

شناسایی تک یاخته نئوسپورا کانینوم در شیر خام گاو های شهر کرد به روش واکنش زنجیره ای پلی مرز

امیر شاکریان^{۱*}، رضا شرافتی چالشتی^۲، نصیر رفعتی^۳، علی شریف زاده^۴

۱- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

۲- استادیار مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

۴- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

*نشانی برای مکاتبه: گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد، شهر کرد، ایران،

تلفن: ۰۲۸ 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 جمعیت های دامی، رابطه مستقیمی با کاهش در میزان فرآورده های 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 گاوداری های سنتی شهرستان شهرکرد جمع آوری شد. سپس جهت شناسایی تک یاخته در نمونه های شیر، دزاکسی ریبونوکلوئوتید های (DNA) جدا شده به روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

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

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

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

مقدمه

در مطالعات گذشته، این تک یاخته جزء عوامل بیماری زای توکسوپلاسموزیس شرح داده می شد زیرا علائم پاتوگنومیک آن، که وجه تمایز این تک یاخته از تک یاخته توکسوپلاسم گوندی و گونه های مختلف جنس سارکوسیست می باشد، گزارش نشده بود. در مطالعات بعدی انگل از موارد متعددی از اجزاء جنین های سقط شده گاوها جدا شد و موردی که به وضوح دیده می شد حضور فراوان این انگل در جنین های 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 می باشند. میزبان اصلی نئوسپورا کانینوم فقط سگ می باشد (۹). انتقال بیماری بصورت عمودی و افقی صورت می گیرد. انتقال عمودی تک یاخته به صورت داخل رحمی و یا به صورت بلع اووسیت نئوسپورا به شیر خام یا آغوز اتفاق می افتد. در

امروزه سرعت جابجایی عوامل بیماری ها به نحوی می باشد که شناخت سریع وضعیت گسترش بیماری ها 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 گونه های 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).

پس از ۳-۵ ثانیه ورتکس کردن، تیوپها را ۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ 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 rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند که در نهایت استخراج DNA صورت گرفت. برای اجرای PCR از پرایمر های اختصاصی نئوسپورا با توالی

NP4(5'CCTCCCAATGCGAACGAAA3')
و NP6(5'CAGTCAACCTACGTCTTCT3')
استفاده شد (۳). جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعه ژنومی از دستگاه (Eppendorf Germany Co.) Master cycler gradient با حجم ۵۰ میکرو لیتر، واجد ۵ میکرو لیتر 10X PCR buffer، 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 ۱ دقیقه، ۵۷ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه 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 الکتروفورز ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱ درصد آگارز در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (Fermentas) در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز گردید (۳).

یافته ها

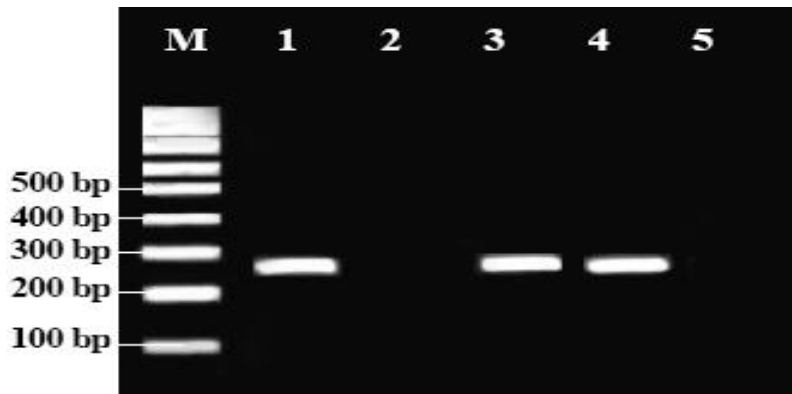
از تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام تعداد ۱۰ نمونه (۱۰٪) آلودگی را نشان دادند و تعداد ۹۰ نمونه (۹۰٪) آلودگی به انگل تک یاخته نئوسپورا کانینوم را نشان ندادند. در شکل شماره ۱ الکتروفورز ژل آگارز نمونه های منفی و مثبت نئوسپورا کانینوم مشاهده می شود.

انتقال افقی بلع اووسیتی که در محیط وجود دارد صورت می گیرد (۳). در صورت وجود آلودگی اغلب دام های ماده تیتراهای 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 بلیون 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 می باشد. کل هزینه های سالیانه مربوط به سقط نئوسپورایی در گاوداری های گوشتی در نیوزلند در حدود ۱/۱ میلیون 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 گاوداری های 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 تیوپ های 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 ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از آن محتویات تیوپها را خالی نموده و ۱۰۰۰ میکرولیتر wash buffer به آن ها اضافه شد و



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز نئوسپورا کانینوم در شیر خام گاو
خط M (ladder, 100 bp from Fermentas, Germany)، خط ۱ کنترل مثبت، خط ۲ کنترل منفی، خط های ۳ و ۴ به ترتیب نمونه های مثبت و خط ۵ نمونه منفی می باشد.

بحث

ها به غیر از انسان (میمون رزوس) حساس به نئوسپورا کانینوم بوده اند (۱۳). در مطالعات دیگری در کشور کره جنوبی از ۱۷۲ نفر ۶/۷ درصد (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 تأیید 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

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 بیماری ها باشد که برای رسیدن به این منظور طی کردن مراحل شناسایی و درمان ضروری به نظر می رسد. استفاده از شیر خام برای ردیابی و شناسایی نئوسپورا کانینوم در گاوداری ها، این امکان را به ما می دهد که اولاً گاوهای مبتلا به نئوسپورا کانینوم را شناسایی و ثانیاً از انتقال آلودگی به گوساله ها 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 پرمات

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 می باشد. بنابراین با توجه حالت زئونوتیک بودن، افزایش سقط جنین و کاهش تولید شیر که از جمله معضلات گاوداری های صنعتی و سنتی می باشد و از طرف دیگر تولید فرآورده 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 می باشد.

سپاس گذاری

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

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 کالیفرنیا 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

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.

- 4- Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GRS, Costa-Cruz JM, et al. 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, Vichová 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.

- 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.