم شبه پاروووم* شناخته شده‌اند (۲،۱۶). دومین گونه *کریپتوسپوریدیوم*

*اندرسونی* است که در شیردان گاو ایجاد عفونت کرده و اوسیست‌های آن از نظر مورفولوژی به *کریپتوسپوریدیوم موریس* شباهت داشته اما اندازه آن کمی بزرگ‌تر است (۱۰). در گذشته انگل‌های *کریپتوسپوریدیوم* که موجب عفونت در انسان‌ها می‌شده با نام *کریپتوسپوریدیوم پاروم* ژنوتیپ انسانی، ژنوتیپ ۱یا ژنوتیپ H به رسمیت شناخته می‌شد، اما امروزه بر اساس تفاوت‌های زیست شناسی و مولکولی به نام *کریپتوسپوریدیوم هومینیس* توصیف می‌شود (۱۷). *کریپتوسپوریدیوم هومینیس* از نظر ریختی مشابه *کریپتوسپوریدیم پاروم* می‌باشد و در گاو ایجاد عفونت می‌نماید (۱۷). از نظر خصوصیات ژنتیکی، به طور قطعی تفاوت آشکاری بین دو گونه *کریپتوسپوریدیوم هومینیس* و *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در طیف وسیعی از محل‌های ژنی نشان داده شده است (۲۷). گونه چهارم گونه جدید *کریپتوسپوریدیوم رایانه* است که در گاو توصیف شده است. اوسیست *کریپتوسپوریدیوم رایانه* که قبلا به عنوان ژنوتیپ شبیه آهوی *کریپتوسپوریدیوم* شناخته شده بود مشابه *کریپتوسپوریدیوم پاروم* و *کریپتوسپوریدیوم بوویس*، اما کوچک‌تر است. گزارش شده است که این ژنوتیپ در گاو در سراسر جهان شایع است. اوسیست‌های مربوط به این گونه کوچک‌ترین اندازه اوسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* که در پستانداران گزارش شده است را دارا می‌باشد. این انگل که از نظر جغرافیایی بسیار گسترده می‌باشد، تنها در گاوهای نژاد *بوس تاروس* یافت شده و به عنوان یک گونه جدید تلقی می‌شود (۱۱).

برطبق شواهد و آثار منتشر شده عفونت *کریپتوسپوریدیوم* در ایران شایع بوده و لزوم مطالعه در زمینه‌های مختلف حضور این انگل وجود دارد. از طرفی انجام یک ارزیابی جامع از خطرات حضور این انگل هنگامی میسر خواهد بود که نمونه‌ها تعیین گونه و ژنوتیپ/ ساب‌تایپ شوند. این یک پیش نیاز برای درک نقش گونه‌های میزبان‌های مختلف و ژنوتیپ/ساب‌تایپ‌های انگل از نظر انتقال بیماری به انسان و حیوانات محسوب می‌گردد. در مطالعه‌ای ۹۴۰ نمونه مدفوع گوساله‌های ۲ ماهه تا یک ساله شهرستان شهریار به روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی شدند. سپس جهت مطالعه مولکولی دی ان آ انگل استخراج گردید و قطعه ۸۴۵ جفت بازی ژن ۱۸srRNA *کریپتوسپوریدیوم* در نمونه‌های مثبت با روش Nested PCR تکثیر گردید و محصول توسط دو آنزیم Ssp1 وVsp1 برش داده شد. طبق نتایج این تحقیق، ۲۳ نمونه (۲/۴۴ درصد) در روش رنگ‌آمیزی از نظر آلودگی به انگل *کریپتوسپوریدیوم* مثبت بودند. تمامی نمونه‌های مثبت در روش Nested PCR دارای الگوی مشابه با *کریپتوسپوریدیوم آندرسونی* بودند (۹). در تحقیقی دیگر مطالعه انگشت‌نگاری دی ان آ ایزوله‌های جدا شده از گاوهای آلوده در استان قزوین براساس بررسی توالی به دست آمده از ژن GP60 انجام گردید و مجموعاً ۲۵ ایزوله *کریپتوسپوریدیوم پاروم* جدا شده از گاوهای آلوده در دامداری‌های استان قزوین مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی ساب ژنوتایپ، نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن GP60 تکثیر و سپس، توالی آن‌ها تعیین شد. بررسی توالی ژن GP60 در ۲۵ ایزوله *کریپتوسپوریدیوم پاروم* وجود دو ساب ژنوتیپ اصلی و همچنین وجود سه ساب ژنوتیپ فرعی در این ایزوله‌ها را مشخص نمود (۱۸).

مروری بر مطالعات انجام شده بر روی ژنوتایپینگ *کریپتوسپوریدیوم* در خلال چند سال گذشته نشان دهنده استفاده از ژن SSU rRNA در ۱۰۰ اثر در بین ۱۱۶ (۸۶ درصد) آثار منتشر شده بوده است. بویژه روش PCR-RFLP که قطعه تقریباً ۸۳۰ بیس پیری از ژن را هدف قرار می‌دهد و از آنزیم‌های محدودالاثر VspI و SspI برای ژنوتایپینگ در آن استفاده شده است (۲۷،۲۴). در مطالعه بر روی نحوه انتقال *کریپتوسپوریدیوم هومینیس* در انسان‌ها و *کریپتوسپوریدیوم پاررووم* در انسان‌ها و نشخوارکنندگان، روش‌های ساب‌تایپینگ نیز مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از روش‌های مورد استفاده در ساب‌تایپینگ گونه‌های انگل، آنالیز توالی دی ان آ در بخش گلیکوپروتئین ۶۰ کیلو دالتونی می‌باشد.

واضح است که گونه‌ها/ژنوتیپ‌های که تاکنون در ایران جدا شده است نمی‌توانند نمایانگر تمامی آن‌ها باشند و بنابراین پایش، بررسی و ژنوتایپینگ در حد گسترده‌تری نیاز است تا به درک بهتری از راه‌های انتقال *کریپتوسپوریدیوم* در ایران دست یابیم. مطالعات صورت گرفته نقش پراهمیت احشام مانند گاو، گوسفند، اسب و شتر را در چرخه عفونت ناشی از *کریپتوسپوریدیوم* نشان داده است و مشخص شده *کریپتوسپوریدیوم پاروم* شایع‌ترین گونه در این میزبان‌ها و در انسان می‌باشد. لازم به ذکر است تعیین ژنوتیپ ایزوله‌های کریپتوسپوریدیایی، به‌منظور شناسایی دقیق منشاء آلودگی و تبیین روش‌های کنترل و پیشگیری مناسب ضروری می‌نماید (۱،۷،۸،۲۷)، که به همین منظور تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران و با استفاده از روش مولتیپلکس نستد پی سی آر بر روی موارد اسهالی حاصل از گوساله‌های دامداری‌های استان البرز و شهر شاهرود انجام پذیرفت.

## مواد و روش کار

**جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه:** نمونه‌برداری از اواخر اسفند ماه ۱۳۹۴ شروع و تا مهر ماه ۱۳۹۶ صورت گرفت. کلیه نمونه‌ها از دامداری‌های صنعتی و از گاوهای اصلاح نژاد شده استان

البرز و شهر کرج و همین‌طور شهر شاهرود تهیه شد. بعد از هماهنگی با مسئولین شبکه‌های دامپزشکی مربوطه، پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه از دامدارها و ثبت اطلاعات دموگرافیک و برخی اطلاعات دیگر از جمله سن، جنس و غیره، در ظروف مخصوص از گوساله‌ها نمونه مدفوع گرفته شد. نمونه‌گیری به روش توشه رکتال انجام گردید. در مواردی که توشه رکتال امکان‌پذیر نبود از بستر حیوان تازه‌ترین نمونه مدفوع جمع‌آوری گردید. پس از انتقال دادن نمونه‌ها به آزمایشگاه تک‌یاخته شناسی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های انگلی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، وضعیت فیزیکی و قوام مدفوع را بررسی کرده و آن را در برگه مخصوص ثبت نموده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگه داری شدند.

**بررسی میکروسکوپی انگل:** در ابتدا جهت جستجوی انگل‌ها تغلیظ نمونه‌ها به روش رسوبی فرمالین اتر انجام پذیرفت. پس از تهیه گستره از رسوب و خشک شدن آن، با متانول فیکس شده، سپس به روش تغییریافته ذیل نلسون رنگ‌آمیزی شدند، به این شکل که رنگ کربول فوشین روی لام‌ها ریخته و بعد از مدت زمان پانزده دقیقه با آب شیر شستشو شده و سپس با استفاده از اسید- الکل ۱ درصد (اسید کلریدریک- اتانول، ۱ به ۹۹) رنگ‌بری شد تا تقریباً لام از نظر رنگ کربول فوشین بی‌رنگ شود. دوباره لام‌ها با آب شیر شستشو شده و به مدت ۳۰ ثانیه رنگ زمینه‌ای متیلن بلو ۰/۴ درصد روی آن ریخته و در نهایت پس از شستشوی نهایی لام‌ها با آب شیر و خشک شدن آن‌ها در مجاورت هوا در دمای آزمایشگاه با روغن ایمرسیون و با درشت‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری زمینه روشن لام‌ها از نظر وجود اوسیست‌های *کریپتوسپوریدیوم* بررسی شدند. در بررسی میکروسکوپی می‌توان انگل را به رنگ قرمز و اندازه ۴ تا ۶ میکرون در زمینه آبی تشخیص داد. پس از تأیید حضور انگل، جهت استخراج دی ان آ و انجام مراحل مولکولی، تغلیظ اوسیست‌ها در نمونه‌های مثبت با استفاده از شناورسازی با آب و شکر به روش شیتر و مطابق منابع انجام پذیرفت (۱۳). با استفاده از یک پیپت پاستور اوسیست‌ها از سطح محلول شیتر در لوله‌ای جداگانه جمع‌آوری شده و با سرم فیزیولوژی دو تا سه بار شستشو داده شده و به منظور جداسازی دی ان آ در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

**بررسی مولکولی (استخراج دی ان آ با روش فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل تغییر یافته):** جهت استخراج دی ان آ از روش Boom و همکاران در سال ۱۹۹۰ (۶) با برخی تغییرات استفاده شد. بدین صورت که ۲۵۰ میکرولیتر از اوسیست تغلیظ شده و شسته شده در سرم فیزیولوژی در یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته، سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. سپس رسوب حاصله ۵ مرتبه در نیتروژن مایع منجمد و در بن ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به جهت سست شدن دیواره اوسیست‌ها ذوب گردید. در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر از بافر لیز کننده اضافه و کاملاً با رسوب مخلوط شد. آنگاه محلول SDS در آب در غلظت نهایی ۱ درصد و پروتئیناز K در غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به لوله اضافه شده و کاملاً مخلوط و به مدت یک شب (جهت هضم پروتئین‌ها و اتصالات بین سلولی) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در بن ماری انکوبه شد. در این مرحله جهت حذف آر ان آ موجود در واکنش، آنزیم ریبونوکلئاز A در غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به لوله اضافه و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جهت جداسازی ناخالصی‌ها به هر لوله ۳۰۰ میکرولیتر محلول کلرید سدیم ۵ مولار اضافه و ده دقیقه در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن ۱ میلی‌لیتر از ترکیب فنل (۲۴ حجم)- کلروفرم (۲۴ حجم)- ایزوآمیل الکل (۱ حجم) به لوله اضافه و لوله به آرامی در طی ۱۰ دقیقه سر و ته شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده، مایع رویی برداشته و به لوله ۲ میلی‌لیتری جدیدی انتقال داده شد. هم حجم فاز شفاف جدا شده کلروفرم اضافه نموده و لوله به آرامی سر و ته شده، سپس در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و به جهت حذف مولکول‌های فنل سانتریفوژ گردید. این مرحله شستشو با کلروفرم یک بار دیگر تکرار گردید. مایع رویی به لوله تمیزی انتقال داده و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد و یک دهم حجم آن استات سدیم ۳ مولار اضافه گردید. لوله حاوی دی ان آ به مدت یک شب در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته، سپس لوله‌ها با اتانول ۷۰ درصد سرد پر شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. مرحله شستشو یک بار دیگر تکرار شد. اتانول ۷۰ درصد به‌طور کامل خالی شده و درب لوله ۱۵-۱۰ دقیقه باز گذاشته شد تا اتانول تبخیر گردد. سپس رسوب خشک شده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به خوبی حل گردیده و محلول حاصل تا هنگام استفاده جهت PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

**استفاده از روش Multiplex Nested PCR جهت**

**تعیین هویت مولکولی انگل:** جهت Multiplex Nested PCR *کریپتوسپوریدیوم* از ۶ جفت پرایمر اختصاصی استفاده گردید (۲۳،۲۲). جفت پرایمر اول یک قطعه به طول ۱۳۰۰ بیس پیر از ژن ۱۸srRNA را جدا نمود. پس از انجام مرحله اول PCR تحت شرایط استاندارد، ۱ میکرولیتر از محصول PCR اول به‌عنوان الگو در مرحله دوم PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله از جفت پرایمرهای دوم استفاده شد که یک قطعه به طول ۲۴۱ تا ۸۴۰ جفت باز (بسته به گونه انگل) را تکثیر نمود. به عبارتی در یک واکنش مولتیپلکس از پرایمرهای اینترنال فوروارد هر چهار گونه (CaF-CrF-CphF-CbF) به علاوه پرایمر اینترنال ریورز در حد جنس (AL۳۰۳۲) استفاده شد تا در یک واکنش مولتیپلکس گونه موجود شناسایی گردد. حجم نهایی ۲۸ میکرولیتری تنظیم و میزان پرایمر ۲۰ پیکومول در نظر گرفته شد. در پی سی آر دوم از برنامه مشابه پی سی آر اول استفاده شد، بجز اینکه دمای اتصال را از ۵۵ به ۵۶ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. پس از هر مرحله PCR، محصول حاصل روی ژل آگارز ۱/۵درصد همراه با سایبر سیف (اینویتروژن) الکتروفورز شده و با ژل داکیومنت باندهای مربوطه در کنار سایز مارکر مشاهده گردید. در کلیه مراحل از کنترل‌های مثبت *کریپتوسپوریدیوم* و منفی (اواوسیست آیمریا) نیز استفاده گردید.

**جدول۱.** پرایمرهای مورد استفاده جهت جداسازی گونه‌های مختلف *کریپتوسپوریدیوم* در گاو (۲۳،۲۴).

| نام جفت پرایمر | توالی ′۳-′۵ | اندازه قطعه (بیس پیر) | گونه جدا شده |
|---|---|---|---|
| AL1687 (EF)<br>AL1691 (ER) | TTCTAGAGCTAATACATGCG<br>CCCATTTCTTCGAAACAGGA | ۱۳۷۰ | اختصاصی جنس |
| AL1598 (IF)<br>AL3032 (IR) | GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG<br>AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA | ۸۴۰ | اختصاصی جنس با پرایمرهای داخلی |
| CaF<br>AL3032 (IR) | GCAAATTACCCAATCCTGAC<br>AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA | ۶۲۵ | *کریپتوسپوریدیوم آندرسونی* |
| CrF<br>AL3032 (IR) | TGTTAATTTTTATATACAATRCTACGG<br>AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA | ۴۱۵ | *کریپتوسپوریدیوم رایانه* |
| CphF<br>AL3032 (IR) | AGAGTGCTTAAAGCAGGCATA<br>AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA | ۳۰۵ | *کریپتوسپوریدیوم پاروووم* |
| CbF<br>AL3032 (IR) | CTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATG<br>AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA | ۲۴۱ | *کریپتوسپوریدیوم بوویس* |

**جدول۲.** برنامه مراحل پی سی آر مورد استفاده جهت جداسازی گونه‌های مختلف *کریپتوسپوریدیوم* در گاو (۲۲،۲۳،۲۴).

| مرحله سیکل | واسرشت | اتصال | پلیمریزاسیون یا طویل شدن | تعداد سیکل ها |
|---|---|---|---|---|
| سیکل اول | ۹۴ درجه سانتی‌گراد<br>۳ دقیقه | ---- | ---- | ۱ |
| سیکل اصلی | ۹۴ درجه سانتی‌گراد<br>۴۵ ثانیه | ۵۵-۵۶<br>درجه سانتی‌گراد<br>۴۵ ثانیه | ۷۲ درجه سانتی‌گراد<br>۱ دقیقه | ۳۵ |
| سیکل نهایی | ---- | ---- | ۷۲ درجه سانتی‌گراد<br>۷ دقیقه | ۱ |

**جدول ۳.** مشخصات تحقیق براساس فاکتورهای جنس دام، فصل نمونه‌گیری و سن دام.

| منطقه نمونه‌گیری | تعداد نمونه | جنسیت دام | | فصل نمونه‌گیری | | | | سن گوساله‌ها | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | نر | ماده | بهار | تابستان | پاییز | زمستان | زیر یک ماه | بالای یک ماه |
| البرز | ۱۱۰ | ۵۰ | ۶۰ | ۳۰ | ۲۵ | ۲۵ | ۳۰ | ۹۰ | ۲۰ |
| شاهرود | ۵۰ | ۲۰ | ۳۰ | ۱۰ | ۱۵ | ۱۰ | ۱۵ | ۲۰ | ۳۰ |
| مجموع | ۱۶۰ | ۷۰ | ۹۰ | ۴۰ | ۴۰ | ۳۵ | ۴۵ | ۱۱۰ | ۵۰ |

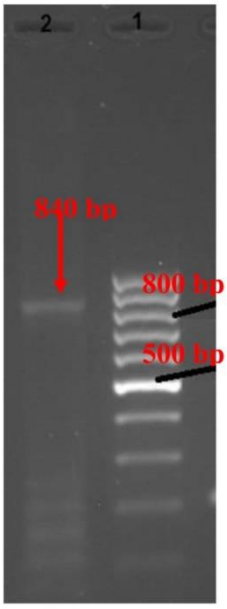
**جدول ۴.** مشخصات نمونه‌های مورد بررسی از نظر قوام و نتایج موارد مثبت.

| منطقه نمونه‌گیری | تعداد نمونه | قوام مدفوع | | موارد مثبت در رنگ‌آمیزی ذیل نلسون | | درصد موارد مثبت در رنگ‌آمیزی ذیل نلسون |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | اسهالی | غیر اسهالی | موارد اسهالی مثبت | موارد غیر اسهالی مثبت | |
| البرز | ۱۱۰ | ۷۰ | ۴۰ | ۴۷ | ۰ | ۴۲/۷۲درصد |
| شاهرود | ۵۰ | ۱۵ | ۳۵ | ۸ | ۰ | ۱۶درصد |
| مجموع | ۱۶۰ | ۸۵ | ۷۵ | ۵۵ | ۰ | ۳۴/۳۷درصد |

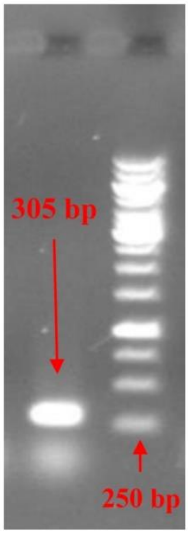
## نتایج

۱۱۰ نمونه مدفوع از دامداری‌های موجود در استان البرز و ۵۰ نمونه مدفوع نیز از دامداری‌های شهر شاهرود جمع‌آوری گردید. از ۱۶۰ راس حیوان مورد آزمایش ۹۰ راس ماده و ۷۰ راس نر بودند. به کمک رنگ‌آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده در ۸ نمونه (۱۶ درصد) از ۵۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از شاهرود تک‌یاخته جنس *کریپتوسپوریدیوم* تشخیص داده شد. از ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده در این منطقه ۱۵ نمونه اسهالی بودند که تمام موارد مرتبط با گوساله‌های زیر یک ماه بود و لذا ارتباط معنی‌داری مابین وضعیت اسهال و حضور این انگل مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). از ۱۱۰ راس دام مورد بررسی در استان البرز، ۹۰ راس آن مربوط به گوساله‌های زیر یک ماه بود که ۷۰ مورد از آن‌ها دچار اسهال بودند. کلیه موارد اسهالی مربوط به گوساله‌های زیر یک ماه بود. از میان ۷۰ راس دام اسهالی ۴۷ مورد (۴۲/۷۲ درصد) آن‌ها از نظر میکروسکوپی و با استفاده از رنگ‌آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده مثبت تشخیص داده شدند. در مجموع در میان ۱۶۰ راس دام مورد آزمایش ۸۵ مورد (۵۳/۱۲ درصد) مبتلا به اسهال بودند که ۵۵ مورد (۳۴/۳۷ درصد) از این تعداد حیوان تحت آزمایش با استفاده از رنگ‌آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده مثبت تشخیص داده شدند. از آنجایی که تمام موارد مثبت مربوط به نمونه‌های اسهالی و مرتبط با گوساله‌های زیر یک ماه بود، ارتباط معنی‌داری مابین وضعیت اسهال و حضور این انگل مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). از نظر توزیع فصلی تفاوتی در میزان موارد اسهالی و موارد مثبت انگلی مشاهده نشد.

**یافته‌های بررسی مولکولی:** نمونه‌هایی که به واسطه رنگ‌آمیزی ذیل نلسون مثبت تشخیص داده شده بودند با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* در گاو و با استفاده از روش Multiplex nested PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. مراحل استخراج دی ان آ به خوبی انجام پذیرفت و استفاده از روش انجماد- ذوب با به کارگیری ازت مایع و بن ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد در ۵ نوبت جهت شکستن دیواره اواوسیست‌ها و استخراج دی ان آ انگل کفایت نمود. جهت Multiplex Nested PCR




**تصویر۱.** الکتروفورز محصول PCRI نمونه‌های مورد آزمایش با پرایمرهای اختصاصی جنس که نشان دهنده حضور قطعه‌ای در حدود ۸۴۰ بیس پیر و تأیید کننده جنس *کریپتوسپوریدیوم* می‌باشد. ستون سمت راست (۱) مارکر ۱۰۰ بیس پیر؛ ستون سمت چپ (۲) نمونه.




**تصویر۲.** الکتروفورز محصول PCRII نمونه‌های مورد آزمایش با پرایمرهای اختصاصی گونه که نشان دهنده حضور قطعه‌ای در حدود ۳۰۵bp و تأیید کننده حضور گونه *کریپتوسپوریدیوم پاروم* می‌باشد. ستون سمت راست مارکر Kb ۱ و ستون سمت چپ نمونه با اندازه تقریبی bp ۳۰۵.

*کریپتوسپوریدیوم* از ۶ جفت پرایمر اختصاصی استفاده گردید (۲۲). در مرحله اول با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی جنس کلیه ۵۵ نمونه مثبت از نظر میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند که در این مرحله قطعه‌ای به طول تقریبی ۸۴۰ بیس پیر از ژن ۱۸srRNA تکثیر و بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید که تأیید کننده حضور انگل *کریپتوسپوریدیوم* در حد جنس بود (تصویر ۱). در مرحله دوم با به کارگیری ۴ پرایمر فوروارد اختصاصی ۴ گونه و ریورز اختصاصی جهت جداسازی در حد جنس در یک واکنش (۵ پرایمر در یک واکنش مولتیپلکس) کلیه ۵۵ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفتند که در این مرحله در تمام نمونه‌ها قطعه‌ای به طول تقریبی ۳۰۵ بیس پیر تکثیر و بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید که تأیید کننده حضور گونه *کریپتوسپوریدیوم پاروم* بود (تصویر ۲).

## بحث

بررسی وضعیت مولکولار اپیدمیولوژی *کریپتوسپوریدیوم* و تعیین وفور ژنوتیپ‌های زئونوتیک و آنتروپونوتیک انگل در منطقه می‌تواند اطلاعات مفیدی جهت تصمیم‌گیری و برنامه‌ریزی‌های بهداشتی در خصوص کنترل و پیشگیری بیماری در منطقه فراهم نماید. تاکنون دو گونه از جنس *کریپتوسپوریدیوم* با نام‌های *کریپتوسپوریدیوم پاروم* و *کریپتوسپوریدیوم آندرسونی* شایع‌ترین گونه‌های شناسایی شده در گاوها و گوساله‌ها بوده‌اند. گونه اول شیوع بیش‌تری داشته و در دام‌های شیرخوار بیش‌تر با اسهال همراه است، اما *کریپتوسپوریدیوم آندرسونی* در گوساله‌های بالغ و جوان شیوع بیش‌تری دارد. گاو معمولاً با گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم ملهٔ آگریدیس*، *کریپتوسپوریدیوم رایانه*، *کریپتوسپوریدیوم بوویس* و *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* علاوه بر گونه پاروم نیز مبتلا می‌شود. مطالعات پیشین در آمریکا از وجود رابطه بین سن و بروز گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* حکایت می‌کند (۲۲،۲۶). آلودگی گاوها در کشورهای مختلف جهان متغیر بوده و مابین ۵ درصد تا ۴۱ درصد می‌باشد و به طور مثال در تحقیقی Huber و همکاران در سال ۲۰۰۷ خصوصیات ژنتیک و فیلوژنتیک جنس *کریپتوسپوریدیوم* را در تعدادی از حیوانات اهلی در برزیل بررسی کردند. در این مطالعه نمونه‌های مدفوع از جوجه‌ها، اردک‌ها، خوکچه‌ها، گوساله‌ها، سگ‌ها و گربه‌ها جمع‌آوری شد و اوسیست‌های استخراج شده به روش RFLP و با استفاده از توالی‌های ژن ۱۸srRNA مورد آنالیز قرار گرفتند که در یکی از گوساله‌ها *کریپتوسپوریدیوم پاروم* شناسایی شد (۱۵). Bajer در سال ۲۰۰۸ ضمن مطالعه‌ای روی عفونت *کریپتوسپوریدیوم* در انسان، حیوان و محیط زیست در لهستان گزارش کردند گاوها مهم‌ترین مخزن *کریپتوسپوریدیوم پاروم* هستند (۴). البته مطالعات انجام پذیرفته در مناطق مختلف ایران نشان دهنده آن است که میزان آلودگی به *کریپتوسپوریدیوم* در گاوهای ایران کمتر از سایر کشورها بوده و مابین ۱/۶۱ تا ۱۴/۹ درصد می‌باشد (۳،۲۱)، به طوری که در تحقیقات گذشته در ایران شیوع بیماری در گاوهای کرمان، بابل، اطراف تهران، اصفهان، سنندج و آمل را به‌ترتیب ۱۸/۹، ۷/۳۳، ۹، ۶۶/۲، ۴/۱ و ۳/۹۲ درصد گزارش نموده‌اند (۲۰).

در تحقیقات مقدماتی نشان داده شده بود که گوساله‌های شیرخوار بیشتر با *کریپتوسپوریدیوم پاروم* و گوساله‌های از شیر گرفته شده بیشتر با *کریپتوسپوریدیوم بوویس* و *کریپتوسپوریدیوم رایانه* آلوده می‌شوند و *کریپتوسپوریدیوم اندرسونی* بیشتر در گوساله‌های سن‌دار و بالغ دیده شده است و مطالعات بعدی نیز نشان دهنده این مطلب بودند و بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که در گوساله‌های شیرخوار بیشترین میزان ابتلا با *کریپتوسپوریدیوم پاروم* دیده می‌شود (۱۲) که تحقیق حاضر نیز موید این مطلب بود. مطالعات جدید مولکولی حاکی از آن است که گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم هومینیس* و *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در ایجاد آلودگی انسان دارای نقش می‌باشند و *کریپتوسپوریدیوم پاروم* می‌تواند در گاو و انسان بیماری ایجاد کند و به‌عنوان تنها گونه‌ای از *کریپتوسپوریدیوم* می‌باشد که از نظر ایجاد بیماری مشترک با منشاء دامی مطرح می‌باشد. این موضوع اهمیت نقش گاو (به ویژه گوساله‌های شیری) را به عنوان یک منبع مهم آلودگی برای جوامع انسانی در ایران را مطرح می‌کند (۱۴). تماس با گوساله‌های آلوده عامل بسیاری از همه‌گیری‌های کریپتوسپوریدیایی در دانشجویان دامپزشکی، کارشناسان آزمایشگاهی و تحقیقاتی و کودکانی که با مزارع پرورش گاو در ارتباط بوده‌اند، در نظر گرفته شده است. آلوده شدن آب و مواد غذایی مورد استفاده انسان با مدفوع گاو عامل بسیاری از همه‌گیری‌های کریپتوسپوریدیوزیس ناشی از آب و غذا بوده است (۲۷).

به نظر می‌رسد که آلودگی به تک‌یاخته فوق تحت تأثیر عوامل متعددی قرار دارد که در این خصوص می‌توان به مدیریت پرورش دام به‌ویژه تراکم، تغذیه بد، شرایط بهداشتی نامناسب و هم‌چنین نوع بستر اشاره نمود. داروهایی مانند پاروموماسین، اسپیرومایسین و نیتازوکسانید نیز جهت کنترل دفع انگل مؤثر بوده و به دامداران منطقه توصیه می‌گردد با نظر دامپزشک جهت پیشگیری از آلودگی

بیش‌تر گوساله‌ها از این داروها استفاده نمایند. مدیریت نگه‌داری دام در کاهش آلودگی تأثیر بسزایی دارد. پس تمیز نگه داشتن محل زندگی دام از مدفوع، خشک نگه داشتن محل و ضدعفونی با محلول آمونیوم ۵ درصد توصیه می‌گردد. جلوگیری از تراکم بیش از حد دام در یک مکان بسته و جدا کردن دام‌های بالغ از دام‌های جوان‌تر باعث کاهش انتقال عفونت می‌گردد، زیرا انتقال آلودگی به دام‌های کم سن‌تر توسط دام‌های بالغ صورت گرفته و به علت حساس بودن نوزادان شیوع عفونت در آن‌ها بیش‌تر می‌باشد. توصیه می‌گردد نوزادان و دام‌های بالغ که دچار اسهال هستند از سایر دام‌ها جدا شده و نوزادان تازه متولد شده از خوردن آغوز مادر محروم نگردند.

## سپاسگزاری

از کلیه همکارانی که تسهیلات لازم برای اجرای این پروژه را فراهم نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم. کلیه هزینه‌های این تحقیق در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ثبت ۰۲۹-۹۵۰۲۳۶-۲-۱۸-۱۸ تأمین مالی و علاوه بر آن فضا و تجهیزات آزمایشگاهی نیز توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی فراهم گردیده است.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References


1. Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F. (2003). Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. J Clin Microbiol, 41(6), 2744–2747. https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003 PMID: 12791920
2. Awad-El-Kariem, F.M., Robinson, H.A., Petry, F., McDonald, V., Evans, D., Casemore, D. (1998). Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. Parasitol Res, 84(4), 297–301. https://doi.org/10.1007/s004360050399
3. Azami, M. (2007). Prevalence of *cryptosporidium* infection in cattle in Isfahan, Iran. J Eukaryot Microbiol, 54(1), 100–102. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00236.x
4. Bajer, A. (2008). *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. Parasitol Res, 104(1), 1–17. https://doi.org/10.1007/s00436-008-1179-x
5. Barker, I.K., Carbonell, P.L. (1974). *Cryptosporidium agni* sp. n. from lambs, and *Cryptosporidium bovis* sp. n. from a calf, with observations on the oocyst. Parasitol Res, 44(4), 289–298. https://doi.org/10.1007/BF00366112
6. Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., Van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol, 28(3), 495–503. PMID: 1691208
7. Cama, V.A., Bern, C., Roberts, J., Cabrera, L., Sterling, C.R., Ortega, Y., Gilman, R.H., Xiao, L. (2008). *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. Emerg Infect Dis, 14(10), 1567. https://doi.org/10.3201/eid1410.071273 PMID: 18826821
8. Cama, V.A., Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Ñavincopa, M., Williamson, J. (2007). Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. J Infect Dis, 196(5), 684–691. https://doi.org/10.1086/ 519842
9. Dalimi, A., Tahvildar, f., Kazemi, B. (2015). Molecular identification of *Cryptosporidium andersoni* in Shahriar calves. Vet J (Pajouhesh va Sazandegi), 28(2), 24–30.
10. Enemark, H.L., Ahrens, P., Lowery, C.J., Thamsborg, S.M., Enemark, J.M.D., Bille-Hansen, V., Lind, P. (2002). *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. Vet Parasitol, 107(1), 37–49. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00083-3
11. Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). Vet Parasitol, 156(3), 191–198. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.024
12. Fayer, R., Santín, M., Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). J Parasitol, 91(3), 624–629. https://doi.org/10.1645/GE-3435
13. Fayer, R., Xiao, L. (200). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. (2nd ed.) CRC Press, Boca Raton, FL. p. 1-527.
14. Heidari H, G.J. (2012). Study of cryptosporidium infection in the livestock (Cattle, Sheep, Dogs, Fowls) and humans, in Hamadan city and its suburbs during 2006-2011. Avicenna J Clin Med, 19(3), 67–74.
15. Huber, F., Da Silva, S., Bomfim, T.C.B., Teixeira, K.R.S., Bello, A.R. (2007). Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. Vet Parasitol, 150(1), 65–74. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.018
16. Morgan, U.M., Xiao, L., Sulaiman, I., Weber, R., Lal, A.A., Thompson, R.C.A., Deplazes, P. (1999). Which genotypes/species of *Cryptosporidium* are humans susceptible to?. J Eukaryot Microbiol, 46(5), 42S - 43S. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb06056.x
17. Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hdjawi, N., Sulaian, I., Payer, R., Thompson, R.C.A., Olson, M., Lal, A., Xia, L. (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from humans, Homo sapiens. J Eukaryot Microbiology, 49(6), 433–440. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00224.x
18. Nazemalhosseini Mojarad, E., Taghipour, N., Haghighi, A., Keshavarz, A., Rostami Nejad, M., Z.M.R. (2011). DNA fingerprinting of bovine cryptosporidium isolates in Qazvin province, Iran. Koomesh, 12(4), 408–412.
19. Peng, M.M., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, M.J., Escalante, A.A., Weltman, A.C., Ong, C.S., Mac Kenzie, W.R., Lal, A.A., Beard, C.B. (1997). Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. Emerg Infect Dis, 3(4), 567. https://doi.org/10.3201/eid0304.970423 PMID: 9366611
20. Ranjbar-Bahadori Sh., A.M., T. M. (2013). Study on the infection rate to cryptosporidium in suckling calves of Ghuchan district. Iran Vet J, 9(40), 62-68.
21. Safavi, E.A., Mohammadi, G.R., Naghibi, A., Rad, M. (2011). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection in some dairy Herds

of Mashhad (Iran) and its association with diarrhea in newborn calves. Comp Clin Path, 20(2), 103–107. https://doi.org/10.1007/s00580-010-0956-y

22. Thomson, S., Innes, E.A., Jonsson, N.N., Katzer, F. (2016). A multiplex PCR test to identify four common cattle-adapted *Cryptosporidium* species. Parasitol Open, 2, e5. Published by Cambridge University Press, 22 April 2016. https://doi.org/10.1017/pao.2016.2
23. Thomson, S., Innes, E.A., Jonsson, N.N., Katzer, F. (2019). A multiplex PCR test to identify four common cattle-adapted *Cryptosporidium* species - corrigendum. Parasitology Open 5, e1, 1. https://doi.org/10.1017/pao.2018.16
24. Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H., Lal, A.A. (2001). Identification of 5 types of *Cryptosporidium parasites* in children in Lima, Peru. J Infect Dis, 183(3), 492–497. https://doi.org/10.1086/318090
25. Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J. (2004). Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev, 17(1), 72–97. https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.72-97.2004 PMID: 14726456
26. Xiao, L., Feng, Y. (2008). Zoonotic cryptosporidiosis. FEMS Immunol Med Microbiol, 52(3), 309–323. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00377.x
27. Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T.K., Gradus, S., Lal, A. (2001). Molecular characterization of *Cryptosporidium oocysts* in samples of raw surface water and wastewater. Appl Environ Microbiol, 67(3), 1097–1101. https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1097-1101.2001 PMID: 11229897

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 75, Number 3, 2020
Original Article

# Isolation, Characterization and Molecular Identification of *Cryptosporidium spp.* Causing Diarrhea in Young Calves by Multiplex Nested-PCR

**Vahid Nasiri, Farnoosh Jameie, Habibollah Paykari**

*Laboratory of Protozoology, Department of Parasitology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran*

10.22059/jvr.2019.273077.2886

***Received:*** *26 February 2020,* ***Accepted:*** *13 May 2020*

## *Abstract*

**BACKGROUND**: Diagnosis of *Cryptosporidium* species based on morphological characteristics is very limited and has no taxonomic value alone, and therefore the use of molecular methods removes these limitations to some extent.

**OBJECTIVES**: The aim of this study was to determine the predominant *Cryptosporidium* genotypes in calves with diarrhea.

**METHODS**: Study were conducted in calves aged less than 3 months for a period of 2 years. During the study period, 160 dung samples were collected from neonatal calves and examined first microscopically and then by molecular techniques. Stools were analyzed for the presence of *Cryptosporidium* oocysts by Sheather's Sugar Flotation Solution followed by Ziel-Neelsen staining method. DNA of parasite was extracted and multiplex nested-PCR protocol basis on the 18srRNA were done to identify three cattle-adapted species (*C. andersoni, C. bovis and C. ryanae*) plus the zoonotic species *C. parvum*.

**RESULTS**: 110 fecal samples were collected from livestock in Alborz province and 50 fecal samples were collected from livestock in Shahroud city. Of the 160 animals examined, 90 were female and 70 were male. In total, out of 160 animals examined, 85 cases (53.12%) had diarrhea, of which 55 cases (34.37%) were positive using Ziel-Neelsen staining. Since all positive cases were related to diarrhea samples and related to calves under one month old, a significant relationship was observed between diarrhea status and the presence of this parasite ($P$<0.05). In terms of seasonal distribution, no difference was observed in the rate of diarrhea and positive parasitic cases. The presence of 305 bp band in all Ziel-Neelsen positive samples confirmed the presence of *C. parvum* in all samples.

**CONCLUSIONS**: Neonatal calves are more likely to be infected with *Cryptosporidium parvum*, as confirmed by the present study.

**Keywords**: Intestinal parasites, *Cryptosporidium*, Diarrhea, Calves, Multiplex PCR

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

**Corresponding author's email:** v.nasiri@rvsri.ac.ir Tel/Fax: 026-34570038-46/026-34552194

**How to cite this article:**

Nasiri, V., Jameie, F., Paykari, H. (2020). Isolation, Characterization and Molecular Identification of *Cryptosporidium spp*. Causing Diarrhea in Young Calves by Multiplex Nested-PCR. J Vet Res, 75(3), 271-279. https://doi.org/10.22059/jvr.2019.273077.2886

## Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Primers used to isolate different species of cryptosporidium in cattle (Thomson et al., 2016; Thomson, 2016).
**Table 2.** Program of PCR steps used to isolate different species of *Cryptosporidium* in cattle.
**Table 3.** Research characteristics based on different factors such as livestock sex, sampling season and livestock age.
**Table 4.** Characteristics of the studied samples in terms of consistency and positive results.
**Figure 1.** The PCRI electrophoresis of the tested specimens with genus specific primers that indicates the presence of a fraction of about 840 bp and confirms the genus of the *Cryptosporidium*. The right Column (1): 100bp Marker; The left Column (2): the sample.
**Figure 2.** The PCRII electrophoresis of the tested specimens with species specific primers that indicates the presence of a fragment of about 305 bp and confirms the presence of the *Cryptosporidium parvum* species. The right column: the 1Kb Marker; and the left column: the sample with an approximate size of 305 bp.