تعیین شیوع *نئوسپورا کنینوم* در جنین های سقط شده گاو های شهر کرد استان چهار محال بختیاری به روش Nested-PCR

رفعتی، ن.[*۱]، جعفریان، م.[۲].

دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۲

خلاصه

نئوسپورا کنینوم یکی از عوامل سقط جنین عفونی گاو در سرتاسر جهان به شمار می آید که سالیانه میلیون ها دلار به صنعت دامپروری خسارت وارد می کند. هدف از این مطاله تعیین شیوع آلودگی *نئوسپورا کنینوم* در جنین های سقط شده گاو در شهرستان شهرکرد، به روش Nested-PCR بود. از مجموع ۱۰۰ جنین سقط شده، ۱۱مورد آلودگی به نئوسپورا تعیین گردید. با توجه به نتایج بدست آمده بنظر می رسد نئوسپورا از عوامل مهم سقط جنین در گاو های شیری شهرکرد باشد.

واژه های کلیدی: شیوع، *نئوسپورا کنینوم*، سقط جنین، Nested-PCR، شهرکرد، چهارمحال بختیاری.

۱. دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسؤول: **nasir.rafati@gmail.com**

مقدمه

نئوسپورا کنینوم تک یاخته ای است که یکی از عوامل اصلی سقط جنین در گاو در سرتاسر جهان به شمار می آید (Dubey، ۲۰۰۳)، و می تواند طیف وسیعی از گونه های مختلف حیوانات را آلوده نماید. در طبیعت آلودگی سگ، گاو، گوسفند، بز، اسب و گوزن به این انگل دیده شده است. سگ تنها میزبان اصلی است. آلودگی به این انگل به صورت افقی و عمودی در طبیعت دیده می شود. انتقال افقی از طریق بلع اووسیت هایی که در محیط توسط میزبان نهایی دفع شده صورت می گیرد و انتقال عمودی از گاو به جنین در هنگام آبستنی رخ می دهد (Dubey،۱۹۹۹؛ Reichel و همکاران،۲۰۱۳). در ایران در سالیان اخیر گزارش های متعددی از فراوانی شیوع این انگل در نقاط مختلف صورت گرفته است. Sadrebazzaz و همکاران ،برای اولین بار آلودگی گاوان شهرستان مشهد به *نئوسپورا کنینوم* را گزارش کردند (Sadrebazzaz و همکاران،۲۰۰۴). بعد از آن ، شیوع گسترده این انگل در نقاط مختلف ایران از جمله گاوان شهرستان های سمنان، اهواز، حومه تهران، نواحی شمال کشور و غرب کشور گزارش شد (رنجبر بهادری و همکارارن،۱۳۸۹). شناسایی نئوسپروزیز در گاوان بالغ بوسیله تست الایزا،PCR، IFAT و در جنین های سقط شده بوسیله PCR و هسیتوپاتولوژی صورت می گیرد. طبق مطالعات انجام شده روش PCR یک روش اختصاصی و با حساسیت بالا برای شناسایی نئوسپروزیز در جنین های سقط شده معرفی شده است (Medina و همکاران،۲۰۰۶). هدف از این مطالعه تعیین میزان آلودگی *نئوسپورا کنینوم* در جنین های سقط شده گاوان شهرستان شهرکرد به روش Nested- PCR بوده است.

مواد و روش ها

نمونه گیری: از تاریخ اول دی ماه ۱۳۹۱ تا اول دی ماه۱۳۹۲ ، ۱۰۰جنین سقط شده به طور تصادفی و بر اساس گزارش دامداران از گاوداری های اطراف شهرکرد جمع آوری گردید. جنین ها با رعایت کامل موازین بهداشتی به سالن کالبد گشایی منتقل و بعد از باز کردن لاشه از مغز جنین ها نمونه برداری انجام گرفت. این نمونه ها تا زمان انجام آزمایشات در فریزر۲۰ – درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

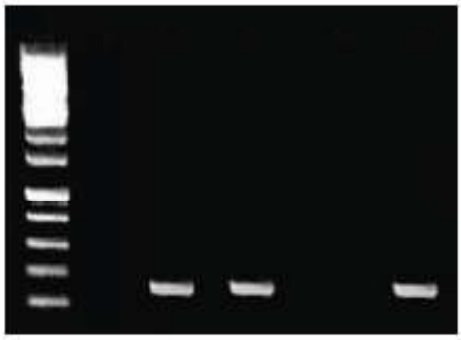
استخراج DNA: با استفاده از کیت استخراج DNA (Cinna gen, Iran) و با توجه به پروتکل کارخانه سازنده استخراج شد. DNA کل در چگالی نوری ۲۶۰ nm با توجه به روش شرح داده شده توسط Sambrook و Russell اندازه گیری شد (Sambrook و Russell ، ۲۰۰۱).

تکثیر ژن: برای تشخیص *نئوسپورا کنینوم*، با تکثیر ژن ITS1 به روش Nested- PCR و با استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتید با توالی شرح داده شده درجدول شماره ۱ انجام گرفت (Ellis و همکاران، ۱۹۹۹). به منظور انجام واکنش PCR از دستگاه Mastercycler Gradient (ساخت شرکت Eppendorf، آلمان) استفاده شد و واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر به صورت ۲۰ نانو گرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵ پیکو مول از هر پرایمر، ۱واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq و ۲۰۰ میکرومولار $Mix\ dNTP_S$ انجام گرفت. شرایط دمایی برای تکثیر ژن شامل یک سیکل حرارتی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. دو میکرولیتر ازمحصول PCR دور اول به عنوان یک الگو برای دور دوم PCR مورد استفاده قرار گرفت، که با نسبت ۱ به صد رقیق می شد. دور دوم PCR با پرایمرهای های قبلی الیگونوکلئوتید برای ۲۵ چرخه با همان غلظت از معرف ها و وضعیت دمایی انجام شد. محصولات PCR به دست آمده به میزان مساوی ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به ژل تزریق شد. ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه برای جدا سازی محصولات مورد استفاده قرار گرفت. DNA ladder ۱۰۰ جفت باز (ساخت شرکت فرمنتاس آلمان) برای تعیین طول قطعه تکثیر شده به عنوان یک مارکر با وزن مولکولی مشخص مورد استفاده قرار گرفت. در هر PCR حداقل یک نمونه واجد آب مقطر به عنوان کنترل منفی و یک نمونه آلوده به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم برماید الکتروفورز گردید و در زیر نور UV مورد مطالعه قرار گرفت و تصویر در سیستم های UVIdoc به دست آمد.

نتایج

در این مطالعه ۱۰۰ مغز جنین سقط شده گاو برای حضور انگل مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه حاصل، با توجه به پرایمر های طراحی شده پس از انجام واکنش PCR ونمایش نتایج بر روی ژل آگارز ۱٪ قطعه ای به طول ۱۴۶ جفت باز بود (تصویر ۱). DNA انگل در ۱۱ مغز از ۱۰۰ نمونه مشاهده شد.

نام پرایمر	توالی پرایمر
5'-GTCCCTCGTGGACCC-3'	NF1
5'-CATGTGGATATTTTGCA-3'	NS2
5'-AAACTCCTGGAAGTTAAAG-3'	NR1
5'-AACCTCTCTCAGAGATCG-3'	SR1



تصو رکت فرمنتاس آلمان)

خط ۱ کنترل منفی، خط۲ کنترل مثبت ،خط های ۳و۵ نمونه های مثبت و خط ۴ نمونه منفی را نشان می دهد.

بحث

هدف از این مطالعه تعیین فراوانی آلودگی *نئوسپورا کنینوم* در جنین های سقط شده گاوان به روش Nested-PCR درشهرستان شهرکرد بود. ۱۱٪ مغز جنین های سقط شده گاو ها آلوده بود. و در بررسی که بر روی جنین های سقط شده گوسفند در شهرستان تبریز انجام شد از ۷۰ نمونه دریافتی ۸/۵٪ مثبت ارزیابی شد(Asadpour و همکاران،۲۰۱۳) که با یافته ها ی این مطالعه (۱۱٪) هم خوانی دارد.

با توجه به این بررسی و سایر بررسی های صورت گرفته در سایر نقاط ایران، می توان نتیجه گرفت اگر چه میزان شیوع و گسترش انگل در بیشتر نقاط ایران کم است است، ولی خسارت اقتصادی این آلودگی بسیار زیاد است. بنا بر این اتخاذ راه های مناسب جهت کنترل انگل در گله ضروری است. با توجه به انتقال عمودی این انگل، یکی از راه های مهم جلوگیری از سقط، حذف گاوهای آلوده است. در بررسی سرولوژیکی از ۱۰۴ راس گاو شیری مبتلا به سقط جنین در شهرستان گرمسار، ۴۰ راس (۳۸,۴۵٪) دارای پادتن ضد *نئوسپورا کنینوم* بودند (رنجبربهادری و همکارارن، ۱۳۸۹). دربررسی از ۱۰۳ قلاده سگ های شهرستان تهران از نظر تعیین آلودگی به *نئوسپورا کنینوم* به روش الایزا ۲۰ مورد (۱۹,۱٪) دارای پادتن ضد *نئوسپورا کنینوم* بودند (Haddadzadeh و همکاران، ۲۰۰۷). یکی از راهکارهای مناسب جهت مقابله با شیوع و گسترش انگل، حذف میزبان نهایی از چرخه تکامل این انگل به حساب می آید. در چرخه زندگی انگل سگ به عنوان میزبان نهایی به شناخته می شود که با آلوده کردن غذا و آب سبب انتقال افقی در محیط به حساب می آید.(Dubey ، ۱۹۹۹) در بررسی که حداد زاده و همکاران در سال ۲۰۰۷ بروی سگ های شهرستان تهران به روش الایزا انجام دادند از تعداد ۱۰۳ نمونه دریافتی تعداد ۲۰ مورد دارای پادتن ضد *نئوسپورا کنینوم* بودند(Haddadzadeh و همکاران، ۲۰۰۷). که با حذف سگ های آلوده در گاوداری می توان از گسترش آلودگی افقی این انگل جلوگیری به عمل آورد.

Journal of Veterinary Laboratory Research 6 (2014) 45-50

The determination of prevalence of *Neospora caninum* in aborted fetuses in dairy cattle of Shahrekord area, Chahar Mahal Bakhtiari province, by Nested-PCR

Rafati, N.[1]*, Jaafarian, M. [2].

Received: 18.02.2014 Accepted: 23.06.2014

Abstract

Neospora caninum is one of the causes in aborted cattle in the world, accompanied with millions dollars economic loses. The aim of this study was to determine the prevalence of bovine *Neospora caninum* in aborted fetuses in shahrekord, by Nested-PCR method. Among the 100 aborted fetuses brains, 11 cases (11%) were infected. According to our results, *Neospora caninum* is one of important factors of abortion in dairy cows in Shahrekord.

Key words: Prevalence, *Neospora caninum*, Abortion, Nested-PCR, Shahrekord, Chahar Mahal Bakhtiatiri province.

1. Graduated in Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: **nasir.rafati@gmail.com**

منابع

رنجبربهادری، ش.؛ متوسلیان، ا. ؛ بکایی، س. ؛ یوسفی، م. ۱۳۸۹. بررسی سرولوژیکی نئوسپورا کنینوم در گاوهای شیری دچار سقط در شهرستان گرمسار، بیوپاتولوژی مقا یسه ای ایران، **(۲)۲**؛ ۲۴۹-۲۵۴.

Asadpour, R., Jafari-Joozani, R., Salehi, N. 2013. Detection of *Neospora caninum* in ovine abortion in Iran, J Parasit Dis, 37, 105-109

Dubey, J.P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis, Veterinary Parasitology, **84**, 349–367

Dubey, J.P. 2003. Review of *Neospora*caninum and neosporosis in animals,KoreanJournal of Parasitology,**41**,116 -118

Ellis, J.T., McMillana , D., Rycea, C. 1999. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA, International Journal for Parasitology, **29**, 89-96.

Haddadzadeh, H. R., Sadrebazzaz, A., Malmasi, A. 2007. *Seroprevalence* of *Neospora caninum* infection in dogs from rural and urban environments in Tehran, Iran, Parasitology Research, **101**,1563–1565.

Medina, L., Cruz-Va´zquez ,C., Quezada ,T. 2006. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico, Veterinary Parasitology, **136**,187–191.

Razmi, G. R., Naseri, Z., Naseri, Z . 2010.A survey of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in large dairy farms of Mashhad, Iran, Parasitology Research,**1419**,106

Reichel, M., Alejandra, P., Gondim, Luís F.P., Ellis, John T. 2013.What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – Thebillion dollar question, International Journal for Parasitology, **133**, 43 – 46.

Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual, 3rd ed, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York ,158-165

Sadrebazzaz, A., Hadadzade, H., Esmailnia, K., Habibi, G., Vojgani, M., Hashemi Fesharaki, R. 2004.

Serological prevalence of *Neospora caninum* in healthy and aborted dairy cattle in Mashhad, Iran, Veterinary Parasitology,**124**, 127-130.