Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 24, No. 2, Summer 2024, Pages:

Original article

Isolation and Identification of *Toxoplasma gondii* from Aborted Fetuses of Goats by PCR in Lorestan Province

Morad Beiranvand [1], Hossein Hamidinejat [1]*, Somayeh Bahrami [1], Mohammad Reza Tabandeh[2], Meysam Makki[3]

1 . Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3 . Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
*** *Corresponding author.*** Tel: +986133330073, Fax: +9806133360802, E-mail: has.hamidinejat@gmail.com

Article info

Article history:
Received: Sep 26, 2024
Accepted: Nov 2, 2024

Keywords:
Toxoplasma gondii
Zoonoses
Abortion
PCR
Iran

ABSTRACT

Background: A zoonotic obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, infects all warm-blooded animals as well as humans worldwide. Identification of the level of infection in intermediate hosts gives us an important data about understanding the role of this parasite in human health as well as estimating the economic loss in livestock. Therefore, the main aim of this study was the isolation and identification of *T. gondii* from aborted goat fetuses by PCR in Lorestan province.

Methods: From autumn 2023 to summer 2024, the brain and liver of 100 goat fetuses were examined for *T. gondii* by PCR based on the amplification of 529 base pair fragments from repetitive regions of the parasite genome. The study was performed in three aborted fetus groups, less than 2 months, 2 to 4 months and more than 4 months.

Results: From a total of 100 examined samples, conventional PCR detected the *T. gondii* infection in 6 (6%) and 2 of the brain and liver fetuses respectively.

Conclusion: This study shows a notable level of infection in goat fetuses, and as a result, *T. gondii* should be considered an important agent involved in the abortion of goats in the Lorestan province of Iran. On the other side, it is necessary to pay more attention to the risk of transmission of this parasite from farmed animals to humans, especially pregnant women and people with suppressed immune system.

How to cite this article: Beiranvand M, Hamidinejat H, Bahrami S, Tabandeh M.R, Makki M. Isolation and Identification of *Toxoplasma gondii* from Aborted Fetuses of Goats by PCR in Lorestan Province. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;24(2):

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

Extended Abstract

Background: A zoonotic obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, infects all warm-blooded animals as well as humans worldwide. Identification of the level of infection in intermediate hosts gives us an important data about understanding the role of this parasite in human health as well as estimating the economic loss in livestock. The only distinguished definitive hosts of *T. gondii* are feline specially cat. Cats shed and disperse non-sporulated oocysts through the feces in the environment. Intermediate hosts are all warm-blooded animals as well as humans and also cats. The intermediate hosts become infected in three main ways: ingestion dispersed oocysts in which sporulated in the environment, eating bradyzoites inside tissue cysts from not well- cocked meat and through the congenital transmission to the fetus. *T. gondii* causes annually a lot of economic losses in animal husbandry and livestock all over the world and these losses seem to be more increased in the last years. On the other side, toxoplasmosis affects human health especially pregnant women and immune compromised individuals. So, as such studies direct us to improve our knowledge about the prevention and control of the disease, study aimed to identify the probable role of *T. gondii* in the abortion of goats.

Methods: From autumn 2023 to summer 2024, the brain and liver of 100 goat fetuses were examined for *T. gondii* by PCR based on the amplification of 529 base pair fragments from repetitive regions of the parasite genome. The study was performed in three aborted fetus groups, less than 2 months, 2 to 4 months and more than 4 months. 50 to 100 grams of the brain and liver of aborted fetuses were separately homogenized, then 1 gram of each homogenized matter was transferred to a sterile vial. DNA of each these homogenized samples was isolated using a commercial DNA extraction kit (Sinacloon, Parstos, Iran) according to the protocol of the manufacturer of the kit. After the isolation of DNA, the presence of *T. gondii* was examined by direct PCR method to amplify the specific 529bp repetitive sequence of the parasite using TOX (TOX4, TOX5) primers. PCR was done on a total of 20 microliters including: 10 microliters of master mix (Taq DNA polymerase, $MgCL_2$, Dntp-mix of nitrogenous bases) (Pars Tos company), 0.5 microliters of each forward and reverse primers, 6 microliters of water and 3 microliters of extracted DNA with the following program: 35 cycles, 94˚C for 1 minute, 58˚C for 45 seconds and 72˚C for 1 minute followed by one reaction step at 94°C for 5 minutes at the beginning of the reaction and one step at 72°C for 5 minutes at the end of the reaction. After DNA amplification by PCR, visualization of the product was done by 1.5% agarose gel using a safe stain (Sinacloon, Parstos, Iran). In all reactions, distilled water was utilized as a negative control and the extracted DNA from the tachyzoites of the parasite which was prepared in the Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, was used as a positive control.

Results: From a total of 100 examined samples, conventional PCR detected the *T. gondii* infection in 6 (6%) and 2 of the brain and liver fetuses respectively. On the other hand, the parasite was mostly identified in fetuses aged between 2 to 4 months. Positive reaction was not observed in any of the fetuses under 2 months. Although, the statistical analyses revealed the differences in the level of infection in different age groups, but those results were not significantly meaningful.

Conclusion: This study shows a notable level of infection in goat fetuses, and as a result, *T. gondii* should be considered as an important agent involved in the abortion of goats in the Lorestan province of Iran. On the other side, it is necessary to pay more attention to the risk of transmission of this parasite from farmed animals to humans, especially pregnant women and people with suppressed immune system. This parasite identified only in fetuses above months. It seems that the

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

probable reason for not observing infection in the age group less than 2 months was the absorption of infected embryos at the age of less than 60 days. Regarding the role of the age factor in the congenital transmission of *T. gondii* resulting in abortion, the results of the present study are consistent with the other studies and researches. According to the present study and other researches, the prevalence of parasite and the mode of transmission of infection in different regions, as well as different weather conditions and changing conditions of the seasons, indicate the differences in the level of contamination of aborted fetuses in different regions. One of the most important phenomena which affect the incidence of such abortions is the human nomadic life. These people move from provinces related to weather conditions of the year and can transmit agents through different distinct. This current phenomenon is usual in Lorestan province.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره بیست و چهارم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۳

مقاله اصیل

جداسازی و شناسایی *توکسوپلاسما گوندی* از جنین‌های سقط شده بز با روش PCR در استان لرستان

مراد بیرانوند[۱]، حسین حمیدی‌نجات[۱]، سمیه بهرامی[۱]، محمدرضا تابنده[۲]، میثم مکی[۳]*

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۶۱۳۳۳۳۰۰۷۳ فاکس: ۰۶۱۳۳۳۶۰۸۰۲ پست الکترونیک: has.hamidinejat@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *توکسوپلاسما گوندی* تک‌یاخته داخل سلولی اجباری زئونوز است که همه حیوانات خونگرم از جمله پستانداران، پرندگان و انسان را در سراسر دنیا آلوده می‌کند. بررسی میزان آلودگی این انگل در میزبان‌های واسط نقش مهمی در بهداشت انسانی و همچنین خسارات اقتصادی در پرورش حیوانات دارد. لذا این مطالعه با هدف شناسایی و جداسازی *توکسوپلاسما گوندی* در جنین‌های سقط شده بزهای استان لرستان انجام گرفت.

روش کار: از پاییز ۱۴۰۲ لغایت تابستان ۱۴۰۳، نمونه‌های مغز و کبد جنین سقط شده ۱۰۰ راس بز، از نظر آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* با استفاده از روش PCR بر پایه‌ی تکثیر قطعه ۵۲۹ bp نواحی پر تکرار ژنوم انگل مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه در سه گروه از جنین‌های سقط شده بز با سنین، کمتر از ۲ ماه، ۲ تا ٤ ماه و بیشتر از ٤ ماه، در استان لرستان انجام گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۱۰۰ نمونه جنین جمع‌آوری شده بزهای سقط کرده، حضور *توکسوپلاسما گوندی*، به‌ترتیب در ۶ مورد (۶٪) و ۲ مورد از مغز و کبد جنین‌ها با روش PCR مستقیم مورد تایید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: جداسازی و شناسایی انگل از جنین بزها در استان لرستان نشان دهنده آلودگی درصد قابل توجهی از بزهای استان لرستان، به این انگل می‌باشد. در نتیجه *توکسوپلاسما گوندی* باید به‌عنوان یکی از عوامل مهم سقط جنین بزها در این استان مطرح باشد. از سویی دیگر، لازم است نسبت به انتقال این انگل از حیوانات پرورشی به انسان، به ویژه زنان باردار و افراد با سیستم ایمنی ضعیف توجه بیشتری شود.

واژهای کلیدی: *توکسوپلاسما گوندی*، زئونوز، سقط، PCR ، ایران

دریافت: ۱۴۰۳/۷/۵ **پذیرش:** ۱۴۰۳/۸/۱۲

مقدمه

انگل *توکسوپلاسما گوندی*[1]، تک‌یاخته زئونوز داخل سلولی اجباری مهم از شاخه آپی‌کمپلکسا[2] می‌باشد که قادر است همه مهره‌داران خون‌گرم از جمله پستانداران، پرندگان و انسان را در سراسر جهان آلوده نماید [۱].

[1] *Toxoplasma gondii*

[2] Apicomplexa

این مقاله تحت شرایط Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License قابل بازنشر است.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

گربه و گربه‌سانان، تنها میزبانان نهایی شناخته شده برای این انگل می‌باشند. گربه‌ها ااُسیست‌های انگل را از راه مدفوع در محیط پخش می‌کنند و نهایتاً در بدن میزبان واسط به اشکال تاکی‌زوئیت[1] و سپس برادی‌زوئیت[2] درون کیست‌های نسجی[3] در می‌آیند [۲]. این انگل بصورت سالیانه باعث ضرر و زیان اقتصادی زیادی در صنعت دامداری و دامپروری در تمام دنیا می‌گردد، همچنین با توجه به اهمیت آن در پزشکی، بخصوص ارتقای سطح سلامت عمومی جامعه، می‌توان با بکارگیری راه‌های کنترل و پیشگیری، از جمله طراحی DNA واکسن‌ها، میزان شیوع عفونت را در جمعیت‌های حیوانی و انسانی کاهش داد [۲]. انسان از طریق بلع ااُسیست‌های عفونی‌زای موجود در محیط آلوده همراه با آب و غذا، خوردن گوشت نپخته و یا خوب پخته نشده آلوده به کیست‌های انگل و همچنین آلودگی مادرزادی جنین از طریق جفت به توکسوپلاسموز مبتلا می‌گردد [۳].

مغز و کبد از مهم‌ترین اندام‌های استقرار انگل هستند. محدوده تظاهرات این بیماری در میزبانان واسط از عفونت‌های مزمن در اغلب حیوانات تا اشکال حاد و کشنده در برخی دیگر متغیر است [۳]. سقط و یا آسیب‌های جنینی از قبیل آنسفالیت، آب‌آوردگی سر و متعاقباً زایش جنین ناقص‌الخلقه از مهم‌ترین علائم بالینی بیماری در میزبانان واسط (انسان، گوسفند و بز) می‌باشند. توکسوپلاسموز در افراد دارای نقص سیستم ایمنی منجر به آنسفالیت‌های کشنده می‌گردد [٤].

در ایران میزان بالایی از بروز سقط و ضررهای اقتصادی ناشی از مرگ و میر بره‌ها و بزغاله‌ها و هم‌چنین از دست دادن شیر و تولیدات دامی ناشی از توکسوپلاسموز در گوسفندان و بزها دیده شده است ولی با این وجود تخمین ضایعات در بزغاله‌ها به‌علت توکسوپلاسموز، کار مشکلی است [۵]. جذب جنین، مومیایی شدن، سقط، مرده‌زایی و یا تولد بره زنده بستگی به مرحله آبستنی دام و دز عفونی آلوده کننده دارد [۵،۱]. به نظر می‌رسد در بزها، توکسوپلاسموز نشانه‌های جدی‌تری نسبت به گوسفند ایجاد نماید [۵،۲]. تب و مرگ و میر در بزهای بالغ در اثر توکسوپلاسموز حاد دیده می‌شود. سقط نیز یکی از عوارض این بیماری در بز است با توجه به اینکه مشاهده می‌شود در بزها، کمتر از ۲ هفته پس از آلودگی توکسوپلاسمایی یعنی قبل از این که انگل به جفت برسد سقط اتفاق می‌افتد اعتقاد بر این است که یکی از مهمترین علل مرگ جنین در این بزها تب است. علاوه بر این، تغییرات هورمونی (به‌هم خوردن تعادل هورمون‌های بدن) در سایر بزها مانند میش‌ها می‌تواند علت سقط باشد [۵،۲]. از روش آزمایش مدفوع برای بررسی آلودگی به مرحله درون روده‌ای گربه‌ها استفاده می‌گردد [۵]. امروزه از روش‌های آزمایشگاهی مبتنی بر مولکولی توسعه‌یافته و بیوسنتز و همچنین روش‌های تشخیص سریع با نتایج بالا در مدت زمان کوتاه برای تشخیص *عفونت توکسوپلاسما گوندی*، مورد توجه است [۶]. تشخیص این بیماری بصورت مستقیم، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی و براساس روش‌های سرولوژیکی، مولکولی، بیولوژیکی، هیستوپاتولوژی و یا ترکیبی از آن‌ها صورت می‌گیرد [۷] در سال‌های اخیر تأکید زیادی روی آنالیز جدایه‌های *توکسوپلاسما گوندی* و اهمیت آن‌ها در ایجاد بیماری شده، به‌طوریکه مدارک زیادی در مورد ارتباط بین تیپ سویه و نتیجه بیماری ناشی از آن به‌دست آمده است [۸]. *با توجه به اینکه توکسوپلاسما گوندی* یکی از انگل‌های زئونوز بوده و بصورت سالیانه باعث ضرر و زیان‌های اقتصادی زیادی در صنعت دامداری ودامپروری می‌شود و همچنین با توجه به اهمیت آن در پزشکی، بخصوص ارتقای سطح سلامت عمومی جامعه و جهت دست‌یابی به راه‌های کنترل و پیشگیری، از جمله طراحی DNA واکسن‌ها (کاهش میزان شیوع عفونت

[1] Tachyzoite
[2] Bradyzoite
[3] Tissue Cysts

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

در جمعیت‌های حیوانی و انسانی) و همچنین با توجه به اینکه بر اساس بررسی داده‌ها تاکنون مطالعه مولکولی‌ای برای جداسازی و شناسایی این انگل از جنین‌های سقط شده بز در استان لرستان انجام نشده است، لذا این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی *توکسوپلاسما گوندی* از جنین‌سقط شده بز در این استان که دارای تعداد زیادی بز است (بیش از یک میلیون و چهارصد هزار راس) انجام گردید تا زمینه انجام مطالعات بعدی جهت کنترل و مبارزه با این انگل را فراهم نماید.

روش کار

در این تحقیق که به صورت مطالعه مقطعی[1] صورت گرفته است، از پاییز ۱۴۰۲ لغایت تابستان ۱۴۰۳ تعداد ۱۰۰ نمونه جنین‌های سقط شده بز از دامداری‌ها و درمانگاه‌های دام (در مواردی از سقط که مادر آنها مشخص و از نظر بالینی مورد معاینه قرار گرفتند) در سه گروه کمتر از ۲ ماه، ۲ تا ٤ ماه و بیشتر از ٤ ماه در استان لرستان (خرم‌آباد، بروجرد، الیگودرز، پلدختر و کوهدشت) واقع در جنوب‌غربی ایران، به روش PCR جداسازی و شناسایی شدند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، جهت آزمایش‌های تکمیلی در دمای -20^{0C} نگهداری و سپس به‌منظور جداسازی و شناسایی انگل و نهایتاً ارزیابی‌های مولکولی به آزمایشگاه انگل شناسی انتقال داده شدند.

پس از نمونه‌گیری، به‌منظور تخمین سن جنین، از فرمول ریچاردسون[2] استفاده گردید. در این فرمول، طول بدن جنین از راس سر تا برجستگی دم در نظر گرفته می‌شود [۹] (شکل ۱ و ۲).

طول بدن: X

سن جنین به روز: Y

$Y = 2.1\ (17+X)$

[1] Cross-sectional Study
[2] Richardson

شکل ۱. (جنین ۲ تا ٤ ماه)
Y=2.1(17+24.5)= 87

شکل ۲. (جنین کمتر از۲ ماه)
Y=2.1(17+8)= 52

استخراج DNA از نمونه‌جنین‌های سقط شده بز با روشPCR

با توجه به انتشار ناهمگون کیست در بافت مغز و کبد، به‌منظور افزایش احتمال شناسایی انگل، مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ گرم از این بافت‌ها به‌صورت مجزا درون هاون چینی له و هموژنیزه گردید، سپس حدود ۱ گرم از هر نمونه هموژنیزه شده به ویال استریل منتقل گشته و درنهایت جداسازی DNA از بافت جنین‌های سقط شده با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA (سیناکلون، پارس‌توس ایران) و طبق پروتکل شرکت سازنده کیت، صورت پذیرفت [۱].

آزمون PCR به‌منظور تشخیص *توکسوپلاسما گوندی*

پس از جداسازی DNA، کلیه نمونه‌های مورد نظر، برای شناسایی حضور *توکسوپلاسما گوندی* با روش PCR مستقیم برای تکثیر توالی تکراری 529bp[3] اختصاصی این انگل با استفاده از پرایمرهای TOX

[1] Base Pair

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

(TOX4 و TOX5) انجام پذیرفت [۱۰]. برای کنترل مثبت DNA تهیه شده از تاکی زوئیت انگل موجود در بخش انگل شناسی دانشکده دامپزشکی و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

TOX4:
CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG
TOX5:
CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT

PCR بر روی ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (Taq DNA polymerase، MgCL2، مخلوط Dntp[1]- بازهای نیتروژن‌دار) (شرکت پارس توس)، پرایمر R و F (پیش‌ران و پس‌ران) هر کدام ۰/۵میکرولیتر، ۶ میکرولیتر آب و ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده، در مجموع ۲۰ میکرولیتر، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD آمریکا) با برنامه ذیل انجام گرفت:

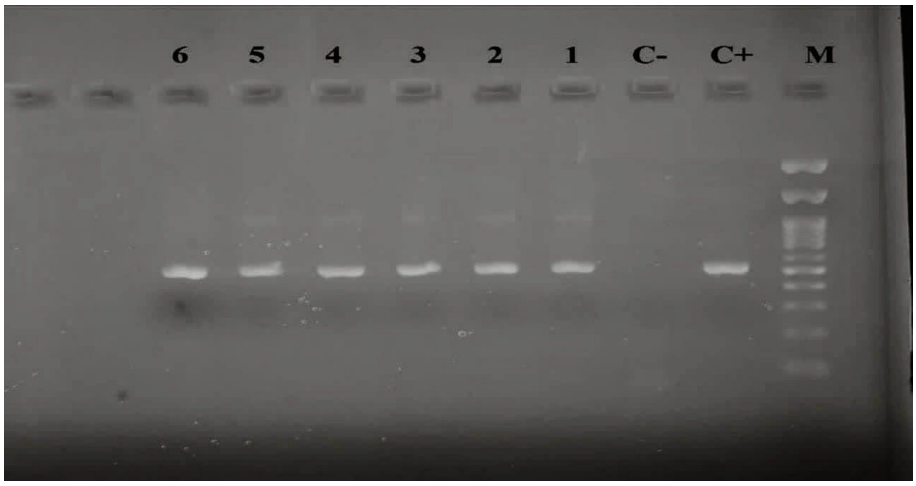
۳۵ چرخه، ۹٤°C به‌مدت ۱ دقیقه، ۵۸°C به‌مدت ٤۵ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۱ دقیقه. یک مرحله واکنش در دمای ۹٤°C به‌مدت ۵ دقیقه در ابتدای واکنش و یک مرحله در دمای ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه در انتهای واکنش. پس از تکثیر DNA با PCR، جهت رویت محصول، از ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از رنگ بی‌خطر استفاده شد. در تمام واکنش‌ها از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی و از DNA تهیه شده از تاکی‌زوئیت انگل موجود در بخش انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۹] (شکل ۳ و٤). در این مطالعه جهت آنالیز آماری از روش آماری مربع کای استفاده شد.

یافته‌ها

از مجموع ۱۰۰ نمونه مغز جنین جمع‌آوری شده، در ۶ مورد (۶٪) حضور انگل با روش PCR شناسایی شد. همچنین از نمونه‌های مثبت در ۲ مورد (۳۳/۳۳٪) کبد نیز این انگل شناسایی گردید. بررسی‌های انجام شده نشان داد که از تعداد ٤۲ نمونه جمع‌آوری شده در فصل پاییز، ۳ مورد (۷/۱٤٪) و از تعداد ۳۸ نمونه جمع‌آوری شده در فصل زمستان، ۲ مورد (۵/۲۶٪) و از تعداد ۱۵ نمونه جمع‌آوری شده در فصل بهار، ۱ مورد (۶/۶۶٪) انگل شناسایی گردید. در تعداد ۵ نمونه جمع‌آوری شده در تابستان، هیچ واکنش مثبتی در PCR مشاهده نشد. همچنین در بین گروه‌های سنی مورد مطالعه، بیشترین آلودگی مربوط به گروه سنی بیشتر از ٤ ماه و ۲-٤ ماه بود، بطوریکه از تعداد ۲۲ جنین (پاییز۷- زمستان۹ – بهار٤ و تابستان۲ نمونه) با سن بیشتر از ٤ ماه، ۲ مورد (۹٪) و از تعداد ۷٤ جنین (پاییز۳۳- زمستان۳۰ و بهار ۱۱ نمونه) با سن ۲ تا ٤ ماهگی ٤ مورد (۵/٤٪) آلودگی در PCR تشخیص داده شد. این در حالی است که در هیچ یک از ٤ نمونه جنین‌های زیر ۲ ماه (پاییز۲ و زمستان ۲ نمونه) آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* واکنش مثبتی در PCR مشاهده نشد. بیشترین موارد مثبت در شهرستان خرم‌آباد و پلدختر جداسازی و شناسایی گردید و در شهرستان کوهدشت نمونه مثبتی شناسایی نگردید (جدول ۲ و ۳)، (نمودار ۱، ۲ و ۳).

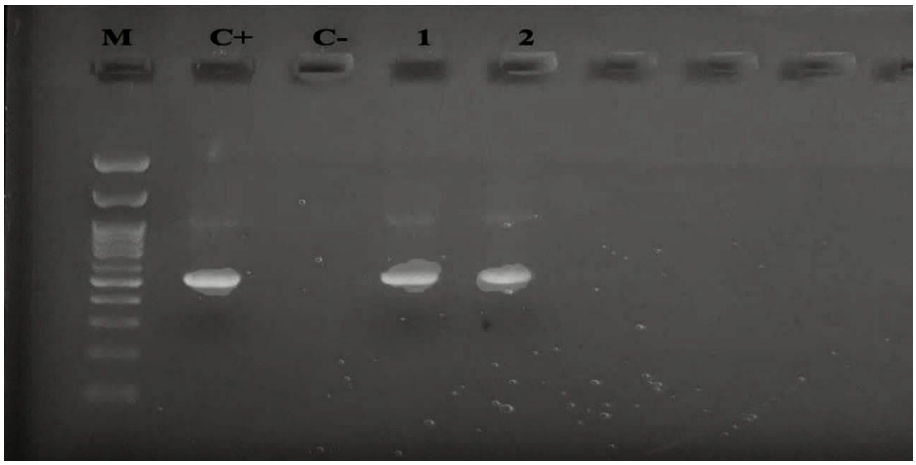
[1] Deoxynucleotides

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]



شکل ۳. تشکیل باند DNA *توکسوپلاسما گوندی* روی ژل آگاروز

M: مارکراستاندارد 100bp DNA، C+ کنترل مثبت، C- کنترل منفی، نمونه‌های ۱ تا ۶ نمونه مثبت مغز



شکل ٤. تشکیل باند DNA *توکسوپلاسما گوندی* روی ژل آگاروز

M: مارکراستاندارد 100bp DNA، C+ کنترل مثبت، C- کنترل منفی، نمونه‌های ۱و۲ نمونه کبد مثبت

جدول ۱. خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق [۱۱]

نام ژن	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر
Tox	۵۲۹	TOX4:CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG TOX5:CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT

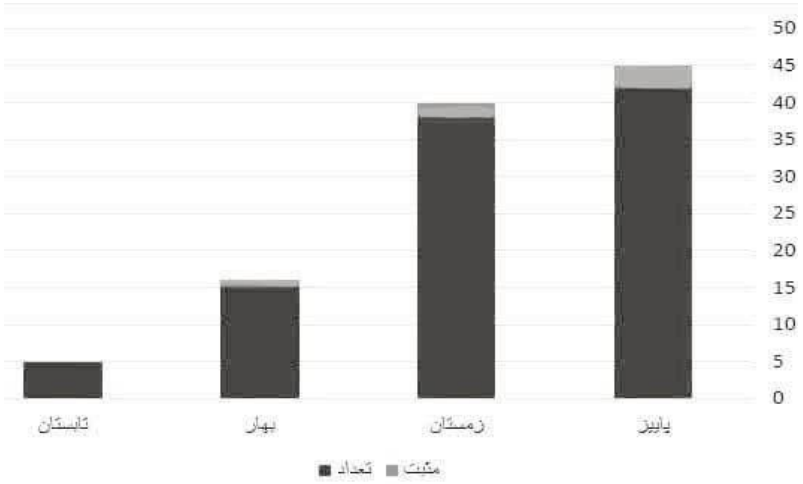
جدول ۲. تعداد نمونه‌ها و نتایج در این تحقیق براساس فصل و سن جنین در لرستان

فصل	تعداد کل نمونه	کمتر از ۲ ماه			۲-٤ ماه			بیشتر از ٤ ماه			جمع نمونه‌های مثبت		درصد آلودگی
		تعداد نمونه	مثبت		تعداد نمونه	مثبت		تعداد نمونه	مثبت				
			مغز	کبد		مغز	کبد		مغز	کبد	مغز	کبد	
پاییز	٤۲	۲	۰	۰	۳۰	۲	۱	۱۰	۱	۰	۳	۱	۷/۱٤
زمستان	۳۸	۲	۰	۰	۳۰	۱	۰	۶	۱	۰	۲	۱	۵/۲۶
بهار	۱۵	۰	۰	۰	۱۱	۱	۱	٤	۰	۰	۱	۰	۶/۶۶
تابستان	۵	۰	۰	۰	۳		۰	۲	۰	۰		۰	۰
جمع	۱۰۰	٤	۰	۰	۷٤	٤	۲	۲۲	۲	۰	۶	۲	۶

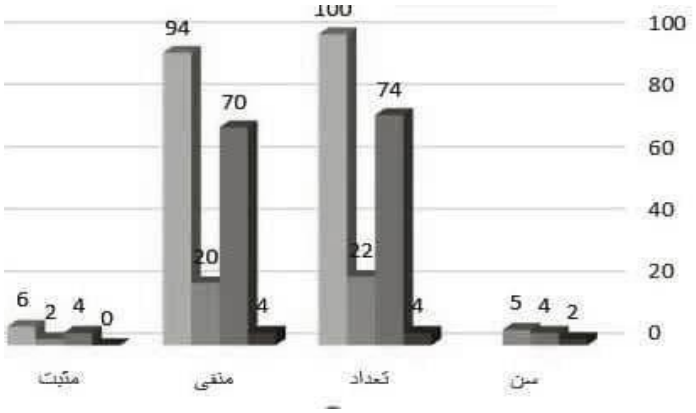
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

جدول ۳. تعداد نمونه‌ها و نتایج در این تحقیق براساس شهرستان‌های لرستان

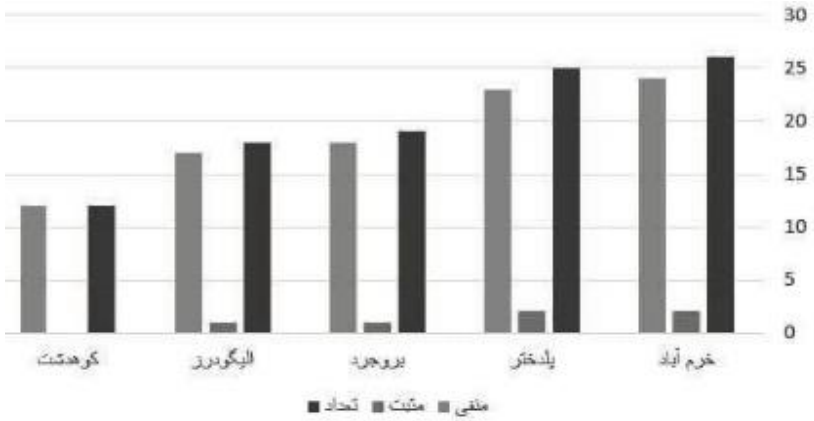
شهرستان	خرم آباد	بروجرد	الیگودرز	پلدختر	کوهدشت	جمع
تعداد نمونه	۲۶	۱۹	۱۸	۲۵	۱۲	۱۰۰
نمونه مثبت مغز٪	۲ (٪ ۷/۷)	۱(٪ ۵/۲۶)	۱ (٪ ۵/۵۶)	۲ (٪۸)	۰	۶ (٪۶)
نمونه مثبت کبد٪	۱ (٪۵۰)	۰	۰	۱ (٪۵۰)	۰	۲ (٪ ۳۳/۳۳)



نمودار ۱. نتایج نمونه‌ها بر اساس فصل نمونه‌گیری در استان لرستان



نمودار ۲. نتایج نمونه‌ها بر اساس سن جنین در استان لرستان



نمودار ۳. نتایج نمونه‌ها بر اساس شهرستان‌های استان لرستان

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

آنالیز آماری نتایج این مطالعه نشان می‌دهد علی‌رغم اختلاف در نتایج حاصله، اما این اختلاف میزان آلودگی جنین بزها در فصول و گروه‌های سنی معنی‌دار نبود.

بحث

توکسوپلاسموز یکی از عوامل مهم سقط در بزها در دنیا می‌باشد. آلودگی به این انگل در بین جانوران خونگرم رایج است. بیشتر مطالعات شناسایی و شیوع *توکسوپلاسما گوندی* بر اساس آزمون‌های سرولوژیکی در سراسر جهان انجام شده است. شیوع سرمی توکسوپلاسموز در گوسفند و بز از ۳ درصد در پاکستان تا ۹۲ درصد در فرانسه متغیر است [٤].

سقط جنین احتمالاً در نتیجه عفونی شدن بزها در اواسط آبستنی (۹۰-۶۰ روزگی) اتفاق می‌افتد. شدت عفونت وابسته به مرحله‌ای از آبستنی است که بزها عفونی می‌شوند [۵،۱].

به‌نظر می‌رسد در بزها، توکسوپلاسموز نشانه‌های جدی‌تری نسبت به گوسفند ایجاد نماید. تب و مرگ و میر در بزهای بالغ در اثر توکسوپلاسموز حاد دیده می‌شود. سقط نیز یکی از عوارض این بیماری در بز است. با توجه به اینکه مشاهده می‌شود در بزها، کمتر از ۲ هفته پس از آلودگی توکسوپلاسمایی یعنی قبل از این که انگل به جفت برسد سقط اتفاق می‌افتد، اعتقاد بر این است که یکی از مهمترین علل مرگ جنین در این بزها تب می‌باشد. علاوه بر این، تغییرات هورمونی در سایر بزها مانند میش‌ها می‌تواند علت سقط باشد [۵،۱]. بدنبال آلودگی بزها در طول اولین دوره آبستنی، تاکی‌زوئیت جفت را مورد حمله قرارداده و باعث تورم جفت همراه با تب می‌شود. شناسایی این انگل از این جهت که عامل سقط جنین در میزبان واسط (بز،گوسفند و انسان) است و همچنین باعث ضرر و زیان اقتصادی در صنعت دامداری و نیز آلودگی در انسان می‌شود دارای اهمیت است [۱۲].

مطالعه حاضر به‌عنوان اولین اقدام برای شناسایی و جداسازی *توکسوپلاسما گوندی* در جنین‌های سقط شده بزها در استان لرستان صورت گرفته تا بتوان زمینه انجام مطالعات بعدی جهت کنترل و مبارزه و پیشگیری از این انگل را در جمعیت انسانی و حیوانی فراهم نمود.

تخمین خسارت اقتصادی ناشی از توکسوپلاسموز بسیار سخت و دشوار است، زیرا علاوه بر سقط‌جنین در مراحل پایان آبستنی، این انگل می‌تواند منجر به از دست دادن جنین در مراحل اولیه آبستنی در بز گردد که معمولاً قابل شناسایی نیست. در انگلستان خسارت سالیانه ناشی از سقط جنین و مرده‌زایی بالغ بر ۱۲/۵ میلیارد یورو تخمین زده می‌شود [۱۲]. با توجه به عدم درمان دام‌های آلوده، کنترل آلودگی در میزبان واسط به‌خصوص دام‌های تولیدکننده گوشت از طریق مبارزه با میزبان نهایی (گربه‌های ولگرد) و جلوگیری از ورود آنها به مزارع پرورش دام، تشخیص سریع و دقیق آلودگی، اتخاذ تدابیر کنترلی مناسب به‌منظور کاهش خسارت اقتصادی ناشی از آلودگی در سال‌های بعد را امکان پذیر می‌کند. عواملی از جمله، دسترسی آسان گربه‌های خانگی به محیط بیرونی، تعداد زیاد گربه‌ها و گربه‌سانان وحشی و همراه شدن با روش‌های گسترده مدیریت حیوانات اهلی ممکن است شرایط مطلوبی برای افزایش آلودگی تصادفی گربه‌ها و متعاقباً میزبانان واسط را فراهم کند [۱۲].

در برزیل با جدا کردن انگل از مغز جنین‌های سقط‌شده بز، گزارش کردند که *توکسوپلاسما گوندی* به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل سقط جنین بزها می‌باشد [۱۳]. مهمترین راه‌های آلودگی انسان به این انگل، خوردن گوشت‌های نپخته و یا نیم پخته آلوده به کیست‌های بافتی و یا آب و غذای آلوده با اُاُسیست‌ها و نیز خوردن اتفاقی اُاُسیست‌های موجود در محیط اطراف به همراه انتقال مادرزادی می‌باشد. خوردن

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

گوشت و امعا و احشای نیم‌پخته بره‌ها و بزغاله‌ها می‌تواند به‌عنوان یک منبع مهم عفونت برای انسان به ویژه زنان باردار و افراد واجد نقص ایمنی مطرح باشد [۱۳]. تشخیص توکسوپلاسموز عمدتاً بر پایه روش‌های سرولوژیکی، مولکولی، بیولوژیکی، هیستوپاتولوژی، بصورت مستقیم، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی و یا ترکیبی از آن‌ها صورت می‌گیرد [۱٤]. با توجه به اینکه استفاده از روش‌های مرسوم جهت شناسایی و جداسازی این انگل، وقت‌گیر بوده و نیز نیاز به رشد انگل دارند و احتمال از دست رفتن نمونه‌ها در زمان کشت انگل و یا تزریق آن به موش وجود دارد، استفاده از روش مستقیم روی نمونه‌های کلینیکی مفیدتر و کارآمدتر است [۱۵]. امروزه برای شناسایی اولیه DNA انگل از ژن ۵۲۹bp (۲۰۰ تا ۳۰۰ تکرار ژنوم) که در حدود ۱۰ تا ۱۰۰ برابر حساس‌تر از توالی‌های ژن B1 می‌باشد، استفاده می‌کنند [۱۶]. به‌منظور بررسی شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در شیر خام در برخی از مناطق ایران، تعداد ٤٤۰ نمونه شیر خام ۵ گونه دام (گوسفند، بز، گاو، گاومیش و شتر) طی چهار فصل سال از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، خوزستان و فارس جمع‌آوری و از نظر حضور *توکسوپلاسما گوندی* به‌روش واکنش PCR-nested مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج این مطالعه نشان داده است که شیوع آلودگی در فصل زمستان (۱۱/٤۳٪)، در پاییز (۶/۸٪) و در بهار (۵/۰۳٪) می‌باشد، در حالی‌که هیچ‌یک از نمونه‌های اخذشده در تابستان به این انگل آلوده نبوده‌اند [۱۷].

با توجه به مطالعات انجام شده، شیوع سرمی توکسوپلاسموز در نقاط مختلف ایران، به‌ترتیب در گوسفند، ۳۵-۱۳/۸، بز ۳۰-۱۳/۱، گاو ۱۶-۰، گاومیش ۱۰/۸- ٤/۷ و اسب ۱۱/۵ درصد گزارش شده است [۱۸].

موذنی و همکاران در استان آذربایجان شرقی، با بررسی سرولوژی و مولکولی از مجموع ۱۸۶ سرم، ۱۳ مغز جنین، ۱۳ کوتیلدون و ۳٤ نمونه خون کامل از گوسفند و بز بترتیب ۶۹، ۲۳ و ۱٤/۷ درصد (گوسفند ۲۷/٤ و بز ۲۳/٤ درصد) گزارش کردند و پس از تعیین ژنوتیپ، فقط سویه تیپI جدا شد [۱۹].

بحرینی و همکاران در کشتارگاه‌های کرمان با بررسی سرولوژی و عیار آنتی‌بادی، در مجموع ۱۳٤۰ نمونه خون از ۵۶۲ راس گوسفند و ۷۷۸ راس بز را مورد بررسی قرار دادند و گزارش آنها حاکی از آلودگی به‌ترتیب، ۲٤/۷ و ۱۵/۸ درصد به *توکسوپلاسما گوندی* و احتمال انتقال آلودگی از طریق گوشت و امعا و احشای نپخته و نیم‌پخته این حیوانات بوده است [۲۰]. در یک تحقیق توسط فیروزه و همکاران، با بررسی سرولوژی تعداد ۲۹۶ جنین دام (شامل ۱۶۸ گوسفند و ۱۲۸ بز) از کشتارگاه قوچان، آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* به‌ترتیب ۱۰/۶ و ۲٤/۸ درصد گزارش گردید [۲۱].

تاجیلا و همکاران در سال ۲۰۱۹ در بنگلادش از ۵۲ مزرعه پرورش بز تعداد ۲۰ جنین سقط شده را جمع‌آوری و به روش PCR توانستند انگل *توکسوپلاسما گوندی* را از ۳۵ درصد نمونه‌ها (مغز، کبد و جفت) جدا کنند و عفونت *توکسوپلاسما گوندی* را یکی از عوامل مهم سقط جنین در بزها گزارش کردند [۲۲].

ارتباط بین عفونت *توکسوپلاسما گوندی* و سقط جنین را می‌توان از طریق بالینی بررسی نمود. یک مطالعه با هدف توصیف شیوع سقط جنین ناشی از *توکسوپلاسما گوندی* در یک گله بز در ایالت ریودوژانیرو برزیل انجام شد. در معاینه بافت شناسی بعد از کالبدگشایی، آنسفالیت نکروزان و میوزیت لنفوپلاسمیتیک در جنین‌های بز مشاهده شد. بنابراین *توکسوپلاسما گوندی* را می‌توان جزو عوامل مهم سقط جنین در بزها در منطقه جنوب شرقی برزیل قرار داد. شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در بزها در برزیل بین ۱۱/٤ تا ٤۰/۷ درصد می‌باشد [۲۳].

جلالی‌منفرد و همکاران میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در میزبانان واسط نشخوارکننده را مورد

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

بررسی و به‌ترتیب، در گوسفند (۳۳٪)، بز (۲۱٪) و گاو (۸/۹٪) گزارش نموده‌اند [۲۴]. توسلی و همکاران در آذربایجان غربی با مقایسه میزان آلودگی توکسوپلاسموز بین گوسفندان و بزها، بیشترین آلودگی *توکسوپلاسما گوندی* را در گوسفند مشاهده کردند [۲۵]. نورمحمدی و همکاران، طی یک مطالعه مولکولی روی ۱۴۲ نمونه مغز و کبد جنین‌های سقط‌شده گوسفند در استان لرستان و خوزستان، توانستند با استفاده از روش PCR مستقیم در مجموع حضور *توکسوپلاسما گوندی* را در ۷ درصد نمونه‌ها، شناسایی و جداسازی نمایند [۲۶].

پاسکاردو و همکاران پس از مطالعه و بررسی جنین‌های سقط شده بزها در برزیل به روش PCR گزارش کردند که یکی از عوامل سقط جنین بزها در برزیل انگل *توکسوپلاسما گوندی* می‌باشد [۲۷]. طی یک مطالعه در شمال اسپانیا از ۴۵ جنین سقط شده که تعیین سن شده بودند ۹ نمونه که طول آنها بیش از ۱۶ سانتیمتر (سن ۲ تا ۴ ماه) بود آلودگی مشاهده شد [۲۸].

تفاوت در میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در نواحی مختلف ایران، احتمالا ناشی از تفاوت در شرایط آب و هوایی، فراوانی گربه‌ها، نحوه مدیریت گله و همچنین روش‌های تشخیصی است که در این بین، تفاوت در روش تشخیصی از اهمیت بیشتری برخوردار است. در استان لرستان با توجه به وجود مراتع فراوان، شرایط آب و هوایی مناسب در اکثر فصول سال (جهت اسپورولوله شدن و بقای اُآسیست)، رونق پرورش دام به‌شکل سنتی (روستایی و عشایری) و همچنین فراوانی مخازن حیوانی (گربه‌های ولگرد و تراکم دام‌های اهلی در واحد سطح) شرایط را برای گسترش بالای آلودگی فراهم کرده است. در این میان، به‌نظر می‌رسد جابه‌جایی عشایر کوچ‌کننده نقش مهمی در جابه‌جایی آلودگی و پیچیده نمودن بررسی‌های اپیدمیولوژیک دارند. گرم‌تر شدن کره زمین در سال‌های اخیر نیز می‌تواند از عواملی باشد که در آینده نقش این‌گونه آلودگی‌ها را در سلامت انسان و حیوان پررنگ‌تر نماید.

با اینکه این بررسی واجد یافته‌های مهمی در ارتباط با *توکسوپلاسما گوندی* در استان لرستان بوده است، اما در عین حال، محدودیت‌هایی نظیر سختی امکان دسترسی به مناطق صعب‌العبور، مشکل ردیابی جنین‌های سقط شده، عدم همکاری برخی از دامداران و محدود بودن هزینه‌های پژوهش سبب سختی کار بوده است. در این تحقیق سعی گردید تا حد امکان این محدودیت‌ها و مشکلات کاهش پیدا کنند، اما با توجه به اینکه این محدودیت‌ها همواره وجود دارند، این پژوهش گامی اساسی به‌سوی پژوهش‌های آتی با رفع هرچه بیشتر مشکلات بوده است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که میزان انتقال انگل از طریق جفت در بزهای این ناحیه، قابل توجه است و *توکسوپلاسما گوندی* می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل پاتوژن مهم در سقط جنین بزها مطرح باشد. از طرفی این انگل بیشتر از جنین‌های با سن ۲ تا ۴ ماهه جدا گردید و در هیچ یک از جنین‌های زیر ۲ ماه مشاهده نشد. هر چند که آنالیز آماری نشان داد اختلاف میزان آلودگی در گروه‌های سنی مختلف معنی‌دار نیست، اما به نظر می‌رسد علت عدم مشاهده آلودگی در گروه سنی کمتر از ۲ ماه، جذب جنین‌های آلوده در سنین کمتر از ۶۰ روزه باشد. در ارتباط با نقش فاکتور سن در انتقال مادرزادی *توکسوپلاسما گوندی*، نتایج مطالعه حاضر با مطالعات و تحقیقات انجام شده مطابقت دارد.

با توجه به مطالعه و تحقیقات حاضر، شیوع اپیدمیولوژی انگل و راه‌های انتقال آلودگی در مناطق مختلف، همچنین شرایط متفاوت آب و هوایی و تغییر شرایط فصول سال، نشان دهنده تفاوت میزان آلودگی جنین‌های سقط شده در مناطق مختلف می‌باشد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

تشکر و قدردانی

این‌مقاله از پایان‌نامه دکتـرای تخصصـی انگـل‌شناسـی دامپزشکی مصوب گروه پـاتوبیولوژی دانشـگاه شـهید چمران اهواز استخراج شده است. نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌دلیـل تامین هزینه‌های تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009; 39(8):895-901.
2- Dubey JP. Toxoplasmosis in sheep-the last 20 years. Vet Parasitol. 2009; 163(1-2): 1-14.
3- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol.2000; 30(12-13):1217-58.
4- Mohamad A, Abu-Dalbou MA, Ababneh MM, Giadinis ND, Lafi SQ. Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). Iran J Veterinary Sci Technol. 2010; 2(2): 61-76.
5- Hamidinejat H, Goraninejad S, Ghorbanpoor M, Nabavi L, Akbarnejad F. Role of *Toxoplasma gondii* in abortion of ewes in Ahvaz (South-West Iran). Bull Vet Inst Pulawy. 2008; 52:369-71.
6- Molaei S, Dadkhah M, Fathi F. Toxoplasmosis diagnostic techniques: Current developed methods and biosensors. Talanta. 2023; 252:123828.
7- Dubey JP, Jones J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol. 2008; 38:1257-78.
8- Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? Curr Opin Microbiol. 2002; 5(4): 438-42.
9- Evans HE, and Sack, WO. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. Anat Histol Embryol. 1973; 2:11-45.
10- Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol. 2000; 30(1):69-75.
11- Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. Int J Parasitol. 2006; 36(7):841-8.
12- Gutierrez JO, Donovan J, Proctor A, Brady C, Marques PX, Worrall S, et al. Application of quantitative real-time PCR for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of ewes. J Vet Diagn Invest. 2012; 24(5):846-54.
13- Pereira GA, Brito MF, Pescador CA, Ubiali DG. *Toxoplasma gondii* induced abortions in a goat herd in Rio de Janeiro, Brazil. Ciênc Rural. 2021; 51(4):e20200568.
14- Terpsidis K, Papazahariadou MG, Taitzoglou IA, Papaioannou NG, Georgiadis MP. Theodoridis IT.*Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats. Exp Parasitol. 2009; 121(3):238-41.
15- Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. J Clin Microbiol.2001; 39(4):1566-70.
16- Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and human. 2nd Edition, Taylor and Francis group press, London. 2010; 58-173.
17- Alipour Amroabadi M, Rahimi E, Shakerian A. Seasonal and age distribution of *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected animal species and dairy samples. EJVS. 2020; 51:171-80.
18- Habibi GR, Imani AR, Gholami MR, Hablolvarid MH, Behroozikhah AM, Lotfi M. et al. Detection and identification of *Toxoplasma gondii* type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin province of Iran. Iran J Parasitol. 2012; 7(3):64-72.
19- Moazen Jula F, Nowzari N, Kavari H, Hashemzadeh Farhang H. Serological and molecular study on *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goat in Tabriz. Arch Razi Inst. 2013; 68(1):29-35.
20- Bahrieni M, Zia-Ali N, Beigzadeh M, Kamyabi H, Fasihi Harandi M. Risk factors analysis associated with seropositivity to *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Southeastern Iran using modified agglutination test (MAT). Iran J Parasitol. 2008; 3(1):38-43.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]

21- Firouzeh N, Foroughiborj H, Zia-Ali N, Tavakoli Kareshk A, Ahmadinejad M, Shafiei R. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* by serological and molecular analyzes in different sheep and goat tissues in North eastern Iran. Iran J Parasitol. 2023; 18(2):217-28.
22- Tanjila H, Abdul M, Delower H, Azizunnesa R, Monir H, Mohammad AA, et al. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in aborted fetuses of goats in Chattogram, Bangladesh. Vet World. 14(9):2386.
23- Caldeira FHB, Ubiali DG, Godoy I, Dutra V, Aguiar DM. Riet-Correa F, et al. Outbreak of caprine abortion by *Toxoplasma gondii* in Midwest Brazil. Pesq Vet Bras. 2011; 31(11):933-7.
24- Jalali Monfared L, Mostafavi N. Toxoplasmosis epidemiology in Iran: a systematic review. J Isfahan Med Sch. 2012; 176(30): 29-43. [Full text in Persian]
25- Tavassoli M, Dilmaghani M, Esmaeil nejad B, Soleimanzade A, Malekifard F. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in sheep and goat milk in northwest of Iran by PCR-RFLP. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(10):1-4.
26- Nourmohammadi M, Hamidinejat H, Goraninejad S, Tabandeh MR, Bahrami S. Genotyping of zoonotic *Toxoplasm gondii* isolated from aborted fetuses of ewes of Lorestan province Based on SAG2, SAG3 and GRA6 molecular marker. J Ardabil Univ Med Sci. 2017; 17(3):343-52. [Full text in Persian]
27- Pescador CA, Oliveira EC, Pedroso PM, Bandarra PM, Okuda LH, Corbellini LG, et al. Reproductive losses linked to Toxoplasma gondii infection in goats in southern Brazil. Pesq Vet Bras. 2007; 27:167-71.
28- Gebremedhin EZ, Abdurahaman M, Tessema TS, Tilahun G, Cox E, Goddeeris B, et al. Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption. Parasit Vectors. 2014; (7):425.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-23]