بررسی فراوانی آلودگی به *توکسوپلاسما* در گوسفندان استان البرز به روش نستد پی سی آر

سید رضا حسینی [۱*]؛ میلاد حمزه علی طهرانی [۲] ؛ نادیا طایفی نصر آبادی [۳]

۱- گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- دانش آموخته رشته دکتری تخصصی انگل شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۳- گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

*نویسنده مسئول:.dr.s.reza@gmail.com

چکیده

مقدمه: امروزه با توجه به مصـــرف روز افزون گوشـــت گوســـفند و محبوبیت گوشـــت این حیوان و همچنین زئونوز بودن بیماری توکسوپلاسموزیس میان انسان و حیوانات و همچنین خسارات مالی که این انگل به دامداران وارد می نماید باید مورد توجه قرار گیرد. هدف ما در این تحقیق بررسی ارزیابی ردیابی *توکسوپلاسما* به روش پی سی آر نستد در خون گوسفند در استان کرج بوده است.

در این تحقیق بعد از جمع آوری نمونه های آزمایش و ثبت مشـخصـات و اطلاعات هر نمونه به کمک روش نسـتد پی سـی آر به بررسی حضور انگل *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان استان کرج پرداخته شد.

سـپس تمامی داده های به دسـت آمده به کمک نرم افزار SPSS آنالیز گردید. نتایج به دسـت آمده نشـان می دهد که ۹ نمونه) ۱۱,۱٪(از نمونه های آزمایش شده) ۸۱ نمونه(دارای سطح آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* می باشند، همچنین رابطه معنی داری میان سن و جنسیت دام با آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* دیده شده است.

نتایج به دست آمده در این گزارش، ضرورت بررسی ایمنی انگلی در ایران را نشان می دهد، زیرا با توجه به این موضوع که بیشتر دام های ایران به شکل سنتی پرورش داده می شود و مراقبت های پیشگیرانه به منظور آلودگی انگلی کمتر انجام می شود یک خطر بالقوه برای سلامتی حیوانات و مصرف کنندگان گوشت آن ها باشد.

کلمات کلیدی: گوسفند، *توکسوپلاسما گوندی*، پی سی آر، زئونوز.

مقدمه

توکسوپلاسموزیس یکی از مهمترین بیماریهای زئونوز است که توسط انگل *توکسوپلاسما گوندی* ایجاد می شود .این انگل به عنوان یک انگل در حیوانات خانگی و وحشی یافت می شود .گوسفندها از مهمترین میزبانان این انگل هستند و می توانند برای انتقال آن به انسان نقش مهمی داشته باشند.

نیکول و مانسو (۱۹۴۲)یک تک یاخته را در بافت های یک جونده همستر مانند به نام *تنوداکتیلوس گوندی* یافتند که برای تحقیقات لیشمانیوز مورد استفاده قرار می گرفت. نیکول ابتدا معتقد بود که این انگل یک پیروپلاسم است، سپس لیشمانیا، اما به زودی متوجه شد که ارگانیسم جدیدی را کشف کرده و آن را *توکسوپلاسما گوندی* نامید، این نام گذاری بر اساس مورفولوژی و میزبان انجام شده بود (Dubey JP et al,2002و Dubey JP et al,2008).

در ۳۴ سال بعد از اکتشاف، ارگانیسمهای مشابه *توکسوپلاسما گوندی* در چندین میزبان دیگر، به ویژه گونه های پرندگان یافت شد (۹) اما *توکسوپلاسما گوندی* زنده برای اولین بار توسط سابین و اولیتسکی(۱۹۳۱)جدا شد و ثابت شد که با سویه انسانی یکسان است (Dubey JP,2016و Dubey JP, Bealty CP,2010).

چرخه بیولوژیکی (مسیرهای انتقال)

اثبات شده است که *توکسوپلاسما گوندی* میزبان هایی از جمله پستانداران و پرندگان خشکی و آبزی را آلوده می کند. این حیوانات به عنوان میزبان های واسط در نظر گرفته می شوند زیرا فقط مراحل غیرجنسی در آنها رخ می دهد. مراحل جنسی فقط در اعضای خانواده فلیدا[1] از جمله گربه خانگی دیده می شود.

برای تشخیص این بیماری در گوسفندان، نمونه برداری از بافت عضلانی و آزمایشات میکرو سکوپی معمولاً استفاده می شود .در انسان، تشخیص *توکسوپلاسما گوندی* معمولاً با استفاده از آزمایشات خون و سرم انجام می شود.

درمان *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان عموماً شامل استفاده از داروهای ضد انگلی مانند سولفادیازین و پیرامتامین است .همچنین، برای کنترل انتقال بیماری به انسان، بهبود شرایط بهداشتی و فرهنگ سازی درباره راه های پیشگیری از این بیماری اهمیت دارد. به طور کلی، توکسوپلاسموزیس یک بیماری خطرناک است که می تواند بر سلامتی انسان ها و حیوانات تأثیر داشته باشد.

مواد و روش کار

به طور کلی ۳۹۶ نمونه از مناطق مختلف استان کرج اخذ گردید؛ ابتدا شهرستان کرج را به چهار قسمت)شرق ،غرب، شمال، جنوب(تقسیم شد و از هر قسمت ۹۹ نمونه خون به صورت خوشه های تصادفی و از ورید وداج اخذ شد و به آزمایشگاه موردنظر با رعایت شرایط سرمای مناسب منتقل شد. نمونه های خون جمع آوری شده سانتریفیوژ شده و متعاقباً تا زمان شروع آزمایشات نهایی در دمای ۱۴- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

به منظور استخراج DNA مورد نظر از نمونه های خون جمعآوری شده، درون میکروتیوبهای ۱ میلی لیتری ۱۴۴ میلیگرم از هر نمونه خون جمع آوری شده قرار داده شد و سپس DNA مورد نظر با استفاده از کیتهای استخراج کلون سینا (Cat No. EX6071) استخراج شد. سپس استخراج DNA بر اساس پروتکل یاد شده در کاتالوگ شرکت معرفی شده انجام گردید

در این پژوهش از پرایمرهای استفاده شده توسط سایر محققین درگذشته استفاده شده است (جدول ۱-۱).

جدول ۱-۱ پرایمر ژن B1 مورداستفاده در PCR RE

Primer	Sequence	bp	Ref
Forward	AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA	116	62
Reverse	TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAACT		

جدول 3-1 پرایمرهای مورداستفاده در Nested PCR

Marker	Primer	Forward	Reverse	Ref
ITS1	External MN1/ MN2	CCTTTGAATCCCAAGCAAA ACATGAG	GCGAGCCAAGACATCCATTG CTGA	69
Rdna	Internal Tg-NP1/ Tg-NP2	GTGATAGTATCGAAAGGT AT	ACTCTCTCTCAAATGTTCCT	

بررسی حضور *توکسوپلاسما گوندی* به کمک**PCR**

پس از استخراج DNA، از ژن با پرایمر *توکسوپلاسما گوندی* جهت تائید حضور این انگل استفاده شد. ابتدا برای حضور *توکسوپلاسما گوندی* از کیت های پی سی آر سینا کلون (Cat No. : PK3141) استفاده شد، بدین ترتیب مشخص کردن نمونه های مثبت به کمک پی سی آر به شکل زیر و بر اساس پروتکل درج شده در کاتالوگ انجام: ابتدا PCR با استفاده از پرایمرهای (جدول ۱-۳) ژن B1 ۱۱۶ جفت باز (Repetitive Element) در حجم کل Ul ۱۶ محلول انجام شد. ابتدا در پلیتهای آزمایش معرفهای PCR MIX به مقدار µl ۱۹/۲ و Taq DNA polymerase به مقدار µl ۴/۱ ریخته شد. همچنین تمام مراحل آزمایش بر روی یخ انجام شد و قبل انجام کار DNA نمونه های مورد استفاده یخ زدایی شد. سپس ۱ قطره روغن معدنی به لوله اضافه شد و درب لوله های آزمایش بسته شد. سپس µl ۶ از DNA موردنظر به لوله اضافه شد. بعد از این عملیات به کمک ورتکس محتویات لوله به مدت ۶ ثانیه مخلوط شد. سپس لوله های آزمایش به سیکل دمایی منتقل شد و بر اساس جدول ۱-۲ و به شکل زیر مراحل آزمایش انجام شد:

ابتدا دناتوراسیون اولیه به مدت ۶ دقیقه و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به صورت یک مرحله ای انجام شد. سپس ۳۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۴ ثانیه صورت گرفت و بعد از این مرحله در مرحله

ی آنیلینگ لوله های آزمایش ۳۰ مرتبه در دمای ۶۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۴ ثانیه قرار گرفتند، همچنین پس از آن در مرحله ی گسترش نیز مواد ۳۰ بار به مدت ۳۴ ثانیه و در دمای ۱۱ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس در گسترش نهایی نمونه ها یکبار به مدت ۶ دقیقه در دمای ۱۱ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

در نهایت برای اطمینان بیشتر از نتایج به دست آمده و تصویربرداری از ژل تاییدی، تمامی نمونه ها بر روی ژل آگاروز ۱٪ ران شدند. وجود قطعه ۱۱۶ جفت باز نشان دهنده مثبت بودن تست بوده است.

پی سی آر نستد این حالت از انواع PCR روشی است که برای افزایش حساسیت واکنش سنجش طراحی شده است. نستد پی سی آر یا پی سی آر تو در تو شامل استفاده از دو مجموعه آغازگر است که مکمل یک ژن هدف بوده و در دو واکنش پی در پی PCR کار میکنند. در این روش از انواع PCR اولین مجموعه آغازگرها به منظور ترمیم توالی های بالادست مجموعه دوم آغازگرها طراحی شده اند، در حالی که مجموعه دوم آغازگرها با توجه به اولین مجموعه آغازگرها به صورت داخلی تر یا تو در تو قرار دارند.

تمام نمونه های مثبت توسط پرایمر اکسترنال(MN1/ MN2) و اینترنال (Tg-NP1/ Tg-NP2) (جدول ۳-۱) ژنهای ITS1 rDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آنها به کمک کیتهای سینا کلون آنالیز شدند (جدول ۱). تمام مراحل این آزمایش بر روی یخ صورت گرفت. مخلوط کلی واکنش PCR شامل محصول راند اول پی سی آر، ۱/۶MgCl2 mM، KCl 14 mM، Tris HCl 14 mM، ۴/۴۱٪ ژلاتین، ۴/۱ mM از دئوکسی نوکلئوتید ۴/۱ µm، پرایمر خارجی ۴ µm، پرایمر داخلی Taq polymerase 1 U/µl بوده است.

مخلوط کلی واکنش PCR شامل PCR MIX ۱۶/۲µl و Taq DNA polymerase ۴/۱µl ریخته شد. سپس ۱۶ µl روغن معدنی به نمونه ها اضافه شد و درب لوله های آزمایش بسته شد. سپس ۶ µl از DNA، ۴/۱ µm پرایمر خارجی، ۴ µm پرایمر داخلی به لوله اضافه شد. سپس به کمک ورتکس محتویات لوله به مدت 6 ثانیه مخلوط شد. سپس لوله های آزمایش به سیکل دمایی منتقل شدند و بر اساس جدول(۳-۳) مراحل آزمایش انجام شد: مراحل به این صورت بوده است که ابتدا دناتوراسیون اولیه به مدت ۶ دقیقه و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به صورت یک مرحله ای انجام شد. سپس ۳۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۴ ثانیه صورت گرفت و بعد از این مرحله در مرحله ی آنیلینگ لوله های آزمایش ۳۰ مرتبه در دمای ۶۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۴ ثانیه قرار گرفتند، پس از آن در مرحله ی گسترش نیز مواد ۳۰ بار به مدت ۳۴ ثانیه و در دمای ۱۱درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس در گسترش نهایی یکبار نمونه ها به مدت ۶ دقیقه در دمای ۱۱ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در اولین PCR و PCR نستد، یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی نیز وارد شد.

در این پژوهش از نرمافزارهای آماری SPSS ۱۶ برای استخراج داده های توصیفی و اپیدمیولوژیک با استفاده از آزمون آماری مربع کای استفاده شد. نفی بگذارد. به همین دلیل، پیشگیری، تشخیص زود هنگام و درمان مناسب از اهمیت بالایی برخوردارند.

هم اکنون به وا کاوی و بررسی داده های حاصل از آزمایش پرداخته میشود .در این فصل اطلاعات مربوط به ۴۴ نمونه خون گوسفند از جامعه آماری پژوهش برای تحلیل رابطه بین متغیرها برای برر سی سؤالات تحقیق برر سی شد. داده های جمع آوری شده با ا ستفاده از نرم افزارهای اس پی اس اس نسخه ۱۶و اکسل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته اند.

نتایج

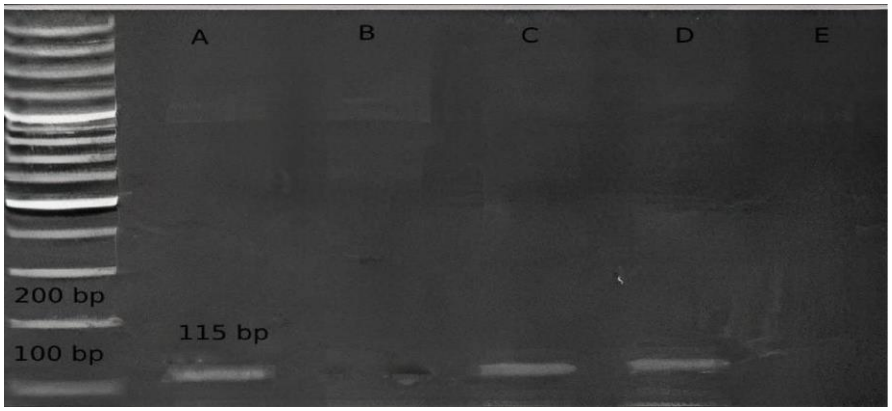
تشخیص *توکسوپلاسما گوندی* توسط PCR

به طورکلی از ۳۹۶ نمونه خون جمع آوری شده و آزمایش شده توسط ژن ۱۱۶ جفت باز ،۸۱ نمونه(۲۰/۴۵٪) از نظر توکسوپلاسموز مثبت بودند. همچنین ۳۱۵ نمونه خون معادل ۷۹/۵۴٪ از نمونه ها فاقد ژن *توکسوپلاسما گوندی* بوده اند (جدول ۲-۱).

جدول ۲-۱ نتایج اولیه PCR نمونه خون

		فراوانی	درصد فراوانی
نمونه ها	مثبت	۹	%۲۰/۴۵
	منفی	۳۵	%۷۹/۵۴

همچنین برای تأیید مضاعف محصول PCR، الکتروفورز چند نمونه از محصولات تکثیری نمونه های مثبت بر روی ژل آگاروز ۱٪ انجام گردید (شکل ۱-۱). در ردیف سمت چپ لدر قرار گرفته که معیار تشخیص ما است و در ردیفهای C،D ، و A در باند 116 جفت بازی حضور *توکسوپلا سما گوندی* تأیید میکند و ستون Bنشان از عدم حضور *توک سوپلا سما گوندی* میبا شد همچنین ستون E به عنوان کنترل منفی است.



تصویر ۱-۱ تأیید حضور ژن B1 در نمونه های مثبت PCR برای توکسوپلاسما گوندی.

تحلیل داده های به دست آمده نشان داد به طور کلی ۵۴ نمونه در گروه ۴-۱ سال، ۱۷ نمونه در گروه ۰-۱ سال ،۹ نمونه در گروه ۴-۶ سال ،۱ نمونه از نمونه ها در گروه سنی بالای ۶ سال قرار داشته اند که از این بین ۸۱ نمونه(۲۰/۴۵٪) از کل نمونه ها مثبت بوده است و ۳۱۵ نمونه(۷۹/۵۴٪) از کل نمونه ها منفی بوده اند (جدول ۱-۲) . داده های این تحلیل نشان داد میان شیوع *توکسوپلا سما گوندی* با سن حیوانات رابطهٔ معناداری وجود دارد($P\leq0.001$). همچنین نتایج به دست آمده بیانگر این موضوع هست بیشترین میزان درگیری در سن بالای ۶ سال است و بعد از این گروه سنی با کاهش سن از شدت ابتلا کم می شود.

جدول ۱-۲ بررسی میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در گروههای سنی مختلف

گروه سنی	۱-۰ سال	۴-۱ سال	۶-۴ سال	بالای ۶ سال	مجموع
تعداد موارد مثبت	۱۷	۵۴	۹	۱	۸۱
تعداد موارد منفی	۱۴۱	۱۵۵	۱۸	۲	۳۱۵
مجموع	۱۵۸	۲۰۹	۲۶	۳	۳۹۶
درصد فراوانی موارد مثبت	۱۱	۲۴	۳۲	۳۳	۲۰

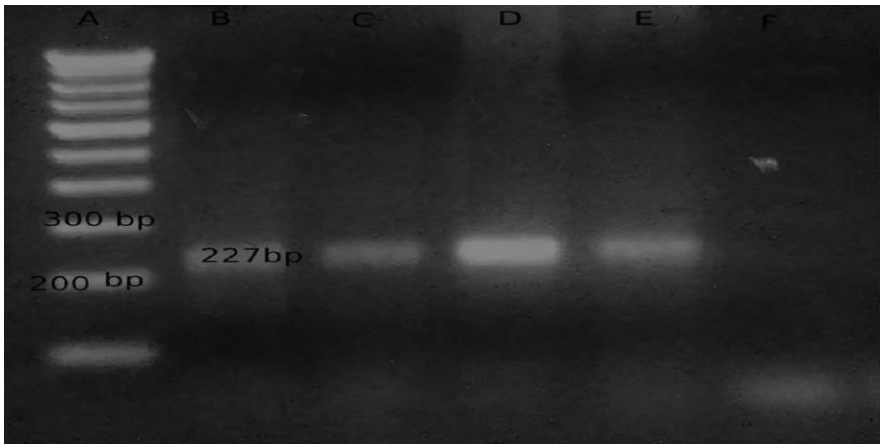
با توجه به نتایج به د ست آمده م شخص شد که ۵۹نمونه(با درصد فراوانی۲۶٪ماده ها) از دامهای ماده اخذ شده و ۲۲ نمونه(با درصد فراوانی ۱۲٪) از دامهای نر اخذ شده است ، به همین ترتیب نمونه های حاصل از ۱۶۳ دام ماده و ۱۵۱ دام نر فاقد آلودگی برر سی برای *توک سوپلا سما گوندی* بوده اند. همچنین رابطهٔ معناداری بین شیوع *توکسوپلا سما گوندی* و جنسیت دام وجود دارد($P\leq0.001$)، بر این اساس بیشتر دامهای مبتلا به *توکسوپلاسما گوندی* ماده هستند که نشان میدهد شیوع با جن سیت دامهای مبتلا رابطهٔ معناداری دارد (جدول ۱-۳).

جدول ۱-۳ بررسی میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* و جنسیت دام

جنسیت	نر	ماده	مجموع
موارد مثبت	۲۲	۵۹	۸۱
موارد منفی	۱۶۱	۱۵۴	۳۱۵
مجموع	۱۷۳	۲۲۳	۳۹۶
درصد فراوانی	۲۶	۱۲	۲۰

از مجموع ۸۱ نمونه مثبت به *توکسوپلاسما گوندی* به طور کلی ۱۸ نمونه(۲۶/۱٪) از پرایمر ژن های MN1/ MN2 (External Primer)در نمونه های آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* شناسایی شد و همچنین در ۹ نمونه(۱۱/۱٪) از نمونه های آلوده پرایمرهای اکسترنال مشاهده نگردید، همچنین ۵۴ عدد از نمونه های(۶۰/۳٪) مورد بررسی از مجموع ۸۱ نمونه دارای پرایمر ژنهای (Internal Primer Tg-NP1/ Tg-NP2)ه ستند و بقیه نمونه ها(۲۹/۳٪) از نمونه های مثبت فاقد ژن های مورد بررسی بوده اند. همچنین رابطهٔ معنی داری میان شیوع کلی و پرایمر ژنهای ITS1 rDNA دیده می شود (۱.. ≤P). اما به طور کلی حضور ژنهای منتسب به پرایمر خارجی بیشتر از پرایمر داخلی بوده است.

در ضمن برای تأیید محصول PCR، چند نمونه از محصولات تکثیری نمونه های مثبت بر روی الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ انجام گردید (شکل ۱-۱). به این ترتیب در ردیف A لدر bp۱۴۴ قرار گرفته است در ردیف B کنترل مثبت الکتروفورز قرار گرفته که معیار تشخیص ما است و در ردیفهای E،C ،D در باند ۱۱۱ جفت بازی حضور مثبت پرایمر ژن های ITS1 rDNA را تأیید میکند همچنین ستون F به عنوان کنترل منفی آزمایش بوده است.



تصویر ۱-۳ بررسی شیوع کلی در برابر ژنهای ITS1 rDNA. A: لدر- B: کنترل مثبت - C, D, E: نمونه های مثبت- F: کنترل منفی.

بحث

در این مطالعه میزان آلودگی گوسفندان استان کرج به انگل *توکسوپلاسما گوندی* با کمک روش PCR۸۱ نمونه(۲۰٪) بود. به دلیل اینکه میزان آلودگی در بین گوسفندان مورد بررسی که گوشت آنها به مصرف انسان میرسد بالا بوده است، میتواند نشان دهنده ی هشداری در مورد احتمال انتقال عفونت توکسوپلاسموزیس به انسان از طریق تماس با لاشه های آلوده و گوشت آنها باشد و این امر از نظر بهداشت عمومی و از لحاظ خسارتهای مالی وارده بسیار حائز اهمیت میباشد.

در مطالعاتی که رئیس زاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ در اصفهان به منظور تشخیص ژن B1 *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان کشتار شده اصفهان با استفاده از واکنش زنجیرهای پلیمراز نستد انجام دادند مشخص شد که ۱۲٪ نمونه های مورد بررسی آنها آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بوده اند (Raieszadeh et al,2021)که این میزان کمتر از نتایج به دست آمده در تحقیقات ما بوده است و نشانگر این موضوع میباشد که آلودگی در استان کرج بیشتر از استان اصفهان است.

در مطالعه ای که بهرامی و همکاران در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی سرولوژی توکسوپلاسموزیس در گوسفندان کشتاری در ایلام به کمک روش الایزا انجام دادند مشخص گردید ۱۱/۰۶٪ نمونه خون اخذ شده از گوسفندان در کشتارگاه این شهر نیز آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بوده اند. که با توجه به نتایجی که در مطالعات ما به دست آمده نشان داده شد که میزان آلودگی در کرج بسیار پایین تر از شهرستان ایلام بوده است(Bahrami et al, 2013).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ توسط چراغی پور و همکاران به منظور بررسی شیوع توکسوپلاسموز گوسفندان و گاوان کشتار شده در شهرستان خرم آباد صورت گرفت مشخص شد ۱۶/۱٪ نمونه های گوسفند در این مطالعه آلوده به *توکسوپلاسما* بوده اند (Cheraghipouret al, 2013)که نتایج به دست آمده در این تحقیق نزدیک به نتایج به دست آمده در مطالعه ی ما بوده است با این حال میزان آلودگی در استان کرج کمتر بوده است.

در مطالعه ای که صالحی و نظامی در سال ۲۰۱۹ به منظور بررسی میزان آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* در جنین های سقط شده گوسفندان با استفاده از روش الایزا در خراسان شمالی انجام دادند در یافتند که شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در جنین های سقط شده ۱۴/۶۳٪ بوده است (Salehi M, Nezami H,2019)که این میزان بسیار نزدیک به نتایج به دست آمده در مطالعات ما بوده است.

در مطالعه ی دیگری که در سال ۲۰۱۷ توسط ابراهیم و همکاران در مصر به منظور بررسی شیوع مولکولی و سرولوژیکی *توکسوپلاسما گوندی* در زنان باردار و گوسفندان انجام شد مشخص گردید شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان به کمک روش الایزا و RT-PCR به ترتیب ۱۶/۱۶٪ و ۱۱/۶۶٪ بوده است (Habibi et al, 2012) که نتایج به دست آمده در مصر بسیار نزدیک و همسو با نتایج ما بوده است و نشان دهنده این موضوع هست که آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان در خاورمیانه شایع است.

در مطالعه ای که صالحی و همکاران در سال ۲۰۲۰ به منظور بررسی عفونت *توکسوپلاسما گوندی* در جنین های

سقط شده گوسفند با استفاده از PCR در خراسان شمالی در ایران انجام دادند مشخص گردید ۱۶ مورد از ۱۳۳ مورد جنین سقط شده آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بودهاند (Salehi M et al,2020).

در مطالعه ی دیگر سان و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی شیوع سرولوژیکی عفونت *توکسوپلاسما گوندی* و نئوسپورا کنینوم در گوسفند و بز استخوان سیاه در جنوب غربی چین پرداختند که پس از تفسیر نتایج این پژوهش مشخص گردید از ۲۱۰ نمونه اخذ شده از گوسفند و بز ۳۶/۲٪ از نمونه ها آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بوده اند (Sun LX et al,2020)، نتایج به دست آمده توسط ما در این پژوهش نشان میدهد شیوع *توکسوپلاسما گوندی* بسیار کمتر از نتایج به دست آمده توسط سان و همکارانش در چین است.

در مطالعه ی دیگری که در برزیل توسط کونسالتر و همکاران در سال ۲۰۱۹ به منظور بررسی اپیدمیولوژیک عفونت *توکسوپلاسما گوندی* در گله گوسفند تجاری در یک منطقه آندمیک توکسوپلاسموز چشمی در جنوب برزیل صورت گرفت مشخص شد از ۳۱۹ نمونه گوسفندان ۱۱۰ نمونه ۱۴/۱٪ نمونه ها آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* میباشند (Consalter A et al, 2019)که نتایج به دست آمده بسیار بالاتر از نتایج به دست آمده در این پژوهش بوده است.

کاکمک و کاراتپ در سال ۲۰۱۷ به منظور بررسی شیوع سرمی *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان استان نوشهیر ترکیه مطالعاتی را انجام دادند که پس از تفسیر نتایج مشخص شد از میان ۱۲۴ نمونه مورد بررسی ۱۲ نمونه (۱۴/۴٪) آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بوده است (Çakmak DÖ, Karatepe B,2017)که نشان میدهد میزان آلودگی در تحقیقات کاکمک و کاراتپ همسو با نتایج به دست آمده در تحقیقات ما بوده است.

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان میدهد میزان آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* در استان کرج مانند استان خراسان شمالی بسیار پایین تر از میزان آلودگی در سایر نقاط ایران است، همچنین میزان آلودگی در کرج نسبت به نتایج آورده شده در سایر نقاط جهان نیز پایین تر می‌باشد.

در مطالعاتی که چراغی پور و همکاران در خرم آباد و در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی شیوع توکسوپلاسموز گوسفندان و گاوان کشتار شده در شهرستان خرم آباد انجام دادند مشخص گردید بیشترین میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در سن های بالای ۶۰ ماه روی میدهد و همچنین رابطه معنی داری با آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* و سن گوسفندان دیده شد (Cheraghipouret al, 2013). در مطالعات دیگری که رئیس زاده و همکاران در سال ۲۰۲۱ در اصفهان به منظور تشخیص ژن B1 *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان کشتار شده اصفهان با استفاده از پی سی آر نستد صورت گرفت مشخص گردید تفاوت معنی داری بین دو گروه سنی مورد بررسی در این تحقیق به آلودگی با توکسو پلاسموز دیده نمیشود (Raieszadeh et al,2021). در مطالعاتی که بهرامی و همکاران در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی سرولوژی توکسوپلاسموزیس در گوسفندان کشتاری در ایلام به کمک روش الایزا صورت گرفت مشخص گردید با افزایش سن، در صد آلودگی نیز افزایش مییابد با این حال ارتباط معنی داری در این مقاله در این پژوهش دیده نشد (Bahrami et al,2013). همچنین

نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد که در گروه سنی ۰-۱ سال بیشترین میزان آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* وجود دارد همچنین رابطه معنی داری میان سن دام و شیوع *توکسوپلاسما گوندی* وجود دارد.

در مطالعاتی که توسط چراغی پور و همکاران به منظور بررسی شیوع توکسوپلاسموز گوسفندان و گاوان کشتار شده در شهرستان خرم آباد صورت گرفت مشخص شد ۴/۱٪ از دام های نر و ۱۱/۹٪ از دامهای ماده آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بودهاند و همچنین ارتباط معنی داری بین جنسیت و آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* دیده نشد (Cheraghipouret al, 2013).

در مطالعاتی که در اصفهان به منظور تشخیص ژن B1 *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان کشتار شده اصفهان با استفاده از پی سی آر نستد توسط رئیس زاده و همکاران صورت گرفت مشخص گردید تفاوت معنی داری میان شیوع در میان دو جنس نر و ماده وجود ندارد (Raieszadeh et al,2021).

در مطالعاتی که در ایلام صورت گرفت مشخص گردید در جنسیت های مختلف، ارتباط معنی داری در این مقاله در این پژوهش دیده نشد. همچنین نتایج به دست آمده در این گزارش نشان داد که بیشترین میزان شیوع در جنسیت ماده صورت گرفته است همچنین رابطه ی معنی داری بین جنسیت و آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* دیده شده است.

گوسفندانی که دوز خوراکی اووسیست های زنده دریافت میکنند معمولا تبدار میشوند و گهگاهی ناراحتی تنفسی نشان میدهند، اما این علائم معمولا تا ۱۰ روز بعد از ظهور بهبود می یابند. در مطالعه ای که چیه بائو و همکاران در برزیل انجام دادند مشخص گردید که دامهای مورد بررسی و مبتلا به *توکسوپلاسما گوندی* دارای تب با مداومت 1 الی 9 روز بوده اند و هیچ مورد سقط جنینی در این دامها گزارش نگردید اما از ۱۶ بره متولد شده از گوسفندان آلوده در این بررسی ۶ راس به شکل مادرزادی آلوده بودند (Dubey JP et al,1998). در مطالعه ی دیگری که توسط گلور و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در جمهوری چک انجام شد مشخص گردید نمونه های مثبت مورد بررسی دارای علائم خفیف درمانگاهی به مدت یک الی دو هفته بوده اند (Glor SB et al,2013). در مطالعات دیگری که در کشور اسکاتلند و در سال ۲۰۱۱ توسط بناویدس و همکاران صورت گرفت مشخص گردید که نمونه های مورد بررسی دارای تب ۱ الی ۱۴ روزه بوده اند (Benavides et al, 2011). در مطالعه ی دیگری که در اسکاتلند توسط کاتزر و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت مشخص شد که علائم بالینی در دو گروه واکسینه شده و غیر واکسینه متفاوت است و نشانه های بالینی در گروه غیر واکسینه به صورت تب ۹ روزه و نشانه های بالینی در گروه واکسینه به صورت تب ۱ روزه دیده شد (Carruthers VB, Tomley FM.,2008 وCarruthers VB, Boothroyd JC,2007). در مطالعه های که در اسپانیا صورت گرفت مشخص شد در ۶ روز اول آلودگی علائم بالینی دیده نشد ولی در روز ۱۱ سقط جنین گزارش شد (Habibi et al, 2012). همچنین نتایج مورد بررسی ما نشان داد که بیشتر نمونه های آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* فاقد علائم بالینی مشخص بوده اند با این حال رابطه ی معنی داری میان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* و علائم بالینی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری نهایی

با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی نتایج سایر مقالات منتشر شده میتوان نتیجه گرفت میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در استان کرج پایین تر از سایر نقاط میباشد. با این حال با توجه به زئونوز بودن این انگل و میزان مصرف بالای گوشت گوسفندی در ایران باید اقدامات پیشگیرانه و بهداشتی مناسب در مورد کنترل این انگل صورت بگیرد.

منابع

1. Bahrami A.M, Jafarian M., Ali rahmi H., Mohammadi M, Cheragh afrooz S., Havasi Z., et al.(2013) Seroepidemiological Study of Toxoplasmosis in Sheep, Ilam, Iran (2013). J Vet Clin Res [Internet];4(4):263–8. Available from: https://jvcr.karaj.iau.ir/article_525906.html
2. Benavides, J., Maley, S., Pang, Y., Palarea, J., Eaton, S., Katzer, F., Innes, E.A., Buxton, D. Chianini F.(2011) Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of Toxoplasma gondii. Vet Parasitol;179:209–15.
3. Çakmak DÖ, Karatepe B.(2017) Seroprevalence of Toxoplasma gondii in sheep from Nevşehir province in Turkey. Türkiye Parazitolojii Derg;41(3):148.

4. Carruthers VB, Tomley FM.(2008) Microneme proteins in apicomplexans. Mol Mech parasite invasion Subcell Biochem;33–45.
5. Carruthers VB, Boothroyd JC.(2007) Publisher's note Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. Curr Opin Microbiol;10:82.
6. Cheraghipour k, Sheikhian A, Tarahi MJ, Nosrati Z, Moradpour K, Zibaei M. (2013) Seroprevalence of toxoplasmosis in slaughtered sheep and cattle in khorram Abad, Lorestan, Iran. J Vet Lab Res [Internet];5(2):113–20. Available from: https://jvlr.semnan.ac.ir/article_1246.html
7. Consalter A, Frazão-Teixeira E, Dubey JP, Zanella EL, da Silva AF, de Souza GN, et al. (2019) Epidemiological investigation of *Toxoplasma gondii* infections in commercial sheep flock in an endemic area for ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. Acta Parasitol;64:514–9.
8. Dubey JP.(2016) Toxoplasmosis of animals and humans. CRC press.
9. Dubey JP, Prowell M.(2013) Ante-mortem diagnosis, diarrhea, oocyst shedding, treatment, isolation, and genetic typing of *Toxoplasma gondii* associated with clinical toxoplasmosis in a naturally infected cat. J Parasitol;99(1):158–60.
10. Dubey JP, Bealty CP.(2010) Toxoplasmosis of animals and humans, CRC Press. Boca Raton, FL.
11. Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan G V, Bandini LA, Kwok OCH, et al.(2008) High prevalence and abundant atypical genotypes of Toxoplasma gondii isolated from lambs destined for human consumption in the USA. Int J Parasitol;38(8–9):999–1006.
12. Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA, et al. (2002) Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (Gallus domesticus) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. Int J Parasitol;32(1):99–105.
13. Dubey JP, Lindsay DS, Speer C.(1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev;11(2):267–99.
14. Glor SB, Edelhofer R, Grimm F, Deplazes P, Basso W.(2013) Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep. Parasit Vectors;6:1–11.
15. Habibi GR, Imani AR, Gholami MR, Hablolvarid MH, Behroozikhah AM, Lotfi M, et al. (2012) Detection and identification of *Toxoplasma gondii* type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin Province of Iran. Iran J Parasitol;7(3):64.
16. Ibrahim HM, Mohamed AH, El-Sharaawy AA, El-Shqanqery HE.(2017) Molecular and serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and sheep in Egypt. Asian Pac J Trop Med;10(10):996–1001.
17. Katzer F, Canton G, Burrells A, Palarea-Albaladejo J, Horton B, Bartley PM, et al. (2004) Immunization of lambs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* reduces tissue cyst burden following oral challenge with a complete strain of the parasite. Vet Parasitol [Internet].

[cited 2023 Sep 5];205(1–2):46–56. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25062897/

18. Katzer F, Brülisauer F, Collantes-Fernández E, Bartley PM, Burrells A, Gunn G, et al.(2011) Increased Toxoplasma gondii positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection. Vet Res;42(1):1–9.

19. Raieszadeh H, Jamshidi A, Noaman V, Razmi G.(2021) Detection of B1 Gene of *Toxoplasma gondii* infection in Slaughtered Sheep in Isfahan Using the Nested PCR. J Anim Biol [Internet];13(2):39–48. Available from: https://ascij.damghan.iau.ir/article_679296.html

20. Salehi M, Nezami H, Niazkar HR.(2020) Investigation of *Toxoplasma gondii* infection in aborted fetuses of sheep using PCR: A study in North Khorasan Province, Iran. Vet Med Int.;2020.

Salehi M, Nezami H.(2019) A Survey of *Toxoplasma gondii* Infection in Aborted Fetuses of Sheep Using ELISA Method in Different Cities of North Khorasan Province. J Vet Res [Internet];74(3):304–10. Available from: https://jvr.ut.ac.ir/article_72869.html

21. Sun L-X, Liang Q-L, Nie L-B, Hu X-H, Li Z, Yang J-F, et al.(2020) Serological evidence of *Toxoplasma gondii* and Neospora caninum infection in black-boned sheep and goats in southwest China. Parasitol Int;75:102041.

Investigation of the frequency of *Toxoplasma* infection in sheep of Alborz province by nested PCR method

Hosseini S.R.*[1], Hamzeh Ali Tehrani M. [2], Taiefi Nasrabadi N.[3]

[1] Department of Veterinary Patobiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] PhD graduate in Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Tehran, Iran

[3] Department of Veterinary Patobiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

* Correspondig Author's.Email: dr.s.reza@gmail.com

Abstract

Introduction: Today, due to the increasing consumption of sheep meat and the popularity of this animal's meat, as well as the zoonosis of *Toxoplasma gondii* disease between humans and animals, as well as the financial losses caused by this parasite to livestock farmers, attention should be paid.
Purpose: Our purpose in this research is to evaluate the detection of *Toxoplasma* by nested PCR method in sheep blood it was in Karaj province.
Research implementation method: In this research, after collecting test samples and recording the characteristics and information of each sample, the presence of *Toxoplasma gondii* parasite in the sheep of Karaj province was investigated using the nested PCR method. Then all the obtained data were analyzed with the help of SPSS software.
Results: The obtained results show that 9 samples (11.1%) of the tested samples (81 samples) have a level of contamination with *Toxoplasma gondii*, also a significant relationship between the age and sex of the animal with contamination with *Toxoplasma gondii* has been seen.
Discussion and conclusion: The results obtained in this report show the necessity of examining the safety of parasites in Iran, because most of Iran's livestock are raised in a traditional way and preventive care for parasitic contamination is less. It can be a potential risk for the health of animals and their meat consumers.

Keywords: sheep, *Toxoplasma gondii*, PCR, zoonosis.