دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و ششم، شماره ۱، صفحه ۲۴-۱۴ (فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۲)

Iran South Med J 2023; 26(1): 14-24

تشخیص و شناسایی کریپتوسپوریدیوم در فاضلاب‌های خام شهری ورودی به مناطق ساحلی بوشهر با استفاده از nested-PCR

فرشید سلیمانی (PhD)[۱و۲*]، رضا طاهرخانی (PhD)[۳]، سینا دوبرادران (PhD)[۲و ۴**]،
فاطمه فرشادپور (PhD)[۳]، عاطفه خلیلی درودزنی (MSc)[۲]، مرضیه طاهرزاده (PhD)[۵]

[۱] مرکز تحقیقات دخانیات و سلامت، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بهداشت محیط سیستمی و انرژی، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۳] مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۴] گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۵] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱۵- پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۵/۲۴)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

چکیده

زمینه: تک یاخته کریپتوسپوریدیوم از انگل‌های بیماری‌زای روده‌ای در آب و هوای گرم و مکان‌هایی که تصفیه آب و فاضلاب کمتر مؤثر است، شیوع بیشتری دارند. هدف از این مطالعه تشخیص و شناسایی کریپتوسپوریدیوم در فاضلاب شهری خام ورودی به منطقه ساحلی در شهر بوشهر بود.

مواد و روش‌ها: در مجموع در دو فصل زمستان و تابستان ۴۸ نمونه فاضلاب خام شهری از ۸ ایستگاه برداشت شد. نمونه‌های فاضلاب از طریق الک ۳۰۰ میکرومتری برای حذف ذرات بزرگ و سپس بر روی غشای استات سلولز، با اندازه منافذ ۱/۲ میکرومتر فیلتر شدند. فیلترها خراشیده و با استفاده از ۴۰ میلی‌لیتر سالین بافر فسفات (PBS) حاوی ۰/۰۵ درصد TWEEN شسته شدند و سپس با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از چرخه‌ی انجماد و ذوب برای استخراج DNA استفاده شد. سطح DNA استخراج شده با نانو دراپ (اسپکتروفتومتر، ND1000) اندازه‌گیری شد و محصولات PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد جدا شدند.

یافته‌ها: نتایج آنالیز PCR نشان داد که از ۴۸ نمونه، ۱۷ نمونه (۳۵/۴ درصد) در مورد کریپتوسپوریدیوم با استفاده از nested-PCR مثبت شدند. در مجموع به ترتیب ۱۱ و ۶ نمونه در فصل زمستان و تابستان مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: مقامات محلی بایستی با توجه و بکارگیری فرآیندهای تصفیه فاضلاب از اپیدمی‌های احتمالی کریپتوسپوریدیوز بین ساکنین و همچنین به کاهش انتقال کریپتوسپوریدیوز انسانی و حیوانی کمک کنند.

واژگان کلیدی: کریپتوسپوریدیوم، فاضلاب، PCR، بوشهر، خلیج‌فارس

[**] بوشهر، مرکز تحقیقات بهداشت محیط سیستمی و انرژی، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
E. mail: s.dobaradaran@bpums.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-2701-888X
**ORCID: 0000-0002-8857-7343

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم یک تک یاخته انگلی و عامل مهم شیوع بیماری‌های روده‌ای منتقله از طریق آب در سراسر جهان، به ویژه در کشورهای در حال توسعه است و می‌تواند میزبان‌های مختلف را آلوده کند (۱). در میان گونه‌ها/ ژنوتیپ‌های مختلف کریپتوسپوریدیوم، C. parvum و C. hominis از اهمیت زیادی برای سلامت انسان برخوردار هستند (۲). این پاتوژن‌ها عامل اصلی عوارض و مرگ ومیر در افراد دارای نقص ایمنی هستند (۳). همچنین اپیدمی‌های کریپتوسپوریدیوزیس در جهان مانند شیوع میلواکی در سال ۱۹۹۳ نشان دهنده اهمیت این تک یاخته و تأثیر آن بر سلامت انسان است (۴ و ۵). وجود گونه‌های کریپتوسپوریدیوم در محیط زیست یک خطر جدی برای سلامت عمومی است (۶ و ۷) و ممکن است انسان از طریق غذا و آب آلوده یا تماس مستقیم با افراد آلوده یا حیوانات اهلی و وحشی به گونه‌های کریپتوسپوریدیوم آلوده شود، اگرچه تقریباً ۹۰ درصد شیوع‌های ثبت شده به منابع آب آلوده مرتبط است (۸).

اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم اغلب در فاضلاب خام تصفیه خانه‌های فاضلاب (WWTPs)[1] در سراسر جهان یافت می‌شوند (۹). چندین مطالعه وجود اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم را در فاضلاب خام گزارش کرده‌اند(۱۴-۱۰). تخلیه پساب‌های حاوی این انگل‌ها به دلیل تصفیه ناکافی فاضلاب خام ممکن است انسان‌ها یا حیوانات را از طریق مصرف غذاهای دریایی خام، نوشیدن آب آلوده، شنا یا فعالیت‌های تفریحی به ویژه در استخرها آلوده کند (۸ و ۱۵).

بررسی‌های مولکولی بر توزیع گونه‌های کریپتوسپوریدیوم در ایران عمدتاً به دلیل بی‌توجهی، مشکلات فنی، و هزینه بالای تجهیزات یا آزمایشگاهی، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. اگرچه برخی از مطالعات قبلی بر روی شیوع گونه‌های کریپتوسپوریدیوم در آب‌های سطحی و WWTPها متمرکز شده‌اند (۲۱-۱۶)، اما هیچ مطالعه‌ای در مورد فاضلاب شهری خام ورودی به آب‌های ساحلی انجام نشده است. در امتداد سواحل شهر بوشهر، فاضلاب‌های خام شهری بدون هیچگونه تصفیه مستقیماً به آب‌های ساحلی تخلیه می‌شوند که می‌توانند منجر به شیوع بیماری کریپتوسپوریدیوزیس و تهدید جدی برای سلامت انسان و اکوسیستم آبی بشمار روند. بخشی از فاضلاب این شهر توسط یک WWTP با حوضچه تثبیت به عنوان فرآیند اساسی تصفیه فاضلاب تصفیه می‌شود. با این حال، بخش قابل توجهی از فاضلاب تولید شده از جمله رواناب شهری بدون هیچ گونه تصفیه در کنار ساحل مستقیماً به دریا تخلیه می‌شود. هیچ مطالعه قبلی در مورد کیفیت فاضلاب و شیوع بیماری‌های مختلف ناشی از تصفیه نامناسب فاضلاب در بوشهر در دسترس نیست. بیماری‌های انگلی می‌توانند از راه‌های مختلف مانند فاضلاب‌های خام و آب آلوده شده به فاضلاب‌های شهری منتقل گردد، لذا فاضلاب‌ها از مهم‌ترین منابع پخش عوامل عفونت‌زا در محیط هستند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر تشخیص و شناسایی کریپتوسپوریدیوم در فاضلاب‌های خام شهری ورودی به مناطق ساحلی بوشهر به روش nested-PCR و ارائه توصیه‌هایی برای حفظ سلامت شهروندان و محیط‌زیست دریا بود.

مواد و روش‌ها

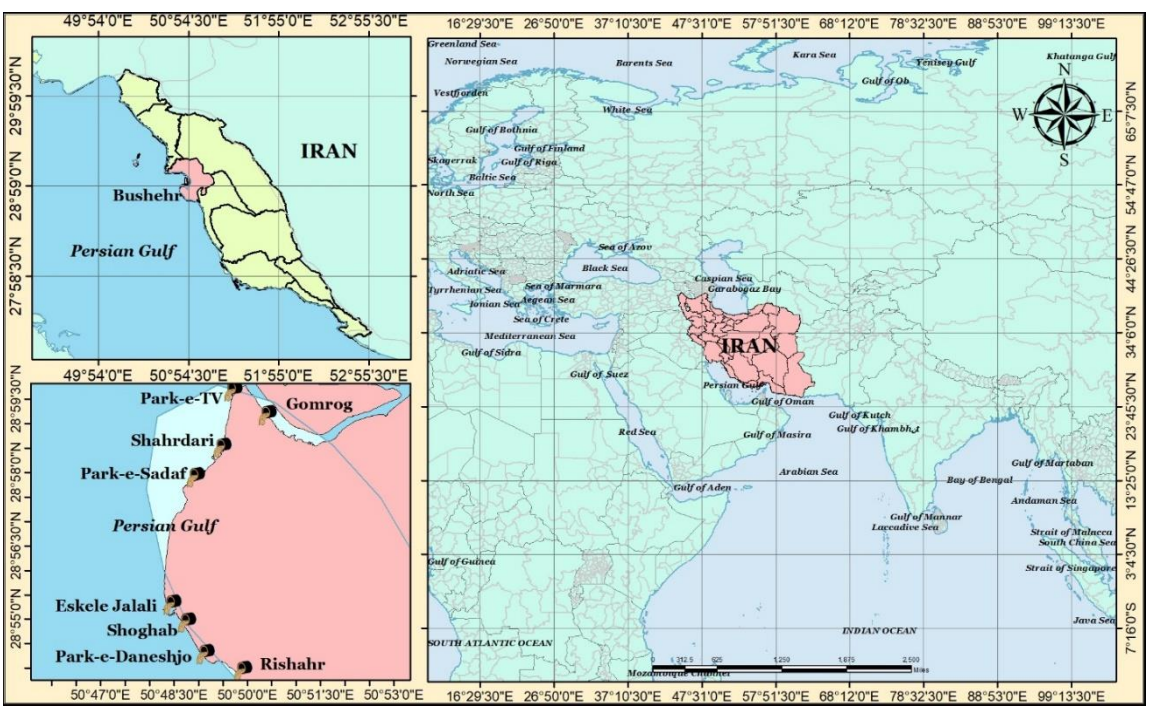
این مطالعه در شهر بوشهر واقع در جنوب ایران انجام شد. بوشهر شهری ساحلی و سومین شهر بزرگ جنوب ایران با جمعیتی حدود ۳۰۰۰۰۰ نفر است که روزانه ۳۸۰۰۰ مترمکعب فاضلاب شهری در شهر بوشهر تولید می‌شود.

[1] Wastewater treatment plants

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

در فواصل نوامبر ۲۰۱۷ تا اکتبر ۲۰۱۸، در مجموع ۴۸ نمونه فاضلاب خام شهری از ۸ ایستگاه تخلیه (پارک تی وی، ریشهر، شغاب، پارک دانشجو، پارک صدف، اسکله جلالی، گمرگ و شهرداری) در خط ساحلی شهر بوشهر جمع‌آوری شد (شکل ۱). در هر ایستگاه سه نمونه (هر نمونه ۲۰ لیتر) برای هر یک از فصول زمستان و تابستان جمع‌آوری شد. نمونه‌های فاضلاب از طریق الک ۵۰ مش ۳۰۰ میکرومتری برای حذف ذرات بزرگ و سپس بر روی غشای استات سلولز، با اندازه منافذ ۱/۲ میکرومتر و قطر ۴۷ میلی‌متر فیلتر شدند. فیلترها خراشیده و با استفاده از ۴۰ میلی لیتر سالین بافر فسفات (PBS) حاوی ۰/۰۵ درصد TWEEN شسته و سپس با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.



شکل ۱) ایستگاه‌های ورود فاضلاب خام به آب دریا در نوار ساحلی شهر بوشهر

Fig 1) The raw wastewater entry stations into sea water in the coasline of Bushehr city

پس از سانتریفیوژ، محصول گلوله‌ای شکل در ۱ میلی‌لیتر بافر هضم (۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۲۵ میلی‌مولار EDTA (pH= ۸)، ۲۵ میلی‌مولار NaCl؛ ۲ درصد SDS) ورتکس شد. سپس محلول در بن ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و به تناوب هم زده شد. به دنبال آن ۱۵ چرخه ذوب انجماد (انجماد ۵ دقیقه در نیتروژن مایع و ذوب ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، و ۱ درصد b-mercaptoethanol، ۱ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP)؛ ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر نمک طعام ۵ مولار اضافه و کاملاً مخلوط شد. پس از آن، ۴۰۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl از پیش گرم شده (۶۵ درجه سانتی‌گراد) (۱۰ درصد CTAB در ۰/۷ مولار NaCl) اضافه شد و با ورتکس کاملاً مخلوط شد تا

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

محتوای مایع شیری شود و ۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. حجم مساوی ۲۴:۱ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه به خوبی مخلوط شد و ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع‌رویی آبی به یک لوله تازه منتقل شد. سپس، حجم مساوی ایزوپروپانول سرد اضافه و مخلوط شد تا اسیدهای نوکلئیک رسوب کنند. مخلوط به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محصول گلوله‌ای با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد شسته و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مرحله شستشو دو بار تکرار شد. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در هوا خشک شدند و گلوله DNA بی‌رنگ در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر از بافر TE حل شد و شبانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. غلظت DNA استخراج شده توسط NanoDrop (اسپکتروفتومتر، ND1000) اندازه‌گیری و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مراحل بعدی نگهداری شد. در این مطالعه از دستگاه PCR TC-512 (برند Techne انگلستان) استفاده شد.

واکنش‌های PCR در حجم کل ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۲ میکرولیتر MgCl2 ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر dNTP، ۲۰pmoles از هر پرایمر و ۲ واحد DNA Taq پلیمراز انجام شد. مراحل PCR با دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ سیکل دناتوراسیون ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵۶ درجه حرارت بازپخت بمدت ۳۰ ثانیه و گسترش به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد با گسترش نهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد (Invitrogen) در TBE ۱x الکتروفورز شدند. پنج میکرولیتر محصول PCR در چاهک‌های نمونه بارگذاری و ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت استفاده شد. سپس ژل در زیر UV transilluminator مشاهده شد. آمپلیکون اولیه حدود ۷۶۲ جفت باز و آمپلیکون دور دوم حدود ۵۸۵ جفت باز بود. طراحی پرایمرها بر اساس مطالعات قبلی صورت گرفت (۲۲ و ۲۳).

جدول ۱) پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی کریپتوسپوریدیوم

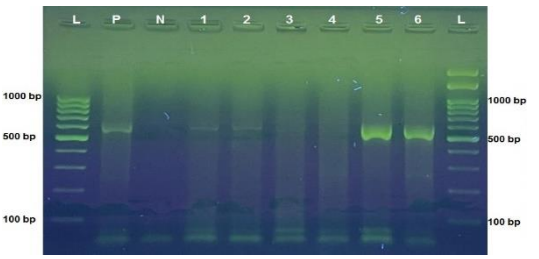
تک یاخته	شناسه پرایمر	توالی پرایمر	محصول PCR(bp)	دمای بازپخت	ناحیه ژن	منبع
کریپتوسپوریدیوم	Crypto271-294-F1	GACATATCATTCAAGTTTCTGACC	bp۷۶۲	۵۶°C	Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA)	(۲۲ و ۲۳)
	Crypto1033-1012-R1	CTGAAGGAGTAAGGAACAACC				
	Crypto294-314-F2	CTATCAGCTTTAGACGGTAGG	bp۵۸۵	۵۶°C		
	Crypto877-856-R2	TCTAAGAATTTCACCTCTGACTG				

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

یافته‌ها

از ۴۸ نمونه بررسی شده، ۱۷ نمونه (۳۵/۴ درصد) در مورد کریپتوسپوریدیوم، با Nested PCR مثبت بودند (شکل ۲).



شکل ۲) الکتروفورز محصول PCR دور دوم کریپتوسپوریدیوم
L .18S rRNA: نشانگر اندازه 100b DNA، P: کنترل مثبت؛
N: کنترل منفی؛ ۱-۶: نمونه‌ها

Fig 2) The electrophoresis *Cryptosporidium* second round PCR product 18S rRNA. L: 100b DNA size marker, P: positive control; N: negative control; 1-6: Examples

در مجموع در هر دو فصل، در ایستگاه‌های شغاب و پارک تی وی به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد مثبت گزارش شد. همچنین در فصل زمستان و تابستان به ترتیب ۱۱ و ۶ نمونه مثبت بودند (جدول ۲).

جدول ۲) نتایج انالیز PCR نمونه‌های فاضلاب خام شهری ایستگاه‌های مختلف خط ساحلی بوشهر (۴۸ نمونه)

ایستگاه	شماره نمونه	فصل	
		زمستان (۲۴ نمونه)	تابستان (۲۴ نمونه)
پارک تی وی	۱	-	-
	۲	+	-
	۳	-	-
ریشهر	۱	+	-
	۲	-	-
	۳	+	-
شغاب	۱	-	-
	۲	+	+
	۳	+	+
پارک دانشجو	۱	-	-
	۲	+	-
	۳	-	+
پارک صدف	۱	+	-
	۲	-	+
	۳		-
اسکله جلالی	۱	-	-
	۲	+	+
	۳	-	-
گمرگ	۱	-	-
	۲	+	-
	۳	+	-
شهرداری	۱	+	-
	۲	-	-
	۳	-	+
کل نمونه های مثبت		۱۱	۶

بحث

انتقال کریپتوسپوریدیوم در ایران به خوبی شناخته نشده است و براساس دانش موجود این مطالعه اولین گزارش در زمینه شیوع و پراکنش فصلی کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های فاضلاب خام شهری در جنوب کشور است. چندین مطالعه وجود اووسیست کریپتوسپوریدیوم در فاضلاب خام را در سراسر جهان گزارش کرده‌اند (۱۲-۱۰). در مطالعه‌ای در شانگهای، چین، ۴۰ درصد از نمونه‌های پساب تصفیه خانه شهری در مورد گونه‌های *Cryptosporidium* شناسایی شده توسط PCR مثبت بودند (۲۴) که با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد. در مطالعه دیگری در تهران، ۷۰/۵ درصد از نمونه‌های فاضلاب بررسی شده از نظر اووسیست کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های فاضلاب انسانی و دامی (تشخیص داده شده با PCR) مثبت بود (۱۶) که بسیار بیشتر از تعداد موارد مثبت در مطالعه حاضر است. در مطالعه فن (Fan) و همکاران، میزان کل وقوع کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های WWTPs و فاضلاب به ترتیب ۱۴/۳ و ۱۳/۶ درصد بود (۲۵) و نرخ موارد مثبت کمتر از مطالعه ما بود. در مطالعه دیگری در چین، ۷۰ درصد از نمونه‌های فاضلاب از شانگهای، ۳۶/۸ درصد از نانجینگ، ۶۸/۸ درصد از چینگدائو و ۴۷درصد از ووهان در مورد گونه‌های کریپتوسپوریدیوم مثبت بودند (۲۶). پارامترهای مختلفی مانند تفاوت در تعداد و یا روش نمونه‌برداری، شرایط جغرافیایی، میزان و روش تصفیه فاضلاب می‌تواند دلایل اصلی تفاوت در نتایج گزارش شده باشد (۲۵). در مناطق مورد بررسی در مطالعه حاضر، فاضلاب خام بدون هیچ گونه فرآیند تصفیه به سواحل تخلیه می‌شود، بنابراین سطوح میکروبی بالاتر از حد مجاز می‌تواند نگرانی‌های بهداشت عمومی را در پی داشته باشد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

به طور کلی، شیوع آلودگی کریپتوسپوریدیوم در فصل سرد (پاییز) دو برابر بیشتر از فصل گرم (تابستان) بود و با مطالعه‌ای که در آب‌های سطحی تایلند انجام شده است (۲۷) همسو می‌باشد. مطالعات قبلی نتایج متفاوتی از شیوع فصلی کریپتوسپوریدیوم گزارش کرده‌اند (۲۸). به عنوان مثال، آجونینا (Ajonina) و همکاران، در مطالعه‌ای گزارش کردند که اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در طول پاییز و زمستان در آلمان غالب‌تر هستند (۲۹)، در حالی که رامو (Ramo) و همکاران، نشان دادند که اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در فصل تابستان در اسپانیا در WWTPها به اوج خود رسیدند (۳۰). در مطالعه دیگری در شمال شرقی اسپانیا، بیشترین موارد مثبت اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های فاضلاب و پساب ثانویه در بهار و پاییز مشاهده شد (۳۱). در مطالعه دیگری در آلمان، سطح کیست‌های کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های فاضلاب ورودی در اواخر تابستان و در طول زمستان، بسته به میزان بارندگی، شیوع بیشتری داشت (۳۲). واضح است که شیوع فصلی کریپتوسپوریدیوم در فاضلاب بسته به ویژگی‌های مشخصی مانند شرایط آب و هوایی، دمای آب/ فاضلاب و سایر عوامل مرتبط با شرایط اپیدمیولوژیک، الگوهای متفاوتی را ارائه می‌کند (۷ و ۳۳).

رواناب‌ها (در فصول بارانی) از زمین‌های کشاورزی و تخلیه فاضلاب به رودخانه‌ها، مصب‌ها و آب‌های ساحلی با آلودگی آب دریا مرتبط هستند (۳۴ و ۳۵). آگویره (Aguirre) و همکاران، نیز میزان اووسیست کریپتوسپوریدیوم در آب دریا را با رویدادهای بارانی مرتبط می‌دانند (۳۶). با این حال، مطالعات محدودی در رابطه با آلودگی تک یاخته‌ها از طریق وقوع بارندگی‌ها وجود دارد (۳۷). میزان *Cryptosporidium spp* آب دریا به عوامل محیطی مختلفی از جمله تخلیه فاضلاب به آب‌های ساحلی، رواناب پس از باران‌های شدید یا سیل، فعالیت‌های کشاورزی، تخلیه آب آلوده، مرتع کردن دام‌ها در نزدیکی منابع آب، و دفع زباله‌های آلوده به مدفوع از کشتارگاه‌ها و WWTPها است (۳۸ و ۳۹). در میان منابع آلودگی، تخلیه فاضلاب‌ها به آب‌های ساحلی و رواناب‌ها پس از باران‌های شدید مهم‌ترین منابع بوده و ممکن است در طول فصول باران به طور قابل توجهی شیوع کریپتوسپوریدیوم در سایت‌های مورد مطالعه افزایش یابد. دوز عفونی این پاتوژن‌ها کم (۳۰-۱۰ اووسیست) است (۴۰). بنابراین، تخلیه فاضلاب خام آلوده به محیط‌های آبی که در آن فعالیت‌های تفریحی و تجاری مانند شنا، ورزش صورت می‌گیرد و یا غذاهای دریایی برای مصرف انسان برداشت می‌شود، می‌تواند خطر ابتلای انسان به انگل‌های مشترک بین انسان و دام را افزایش دهد. وجود کریپتوسپوریدیوم در نقاط تخلیه فاضلاب یک مسیر بالقوه مواجهه انسان با این انگل را نشان می‌دهد که یک نگرانی بهداشت عمومی محسوب می‌شود. برای جلوگیری از شیوع کریپتوسپوریدیوزیس، بایستی اقدامات و توصیه‌های متعددی در راستای پیشگیری و نظارت بر حضور گونه‌های کریپتوسپوریدیوم در شناگاه‌ها و همچنین غذاهای دریایی (مانند صدف‌ها) در نظر گرفته شود. برای جلوگیری از انتقال محیطی پاتوژن‌های مختلف (به‌عنوان مثال، ویروس‌ها، باکتری‌ها، انگل‌های تک‌یاخته‌ای و کرم‌ها)، تصفیه پساب‌ها برای کاهش یا غیرفعال کردن عوامل بیماری‌زا قبل از تخلیه ضروری است (۴۱). تصفیه فاضلاب معمولاً شامل فرآیندهای فیزیکی، بیولوژیکی و شیمیایی است (۴۱). مطالعات قبلی نشان داد که فرآیندهای تصفیه متداول مورد استفاده در WWTPs برای حذف همه

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

اووسیست‌های *Cryptosporidium spp* ناکارآمد بودند (۱۴، ۴۴-۴۲).

با توجه به مطالعه ناصر، لجن فعال و فیلتراسیون شنی با سرعت بالا کارایی پایینی برای حذف اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم از پساب داشتند و اشعه ماوراء بنفش موثرترین فرآیند ضدعفونی برای غیرفعال کردن کریپتوسپوریدیوم بود (۴۱). حوضچه‌های تثبیت فاضلاب با زمان نگهداری بیش از ۲۰ روز و تالاب‌های جریان سطحی غوطه‌ور نیز دارای راندمان حذف بالایی برای اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم از فاضلاب بودند (۴۱). با این وجود، استفاده از فناوری‌های مؤثر تصفیه فاضلاب می‌تواند از انتقال محیطی کریپتوسپوریدیوم جلوگیری کند. از این نظر، اجرای فناوری‌های تصفیه کافی در شهر بوشهر برای جلوگیری از تبدیل شدن اووسیست کریپتوسپوریدیوم به یک معضل بهداشتی ضروری است.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، شیوع کریپتوسپوریدیوم در پساب‌های شهری خام تخلیه شده به آب‌های ساحلی شهر بوشهر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نرخ PCR مثبت به طور قابل توجهی در طول فصل بارانی بیشتر است که احتمالاً به دلیل افزایش بارهای تخلیه از وقوع باران شدید و رواناب‌های شهری می‌باشد. با توجه به اینکه بخش قابل توجهی از فاضلاب تولید شده در شهر بوشهر و رواناب شهری بدون هیچ گونه تصفیه در کنار ساحل مستقیماً به دریا تخلیه می‌شود (۴۵ و ۴۶)، بنابراین مسئولان استان بوشهر بایستی نسبت به اپیدمی احتمالی کریپتوسپوریدیوز در بین شهروندان آگاه باشند و اقدامات مناسب مانند جمع‌آوری و مدیریت مناسب فاضلاب شهری و سپس اعمال فرآیندهای مؤثر تصفیه فاضلاب می‌تواند به کاهش انتقال کریپتوسپوریدیوز انسانی و حیوانی کمک کند.

سپاس و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی بوده و تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر می‌باشد (Grant No: ۲۶۶). لذا بدین‌وسیله نویسندگان از این معاونت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks-an update 2011-2016. Water Res 2017; 114: 14-22. doi: 10.1016/j.watres.2017.01.036.

2.Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitology 2014; 141(13): 1667-85. doi: 10.1017/S0031182014001085.

3.Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. Exp Parasitol 2010; 124(1): 138-46. doi: 10.1016/j.exppara.2009.02.003.

4.Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol 2000; 30(12-13): 1305-22. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00135-1.

5.Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med 1994; 331(3): 161-7. doi: 10.1056/NEJM199407213310304.

6.Putignani L, Menichella D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. Interdiscip

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

Perspect Infect Dis 2010; 2010: 753512. doi: 10.1155/2010/753512.
7. Haghi MM, Khorshidvand Z, Khazaei S, et al. *Cryptosporidium* animal species in Iran: a systematic review and meta-analysis. Trop Med Health 2020; 48(1): 97. doi: 10.1186/s41182-020-00278-9.
8. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks-an update 2004-2010. Water Res 2011; 45(20): 6603-14. doi: 10.1016/j.watres.2011.10.013.
9. Khouja LBA, Cama V, Xiao L. Parasitic contamination in wastewater and sludge samples in Tunisia using three different detection techniques. Parasitol Res 2010; 107(1): 109-16. doi: 10.1007/s00436-010-1844-8.
10. Bai X, Zeng L, Zhu B, et al. Existence of *Cryptosporidium* and Giardia in the effluent from a WWTP and its receiving water in Shanghai. Chin J Health Lab Technol 2006; 16(1): 4-5. https://caod.oriprobe.com/articles/10069323/Existence_of_*Cryptosporidium*_and_Giardia_in_the_ef.htm.
11. Yu S, Chen Y, Yan J. The determination of Giardia Theca and *Cryptosporidium* Capsule in water by immunofluorescence method. Adm Tech Environ Monit 2009; 21: 33-5. https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=The+determination+of+Giardia+Theca+and+*Cryptosporidium*+Capsule+in+water+by+immunofluorescence+method&btnG=.
12. Feng Y, Li N, Duan L, et al. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium* hominis transmission. J Clin Microbiol 2009; 47(1): 153-7. doi: 10.1128/JCM.01777-08.
13. Ulloa-Stanojlović FM, Aguiar B, Jara LM, et al. Occurrence of Giardia intestinalis and *Cryptosporidium sp*. in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Peru. Environ Sci Pollut Res Int 2016; 23(21): 22197-205. doi: 10.1007/s11356-016-7537-9.
14. Martins FDC, Ladeia WA, Toledo RdS, et al. Surveillance of Giardia and *Cryptosporidium* in sewage from an urban area in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2019; 28(2): 291-7. doi: 10.1590/S1984-29612019037.
15. Liu A, Ji H, Wang E, et al. Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and Giardia duodenalis in raw urban wastewater in Harbin, China. Parasitol Res 2011; 109(3): 913-8. doi: 10.1007/s00436-011-2333-4.
16. Hatam-Nahavandi K, Mohebali M, Mahvi AH, et al. Microscopic and molecular detection of *Cryptosporidium* andersoni and *Cryptosporidium* xiaoi in wastewater samples of Tehran Province, Iran. Iran J Parasitol 2016; 11(4): 499-506. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28127361/.
17. Hatam-Nahavandi K, Mohebali M, Mahvi AH, et al. Evaluation of *Cryptosporidium* oocyst and Giardia cyst removal efficiency from urban and slaughterhouse wastewater treatment plants and assessment of cyst viability in wastewater effluent samples from Tehran, Iran. J Water Reuse Desalination 2015; 5(3): 372-90. https://doi.org/10.2166/wrd.2015.108.
18. Mahmoudi MR, Nazemalhosseini-Mojarad E, Kazemi B, et al. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes distribution in river water in Iran. J Water Health 2015; 13(2): 600-6. doi: 10.2166/wh.2014.234.
19. Mahmoudi MR, Kazemi B, Mohammadiha A, et al. Detection of *Cryptosporidium* and Giardia (oo) cysts by IFA, PCR and LAMP in surface water from Rasht, Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 2013; 107(8): 511-7. doi: 10.1093/trstmh/trt042.
20. Mahmoudi MR, Karanis P. Genotyping of *Cryptosporidium spp*. from a Sewage-Contaminated River in Guilan, Iran. Environ Sci Proc 2020; 2(1): 10. https://doi.org/10.3390/environsciproc2020002010.
21. Mahmoudi MR. Molecular detection and characterization of *Cryptosporidium spp*. in the sewage-contaminated rivers entering Bandar-e Anzali Lagoon in Guilan Province, Iran. J Adv Environ Health Res 2020; 8(2): 95-9. doi: 10.22102/JAEHR.2020.203874.1145.
22. Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Appl Environ Microbiol 2005; 71(8):

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

4446-54. doi: 10.1128/AEM.71.8.4446-4454.2005.
23.LeChevallier MW, Di Giovanni GD, Clancy JL, et al. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium spp*. in source waters. Appl Environ Microbiol 2003; 69(2): 971-9. doi: 10.1128/AEM.69.2.971-979.2003.
24.Ma J, Feng Y, Hu Y, et al. Human infective potential of *Cryptosporidium spp*., Giardia duodenalis and Enterocytozoon bieneusi in urban wastewater treatment plant effluents. J Water Health 2016; 14(3): 411-23. doi: 10.2166/wh.2016.192.
25.Fan Y, Wang X, Yang R, et al. Molecular characterization of the waterborne pathogens *Cryptosporidium spp*., Giardia duodenalis, Enterocytozoon bieneusi, Cyclospora cayetanensis and Eimeria spp. in wastewater and sewage in Guangzhou, China. Parasit Vectors 2021; 14(1): 66. doi: 10.1186/s13071-020-04566-5.
26.Li N, Xiao L, Wang L, et al. Molecular surveillance of *Cryptosporidium spp*., Giardia duodenalis, and Enterocytozoon bieneusi by genotyping and subtyping parasites in wastewater. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(9): e1809. doi: 10.1371/journal.pntd.0001809.
27.Koompapong K, Sukthana Y. Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya River and Bang Pu Nature Reserve pier, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2012; 43(4): 832-40. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23077804/.
28.Galván AL, Magnet A, Izquierdo F, et al. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. Sci Total Environ 2014; 468: 368-75. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.053.
29.Ajonina C, Buzie C, Ajonina IU, et al. Occurrence of *Cryptosporidium* in a wastewater treatment plant in North Germany. J Toxicol Environ Health A 2012; 75(22-23): 1351-8. doi: 10.1080/15287394.2012.721167.
30.Ramo A, Del Cacho E, Sánchez-Acedo C, et al. Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* and Giardia in urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain. Sci Total Environ 2017; 598: 628-38. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.097.
31.Montemayor M, Valero F, Jofre J, et al. Occurrence of *Cryptosporidium spp*. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. J Appl Microbiol 2005; 99(6): 1455-62. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02737.x.
32.Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J, et al. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and Giardia in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. Epidemiol Infect 2013; 141(1): 9-21. doi: 10.1017/S0950268812002026.
33.Domenech E, Amorós I, Moreno Y, et al. *Cryptosporidium* and Giardia safety margin increase in leafy green vegetables irrigated with treated wastewater. Int J Hyg Environ Health 2018; 221(1): 112-9. doi: 10.1016/j.ijheh.2017.10.009.
34.Campos CJ, Lees DN. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. Appl Environ Microbiol 2014; 80(12): 3552-61. doi: 10.1128/AEM.04188-13.
35.Coulliette AD, Noble RT. Impacts of rainfall on the water quality of the Newport River Estuary (Eastern North Carolina, USA). J Water Health 2008; 6(4): 473-82. doi: 10.2166/wh.2008.136.
36.Aguirre J, Greenwood SJ, McClure JT, et al. Effects of rain events on *Cryptosporidium spp*. levels in commercial shellfish zones in the Hillsborough River, Prince Edward Island, Canada. Food Waterborne Parasitol 2016; 5: 7-13. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.08.003.
37.Willis JE, McClure JT, Davidson J, et al. Global occurrence of *Cryptosporidium* and Giardia in shellfish: Should Canada take a closer look? Food Res Int 2013; 52(1): 119-35. doi:10.1016/j.foodres.2013.02.020.
38.Iwamoto M, Ayers T, Mahon BE, et al. Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. Clin Microbiol Rev 2010; 23(2): 399-411. doi: 10.1128/CMR.00059-09.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

39.Schijven JF, Bradford SA, Yang S. Release of Cryptosporidium and Giardia from dairy cattle manure: physical factors. J Environ Qual 2004; 33(4): 1499-508. doi: 10.2134/jeq2004.1499.
40.Yoder JS, Beach MJ; Control CfD, Prevention. Cryptosporidiosis surveillance–United States, 2003-2005. MMWR Surveill Summ 2007; 56(7): 1-10. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17805223/.
41.Nasser AM. Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: a review. J Water Health 2016; 14(1): 1-13. doi: 10.2166/wh.2015.131.
42.Rosado-García FM, Guerrero-Flórez M, Karanis G, et al. Water-borne protozoa parasites: the Latin American perspective. Int J Hyg Environ Health 2017; 220(5): 783-98. doi: 10.1016/j.ijheh.2017.03.008.
43.Aldeyarbi HM, Abu El-Ezz NM, Karanis P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: the African perspective. Environ Sci Pollut Res Int 2016; 23(14): 13811-21. doi: 10.1007/s11356-016-6746-6.
44.Nasser AM, Tweto E, Nitzan Y. Die-off of *Cryptosporidium* parvum in soil and wastewater effluents. J Appl Microbiol 2007; 102(1): 169-76. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03048.x.
45.Noroozi-Karbasdehi V, Ravanipour M, Mohebbi M, et al. The study of contamination of discharged runoff from surface water disposal channels of Bushehr city in 2012-2013. Iran South Med J 2016; 19(4): 571-85. doi: 10.18869/acadpub.ismj.19.4.571
46.Noroozi Karbasdehi V, Dobaradaran S, Mirahmadi SR, et al. Survey of microbiological and chemical quality of the swimming beaches along the Persian Gulf in Bushehr port. Iran South Med J 2015; 18(2): 393-408. http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-685-fa.html

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]

Original Article

Detection and Identification of *Cryptosporidium* in Raw Urban Wastewaters Entering the Bushehr Coastal Area by Nested-PCR

F. Soleimani (PhD)[1,2], R. Taherkhani (PhD)[3], S. Dobaradaran (PhD)[2,4**], F. Farshadpour (PhD)[3], A. Khalili Doroodzani (MSc)[2], M. Taherzadeh (PhD)[5]*

[1] Tobacco and Health Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
[2] Systems Environmental Health and Energy Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
[3] The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
[4] Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
[5] The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 6 Nov, 2022 Accepted 15 Aug, 2023)

Abstract

Background: The protozoan *Cryptosporidium* is an intestinal pathogenic parasite; are more common in hot climates and places where water and sewage treatment is less effective**.** The aim of this study was to detect *Cryptosporidium* in raw urban wastewaters entering the Bushehr coastal area.

Materials and Methods: In total, 48 samples of urban raw wastewater samples were collected from 8 stations in winter and summer seasones. Wastewater samples were filtered through a 300 µm sieve to remove large particles and then on a cellulose acetate membrane with a pore size of 1.2 µm. The filters were scraped and washed with 40 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% TWEEN and then centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 4°C. The freeze-thaw cycles cycles were used for DNA extraction. The level of extracted DNA was measured by NanoDrop (Spectrophotometer, ND1000), and PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel.

Results: PCR analysis showed out of the 48 samples, 17 samples (35.4%) werepositive PCR amplification by nested PCR in the case of *Cryptosporidium spp.* In total, 11 and 6 samples were positive in the winter and summer seasons, respectively.

Conclusion: Local authorities should be aware of probable cryptosporidiosis epidemics between the residents by paying attention to wastewater treatment processes and suitable preventive measures will help reduce the transmission of human and animal cryptosporidiosis**.**

Keywords: *Cryptosporidium*, Wastewater, PCR, Bushehr, The Persian Gulf

©Iran South Med J. All rights reserved

Cite this article as: Soleimani F, Taherkhani R, Dobaradaran S, Farshadpour F, Khalili Doroodzani A, Taherzadeh M. Detection and Identification of Cryptosporidium in Raw Urban Wastewaters Entering the Bushehr Coastal Area by Nested-PCR. Iran South Med J 2023; 26(1): 14-24

***Address for correspondence:* Systems Environmental Health and Energy Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran.
E.mail: s.dobaradaran@bpums.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-2701-888X
**ORCID: 0000-0002-8857-7343

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.61186/ismj.26.1.14]