Archive of SID

شناسایی تک یاخته نئوسپورا کانینوم در شیرخام گاو های شهرکرد به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز

امیر شاکریان[1*]، رضا شرافتی چالشتری[2]، نصیر رفعتی[3]، علی شریف زاده[4]

۱- دانشیارگروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
۲- استادیار مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
۴- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

***نشانی برای مکاتبه:** گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد،ایران،
تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۴۵ ، amshakerian@yahoo.com

دریافت مقاله: اسفند نود و سه پذیرش برای چاپ: خرداد نود و چهار

چکیده

سابقه و هدف: *نئوسپورا کانینوم، تک یاخته ای است که اخیراً به عنوان عامل بیماری زای سقط جنین در گاو شناخته شده است. افزایش سقط جنین در جمعیت‌های دامی، رابطه مستقیمی با کاهش در میزان فرآورده‌های پروتئینی و بازار پر سود آن دارد. هدف از این پژوهش جستجوی انگل نئوسپورا کانینوم در شیر خام گاوهای شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۲ بود.*

روش کار: *در این مطالعه توصیفی مقطعی، تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام به روش تصادفی از گاوداری‌های سنتی شهرستان شهرکرد جمع آوری شد. سپس جهت شناسایی تک یاخته در نمونه‌های شیر، دزاکسی‌ریبونوکلئوتید های (DNA) جدا شده به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند.*

یافته ها: *بر اساس نتایج روش واکنش زنجیره ای پلی مراز، تعداد ۱۰ نمونه شیر (۱۰٪) آلوده به تک یاخته نئوسپورا کانینوم بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که می‌توان از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز در شیر برای شناسایی گاوهای آلوده استفاده کرد و از انتقال عامل به گوساله‌های تازه متولد شده و سایر دام های حساس جلوگیری کرد.*

واژه گان کلیدی: نئوسپورا، انتقال عمودی، شیر، PCR

مقدمه

امروزه سرعت جابجایی عوامل بیماری‌ها به نحوی می‌باشد که شناخت سریع وضعیت گسترش بیماری‌ها و اجرای کنترل و پیشگیری از ضررهای هنگفت آنها ضروری می باشد(۱). نئوسپورا کانینوم، تک یاخته ای است که اخیراً به عنوان عامل بیماری زای سقط جنین در گاو شناخته شده است و در گونه‌های مختلفی از حیوانات نیز وجود نئوسپوروزیس ناشی از نئوسپورا کانینوم گزارش شده است(۲). این تک یاخته می تواند در اثر مصرف شیر خام گاو آلوده یا تانک های جمع آوری کننده شیر خام آلوده شده به نئوسپورا سبب بیماری زایی در انسان شود(۳). در مطالعات گذشته در برزیل آلودگی نئوسپوروزیس را در اقشار مختلف نشان دادند به طوری که افراد مبتلا به ایدز ۳۵ درصد آنتی بادی علیه نئوسپورا کانینوم را داشتند(۴). در مطالعه دیگری نشان دادند، از تعداد ۱۷۲ فرد که از نظر سرولوژیکی توکسوپلاسموزیس مثبت بودند ۱۲ نفر از نظر سرولوژیکی آلودگی به نئوسپورا کانینوم داشتند(۵).

در مطالعات گذشته، این تک یاخته جزء عوامل بیماری زای توکسوپلاسموزیس شرح داده می‌شد زیرا علائم پاتوگونومیک آن، که وجه تمایز این تک یاخته از تک یاخته توکسوپلاسما گوندیی و گونه‌های مختلف جنس سارکوسیست می باشد، گزارش نشده بود. در مطالعات بعدی انگل از موارد متعددی از اجزاء جنین‌های سقط شده گاوها جدا شد و موردی که به وضوح دیده می‌شد حضور فراوان این انگل در جنین‌های تازه سقط شده بود و لذا این تک یاخته به عنوان یکی از عوامل عمده سقط در سرتاسر جهان در نظر گرفته شد(۸-۶).

میزبان نئوسپورا کانینوم اغلب گونه های حیوانی مانند سگ، گربه، گوسفند، بز، اسب و موش می‌باشند. میزبان اصلی نئوسپورا کانینوم فقط سگ می‌باشد(۹). انتقال بیماری بصورت عمودی و افقی صورت می‌گیرد. انتقال عمودی تک یاخته به صورت داخل رحمی و یا به صورت بلع اووسیت نئوسپورا به شیر خام یا آغوز اتفاق می افتد. در

www.SID.ir

Archive of SID

انتقال افقی بلع اووسیتی که در محیط وجود دارد صورت می‌گیرد(۳). در صورت وجود آلودگی اغلب دام های ماده تیترهای آنتی بادی بر علیه نئوسپورا کانینوم رانشان می دهند و به واسطه نئوسپورا و سایر عوامل، دچار سقطهای پی در پی می شوند. خسارت وارده به صنعت گاوداری در سرتاسر جهان در اثر نئوسپورا کانینوم بیش از ۱/۲۹۸ بیلیون دلار در هر سال از نظر گوساله زایی و کاهش میزان تولید شیر تخمین زده شده است که حدود ۸۴۲/۹ میلیون دلار مربوط به ضررهای گاوداری های شیری می‌باشد. کل هزینه‌های سالیانه مربوط به سقط نئوسپورایی در گاوداری های گوشتی در نیوزلند در حدود ۱/۱میلیون دلار و در ایالات متحده در حدود ۵۴۶/۳ میلیون دلار در گاوداری های شیری بوده است(۱۰). در بررسی در تبریز میزان آلودگی سرمی به تک یاخته مزبور ۱۰/۵ درصد بوده است(۱۱) و در مطالعه ای دیگر میزان آلودگی اسپرم های منجمد برابر ۱۰/۵۳ درصد گزارش شد(۱۲).

هدف این پژوهش جستجوی انگل نئوسپورا کانینوم در شیر خام گاوهای شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۲ بود.

روش کار

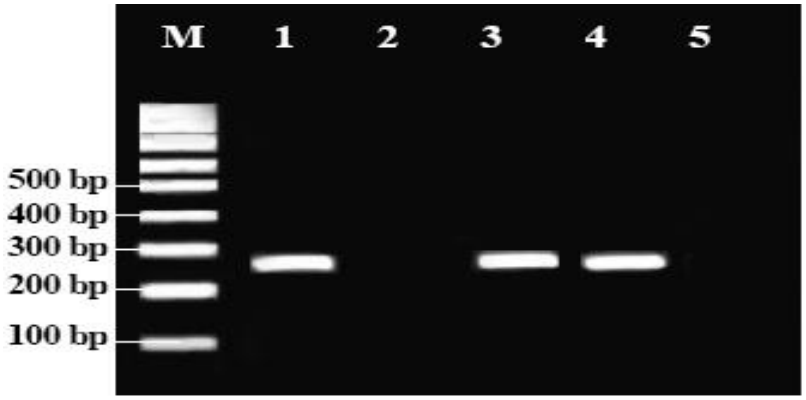
در این مطالعه توصیفی مقطعی، تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام به صورت تصادفی از گاوداری‌های سنتی شهرستان شهرکرد در طی سال ۱۳۹۲ جمع آوری شد. نمونه ها در کنار یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انتقال داده شد. جهت استخراج DNA، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه شیر با ۱۰۰ میکرولیتر پروتئاز بافر و ۵ میکرولیتر آنزیم پروتئاز 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 rpm ۱۳۰۰۰سانتریفیوژ شدند. پس از آن محتویات تیوپ‌ها را خالی نموده و ۱۰۰۰ میکرولیتر wash buffer به آن ها اضافه شد و پس از ۵-۳ ثانیه ورتکس کردن، تیوپ‌ها را ۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰سانتریفیوژ و نهایتا 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 ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند که در نهایت استخراج DNA صورت گرفت. برای اجرای PCR از پرایمر های اختصاصی نئوسپورا با توالی های NP4(5'CCTCCCAATGCGAACGAAA3')، NP6(5'CAGTCAACCTACGTCTTCT3') و NP7(5'GGGTGAACCGAGGGAGTTG3') استفاده شد (۳). جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعه ژنومی از دستگاه Master cycler gradient (Eppendorf Germany Co.) با حجم ۵۰ میکرو لیتر، واجد ۵ میکرو لیتر PCR buffer 10X، ۲ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۲ میکرومول از هر زوج پرایمرها NP4، NP6 و NP7، ۱ واحد آنزیم ۱ واحدی Taq DNA Polymerase و ۱ میکروگرم از DNA هر نمونه استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۴ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سلسیوس ۱دقیقه، ۵۷ درجه سلسیوس ۱دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱دقیقه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. جهت تأیید وجود قطعه تکثیر یافته از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. برای این منظور ۱ گرم از پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE حل و بعد از ذوب شدن مقدار ۱۰ میکرولیتر اتیدیوم برماید به آن اضافه و در سینی مخصوص الکتروفروز ریخته شد. سپس۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱ درصد آگارز در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (Fermentas) در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفروز گردید(۳).

یافته ها

از تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام تعداد ۱۰ نمونه (۱۰٪) آلودگی را نشان دادند و تعداد ۹۰ نمونه (۹۰٪) آلودگی به انگل تک یاخته نئوسپورا کانینوم را نشان نداند. در شکل شماره ۱ الکتروفورز ژل آگارز نمونه های منفی و مثبت نئوسپورا کانینوم مشاهده می شود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز نئوسپورا کانینوم در شیر خام گاو
خط M (ladder, 100 bp from Fermentas, Germany)،خط ۱ کنترل مثبت، خط۲ کنترل منفی،خط‌های ۳و۴ به ترتیب نمونه‌های مثبت و خط ۵ نمونه منفی می‌باشد.

بحث

هدف از این مطالعه شناسایی آلودگی شیر های خام به نئوسپورا کانینوم بود. در مطالعه حاضر که احتمالاً جزء اولین گزارشات آلودگی شیر خام گاو ها به روش ملکولی در ایران بوده است، مشخص گردید که می توان از روش PCR به عنوان یک روش سریع و با دقت بالا در شناسایی این تک یاخته در شیر استفاده کرد. همچنین میزان آلودگی شیر های خام برابر ۱۰ درصد بود که متعاقب آن می توان گفت جمعیت گاو های شیری آلودگی نسبتاً بالایی به نئوسپورا کانینوم داشتند. آگاهی داشتن از میزان شیوع نئوسپوروزیس در جمعیت های دامی می تواند کمک کننده در مبارزه با عوامل بیماری زا و ریشه کنی بیماری‌ها باشد که برای رسیدن به این منظور طی کردن مراحل شناسایی و درمان ضروری به نظر می رسد. استفاده از شیرخام برای ردیابی و شناسایی نئوسپورا کانینوم در گاوداری ها، این امکان را به ما می‌دهد که اولا گاوهای مبتلا به نئوسپورا کانینوم را شناسایی و ثانیاً از انتقال آلودگی به گوساله‌ها جلوگیری به عمل آورد.

این تک یاخته در انسان نیز می تواند آلودگی نئوسپوروزیس را ایجاد کند. در مطالعات گذشته یکی از مهمترین مواد غذایی انتقال دهنده این تک یاخته به انسان را شیر خام و شیر های آلوده شده در مراکز جمع آوری شیر دانسته اند(۳). اگر چه که هنوز اطلاعات زیادی در مورد نئوسپوروزیس در انسان در جهان گزارش نشده است ولی نتایج نشان داده اند که پریمات ها به غیر از انسان (میمون رزوس) حساس به نئوسپورا کانینوم بوده اند(۱۳). در مطالعات دیگری درکشور کره جنوبی از ۱۷۲ نفر ۶/۷درصد (۱۴)، 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(۵).

در مطالعات مشابه گذشته نشان داده اند که شیر خام و آغوز گاو هایی که از نظر سرولوژیکی آلودگی به نئوسپورا کانینوم بوده اند حاوی DNA تک یاخته می باشند(۳). در مطالعه دیگری برای اولین بار نئوسپورا کانینوم را به روش تائید ملکولی در خرس قهوه ای اروپایی نشان دادند(۱۶). در مطالعات مشابه دیگر شناسایی آنتی بادی های علیه نئوسپورا کانینوم به روش الایزا در گوزن شمالی ۲/۷ درصد و به روش PCR ، ۲ درصد نمونه ها مثبت گزارش گردید(۱۷). هورکووا و همکاران با بررسی شیر ۴۹۵ گاوداری به روش الایزا، شیرهای ۵ گاوداری دارای آنتی بادی مثبت به این انگل بودند(۱۸). در مطالعه دیگری در مصر ۷/۹۲ درصد انسان ها و ۲۰/۳ درصد گاوها آنتی بادی ضد نئوسپورا کانینوم را داشتند(۱۹). در بررسی دیگری آلودگی سرولوژیکی گاو های شیری در شهر تبریز میزان آلودگی را ۱۰/۵ درصد گزارش نمودند(۱۱). در مطالعه دیگری در یک جنین سقط شده عامل آن را نئوسپورا کانینوم به روش Nested PCR گزارش کردند(۲۰). در مطالعه دیگری توسط دوستی و همکاران

www.SID.ir

Archive of SID

آلودگی مایع منی منجمد شده گاو ها در ایران را ۱۰/۵۳ درصد گزارش کردند(۱۲). در مطالعه حاضر میزان آلودگی شیر های خام ۱۰ درصد بود.

بر اساس گزارش ها، مشخص شده که بین سن و سقط جنین در دام ها ارتباط وجود دارد. بیشترین میزان سقط جنین در دام ها در بین سال های ۴ تا ۶ سالگی صورت می گیرد(۱۱). همچنین سقط ها در گاو ها معمولاً پس از ۳ ماهگی آبستنی صورت می گیرد(۹). عوامل زیادی در گسترش وسیع این تک یاخته اثر گذار است از جمله اکوسیستم، دما و تراکم جمعیتی حیوانات میزبان می باشد. از مهمترین روش انتقال تک یاخته در بین گاوداری های گوشتی و شیری عمدتاً روش عمودی بوده است(۲۱).

گزارشات گذشته نشان داده است که وجود تاکی زوآیت های موجود در شیر خام می تواند سبب آلودگی گوساله های تازه متولد شده شود(۲۲). با این حال استفاده گوساله ها از شیر گاو هایی که آلودگی سرولوژیکی به این تک یاخته نداشتند، سبب جلوگیری از آلودگی نئوسپوروزیس در گوساله ها شده است(۲۲). در یک مطالعه ای نیز استفاده از آغوز را به عنوان یک فاکتور بالقوه در انتقال بیماری گزارش کرده اند(۲۳). نئوسپوروزیس در گله های شیری کالیفرنیای آمریکا سبب شده است که در گاو هایی که از نظر سرولوژیکی مثبت بوده اند تولید شیری حدود یک کیلوگرم کمتر نسبت به گاو های سالم داشته باشند(۲۴). در بررسی دیگری کاهش ۳ تا ۴ درصدی تولید شیر گزارش کرده اند(۲۵). در بررسی بارتلز و همکاران در گاو هایی که از نظر سرولوژیکی نسبت به نئوسپورا کانینوم مثبت بودند، بیشترین کاهش تولید شیر را در ۱۰۰ روز اول شیرواری، یکسال پس از اپیدمی سقط در گله مشاهده کردند. البته هنوز پاتوفیزیولوژی اثر نئوسپورا کانینوم در کاهش تولید شیر مشخص نشده است(۲۶).

نتیجه گیری

با توجه به آمارهای ارائه شده در این مقالات، گسترش و شیوع این انگل رقم بالایی را به خود اختصاص داده و نشان دهنده گسترش و شیوع گسترده این انگل می‌باشد. بنابراین با توجه حالت زئونوتیک بودن، افزایش سقط جنین و کاهش تولید شیر که از جمله معضلات گاوداری‌های صنعتی و سنتی می باشد و از طرف دیگرتولید فراورده های سنتی شیر از جمله تولید پنیرهای محلی حاصل از شیر خام و اهمیت آن در بهداشت مواد غذایی لذا اجرای دقیق برنامه های کنترلی و سیاست های پیشگیرانه لازم و ضروری می‌باشد.

سپاس گزاری

بدینوسیله از همکاران مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد تقدیر و قدرانی به عمل می آید.

REFERENCES

1- Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. (Eds.). Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle. John Wiley & Sons. 2008.

2- Dubey JP, Dorough KR, Jenkins MC, Liddell S, Speer CA, Kwok OCH, Shen SK. *Canine neosporosis*: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. Int J Parasitol 1988; 28:1293-1304.

3- Moskwa B, Cabaj W. The role of the colostrum and milk in *Neospora caninum* transmission. Helminthologia 2007; 44(3): 126-129.

www.SID.ir

Archive of SID

4- Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GRS, Costa-Cruz JM, etal. 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. Clin Vaccine Immunol 2006; *13*(1): 84-89.

5- Tranas J, Heinzen RA, Weiss LM, McAllister MM. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. Clin Diagn Lab Immun 1999; *6*(5): 765-767.

6- Dubey JP. Neosporosis in cattle. Vet Clin Food Anim 2005; 21(2): 473-483.

7- Dubey JP, Lindsay DS, Lipscomb TP. *Neosporosis* in cats. Vet Parasitol 1990; 27:335-339.

8- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1991; 198(2), 241-244.

9- Dubey JP. Neosporosis in cattle. J Parasitol 2003; 89: 42-56.

10- Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca MA, Gondim LF, Ellis JT. What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle–the billion dollar question. Int J Parasitol 2013; 43(2): 133-142.

11- Nematollahi A, Jaafari R, Moghaddam G. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Tabriz, Northwest Iran. Iran J Parasitol 2011; 6(4): 95.

12- Doosti A, Khamesipour F, Nekoei S, Lutvikadic I. Survey for the presence of *Neospora caninum* in frozen bull's semen samples by PCR assay. Asian Pac J Trop Dis 2015; 5(1): 7-12.

13- Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. Lab Invest 1994; *71*(2): 236-242.

14- Nam HW, Kang SW, Choi WY. Antibody reaction of human anti-Toxoplasma gondii positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. Korean J Parasitol 1998; 36(4): 269-275.

15- Graham DA, Calvert V, Whyte M, Marks J. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. Vet Rec 1999; 144(24): 672-673.

16- Čobádiová A, Víchová B, Majláthová V, Reiterová K. First molecular detection of *Neospora caninum* in European brown bear (Ursus arctos). Vet Parasitol 2013; 197(1): 346-349.

17- De Craeye S, Speybroeck N, Ajzenberg D, Dardé ML, Collinet F, Tavernier P, et al. Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae. Vet Parasitol 2011; 178(1): 64-69.

18- Hurkova L, Halova D, Modry D. The prevalence of *Neospora caninum* antibodies in bulk milk of dairy herds in the Czech Republic: a case report. Vet Med (Praha) 2005; 50(12): 549.

19- Ibrahim HM, Huang P, Salem TA, Talaat RM, Nasr MI, Xuan X, Nishikawa Y. Prevalence of *Neospora caninum* and Toxoplasma gondii antibodies in northern Egypt. Am J Trop Med Hyg 2009; 80(2): 263-267.

20- Salehi N, Haddadzadeh H, Shayan P, Koohi MK. Isolation of *Neospora caninum* from an aborted fetus of seropositive cattle in Iran. Vet Arhiv 2012; 82(6): 545-553.

www.SID.ir

Archive of SID

21- Reiterová K, Špilovská S, Antolová D, Dubinský P. *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: the current serological follow-up in Slovakia. Vet Parasitol 2009; 159(1): 1-6.

22- Davison HC, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Williams DJL, Kelly DF, Trees AJ. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. Res Vet Sci 2001: 70:163–168.

23- Corbellini LG, Smith DR, Pescador CA, Schmitz M, Correa A, Steffen DJ, Driemeier D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. Prev Vet Med 2006: 74:130–141.

24- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 2007: 20(2):323-67.

25- Hernandez J, Risco C, Donovan A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 2001: 219:632–635.

26- Bartels CJM, van Schaik G, Veldhuisen JP, van den Borne BHP, Wouda W, Dijkstra T. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. Prev. Vet. Med 2006: 77:186–198.

www.SID.ir