Food Hygiene, Vol. 12, No. 47, Autumn 2022

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2023.1975512.1387**

Investigation of the prevalence of *Neospora caninum* in traditional cheeses produced from the milk of ruminants in Chaharmahal and Bakhtiari province by molecular method

Abbasi Tadi, D.[1], Rahimi, E. [2*]

1. DVM Graduate in Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Professor, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
*Coresponding author Email: Ebrahimrahimi55@yahoo.com

(Received: 2022/12/19 Accepted: 2023/02/07)

Abstract

Cheese isamong ther dairy products and is a suitable environment for the growth and reproduction of microorganisms. One of these pathogens, *Neospora caninum*, causes abortion in cows. This study aimed to investigate the prevalence of *N. caninum* in traditional cheeses produced from ruminant milk using molecular method. In this study, 86 traditional cheese samples consisting 42 cow cheese, 20 sheep cheese, 12 goat cheese, and 12 sheep cheese ripened in brine were randomly collected from dairy herds in Chahar Mahal and Bakhtiari provinces. The samples were transferred to the laboratory in sterile conditions next to ice an, and Nested-PCR technique was used on *Nc5* gene for molecular analysis. The results showed that 9.3% (8/86) of the samples were contaminated with *N. caninum*. The highest contamination (12.5%) was found in cow milk cheese samples. No contamination was observed in traditional cheeses produced from goat milk or sheep brined cheese. The comparison of contamination levels in different cheeses showed no significant difference between the groups. Since milk and dairy products have a high place in the human food basket; therefore, the healthiness of these foods is crucial.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Nested-PCR, *Neospora caninum*, local cheese, Chaharmahal and Bakhtiari

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2023.1975512.1387

بررسی شیوع *نئوسپورا کانینوم* در پنیرهای سنتی تولید شده از شیر نشخوارکنندگان در استان چهارمحال و بختیاری به‌روش مولکولی

دانیال عباسی‌طادی[۱]، ابراهیم رحیمی[۲*]

۱- دانش‌آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۹/۲۸ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۱۱/۱۸)

چکیده

پنیر یکی از محصولات شیر است که محیط مناسبی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌هاست. یکی از این عوامل بیماری‌زا، *نئوسپورا کانینوم* تک‌یاخته عامل سقط جنین در گاو است. هدف از مطالعه حاضر شیوع *نئوسپورا کانینوم* در پنیرهای سنتی تولیدشده از شیر نشخوارکنندگان به‌روش مولکولی است. در این مطالعه ۸۶ نمونه پنیر سنتی شامل پنیر گاوی ۴۲، پنیر گوسفندی ۲۰ ، پنیر بز ۱۲ و پنیر گوسفندی سنتی رسیده در آب نمک ۱۲ نمونه، از گله‌های شیری واقع در استان چهارمحال و بختیاری به‌شکل تصادفی در لوله‌های آزمایش استریل جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در شرایط سترون در کنار یخ و بلافاصله پس از نمونه‌گیری، به آزمایشگاه منتقل شدند. از تکنیک Nested-PCR روی ژن Nc5 جهت بررسی مولکولی استفاده شد. نتایج نشان داد که از مجموع ۸۶ نمونه مورد بررسی، تعداد ۸ نمونه (۹/۳ درصد) آلوده به *نئوسپورا کانینوم* بودند. بالاترین میزان آلودگی در نمونه‌های پنیر سنتی شیر گاو (۱۲/۵درصد) بود و در پنیرهای سنتی تولیدشده از شیر بز و پنیر گوسفندی سنتی رسیده در آب نمک هیچ آلودگی مشاهده نشد. مقایسه میزان آلودگی در پنیرهای مختلف نشان داد که بین هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. از آن‌جایی که شیر و محصولات لبنی جایگاه بالایی در سبد غذایی انسان دارد؛ بنابراین سلامت این مواد غذایی و عاری از عوامل بیماری‌زا بودن بسیار حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: Nested-PCR، *نئوسپورا کانینوم*، پنیر محلی، چهارمحال و بختیاری.

مقدمه

شیر ماده غذایی با ارزشی است که با ذائقه افراد در سنین مختلف سازگاری دارد و مصرف آن برای تأمین بخشی از نیازهای تغذیه‌ای لازم است. شیر 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 به‌نظر می‌رسد. از آن‌جایی که شیر محیطی مناسب برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم هاست، می‌تواند به‌عنوان بستر مناسبی برای رشد و انتقال عوامل بیماری‌زا تلقی شود. لذا توجه به مسائل کیفی شیر از اهمیت بالایی برخوردار است (Ayazi *et al*., 2022). پنیر یکی از فرآورده‌هایی است که به‌صورت گسترده‌ای در صدها نوع مختلف، از شیر تهیه می‌شود. پنیر از دلمه شدن شیر، معمولاً شیر گاو، گاومیش، شتر، بز و گوسفند تهیه می‌شود (Pazzola *et al*., 2019).

نئوسپورا کانینوم، تک‌یاخته‌ای است که به‌عنوان 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 (Regidor-Cerrillo *et al*., 2020). عامل نئوسپوروزیس تک‌یاخته‌ای به نام *نئوسپورا کانینوم* بوده که از شاخه *اپی‌کمپلکسا* است. این انگل قادر است گونه‌های مختلفی از حیوانات خانگی و وحشی را آلوده کند. اگرچه در طبیعت آلودگی با آن در سگ، گاو، گوسفند و بز دیده می‌شود، ولی سگ و کایوت به‌عنوان میزبان نهایی این تک‌یاخته شناخته می‌شوند و سایر حیوانات خونگرم به‌عنوان میزبان واسط و تصادفی این انگل بوده که از طریق خوردن اووسیست‌های دفع شده از مدفوع سگ آلوده می‌شوند. اگرچه وجود آنتی‌بادی علیه *نئوسپورا کانینوم* در انسان گزارش شده، ولی حضور انگل در بافت انسان گزارش نشده است؛ بنابراین جنبه زئونوز بودن این بیماری هنوز جای ابهام دارد (Anvari *et al*., 2020, Li *et al*., 2020).

مشخصات ریخت‌شناسی و پاتوژنز انگل مشابهت زیادی با *توکسوپلاسما گوندی* دارد ولی از لحاظ برخی ساختارهای مولکولی و آنتی‌ژنیک متفاوت هستند. به‌دلیل ارتباط و نزدیکی بیولوژیک *نئوسپورا کانینوم* با زئونوز *توکسوپلاسما گوندی* و ایجاد عفونت تجربی در میمون رزوس احتمال زئونوتیک بودن آن نیز وجود دارد و پیش از تشخیص قطعی آن، احتمالاً به اشتباه *توکسوپلاسماگوندی* تشخیص داده می‌شد (Duarte *et al*., 2020, Ciuca *et al*., 2020).

نئوسپورا کانینوم عامل بیماری نئوسپوروز در سگ و گاو است. تشابه ساختاری *نئوسپورا کانینوم* با *توکسوپلاسماگوندی* محققان را به این فکر انداخت که سیکل مشابهی بین این دو تک‌یاخته شامل میزبانان واسط و یک میزبان نهایی گوشتخوار وجود دارد. در مطالعاتی که انجام پذیرفته، مشخص شد که میزبان نهایی این انگل، سگ، کایوت و دینگو و برخی دیگر از سگ‌سانان هستند، هم‌چنین طیف وسیعی از جانوران از جمله گاو، گوسفند، بز، اسب، الاغ، کرگدن، آهو، جوندگان، خرگوش، پرندگان و برخی دیگر از حیوانات وحشی میزبان واسط این تک‌یاخته محسوب می‌شوند (Dos Santos *et al*., 2022).

به سبب جایگزینی اختصاصی *نئوسپورا کانینوم* در مغز، نخاع و عضلات، مشاهده مستقیم انگل مشکل است، به‌همین دلیل، توسعه و پیشرفت آزمایش‌های سرولوژیک اختصاصی برای تشخیص انگل ضروری است. روش‌های مولکولی نظیر PCR، به دلیل اختصاصی بودن و حساسیت بالا از روش‌های ایمنی شناسی در تشخیص عفونت برتر می‌باشد (Barry *et al.*, 2019). هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع *نئوسپورا کانینوم* در پنیرهای سنتی تولید شده از شیر نشخوارکنندگان در استان چهارمحال و بختیاری به‌روش مولکولی است.

مواد و روش‌ها

- روش نمونه‌برداری

مطالعه حاضر از نوع توصیفی و مقطعی است که طی سال ۱۴۰۰ انجام پذیرفت. در کل ۸۶ نمونه پنیر سنتی تولید شده از شیر نشخوارکنندگان شامل ۴۲ نمونه پنیر سنتی تولید شده از شیر گاو، ۲۰ نمونه پنیر سنتی تولید شده از شیر گوسفند، ۱۲ نمونه پنیر سنتی تولید شده از شیر بز و ۱۲ نمونه پنیر گوسفندی سنتی رسیده در آب نمک از گله‌های شیری واقع در استان چهارمحال و بختیاری به‌شکل تصادفی در لوله‌های آزمایش دربدار استریل جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در شرایط سترون در کنار یخ و بلافاصله پس از نمونه‌گیری، به آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند.

-استخراج و آماده‌سازی DNA

جهت استخراج DNA، ابتدا ۱۴۴ میکرولیتر از نمونه پنیر با ۱۰۰ میکرولیتر پروتئاز بافر و ۵ میکرولیتر آنزیم پروتئاز داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط و به‌مدت ۳-۱ ثانیه ورتکس و سپس به‌مدت ۳-۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. به تیوب‌ها ۴۰۰ میکرولیتر Lysis solution اضافه و به‌مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به آن‌ها ۳۰۰ میکرولیتر Precipitation solution اضافه و پس از ۵ ثانیه ورتکس شدن، تیوب‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از آن محتویات تیوب‌ها را خالی نموده و ۱۰۰۰ میکرولیتر wash buffer به آن‌ها اضافه شد و پس از ۵-۳ ثانیه ورتکس کردن، تیوب‌ها را ۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰سانتریفیوژ و نهایتاً به محتویات قبلی اضافه شدند. محتویات داخل تیوب‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس خشک و با ۵۰ میکرولیتر از Solvent buffer مخلوط شده و به‌آرامی تکان داده شد و به‌مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس محتویات دیواره تیوب‌ها مخلوط شده و به‌مدت ۳۰ ثانیه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند که در نهایت استخراج DNA صورت گرفت. ژن Nc_5 *نئوسپورا کانینوم* طی واکنش پلیمراز زنجیره‌ای مورد شناسایی قرار گرفت. واکنش اولیه PCR شامل ۱ میکروگرم تمپلت DNA، ۲ میکرومولار $MgCl_2$، ۱۰ میکرولیتر بافر TE۱۰ واکنش PCR و ۱۰پیکومول از هر کدام از پرایمرها و ۲۰۰ میکرومولار dNTP و یک واحد آنزیم Taq پلیمراز بود (Thermo Fisher (Scientific, Germany) (Tian *et al.*, 2018). جدول (۱) مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR اولیه و nested-PCR، جهت ردیابی *نئوسپورا کنیوم* را نشان می‌دهد.

واکنش شامل ۳۵ سیکل واسرشتی در دمای ۹۵

درجه سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه به‌مدت 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 ۱۰x واکنش PCR، ۱۰ pmol از هر یک از پرایمرها، ۲۰۰ میکرومولار dNTP و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز بود (Thermo Fisher Scientific, Germany). پروسه دمایی nested-PCR مانند مرحله اول بود (Barry *et al*., 2019, Kornacka *et al*., 2018, Tian *et al*., 2018).

- الکتروفورز محصولات PCR

مقدار ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR در آگاروز ۲ درصد تهیه شده در بافر 1X TBE در ولتاژ ۹۰ ولت به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه قرار گرفت و با SYBER سبز رنگ‌آمیزی شد (Thermo Fisher Scientific Germany). تمام مراحل شامل یک نمونه کنترل منفی به‌صورت آب مقطر و یک نمونه کنترل مثبت DNA (از مرکز تحقیقات تغذیه و غذاهای ارگانیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد) تهیه شد. نمونه‌های کنترل منفی از اولین سیکل تقویت‌سازی به اضافه یک نمونه کنترل منفی از سیکل دوم وارد واکنش nested-PCR شدند (Gharekhani *et al*., 2022). کنترل مثبت تهیه گردید.

جدول (۱)- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی *نئوسپورا کانینوم* در واکنش nested-PCR

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

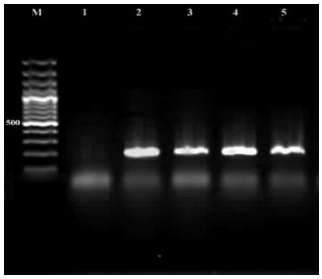
- آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار IBM SPSS statistics v. 23 و در دو سطح توصیفی و استنباطی محاسبات صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های پارامتریک با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. بررسی تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از مربع کای و تست دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه ضریب اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

شکل (۱) الکتروفورز برای ردیابی *نئوسپورا* nested-PCR محصولات واکنش کانینوم در نمونه‌های پنیر سنتی تولید شده از شیر نشخوارکنندگان را نشان می‌دهد. جدول (۲) فراوانی نمونه‌های آلوده به *نئوسپورا کانینوم* را نشان می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از مجموع ۸۶ نمونه مورد بررسی با روش nested-PCR، تعداد ۸ نمونه (۹/۳ درصد) آلوده به *نئوسپورا اکانینوم* بودند. بالاترین میزان آلودگی در نمونه‌های پنیر سنتی تولید شده از شیر گاو (۱۲/۵درصد) بود و در پنیرهای سنتی تولید شده از شیر بز و پنیر گوسفندی

سنتی رسیده در آب نمک هیچ آلـودگی مشـاهده نشـد. مقایسه آلودگی در پنیرهای مختلـف نشـان داد کـه بـین هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.



شکل (۱)- الکتروفورز ردیابی *نئوسپورا* nested-PCR محصولات واکنش کنینوم در نمونه‌های پنیر سنتی تولید شده از شیر نشخوارکنندگان .ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: کنترل منفی، ستون ۳: کنترل مثبت، ستون ۴ و ۵: نمونه‌های مثبت را نشان می‌دهد.

جدول (۲)- شیوع *نئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های پنیر سنتی تولید شده از شیر نشخوارکنندگان*

نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد آلودگی به *نئوسپورا کانینوم*
گاو	۴۸	۶ (۱۴/۳)	۶ (۱۲/۵)
گوسفند	۲۲	۲ (۱۰/۰)	۲ (۹/۱)
بز	۱۲	۰ (۰/۰)	۰
پنیر گوسفندی آب نمکی	۱۲	۰ (۰/۰)	۰

*سطح معنی‌داری گاو با گوسفند ^{ns}۰/۶۳۸؛ سطح معنی‌داری گاو با بز و پنیر گوسفندی سنتی رسیده در آب نمک ^{ns} ۰/۱۶۵؛ سطح معنی‌داری گوسفند با بز و پنیر گوسفندی سنتی رسیده در آب نمک ^{ns}۰/۲۵۸

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ای به بررسی شیوع *نئوسـپورا کـانینوم* در گاوهای شیری آبستن اطـراف تهـران بـه‌روش Nested PCR پرداخته شد، کـه نتـایج مطالعـه نشـان داد شـیوع *نئوسپورا کانینوم* در گاوهای شیری آبستن اطراف تهـران میزان آلودگی بین ۱۸ تا ۶۵ درصد بـود (Salehi *et al.*, 2009)، نتایج مطالعه فوق و مطالعـه حاضـر اگرچـه تـا حدودی همسو می‌باشد اما میزان شیوع به‌دست آمـده از مطالعه حاضر میزان آلودگی کمتری را در منـاطق مـورد بررسی نسبت به تهران نشـان مـی‌دهـد. ایـن اخـتلاف، ممکن است به‌دلیل تفاوت در منطقـه جغرافیـایی، روش اندازه‌گیری و میزان کنترل سگ‌های ولگرد و تفـاوت در حجم نمونه‌ها در این دو منطقه باشـد. همچنـین ممکـن است پروسه‌های انجام شده روی شـیر بـرای تبـدیل بـه پنیر نیز در این موضوع دخیل باشد. در تحقیقی فراوانـی آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در شیر گاوهای شـهریار به‌روش الایزا بررسی شد. طبق نتایج به دست آمـده، ۲۲ درصد از نمونه‌ها از لحاظ وجود آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* مثبت اعلام شد (Taheri Lak *et al.*, 2017)، که با نتـایج حاصـل از تحقیـق حاضـر مطابقـت نـدارد. در تحقیـق مشـابهی روی بررسـی حضـور آنتی‌بـادی ضـد *نئوسـپورا کـانینوم* بـه‌روش الایـزا در گاوهـای شـیرده اصفهان، میزان آلودگی گله‌ها را بین صفر تـا ۲۴ درصـد گزارش کردنـد (Morovati and Noaman, 2017)، کـه

در مطالعه حاضر میزان آلودگی در ۸ نمونه تشخیص داده شد.

در تحقیقی همسو با مطالعه حاضر، روی آلودگی *نئوسپورا کانینوم* در شیر گزارش دادند که از مجموع ۴۴۰ نمونه شیر مورد مطالعه، ۵۴ نمونه (۲۷/۱۲ درصد) آلوده به *نئوسپورا کانینوم* بودند. شیر گاو بیشترین میزان آلودگی (۲۶ درصد) و شیر گوسفند کمترین میزان آلودگی (۴ درصد) را داشت (Alipour *et al*., 2020) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقتی نداشته و میزان آلودگی بالاتر است. 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. در بررسی‌ای روی ۲۳۷ نمونه خون از گاوداری‌های مختلف شهرستان سمنان و ۱۰۴ نمونه شیر از چهار سکوی جمع‌آوری از شهرستان‌های سمنان، گرمسار، دامغان و شاهرود تهیه و وجود آنتی بادی علیه این تک‌یاخته در آن‌ها با روش الایزا مورد بررسی قرار دادند. نشان داد که ۲۷/۸۷ درصد نمونه سرم گاوها مثبت بود (Binaei *et al*., 2021)، که بالاتر از مطالعه حاضر بود.

در مطالعه دیگری که در مصر انجام گرفت، میزان شیوع سرمی انگل *نئوسپورا کانینوم* را در جمعیت گاوها ۱۲/۱ درصد گزارش دادند (Ibrahim *et al*., 2021) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر برابر و همسو می‌باشد. مطالعه دیگری بر روی شیوع سرمی انگل *نئوسپورا کانینوم* را در گله‌های شیری مختلف کانادا ۵ تا ۲۵ درصد گزارش دادند (Haddad *et al*., 2005)، که دارای تفاوت‌هایی با مطالعه حاضر است.

در تحقیق مشابهی، شیوع سرمی انگل *نئوسپورا کانینوم* را در گله‌های شیری مناطق مختلف سوئد بین ۶ تا ۶/۵ درصد گزارش کردند (Frössling *et al*., 2005)، در حالی در مطالعه حاضر میزان آلودگی در ۸ نمونه مثبت بود. در مطالعه شیوع سرمی انگل *نئوسپورا کانینوم* در گله‌های مختلف گاوهای شیری آمریکا، گزارش دادند که از ۵ تا ۱۰ درصد و در برخی گاوداری‌ها تا بیش از نیمی از جمعیت گله آلوده بودند (Anderson *et al*., 1991) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همسو می‌باشد.

مطالعه روی آلودگی شیرهای عرضه شده در کاشان به *نئوسپورا کانینوم* نشان داد که ۱۸/۱۸ درصد نمونه‌ها آلودگی داشتند (Hadadi *et al*., 2018)، که بیشتر از مطالعه حاضر است. مطالعه‌ای روی آلودگی گله‌های گاوی از ۱۹۶ نمونه شیر در تایلند انجام شد که گزارش دادند، شیوع کلی *نئوسپورا کانینوم* در شیر گاوها ۳۶/۵ درصد بود که بین ۱۶/۷–۵۰ درصد بین مناطق مختلف متفاوت بود (Japa *et al*., 2019). مطالعه‌ای در مصر در سال ۲۰۲۲ روی آلودگی شیرهای عرضه شده به *نئوسپورا کانینوم* دریافتند که از ۱۷۱ نمونه شیر، در ۲۵/۷ درصد نمونه‌ها مثبت بود. همچنین آنتی‌بادی‌های *نوروسپورا کانینوم* در ۲۶/۲ درصد از گاوها، ۱۸/۸ درصد گاومیش‌ها، ۳۳/۳ درصد از گوسفندها، و ۱۸/۲ درصد از بزها مثبت بود (Fereig *et al*., 2022)، که اختلاف بالایی با مطالعه حاضر دارد.

از مقایسه نتایج مطالعات فوق و مطالعه حاضر می‌توان چنین برداشت کرد که میزان شیوع *نئوسپورا کانینوم* نه‌تنها در مناطق مختلف متفاوت بوده بلکه در مناطق یکسان کاملاً متغیر است. این مسئله می‌تواند

دلالت بر تأثیر فصول، آب و هـوا، منطقـه جغرافیـایی و میزان آلودگی سگ‌های ولگـرد بـر میـزان حضـور ایـن تک‌یاخته داشته باشد. بنابراین با توجه به راه‌های انتقـال آلودگی از اووسیست مدفوع سـگ‌هـا و بلـع آن توسـط میزبانان واسط از جمله گاو، باید امکان دسترسـی سـگ ها به انبار آذوغه و آب گاوها و دیگر میزبانان واسـط را محدود ساخت. میزان آلودگی در نمونـه‌هـای پنیـرهـای سنتی تولید شده از شیر گاو، گوسفند، بز به‌ترتیب ۱۲/۵ درصد، ۹/۳ و صفر درصد بوده است. سایر مطالعات نیز بالاتر بودن میـزان آلـودگی در نشـخوارکنندگان بـزرگ نسبت به نشخوارکنندگان کوچک را نشان می‌دادنـد کـه از این نظر نیز میتوان نتیجه‌گیری مشابهی داشت.

بر پایه اطلاعات نویسندگان، مطالعه حاضـر اولـین گزارش در خصوص بررسی شیوع *نئوسپورا کـانینوم* در پنیرهای سنتی تولیـد شـده از شـیر نشـخوارکنندگان در استان چهارمحال و بختیاری و در ایران می‌باشد. افزایش سقط جنـین و کـاهش تولیـد شـیر و احتمـال انتقـال از طریق شیر به انسان از جمله معضلات حاصل از آلودگی دام و محصولات دامی به *نئوسپورا کانینوم* مـی‌باشـد. از طرف دیگر با توجه به تولید فراورده‌های سـنتی شـیر از جمله تولید پنیرهای محلی حاصل از شیر خـام، اجـرای دقیق برنامه‌های کنترلی و سیاست‌های پیشـگیرانه لازم و ضروری می‌باشد. همچنین، با توجه به حضور سـگ در همه گاوداری‌های مورد مطالعه، احتمال انتقـال آلـودگی *نئوسپورا کانینوم* از طریق سگ‌های نگهبان گـاوداری‌هـا نیز وجود دارد. پیشنهاد می‌شود به منظـور جلـوگیری از انتقال و شیوع *نئوسپورا کانینوم* از طریق سگ‌ها به دام و در نهایت انسـان، اقـدامات لازم جهـت کنتـرل تـردد و چگـونگی حضـور ایـن دسـته از حیوانـات در محـیط دامداری‌ها نیـز بـه درسـتی صـورت پـذیرد. در نهایـت راه‌حلی برای پیشگیری یا بهبـود ایـن آلـودگی در پنیـر سنتی موجود نیست چرا که تیمارهای حرارتـی مناسـبی در پنیر اعمال نمی‌شود. از اینـرو، اسـتراتژی در صـنعت دامپروری بـه منظـور کـاهش شـیوع و تلفـات ناشـی از *نئوسپورا کانینوم* بر این است که دام‌های آلوده شناسـایی شده و با درمان دام دوره زندگی انگل کوتاه شـود. ایـن تک‌یاخته قادر است از طریق مصرف شیر خام و پنیر بـه دلیل عدم حرارت‌دهی بالا و بالا بودن میـزان pH سـبب بیماری‌زایی در انسان شود.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Alipour, M., Rahimi, E. *and* Shakerian, A. (2020). Investigating the prevalence of *Neospora caninum* in ruminant milk by molecular method. Scientific Journal of Veterinary Microbiology, 15**,** 101-110.
- Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B., Dubey, J., Hoffman, R. and Conrad, P.A. (1991). Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association, 198**,** 241-244.

- Anvari, D., Saberi, R., Sharif, M., Sarvi, S., Hosseini, S.A., Moosazadeh, M., *et al*. (2020). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dog population worldwide: a systematic review and meta-analysis. Acta Parasitologica, 65**,** 273-290.
- Ayazi, N., Heidarzadi, M. A., Kohneh Poushi, M., Karami, M., Sabzibalkhkanlo, A. and Gorgin Karaji, K. (2022). Investigating the amount of microbial contamination of pasteurized milk in Kermanshah city with coliform and the total number of bacteria. Journal of Alternative Veterinary Medicine, 5**,** 702-709.
- Barry, R., Nissly, R.H., Feria, W., Thirumalapura, N., Tewari, D., Jayarao, B.M. *et al*. (2019). A probe-based real-time PCR assay for the detection of *Neospora caninum* in clinical samples from cattle. Veterinary Parasitology, 269**,** 2-6.
- Binaei, M., Changizi, E. And Staji, H. (2021). A serological study of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Semnan province, Iran. Journal of Veterinary Research, 76**,** 1-7.
- Ciuca, L., Borriello, G., Bosco, A., D'andrea, L., Cringoli, G., Ciaramella, P. *et al*. (2020). Seroprevalence and clinical outcomes of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia besnoiti* infections in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). Animals, 10**,** 532.
- Dos Santos, E.O., Klain, V.F., Manrique, S.B., Roman, I.J., Dos Santos, H.F., Sangioni, L.A., *et al*. (2022). The influence of landscape structure on the occurrence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, and Sarcocystis spp. in free-living neotropical primates. Acta Parasitologica**,** 1-17.
- Duarte, P.O., Oshiro, L.M., Zimmermann, N.P., Csordas, B.G., Dourado, D.M., Barros, J.C. (2020). Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. Scientific Reports, 10**,** 1-8.
- Fereig, R.M., Abdelbaky, H.H., Mazeed, A.M., El-Alfy, E.-S., Saleh, S., Omar, M.A. *et al*. (2022). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies and DNA in raw milk of various ruminants in Egypt. Pathogens, 11**,** 1305.
- Frössling, J., Uggla, A. And Björkman, C. (2005). Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. Veterinary Parasitology, 128**,** 209-218.
- Gharekhani, J., Yakhchali, M. And Heidari, R. (2022). Molecular detection and phylogenetic analysis of *Neospora caninum* in various hosts from Iran. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 80**,** 101737.
- Hadadi, M., Sherafati, R., Delavari, M., Arbabi, M., Gilasi, H. and Abed, A. (2018). Evaluation of anti-*Neospora caninum* antibody presence in cow's milk in Kashan. KAUMS Journal (FEYZ), 22**,** 333-338.
- Haddad, J.P.A., Dohoo, I.R. and Vanleewen, J.A. (2005). A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle—a Canadian perspective. The Canadian Veterinary Journal, 46**,** 230.
- Ibrahim, H.M., Abdel-Rahman, A.A. and Bishr, N.M. (2021). Seroprevalence of *Neospora caninum* and Toxoplasma gondii IgG and IgM antibodies among buffaloes and cattle from Menoufia Province, Egypt. Journal of Parasitic Diseases, 45**,** 952-958.
- Japa, O., Nuangmek, A., Prakhammin, K. and Flynn, R.J. (2019). Prevalence of vertically transmitted *Neospora caninum* amongst beef cattle in Phayao, Thailand. Parasitology International, 70**,** 98-101.
- Kornacka, A., Cybulska, A., Popiołek, M., Kuśmierek, N. and Moskwa, B. (2018). Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in raccoons (*Procyon lotor*) from the Czech Republic, Germany and Poland. Veterinary Parasitology, 262**,** 47-50.
- Li, L., Wang, X.-C., Gong, P.-T., Zhang, N., Zhang, X., Li, S. *et al*. (2020). ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation participates in the response against *Neospora caninum* infection. Parasites and Vectors, 13**,** 1-17.
- Morovati, H. and Noaman, V. (2017). Detection of *Neospora caninum* antibodies in commercial fetal bovine serum (FBS) by ELISA. Veterinary Researches and Biological Products, 30**,** 201-205.

- Pazzola, M., Stocco, G., Dettori, M.L., Bittante, G. and Vacca, G.M. (2019). Effect of goat milk composition on cheesemaking traits and daily cheese production. Journal of Dairy Science, 102**,** 3947-3955.
- Regidor-Cerrillo, J., Horcajo, P., Ceglie, L., Schiavon, E., Ortega-Mora, L.M. and Natale, A. (2020). Genetic characterization of *Neospora caninum* from Northern Italian cattle reveals high diversity in European N. caninum populations. Parasitology Research, 119**,** 1353-1362.
- Salehi, N., Haddadzadeh, H., Ashrafihelan, J., Shayan, P. and Sadrebazzaz, A. (2009). Molecular and pathological study of bovine aborted fetuses and placenta from *Neospora caninum* infected dairy cattle. Iranian Journal of Parasitology, 4**,** 40-51.
- Taheri Lak, K., Sadraei, J. and Dalimi, A. (2017). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in milk samples from dairy farms in the Shahriyar. Veterinary Researches and Biological Products, 30**,** 142-146.
- Tian, A.-L., Elsheikha, H.M., Zhou, D.-H., Wu, Y.-D., Chen, M.-X., Wang, M. *et al*. (2018). A novel recombinase polymerase amplification (RPA) assay for the rapid isothermal detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses. Veterinary Parasitology, 258**,** 24-29.