JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۱۱۰-۱۰۱

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

مهتاب علی پور عمروآبادی[۱]، ابراهیم رحیمی[۲*]، امیر شاکریان[۳]

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. نمونه های 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. نمونه های شیر جمع آوری شده در فصل زمستان بیشترین (۲۲/۸۵ درصد) و نمونه های جمع آوری شده در فصل تابستان کمترین (۸/۵۷ درصد) میزان شیوع *نئوسپورا کانینوم* را داشتند. نمونه های شیر جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری بیشترین (۱۴/۹۴ درصد) و نمونه های جمع آوری 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، شیرخام، *نئوسپورا کانینوم*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

*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 بهره هوشی، 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*، تک یاخته‌ای 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 گاو ها به نئوسپوروزیس در کالیفرنیا حدود ۳۵ میلیون دلار تخمین زده می شود (۸).

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

در سرتاسر جهان خسارت وارده به صنعت گاوداری در اثر *نئوسپورا کانینوم* بیش از ۱/۲۹۸ بیلیون 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، واکسنی که بتواند آلودگی را از طریق درون‌زاد (جفتی) متوقف کند، در دسترس نیست (۹، ۲۰).

مطالعات پراکنده ای نشان داده اند که مصرف شیر خام گاو های آلوده به *نئوسپورا کانینوم*، می تواند 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 تیتر بالای آنتی بادی بر علیه *نئوسپورا کانینوم* بودند (۱۹). در مطالعه دیگری نیز میزان آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در سرم های اخذ شده از افراد مبتلا به توکسوپلاسموزیس، حدود ۴۳ درصد بود (۲۷). با این وجودنقش این تک یاخته 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.

مواد و روش کار

الف) نمونه گیری:

مطالعه حاضر از نوع توصیفی و مقطعی بود که در طی سال های ۱۳۹۵ و ۹۶ انجام پذیرفت. در کل ۴۴۰ نمونه شیر خام شامل نمونه شیر گاو (۱۰۰ نمونه)، نمنه شیر گوسفند (۱۰۰ نمونه)، شیر بز (۸۰ نمونه)، شیر گاومیش (۷۰ نمونه) و شیر خام شتر (۹۰ نمونه) از گله های شیری واقع در استان‌های اصفهان، چهار محال و بختیاری، فارس و خوزستان به شکل تصادفی در لوله های 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 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 solutionاضافه و پس از ۵ ثانیه ورتکس شدن، تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از آن محتویات تیوپ‌ها را خالی نموده و ۱۰۰۰ میکرولیتر wash buffer به آن‌ها اضافه شد و پس از ۵-۳ ثانیه ورتکس کردن، تیوپ‌ها را ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ 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 bufferمخلوط 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 DNAصورت 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 Nc_5 *نئوسپورا کانینوم* در واکنش پلیمراز زنجیره‌ای مورد شناسایی قرار گرفت (۲۱). واکنش اولیه PCR شامل ۱ میکروگرم تمپلت DNA، ۲ میکرومولار MgCL2، ۱۰ میکرولیتر بافر 10_{TE} واکنش PCR و ۱۰pmol از هر کدام از پرایمرها (bp ۳۲۸) و ۲۰۰ میکرومولار dNTP و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز DNA بود (Thermo Fisher Scientific, Germany). جدول ۱ لیست پرایمر های مورد استفاده در واکنش PCR اولیه و همچنین nested، جهت ردیابی *نئوسپورا کنینوم* در نمونه‌های شیر را نشان می دهد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی *نئوسپورا کنینوم* در واکنش nested-PCR.

ژن هدف	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
Nc_5	F: 5'-GGGTGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3' R: 5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3'	۳۲۸
	F: 9'- GGGTGAACCGAGGGAGTTG-3' R: 5'-TCGTCCGCTTGCTCCCTATGAAT3-3'	۱۹۸

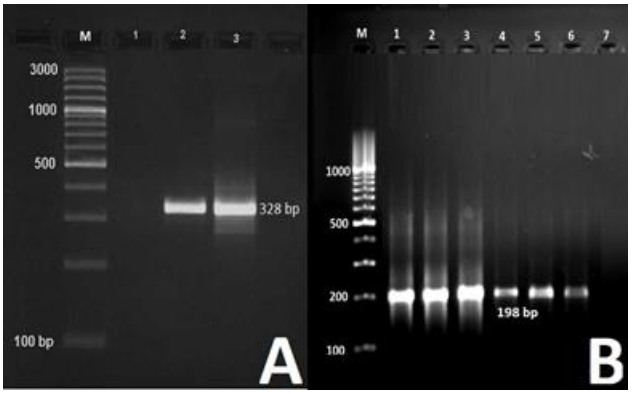
واکنش شامل ۳۵ سیکل واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه بود. محصول مرحله اول PCR در آب مقطر تا رقت ۱ به ۱۰ رقیق شد تا برای استفاده در واکنش nested-PCR آماده شود. nested-PCR شامل ۱ میکروگرم تمپلت DNA، ۲ میکرو مولار $MgCL_2$، ۵ میکرولیتر بافر X ۱۰ واکنش PCR، ۱۰ pmol از هر کدام از پرایمرها (198bp)، ۲۰۰ میکرومولار dNTP و ۱ واحد آنزیم Taqپلیمراز 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 TBE ۱X 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 مجموعا ۴۴۰ نمونه شیر خام گاو، گوسفند، بز، شتر و گاومیش از چهار استان اصفهان، چهار محال و بختیاری، فارس و خوزستان جمع آوری و از نظر آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* با استفاده از روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ تصویر الکتروفورز محصولات واکنش nested-PCR برای ردیابی *نئوسپورا کنینوم* در نمونه‌های شیر را نشان می دهد. جدول ۲ فراوانی نمونه‌های آلوده به *نئوسپورا کنینوم* را نشان می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از مجموع ۴۴۰ نمونه مورد بررسی، تعداد ۵۴ نمونه (۱۲/۲۷ درصد) آلوده به *نئوسپورا کنینوم* 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 *نئوسپورا کنینوم* 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 *نئوسپورا کنینوم* در نمونه‌های شیر خام را نشان می‌دهد. از مجموع ۹۴ نمونه شیرخام 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 *نئوسپورا کانینوم* بودند.



شکل ۱- نتایج ژل الکتروفورزیس ژن Nc_5 *نئوسپورا کانینوم*.

A : مرحله اول PCR (۳۳۸bp) و B: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای (۱۹۸bp) M: نردبان ۱۰۰ 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 *نئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر نشخوارکنندگان.

نوع نمونه	تعداد نمونه	فراوانی نمونه‌های آلوده به *نئوسپورا کانینوم*(درصد)
شیر گاو	۱۰۰	۲۶ (۲۶)
شیر گوسفند	۱۰۰	۴ (۴)
شیر بز	۸۰	۴ (۵)
شیر گاومیش	۷۰	۱۶ (۲۲,۸۵)
شیر شتر	۹۰	۴ (۴,۴۴)
مجموع	۴۴۰	۵۳ (۱۲,۰۴)

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

فصل	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد نمونه آلوده به *نئوسپورا کنینوم* (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)

جدول٤- شیوع جغرافیایی *نئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های شیر خام.

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

بحث

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 شیر های آلوده شده در مراکز جمع آوری شیر دانسته‌اند (۲۰). اگر چه که هنوز مطالعات زیادی در مورد نئوسپوروزیس در انسان در جهان گزارش نشده است ولی نتایج نشان داده‌اند که پریمات‌ها 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 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 شهر کاشان را ۱۸/۸ درصد گزارش کردند. نتایج هر دو مطالعه فوق با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

در مطالعات دیگری درکشور 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).

صالحی و همکاران (۲۴) در بررسی شیوع *نئوسپورا کانینوم* به روش Nested PCR در گاوهای شیری آبستن 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 *نئوسپورا کانینوم* پرداخته و میزان آلودگی را ۳/۸ درصد گزارش کردند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میزان شیوع *نئوسپورا کنینوم* 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 شهربابک به *نئوسپورا 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 تقریبا به یک میزان می‌باشد. طاهری لک و همکاران (۴) طی مطالعه‌ای به بررسی فراوانی آنتی بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در شیر گاوهای شهریار به روش الایزا پرداختند. طبق مطالعه آنها، ۲۲ درصد از نمونه‌ها از لحاظ وجود آنتی بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* مثبت اعلام شد. مروتی و نعمان (۶) در بررسی حضور آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا 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 نئوسپوروزیس در گاوهای استان فارس به روش آگلوتیناسیون را ۲۹/۳۴ درصد عنوان کردند. مطالعات مشابه گذشته نشان داده‌اند که شیر خام و آغوز گاوهایی که از نظر سرولوژیکی آلوده به *نئوسپورا کانینوم* بوده‌اند حاوی DNA تک یاخته می‌باشند (۲۰). هورکووا 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 *نئوسپورا کانینوم* را داشتند (۱۸). مطالعه پورمهدی و همکاران (۲) به منظور بررسی سرولوژیکی *نئوسپورا کانینوم* در گاومیش‌های اهواز به روش الایزا میزان آلودگی را ۵۵/۹ درصد نشان داد. قره داغی و همکاران (۱۰) در بررسی شیوع *نئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های سرمی گاومیش‌های تبریز به روش الایزا ۱۷/۷ درصد گزارش کردند. از مقایسه نتایج مطالعات فوق و مطالعه حاضر می‌توان چنین برداشت کرد که میزان شیوع *نئوسپورا کنینوم* نه تنها در مناطق مختلف متفاوت بوده بلکه در مناطق یکسان طی زمان‌های مختلف، کاملا 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 نئوسپورا در گوسفندان همدان را ۲/۲ درصد و در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۶ شیوع این ارگانیسم در بزهای غرب ایران را ۶/۲ درصد گزارش کردند (۱۳). قنواتی و همکاران (۵) در بررسی شیوع *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های اهواز ۲۰ درصد آلودگی و رئیسی و همکاران (۳) در بررسی شیوع سرمی *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های چهارمحال و بختیاری شیوع ۲۷/۵ درصدی را گزارش کردند. در مطالعه حاضر

اختلاف معناداری بین آلودگی *نئوسپورا کانینوم* 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 *نئوسپورا کانینوم* در مناطق مختلف ارتباط مستقیمی با آلودگی سگ‌ها به *نئوسپورا کانینوم* داشته است. میزان آلودگی در نمونه‌های شیر گاو، گوسفند، بز، شتر و گاومیش 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.

نتیجه گیری

بر پایه اطلاعات نویسندگان، مطالعه حاضر اولین گزارش در خصوص بررسی شیوع فصلی *نئوسپورا کانینوم* در شیرخام جمع آوری شده از نشخوارکنندگان مناطق مختلف ایران می باشد. نتایج مطالعه حاضر بیانگر آلودگی نسبتا بالای شیر به *نئوسپورا کانینوم* 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 *نئوسپورا 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 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 گاوداری های مورد مطالعه، احتمال انتقال آلودگی *نئوسپورا کنینوم* از طریق سگ‌های نگهبان گاوداری‌ها نیز وجود دارد. پیشنهاد می‌شود به منظور جلوگیری از انتقال و شیوع *نئوسپورا 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 اووسیست‌های 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

اســت مطالعات جامع و کامل‌تری در زمینه تشــخیص این بیماری در گاو و ســایر 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 اســت. نویســندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه نهایت تشــکر 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. رئیسی، 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 دکتری حرفه ای دامپزشکی*، شماره ۱۲۱، دانشگاه شهرکرد.

۴. طاهری لک، ک.، صدرایی، 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. قنواتی، س.، بهرامی، س.، مصلی نژاد، ب.، حمیدی نجات، ح. (۱۳۹۴). بررسی شیوع سرولوژی و مولکولی انگل *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های شهرستان اهواز. *پایان نامه دکتری حرفه ای 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 روش الایزا. مجله دامپزشکی، دوره ۳۰، شماره ۱، صفحات ۲۰۵-۲۰۱.

۷. نوری، م.، گنجعلی، م.، راسخ، م.، نوراللهی فرد، س. ر.، سعادتی، د. (۱۳۹۴). بررسی سرولوژیک آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* درگاوهای منطقه‌ی سیستان. *پایان نامه دکتری حرفه ای 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 crossbreed cattle: A cross sectional study. *Journal of Veterinary Research*, **67:** 325-329.
12. Gharekhani, J., Tavoosidana, G.H., Zandieh, M. (2013). Seroprevalence of *Neospora caninum* in sheep from Western Iran. *Veterinary World*, **6:** 709-710.
13. Gharekhani, J., Esmaeilnegad, 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*

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.
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-Alcérreca, 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., Koohi, 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-chaleshtori, 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.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019

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

Mahtab Alipour[1], Ebrahim Rahimi[*2], Amir Shakerian[3]

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