DOI: 10.22092/vj.2017.109885
شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی شیوع سرمی عفونت ناشی از تک یاخته *توکسوپلاسما گوندئی* در گوسفندان مناطقی از استان اصفهان

• **مرتضی حسینی نژاد (نویسنده مسئول)**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
• **مصطفی شفاعتی فرد**
دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
•یاسر **پیرعلی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
•**حمیدرضا عزیزي**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
تاریخ دریافت: ۲۹-۰۳-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۲-۰۸-۱۳۹۵
Email: hosseininejad@gmail.com

چکیده

توکسوپلاسموز، عفونت تک‌یاخته‌ای است که منجر به ایجاد سقط جنین در حیوانات خون‌گرم و از جمله در گوسفند می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع عفونت ناشی از *توکسوپلاسما گوندئی* در گوسفندان مناطقي از استان اصفهان بود. به این منظور؛ تعداد ۳۲۰ نمونه سرمی از جمعیت مذکور تهیه و از نظر وجود پادتن‌های IGg مربوط به این تک‌یاخته با روش الایزای غیرمستقیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بررسی نشان داد ۷۳ مورد از ۳۲۰ سرم مورد بررسی (۲۲/۸۱ درصد) دارای تیتر سرمی قابل‌اندازه‌گیری ضد توکسوپلاسما گوندئی بودند. نمونه‌های مورد بررسی، بر حسب سن گوسفندان، به پنج گروه طبقه‌بندی شدند: یک تا ۱/۵ سال، از ۱/۵ تا ۲/۵ سال، از ۲/۵ تا ۳/۵ سال، از ۳/۵ تا ۴/۵ سال و پیرتر از ۴/۵ سال. شیوع سرمی ضد تک‌یاخته مذکور در این نمونه‌ها بررسی شد و نتایج بررسی به ترتیب نشان‌دهنده شیوع ۱۶/۶۶، ۱۹/۴۸، ۲۲/۰۷، ۲۵/۷۷ و ۲۵/۴۹ درصد در گروه‌های مذکور بود. بررسی آماری نشان دهنده‌ی وجود ارتباط آماری معنی‌داری بین افزایش سن و افزایش یا کاهش موارد مثبت عفونت نبود (P>۰/۰۵). نتایج بررسي نشان مي‌دهد علاوه بر شیوع نسبتا بالاي عفونت و امکان ایجاد سقط جنین در جمعیت گوسفندان، امکان انتقال بیماري به انسان از طریق مصرف گوشت و فراورده‌هاي گوشتي عمل‌آوري شده با حرارت ناکافي نیز وجود دارد.

کلمات کلیدی: گوسفند، اصفهان، *توکسوپلاسما گونده‌ای*، پلاسما

Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 92-96

Sero-Prevalence of ***Toxoplasma gondii*** Infection in Sheep in Some Parts of Isfahan Province

By: Hoseininijad, M., (Corresponding Author) Department of Sience Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Shefaatifard, M., Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Pirali, Y., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Azizi, H.R., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Received: 2016-06-18 Accepted: 2016-11-12

Email: hosseininejad@gmail.com

Toxoplasmosis is a protozoan infection causing abortion in warm-blooded animals including sheep. The aim of this study was to investigate sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* infection of sheep in some regions of Isfahan province. To do this, 320 serum samples were taken and investigated for the presence of anti-Toxoplasma gondii IgG antibodies using an indirect ELISA. Results showed that 73 out of 320 investigated samples (22.8 percent) had detectable titers of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies. The samples were then divided into five groups according to the age of animals including 1-1.5, 1.5-2.5, 2.5-3.5, 3.5-4.5 and older than 4.5 years old. Sero-prevalence of infection was 16.66, 19.48, 22.07, 25.77 and 25.49 percent in each group, respectively. Statistical analysis revealed no relationship between the age groups and seropositivity. The results of this study showed that rather than relatively high sero-prevalence of infection and possibility of abortion in sheep population, the infection may be the source of zoonotic hazard via undercooked meat products.

Keyword: Sheep, Isfahan, *Toxoplasma gondii,* ELISA

مقدمه

توكسوپلاسموز، از بيماري‌هاي شايع مشترك بين انسان و دام بوده كه داراي انتشار جهاني است. اين بيماري تك‌ياخته‌اي ناشي از فعاليت تك‌ياخته كوكسيديايي توكسوپلاسما گوندئي (*Toxoplasma gondii*) است و منجر به ايجاد سقط جنين در ميزبان‌هاي واسط، شامل انسان و حيوانات خون‌گرم از جمله در گوسفند مي‌شود. گربه‌سانان ميزبان‌هاي نهايي اين تك‌ياخته بوده و با دفع و انتشار اووسيست‌هاي انگل، نقش مهمي در گسترش آن دارند. آب و غذاي آلوده به اين اووسيست‌ها و گوشت خام آلوده به كيست‌هاي انگل به صورت افقي و آلودگي مادرزادي به صورت عمودي در اپيدميولوژي بيماري موثر هستند (۲).

در برخي از مناطق جهان، تا ۶۰ درصد از جمعيت انساني، داراي تيتر قابل اندازه‌گيري IGg ضد اين تك‌ياخته بوده‌اند كه حاكي از وجود عفونت پايدار در اين جوامع است. عفونت ناشي از اين تك‌ياخته در موارد نقص سيستم ايمني، فعال شده و باعث ايجاد بيماري‌هايي همچون مننگوانسفاليت مي‌شود (۳).

در انتقال افقي تك‌ياخته، اسپوروزوآيت‌هاي تشكيل شده در اووسيست‌هاي دفع شده توسط گربه‌سانان و يا برادي‌زوآيت‌هاي آزاد شده از كيست‌هاي بافتي از ديواره روده عبور و پس از بلعيده شدن توسط ماكروفاژها و آزاد شدن در بافت‌هاي مختلف، منجر به آسيب‌هاي سلولي، نكروز و ضايعات بافتي مي‌شوند.

بيشترين احتمال ايجاد سقط جنين ناشي از تك‌ياخته توكسوپلاسموز در گوسفند، وقتي است كه گوسفند در دو ماهگي دچار اين عفونت شود. گوسفندان آبستن طي دو هفته دچار پارازيتمي شده و تكي زوآيت‌هاي آزاد، جفت را مورد حمله قرار داده و منجر به التهاب آن مي‌شوند. بسته به مرحله‌ي آلودگي و ميزان انگل (دوز عامل عفوني آلوده كننده)، جذب جنين، عقيمي، موميايي شدن جنين، مرده‌زايي و يا تولد بره‌ي زنده‌ي آلوده اتفاق مي‌افتد. پاتوژنز دقيق سقط جنين ناشي از توكسوپلاسما به خوبي مشخص نيست و به نظر نمي‌رسد ضايعات جنيني عامل سقط باشند، چراكه در بسياري از موارد سقط جنين، ضايعات جنيني چندان شديد نيستند و در برخي موارد نيز با وجود ضايعات شديد، بره‌ها به صورت زنده متولد مي‌شوند (۴).

تشخيص عفونت ناشي از اين تك‌ياخته، بر اساس جداسازي انگل از بافت‌هاي آلوده، بررسي مولكولي با روش PCR و تست‌هاي مختلف سرولوژي از جمله روش ايمنوفلورسنت غير مستقيم (IFAT)، الايزا (ELISA) و ايمونوبلات (Immunoblotting) انجام مي‌شود. از اين ميان، روش الايزا، به دليل هزينه كمتر و امكان بررسي چندين نمونه در زمان كوتاه و حساسيت و ويژگي قابل قبول، از ارزش بالايي برخوردار است و در مورد تشخيص بيماري در حيوانات مختلف مورد استفاده قرار گرفته

است (۷).

شناسايي ميزان شيوع عفونت ناشي از تك‌ياخته‌ي توكسوپلاسما گوندئي، با توجه به اهميت سقط جنين در گله‌هاي گوسفند و تلفات و خسارات اقتصادي ناشي از آن، از اهميت بالايي برخوردار است. با توجه به عدم وجود بررسي اپيدميولوژيك در مورد آلودگي ناشي از اين تك‌ياخته در جمعيت گوسفندان در شهرستان‌هاي نجف‌آباد و خميني‌شهر استان اصفهان، اين مطالعه با روش الايزاي غيرمستقيم با استفاده از آنتي‌ژن SAG۱ انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری‌ها

نمونه‌گیری از تعداد ۳۲۰ راس گوسفند با دامنه‌ی سنی دوازده ماه و بالاتر، به صورت مطالعه توصيفي مقطعي، از شهرستان‌هاي خميني شهر و نجف‌آباد استان اصفهان انجام شد. سپس جداسازی سرم از نمونه خون اخذ شده انجام شده و نمونه‌های سرمی به دست آمده، تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگه‌داری می‌شد. سن گوسفندان بر اساس اطلاعات اخذ شده در محل گرفته و ثبت شد.

بررسی سرولوژیک

جهت بررسی سرولوژیک نمونه‌ها از نظر وجود پادتن IgG ضد تک‌یاخته‌ی توکسوپلاسما گوندئی، از یک روش الایزای طراحی شده بر مبنای یک آنتی‌ژن سطحی خالص تک‌یاخته (SAG۱) استفاده شد. به این منظور، ابتدا اقدام به فیکس کردن آنتی‌ژن خالص شده در کف گوه‌های پلیت الایزا شد. به این ترتیب که آنتی‌ژن خالص شده SAG۱ که از فراوان‌ترین و موثرترین آنتی‌ژن‌های سطحی مورد استفاده در تشخیص انگل به شمار می‌رود، در بافر بیکربنات سدیم ۰/۱ مولار (pH=۸/۳) رقیق شد. سپس آنتی pHژن رقیق شده در پلیت pHهای الایزا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک ساعت قرار گرفت. لازم به ذکر است نحوه تلخيص آنتي‌ژن SAG۱ بر اساس روشي صورت گرفت كه در پيشتر در مقاله مربوطه شرح داده شده است (۷). در مرحله بعد پلیت الایزا، سه بار با PBS-T (شامل بافر PBS به همراه شوینده Tween) شستشو داده و سپس با محلول بلاک کننده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت نیم ساعت نگهداری شد. در مرحله بعد چاهک‌ها تخلیه شد و نمونه‌های سرمی که در PBS-T و سرم اسب ۲۰ درصد به میزان ۱:۲۰۰ رقیق شده بودند، به چاهک‌ها اضافه شد. سپس اقدام به شستشوی چاهك‌ها با استفاده از محلولPBS-T شد. پس از شستشو، anti-sheep IgG کونژوگه به چاهك‌ها اضافه شد و انکوباسیون صورت گرفت. پس از آن دوباره اقدام به شستشوی چاهك‌ها با استفاده ازPBS-T شده وسوبسترا اضافه شد. پلیت‌های حاوی سوبسترا به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش ایجاد شده با استفاده از اسید سولفوریك یک نرمال متوقف و نتیجه تست‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

جهت تبدیل نتایج الایزا به اطلاعات قابل مقایسه، اقدام به محاسبه اندکس الایزا (SIn) گردید به این ترتیب که میزان جذب الایزا در مورد سرم کنترل منفی (N) از میزان جذب هر نمونه مورد آزمایش (Sn) کسر شد و مقدار به دست آمده، بر میزان جذب سرم کنترل مثبت (P) منهای میزان جذب سرم کنترل منفی (N) تقسیم شد. در واقع، فرمول محاسبه به قرار زیر بود:

$$SIn = (Sn-N)/(P-N)$$

در صورتی که اندکس به دست آمده، مقداری بیش از ۰/۱۵ بود، نمونه مورد نظر، مثبت و در صورتی که کمتر از این مقدار بود، منفی قلمداد شد. جذب نمونه‌های مثبت و منفی پیشتر با استفاده از تست فلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم ارزیابی و کالیبره شده بود. جهت این کالیبراسیون، مقادیر جذب الایزا با استفاده از منحنيROC (Receiver operating characteristic) با تست استاندارد IFAT مورد مقایسه قرار گرفته و بر اساس این تست، مقادیر cut off محاسبه شد.

بررسی آماری

نتایج به دست آمده، بر اساس سن به پنج گروه شامل گروه‌های یک تا ۱/۱۵ سال، از ۱/۵ تا ۲/۵ سال، از ۲/۵ تا ۳/۵ سال، از ۳/۵ تا ۴/۵ سال و بیشتر از ۵/۵ سال تقسیم‌بندی شدند. تعداد موارد مثبت بر اساس گروه سنی با استفاده از مربع کای و با سطح اطمینان ۹۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS۱۶ مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج بررسی نشان داد ۷۳ مورد از ۳۲۰ سرم مورد بررسی (۲۲/۸۱ درصد) دارای تیتر سرمی قابل اندازه‌گیری بر ضد توکسوپلاسما گوندئی بودند.

شیوع سرمی ضد تک‌یاخته مذکور در این نمونه‌ها بررسی شد و نتایج بررسی به ترتیب نشان دهنده شیوع ۱۶/۶۶، ۱۹/۴۸، ۲۲/۰۷، ۲۵/۷۷ و ۲۵/۴۹ درصد در گروه‌های مذکور بود. بررسی آماری نشان‌دهنده ی وجود ارتباط آماری معنی‌داری بین افزایش سن و افزایش یا کاهش موارد مثبت عفونت نبود (جدول ۱).

بحث

توكسوپلاسموز يك بيماري مشترك بين انسان و دام است كه پرندگان و انسان‌ها و تمام حيوانات خون‌گرم را در جهان تحت تاثير قرار مي‌دهد و از لحاظ اقتصادي صنعت پرورش گوسفندان را تحت تاثير قرار داده و منجر به سقط و نواقص جنيني شامل هيدروسفالي و نقص در بينايي در انسان‌ها مي‌شود. اين بيماري هم به لحاظ اقتصاد دامپروري و هم به لحاظ پتانسيل زئونوتيك داراي اهميت است. استفاده از آنتي‌ژن جداسازي شده SAG۱ در تشخيص عفونت ناشي از توكسوپلاسما گوندئي، در برخي حيوانات به كار رفته است. از جمله موارد استفاده از آن، در بررسي اين عفونت در سگ بوده است كه در سال ۲۰۰۹ انجام شده است. روش الايزا با استفاده از اين آنتي‌ژن به خوبي قادر به تفكيك گربه‌ها و موش‌هاي بيماري كه بطور تجربي آلوده به توكسوپلاسموز شده‌اند از گربه‌ها و موش‌هاي سالم مي‌باشد (۷ و ۸).

نتایج این مطالعه نشان داد، ۲۲/۸ درصد از گوسفندان مورد بررسی دارای تیتر سرمی قابل‌اندازه‌گیری توکسوپلاسما گوندئی بودند. عمده‌ی بررسی‌های پیشین انجام شده در زمینه‌ی شیوع سرمی این تک‌یاخته، نشان دهنده‌ی درصد بالای شیوع بوده‌اند. در یک مطالعه‌ی توصیفی مقطعی، جهت تعیین میزان شیوع سرمی این تک‌یاخته در سال ۱۳۸۳،

۶۳۹ نمونه‌ی سرمی از گاو، گوسفند و بز از کشتارگاه‌های استان مازندران اخذ شد. از کل نمونه‌های مورد بررسی، ۴۶۳ مورد (۷۲/۵ درصد) منفی و ۱۷۶ مورد (۲۷/۵ درصد) مثبت بودند که ۳۵ درصد از موارد مثبت به گوسفندان مورد بررسی تعلق داشت (۶).

در مطالعه‌ای دیگر که در کشتارگاه‌های استان‌های گیلان و مازندران با روش لاتکس آگلوتیناسیون انجام شد، شیوع آلودگی در گوسفند، ۳۲/۵ درصد و در بز ۱۷/۷درصد گزارش شده است. مطالعه‌ای دیگر، این درصد را با بررسی به روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و لاتکس آگلوتیناسیون، در گوسفند ۲۴/۵ درصد و در بز ۱۹/۵ درصد گزارش کرده است (۹).

در بررسی انجام شده در استان لرستان، تعداد ۷۶۰ نمونه خون مربوط به ۱۷۴ گاو، ۳۹۸ گوسفند و ۱۸۸ بز اخذ و به لحاظ حضور پادتن ضد این تک‌یاخته مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی نمونه‌های سرمی گاو با روش تست فلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم و نمونه‌های خون گوسفند با روش الایزای غیرمستقیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بررسی نشان دهنده آلودگی سرمی ۲۸/۷۳، ۵۳/۰۱ و ۵۱/۰۶ درصد به ترتیب در مورد گاو، گوسفند و بز بود (۵).

بررسی‌های انجام شده در کشورهای منطقه نیز نشان دهنده‌ی شیوع نسبتا بالای انگل است. بررسی انجام شده با روش هماگلوتیناسیون (Hemaglutination Test) در سال ۱۹۹۷ نشان دهنده‌ی آلودگی در ۳۹ درصد از گوسفندان و ۲۸ درصد از جمعیت بزهای مورد بررسی در عربستان صعودی بوده است (۱۰). در مطالعه‌ای در اتیوپی، که با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم انجام شده است، میزان آلودگی در گوسفند ۲۲/۹ و در بز ۱۱/۶ درصد گزارش شده است (۲).

انتقال بیماری در جمعیت مورد بررسی می‌تواند با دو روش افقی و عمودی انجام شود که روش افقی به دلیل آلودگی حیوان با منابع آلودگی همچون آلودگی منابع آب و غذا با اووسیست تک‌یاخته و روش عمودی ناشی از انتقال مادرزادی آلودگی می‌باشد. با توجه به اینکه افزایش سن، ارتباط معنی‌داری با افزایش سطح عفونت ندارد، می‌توان نتیجه گرفت که انتقال عفونت عمدتا به صورت مادرزادی است. در چنین الگوهایی سقط جنین، به صورت اندمیک و با روندی نسبتا ثابت در گله دیده می‌شود (۸).

در مجموع بررسی‌های سرولوژیک، نشان دهنده‌ی بالا بودن میزان آلودگی در گوسفندان مناطق تحت بررسی بوده‌اند، که نشان از اهمیت بیماری‌زایی توکسوپلاسما گوندئی به عنوان عامل ایجاد سقط جنین در گوسفند و پتانسیل زئونوتیک گوشت گوسفند و امکان انتقال تک‌یاخته به انسان دارد. اگرچه آلودگي به اين تك‌یاخته مترادف با بيماري باليني نمي‌باشد اما عفونت خفته در مواقع نقص سيستم ايمني و يا در دوران آبستني منجر به فرم باليني بيماري خواهد شد.

منابع مورد استفاده

1. Bekele, T. and O. B. Kasali. 1989. Toxoplasmosis in sheep, goats and cattle in central Ethiopia. *Veterinary Research Communication* 13: 371-375.

2. Dubey, J. P. and J. L. Jones. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal of Parasitology* 38:1257-1278.

3. Dubey, J. P. 2016. Overview of Toxoplasmosis. In: S. E. Aiello (editor.), Merck Veterinary Manual. 11th ed, Kenilworth, NJ, USA.

4. Dubey, J. P. 2009. Toxoplasmosis of animals and humans. CRC press, Philadelphia.

5. Hashemi, S. 2014. Evaluation of Seroprevalence of Toxoplasmosis in cattle, sheep and goat using ELISA and IFAT in Lorestan province. *Clinical Investigations in Large Animals.* 7:49-56.

6. Hashemi-Fesharki, R. 1996. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. *Veterinary Parasitology*. 61: 1-3.

7. Hosseininejad, M., H. R. Azizi, F. Hosseini and G. Schares. 2009. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite

جدول ۱- ارزیابی نمونه‌های سرمی اخذ شده به لحاظ دارا بودن تیتر سرمی قابل اندازه‌گیری علیه تک یاخته *توکسوپلاسما گوندئی* در گوسفندان مورد بررسی بر اساس سن.

سن	تعداد نمونه	درصد نمونه‌های مثبت
یک تا ۱/۵ سال	۱۸	۱۶/۶۶
۱/۵ تا ۲/۵ سال	۷۷	۱۹/۴۸
۲/۵ تا ۳/۵ سال	۷۷	۲۲/۰۷
۳/۵ تا ۴/۵ سال	۹۷	۲۵/۷۷
بالاتر از ۵/۵ سال	۵۱	۲۵/۴۹

surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. Veterinary Parasitology. 164: 315-319.

8. Kimbita, E. N., X. Xuan, X. Huang, T. Miyazawa, S. Fukumoto, M. Mishima, H. Suzuki, C. Sugimoto, H. Nagasawa, K. Fujisaki, N. Suzuki, T. Mikami and I. Igarashi. 2001. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. *Veterinary Parasitology.* 102: 35-44.

9. Romanelli, P. R., R. L. Freire, O. Vidotto, E. R. M. Marana, L. Ogawa, V. S. O. De Paula, J. L. Garciaand and I. T. Navarro. 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil. *Research in Veterinary Science.* 82: 202-207.

10. Sharif, M., S. Gholami, H. Ziaei, A. Daryani, B. Laktarashi, S. P. Ziapour, A. Rafiei and M. Vahedi. 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. *Veterinary Journal.* 174: 422-424.