

## بررسی شیوع *نئوسپورا کانینوم* در شیر نشخوارکنندگان به روش مولکولی

مهتاب علی پور عمروآبادی<sup>۱</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>۲\*</sup>، امیر شاکریان<sup>۳</sup>

۱. فارغ التحصیل دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران،

۳. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۵

### چکیده:

*نئوسپورا کانینوم* انگل تک یاخته داخل سلولی با گسترش جهانی است. این تک یاخته از عوامل اصلی سقط جنین در گاوهای شیری بوده است. تحقیق حاضر به منظور بررسی میزان شیوع فصلی و جغرافیایی *نئوسپورا کانینوم* در شیر نشخوارکنندگان به روش مولکولی انجام شد. چهارصد و چهل نمونه شیر خام طی چهار فصل سال از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، خوزستان و فارس جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از کیت بوسیله آزمون nested-PCR به منظور ردیابی ژن *NC5* *نئوسپورا کانینوم* ارزیابی شدند. از مجموع ۴۴۰ نمونه شیر مورد مطالعه، ۵۴ نمونه (۱۲/۲۷ درصد) آلوده به *نئوسپورا کانینوم* بودند. شیر گاو بیشترین (۲۶ درصد) و شیر گوسفند کمترین (۴ درصد) میزان شیوع *نئوسپورا کانینوم* را داشتند. نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده در فصل زمستان بیشترین (۲۲/۸۵ درصد) و نمونه‌های جمع‌آوری شده در فصل تابستان کمترین (۸/۵۷ درصد) میزان شیوع *نئوسپورا کانینوم* را داشتند. نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری بیشترین (۱۴/۹۴ درصد) و نمونه‌های جمع‌آوری شده از اصفهان کمترین (۶/۳۸ درصد) میزان شیوع *نئوسپورا کانینوم* را داشتند. با توجه به شیوع نسبی این انگل در شیر خام مورد مطالعه، اتخاذ برنامه‌های کنترلی بیش از پیش مورد نیاز است. همچنین با توجه به احتمال مصرف فرآورده‌های لبنی سنتی و انتقال آلودگی به انسان، جوشش کامل شیر قبل از مصرف توصیه می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** شیوع فصلی، موقعیت جغرافیایی، شیر خام، *نئوسپورا کانینوم*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

\*نویسنده مسئول: ابراهیم رحیمی

آدرس: گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد-ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۲۷۸۳۷۷

پست الکترونیک: ebrahimrahimi55@yahoo.com

## مقدمه

شیر ماده غذایی بسیار با ارزشی است که با ذائقه افراد در سنین مختلف سازگاری دارد و مصرف آن برای تامین بخشی از نیازهای تغذیه‌ای لازم است. این ماده غذایی نقش مهمی در افزایش بهره‌هوشی، رشد و نمو بدن، کاهش خستگی و جلوگیری از پیری زودرس دارد. امروزه سرعت جابجایی عوامل بیماریزا به نحوی است که شناخت سریع وضعیت گسترش بیماری‌ها، اجرای کنترل و پیشگیری از خسارات اقتصادی، امری ضروری به نظر می‌رسد. از آنجایی که شیر محیطی مناسب برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌هاست، می‌تواند به عنوان بستر مناسبی برای رشد و انتقال عوامل بیماریزا تلقی شود، لذا توجه به مسائل کیفی شیر از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. *نئوسپورا کانینوم*، تک‌یاخته‌ای است که به عنوان عامل بیماریزای سقط جنین در گاو شناخته شده است و در گونه‌های مختلفی از حیوانات نیز وجود *نئوسپوروزیس* ناشی از *نئوسپورا کانینوم* گزارش شده است. در مطالعات گذشته یکی از مهم‌ترین مواد غذایی انتقال‌دهنده این تک‌یاخته به انسان را شیر خام و شیرهای آلوده شده در مراکز جمع‌آوری شیر دانسته‌اند (۲۰). میزان خسارات اقتصادی سالانه ناشی از آلودگی گاو‌ها به *نئوسپوروزیس* در کالیفرنیا حدود ۳۵ میلیون دلار تخمین زده می‌شود (۸).

اهمیت این انگل به دلیل خسارات مستقیم ناشی از سقط جنین و خسارات غیر مستقیم شامل هزینه‌های تشخیص بیماری، تلقیح مجدد دام مبتلا به سقط و کاهش تولید شیر می‌باشد (۱۲).

در سرتاسر جهان خسارت وارده به صنعت گاو‌داری در اثر *نئوسپورا کانینوم* بیش از ۱/۲۹۸ میلیارد دلار در هر سال

برآورد شده است (۱۲). میزان این خسارت در گاو‌داری‌های شیری حدود ۸۴۲/۹ میلیون دلار از طریق اختلال در گوساله زایی و کاهش میزان تولید شیر تخمین زده شده است (۱۲، ۲۳). آلودگی در گاو اغلب به صورت مزمن بوده و در تمام طول زندگی، حیوان آلوده می‌ماند. انتقال بیماری در گاو به صورت عمودی و در حیوان آبستن از طریق جفت به جنین صورت گرفته و در بارداری‌های بعدی نیز ادامه می‌یابد. با این وجود، واکنشی که بتواند آلودگی را از طریق درون‌زاد (جفتی) متوقف کند، در دسترس نیست (۹، ۲۰).

مطالعات پراکنده‌ای نشان داده‌اند که مصرف شیر خام گاو‌های آلوده به *نئوسپورا کانینوم*، می‌تواند موجب بروز بیماری در انسان شود (۱۹). در این ارتباط، مطالعه پیشین در برزیل نشان داد که ۳۳ درصد افراد مبتلا به بیماری ایدز، دارای تیتربالای آنتی‌بادی بر علیه *نئوسپورا کانینوم* بودند (۱۹). در مطالعه دیگری نیز میزان آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در سرم‌های اخذ شده از افراد مبتلا به توکسوپلاسموزیس، حدود ۴۳ درصد بود (۲۷). با این وجود نقش این تک‌یاخته در بروز بیماری در جوامع انسانی هنوز به شکل کامل تایید نشده است (۱۹). همچنین، علیرغم اینکه گزارشات فراوانی از آلودگی مواد غذایی به *نئوسپورا کانینوم* وجود دارد، اطلاعات محدودی از شیوع این انگل در شیر خام نشخوارکنندگان در ایران وجود دارد. لذا مطالعه حاضر علاوه بر بررسی میزان شیوع *نئوسپورا کانینوم* در شیر نشخوارکنندگان، به بررسی شیوع فصلی و جغرافیایی آلودگی نمونه‌های شیر به این انگل پرداخت.

نموده و ۱۰۰۰ میکرولیتر wash buffer به آن‌ها اضافه شد و پس از ۳-۵ ثانیه ورتکس کردن، تیوپ‌ها را ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و نهایتاً به محتویات قبلی اضافه شدند. محتویات داخل تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس خشک و با ۵۰ میکرولیتر از Solven buffer مخلوط شده و به آرامی تکان داده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس محتویات دیواره تیوپ‌ها مخلوط شده و به مدت ۳۰ ثانیه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند که در نهایت استخراج DNA صورت گرفت.

یک DNA ترموسایکلر (Eppendorf Mastercycler 5330, Eppendorf-Nethel-Hinz GmbH, Hamburg, Germany) قابل برنامه ریزی در تمامی مراحل PCR مورد استفاده قرار گرفت. ژن *Nc5* *نتوسپورا کانینوم* در واکنش پلیمرز زنجیره‌ای مورد شناسایی قرار گرفت (۲۱). واکنش اولیه PCR شامل ۱ میکروگرم تمپلت DNA، ۲ میکرومولار MgCL<sub>2</sub>، ۱۰ میکرولیتر بافر TE<sup>۱۰</sup> و واکنش PCR و ۱۰ pmol از هر کدام از پرایمرها (bp ۳۲۸) و ۲۰۰ میکرومولار dNTP و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز DNA بود (Thermo Fisher Scientific, Germany). جدول ۱ لیست پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR اولیه و همچنین nested، جهت ردیابی *نتوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر را نشان می‌دهد.

## مواد و روش کار

### الف) نمونه گیری:

مطالعه حاضر از نوع توصیفی و مقطعی بود که در طی سال‌های ۱۳۹۵ و ۹۶ انجام پذیرفت. در کل ۴۴۰ نمونه شیر خام شامل نمونه شیر گاو (۱۰۰ نمونه)، نمونه شیر گوسفند (۱۰۰ نمونه)، شیر بز (۸۰ نمونه)، شیر گاو میش (۷۰ نمونه) و شیر خام شتر (۹۰ نمونه) از گله‌های شیری واقع در استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، فارس و خوزستان به شکل تصادفی در لوله‌های آزمایش درب دار استریل (به حجم ۱۰ میلی لیتر) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در شرایط سترون در کنار یخ و بلافاصله پس از نمونه گیری، به آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند.

### ب) استخراج و آماده‌سازی DNA:

جهت استخراج DNA، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه شیر با ۱۰۰ میکرولیتر پروتاز بافر و ۵ میکرولیتر آنزیم پروتاز داخل تیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری سانتریفیوژ مخلوط و به مدت ۳-۱ ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۳-۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. به تیوپ‌ها ۴۰۰ میکرولیتر Lysis solution اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به آنها ۳۰۰ میکرولیتر Precipitation solution اضافه و پس از ۵ ثانیه ورتکس شدن، تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از آن محتویات تیوپ‌ها را خالی

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی *نتوسپورا کانینوم* در واکنش nested-PCR

اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر	ژن هدف
۳۲۸	F: 5'-GGGTGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3' R: 5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3'	<i>Nc5</i>
۱۹۸	F: 9'-GGGTGAACCGAGGGAGTTG-3' R: 5'-TCGTCCGTTGCTCCCTATGAAT3-3'	

محال و بختیاری، فارس و خوزستان جمع آوری و از نظر آلودگی به *تئوسپورا کانینوم* با استفاده از روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ تصویر الکتروفورز محصولات واکنش nested-PCR برای ردیابی *تئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر را نشان می‌دهد. جدول ۲ فراوانی نمونه‌های آلوده به *تئوسپورا کانینوم* را نشان می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از مجموع ۴۴۰ نمونه مورد بررسی، تعداد ۵۴ نمونه (۱۲/۲۷ درصد) آلوده به *تئوسپورا کانینوم* بودند. بالاترین میزان آلودگی به ترتیب در نمونه‌های شیر گاو (۲۶ درصد) و کمترین میزان در شیر گوسفند (۴ درصد) مشاهده شد. جدول ۳ شیوع فصلی *تئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر خام را نشان می‌دهد. بررسی شیوع فصلی آلودگی نمونه‌های شیر خام نشخوارکنندگان مورد مطالعه حاکی از آن است که بالاترین میزان آلودگی در نمونه‌های اخذ شده در فصل زمستان (۲۲/۸۵ درصد) و پس از آن نمونه‌های اخذ شده در فصل پاییز (۱۲/۰۴ درصد) و بهار (۱۱/۱۷ درصد) بوده است. کمترین میزان آلودگی (۸/۵۷ درصد) در فصل تابستان گزارش شد. جدول ۴ شیوع منطقه‌ای *تئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر خام را نشان می‌دهد. از مجموع ۹۴ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از استان اصفهان، ۶ نمونه (۶/۳۸ درصد)، از ۸۷ نمونه اخذ شده از استان چهارمحال و بختیاری، ۱۳ نمونه (۱۴/۹۴ درصد)، از ۱۳۲ نمونه شیر جمع‌آوری شده از استان خوزستان، ۱۸ نمونه (۱۳/۶۳ درصد) و از مجموع ۱۲۷ نمونه اخذ شده از استان فارس، ۱۵ نمونه (۱۱/۸۱ درصد) آلوده به *تئوسپورا کانینوم* بودند.

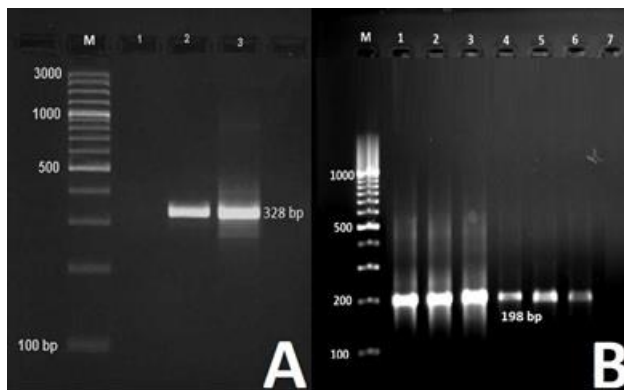
واکنش شامل ۳۵ سیکل واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه بود. محصول مرحله اول PCR در آب مقطر تا رقت ۱ به ۱۰ رقیق شد تا برای استفاده در واکنش nested-PCR آماده شود. nested-PCR شامل ۱ میکروگرم تمپلت DNA، ۲ میکرومولار  $MgCl_2$ ، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰ X واکنش PCR، ۱۰ pmol از هر کدام از پرایمرها (198bp)، ۲۰۰ میکرومولار dNTP و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز DNA بود (Thermo Fisher Scientific, Germany). پروسه دمایی واکنش nested-PCR همانند مرحله اول بود.

**ج) الکتروفورز محصولات PCR:** ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR تقویت شده در آگاروز ۲ درصد تهیه شده در بافر 1X TBE در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه قرار گرفت و با SYBR سبز رنگ‌آمیزی شد (Thermo Fisher Scientific, Germany). تمام مراحل شامل یک نمونه کنترل منفی به صورت آب مقطر و یک نمونه کنترل مثبت DNA تهیه شده است. نمونه‌های کنترل منفی از اولین سیکل تقویت‌سازی به اضافه یک نمونه کنترل منفی از سیکل دوم وارد واکنش nested-PCR شدند.

**د) تجزیه تحلیل آماری:** در پایان، نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS/21 و برنامه آماری مربع کای و تست دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

### نتایج

در مطالعه حاضر مجموعاً ۴۴۰ نمونه شیر خام گاو، گوسفند، بز، شتر و گاو میش از چهار استان اصفهان، چهار



شکل ۱- نتایج ژل الکتروفورزیس ژن *Net5* *نتوسپورا کانینوم*.

A: مرحله اول PCR (338bp) و B: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای (198bp) M: نردبان (100 bp). تصویر A: ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ کنترل مثبت و ستون ۳ نمونه مثبت. تصویر B: ستون ۱ کنترل مثبت، ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ نمونه‌های مثبت و ستون ۷ کنترل منفی.

جدول ۲- شیوع *نتوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر نشخوارکنندگان.

نوع نمونه	تعداد نمونه	فراوانی نمونه‌های آلوده به <i>نتوسپورا کانینوم</i> (درصد)
شیر گاو	۱۰۰	۲۶ (۲۶)
شیر گوسفند	۱۰۰	۴ (۴)
شیر بز	۸۰	۴ (۵)
شیر گاو میش	۷۰	۱۶ (۲۲٫۸۵)
شیر شتر	۹۰	۴ (۴٫۴۴)
مجموع	۴۴۰	۵۳ (۱۲٫۰۴)

جدول ۳- شیوع فصلی *نتوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر خام نشخوارکنندگان.

فصل	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد نمونه آلوده به <i>نتوسپورا کانینوم</i> (درصد)
بهار	۱۷۹	۲۰ (۱۱/۱۷)
تابستان	۳۵	۳ (۸/۵۷)
پاییز	۱۹۱	۲۳ (۱۲/۰۴)
زمستان	۳۵	۸ (۲۲/۸۵)
مجموع	۴۴۰	۵۴ (۱۲/۲۷)

جدول ۴- شیوع جغرافیایی نئوسپورا کانینوم در نمونه‌های شیر خام.

نمونه	گاو		گوسفند		بز		شتر		گاومیش		مجموع	استان
	تعداد نمونه	میزان آلودگی (درصد)	تعداد نمونه	میزان آلودگی (درصد)	تعداد نمونه	میزان آلودگی (درصد)	تعداد نمونه	میزان آلودگی (درصد)	تعداد نمونه	میزان آلودگی (درصد)		
اصفهان	۲۵	(۲۰)۵	۲۵	(۰)۰	۲۰	(۰)۰	۲۴	(۴/۱۶)۱	۰	(۰)۰	۹۴	۶ (۶/۳۸)
چهارمحال و بختیاری	۲۵	(۳۲)۸	۲۵	(۸)۲	۲۰	(۱۰)۲	۱۷	(۴/۱۶)۱	۰	(۰)۰	۸۷	۱۳ (۱۴/۹۴)
خوزستان	۲۵	(۱۶)۴	۲۵	(۴)۱	۲۰	(۰)۰	۱۷	(۱۱/۷۶)۲	۴۵	(۲۴/۴)۱۱	۱۳۲	۱۸ (۱۳/۶۳)
فارس	۲۵	(۲۸)۷	۲۵	(۴)۱	۲۰	(۱۰)۲	۳۲	(۰)۰	۲۵	(۲۰)۵	۱۲۷	۱۵ (۱۱/۸۱)
مجموع	۱۰۰	(۲۴)۲۴	۱۰۰	(۴)۴	۸۰	(۵)۴	۹۰	(۴/۴۴)۴	۷۰	(۲۲/۸)۱۶	۴۴۰	۵۴ (۱۲/۲۷)

## بحث

به نئوسپورا کانینوم بودند. از نظر شیوع فصلی بالاترین میزان آلودگی در فصل زمستان (۲۲/۸۵ درصد) و کمترین میزان آلودگی در فصل تابستان (۸/۵۷ درصد) مشاهده شد. از نظر موقعیت جغرافیایی بیشترین شیوع در استان چهارمحال و بختیاری (۱۴/۹۴ درصد) و کمترین شیوع در استان اصفهان (۶/۳۸ درصد) گزارش شد. طی سال‌های اخیر گزارشات پراکنده‌ای مبنی بر وجود نئوسپورا کانینوم در مواد غذایی ذکر شده است. مطالعه حاضر نیز نشان داد که درصد بالایی از نمونه‌های شیر نشخوارکنندگان عرضه شده در ایران حامل نئوسپورا کانینوم بوده است به نحوی که بیش از ۱۲ درصد از نمونه‌های شیر، آلوده گزارش شده‌اند. در مطالعه انجام شده توسط شاکریان و همکاران (۲۵) حاکی از آلودگی ۱۰ درصدی شیر گاوهای شهرکرد بود، همچنین حدادی و همکاران (۱۶) نیز میزان آلودگی شیر گاوهای شهرکاشان را ۱۸/۸ درصد گزارش کردند. نتایج هر دو مطالعه فوق با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در مطالعات دیگری در کشور کره جنوبی از ۱۷۲ نفر ۶/۷ درصد (۲۱)، ایرلند شمالی از ۲۴۷ نفر ۸ درصد (۱۵) و در آمریکا از ۱۰۲۹ نفر ۶/۷ درصد از نظر سرولوژیکی آلودگی نسبت به نئوسپورا کانینوم را نشان دادند (۲۷).

آگاهی داشتن از میزان شیوع نئوسپوروزیس در جمعیت‌های دامی می‌تواند عاملی کمک کننده در راستای مبارزه با عوامل بیماری‌زا و ریشه کنی بیماری‌ها باشد. برای رسیدن به این منظور طی کردن مراحل شناسایی و درمان ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از شیرخام برای ردیابی و شناسایی نئوسپورا کانینوم در گاو‌داری‌ها، این امکان را می‌دهند که اول گاوهای مبتلا به نئوسپورا کانینوم را شناسایی و ثانیاً از انتقال آلودگی به گوساله‌ها جلوگیری به عمل آورد این تک یاخته در انسان نیز می‌تواند آلودگی نئوسپوروزیس را ایجاد کند. در مطالعات گذشته یکی از مهم‌ترین مواد غذایی انتقال دهنده این تک یاخته به انسان را شیر خام و شیرهای آلوده شده در مراکز جمع آوری شیر دانسته‌اند (۲۰). اگر چه هنوز مطالعات زیادی در مورد نئوسپوروزیس در انسان در جهان گزارش نشده است ولی نتایج نشان داده‌اند که پرمیات‌ها به غیر از انسان (میمون رزوس) حساس به نئوسپورا کانینوم بوده‌اند (۸). طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، از مجموع ۴۴۰ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، خوزستان و فارس ۵۴ نمونه (۱۲/۲۷ درصد) نمونه‌ها آلوده

آگلوتیناسیون را ۲۹/۳۴ درصد عنوان کردند. مطالعات مشابه گذشته نشان داده‌اند که شیر خام و آغوز گاوهایی که از نظر سرولوژیکی آلوده به *نتوسپورا کانینوم* بوده‌اند حاوی DNA تک یاخته می‌باشند (۲۰). هورکوا و همکاران (۱۷) با بررسی شیر ۱۹۳ گاوداری به روش الایزا، شیرهای پنج گاوداری دارای آنتی بادی مثبت به این انگل بودند. در مطالعه دیگری در مصر ۷/۹۲ درصد انسان‌ها و ۲۰/۳ درصد گاوها آنتی بادی ضد *نتوسپورا کانینوم* را داشتند (۱۸). مطالعه پورمهدی و همکاران (۲) به منظور بررسی سرولوژیکی *نتوسپورا کانینوم* در گاوهای اهواز به روش الایزا میزان آلودگی را ۵۵/۹ درصد نشان داد. قره داغی و همکاران (۱۰) در بررسی شیوع *نتوسپورا کانینوم* در نمونه‌های سرمی گاوهای تبریز به روش الایزا ۱۷/۷ درصد گزارش کردند. از مقایسه نتایج مطالعات فوق و مطالعه حاضر می‌توان چنین برداشت کرد که میزان شیوع *نتوسپورا کانینوم* نه تنها در مناطق مختلف متفاوت بوده بلکه در مناطق یکسان طی زمان‌های مختلف، کاملاً متغیر است. این مسئله می‌تواند دلالت بر تاثیر فصول، آب و هوا، منطقه جغرافیایی و میزان آلودگی سگ‌های ولگرد بر میزان حضور این تک یاخته داشته باشد. در همین راستا، قره‌خانی و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۱۳ میزان شیوع *نتوسپورا* در گوسفندان همدان را ۲/۲ درصد و در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۶ شیوع این ارگانسیم در بزهای غرب ایران را ۶/۲ درصد گزارش کردند (۱۳). قنوتی و همکاران (۵) در بررسی شیوع *نتوسپورا کانینوم* در سگ‌های اهواز ۲۰ درصد آلودگی و رئیسی و همکاران (۳) در بررسی شیوع سرمی *نتوسپورا کانینوم* در سگ‌های چهارمحال و بختیاری شیوع ۲۷/۵ درصدی را گزارش کردند. در مطالعه حاضر

صالحی و همکاران (۲۴) در بررسی شیوع *نتوسپورا کانینوم* به روش Nested PCR در گاوهای شیری آبتن اطراف تهران میزان آلودگی را بین ۱۸/۷ تا ۶۵/۱ درصد اعلام کردند. نتایج مطالعه فوق و مطالعه حاضر اگرچه همسو می‌باشد اما میزان شیوع بدست آمده از مطالعه حاضر میزان آلودگی کمتری را در مناطق مورد بررسی نسبت به تهران نشان می‌دهد. این اختلاف، ممکن است به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی، روش اندازه‌گیری و میزان کنترل سگ‌های ولگرد در این دو منطقه باشد. نوری و همکاران (۷) نیز به بررسی سرولوژیک آلودگی گاوهای منطقه سیستان و بلوچستان به *نتوسپورا کانینوم* پرداخته و میزان آلودگی را ۳/۸ درصد گزارش کردند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میزان شیوع *نتوسپورا کانینوم* در سیستان و بلوچستان به مقدار قابل توجهی کمتر از مناطق مورد بررسی در مطالعه حاضر است. در مطالعه اسدی کرم و همکاران (۱) به منظور ارزیابی آلودگی گاوهای شهر بابک به *نتوسپورا کانینوم* به روش الایزا میزان آلودگی، ۱۲/۹۱ درصد به دست آمد. میزان شیوع این تک یاخته در شهر بابک و مناطق مورد مطالعه در پژوهش حاضر تقریباً به یک میزان می‌باشد. طاهری لک و همکاران (۴) طی مطالعه‌ای به بررسی فراوانی آنتی بادی ضد *نتوسپورا کانینوم* در شیر گاوهای شهریار به روش الایزا پرداختند. طبق مطالعه آنها، ۲۲ درصد از نمونه‌ها از لحاظ وجود آنتی بادی ضد *نتوسپورا کانینوم* مثبت اعلام شد. مروتی و نعمان (۶) در بررسی حضور آنتی بادی ضد *نتوسپورا کانینوم* به روش الایزا در گاوهای شیرده اصفهان میزان آلودگی گله‌ها را بین صفر تا ۶۰ درصد گزارش کردند. توانایی و نام‌آوری (۲۶) نیز میزان شیوع *نتوسپوروزیس* در گاوهای استان فارس به روش

باکتری در فصول و مناطق جغرافیایی مختلف نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. بر طبق نتایج حاصل از پژوهش حاضر، از نظر شیوع فصلی بالاترین میزان آلودگی در فصل زمستان (۲۲/۸۵ درصد) و پایین‌ترین میزان آلودگی در فصل تابستان (۸/۵۷ درصد) گزارش شد. از نظر موقعیت جغرافیایی بیشترین شیوع در استان چهارمحال و بختیاری (۱۴/۹۴ درصد) و کمترین شیوع در استان اصفهان (۶/۳۸ درصد) مشاهده شد. بنابراین تغییرات فصلی می‌تواند به عنوان یک فاکتور موثر بر میزان شیوع این باکتری و ایجاد معضلات ناشی از آن در نظر گرفته شود. دانستن این موضوع می‌تواند به تدوین و اجرای راهکارهای پیشگیرانه کمک شایانی کرده و به کنترل آلودگی بیانجامد. همچنین، با توجه به حضور سگ در همه گاو‌داری‌های مورد مطالعه، احتمال انتقال آلودگی *نتوسپورا* کنینوم از طریق سگ‌های نگهبان گاو‌داری‌ها نیز وجود دارد. پیشنهاد می‌شود به منظور جلوگیری از انتقال و شیوع *نتوسپورا* کنینوم از طریق سگ‌ها به دام و در نهایت انسان، اقدامات لازم جهت کنترل تردد و چگونگی حضور این دسته از حیوانات در محیط دامداری‌ها نیز به درستی صورت پذیرد. آلودگی گنجشگ به این انگل توسط گوندیم و همکاران (۱۴) در برزیل گزارش شده است. تردد این پرنده در دامداری و تغذیه آن از سطح خاک باعث انتقال فیزیکی و بیولوژیکی اوویست‌های انگل می‌شود. بنابراین بایستی تمهیدات لازم برای کاهش آلودگی از این طریق نیز اندیشیده شود. در خاتمه ذکر این نکته لازم است که با توجه به محدود بودن این گونه مطالعات در کشور، ضروری

اختلاف معناداری بین آلودگی *نتوسپورا* کنینوم در شیر و مناطق مختلف جغرافیایی ایران نبوده است (p0/05) به نحوی که بالاترین میزان آلودگی در استان چهارمحال و بختیاری و کمترین در اصفهان بوده است که این بخش از مطالعه با مطالعات مشابه در ایران هم‌خوانی دارد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که میزان آلودگی نشخوارکنندگان به *نتوسپورا* کنینوم در مناطق مختلف ارتباط مستقیمی با آلودگی سگ‌ها به *نتوسپورا* کنینوم داشته است. میزان آلودگی در نمونه‌های شیر گاو، گوسفند، بز، شتر و گاو میش به ترتیب ۲۶ درصد، ۴ درصد، ۵ درصد، ۲۲/۸۵ درصد و ۴/۴۴ درصد بوده است. سایر مطالعات نیز بالاتر بودن میزان آلودگی در نشخوارکنندگان بزرگ نسبت به نشخوارکنندگان کوچک را نشان می‌دادند که از این نظر نیز می‌توان نتیجه‌گیری مشابهی داشت.

### نتیجه‌گیری

بر پایه اطلاعات نویسندگان، مطالعه حاضر اولین گزارش در خصوص بررسی شیوع فصلی *نتوسپورا* کنینوم در شیرخام جمع‌آوری شده از نشخوارکنندگان مناطق مختلف ایران می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر بیانگر آلودگی نسبتاً بالای شیر به *نتوسپورا* کنینوم می‌باشد. افزایش سقط جنین و کاهش تولید شیر و احتمال انتقال از طریق شیر به انسان از جمله معضلات حاصل از آلودگی دام و محصولات دامی به *نتوسپورا* کنینوم می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به تولید فراورده‌های سنتی شیر از جمله تولید پنیرهای محلی حاصل از شیر خام، اجرای دقیق برنامه‌های کنترلی و سیاست‌های پیشگیرانه لازم و ضروری می‌باشد. در این مطالعه، علاوه بر بررسی میزان فراوانی این باکتری در شیر، شیوع این



روش الیزا. مجله دامپزشکی، دوره ۳۰، شماره ۱، صفحات ۲۰۵-۲۰۱.

۷. نوری، م.، گنجعلی، م.، راسخ، م.، نوراللهی فرد، س. ر.، سعادت، د. (۱۳۹۴). بررسی سرولوژیک آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گاوهای منطقه‌ی سیستان. پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، شماره ۱۷۳، دانشگاه زابل.

8. Barr, B.C., Conrad, P.A., Sverlow, K.W., Tarantal, A.F., Hendrickx, A.G. (1994). Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Laboratory Investigation*, **71**: 236-242.
9. Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, **20**: 323-67.
10. Gharedaghi, Y., Firouivand, Y., Heikal Abadi, M. (2017). Assessment of *Neospora caninum* seroprevalence in buffalo in Tabriz, North West of Iran. *Buffalo Bulletin*, **36**: 379-384.
11. Gharekhani, J., Heidari, H., Akbarein, H. (2012). Seroepidemiology of *Neospora caninum* in Iranian native and crossbred cattle: A cross sectional study. *Journal of Veterinary Research*, **67**: 325-329.
12. Gharekhani, J., Tavosidana, G.H., Zandieh, M. (2013). Seroprevalence of *Neospora caninum* in sheep from Western Iran. *Veterinary World*, **6**: 709-710.
13. Gharekhani, J., Esmailnegad, B., Rezaei, H., zhari, M. (2016). Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Iranian goats. *Annals of Parasitology*, **62**: 111-114.
14. Gondim, L.S., Abe-Sandes, K., Uzêda, R.S., Silva, M.S., Santos, S.L., Mota, R.A., Vilela, S.M., Gondim, L.F. (2010). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Veterinary Parasitology*, **168**: 121-4.
15. Graham, D.A., Calvert, V., Whyte, M., Marks, J. (1999). Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *Veterinary Record*, **144**: 672-673.
16. Hadadi, M.R., Sherafati, R., Delavari, M., Arbabi, M., Gilasi, H.R., Abed, A. (2018). Evaluation of anti *Neospora caninum*

است مطالعات جامع و کامل تری در زمینه تشخیص این بیماری در گاو و سایر میزبانان انگل صورت گیرد.

## تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه تخصصی بهداشت مواد غذایی بوده و مورد حمایت مالی دانشگاه آزاد شهرکرد قرار گرفته شده است. نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه نهایت تشکر را دارند. همچنین از آقای مهندس منوچهر مومنی تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

۱. اسدی کرم، م.، نوراللهی فرد، س. ر.، خلیلی، م.، میرزایی م. (۱۳۹۵). مطالعه سرولوژیک آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گاوهای شهرستان شهر بابک. پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی. شماره ۳۹۵، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
۲. پور مهدی بروجنی، م.، حمیدی نجات، ح.، قربانپور، م.، آصفی، ه. (۱۳۹۴). مقایسه روش‌های تشخیص سرولوژیکی تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* در گاومیش. نشریه علمی پژوهشی میکروبیولوژی دامپزشکی، دوره ۱۱، شماره ۱، صفحات ۱۹-۲۶.
۳. رئیس، ا.، حسینی نژاد، م.، و پیرعلی، خ. (۱۳۸۸). شیوع سرمی عفونت ناشی از *نئوسپورام کنینوم* در سگ‌های استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از آزمون غیر مستقیم پادتن‌های درخشان. پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، شماره ۱۲۱، دانشگاه شهرکرد.
۴. طاهری لک، ک.، صدراپی، ج.، دلیمی اصل، ع. ه. (۱۳۹۶). فراوانی آنتی بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر تعدادی از گاو‌داری‌های شهرستان شهریار. نشریه دامپزشکی، دوره ۱، شماره ۱۱۵، صفحات ۱۴۶-۱۴۲.
۵. فتواتی، س.، بهرامی، س.، مصلی نژاد، ب.، حمیدی نجات، ح. (۱۳۹۴). بررسی شیوع سرولوژی و مولکولی انگل *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های شهرستان اهواز. پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، شماره ۲۲۲، دانشگاه شهید چمران اهواز.
۶. مروتی، ح.، نعمان، و. (۱۳۹۶). ردیابی آنتی بادی علیه *نئوسپورا کانینوم* در سرم‌های تجاری جنین گاو (FBS) با استفاده از

22. Nam, H.W., Kang, S.W., Choi, W.Y. (1998). Antibody reaction of human anti-Toxoplasma gondii positive and negative sera with Neospora caninum antigens. *Korean Journal of Parasitology*, **36**: 269-275.
23. Reichel, M.P., Ayanegui-Alcérrec, M.A., Gondim, L.F., Ellis, J.T. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion-dollar question. *International Journal of Parasitology*, **43**: 133-142.
24. Salehi, N., Haddadzadeh, H., Shayan, P., Koochi, M.K. (2012). Isolation of *Neospora caninum* from an aborted fetus of seropositive cattle in Iran. *Veterinary Archive*, **82**: 545-553.
25. Shakerian, A., Sharafati-chalesshtori, R., Rafati, N., Sharifzadeh, A. (2015). Detection of *Neospora caninum* in Milk of Cows by Polymerase Chain Reaction. *Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine*, **20**: 7- 14.
26. Tavanaee, H.R., Namavari, M. (2017). Evaluation of attenuated variety of *Neospora caninum* for diagnosis of infection in cattle by agglutination test. *Veterinary Research and Biological Products*, **30**: 153-157.
27. Tranas, J., Heinzen, R.A., Weiss, L.M., McAllister, M.M. (1999). Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **6**: 765-767.
- antibodi presence in cow's milk in Kashan. *Feyz: (Journal of Kashan University of Medical Sciences)*, **22**: 333-338.
17. Hurkova, L., Halova, D., Modry, D. (2005). The prevalence of *Neospora caninum* antibodies in bulk milk of dairy herds in the Czech Republic: a case report. *Veterinary Medicine Journal*, **50**: 549- 552.
18. Ibrahim, H.M., Huang, P., Salem, T.A., Talaat, R.M., Nasr, M.I., Xuan, X., Nishikawa, Y. (2009). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**: 263-267.
19. Lobato, J., Silva, D.A., Mineo, T.W., Amaral, J.D, Segundo, G.R.S, Costa-Cruz, J.M., et al. (2006). Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clinical and Vaccine Immunology*, **13**: 84-89.
20. Moskwa, B., Cabaj, W. (2007). The role of the colostrum and milk in *Neospora caninum* transmission. *Helminthologia*, **44**: 126-129.
21. Müller, N., Zimmermann, V., Hentrich, B., Gottstein, B. (1996). Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**: 2850–2852.

## Study the prevalence of *Neospora caninum* in milk of ruminants by molecular method

Mahtab Alipour<sup>1</sup>, Ebrahim Rahimi<sup>\*2</sup>, Amir Shakerian<sup>3</sup>

1. P.h.D Student of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord ,Iran
2. Professor of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Professor of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran,

Received: 03 June 2019

Accepted: 16 July 2019

---

### Abstract

*Neospora caninum* is an intracellular protozoan parasite with global dissemination. This protozoa has been the main cause of abortion in dairy cows. The present research was done to study the seasonal and geographical prevalence of *Neospora caninum* in ruminants milk by molecular method. Four-hundred and forty raw milk samples were collected from Isfahan, Chaharmahal Va Bakhtiari, Khuzestan and Fars provinces through 4 seasons of the year and transferred to the laboratory. Extracted DNA samples by kit were analyzed in order to detect the *Neospora caninum* NC5 gene using the nested-PCR assay. From a total of 440 studied milk samples, 54 samples (12.27%) were infected with *Neospora caninum*. Cow milk had the highest (26%) and sheep milk had the lowest (4%) prevalence of *Neospora caninum*. Milk samples collected in winter had the highest (22.85%) and samples collected in the summer had the lowest (8.57%) prevalence of *Neospora caninum*. Milk samples collected from Chaharmahal Va Bakhtiari province had the highest (14.94%) and samples collected from Isfahan had the lowest (6.38%) prevalence of *Neospora caninum*. Regarding the relative prevalence of this parasite in raw milk, adoption of monitoring plans are required more than before. Additionally, considering the possibility of consumption of traditional dairy products and transmission of infection to human, complete boiling of milk is recommended before consumption.

**Key words:** Season prevalence, Geographical position, Raw milk, *Neospora caninum*.

---

\*Corresponding author: Ebrahim Rahimi

Address: Department of Food Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Tel 09133278377

E. mail: ebrahimrahimi55@yahoo.com