

جداسازی و شناسایی تک‌یاخته کریپتوسپورییدیوم در اسهال گوساله در استان البرز

غلامرضا کریمی^{۱*}، حبیب اله پایکاری^۱، شهلا ریواز^۱، وحید نصیری^۱، محمد عبدی گودرزی^۱، محمد مهدی رنجبر^۱

۱- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۰۷ مهر ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۹ آبان ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲ بهمن ۱۳۹۸

چکیده

کریپتوسپورییدیوز یک بیماری انگلی است که به وسیله تک‌یاخته‌ای از جنس کریپتوسپورییدیوم (*Cryptosporidium*) در جانوران ایجاد می‌شود. این انگل در دام‌ها به ویژه نشخوارکنندگان، سندرم‌های اسهال نوزادان را به وجود می‌آورد. منبع مستقیم و عمده آلودگی، مدفوع حاوی اووسیست و انتقال از راه دهان می‌باشد. هدف از این پروژه جداسازی و شناسایی گونه‌های تک‌یاخته کریپتوسپورییدیوم به روش ریخت‌شناسی در اسهال گوساله‌ها به منظور پیشگیری و کنترل بیماری بوده است. تخلیص اووسیست از مدفوع با استفاده از تکنیک شناورسازی، رنگ‌آمیزی با روش زیل نیلسون اصلاح شده (روش هنریکسن) و شناسایی با کلیدهای تشخیصی انجام شده است. بدین منظور، از گوساله‌های مبتلا به اسهال و بدون اسهال در استان البرز به ترتیب ۱۵۰ و ۵۰ نمونه مدفوع به طور تصادفی جمع‌آوری گردید. از تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی جمع‌آوری شده به صورت تصادفی، تعداد ۶۰ نمونه مثبت بود که ۴۰ درصد آلودگی را نشان می‌دهد. در هیچ یک از نمونه‌های مدفوع بدون اسهال گوساله‌ها (۵۰ نمونه) انگلی (اووسیست) مشاهده نشد. در گوساله‌های زیر یک ماه مبتلا به اسهال به ویژه در دو هفته اول ۴۰ درصد آلودگی مشاهده شد که ناشی از کریپتوسپورییدیوم پاروم بود. در کشور ایران تلفات گوساله‌ها ۱۲-۲۰ درصد (متوسط ۱۶ درصد) می‌باشد که از این تلفات ۱۶ درصدی حدود ۷۵ درصد را سندرم اسهال به خودش اختصاص می‌دهد و یکی از تک‌یاخته‌های مهم که موجب اسهال می‌شود انگل کریپتوسپورییدیوم است. در بررسی حاضر نمونه‌های مدفوع بدون اسهال گوساله‌ها انگلی نداشتند و در گوساله‌های زیر یک ماه مبتلا به اسهال به ویژه در دو هفته اول ۴۰ درصد آلودگی مشاهده شد.

واژگان کلیدی: جداسازی، شناسایی، کریپتوسپورییدیوم، اسهال گوساله‌ها، استان البرز

مقدمه

اسهال گوساله‌ها یکی از عوامل مهم مرگ و میر، کاهش بهره‌دهی و از بین رفتن منابع پروتئینی حیوانی است و خسارات اقتصادی ناشی از مرگ و میر، لاغری، هزینه‌های درمان و کاهش شیر مادران است. عواملی چون ویروس‌ها، باکتری‌ها، تک‌یاخته‌ها، قارچ‌ها و تغذیه باعث آن می‌شوند. میانگن تلفات گوساله‌ها در ایران ۱۶ درصد می‌باشد که ۷۵ درصد آن را سندرم اسهال به خودش اختصاص می‌دهد. کریپتوسپوریدیوز یک بیماری انگلی است که به وسیله تک‌یاخته‌ای از جنس کریپتوسپوریدیوم در جانوران ایجاد می‌شود. این انگل برای مهره‌داران از جمله پستانداران، پرندگان، خزندگان و ماهیان بیماری‌زا می‌باشد. در دام‌ها به ویژه نشخوارکنندگان سندرم‌های اسهال نوزادان را به وجود می‌آورد (۱۰). علاوه بر اهمیت پزشکی آن، آلودگی در حیوانات ممکن است باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی به دلیل میزان ابتلای فراوان و گاهی اوقات کاهش شدید رشد و در نتیجه لاغری و حالت ضعف عمومی حیوانات مبتلا شود (۱۲، ۱۶). ۹۰ درصد گاوداری‌ها و بیش از ۵۰ درصد گوساله‌های یک گاوداری می‌تواند آلوده باشد. توان بقای جرم در میزبان برای تمام طول زندگی دائم انسان آلوده، روش زیاد شدن آن در فرد آلوده، تکرار آلودگی در داخل بدن موجود آلوده، تعداد و تنوع فراوان میزبان و زنده ماندن طولانی در محیط زیست باعث شده که مبارزه بیولوژیک با این تک‌یاخته غیر ممکن شود. کریپتوسپوریدیوم پارووم تنها در روده کوچک تکامل می‌یابد و اووسیست‌های آن کوچکتر از کریپتوسپوریدیوم موریس است. به تنهایی باعث بیماری بالینی در گوساله‌های جوان می‌شود و زمان عفونت نهفته آن ۳ تا ۶ روز می‌باشد (۱۶).

کریپتوسپوریدیوم برای اولین بار در سال ۱۹۰۷ توسط Tyzzer در غدد معدی موش از ایالات متحده

امریکا گزارش شد (۱۷). در سال ۱۹۷۱ در نوع گاو و در سال ۱۹۷۶ در انسان مورد شناسایی قرار گرفت. از ۱۹۷۸ میلادی به بعد اهمیت یافت و از تمام دام‌ها و انسان گزارش شد. کریپتوسپوریدیوز در گونه‌های مختلف پستانداران اهلی و وحشی، پرندگان و به ندرت خزندگان و ماهی‌ها گزارش شده است (جدول شماره ۱) (۳، ۱۵). کریپتوسپوریدیوم در ایران برای اولین بار در گوساله توسط قراگوزلو در سال ۱۳۶۳ گزارش شده است. در پستانداران دو نوع کریپتوسپوریدیوم که شامل کریپتوسپوریدیوم پاروم و کریپتوسپوریدیوم آندرسونی می‌باشد از اهمیت خاصی برخوردارند. کریپتوسپوریدیوز از نقاط مختلف جهان گزارش شده و می‌توان گفت یک بیماری جهانی است.

در دام‌های بزرگ روش آلوده شدن با لیسیدن بافت‌های پوششی خارجی پوست و اشیاء آلوده به اووسیست، مکیدن بافت‌های سر پستانک، بند ناف، نوشیدن آب یا شیر آلوده و پوز زدن یا خوردن مواد مغذی و غیر مغذی آلوده می‌باشد.

در حیوانات جوان اسهال‌های مقاوم یکی از عوارض بالینی انگل محسوب می‌شود و حیوانات کم سن و بره‌ها را می‌کشد. علائم درمانگاهی شامل اسهال آبکی که اغلب بدبو است و تبدیل به موکوسی زرد یا سبز و بسیار زیاد می‌شود که ۲ تا ۱۴ روز طول می‌کشد، بی‌اشتهایی، افسردگی، درد، دهیدراتاسیون و از دست دادن وزن به همراه تب می‌باشد. در اسهال حاد با دفع غیر طبیعی مدفوع، کم‌آبی پیشرونده و مرگ به فاصله چند روز مشخص می‌شود. دوره کمون بین ۲ تا ۱۰ روز می‌باشد. آلودگی اغلب موارد مربوط به کریپتوسپوریدیوم پاروومی‌باشد اگر چه آلودگی شیردان با کریپتوسپوریدیوم موریس در گاوهای گوشتی مشاهده شده است. کریپتوسپوریدیوم پارووم به

یک مولار به آن اضافه شده و محلول حاصل به لوله آزمایش منتقل و پس از سانتریفیوژ قسمت رویی به لوله استریل دیگر منتقل و دوباره سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب حاصله از سانتریفیوژ با ۱ سی‌سی نرمال سالین مخلوط شد. از نمونه‌های مستقیم مدفوع و نمونه‌های تغلیظ شده اووسیست گسترش تهیه نموده و به روش زیل نیلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی کرد و مورد بررسی قرار گرفت.

ذخیره اووسیست‌ها به صورت زنده: جهت

حفظ اووسیست‌های احتمالی به صورت زنده، یا در صورت تغلیظ و تشخیص اووسیست‌ها، مقداری از نمونه مدفوع یا سوسپانسیون اووسیست را در داخل محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد مخلوط کرده و در یخچال ۴ درجه نگهداری کرده‌اند. اووسیست‌های زنده در صورت لزوم، برای آلوده‌سازی و تکثیر در تخم‌مرغ جنین‌دار یا حیوان آزمایشگاهی استفاده خواهد شد.

رنگ‌آمیزی با روش زیل نیلسون اصلاح

شده (روش هنریکسن): روش زیل نیلسون سرد اصلاح شده که اولین بار توسط هنریکسن و پوهلنز ارائه شد و تغییرات دیگری پس از آن هم پیشنهاد شده است به صورت گسترده برای رنگ‌آمیزی اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم استفاده می‌شود:

- ۱- تهیه اسمیر از مدفوع در اسلاید
- ۲- خشک کردن آن در دمای اتاق
- ۳- ثابت کردن (فیکس) با متانول ۹۶ درصد به مدت ۲ تا ۶ دقیقه
- ۴- خشک کردن آن در دمای اتاق
- ۵- ثابت کردن (فیکس) مختصر با حرارت
- ۶- کربول فوشین غلیظ به مدت ۲۰ تا ۶۰ دقیقه

۷- شستشوی کامل و رنگ‌زدایی خفیف با اسیدکلریدریک یک درصد در الکل اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه (یک سی‌سی

تنهایی باعث بیماری بالینی در گوساله‌های جوان می‌شود و زمان عفونت نهفته آن ۳ تا ۶ روز می‌باشد (۱۲). در گاوها، این بیماری انگلی معمولاً گوساله‌های کوچکتر از یک ماه (۵ تا ۱۰ روزه) را مبتلا می‌کند و بخشی از کمپلکس اسهال نوزادان را تشکیل می‌دهد. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی گونه‌های تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم به روش ریخت‌شناسی در اسهال گوساله‌ها به منظور پیشگیری و کنترل بیماری بوده است. در این مطالعه در نظر است با جداسازی و شناسایی گونه‌های بیماری‌زای کریپتوسپوریدیوم با روش ریخت‌شناسی در نمونه‌های ارسالی گوساله‌های جوان گامی مطمئن در راه مبارزه با مشکل برداشته شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: چند گاوداری به طور تصادفی از مناطق مختلف البرز مانند ماهدشت، کردان، ساوجبلاغ و نظرآباد انتخاب شد و یکصد و پنجاه نمونه مدفوع از گوساله‌های جوان مبتلا به اسهال و ۵۰ نمونه هم از موارد بدون علامت به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. روش نمونه‌گیری از رکتوم با استفاده از دستکش یک بار مصرف و انتقال به ظروف پلاستیکی درب‌دار صورت گرفت و مشخصات و تاریخچه گله و گوساله مورد نمونه‌برداری شامل سن، جنس، علائم بالینی و غیره. ثبت شد و نمونه‌های مدفوع تحت شرایط مناسب کنار یخ به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل شدند.

آماده‌سازی نمونه: تخلیص اووسیست از

مدفوع با استفاده از تکنیک شناورسازی با کمک شکر یا نمک اشباع انجام شد. طبق روش Casemore و همکاران (۲)، مقدار ۵ سی‌سی از مدفوع گوساله‌ها را با ۱۰ سی‌سی فسفات بافر سالین اضافه و مخلوط و سوسپانسیون را از چند لایه گاز استریل عبور داده‌اند و ۵ سی‌سی از محلول سوکروز

اسیدکلریدریک در ۹۹ سی سی اتانول).

۸- شستشوی اسلاید در با آب

۹- رنگ آمیزی با مالاشیت گرین ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه

۱۰- شستشو با آب

تشخیص: برای تشخیص اولیه، ابتدا گسترشها با عدسی شیئی ۴۰ حداقل ۵۰ میدان میکروسکوپی و موارد مشکوک با عدسی ۱۰۰ ایمرسیون بررسی می شوند و اگر حتی یک اووسیست در گسترش مشاهده شود، نمونه مثبت تلقی می شود. برای تشخیص و تأیید نهایی اووسیستها و مشاهده اسپوروزوئیتها، کلیه گسترشهای مثبت با عدسی ۱۰۰ هم بررسی می شوند.

جهت طبقه بندی شدت آلودگی، اووسیستها با درشت نمائی عدسی شیئی ۴۰ مشاهده و بررسی شدند و تعداد اووسیستها در ۳ تا ۵ میدان میکروسکوپی شمارش شد و میانگین شدت آلودگی را با (+)، (++)، (+++) به طریق زیر بیان شد:

۱) با مشاهده ۱ تا ۴ اووسیست انگل در هر میدان (+)، آلودگی خفیف گزارش شد.

۲) با مشاهده ۵ تا ۲۵ اووسیست انگل در هر میدان (++)، آلودگی ملایم گزارش شد.

۳) با مشاهده بیش از ۲۵ اووسیست انگل در هر میدان (+++)، آلودگی شدید گزارش شد.

نتایج

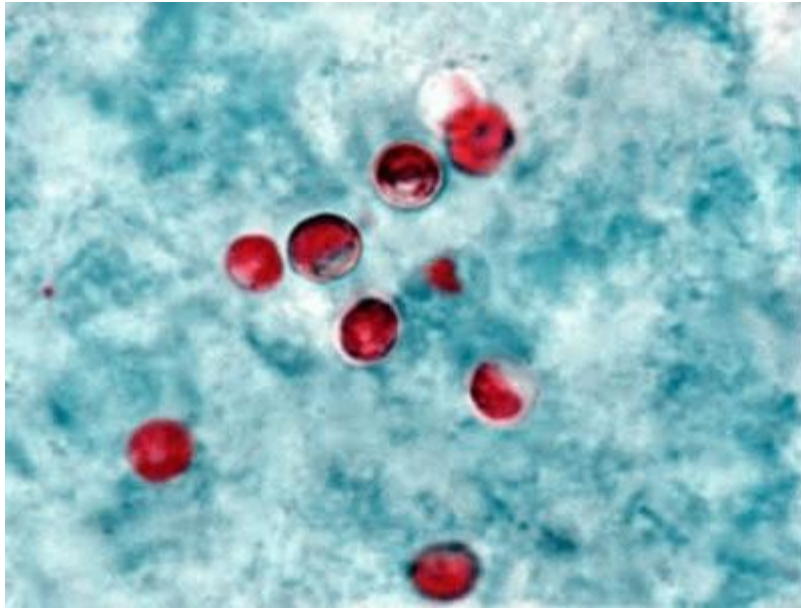
از تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی جمع آوری شده از استان البرز به صورت تصادفی در سال های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶، تعداد ۶۰ نمونه مثبت بود که ۴۰ درصد آلودگی را نشان می دهد. رنگ آمیزی با روش

زیل نیلسون اصلاح شده انجام شده و ۱ تا ۴ اووسیست انگل در هر میدان (+)، ۵ تا ۲۵ اووسیست انگل در هر میدان (++) و بیش از ۲۵ اووسیست انگل در هر میدان (+++) در نظر گرفته شده است. معمولاً با مشاهده انگل در ۳ تا ۵ میدان میکروسکوپی و میانگین آن نتیجه اعلام می شود. حضور بیش از ۲۵ اووسیست در هر میدان اغلب همراه با علائم بالینی می باشد و چنانچه در گوساله اسهالی در هر میدان میکروسکوپی بیش از ۲۰ اووسیست شمارش شود یا شمارش تخمها آن گونه باشد که در هر گرم مدفوع $10^6 \times 4$ عدد اووسیست وجود داشته باشد. می توان اسهال را کریپتوسپوریدیایی تلقی نمود. تجزیه و تحلیل داده ها به صورت درصدگیری ساده انجام شده است.

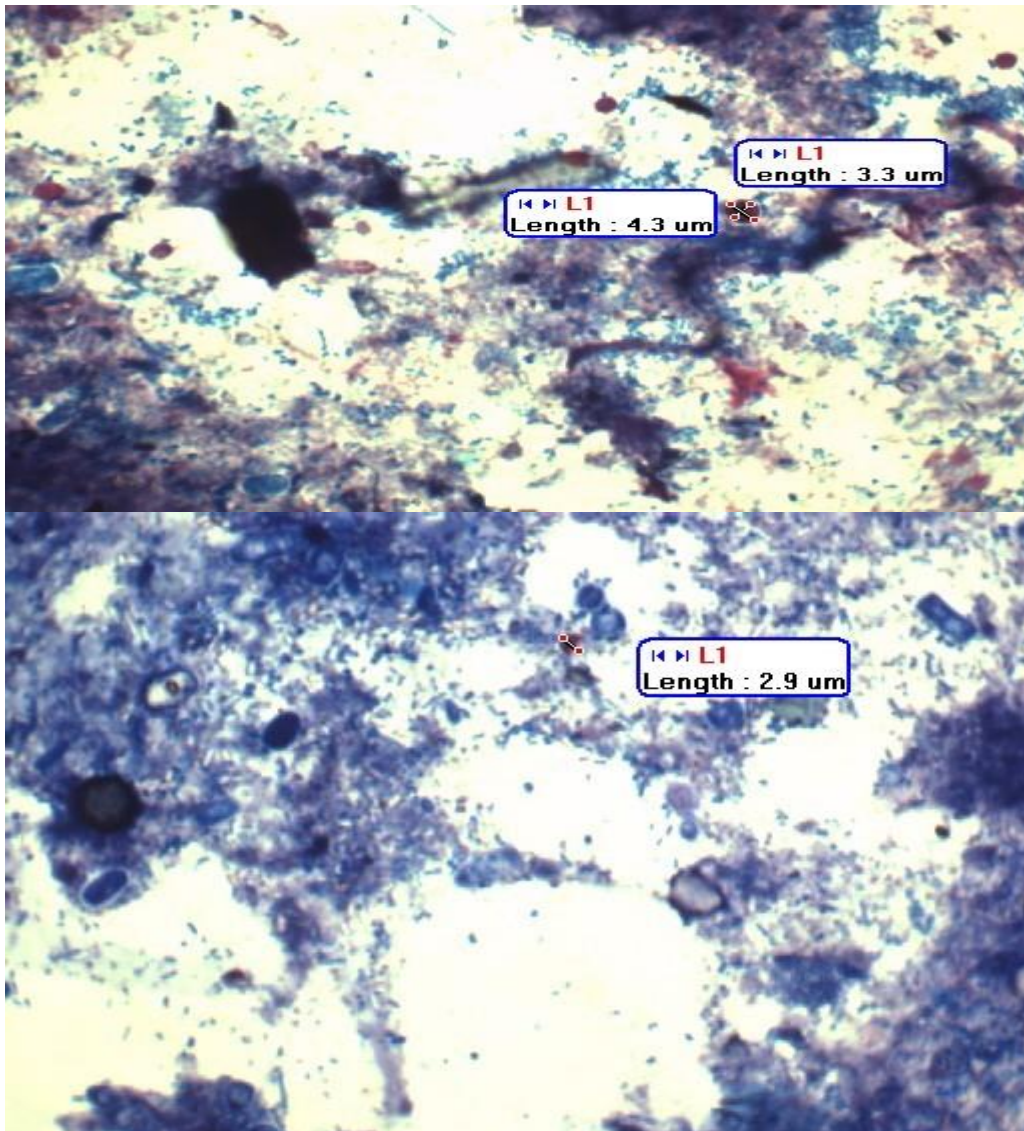
در این تحقیق اندازه اووسیستها گرفته شد (جدول ۱) و با گزارش های دیگر محققین مقایسه شده است.

اندازه کریپتوسپوریدیوم موریس ۷/۴-۵/۶، اندازه کریپتوسپوریدیوم پارووم ۶-۴ میکرون، کریپتوسپوریدیوم آندرسونی ۷/۵-۴/۵ میکرون می باشد. اندازه کریپتوسپوریدیوم ریانی ۷/۳-۲/۳ میکرون و کریپتوسپوریدیوم هومینیس ۴/۴-۳/۹ میکرون است.

در کلیه نمونه های مدفوع بدون اسهال گوساله ها انگلی (اووسیست) مشاهده نشد. در گوساله های زیر یک ماه به ویژه دو هفته اول ۴۰ درصد آلودگی مشاهده شد که به نظر کریپتوسپوریدیوم پارووم می باشد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- نمونه مثبت تشخیص داده شده در رنگ آمیزی زیل نیلسون اصلاح شده



شکل ۲- نمونه‌های اندازه‌گیری شده با میکروسکوپ نوری (۱۳۹۶-۱۳۹۷).

جدول شماره ۱- طول و عرض اوویسیست‌های اندازه‌گیری شده با میکروسکوپ نوری (۱۳۹۶-۱۳۹۷).

	length	Width		length	Width
1	4.6	4.5	21	4.6	3.7
2	4.6	3.8	22	4.9	4.2
3	4.9	4.6	23	4.5	3.8
4	3.4	3	24	4.5	3.9
5	3.6	3.5	25	5.1	4.5
6	5.0	4.4	26	4.4	4.1
7	4.6	4.2	27	4.8	4.4
8	4.7	4	28	4.4	4.3
9	4.5	3.6	29	3.9	3.2
10	3.8	3.6	30	4.9	3.2
11	3.9	3.4	31	4.7	3.1
12	3.9	3.0	32	4.0	3.2
13	3.8	3.1	33	4.7	4.1
14	4.0	3.2	34	4.1	3.5
15	4.4	4.3	35	4.4	4.1
16	3.9	3.8	36	4.5	3.9
17	4.0	3.8	37	4.7	4.0
18	4.3	3.6	38	3.9	3.5
19	4.4	4.3	39	4.7	4.1
20	4.2	3.7	40	3.3	3.1

بحث و نتیجه‌گیری

اسهال ناشی از کریپتوسپوریديوز در گوساله‌های نوزاد یکی از مشکلات مهم بهداشتی می‌باشد و موجب خسارات شدید اقتصادی می‌شود. اسهال گوساله‌ها یکی از عوامل مهم مرگ و میر و کاهش بهره‌دهی و از بین رفتن منابع پروتئینی حیوانی است و خسارات اقتصادی آن ناشی از مرگ و میر، لاغری، هزینه درمان و کاهش شیر مادران می‌باشد (۱۰). نزدیک به ۴۰ تا ۵۰ درصد گوساله‌ها در خلال اولین ماه زندگی خود مبتلا به اسهال می‌شوند. در کشور ما تلفات گوساله‌ها ۲۰-۱۲ درصد (متوسط ۱۶ درصد) می‌باشد که از این تلفات ۱۶ درصدی حدود ۷۵ درصد را سندرم اسهال به خودش اختصاص می‌دهد. یکی از تک‌یاخته‌های مهم که موجب اسهال می‌شود این انگل است. اختصاصی نیست و یکی از بیماری‌های مشترک نوپدید بین انسان و حیوان تلقی می‌شود و این مسأله و عدم درمان مؤثر بر ضد آن اهمیت این بیماری را دو چندان می‌کند.

کریپتوسپوریديوز از نقاط مختلف جهان گزارش شده است و می‌توان گفت یک بیماری جهانی است. در گونه‌های مختلف پستانداران اهلی و وحشی، پرندگان و به ندرت خزندگان و ماهی‌ها گزارش شده است. در اروپا ۸ گونه کریپتوسپوریديوم در گاو گزارش شده است که عبارتند از: کریپتوسپوریديوم پارووم، آندرسونی، بوویس، ریانی، فلیس، هومینیس، مله اگریدیس و سوئیس. مطالعات کتابخانه‌ای نشان‌دهنده ۴ نوع کریپتوسپوریديوم در ایران می‌باشد که کریپتوسپوریديوم پارووم در پستاندارانی چون گاو (گوساله‌های جوان)، گوسفند، بز، اسب، موش، خوک و انسان بوده و کریپتوسپوریديوم بوویس، کریپتوسپوریديوم آندرسونی و کریپتوسپوریديوم ریانی در گوساله‌هایی که از شیر گرفته شده‌اند، گزارش شده است. کریپتوسپوریديوم آندرسونی در گاوهای بالغ وجود دارد.

در بررسی عزیزی و همکاران مشخص شد که در گوساله‌های آلوده میزان بروز اسهال ۲/۳ برابر بیشتر از گوساله‌های غیر آلوده است (۱). اغلب موارد

رضازاده و همکاران در سال ۱۳۸۱ در یک واحد شیری اطراف تهران میزان آلودگی در گوساله‌های مبتلا به اسهال را ۲/۱ درصد و در گوساله‌های ظاهراً سالم صفر درصد گزارش کردند (۱۴).

محبعلی و همکاران در سال ۱۳۷۸ میزان آلودگی در گوساله‌های ظاهراً سالم در گاوداری‌های اسلام شهر را ۱۲/۷ درصد گزارش کردند (۷). بنابر مطالعات ملکی و نایب زاده در سال ۱۳۸۶ در شهرستان خرم آباد میزان آلودگی در گاوها و گوساله‌های اسهالی و غیر اسهالی در چهار فصل یکسان بوده است، طبق این مطالعه در جمعیت دام‌های بدون اسهال، گاوهای بالغ بالاترین میزان آلودگی (۲۳/۷۵ درصد) و در جمعیت دام‌های مبتلا به اسهال گوساله‌ها بالاترین میزان آلودگی (۲۱/۸ درصد) را نشان دادند. بنابر همین بررسی درصد آلودگی در دام‌های مزبور در خرم آباد ۱۷/۵ درصد بوده است (۶). در مطالعه‌ای که توسط نورمحمدزاده و همکاران در سال ۱۳۸۹ در آذربایجان شرقی انجام شد میزان شیوع آلودگی در نمونه‌های مدفوع در گوساله‌های مبتلا به اسهال ۴۰/۴ درصد بود (۱۰). در بررسی حاضر نمونه‌های مدفوع بدون اسهال گوساله‌ها انگلی نداشتند و در گوساله‌های مبتلا به اسهال زیر یک ماه به ویژه در دو هفته اول ۴۰ درصد آلودگی مشاهده شد.

گزارش شده مربوط به گاو و گوسفند و بز می‌باشد اما در دیگر دام‌ها نیز مانند شتر می‌توانند به عنوان یک مخزن عمل نموده و سبب انتقال تک‌یاخته به حیوانات دیگر شوند (۱۳). گرچه وجود کریپتوسپورییدیوم در مدفوع دام همواره نشانه بیماری نمی‌باشد اما در دام‌های اسهالی آلودگی به این تک‌یاخته می‌تواند سیر بیماری را وخیم‌تر سازد. در بررسی رنجبر بهادری و علیاری در سال ۱۳۹۰ آلودگی عمدتاً در گوساله‌های زیر ۲ ماه گزارش شد (۱۱). فتوحی اردکانی و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز کریپتوسپورییدیوز را در ۱۸/۹ درصد گاوهای مورد بررسی گزارش نمودند که البته در این تحقیق نیز سن حیوان از عوامل تأثیرگذار بر آلودگی محسوب می‌شود و گوساله‌های شیرخوار با سن زیر ۲ ماه با شیوع ۳۳/۶ درصد بیشترین میزان آلودگی را نشان دادند (۴).

مخبر دزفولی و مشکی در سال ۱۳۸۱ میزان آلودگی در جمعیت گاوهای تحت مطالعه بدون اسهال را ۱۱ درصد گزارش کرده‌اند، آنها میزان آلودگی در گوساله‌های اسهالی زیر ۳ ماه را ۲۰ درصد و میزان آلودگی در گوساله‌های کمتر از ۳ ماه بدون اسهال را ۲۴ درصد گزارش کرده‌اند (۸، ۹). لطف‌الله زاده و همکاران در سال ۱۳۸۳ میزان آلودگی در گوساله‌های اسهالی زیر یک ماه سن در قائم شهر و بابل را ۲۲/۸ درصد گزارش کرده‌اند (۵).

References

- 1- Azizi H R, Pour Jafar M, Dabaghzadeh B, Rajabi H. Study on prevalence rate of Cryptosporidium parvum in calves with under one year age group old in Shahrekord. Iranian Vet. J.2007; 17: 96-99.
- 2- Casemore D.P, et al. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J. Clinical pathology.1985; 38: 1337-1341.
- 3- Fayer R. Cryptosporidium and Cryptosporidium. CRC press.1997; 64,111-128.
- 4- Fotouhi Ardakani R, Fasihi Harandi M, Solayman Banani S, Kamyabi H, Atapour M, et

al. Epidemiology of Cryptosporidium infection of cattle in Kerman/Iran and molecular genotyping of some isolates. J. Kerman Univ. Med. Sci.2008; 15: 313-320.

- 5- Lotfollahzadeh S, Ziaei Daroonkolai N, Zahraei Salehi T, Poorbakhsh S A, Mokhber Dezfouli M.R, Afshari Gh R. A study on the presence of Escherichia coli, coccidia and cryptosporidium in stool samples of under one month age diarrheic calves in Ghaemshahr and Babol and antibiotic sensitivity of isolates. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.2004; 59: 131-135.

6- Maleki Sh, Nayebyzadeh H. A survey of prevalence of cryptosporidiosis among diarrheic and Healty cattle and calves in Khoram Abad, Iran. *J. Vet. Res.* 2008; 62: 423-426.

7- Mohebbali M, Nateghpour M, Korsandinia A. A survey on prevalence rate of calves cryptosporidium infection in Islam-Shahr district, Tehran province and its health importance in human. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.* 1999; 54: 59-62.

8- Mokhber Dezfouli M R, Meshgi B. Epidemiological study of cryptosporidial infestation of man and animals. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.* 2002; 57: 87-91.

9- Mokhber Dezfouli M R, Meshgi B, Maleki S H, Nayebyzadeh H. A survey of prevalence of cryptosporidiosis among diarrheic and Healty cattle and calves in Khoram Abad, Iran. *J. Vet. Res.* 2008; 62: 423-426.

10- Nour Mohammadzadeh F, Davoudi Y, Jamali R, Norouzian I. Epidemiological study of Cryptosporidium in newborn cattle in eastern Azbayjan Province. *Quarterly J. of Vet Research* 65-3. 2010; 247-254 [In Persian].

11- Ranjbar-Bahadori S H, Aliari M. Risk factors for cryptosporidial diarrhea in calves. *J. Vet. Res.* 2011; 67: 205-209.

12- Rasstegar Moghadam D, Azimi M. Isolation and purification of oocysts and sporozoites of Cryptosporidium using pointed sucrose gradient and percoll gradient methods. *Journal of Basic Medical Sciences.* Vol. 8, No.1, 2005; 18-24 [In Persian].

13- Razawi S M, Oryan A, Bahrami S, Mohammadalipour A, Gowhari M. Prevalence of Cryptosporidium infection in camels (*Camelus dromedarius*) in a slaughterhouse in Iran. *Trop. Biomed.* 2009; 26: 267-73.

14- Rezazadeh, F, Zahraei Salehi T, Mokhber Dezfouli M R, Rabani M, Morshedi A, Khaki Z, Nabian S, Rahbari S, Bahonar A. Clinical, biochemical and microbiological findings of calves diarrhea in a dairy herd in suburbs of Tehran. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.* 2004; 59: 301-307.

15- Ronald F. Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, 1st. ed. Nourbakhsh publication center. 2001; 34-40 [In Persian].

16- Taghipour T, Bghebanzadeh A, Rasouli A. Cryptosporidiosis a Universal Disease in human and animal. Islamic society of students at Vet. College of Tehran University press. 1989; 35-38 [In Persian].

17- E.E. Tyzzer A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 5 (1907), pp. 12-13.

Isolation and identification of *Cryptosporidium* spp. in diarrhetic calves in Alborz province

**Karimi, Gh.R.^{1*}; Paykari, H.¹; Rivaz, Sh.¹; Nasiri, V.¹; Abdigoudarzi, M.¹
Ranjbar, M.M.¹**

1- Razi vaccine and sera research institutes, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Receive: September 29, 2019; Revise: November 10, 2019; Accept: January 22, 2020

Summary

Cryptosporidiosis is a parasitic disease caused by the cryptosporidium protozoan in the vertebrate animal. This parasite in livestock special ruminants causes diarrhea syndromes in infants. The main sources of the parasite spread are infectious feces and the host mouth. The purpose of this project was to isolate and identify the cryptosporidium species by morphological indices in diarrhetic calves in order to detect and control the disease. According to the method of Casemore *et al.*, purification of oocysts from feces using flotation technique was carried out. Staining with modified Zeil nelson method (Henriksen method) and identification with diagnostic keys was done. *Cryptosporidium parvum* alone causes clinical disease in young calves; the latent infection time is 3 to 6 days. *Cryptosporidium muris*, *C. Andersoni* and *C. ryanae* have been reported in weaned calves, and *C. Andersoni* has been also observed in adult cattle. The total of 150 cattle fecal samples were randomly collected from Alborz province. 60 out of 150 (40%) calf diarrhea positive samples were detected by modified Zeil nelson method staining. In all fecal samples from calves without diarrhea, the oocyst was not observed. In calves below one month, especially in the first two weeks, 40% of the diarrhetic samples were infected. This protozoon is a zoonotic and opportunistic parasite and, in Iran, it has been reported from various species like poultry, cattle, sheep and goats and it may cause significant economic losses which need much more attentions.

Keywords: Isolation, Identification, *Cryptosporidium* spp., Calf Diarrhea