ارزیابی دو آزمایش ساده برای تشخیص آلودگی مدفوع گوساله به *کریپتوسپوریدیوم*

چنگیزی، ع.

دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۱/۰۴

خلاصه

به منظور مقایسه دو روش تهیه گسترش از نمونه مدفوع آلوده به *کریپتوسپوریدیوم* شامل آزمایش فرمل اتر و تهیه گسترش مستقیم، از ۵۳ نمونه مدفوع اخذ شده از گوساله های مثبت به *کریپتوسپوریدیوم* از گاوداری های شهرستان سمنان، ۱ گسترش به روش فرمل اتر و ۲ گسترش به صورت مستقیم تهیه گردید. از ۵۳ نمونه تهیه شده به روش فرمل اتر، ۴۲ نمونه مثبت تشخیص داده شد. ولی در نمونه های تهیه شده به روش گسترش مستقیم، حداقل ۳۶ مورد از ۵۳ نمونه تهیه شده مثبت بودند. ولی هنگامی که ۲ نمونه گسترش مستقیم تهیه شده از یک نمونه در نظر گرفته می شد، موارد مثبت افزایش یافته و به ۴۶ نمونه می رسید. حساسیت آزمایش مدفوع به روش فرمل اتر ۸۲/۸٪ و ۲ نمونه گسترش مستقیم ۸۸/۳٪ تعیین گردید. با توجه به زمان بر بودن و هزینه های مترتبه در آزماش فرمل اتر، منطقی به نظر می رسد که در مطالعات اپیدمیولوژیک، ۲ گسترش مستقیم از ۲ قسمت متفاوت مدفوع تهیه گردد.

واژه‌های کلیدی: *کریپتوسپوریدیوم*، *مدفوع*، گسترش مستقیم، فرمل اتر، مطالعات اپیدمیولوژیک.

۱. گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسؤول: **echangizi@semnan.ac.ir**

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم پاروم، تک یاخته انگلی است که می تواند گوساله ها را همانند دیگر مهره داران آلوده سازد. بلع اووسیست های عفونی زا که از مدفوع حیوانات آلوده دفع شده است و در واکوئل های پارازیتوفروس در سلول های اپی تلیال دستگاه گوارش حیوان مبتلا تکثیر پیدا کرده است، موجب اسهال و دیگر ناراحتی های گوارشی در حیوان می شود (Fayer و همکاران، ۲۰۰۰). کریپتوسپوریدیوزیس در گوساله های شیری معمولا در هفته های اول زندگی رخ می دهد و در اغلب موارد نیز خودبخود محدود می–شود. ولی وضعیت ذکر شده در مزرعه ایی که میزان شیوع بیماری بالا است مشکلاتی را به علت افزایش هزینه درمان و در بعضی موارد مرگ و میرایجاد می کند (de Graaf و همکاران، ۱۹۹۹). *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در گوساله ها به لحاظ زئونوز بودن نیز اهمیت دارد. انسان می تواند با تماس مستقیم با حیوان مبتلا و یا خوردن اووسیست های عفونی زا در آب و یا غذای آلوده به بیماری مبتلا گردد (McLauchlin و همکاران، ۲۰۰۰؛ Peng و همکاران ۱۹۹۷). ابتلا به *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در گوساله ها با روش های متعددی قابل تشخیص است. در حیوان تلف شده، ابتلا، با مطالعه مقاطع بافت شناسی روده شناخته می شود. اما اغلب روش های تشخیصی بر پایه تشخیص اووسیست در نمونه های متراکم شده و یا معمولی با میکروسکوپ است. چنین روش هایی تهاجمی نیستند و قادر هستند که ابتلا به بیماری را در حیوان زنده نشان دهند. تشخیص انگل با استفاده از میکروسکوپ بر روی گسترش های رنگ شده و یا رنگ نشده صورت می گیرد. روش های رنگ آمیزی که بیشتر صورت می پذیرد شامل زیل نلسون، رنگ آمیزی غیراختصاصی فلوروسنت مانند اورامین–رودامین می باشد (Casemoreو همکاران، ۱۹۸۵؛ Qui´lez و همکاران، ۱۹۹۶). رنگ آمیزی های ذکر شده ممکن است به همراه روش های متراکم سازی و یا بدون روش های متراکم سازی و مستقیم انجام گیرد. روش های متراکم سازی(Bukhari و Smith، ۱۹۹۵) معمولا در جهت بالا بردن دقت تشخیص مورد استفاده قرار می گیرند. معمولا از محلول شیتر (محلول آبی شکر) برای متراکم سازی استفاده می شود. متراکم سازی با استفاده از سانتریفوژ و یا بدون آن صورت می–گیرد. از دیگر روش های متراکم سازی، تهیه رسوب با استفاده از روش فرمل اتر است. اما استفاده از روش های متراکم سازی در مقایسه با روش های مستقیم، هزینه بر و طولانی می باشد. علاوه بر این گوساله های شیری معمولا مقادیر زیادی اووسیست دفع می کنند (Nydam و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین مطالعه میکروسکوپی نمونه ها بدون روش های متراکم سازی نیز از حساسیت قابل قبولی برخوردار هستند. متراکم سازی نیز از حساسیت قابل قبولی برخوردار هستند. مطالعات فراوانی جهت ارزیابی و مقایسه روش های مختلف برای تشخیص *کریپتوسپوریدیوم* در انسان و حیوان انجام شده است (Bialek و همکاران، ۲۰۰۲، Abassi و همکاران، ۲۰۰۰، Morgan و همکاران، ۱۹۹۸). اما مطالعات چاپ شده در اکثر موارد، تکنیک هایی را شرح می دهد که نیاز به متراکم سازی دارد. بنابراین در این زمینه فقدان اطلاعاتی در رابطه با مفید بودن روش های ساده تر در جهت تشخیص سریعتر و ساده تر به چشم می خورد. هدف از این مطالعه ارزیابی و مقایسه ۲ روش تهیه گسترش از مدفوع متراکم شده به روش فرمل اتر و نمونه تازه مدفوع می باشد.

مواد و روش کار

جهت بررسی میزان شیوع کریپتوسپوریدیوزیس در گاوداری های شهرستان سمنان، نمونه های مدفوع به طور مستقیم از گوساله های گاوداری های مستقر در جنوب سمنان در تابستان ۱۳۸۹ اخذ گردید. نمونه های اخذ شده به همراه مشخصات در کیسه فریزر قرار داده شده و بدون اینکه به مدفوع ماده نگهدارنده ایی اضافه گردد، به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل و حداکثر تا ۵ روز در یخچال (۵ درجه) تا زمان آزمایش، نگهداری می شد. از نمونه ها به روش فرمل اتر که شرح آن در ذیل آمده است، گسترشی را بر روی لام تهیه کرده و پس از تثبیت آن با متانول به روش زیل نلسون، رنگ آمیزی می گردید و با میکروسکوپ با درشت نمایی ×۱۰۰ مورد مطالعه قرار می گرفتند. نمونه های مثبت به اووسیست کریپتوسپوریدیوم جدا شده و شدت آلودگی آن مورد سنجش قرار می گرفت. نمونه های تهیه شده پس از رنگ آمیزی با کربول فوشین، با بزرگنمایی ۱۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. در صورتی که در ۲۰ دامنه میکروسکوپی به طور متوسط ۱ اووسیست مشاهده می شد، به نمونه مربوطه شدت آلودگی ۱، در صورتی که بین ۲ تا ۵ اووسیست مشاهده می شد، شدت آلودگی ۲، در صورتی که بین ۶ تا ۱۰ اووسیست رویت می گردید، شدت آلودگی ۳ و در صورت دیده شدن بیشتر از ۱۰ اووسیست، شدت آلودگی ۴ ارزیابی می شد (José و همکاران، ۲۰۰۲). سپس از نمونه های مثبت با قوام طبیعی به دو صورت گسترش مستقیم و گسترش تهیه شده با روش فرمل اتر لام تهیه می گردید. در تهیه نمونه به روش گسترش مستقیم، با استفاده از چوب کبریت مقدار کمی مدفوع (۰/۰۴ گرم) را از دو قسمت متفاوت مدفوع، بر روی لام آزمایشگاهی گسترشی تهیه کرده و پس از خشک شدن آن، بوسیله متانول تثبیت می شد. در تهیه نمونه به روش فرمل اتر، یک گرم مدفوع را وزن کرده و در یک لیوان یک بار مصرف، حجم آن را با محلول فرمالین ۱۰٪ به ۱۰ سی سی می رساندیم. پس از مخلوط کردن و تهیه مخلوطی یکنواخت،

آن را از دو لایه تنزیب پارچه ایی عبور داده و به لوله آزمایش منتقل و حجم آن را با فرمالین ۱۰٪ به ۱۰ سی سی می رساندیم و ۳ سی سی اتر به آن اضافه کرده و به مدت ۲۰ ثانیه آن را به شدت تکان داده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی ۱۳۷۰ g سانتریفوژ می نمودیم. پس از سانتریفوژ، محلول رویی را دور ریخته و از مقداری از رسوب ته لوله بر روی لام گسترشی نهیه کرده و پس از خشک شدن، بوسیله متانول آن را تثبیت می نمودیم. لام های تهیه شده به روش زیل نلسون رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ با درشت نمایی ×۱۰۰ مورد مطالعه قرار می گرفتند. ۴۰ دامنه میکروسکوپی در هر لام تهیه شده بررسی شده و تعداد اووسیست های شمارش شده و اولین دامنه که اووسیست دیده شد، نیز یادداشت گردید.

نتایج

شدت آلودگی در تمامی نمونه های مثبت اخذ شده ۱ ارزیابی گردید. از ۵۳ نمونه مثبت به اووسیست کریپتوسپوریدیوم، ۵۳ لام به روش فرمل اتر و ۱۰۶ لام به روش گسترش مستقیم تهیه گردید. از ۵۳ نمونه تهیه شده به روش فرمل اتر، ۴۲ نمونه مثبت تشخیص داده شد. ولی در نمونه های تهیه شده به روش گسترش مستقیم، حداقل ۳۶ مورد از ۵۳ نمونه تهیه شده مثبت بودند. ولی هنگامی که ۲ نمونه گسترش مستقیم تهیه شده از یک نمونه در نظر گرفته می شد، موارد مثبت افزایش یافته و به ۴۶ نمونه می رسید. در هر گسترش به صورت اتفاقی، ۴۰ دامنه میکروسکوپی با درشت نمایی ×۱۰۰ مورد بررسی قرار می گرفت. به طور میانگین در هر گسترش تهیه شده به روش فرمل – اتر در ۴۰ دامنه میکروسکوپی ۱۱/۰۷ ±۸/۷۱ اووسیست مورد شمارش قرار می گرفت، ولی در گسترش مستقیم ۵/۵۴ ±۵/۰۲ اووسیست مورد شمارش قرار می گرفت. جستجوی اولین اووسیست در گسترش تهیه شده از فرمل اتر به طور میانگین در۳/۷۷ ± ۴/۲ دامنه میکروسکوپی صورت پذیرفت (حداقل اولین دامنه و حداکثر در دامنه ۱۶) مشاهده گردید. در گسترش تهیه شده به صورت مستقیم در ۱۱/۲ ± ۹/۹ دامنه میکروسکوپی، اولین اووسسیت مشاهده گردید (حداقل اولین دامنه و حداکثر در دامنه ۳۸). در مطالعه انجام شده حساسیت روش فرمل اتر با جستجوی ۴۰ دامنه میکروسکوپی در زمانی در حدود ۵ دقیقه، ۸۲/۴٪ و گسترش مستقیم با همان شرایط ۸۸/۳٪ ارزیابی گردید (جدول ۱).

روش	تعداد نمونه آزمایش شده	تعداد نمونه مثبت	حساسیت
فرمل اتر	۵۳	۴۲	٪۸۲/۸
گسترش مستقیم	۵۳	۴۶	٪۸۸/۳

جدول۱. مقایسه نتایج گسترش تهیه شده از فرمل– اتر و گسترش مستقیم

روش محاسبه حساسیت آزمایش: تعداد مثبت حقیقی / (تعداد مثبت حقیقی + تعداد منفی کاذب)

بحث

در دو دهه اخیر مطالعات بسیار زیادی در رابطه با کریپتوسپوریدیوزیس در ایران انجام شده است. در برخی از مطالعات مذکور، به منظور تهیه گسترش از مدفوع مشکوک، از روش فرمل اتر استفاده می شده است. بدین منظور از رسوب ته لوله بر روی لام گسترش و به روش زیل نلسون رنگ آمیزی می شود. علت این عمل هم ارزیابی هر چه دقیق تر مدفوع عنوان شده است (واحدی و همکاران ۱۳۸۸، نورمحمد زاده و همکاران ۱۳۸۹ ، فصیحی هرندی و فتوحی اردکانی ۱۳۸۷). یکی از بهترین روش ها جهت جدا سازی *کریپتوسپوریدیوم* از مدفوع، استفاده از روش فرمل اتر است. در مطالعه ایی در سال ۱۹۹۵ به منظور مقایسه روش های مختلف جداسازی و انتخاب بهترین روش، ۳ روش متراکم سازی با فرمل اتر– آب شکر و سولفات روی جهت جدا سازی اووسیست مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور به نمونه مدفوع گوساله ایی که از لحاظ ابتلا به *کریپتوسپوریدیوم* منفی بود، مقدار مشخصی اووسیست اضافه کردند و به کمک روش های مذکور اووسیست ها را جدا کردند. روش فرمل اتر نسبت به مابقی روش ها از کیفیت بالاتری برخوردار بود، و توانست ۴۶ تا ۷۵ درصد اووسیست ها را جدا کند. این در حالی است که بقیه روش ها در حدود ۲۴ تا ۶۴ درصد اووسیست ها را جدا کردند. آنها نتیجه گیری کردند که در متراکم سازی به روش فرمل اتر، به علت اینکه اتر چربی مدفوع را می گیرد و اووسیست ها در محلول پخش

می گردند، اثر بخشی بهتری دارد (Bukhari وSmith، ۱۹۹۵). علاوه بر روش فرمل اتر، روش های دیگرمرسوم جداسازی *کریپتوسپوریدیوم*، شامل متراکم سازی و رنگ آمیزی گسترش های مدفوع می باشد (Garcia و Shimizu، ۱۹۸۱، Rosalesو همکاران، ۱۹۹۴). روش های رنگ آمیزی جهت تفریق اووسیست های *کریپتوسپوریدیوم* شامل رنگ آمیزی متیلن-سافرانین بلو (Baxby و همکاران، ۱۹۸۴)، کینیون (Ma وSoave، ۱۹۸۳)، زیل نلسون (Henricksen و Pohlenz، ۱۹۸۱) و کربول فوشین DMSO می باشد (Pohjola و همکاران، ۱۹۸۴). در رنگ آمیزی های مذکور اووسیست به رنگ قرمز و زمینه لام به رنگ متضاد لام رنگ می گیرد. اما تشخیص تفریقی زمان بر و حساسیت و ویژگی آن متغیر است (Moodley و همکاران، ۱۹۹۱؛ Smith و همکاران، ۱۹۸۹؛ Baxby و همکاران، ۱۹۸۴). همچنین می توان بدون اینکه مدفوع را متراکم نمود، از مقدار کمی مدفوع بر روی لام گسترش تهیه کرد و پس از تثبیت آن با متانول، آن را رنگ آمیزی نمود. حساسیت این روش در صورت مطالعه اسلاید به مدت ۵ دقیقه ۸۳/۷٪ می باشد (Morganو همکاران، ۱۹۹۸) در مطالعه حاضر حساسیت روش فرمل اتر با جستجوی ۴۰ دامنه میکروسکوپی در زمانی در حدود ۵ دقیقه، ۸۲/۸٪ تعیین گردید ولی هنگامی که ۲ گسترش مستقیم از یک نمونه اخذ می گردید و با همان شرایط قبلی مطالعه می شد، حساسیت ۸۸/۳٪ ارزیابی گردید. در گسترش تهیه شده به روش فرمل اتر میانگین تعداد اووسیست یافت شده در هر لام و زمان صرف شده برای دیده شدن اولین اووسیست به طور معنی داری از لام های تهیه شده به روش گسترش مستقیم بیشتر بود ($\alpha \leq$ ۰,۰۱). بدیهی است که در روش فرمل اتر مقدار بیشتری از مدفوع مورد آزمایش قرار می گیرد و به همین علت هم تعداد اووسیست بیشتری و در زمان کمتری دیده می شود. بایستی به این نکته اذعان نمود که هدف غایی در مطالعات اپیدمیولوژیک، تعیین موارد مثبت و آلوده است. در کریپتوسپوریدیوزیس، تعداد اووسیست دفع شده بسیار زیاد است، در مطالعه ای آزمایشگاهی در ژاپن گزارش شده است که در صورت ابتلا گوساله به اسهال ناشی از کریپتوسپوریدیوزس، حداقل تعداد اووسیست دفع شده در هر گرم مدفوع یک گوساله در روزهای مختلف ۲×۱۰^{۶} و حد اکثر ۲×۱۰^{۸} است (Uga و همکاران، ۲۰۰۰). با احتساب اینکه با درشت نمایی ۱۰۰×، در زیر یک لام، ۵۷۵۸ دامنه میکروسکوپی دیده می شود. در صورتی که برای تهیه گسترش مستقیم از حدود ۰/۰۴ گرم مدفوع استفاده گردد. با توجه به حداقل تعداد اووسیست در هر گرم مدفوع (۲×۱۰^{۶})، به طور متوسط در هر دامنه میکروسکوپی ۱/۴ اووسیست دیده خواهد شد که با معیار معمول، تخمین شدت آلودگی در چنین مدفوعی ۱ می باشد. به عبارت دیگر در صورتی که گوساله به حداقل شدت آلودگی نیز مبتلا باشد گسترش مستقیم از مدفوع می تواند ارزیابی دقیقی از آلودگی را بیان نماید. ولی بایستی به این نکته نیز توجه نمود که پراکندگی اووسیست در مدفوع یکنواخت نیست (Uga و همکاران، ۲۰۰۰)، به همین جهت پیشنهاد می گردد که ۲ گسترش، از دو قسمت متفاوت مدفوع تهیه گردد. با توجه با اینکه در روش فرمل اتر، برای تهیه گسترش از مواد و لوازم بیشتری استفاده می شود و حداقل زمان لازم جهت آزمایش فرمل اتر در حدود ۳۰ دقیقه می باشد، منطقی به نظر می رسد که در مطالعات اپیدمیولوژیک، ۲ گسترش مستقیم از دو قسمت مختلف مدفوع مورد آماده سازی و مطالعه قرار گیرد.

Journal of Veterinary Laboratory Research 5 (2013) 21-27

Evaluation of two simple tests for detection of *cryptosporidium* in calves

Changizi, e.

Received: 10.03.2012 Accepted: 24.03.2013

Abstract

In order to compare the methods of *Cryptosporidium* infected fecal sample preparation, including direct smear and formol-ether concentration method, we prepared two direct smear and one formol-ether smear from each fecal sample. Out of 53 specimens (infected cows from different animal husbandry of Semnan) in formol-ether smear, 42 samples were positive. But in specimens in direct smear at least 36 were positive. In performing two direct smears, 46 samples were positive. Sensitivity in direct smear was estimated 88.3% and in formol-ether was 82.8%. It seems to be logical that it's better to provide two direct smear from different parts of the feces in epidemiological studies.

Key words: *Cryptosporidium*, Direct smear, formol-ether smear, Epidemiological studies

1. School of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: **echangizi@semnan.ac.ir**

منابع

فصیحی هرندی، م.، فتوحی اردکانی، ر. ۱۳۸۷. *کریپتوسپوریدیوم* در گوسفند و بز شهرستان کرمان: اپیدمیولوژی و آنالیز فاکتورهای خطر آلودگی. مجله تحقیقات دامپزشکی، **۶۳ (۱)**، ۴۷-۵۱.

واحدی، ن.، دلیمی اصل، ع.، سعادت آملی، م. ۱۳۸۸. بررسی مقدماتی میزان آلودگی با کریپتوسپوریدیایی گوارشی در بره ها و گوساله ها در شهرستان آمل- ایران. مجله تحقیقات دامپزشکی، **٦٤ (۲)**، ۱۰۱-۱۰۳.

نور محمد زاده، ف.، داوودی، ی.، جمالی، ر.، نوروزیان، ا. ۱۳۸۹. مطالعه اپیدمیولوژیک کریپتوسپوریدیوز گوساله های نوزاد در استان آذربایجان شرقی. مجله تحقیقات دامپزشکی، **٦٥ (۳)**، ۲۴۷-۲۵۴.

Abassi, H., Wyers, M., Naciri, M. 2000. Rapid detection and quantification of *Cryptosporidium baileyi* oocysts in feces and organs of chickens using a microscopic slide flotation method. Parasitology Research. **86**, 179-187.

Baxby, D., Blundell, N., Hart, C.A. 1984. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. Journal of Hygiene.**92**, 317-323.

Bialek, R., Binder, N., Dietz, K., Joachim, A., Knobloch, J., Zelck, U.E. 2002. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. **43**, 283-288.

Bukhari, Z., Smith, H.V. 1995. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. Journal of Clinical Microbiology. **33**, 2592-2595.

Casemore, D.P., Armstrong, M., Sands, R.L. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. Journal of Clinical Pathology. **38**, 1337-1341.

De Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E. 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. International Journal for Parasitology. **29**, 1269-1287.

Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and Identification. International Journal for Parasitology **30**, 1305-1322.

Garcia, L.S., Shimizu, R. 1981. Comparison of clinical results for the use of ethyl acetate and diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique performed on polyvinyl alcohol-preserved specimens. Journal of Clinical Microbiology. **13**, 709-713.

Henricksen, S.A., Pohlenz, J.F.L. 1981. Staining of *cryptosporidium* by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Veterinaria Scandinavica. **22**, 594-596.

José, A., Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y.A., Mezo-Menéndez, M., Ares-Mazás E. 2002. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. Veterinary Parasitology. **106**, 11-17.

Ma, P., Soave, R. 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhoea. Journal of Infectious Disease. **147**, 824-828.

McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Dı´az, S., Nichols, G.L. 2000. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. In the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1705 fecal

samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. Journal of Clinical Microbiology. **38**, 3984-3990.

Moodley, D., Jackson, T.F., Gathiram, V., van den Ende, J.A. 1991. Comparative assessment of commonly employed procedures for the diagnosis of cryptosporidiosis. South African Medical Journal. **79**, 314-317.

Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, G., Thompson, C.A. 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. Journal of Clinical Microbiology. **36**, 995-998.

Nydam, D.V., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Mohammed, H.O. 2001. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. American Journal of Veterinary Research. **62**, 1612-1615.

Peng, M.M., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, J., Escalante, A.A.,Weltman, A.C., Ong, C.S.L., MacKenzie,W.R., Lal, A.A., Beard, C.B. 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. Emerging Infectious Diseases journal. **3**, 567-573.

Pohjola, S., Jokipii, L., Jokipii, A.M.M. 1984. Dimethylsulphoxide-Ziehl-Neelsen staining technique for the detection of cryptosporidial oocysts. Veterinary Record. **115**, 442-443.

Quı´lez, J., Sa´nchez-Acedo, C., Clavel, A., del Cacho, E., Lo´pez- Bernad, F. 1996. Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. Veterinary Parasitology. **67**, 75-81.

Rosales, M.J., Lazcano, C.M., Arnedo, T., Castilla, J.J. 1994. Isolation and identification of *Cryptosporidium parvum* oocysts with continuous percoll gradients and combined alcian blue-giemsa staining. Acta Tropica. **56**, 371-373.

Smith, H.V., McDiarmid, A., Smith, A.L., Hinson, A.R., Gilmour, R.A. 1989. An analysis of staining methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water-related samples. Parasitology. **99**, 323-327.

Uga, S., Matsuo, J., Kono, E., Kimura, K., Inoue, M., Rai, S.K., Onad, K. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan. Veterinary Parasitology. **94**, 27-32.