بررسی آلودگی *توکسوپلاسما گوندای* در شتران استان یزد با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

علیرضا سازمند[۱*§]، موسی توسلی[۲]، بیژن اسمعیل نژاد [۳]، زهرا اسداللهی[۴]، علی کاظم نیا [۵]، سیدحسین حکمتی مقدم[۶]

۱- مربی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور یزد، یزد، ایران.
۲ – استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۴- دانشجوی دکتری، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۵- تکنسین آزمایشگاه، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۶- استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
§ آدرس کنونی: دانشجوی دکتری، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه دامپزشکی وین، وین، اتریش.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Alireza.Sazmand@vetmeduni.ac.at
(دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۳ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۴/۳)

Archive of SID

چکیده

تک‌یاخته *توکسوپلاسما گوندای* یکی از مهمترین عوامل بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوانات است. لذا در مطالعه‌ی مقدماتی حاضر به منظور بررسی آلودگی به این انگل، ۵۰ شتر یک کوهانه‌ی نر و ماده در سنین مختلف که توسط دامداران منطقه یزد نگه‌داری می‌شدند مورد آزمایش قرار گرفتند. همه نمونه‌های خونی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از ژن B۱ بررسی شدند. نتایج نشان داد که در هیچ یک از شتران بررسی شده توسط روش PCR آلودگی خونی با *توکسوپلاسما گوندای* وجود نداشت. مطالعه آزمایشگاهی حاضر اولین تلاش در بررسی آلودگی شترهای ایران به *توکسوپلاسما گوندای* به روش PCR می‌باشد. انجام تحقیقات بیشتر در دیگر نواحی کشور در فهم اهمیت بیماری لازم به نظر می‌رسد. همچنین آلودگی تجربی شترها جهت بررسی سیر بیماری پیشنهاد می‌شود.

کلید واژه‌ها: ***توکسوپلاسما گوندای*، شتر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ایران.**

مقدمه

توکسوپلاسما گوندای یک تک‌یاخته‌ی تشکیل‌دهنده‌ی کیست از شاخه آپی کمپلکسا (Apicomplexa) است که بسیاری از حیوانات خون‌گرم را در اکثر مناطق جهان آلوده می‌کند. میزبان اصلی این انگل گربه سانان هستند، ولی با تشکیل کیست در بافت‌های میزبان‌های واسط از جمله نشخوارکنندگان باعث زیان‌های اقتصادی از جمله مرگ زودهنگام جنین، سقط جنین، زایمان زودرس و

www.SID.ir

مرگ نوزادان مبتلا می‌شود. انگل ممکن است از طریق بلع اووسیست همراه با آب و غذای آلوده به میزبان‌های واسط انتقال یابد. انتقال عمودی از مادر به جنین از طریق جفت نیز روش دیگر آلودگی می‌باشد (Tenter *et al.*, 2000). توکسوپلاسموزیس به عنوان یک بیماری زئونوز با انتشار جهانی، اثر جدی روی جنین متولد نشده و اشخاص دارای ضعف سیستم ایمنی دارد. آلودگی به *توکسوپلاسما گوندای* معمولاً در انسان و حیوانات سالم بدون علائم بالینی می‌باشد، اما گاهی اوقات باعث مسمومیت جنین می‌شود. آلودگی زنان باردار می‌تواند باعث بیماری‌های شدید و کشنده‌ای در جنین و نوزاد شامل سقط، آنسفالیت، عقب‌ماندگی ذهنی و کوری شود (Cook *et al.*, 2000). آنتی‌بادی علیه این انگل در سرم انسان و حیوانات در ایران به طور گسترده‌ای شایع (Ghorbani *et al.*, 1978; Hashemi-Fesharaki, 1996; Zia-Ali, *et al.*, 2007) و فراوانی آن در گروه‌های مختلف انسانی بین ۲۲ تا ۷٤/٦ درصد گزارش شده است (Mostafavi *et al.*, 2011).

اگرچه شترهای یک‌کوهانه (*Camelus dromedarius*) حیوانات چند منظوره‌ی مهمی در بخش‌های خشک و نیمه خشک دنیا هستند، اما مطالعات کمی روی توکسوپلاسموزیس در این حیوانات انجام شده است. در اکثر مقالات منتشره از تحقیقات توکسوپلاسما در شتر، آزمایش حضور آنتی-بادی علیه این انگل در حیوانات به ظاهر سالم انجام شده است (Hussein *et al.*, 1988; Hilali *et al.*, 1998; Sadrebazzaz *et al.*, 2006; Hamidinejat *et al.*, 2013). در تنها مطالعه انجام شده روی بیولوژی *توکسوپلاسما گوندای* در شتر، هیلالی و همکاران کیست‌های زنده‌ی انگل را از بافت‌های ۳۸ شتر به ظاهر سالم استخراج کرده و به چهار گربه خوراندند که گربه‌ها اووسیست‌های *توکسوپلاسما گوندای* را در مدفوعشان دفع کردند (Hilali *et al.*, 1995). اگرچه توکسوپلاسموزیس در شتر غالباً بدون نشانه‌های بالینی مشخص است، در تنها گزارش بروز توکسوپلاسموزیس بالینی در شترها، یک نفر شتر یک کوهانه ٦ ساله ماده با نشانه‌های بی‌اشتهایی و سقط جنین به بیمارستان آموزشی دامپزشکی ایالت آیووا آمریکا انتقال داده شد که در آزمایشات انگل‌شناسی تاکی‌زوآیت‌های زیادی در شش‌ها و ترشحات اکسودایی محوطه جنبی حیوان یافت شد (Hagemoser *et al.*, 1990). طبق آمار وزارت جهاد کشاورزی، حدود ۱۵۳۰۰۰ شتر در ایران وجود دارد که ۲۱٦۹۰ نفر از آنها در استان یزد حضور دارند (Ministry of Agriculture of I.R. Iran, 2010). در این منطقه شترها به منظور تولید گوشت نگه‌داری می‌شوند. طبق اطلاعات ما تاکنون گزارشی مبنی بر تشخیص آلودگی شترها به *توکسوپلاسما گوندای* با روش‌های آزمایشگاهی مولکولی وجود ندارد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تشخیص این انگل در نمونه‌های خون، مایع مغزی-نخاعی و سایر بافت‌های بیماران آلوده به کار می‌رود (Howe and Sibeley, 1995). بر همین اساس، هدف از مطالعه‌ی حاضر تشخیص *توکسوپلاسما گوندای* در خون حیوانات به روش PCR و تفکیک سویه‌های این انگل به روش RFLP بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه‌ی مقدماتی حاضر، از دی ماه ۱۳۸۹ تا فروردین ماه ۱۳۹۰ پنجاه نمونه خون از شترهای نر و ماده‌ی ٦ ماهه تا ۳۰ ساله جمع آوری شد.

Archive of SID

www.SID.ir

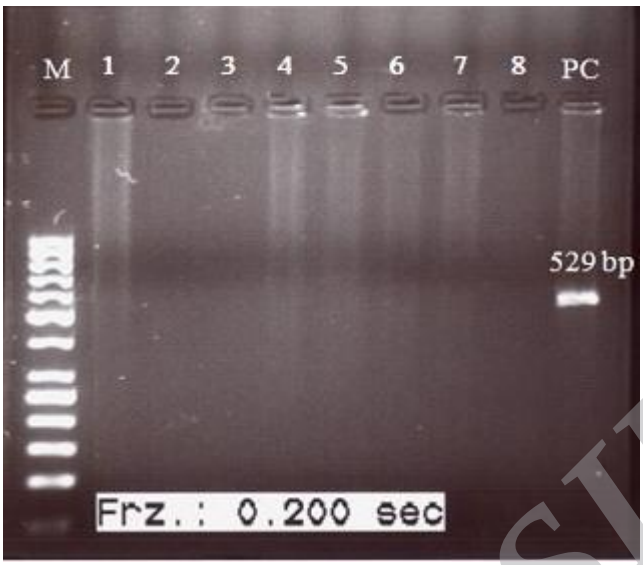
نمونه‌ها از دامداری‌های حومه و کشتارگاه‌های استان یزد به صورت تصادفی جمع آوری شدند. حیوانات در زمان نمونه‌گیری هیچ علامت بالینی واضحی از بیماری نداشتند. نمونه‌های خونی گرفته شده تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های خون با روش ارائه شده توسط فوئنتس و همکاران و با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Fermentas آلمان انجام شد (Fuentes *et al.*, 1996). بدین صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه خون با ۱۰۰ میکرولیترمحلول کافت‌گر حاوی mM ۱۰Tris-HCl، ۱/۵ mM $MgCl_2$، ۵۰ mM KCl، ۰/۱ میلی گرم ژلاتین به‌ازای هر میلی‌لیتر، ۰/۵ Tween 20 درصد و ۲۰ میکروگرم پرتئیناز K مخلوط و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس برای غیرفعال کردن پرتئیناز K نمونه‌ها در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با دور g× ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی به عنوان DNA استفاده گردید. PCR روی حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از بافر PCR x ۱۰حاوی mM Tris-HCl ۷۰ (pH ۸/۸)، mM $(NH_4)SO_4$ ۲۰۰، Tween 20 ۰/۱ درصد به علاوه mM $MgCl_2$ ۲، µM ۲۵۰ از هر دی-نوکلئوتید تری فسفات، ۱/۲۵ واحد بین‌المللی DNA Taq polymerase (Fermentas، آلمان)، pM ۵۰ از هر پرایمر ToX ٤ (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG -۵′-۳′) و Tox ۵ (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT -۵′-۳′) برای تکثیر قطعه ۵۲۹ جفت بازی از ژن B۱ *توکسوپلاسما گوندای* و µL ۵ الگوی DNA استخراج شده انجام شد (Homan *et al.*, 2000). تکثیر DNA انگل در ترموسایکلر CP2-003 (Corbett Research، استرالیا) انجام شد. پلیمریزاسیون DNA طی ۳۵ سیکل به این قرار تکمیل شد: دناتوره شدن (denaturation) اولیه‌ی نمونه‌ها در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه و دناتوره شدن سیکل‌ها در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، انیلینگ (annealing) اولیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اکستنشن (extension) در ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و اکستنشن (extension) نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. DNA کنترل مثبت برای *توکسوپلاسما گوندای* از انستیتو پاستور تهیه شد. از آب مقطر هم به عنوان کنترل منفی استفاده شد. محصولات PCR با ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز و طبق دستور شرکت سازنده تحت تأثیر آنزیم محدود کننده‌ی AluI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند.

یافته‌ها

در پژوهش حاضر، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان‌گر عدم حضور زوآیت‌های *توکسوپلاسما گوندای* در ۵۰ نمونه خون محیطی شترهای یک کوهانه استان یزد بود. شکل ۱ نتایج مربوطه را نمایش می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- محصول PCR (۵۲۹ bp) از ژن B۱ تکثیر یافته‌ی آلوده به *توکسوپلاسما گوندای*: ستون M: مارکر ۵۰ جفت باز، ستون PC: کنترل مثبت، ستون‌های ۱ تا ۸: تعدادی از نمونه‌های آزمایش شده.

بحث و نتیجه‌گیری

برخلاف دام‌های مرزعه مانند گاو، گوسفند و بز، توکسوپلاسموزیس در شترها به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار نگرفته است و دانش انگل‌شناسان اغلب مبتنی با یافته‌های آزمایشات سرم شناسی است که برای سنجش توکسوپلاسموزیس استاندارد هستند. گروه‌های تحقیقاتی متعددی در مناطقی از دنیا که شتر پرورش می‌یابد، فراونی متفاوتی از شیوع توکسوپلاسموزیس را گزارش کرده‌اند. در ایران صدر بزاز و همکاران با آزمایش فلورسنت غیرمستقیم آنتی‌بادی‌های انگل را در ٤/١٦ درصد شترهای مشهد (Sadrebazzaz *et al.*, 2006) ، و حمیدی نجات و همکاران با روش آگلوتیناسیون اصلاح شده شیوع سرمی ١٤/٧٥ درصد را در شترهای یزد (Hamidinejat *et al.*, 2013) گزارش کردند. در شترهای مصر و عربستان سعودی هم به ترتیب ١٧/٤ درصد و ١٦ درصد شیوع سرمی گزارش شده است (Hussein *et al.*, 1988; Hilali *et al.*, 1998).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که در آن قسمتی از ژنوم DNA *توکسوپلاسما گوندای* قابل ردیابی است، به دلیل حساسیت و ویژگی کافی، بر دیگر روش‌های تشخیصی ارجحیت دارد. دستیابی سریع به نتایج از دیگر مزایای این روش است (James *et al.*, 1996). اگرچه در مورد *توکسوپلاسما گوندای* از روش PCR اغلب برای ردیابی انگل در بافت استفاده می‌شود، با این حال، خون در دسترس‌ترین نمونه مورد نیاز برای انجام PCR به منظور تشخیص در موارد انسانی و دامی می باشد (OIE, 2008). حضور و مقاومت *توکسوپلاسما گوندای* در خون به سویه و نحوه‌ی آلوده شدن میزبان بستگی ارتباط دارد. آلودگی میزبان از طریق تاکی‌زوآیت، برادی‌زوآیت و اسپوروزوآیت اثر قابل توجهی بر زمان حضور انگل در خون و مقاومت

Archive of SID
www.SID.ir

آن دارد. حضور انگل در خون در فاز حاد رخ می‌دهد و عامل آن تاکی‌زوآیت می‌باشد (Tavassoli *et al.*, 2013). در مطالعات بر پایه‌ی PCR برای ردیابی *توکسوپلاسما گوندای*، مهمترین مناطق هدف ژن‌های B۱، P۳۰ (SAG۱) و S ribosomal DNA ۱۸هستند. ژن B۱ و DNA ریبوزومال برای پلیمریزه شدن در PCR مناسب هستند زیرا، کپی‌های آن‌ها در ژنوم توکسوپلاسما وجود دارد به نحوی که ژن B۱ در ژنوم *توکسوپلاسما گوندای* ۳۵ بار تکرار شده است (OIE, 2008; Jones *et al.*, 2000). کاربرد ژن B۱ مزایای دیگری نیز دارد. از جمله این‌که، پرایمر B۱ در گونه‌های قارچی یا باکتریایی پلیمریزه نمی‌شود در حالی‌که، پرایمرهای ژن P۳۰ کمتر از ژن B۱ اختصاصی هستند. کاربرد ژن B۱ فقط به دلیل ویژگی بالای آن در پلیمریزه کردن *توکسوپلاسما گوندای* نیست بلکه به دلیل حساسیت بالای آن در تشخیص انگل نیز می‌باشد (Jones *et al.*, 2000). با استفاده از همین ژن توسلی و همکاران در سال ۱۳۸۸ نرخ آلودگی پایینی از *توکسوپلاسما گوندای* در دام‌های اهلی ارومیه گزارش نمودند ولی یک سویه از آن را جدا کردند (توسلی و همکاران، ۱۳۸۸). در مطالعه دیگری توسط توسلی و همکاران روی ۱۳۳ گوسفند و ۱۲٤ بز از شمال غرب ایران، سه گوسفند مثبت با یک الگوی RFLP یافتند (Tavassoli *et al.*, 2013). در بررسی حاضر ما موفق به شناسایی موردی آلوده به انگل نشدیم که می‌تواند به دلیل عدم حضور زوآیت‌ها در خون حیوانات مورد بررسی یا مقاومت شتر به این انگل باشد. به عقیده ما می‌توان با آلودگی تجربی شتر با *توکسوپلاسما گوندای* به این پرسش‌ها پاسخ داد. بنابر این، پایه‌ریزی یک مطالعه جهت بررسی سیر بیماری در این حیوان پیشنهاد می‌شود.

در پایان، همان‌گونه که اهمیت توکسوپلاسموزیس در پیشینه‌ی تحقیق ذکر شده است، *توکسوپلاسما گوندای* باعث حدود ۲۱ درصد از کل مرگ و میرهای ناشی از پاتوژن‌های غذایی در ایالات متحده آمریکا می‌باشد و مرکز کنترل بیماریها (CDC) تخمین زده است که ۵۰ درصد از کل افراد از طریق مواد غذایی در معرض آلودگی به *توکسوپلاسما* قرار می‌گیرند (Mead, *et al.*, 1999). در اروپا نیز بیش از ٦۳ درصد آلودگی‌های توکسوپلاسمایی انسان به مصرف محصولات گوشتی خام یا کم پخته مرتبط می‌باشد (Cook *et al.*, 2000). بنابراین، اگرچه نتایج ما تخمینی از درصد آلودگی شتران را فراهم نکرد اما از آن‌جا که مصرف گوشت شتر و تماس افراد شاغل در کشتارگاه‌ها و مراکز تهیه و توزیع گوشت با خون حیوان ممکن است از منابع آلودگی برای انسان باشند (Hilali *et al.*, 1995)، بنابراین علاوه بر رعایت نکات بهداشت شغلی، گوشت و دیگر بخش‌های قابل مصرف دام باید به طور کامل قبل از مصرف پخته شود.

سپاسگزاری

مراتب سپاس از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه جهت تأمین هزینه‌ی اجرای این بررسی اعلام می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

- توسلی، م.، طباطبایی، م.، جوادی، ش.، کاظم نیا، ع. و مردانی، ک. (۱۳۸۸). بررسی آلودگی به *توکسوپلاسما گوندئی* در حیوانات مختلف در شهرستان ارومیه به روش PCR و بررسی اختلاف ژنتیکی از طریق RFLP. نشریه دامپزشکی (پژوهش و سازندگی)، شماره ۸۵، صفحات: ٦٦-٦١.
- Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., *et al*. (2000). Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case–control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis, British Medical Journal, 321(7254): 142-147.
- Fuentes, I., Rodriguez, M., Domingo, C.J., del Castillo, F., Juncosa, T., and Alvar, J. (1996). Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 34(10): 2368-2371.
- Ghorbani, M., Edrissian, G.H. and Assad, N. (1978). Serological survey of toxoplasmosis in northern part of Iran, using indirect fluorescent antibody technique. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 72(4): 369-371.
- James, G.S., Sintchenko, V.G., Dickeson, D.J., and Gilbert, G.L. (1996). Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. Journal of Clinical Microbiology, 34(6): 1572-1575.
- Hagemoser, W.A., Dubey, J.P. and Thompson, J.R. (1990). Acute toxoplasmosis in a camel. Journal of the American Veterinary Medical Association, 196(2): 347.
- Hamidinejat, H., Ghorbanpour, M., Rasooli, A., Nouri, M., Hekmatimoghaddam, S., Namavari, M., *et al*. (2013). Occurrence of Anti – *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in camels (*Camelus dromedaries*) in center of Iran. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 37(3): 277-281.
- Hashemi-Fesharki, R. (1996). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. Veterinary Parasitology, 61(1-2): 1-3.
- Hilali, M., Fatani, A. and Al-Atiya, S. (1995). Isolation of tissue cysts of *Toxoplasma*, *Isospora*, *Hammondia* and *Sarcocystis* from camel (*Camelus dromedarius*) meat in Saudi Arabia. Veterinary Parasitology, 58(4): 353-356.
- Hilali, M., Romand, S., Thulliez, P., Kwok, O.C. and Dubey, J.P. (1998). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. Veterinary Parasitology, 75(2-3): 269-271.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J. and Verschueren, H. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. International Journal for Parasitology, 30(1): 69-75.
- Howe D.K. and Sibeley L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprise three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. The Journal of Infectious Diseases, 172(6): 1561-1566.
- Hussein, M.F., Bakkar, M.N., Basmaeil, S.M. and Gar el Nabi, A.R. (1988). Prevalence of toxoplasmosis in Saudi Arabian camels (*Camelus dromedaries*). Veterinary Parasitology, 28(1-2): 175-178.
- Jones, C.D., Okhravi, N., Adamson, P., Tasker, S. and Lightman, S. (2000). Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 41(3): 634-644.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., *et al*. (1999). Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5(5): 607-625.
- Ministry of Agriculture of I.R. Iran, Office of statistics and information technology (2010). Accessed on 20 December 2013, http://www.maj.ir

Archive of SID

www.SID.ir

- Mostafavi, S.N., Ataei, B., Nokhodian, Z., Yaran, M. and Babak, A. (2011). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in Isfahan province, central Iran: A population based study. Journal of Research in Medical Sciences, 16(4): 496-501.
- OIE Terrestrial Manual (2008). Toxoplasmosis. Chapter 2.9.10., pp. 1284-1293.
- Sadrebazzaz, A., Haddadzadeh, H. and Shayan, P. (2006). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in camels (*Camelus dromedarius*) in Mashhad, Iran. Parasitology Research, 98: 600-601.
- Tavassoli, M., Ghorbanzadehghan, M. and Esmaeilnejad, B. (2013). Detection of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats blood samples by PCR-RFLP in Urmia. Veterinary Research Forum, 4(1): 43-47.
- Tenter A.M., Heckerotha A.R. and Weiss L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology, 30(12-13): 1217-1258.
- Zia-Ali, N., Fazaeli, A., Khoramizadeh, M., Ajzenberg, D., Dardé, M. and Keshavarz-Valian, H. (2007). Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. Parasitology Research, 101(1): 111-115.

Archive of SID

www.SID.ir