مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۳، ۲۴۸-۲۴۱
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,3: 241-248, 2015

مطالعه الگوی دفع اووسیست و تغییرات وزن ناشی از آلوده‌سازی تجربی گوساله‌های نوزاد با کریپتوسپوریدیوم پاروووم

فیصل ضرغامی[1] محمدرضا مخبردزفولی[1*] صادق رهبری[2] پرویز شایان[2] الهه ابراهیم زاده[2] محمود بلورچی[3] صمد لطف اله زاده[1]

۱) گروه بیماریهای داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران
۲) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران
۳) گروه مامایی وبیماریهای تولید مثل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۲۸ اردیبهشت ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱۶ تیر ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: کریپتوسپوریدیوم پاروووم تک یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکساست که دام‌های اهلی و وحشی و همچنین انسان را آلوده می کند. **هدف:** مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی ایجاد اسهال و دفع اووسیست در کریپتوسپوریدیوزتجربی و ارتباط آن با کاهش وزن گوساله‌های نوزاد انجام گرفت. روش کار: ۱۲ گوساله نوزاد در یک گاوداری شیری انتخاب و به صورت تصادفی به ۲ گروه ۶ تایی تقسیم شدند.۶ گوساله(گروه آزمایش) ۱۲ ساعت پس از تولد با ۱×۱۰^{۷} اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروووم آلوده شدند و ۶ گوساله دیگر (گروه شاهد) با اووسیت مواجهه نشدند. روزانه ۲ بار نشانه‌های بالینی بررسی و به منظور تعیین حضور و شمارش اووسیست‌های موجود، نمونه مدفوع از طریق رکتوم برداشت می‌گردید. جهت تعیین اثرات کریپتوسپوریدیوز بر افزایش وزن، تمامی گوساله‌ها از روز ۰ تا ۳۰ پس از عفونت با فواصل سه روز وزن می‌شدند. **نتایج:** تمامی گوساله‌های آلوده علیرغم دریافت آغوز مادری، از روز ۳ پس از عفونت نشانه‌های دپرسیون و کاهش اشتها را نشان دادند و به دنبال آن اسهال آبکی همراه با توده‌هایی از موکوس و تغییر رنگ آن به زرد یا بی رنگ ظاهر شد. اسهال ۸-۵ روز ادامه داشت که این منجربه دهیدراتاسیون شدید گردید.بیشترین شدت اسهال ۶-۴ روز پس از عفونت بود. دفع اووسیست از روز ۴ پس از عفونت شروع و تا روز ۱۱ ادامه داشت. بیشترین میزان آن در روز $(۹/۰۳ \pm ۱۰^{۶} \times ۶۰/۴۸$ اووسیست در هر گرم مدفوع) بود. نشانه‌های بالینی در گوساله‌های شاهد مشاهده نگردید.میانگین افزایش وزن گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از گروه آزمایش بود ($p<۰/۰۰۱$). وزن گوساله‌های آلوده تا سن ۹ روزگی کاهش و بعد از آن افزایش را نشان داد. **نتیجه گیری نهایی:** مطالعه حاضر علاوه بر تعیین الگوی دفع اووسیست نقش کریپتوسپوریدیوم پاروووم را به عنوان عامل اولیه در ایجاد اسهال و کاهش وزن گوساله‌های نوزاد نشان داد.

واژه‌های کلیدی: کریپتوسپوریدیوم پاروووم، اووسیست، تغییرات وزن، اسهال، گوساله‌ها

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم پاروووم تک یاخته‌ای از شاخه اپی کمپلکسا با انتشار جهانی می‌باشد که بافت پوششی روده اکثر مهره داران را مورد تهاجم قرار می‌دهد (۱۹،۲۱،۲۷،۳۲) . با گذشت بیش از یک قرن از شناسایی کریپتوسپوریدیوم توسط تایزر در سال ۱۹۰۷، ۱۹ گونه از جنس کریپتوسپوریدیوم از حیوانات مختلف جدا شده است که دوگونه آن شامل کریپتوسپوریدیوم آندرسونی و پاروووم در گاو دارای اهمیت است. کریپتوسپوریدیوم آندرسونی در سلول‌های پوششی مخاط شیردان جایگزین می‌گردد و با کاهش تولید در گاوهای شیری در ارتباط است (۶،۱۷،۲۴). کریپتوسپوریدیوم پاروووم یکی از مشکلات مهم گاوداری‌های صنعتی است که خسارات اقتصادی فراوانی در صنعت گاوداری به دلیل هزینه‌های درمانی، خدمات دامپزشکی و همچنین اسهال، کاهش وزن و بروز مرگ و میر در گوساله‌ها ایجاد می کند (۹،۱۹). بیش از نیمی از گوساله‌های تازه متولد شده در معرض خطر آلودگی به کریپتوسپوریدیوم قراردارند (۱۰). چرخه زندگی این انگل در فضای زیر غشایی سلول‌های پوششی روده بویژه در بخش انتهایی روده کوچک طی می‌گردد. تهاجم کریپتوسپوریدیوم پاروووم به سلول‌های روده منجر به آتروفی پرزها، تغییر شکل سلول‌های پوششی و کوچک شدن میکروویلی‌های روده شده و ایجاد اسهال می‌نماید (۶،۲۴). کریپتوسپوریدیوم پاروووم به عنوان عامل مهم اسهال در انسان و دام‌های اهلی معرفی گردیده و اخیراً بویژه در افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و کودکان به عنوان یک عامل آسیب رسان روده ای مشترک بین انسان و دام مورد توجه قرار گرفته است (۸،۲۶،۲۷). رقم بالای کریپتوسپوریدیوز در مبتلایان به نقص ایمنی در جهان و شیوع آن به میزان ۳۳/۴ ٪ و ۱۱/۱ ٪ به ترتیب در مبتلایان به ایدز و بدخیمی‌های خونی دارای اسهال در ایران نشان دهنده اهمیت این انگل در بهداشت انسانی است(۲۰). حدود ۱۰٪ مرگ و میر در مبتلایان به ایدز مربوط به این بیماری است (۲۲). گاوها و گوساله‌های آلوده به عنوان یک منبع بالقوه آلودگی در انسان مورد توجه قرار گرفته‌اند که می‌توانند از طریق دفع اووسیست انگل در مدفوع، منابع آب آشامیدنی انسان را آلوده کنند. عفونت‌زایی این انگل مدت‌های طولانی در محیط‌های مرطوب حفظ می‌شود و نسبت به اغلب ضد عفونی کننده‌های رایج مقاوم می‌باشد (۴،۱۰،۱۴،۳۰،۳۲). مهمترین نشانه‌های بالینی در گوساله‌ها دپرسیون، بی اشتهایی، اسهال، کاهش وزن و گاهی تلفات می‌باشد (۸،۱۱،۱۶). در دنیا، چندین مطالعه در زمینه نشانه‌های بالینی و تأثیر کریپتوسپوریدیوز بر وزن

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۶۴۳۱۱۰۳-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: mokhberd@ut.ac.ir

نوزاد حیوانات مختلف انجام شده است (۱،۹،۱۱،۱۵). تحقیق حاضر، اولین مطالعه‌ای در کشـور اسـت که در این زمینه و با هدف تعیین الگوی ایجاد اسهال و دفع اووسیست درآلودگی تجربی کریپتوسپوریدیوم پاروم و ارتباط آن با کاهش وزن گوساله‌های نوزاد و مقایسه آن با یافته‌های سایر محققین طراحی گردید.

مواد و روش کار

آماده سازی نمونه مثبت: جهت آلوده ساختن گوساله‌ها، اووسیست‌های کریپتوسـپوریدیوم پاروم از مدفوع یک گوساله ۱۲ روزه مبتلا به اسهال در مؤسسـه تحقیقاتی امین آباد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. نمونه مدفوع به طور مسـتقیم از رکتوم گوساله مورد نظر برداشت و هم حجم آن بی کرومات پتاسـیم ۲/۵٪ اضافه شد و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی تهران منتقل گردید.به منظور شناسایی اولیه از نمونه مدفوع گسـترش تهیه وبا روش ذیل- نلسـون اصلاح شده رنگ آمیزی گردید (۱۲). در بررسـی میکروسـکوپی بیش از ۲۰ اووسیسـت در هر میدان دید (بزرگنمایی ۴۰×) مشـاهده گردید. به منظور خالص سـازی اووسیسـت‌های انگل از روش اصلاح شـده Winter وهمکاران استفاده گردیـد(۳۱) . ابتدا نمونـه مدفوع به ترتیب از الک‌هـای ۱۰۰، ۱۴۰ و ۲۰۰ گذرانده شـد تا اجزاء درشـت مدفوع از آن جدا گردد و سـپس مدفوع الک شده تحت ۳۰۰۰×g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ آب اضافه و مجدداً سانتریفیوژ گردید و سپس این مرحله ۲ بار دیگر تکرار شـد تا بی کرومات پتاسیم از مدفوع زدوده شود. در مرحله بعد، در یـک فالکون ۵۰mL، ۱۰mL از نمونه با یک حجم از اتر سـرد بعلاوه سه حجم بی کربنات سدیم ۱٪ سرد خوب مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه تحت ۳۰۰۰×g سـانتریفیوژ گردید. توده ضخیمی از چربی در بالای ظرف تشـکیل شـد که آن را دور ریخته و لایه رسـوب نگه داشـته شد . سپس بافـر Tris-EDTA (۳/۷۲g EDTA و ۶/۰۵۷ g Tris-Hcl در ۱L آب مقطـر) بر روی نمونه ریخته و جهت شستشـو به مدت ۱۰ دقیقه تحت × ۳۰۰۰ g سـانتریفیوژ گردید. این مرحله دو بار تکرار شد . سپس به رسوب حاوی اووسیسـت ۴۰mL سـاکارز ۵۵٪ در فالکون ۵۰mL اضافه و خوب مخلوط گردید سـپس ۱۰mL آب مقطر بسیار خنک روی آن ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه تحت ۳۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید و در نهایت لایه میانی حاوی اووسیسـت‌های خالـص از ۲ لایه دیگر جدا و جمع آوری شـد . در مرحله بعد اووسیسـت‌های خالص شده با ۱۰ برابر حجم PBS (PH= ۷/۲) خوب مخلوط شـد و به مدت ۱۰ دقیقه تحت ۳۰۰۰×g سـانتریفیوژ شد و دو بار دیگر این مرحله تکرار شـد تا سـاکارز از اووسیست‌های خالص شده زدوده شـود. از ۱×۱۰^{۷} اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم ماده وراثتی به کمک کیت اسـتخراج DNA (MBST, Iran) اسـتخراج شد و به کمک پرایمرهای مشـتق از ژن ۱۸SrRNA در کریپتوسپوریدیوم تأیید جنس و همچنین به کمک پرایمر اختصاصی برای گونه پاروم تأیید گونه انجام شد. پس از تأیید مولکولی، اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پاروم مذکور تحت عنوان جدایه ایران تا مرحله آلوده سـازی در PBS (PH= ۷/۲) و در دمای ۴°C نگهداری شد. درست قبل از آلوده سازی، تعداد اووسیست‌ها با استفاده از لام هموسـیتومتر و با درشت نمایی۴۰ برابر میکروسکوپ نوری مجددا شمارش و محاسبه گردید.

حیوانات مورد استفاده : ۱۲ گوساله تازه متولد شده در مؤسسه تحقیقاتی امین آباد وابسته به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت انجام تحقیق در نظر گرفته شد. چند ساعت قبل از زایمان، گاوهای آبستن به سالن زایش که از قبل شستشو و ضد عفونی شده و کف آن کاه ریخته شده بود منتقل می‌شدند و ناحیه زیر دم و پرینه گاو آبستن بخوبی شسته می‌شد تا آلودگی محیطی گوساله به حداقل برسد. گوساله‌های تازه متولد شده بلافاصله بعد از تولد (۳۰ دقیقه بعد از تولد) از مادران جدا شـده و بند ناف آنها با اسـتفاده از محلـول ۷٪ بتادین به روش غوطه وری ضد عفونی می‌گردید. سـپس گوسـاله‌ها، وزن کشی شـده و به باکس‌های انفرادی که قبلاً تمیز و ضد عفونی شـده و کف آن با کاه پوشـانده شده بود منتقل می‌شدند. به منظور ضدعفونی، باکس‌های نگهداری شعله افکنی شده و به دنبال آن با استفاده از فرمالین ۱۰٪ شستشو گردید (۲۴). گوساله‌ها بطور تصادفی به ۲ گروه ۶ تایی کنترل و آزمایش تقسیم شدند. گروه‌های آزمایش و شاهد ۳L آغوز در ۲ سـاعت اول بعد از تولد از طریق بطری سر پستانک دار دریافت کردند و در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تولد نیز به ترتیب ۲L و ۱L آغوز به انها داده شد. بعد از ۲۴ ساعت همه گوساله‌ها به میزان ۱۰٪ وزن بدن و سه بار در روز از شـیر بدون آنتی بیوتیک و از یک منبع تغذیه می‌شدند. در ساعت ۱۲ پس از تولد به شش گوساله (گروه آزمایش) ۱×۱۰^{۷} اووسیست کریپتوسپوریدیوم پـاروم همراه بـا ۵۰mL آغوز (از آغوز سـاعت ۱۲) خورانده شـد (۳،۲۸). ۶گوسـاله دیگر به عنوان گروه شاهد، اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم را دریافت نکردند. ۲۰mL از آغوز دوشـش اول گاوهای شـاهد و آزمایش جهت ارزیابی سطح آنتی بادی ضد کریپتوسپوریدیوم جمع آوری و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

ارزیابی بالینی: معاینات سـلامت گوسـاله شامل تعداد ضربان قلب و تعداد تنفس در دقیقه، درجه حرارت رکتوم، بررسـی رفتار تغذیه‌ای، میزان افسردگی و درجه دهیدراتاسیون دوبار در روز به فاصله هر ۱۲ ساعت انجام می‌شـد و وجود اسهال و سایر نشـانه‌های بالینی در آنها مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. از روزصفر تا روز ۱۵ پس از آلوده سازی، دو بار در روز به فاصله هر ۱۲ سـاعت، نمونه مدفوع از طریق رکتوم برداشت و جمع آوری می‌شد و رنگ و قوام آن و همچنین وجود یا عدم وجود اسـهال ارزیابی می‌گردید. قبل از آلوده سـازی و در صورت بروز اسهال نیز نمونه‌های مدفوعی جهت بررسی حضور سـایر عوامل مولد اسهال نوزادان (کروناویروس، سالمونلا، روتـا ویـروس و *Escherichia Coli* K۹۹) از گوسـاله‌ها اخذ می‌شـد.

معیارهای بالینی شـامل بررسی قوام مدفوع (جامد، خمیری، آبکی، شدیداً آبکی)، رنگ مدفوع (زرد، سبز، متمایل به سفید، قهوه‌ای)، غیر طبیعی‌های مدفوع (موکوس، خون)، بررسی وضعیت اشتها (خوب و نرمال، ضعیف، بی اشتها)، وضعیت دهیدراتاسیون و وضعیت افسردگی بالینی بود (۱۳،۲۵).

بررسی حضور اشریشیا کولی، سالمونلا روتاویروس و کروناویروس در مدفوع: به منظور بررسـی حضور سـالمونلا در مدفوع گوساله‌ها، نمونه مدفوع را جهت کشت میکروبی در یک لوله استریل ریخته و بلافاصله بعداز اخذ، با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشـگاه تهران ارسال می‌گردید. جهت بررسی حضور روتا ویروس، کرونا ویروس و *E.coli* K۹۹، ردیابی آنتی ژن این عوامل با اسـتفاده از آزمایش الایزا (کیت الیزای تشخیص آنتی ژن روتاویروس، کروناویروس و *E.coli* K۹۹ سـاخت شرکت pourquier فرانسه) بر روی نمونه‌های مدفوع که بلافاصله بعد از اخذ از رکتوم تحت برودت ۲۰°C- منجمد شده بودند، انجام گرفت.

شـمارش اووسیست‌های مدفوع: روزانه نمونه مدفوع گوساله‌های هر دو گروه از طریق رکتوم اخذ شـده و به منظور بررسی حضور اووسیست‌ها در مدفوع از هر نمونه گسـترش تهیه شـده و پس از رنـگ آمیزی آن به روش ذیل- نلسون اصلاح شده مورد بررسی میکروسکوپی قرار می‌گرفت. در صورت مشـاهده اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پاروووم در مدفوع، به منظور شـمارش تعداد اووسیسـت‌ها، ۱g از مدفوع مورد نظر وزن شده و در فالکـون ۵۰mL ریختـه و با اسـتفاده از روش winter و همکاران در سـال ۲۰۰۰ اقدام به خالص سازی اووسیست‌ها می‌گردید(۳۱) و در نهایت اووسیسـت‌های خالص شـده با اسـتفاده از لام هموسـیتومتر نئوبار و با بزرگنمایی ۴۰ برابر میکروسـکوپ نوری شمارش می‌شد و به این صورت میزان اووسیست دفع شده در هر گرم مدفوع بدست می‌آمد.

ارزیابـی تغییرات وزن: جهت تعیین اثرات کریپتوسـپوریدیوز بر روی وزن، گوسـاله‌ها از روز ۰ تا روز ۳۰ پس از آلوده سـازی به فاصله هر سـه روز یکبار وزن کشـی می‌شدند و بنابراین وزن حیوانات قبل و در زمان دفع اووسیسـت و همچنین بعد از اتمام دفع اووسیسـت در دو گروه آزمایش و شاهد مورد بررسی قرار می‌گرفت.

بررسی سطح آنتی بادی ضد P۲۳ کریپتوسپوریدیوم پاروووم درآغوز با اسـتفاده از دات بلات: ابتدا از آغوز دوشش اول گاوهای هر دو گروه شاهد و آزمایش سـرم تهیه گردید. بدین منظور ابتدا آغوز را از دمای ۲۰°C- به یخچال ۴°C منتقل کرده سـپس دردمای معمولی اتاق قرار داده شد تا به آرامی از انجماد خارج شود. در مرحله بعد این آغوزها را در میکروتیوب‌های ۱mL اسـتریل ریخته و به مدت نیم سـاعت تحت ۱۰۰۰×g و دمای ۳°C سـانتریفیوژ شد تا لایه چربی از آغوز جدا شـود. بعد از چربی زدایی، ۱µL از آنزیم رنین ۱units/mg به مجموعه اضافه شـد. سپس میکروتیوب را خوب تکان داده و به مدت ۱/۵ سـاعت در بن ماری ۱۷°C قرار داده شد و به دنبال آن به مدت ۵ دقیقه تحت ۱۰۰۰×g در دمای ۲۵°C سانتریوفوژ شد. در نهایت لایه رویی میکروتیوب که حاوی پروتئین‌های محلول بود با استفاده از سمپلر برداشت و در یک میکروتیوب استریل ریخته شد (۱۰). در مرحله بعد ، آزمایش دات بلات بر روی سرم‌های آغوز انجام گردید(۲۹).

تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶/۰ و با استفاده از رویه مدل عمومی خطی (GLM) برای داده‌های تکراری و آزمون t مستقل (Independent samples t test) انجام گردید. سـطح معنی‌داری ۵٪ درنظر گرفته شد.

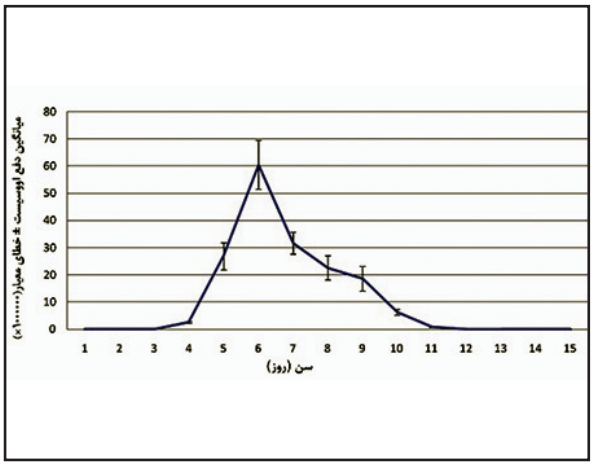
نتایج

نشـانه‌های بالینـی: در گوسـاله‌های گـروه آزمایـش از روز ۳ پس از آلوده‌سازی تجربی، نشانه‌های افسردگی (متوسط تا شدید) و کاهش اشتها به میزان قابل توجهی ظاهر گردید، اگرچه اشـتها به طور کامل قطع نشد. به دنبال این نشـانه‌ها، اسهال آبکی ظاهر شـد که به مدت ۸-۵ روز ادامه داشـت (میانگین دوره اسـهال، ۶/۵ روز بود). قوام مدفوع آبکی و رنگ آن بـه زرد یا بی رنگ تغییر یافت و توده‌هـای فراوانی از موکوس در آن قابل مشـاهده بود. اسـهال در فاصله روزهای ۴ تا ۶ پس از آلوده سـازی شدید (آبکی وشـدیدا آبکی) بود. به دنبال اسـهال، میزان از دست دادن آب بدن درگوساله‌های گروه آزمایش قابل توجه (۱۰-۸٪ دهیدراتاسیون) و رفلکس مکـش در آنها ضعیف گردید و تعداد ضربان قلب و تنفس در آنها افزایش یافت. تب از نشانه‌های بیماری نبود. در گروه شاهد، هیچ کدام از نشانه‌های ذکر شده مشاهده نشد.

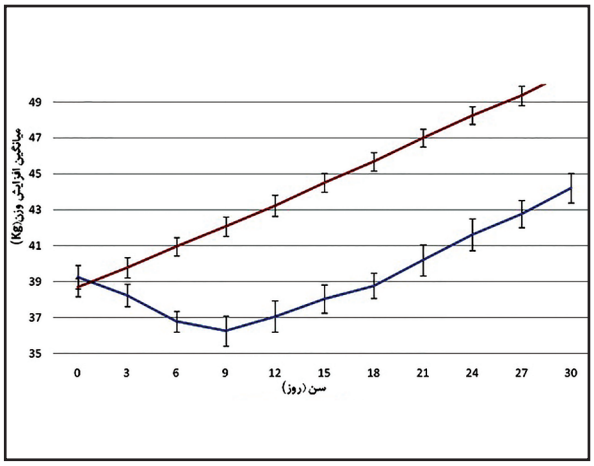
یافته‌های انگل‌شناسی: در گوساله‌های آزمایش دفع اووسیست از روز ۴ پس از آلوده سازی شروع شد و تا روز ۱۱ پس از عفونت ادامه یافت. روز ۶ پس از آلودگی میانگین دفع اووسیست به بیشترین میزان (۹/۰۳±۶۰/۴۸×۱۰^{۶} اووسیسـت در هر گرم مدفوع) رسید (نمودار ۱). بعد ازقطع دفع اووسیست، حضور مجدد آن در مدفوع گوسـاله‌ها مشـاهده نگردید. دفع اووسیست در گروه شاهد، مشاهده نشد. براساس نتایج کشت میکروبی و آزمایش الایزا هیچکدام از عوامل سالمونلا، روتاویروس، کروناویروس و*E.coli* K۹۹ در مدفوع یافت نگردید.

نتایج دات بلات آغوز: در آزمایش دات بلات، آغوز گاوهای گروه شاهد و آزمایش تا رقت ۱/۵۰۰ با آنتی ژن P۲۳ کریپتوسـپوریدیوم واکنش داد و تفاوتی بین ۲ گروه وجود نداشت.

تغییرات وزن: وزن تولد گوسـاله‌های دو گـروه بین ۳۷/۵Kg تا ۳۸/۸ بود. پس از ۳۰ روز، وزن گوسـاله‌های تیمار به ۰/۸۱Kg±۴۴/۲۱ رسـید در حالیکه وزن گوسـاله‌های گروه شاهد بطور معنی‌داری بیشتر از گروه تیمار بـود ($p<۰/۰۰۱$) و میانگین وزن در گروه شـاهد بـه ۰/۵۹Kg±۵۰/۷۵ در روز ۳۰ رسـید (نمـودار ۲). میانگین افزایش وزن روزانـه در گروه آزمایش به طور معنی‌داری کمتر از میانگین افزایش وزن روزانه درگروه شـاهد بود



نمودار۱. میانگین دفع اووسیست± خطای معیار در گروه آزمایش.



نمـودار۲. میانگین افزایش وزن± خطـای معیار در گروه آزمایـش (خط آبی) و گروه شاهد (خط قرمز).

(p<۰/۰۰۱). کاهش وزن گوساله‌های آزمایش تا روز ۹ پس از چالش ادامه داشـت و بعـد از آن به تدریج وزن آنها افزایـش یافت. اگرچه اثرات منفی کریپتوسـپوریدیوز بر روی وزن گوسـاله‌های تیمار به گونه‌ای بود که وزن آنها در سن ۱۸ روزگی با وزن تولد آنها برابر شد و بعد از بهبودی نیز تفاوت افزایش وزن بین دو گروه شاهد و آزمایش معنی‌دار بود(p<۰/۰۰۱).

بحث

در مطالعـه حاظـر تمامـی گوسـاله‌هایی کـه بـه صـورت تجربی با اووسیسـت‌های کریپتوسپوریدیوم آلوده شدند، بعد از ۴ روز اووسیت‌های ایـن انـگل را از طریـق مدفوع دفـع کردند و نشـانه‌های بالینـی بیماری شـامل: دپرسیون متوسط تا شـدید ، کاهش موقتی اشتها و اسهال که به مدت چند روز ادامه داشـت را نشـان دادند در حالیکه در گوساله‌های شاهد نشانه‌های بیماری و دفع اووسیست مشاهده نگردید. نقش کریپتوسپوریدیوم پاروووم به عنوان عامل اولیه ایجاد اسـهال در برهها وبزغاله‌ها ثابت شـده اسـت(۸) در دو مطالعه برروی گوسـاله‌های مبتلا به اسهال، در ۵۱ و ۵۵٪ موارد کریپتوسـپوریدیوم پـاروووم تنها عامل پاتوژن ایجاد اسـهال گزارش شـد و در ۳۹٪ مـوارد این انگل همراه با روتاویـروس و کروناویروس یافت شـد(۲۴). در مطالعه حاضر نیز به اسـتثناء کریپتوسـپوریدیوم پاروووم سایر عوامل معمول آسـیب رسـان روده ای نـوزادان (سـالمونلا، روتاویروس، کروناویروس و *E.coli* K۹۹) در گوسـاله‌ها یافت نشـد. این نشان می‌دهد که کریپتوسپوریدیوم به تنهایی و بدون همراهی سایر عوامل معمول اسهال نوزادان قادر به ایجاد اسهال شدید در گوساله‌های نوزاد می‌باشد. این درحالی است که همه این گوساله‌ها آغوز مادری به میزان کافی و در زمان مناسب دریافت کردند. این یافته نشان می‌دهد که آغوز مادرانی که ایمن نشده اند نمی‌تواند نوزادان آنها را در برابر اووسیسـت‌های کریپتوسپوریدیوم پاروووم در صـورت آلودگـی محافظت کند حتی اگر این مادران سـابقه آلودگی با انگل را داشـته باشـند. بنابراین جهت محافظت گوساله‌های نوزاد در برابر کریپتوسپوریدیوز اسـتفاده از آغوزهایپر ایمن ضروری می‌باشد. این یافته بـا نتایج چندین مطالعه مطابقت دارد. Arrowood و همکاران در سـال ۱۹۸۹ و Moon و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که آغوز موش‌های بهبود یافته از کریپتوسپوریدیوز قادر نیست نوزاد آنها را در صورت آلودگی برابر کوریپتوسپوریدیوم پاروووم محافظت کند (۲،۱۸). همچنین Naciri و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که آغوز میش‌های ایمن نشده، برههای آنهـا را در برابر کریپتوسـپوریدیوز محافظت نمی‌کنـد و جهت محافظت نوزادان در برابر کریپتوسـپوریدیوز ایمن سازی آغوز مادران ضروری است (۱۹) . نشـانه‌های بالینی مشـاهده شده در این مطالعه شامل بی اشتهایی، اسهال آبکی و دهیدراتاسیون با مطالعه تجربی Fayer و همکاران در سال ۱۹۹۸ که بر روی گوسـاله‌ها انجام شـد مطابقت دارد (۱۱). دوره اسهال در عفونت تجربی یا طبیعی کریپتوسپوریدیوز از چند روز تا ۲-۱هفته متفاوت اسـت(۳). در مطالعه حاضردوره نهفته ۴ روز بود و گوساله‌ها از روز۴ پس از آلوده سـازی، دفع اووسیست و نشانه‌های اسهال را نشان دادند Blewett و همـکاران در سـال۱۹۹۳ درآلوده سـازی تجربی با ۱×۱۰^{۷} اووسیسـت کریپتوسـپوریدیوم پاروووم در گوساله‌های شـیری دوره نهفته را ۵- ۴ روز بیان کردند(۳). اختلاف در دوره نهفته ودوره اسـهال در مطالعات مختلف، ممکن است به دلیل تفاوت در میزان اووسیست استفاده شده جهت آلوده سازی باشد. نشان داده شده است برههایی که با میزان کمتری اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروووم آلوده شده‌اند دوره نهفته طولانی‌تری داشته‌اند. در مطالعه Naciri و همکاران در سال ۱۹۹۴ برههایی که به صورت تجربی با ۱×۱۰^{۶} اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروووم آلوده شدند از روز ۴ تا ۱۱ پس از عفونت اووسیست را از طریق مدفوع دفع کردند، اگر چه دوره اسهال دراین برهها کوتاه بود(۲ روز)(۲۱). در مطالعه Xiao و همکاران در سال۱۹۹۴، دفع اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروووم از روز ۴ پس از عفونت شروع شد و در ۷ روزگی به بیشـترین میزان دفع رسید (۳۱). در حالیکه در مطالعه حاضر، حداکثر دفع اووسیست در روز ۶ پس از عفونت مشاهده گردید و تا روز ۱۱

پس از عفونت، اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در مدفوع قابل مشاهده بود. Quilez و همکاران در سال ۱۹۹۶ اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پاروووم را در سن سه روزگی در عفونت طبیعی مشاهده کردند (۲۴). همچنین Fayer و همکاران درسال ۱۹۹۸ دوره نهفته بیماری را در گوساله‌ها، ۶-۳ روز پس از آلوده سازی تجربی با اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پاروووم گزارش کردند. در مطالعه این محققین در بیش از نیمی از گوساله‌ها شروع دفع اووسیست از روز ۴ پس از عفونت مشاهده گردید و ۸-۶ روز پس از عفونت به حداکثر رسید و گوساله‌ها از روز ۳ پس از آلوده سازی نشانه‌های اسهال را نشان دادند که ۴ تا ۱۶ روز ادامه داشت (۱۳). در مطالعه حاضراسهال در گوساله‌های آزمایش در روز ۴ پس از عفونت مشاهده گردید که به مدت ۸-۵ روز ادامه داشت. بر خلاف مطالعه Fayer و همکاران در سال ۱۹۹۸، در مطالعه حاضر اسهال گوساله‌ها متناوب نبود. در این مطالعه بیشترین شدت اسهال در دوره‌ای که حداکثر دفع اووسیست (روز ۵ و ۶ پس از عفونت) رخ داد، مشاهده گردید. این یافته همبستگی بین شدت اسهال و دفع اووسیست را بیان می‌کند. Causape و همکاران در سال ۲۰۰۲ همبستگی بین شدت عفونت و حضور نشانه‌های بالینی و اسهال را نشان دادند (۴). در مطالعه حاضر دوره اسهال در گوساله‌ها کوتاه‌تر از دوره دفع اووسیست بود و دفع اووسیست تا چند روز پس از قطع اسهال نیز ادامه داشت. این یافته نشان می‌دهد که الزاماً، همیشه دفع اووسیست کریپتوسپوریدیوم با نشانه‌های بالینی کریپتوسپوریدیوز مانند اسهال همراه نمی‌باشد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تب نشانه ثابت در کریپتوسپوریدیوز نمی‌باشد. Enemark و همکاران در سال ۲۰۰۳ تب را در کریپتوسپوریدیوز تجربی گوساله‌ها مشاهده کردند. این محققین بیان کردند این تب ممکن است به دلیل همزمانی با عفونت روتاویروسی یا به دلیل تفاوت‌های فردی باشد(۹). در مطالعه حاضر، افزایش وزن گوساله‌های گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از گروه آزمایش بود ($p<۰/۰۰۱$). این یافته با نتایج مطالعه Enemark و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد. آنها نشان دادند که افزایش وزن روزانه در خوکچه‌های شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از گروه آلوده شده با اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروووم بود (۹). در مطالعه Sagodira و همکاران در سال ۱۹۹۹ کریپتوسپوریدیوز تجربی منجر به کاهش رشد و وزن در بزغاله‌های نوزاد گردید(۲۷). مطالعه‌ای نشان داد بزغاله‌های مبتلا به کریپتوسپوریدیوز، اختلاف وزن ۲ Kg در ۴ هفته اول زندگی در مقایسه با گروه شاهد داشتند (۸). در کودکان نیز کریپتوسپوریدیوز منجر به کاهش رشد و وزن می‌گردد. Chekley و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که کودکان دارای کریپتوسپوریدیوز بالینی و تحت بالینی به ترتیب ۳۴۲g و ۱۹۲ افزایش وزن کمتری در مقایسه با نوزادان فاقد عفونت کریپتوسپوریدیوم پاروووم در یک ماه اول داشتند(۷). میزان دفع اووسیست، درجه اسهال و دهیدراتاسیون و تغییرات وزن بدن مشخص ترین نشانه‌های حدت در کریپتوسپوریدیوز می‌باشد (۹). در مطالعه حاضر، گوساله‌های گروه آزمایش تا سن ۹ روزگی، کاهش وزن را نشان دادند و بعد از این سن نیز (روز ۱۰ تا ۳۰) افزایش وزن در گوساله‌های آلوده، به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($p<۰/۰۰۱$) . در مطالعه Martin-Gomez و همکاران در سال ۲۰۰۵ کریپتوسپوریدیوز تجربی در بره‌ها منجر به کاهش وزن و رشد شد که بعد از بهبودی نیز این تأثیر منفی بر افزایش وزن بره‌ها باقی ماند(۱۶). بیشترین شدت نشانه‌های بالینی شامل اسهال و کاهش وزن و همچنین بیشترین میزان دفع اووسیست تا سن ۹ روزگی مشاهده گردید. این یافته نشان می‌دهد که همبستگی زیادی بین کاهش وزن و کریپتوسپوریدیوز وجود دارد.کاهش اشتها، اسهال، آسیب شدید روده و به دنبال آن اختلال در هضم و جذب مواد مغذی عامل کاهش وزن و لاغری مفرط در کریپتوسپوریدیوز است (۲۴). کریپتوسپوریدیوز تجربی در حیوانات مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با رویکرد الگوی دفع اووسیست و ایجاد اسهال و ارتباط آن با تغییرات وزن برای اولین بار در کشور بر روی کریپتوسپوریدیوم پاروووم انجام می‌شود. با توجه به اینکه گوساله مبتلا به کریپتوسپوریدیوز میزان زیادی اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروووم در دوره بیماری دفع می‌کند، محققین جهت کارهای تحقیقاتی معمولاً از آلوده‌سازی تجربی گوساله جهت دستیابی به میزان زیادی اووسیست کریپتوسپویریدیوم پاروووم استفاده می‌کنند. این مطالعه به طور دقیق و کامل، جزئیات نشانه‌های بالینی، الگوی اسهال و دفع اووسیست و همچنین ارتباط آن با تغییرات وزن در گوساله‌های آلوده شده به اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پاروووم را مشخص کرد. همانطور که در این مطالعه نشان داده شد، گوساله‌ها در دوره بیماری میلیون‌ها اووسیست در هر گرم مدفوع دفع می‌کنند که رها سازی مدفوع آلوده در محیط و یا استفاده مستقیم از آن در زمین‌های کشاورزی باعث آلودگی آب‌ها، زنجیره غذایی و محصولات کشاورزی می‌شود که این، خطر عامل مهم و تهدید کننده بهداشت عمومی است و افراد زیادی بویژه کودکان، سالمندان و مبتلایان به ضعف سیستم ایمنی ممکن است در معرض آلودگی قرار گیرند.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان مقاله از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، پژوهشکده طب تجربی دانشگاه تهران و قطب علمی ایمونوپاتولوژی برای پشتیبانی مالی در ارتباط با طرح ملی طراحی و کسب دانش فنی تولید واکسن بر علیه کریپتوسپوریدیوز قدر دانی می‌نمایند. همچنین از همکاری موسسه تحقیقاتی امین آباد قدر دانی می‌گردد.

References

1. Anderson, B.C. (1981) Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. J Am Vet Med Assoc. 78: 982-984.

2. Arrowood, M.J., Mead, J.R., Mahrt, J.L., Sterling, C.R. (1989) Effects of immune colostrum and orally administered antisporozoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. Infect Immun. 57: 2283-2288
3. Blewett, D.A., Wright, S.E., Casemore, D.P., Booth, N.E., Jones, C.E. (1993) Infective dose size studies on *Cryptosporidium parvum* using gnotobiotic lambs. Water Sci Technol. 27: 61.
4. Causape, A.C., Quılez, J., Sanchez-Acedo, C., Del Cacho, E., Lopez-Bernad, F. (2002) Prevalence and analysis of potential risk factors for-*Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). Vet Parasitol. 104: 287–298.
5. Chalmers, R.M., Davies, A.P. (2010) Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Exp Parasitol. 124: 138–146.
6. Changizi, E., Salimi-Bejestani, M.R., Javaheri Vayeghan, A.(2012) The *Cryptosporidium ryanae* infection commence in Iranian cattle. Tehran. J Vet Res. 67: 127-133.
7. Checkley, W., Gilman, R.H., Epstein, L.D., Suarez, M., Diaz, J.F., Cabrera, L., Black, R.E., Sterling, C.R. (1997) Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: Their acute effect on weight gain in Peruvian children. Am J Epidemiol. 145: 156-164.
8. de Graaf, D.C., Vanopdenboscha, E., Ortega-Mora, L.M.,Abbassi, H., Peeters, J.E. (1999) A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int J Parasitol. 29: 1269-1287.
9. Enemark, H.L., Bille-Hansen, V., Lind, P., Heegaard, P.M.H., Vigre, H., Ahrens, P., Thamsborg, S.M. (2003) Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*—evaluation of an animal infection model. Vet Parasitol. 113: 35–57.
10. Fayer, R. (2008) General biology. In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. Fayer, R., Xiao, L. (eds.). (2th ed.) CRC Press. New York, USA. p. 1-35.
11. Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D. (1998) *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. Int J Parasitol. 28: 49–56.
12. Henrikson, S.V., Poglenz, J.F. (1981) Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl Nelson technique. Acta Vet Scand. 22: 594-596.
13. House, J.K., Gunn, A.A. (2009) Manifestations and management of disease in neonatal ruminants. In: Large Animal Internal Medicine. Smith, B. (ed.). (4th ed.). Mosby, Inc. Philadelphia, USA. p. 336-366.
14. Jenkins, M.C., O'Brien, C., Trout, J., Guidry, A., Fayer, R. (1998) Hyperimmune bovine colostrum specefic for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. Vaccine.17: 2453-2460.
15. Koudela, B., Jiri, V. (1997) Experimental cryptosporidiosis in kids. Vet Parasitol. 71: 273-81.
16. Martin-Gomez, S., Alvarez-Sanchez, M.A., Rojo-Vazquez, F.A. (2006) Obtaining hyperimmune anti-*Cryptosporidium parvum* ovine colostrum. A study of the humoral immune response in immunized sheep. Parasitol Res. 98: 119–129.
17. Mokhber Dezfouli, M.R., Sadeghiannasab, A., Akbarein, H., Tajik,P., Nadalian,M., Khajenasiri, Sh. (2005) Cryptosporidia infection and associated bacterial entropathogens in diarrheic calves and cows in dairy farms around Tehran. J Vet Res (University of Tehran). 60: 131-135.
18. Moon, H.W., Woodmansee, D.B., Harp, J.A., Abel, S., Ungar, B.L.P. (1988) Lacteal immunity to enteric cryptosporidiosis in mice: Immun doms do not protect their suckling pups. Infect Immun. 56: 649-653.
19. Naciri, M., Mancassolo, R., Reprant, J.M., Canivez, O., Quinque, B., Yovore, P. (1994) Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrum. Vet Parasitol. 53: 173-190.
20. Nahrevanian, H., Assmar, M. (2006) A case report of Cryptosporidiosis and isosporiasis in AIDS patients in Iran. J Tropic Med Parasitol. 29: 33-36.
21. Perryman, L.E., Kegerreis, K., Mason, P.H. (1993) Effect of orally administered monoclonal

antibody on persistent *Cryptosporidium Parvum* infection in scid mice. Infect Immune. 61: 4906-4908

22. Petersen, C. (1992) Cryptosporidiosis in patient infected with the human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 15: 903-909.
23. Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., del Cacho, E., Clavel, A., Causape, A.C. (1996) Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). Vet Parasitol. 66: 139–146.
24. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007) Veterinary Medicine. (10th ed.) WB. Saunders Company. Philadelphia, USA.
25. Rezazadeh, F., Zahraei–salehi, T., Mokhber Desfouli, M.R. Rahbari, M., Morshedi, A., Khaki, Z., Nabian, S., Rahbari, S., Bahonar, A. (2004) Clinical, biochemical and microbiological findings Of calves diarrhea in a dairy herd in suburbs of Tehran. J Vet Med (University of Tehran). 59: 301-308.
26. Riggs, M.W. (2002) Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. Microb. Infect. 4: 1067-1080.
27. Sagodira, S., Buzoni-Gatela, D., Iochmanna, S., Naciri, M., Bout, D. (1999) Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. Vaccine. 17: 2346-2355.
28. Schnyder, M., Kohler, L., Hemphill, A., Deplazes, P. (2009) Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. Vet Parasit. 160: 149-154.
29. Shayan, P., Ebrahimzadeh, E. (2008) Recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 as a target for the detection of cryptosporidium- specific antibody in calf sera. Parasitol Res. 103: 1207-1211.
30. Trotz-Williams, L.A., Wayne Martin, S., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. (2008) Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. Prevent Vet Med. 83: 11–23.
31. Winter, G., Andrew, A.G., Williams, L.K., Slade, M.B. (2000) Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*.Funct Integr Genom. 1: 207-217.
32. Xiao, L., Herd, R.P. (1994) Infection patterns of Cryptosporidium and Giardia in calves. Vet Parasitol. 55: 257-262.

A study of oocyst shedding pattern and weight changes in neonatal calves experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*

Zarghami, F.[1], Mokhber Dezfouli, M.R.[1*], Rahbari, S.[2], Shayan, P.[2], Ebrahimzadeh, E.[2], Bolourchi, M.[3], Lotfolahzadeh, S.[1]

[1]*Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*
[2]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*
[3]*Department of Obstetrics and Genital Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*

(Received 18 May 2015, Accepted 7 July 2015)

Abstract:

BACKGROUND: *Cryptosporidium parvum* is a protozoan parasite which belongs to apicomplexa phylum. The parasite infects both wild and domesticated animals and human beings as well. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to detect oocyst shedding and diarrhea pattern in experimental cryptosporidiosis and their correlation with weight loss in neonatal calves. **METHODS:** Twelve Holstein calves of both sexes were obtained at birth from dairy farm and randomly divided into two groups of 6 calves. Six calves were orally infected with 10^7 *C.Parvum* oocysts at the 12h post parturition. The control group was not infected. Clinical signs were examined and fecal samples were collected by the rectal examination twice a day. All calves were weighed from day 0 to day 30 with 3 days intervals to determine effects of cryptosporidiosis on weight gain. **RESULTS:** All infected calves were noticeably depressed and had a decreased appetite from 3 days post inoculation (DPI) while they received colostrum. Subsequently, watery diarrhea with clumps of mucus and yellow or pale changes of feces color were observed. The infected calves have had diarrhea for 5-8 days that remarkably had got dehydrated. The most severity of diarrhea was 4-6 DPI. Oocyst excretion started 4 DPI, peaked at 6 DPI ($60.48\times10^6\pm9.03$oocysts/g feces) and continued until 11 DPI. Control calves had no diarrhea and other clinical signs during the whole period of the trial. The mean weight gain of control group was significantly higher than inoculated group during experiment ($p<0.001$). The Weight of the infected calves was retarded until 9 days old and then risen subsequently. **CONCLUSIONS:** Present study showed the role of *C.Parvum* as the primary cause of diarrhea and weight loss among neonatal calves.

Keyword: calves, *Cryptosporidium parvum*, diarrhea, oocyst, weight changes

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. Oocyst shedding mean ± SE in test group.

Graph 2. Weight gain mean ± SE in test group (blue line) and control group (red line).

***Corresponding author's email: mokhberd@ut.ac.ir, Tel: 021-66431103, Fax: 021-66933222**