دوره سیزدهم ـ شماره ۴ ـ زمستان ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.64040.1820

بررسی شیوع سرمی توکسوپلاسموزیس در گوسفندان روستاهای شهرستان تبریز با روش‌های ایمونوبلاتینگ

پریسا شهبازی[۱]، احمد نعمت‌الهی[۲]، حامد بهنیافر[۳] و عباس ایمانی باران[۴*]

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲

چکیده

توکسوپلاسموزیس یکی از بیماری‌های مشترک با انتشار جهانی است که عامل آن تک‌یاخته‌ی *توکسوپلاسما گوندی* است. این تک-یاخته می‌تواند انواع سلول‌ها را در انسان و تقریباً تمام حیوانات آلوده سازد. این مطالعه با هدف تعیین شیوع سرمی توکسوپلاسموزیس در گوسفندان روستاهای شهرستان تبریز و با به کارگیری آزمون‌های دات بلات و وسترن بلات بر اساس واکنش آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت‌های *توکسوپلاسما گوندی* با آنتی‌بادی‌های موجود در نمونه‌های سرم گوسفندان، انجام گرفت. مجموعاً، ۱۸۶ نمونه‌ی خون از گوسفندان (۹۳ رأس میش، ۹۳ رأس قوچ) روستاهای شهرستان تبریز در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۲، اخذ شده و سرم آن‌ها جدا گردید. نخست، سرم‌ها برای تعیین میزان شیوع توکسوپلاسموزیس با آزمون دات بلات ارزیابی شدند. سپس، نمونه-های سرمی مثبت برای تأیید نهایی آلودگی و مشاهده‌ی باندهای اختصاصی ۳۰ کیلو دالتون با آزمون وسترن بلات ارزیابی شدند. بر اساس آزمون دات بلات، شیوع سرمی در گوسفندان روستاهای شهرستان تبریز ۹/۱۴ درصد بود. شیوع توکسوپلاسموزیس در بین گوسفندان ماده (۱۱/۸۳ درصد) بیش‌تر از گوسفندان نر (۶/۴۵ درصد) بود، ولی از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار نبود ($P>0/05$). در آزمون وسترن بلات روی تمامی نمونه‌های سرمی مثبت، باند ۳۰ کیلو دالتون به طور آشکار مشاهده شد. در بررسی حاضر هیچ تفاوت آشکاری در نمونه‌های آلوده در مورد باندهای آنتی‌ژنی / پروتئینی مشاهده نشد و پروتئین‌های با وزن مولکولی ۳۰ کیلودالتون و کوچک‌تر از ۱۰ کیلو دالتون به عنوان پروتئین‌های ایمنی‌زای تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* سویه‌ی RH شناخته شدند.

کلمات کلیدی: توکسوپلاسموزیس، سرولوژی، گوسفند، تبریز

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی یک تک یاخته‌ی مهم درون سلولی اجباری است که می‌تواند انواع سلول‌ها را در انسان، حیوانات اهلی، پستانداران وحشی و پرندگان آلوده سازد. در بین دام‌های اهلی، گوسفند و بز در برابر آلودگی به این تک یاخته بسیار حساس هستند. عفونت *توکسوپلاسما گوندی* عمدتاً از طریق خوردن بافت‌های آلوده به کیست انگل، مصرف غذا و آب آلوده با اووسیست‌های اسپورولِه و همچنین انتقال از طریق جفت به جنین ایجاد می‌شود (Gajadhar et al. 2006). آلوده شدن با *توکسوپلاسما گوندی* در طول دوره‌ی آبستنی ممکن است به سقط جنین، بد شکلی جنین یا مرده‌زایی منجر شود (Cook et al. 2000). *توکسوپلاسما گوندی* دارای یک چرخه‌ی تولید مثلی پیچیده است که مراحل تکاملی تاکی‌زوئیت، برادی‌زوئیت و اووسیست را شامل می‌شود. تمامی این مراحل برای میزبان‌های حساس عفونت‌زا هستند. اعضای خانواده‌ی گربه‌سانان میزبان

[۱] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز
[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز
[۳] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز
[۴*] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز E-mail: a.imani@tabrizu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

نهایی برای این انگل هستند. آلودگی در گربه شامل مراحل تولیدمثلی جنسی و غیرجنسی در دستگاه گوارش است که به دفع اووسیست در مدفوع در عرض ۱۳-۳ روز پس از آلودگی منتهی می‌شود. در میزبان‌های واسط، اسپوروزوئیت‌های آزاد شده از اووسیست‌های اسپوروله‌ی بلعیده شده یا برادی‌زوئیت‌های حاصل از کیست‌های بافتی وارد دیواره‌ی روده شده و به فرم تاکی‌زوئیت تبدیل می‌شوند و در طیف وسیعی از سلول‌ها تکثیر یافته و نهایتاً در بافت‌ها، به ویژه بافت‌های مغزی و عضلات دام‌ها از جمله گوسفند و بز، مرحله‌ی کیستی را تشکیل می‌دهند (Dubey 1998). شیوع عفونت *توکسوپلاسما گوندی* در بین دام‌های یک منطقه و نیز بین دام‌های مناطق مختلف، متفاوت است و تفاوت در شیوع به عوامل زیادی از جمله شیوه‌ی کشاورزی، رطوبت محیطی و پراکندگی نسبی گربه‌های ولگرد به عنوان میزبان نهایی مربوط است. مطالعات نشان داده‌اند که شیوع عفونت در گوسفند و بز می‌تواند به ترتیب بیش از ۹۲ درصد و ۷۵ درصد باشد (Havakhah et al. 2014).

آزمون‌های سرم‌شناسی برای تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده در برابر *توکسوپلاسما گوندی* در انسان و حیوانات، در مقایسه با روش‌های اثبات مستقیم مراحل سیر تکاملی انگل از جمله ارزیابی‌های زیستی یا آزمایش‌های پس از مرگ، رایج‌تر هستند (Dubey et al. 1995). انواع آزمون‌های سرم‌شناسی برای تشخیص آنتی-بادی‌های سرمی تولید شده در برابر عفونت‌های توکسوپلاسمایی، از جمله تست رنگی سابین- فلدمن، آزمون آگلوتیناسیون مستقیم و آگلوتیناسیون اصلاح شده، آزمون آگلوتیناسیون لاتکس، الایزا، آزمون آنتی‌بادی درخشان غیرمستقیم، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و وسترن بلات، استفاده شده‌اند که هر یک دارای مزایا و معایبی هستند. برخی از این آزمون‌ها دارای محدودیت‌هایی در اجرا، مانند قابلیت اجرایی متفاوت آزمون آگلوتیناسیون اصلاح شده در میزبان‌های مختلف، نیاز به تاکی‌زوئیت-های زنده در تست سابین- فلدمن و همچنین نیاز به کونژوگه‌ی اختصاصی‌گونه‌ی میزبان در تست‌های الایزا، وسترن بلات و آزمون آنتی‌بادی درخشان غیرمستقیم می-باشند (Al-Adhami and Gajadhar 2014). در بین روش‌های نامبرده، آزمون وسترن بلات علاوه بر تشخیص آلودگی قابلیت تعیین پروتئین‌های ایمنی‌زای انگل را نیز داراست.

در میان انواع آنتی‌ژن‌های شناخته شده‌ی *توکسوپلاسما گوندی*، پروتئین SAG1 (Surface Antigen G1) معروف به پروتئین ۳۰ (P30) که به طور اختصاصی توسط مرحله‌ی تاکی زوئیت انگل ساخته می‌شود، یک آنتی‌ژن سطحی و بارز این انگل است (Magner et al. 1998). این آنتی‌ژن ایمونودامینانت بوده و بر ضد آن آنتی‌بادی اختصاصی در بدن تولید می‌شود که می‌توان از جستجوی آن در سرم، جهت تشخیص عفونت توکسوپلاسما استفاده نمود (Rodriguez et al. 1985). SAG1 (Surface Antigen G1) یک آنتی‌ژن محلول بوده و می‌توان آن را در آزمون‌هایی از جمله وسترن بلات به کار گرفت.

با توجه به نقش مهم گوسفند در تأمین نیازمندی‌های پروتئینی برای جمعیت انسانی استان آذربایجان شرقی و اقلیم معتدل این نقطه از ایران که شرایط مطلوبی را برای تکثیر و انتشار انگل توکسوپلاسما فراهم می‌نماید و با توجه به خطر ایجاد سقط جنین در گوسفندان که از جنبه-های مهم اقتصادی این بیماری می‌باشد؛ بنابراین تعیین وضعیت اپیدمیولوژیکی توکسوپلاسموزیس در این منطقه-ی مهم دام‌پروری ایران دارای اهمیت اقتصادی و بهداشت عمومی است. هدف از مطالعه‌ی حاضر، تعیین شیوع سرمی توکسوپلاسموزیس در گوسفندان روستاهای شهرستان تبریز با استفاده از روش‌های ایمونوبلاتینگ و تعیین پروتئین‌های ایمنی‌زای تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* سویه‌ی RH با استفاده از سرم گوسفندان آلوده در این منطقه به عنوان ارائه الگویی جهت تشخیص این بیماری بوده است.

مواد و روش کار

این مطالعه در مناطق روستایی شهرستان تبریز از استان آذربایجان شرقی واقع در شمال غرب ایران (-'36°43 39°45'N و 45°3'-48°19E) انجام شد. شهرستان تبریز به لحاظ جغرافیایی جزء مناطق کوهستانی با ارتفاع ۱۳۵۱/۴ متر بالاتر از سطح دریا بوده و دارای آب و هوای معتدل با تابستان‌های نسبتاً گرم و خشک و زمستان‌های سرد می‌باشد (Nematollahi et al. 2014a).

جهت انجام نمونه‌برداری از دام‌ها و جمع‌آوری سرم، در طول پاییز و زمستان سال ۱۳۹۲ از روستاهای شهرستان تبریز، نمونه‌های خون به میزان ۵ میلی‌لیتر از ورید وداج ۱۸۶ رأس گوسفند (شامل ۹۳ رأس نر و ۹۳ رأس ماده) در لوله‌های ونوجکت کاملاً استریل جمع‌آوری شدند. پس از سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، سرم‌ها از نمونه‌های خون جدا شدند و تا زمان آزمایش وسترن بلات و دات بلات در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تهیه‌ی تاکی زوئیت و استخراج آنتی‌ژن، دو ویال تاکی زوئیت کشته شده‌ی *توکسوپلاسما گوندی* سویه‌ی RH (مجموعاً به حجم ۵ میلی‌لیتر) از مؤسسه‌ی پاستور خریداری شدند. برای استخراج آنتی‌ژن محلول کامل، تاکی زوئیت‌های محتوی هر دو ویال در یک فالکون ریخته شدند و با استفاده از بافر لیز کننده (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH=7.2, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 1% Triton X-100, 0.1% Sodium deoxycholate, 10G4 M PMSF) متعاقب چند بار انجماد و ذوب در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد لیز شدند و سپس در یک سانتریفیوژ یخچال دار ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور ۸۰۰۰g به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی در میکروتیوب‌های با حجم ۵۰ میکرولیتر جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت تهیه‌ی سرم کنترل مثبت، دو گوسفند نر دو ساله از گوسفندان گروه دامپروری دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تبریز به صورت زیر جلدی در معرض سه مرحله‌ی تزریق، هر کدام با ۱ میلی‌لیتر محلول آنتی‌ژن تاکی زوئیت تهیه شده، قرار گرفتند. اولین مرحله‌ی تزریق با استفاده از امولسیون ۱ میلی‌لیتر آنتی‌ژن با ۰/۵ میلی‌لیتر ادجوانت کامل (Complete Freund's adjuvant) انجام شد. به ترتیب، دومین و سومین مرحله‌ی تزریق با استفاده از امولسیون ۱ میلی‌لیتر آنتی‌ژن با ۰/۵ میلی‌لیتر ادجوانت ناقص (Incomplete Freund's adjuvant) در بازه‌ی زمانی دو هفته انجام شدند (Raj et al. 2004). نهایتاً، دو هفته پس از آخرین تزریق از گوسفندان مذکور به عنوان کنترل مثبت، سرم تهیه شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت ارزیابی کنترل مثبت و تعیین تیتر مناسب در آزمون دات بلات، یک میکرولیتر از آنتی‌ژن محلول روی یک گوشه‌ی مشخص شده از کاغذهای نیتروسلولز (Porablot NCB, Germany) در ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر مربع کوت شد و در سمت مقابل آن، ایمونوگلوبولین Y خالص به عنوان کنترل منفی قرار داده شد. برای غربال‌گری، از سرم گوسفندان کنترل مثبت رقت‌های مختلف (۱:۱۰، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰، ۱:۱۰۰۰ و ۱:۱۰۰۰۰) تهیه گردید. پس از خشک شدن، تمامی کاغذهای نیتروسلولز با محلول شیر خشک ۳ درصد در بافر TBS (20mM Tris base + 0.15 M NaCl در آب مقطر) حاوی ۰/۰۵ درصد Tween20 (TBS-T) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق به منظور انسداد محل‌های پیوند غیراختصاصی پروتئین‌ها انکوبه شدند. سپس، کاغذها سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر TBS-T شسته شدند. سپس، کاغذها، با رقت‌های مختلف از سرم گوسفندان کنترل مثبت به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و پس از این مدت مثل مرحله‌ی قبل شسته شدند. سپس، کونژوگه‌ی Rabbit anti sheep IgG (Dako, Denmark) رقیق شده (۱:۲۰۰۰) اضافه گردیده و کاغذها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از شست و شو مانند مرحله‌ی قبل، برای مشاهده‌ی واکنش مثبت، کاغذها به مدت ۵ دقیقه با

سوبسترای DAB (Sigma, USA) (دی آمینو بنزیدین) آغشته شدند. نهایتاً، تیتر مناسب (۱:۱۰۰) برای این بررسی تعیین شد. برای مشخص نمودن تعداد موارد مثبت توکسوپلاسموزیس در بین ۱۸۶ نمونه‌ی اخذ شده از گوسفندان روستاهای شهرستان تبریز بر همین اساس و با استفاده از تیتر مناسب (۱:۱۰۰) عمل شد.

در این مرحله، برای انجام SDS-PAGE و وسترن بلات با هدف تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد *توکسوپلاسما گوندی*، ابتدا رقت‌هایی از آنتی‌ژن توکسوپلاسما با بافر نمونه (5X sample buffer) به نسبت ۱ به ۴ تهیه شد و پس از جوشاندن، ۲۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها به داخل چاهک‌های ژل پلی‌آکریلامید ۱۲ درصد ریخته شد. ضمناً، یک چاهک در هر ژل به مارکرهای پروتئینی اختصاص یافت (Pre-stained Page Ruler, Protein Ladder, SMO671, Fermentas: مارکر از پیش رنگ شده جهت آزمون وسترن بلات، Page Ruler Protein Ladder, SMO66 Fermentas: مارکر برای SDS-PAGE) و ژل مربوطه به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. با توجه به این که نمونه‌ها به صورت تکرار در دو ژل مجزا ریخته شده بودند، پس از اتمام الکتروفورز یکی از ژل‌ها با رنگ کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و بیان پروتئین مورد نظر ۳۰ کیلو دالتونی و سایر پروتئین‌های آنتی‌ژن تاکی زوئیت بررسی گردید و روی ژل دیگر وسترن بلات انجام شد. بدین منظور، ابتدا باندهای آنتی‌ژن روی کاغذ نیتروسلولز انتقال داده شدند (Towbin et al. 1979). به این ترتیب که ژل پلی‌آکریلامید به مدت ۱۵ دقیقه در بافر توبین قرار داده شد تا یون‌های املاح در آن به تعادل برسند و کاغذ نیتروسلولز و کاغذهای واتمن نیز به مدت ۱۵ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شدند. سپس، صفحات به ترتیب روی هم قرار داده شدند. ابتدا یک صفحه واتمن بسیار ضخیم در زیر، کاغذ نیتروسلولز روی آن، ژل پلی آکریلامید روی کاغذ نیتروسلولز و در بالا هم یک صفحه واتمن دیگر قرار داده شد. پس از خارج کردن کامل حباب‌های هوا از بین لایه‌ها، این مجموعه روی دستگاه بلات نیمه خشک قرار گرفت. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۱۵ ولت، عمل انتقال پروتئین‌ها از ژل به کاغذ نیتروسلولز انجام گردید. پس از اتمام عمل انتقال، جهت اشباع جایگاه‌های باقیمانده‌ی اتصال پروتئین‌ها و به منظور کاهش اتصال ایمونوگلوبولین‌های غیراختصاصی به آن به مدت یک ساعت در محلول ۳ درصد شیر خشک قرار داده شد و سه بار با بافر TBS-T شسته شد. پس از خشک شدن، کاغذ نیتروسلولز به صورت نوارهای باریک شماره‌دار بریده شد. هر نوار برای تست یک نمونه‌ی سرم از نمونه‌های مثبت به دست آمده در آزمون دات بلات به کار رفت. ضمناً در هر مرحله یک نوار برای سرم کنترل مثبت استفاده شد. نوار مربوط به مارکر پروتئینی از پیش رنگ شده نیز جدا گردید و کنار گذاشته شد. نوارهای بریده شده با رقت ۱ به ۱۰۰ سرم‌ها به مدت ۱ ساعت مجاور گردید. سپس نوارها سه بار با بافر TBS-T شسته شدند. پس از خشک شدن نوارها، تمامی آن‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با کونژوگه‌ی Rabbit anti sheep رقیق شده مجاورت داده شدند و پس از شست و شو، روی نوارها سوبسترای DAB اضافه شد. نوارها بلافاصله به منظور جلوگیری از گسترش رنگ شسته شدند و برای خشک شدن لای کاغذ صافی قرار داده شدند. نهایتاً، باندهایی که با کروموژن رنگ گرفته بودند، نمایان گردیدند.

از آزمون کای (χ^2) برای آنالیز ارتباط بین آلودگی توکسوپلاسما با جنس گوسفندان استفاده شد. مقایسه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری (Vesion 17, SPSS SPSS (Inc., Chicago, IL, USA با در نظر گرفتن P-Value<0.05 و حدود اطمینان ۹۵ درصد (CI=95%) انجام شد.

نتایج

در بررسی اولیه بر اساس آزمون دات بلات (با تیتر سرمی ۱:۱۰۰)، از ۱۸۶ نمونه‌ی سرم مورد مطالعه در مجموع ۱۷نمونه (۹/۱۴ درصد) آلوده به توکسوپلاسما

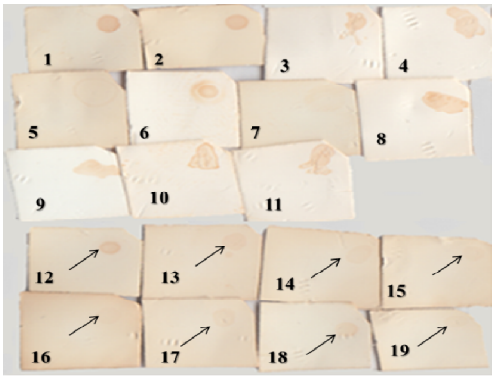
بودند (شکل ۱ و جدول ۱). اگر چه میزان آلودگی در گوسفندان ماده بیش‌تر از گوسفندان نر مورد آزمایش بود، ولی در آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون مربع کای برای بررسی تأثیر شاخص جنسیت بر میزان آلودگی، اختلاف معنی‌داری در میزان آلودگی بین جنس‌های نر و ماده مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۱).

در مرحله‌ی الکتروفورز آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* سویه‌ی RH روی ژل ۱۲ درصد پلی‌آکریلامید، سه باند مجزا و کاملاً یکسان، شامل یک باند کوچک‌تر از ۱۵ کیلو دالتون، باند ۳۰ کیلو دالتون مربوط به پروتئین SAG1 و یک باند با وزن مولکولی کوچک‌تر از ۸۵ کیلو دالتون و بزرگ‌تر از ۵۰ کیلو دالتون رویت شدند (شکل ۲).

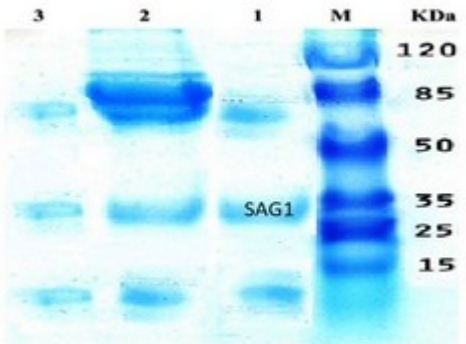
در آزمون وسترن بلات که روی ۱۷ نمونه‌ی سرمی مثبت در آزمون دات بلات انجام گرفت، الگوهای مشاهده شده به سبب ظهور باندهای قوی مورد انتظار ۳۰ کیلو دالتونی (P30) برای تمامی نمونه‌ها یکسان بود که این باند مربوط به واکنش پروتئین ایمونودامینانت SAG1 مشاهده شده در SDS-PAGE با سرم‌های مثبت بود. همچنین، باندهای مشابه با وزن مولکولی کوچک‌تر از ۱۰ کیلو دالتون برای تمامی نمونه‌ها رویت شد که مربوط به باند پروتئینی کم‌تر از ۱۵ کیلو دالتون مشاهده شده در SDS-PAGE بود (شکل ۲ و ۳). همچنین، ظهور باندهای با وزن مولکولی کوچک‌تر از ۸۵ کیلو دالتون و بزرگ‌تر از ۵۰ کیلو دالتون روی ژل SDS-PAGE و عدم ظهور باندهای با وزن مولکولی مشابه در وسترن بلات برای تمامی نمونه‌ها یکسان بود. همان گونه که الگوهای مشاهده شده در شکل‌های ۲ و ۳ نشان می‌دهند، هیچ نوع تفاوت آشکاری در نمونه‌های آلوده در مورد باندهای آنتی‌ژنی/ پروتئینی دیده نمی‌شوند و پروتئین‌های با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون و کوچک‌تر از ۱۰ کیلو دالتون به عنوان پروتئین‌های ایمنی‌زای تاکی‌زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* سویه‌ی RH در بررسی حاضر شناخته شدند. مشاهده‌ی باندهای نامبرده در هر ۱۷ نمونه‌ی سرمی، میزان شیوع ۹/۱۴ درصد که در بررسی اولیه توسط آزمون دات بلات به دست آمده بود، را تأیید نمود.

جدول ۱: نتایج شیوع سرمی توکسوپلاسموزیس در بین گوسفندان روستاهای شهرستان تبریز بر اساس آزمون‌های دات بلات و وسترن بلات

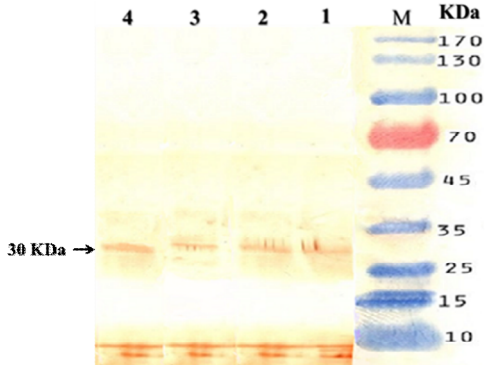
جنس	تعداد نمونه سرمی	موارد مثبت (٪)	p-value
گوسفند نر	۹۳	(۶/۴۵)۶	P>0.05
گوسفند ماده	۹۳	(۱۱/۸۳)۱۱	P>0.05
مجموع	۱۸۶	(۹/۱۴)۱۷	



شکل ۱: نتایج آزمایش دات بلات انجام شده با استفاده از آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسما و نمونه‌های سرمی گوسفندان مورد مطالعه (رقت ۱:۱۰۰)
۱: کنترل مثبت، ۱۹-۲: نمونه‌های سرمی



شکل ۲: الگوی الکتروفورز آنتی‌ژن تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* سویه‌ی RH روی ژل SDS-PAGE
(M: مارکر پروتئینی، ستون‌های ۳-۱: پروتئین تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* با رقت ۲۵ درصد)



شکل ۳: وسترن بلات آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* روی کاغذ نیتروسلولز در واکنش با سرم کنترل مثبت و نمونه‌های سرمی مثبت

M: مارکر پروتئینی؛ نوار ۱: سرم کنترل مثبت، نوارهای ۴-۲: نمونه‌های سرمی مثبت

بحث

در ایران، گوسفند و بز به عنوان یکی از منابع اصلی تأمین کننده‌ی فرآورده‌های پروتئینی محسوب می‌شوند. این امر اهمیت آن‌ها را به عنوان منبع عفونت توکسوپلاسموزیس افزایش می‌دهد. بنابراین، میزان توکسوپلاسموزیس در دام‌ها شاخص مهمی در تعیین خطر این بیماری در انسان است و وجود تیترهای بالا در نتایج سرولوژیکی می‌تواند از نظر انتقال بیماری بسیار مورد توجه باشد (ذوقی ۱۳۶۸). علاوه بر خسارات بهداشتی این بیماری در جوامع انسانی، بروز سقط جنین در گوسفندان از جنبه‌های مهم اقتصادی این بیماری می‌باشد. مطالعات انجام شده در ایران و کشورهای مختلف، علی‌رغم شیوع پایین علایم بالینی، همگی حاکی از آلودگی متفاوت و نسبتاً بالا به توکسوپلاسما بر اساس روش‌های مختلف سرولوژیکی می‌باشند. نکته‌ی حائز اهمیت در تمامی این مطالعات، تنوع روش‌های مورد بررسی است. این تفاوت در شیوع، علاوه بر تنوع آزمون‌های مورد استفاده و آستانه‌ی سطح سرمی مد نظر برای گزارش موارد مثبت، می‌تواند ناشی از سنت‌ها، سبک زندگی و عادات غذایی ساکنان، شرایط آب و هوایی، سن حیوانات، استفاده یا عدم استفاده از آب‌های سطحی برای گله، اندازه‌ی گله، حضور گربه‌ها و فعالیت‌های کشاورزی مناطق مختلف باشد (صائبی ۱۳۶۹).

مطالعات انجام شده برای برآورد میزان شیوع توکسوپلاسموزیس در حیوانات مناطق مختلف ایران با استفاده از روش‌های متنوع سرولوژیکی، میزان‌های مختلف شیوع سرمی را نشان داده‌اند. در سال‌های اخیر، شیوع توکسوپلاسموزیس در گوسفندان در استان مازندران ۲۷/۵ درصد (دریانی و همکاران ۱۳۸۵)، ۳۵ درصد (Sharif et al. 2007) و ۳۱/۲ درصد (Youssefi et al. 2007)، در اردبیل ۳۱ درصد (Ghazaei 2006)، اردبیل (مشکین شهر) ۵۹ درصد (Keshavarz et al. 2007)، کرمانشاه ۲۲/۵۵ درصد (Hamzavi et al. 2007)، چهارمحال و بختیاری ۲۹/۱ درصد (Bonyadian et al. 2007)، خوزستان (اهواز) ۵۸ درصد (Hamidinejat et al. 2008)، فارس ۲۶/۴ درصد (Asgari et al. 2010)، آذربایجان غربی ۲۱ درصد (Raeghi et al. 2011)، کردستان ۲۱/۷۴ درصد (Khezri et al. 2012) و گیلان ۳۶/۸ درصد (Havakhah et al. 2014) گزارش شده‌اند.

منطقه‌ی شمال غرب ایران از نظر جمعیت دام‌های ساکن و مهاجر یکی از اقلیم‌های غنی می‌باشد که نوع پوشش گیاهی و ویژگی‌های جغرافیایی آن، این منطقه را مطلوب برای پرورش دام به خصوص گوسفند و بز نموده است. بنابراین، بررسی میزان شیوع توکسوپلاسموزیس در حیوانات این منطقه اهمیت بسیار زیادی دارد تا در راستای شناخت دقیق از وضعیت اپیدمیولوژیکی این بیماری مهم، اقدامات اساسی برای جلوگیری از خسارات جبران‌ناپذیر اقتصادی و بهداشتی بالقوه برداشته شود. با جستجوی موارد مطالعاتی شیوع سرمی توکسوپلاسموزیس در بین دام‌ها در منطقه‌ی شمال غرب کشور، از جمله شهرستان تبریز، مشخص شد که تا به حال مطالعات مناسب نسبتاً کمی در این ارتباط صورت گرفته‌اند. در طی مطالعه‌ی حاضر، میزان شیوع سرمی توکسوپلاسموزیس در بین گوسفندان مناطق روستایی شهرستان تبریز با استفاده از روش‌های وسترن بلات و

دات بلات ۹/۱۴ درصد مشخص گردید. مقایسه‌ی نتایج حاصل از بررسی‌های صورت گرفته در استان‌های مختلف ایران با نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که میزان آلودگی در مناطق روستایی شهرستان تبریز به مراتب کم‌تر بوده، اما آلودگی هم‌چنان در بین گوسفندان و به ویژه جنس‌های ماده بیش‌تر است. این تفاوت در نتایج را علاوه بر تفاوت‌های اقلیمی و سرد بودن منطقه‌ی تبریز و روش‌های مدیریتی و بهداشتی در پرورش گوسفندان، می‌توان به تفاوت در روش‌های تشخیصی مورد استفاده نسبت داد.

در مطالعات قبلی در استان آذربایجان شرقی با استفاده از روش الایزا (هاشم‌زاده فرهنگ و همکاران ۱۳۸۹) و دای تست (Khanmohammadi 2011)، به ترتیب میزان شیوع سرمی ۱۳/۴۵ درصد و ۵۶/۸ درصد برای توکسوپلاسموزیس در بین گوسفندان روستاهای اطراف تبریز گزارش شده‌اند . همچنین، در بررسی توکسوپلاسموزیس در گوسفندان ماده و دارای تاریخچه‌ی سقط جنین در مناطق روستایی شهرستان تبریز با استفاده از آزمون آنتی‌بادی درخشان غیرمستقیم (IFAT) ۳۴/۶ درصد از گوسفندان دارای ایمونوگلوبولین G اختصاصی توکسوپلاسموزیس در نمونه‌های سرمی بودند (Nematollahi et al. 2014b). اختلاف میزان شیوع مطالعات قبلی با نتایج بررسی حاضر را می‌توان به اختلاف میزان حساسیت آزمون‌های به کار رفته و اختلاف زمانی در بررسی و تفاوت در مرحله‌ی عفونت نسبت داد (Sensini 2006). در بررسی دیگری که به روش الایزا روی نمونه‌های سرمی گوسفندان منطقه و به موازات بررسی حاضر صورت گرفت، نتایج نشان دهنده‌ی ۶/۹۸ درصد آلودگی بود (Nematollahi et al. 2014a) که به نتایج آزمون ایمونوبلات (۹/۱۴ درصد) نزدیک است. اختلاف جزیی موجود می‌تواند به دلیل حساسیت بیش‌تر روش‌های ایمونوبلاتینگ باشد که بررسی‌های سایر محققین نیز مبین این امر است (Rilling et al. 2003, Tissot et al. 2003).

به طور کلی صرف نظر از برخی معایب، بررسی‌ها نشان دهنده‌ی حساسیت و ویژگی بالای روش‌های ایمونوبلاتینگ به ویژه وسترن بلات در تشخیص توکسوپلاسموزیس در مراحل و اشکال مختلف بیماری است. از جمله در ارزیابی مقایسه‌ای آزمون وسترن بلات IgG/IgM با الایزا برای تشخیص زود هنگام توکسوپلاسموزیس مادرزادی در نوزادان زیر سه ماه و نیز مقایسه‌ی وسترن بلات با روش آگلوتیناسیون جاذب ایمنی IgM در نمونه‌های سرمی نوزادان تازه متولد شده و ۱ تا ۳ ماهه، ویژگی و حساسیت بالای روش وسترن بلات نسبت به دو روش دیگر به وضوح نشان داده شده است (Rilling et al. 2003, Tissot Dupont et al. 2003).

نتایج برخی بررسی‌ها نشان داده‌اند که در برابر آلودگی‌های توکسوپلاسمایی، گوسفندان ماده حساس‌تر از گوسفندان نر هستند (Ramzan et al. 2009)، در حالی که مغایر با یافته‌های مطالعه‌ی فوق گزارش‌های دیگری در دسترس هستند که نشان می‌دهند هیچ ارتباط معنی‌داری بین آلودگی توکسوپلاسما و جنسیت دام‌ها وجود ندارد (Caballero-Ortega et al. 2008, Cavalcante et al. 2008). در مطالعه‌ی حاضر اگر چه گوسفندان ماده شیوع سرمی بالای توکسوپلاسموزیس را نسبت به گوسفندان نر نشان دادند، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. به طور مشابه، برخی مطالعات (Van der Puije et al. 2000, Jittapalapong et al. 2005, Teshale et al. 2007) نیز شیوع بالای توکسوپلاسموزیس را در دام‌های ماده نشان داده‌اند، در صورتی که Bisson و همکاران در سال ۲۰۰۰ و Cavalcante و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی‌های خود اظهار کرده‌اند که جنسیت عامل تعیین کننده‌ی مهم در مواجهه با آلودگی توکسوپلاسمایی نمی‌باشد.

در این مطالعه آزمون دات بلات به منظور غربال‌گری اولیه نمونه‌ها و آزمون وسترن بلات به دلیل داشتن ویژگی بالاتر جهت تشخیص دقیق‌تر مورد استفاده قرار گرفتند. قابل ذکر است که ارزش انجام آزمون‌های ایمونوبلاتینگ، مشخص نمودن آنتی‌ژن‌های ایمونوژن توکسوپلاسما است

که در بررسی حاضر پروتئین‌های با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون و کوچک‌تر از ۱۰ کیلو دالتون به عنوان پروتئین‌های ایمنی‌زای تاکی‌زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* سویه‌ی RH شناخته شدند.

یک نکته‌ی قابل توجه دیگر به لحاظ بهداشت عمومی این است که با توجه به اهمیت مصرف گوشت گوسفند به خصوص به صورت کبابی و نیم‌پز و بالا بودن میزان آلودگی در این دام نسبت به سایر دام‌ها، امکان انتقال این انگل به انسان از طریق گوشت گوسفند بالا می‌باشد. با توجه به این مسائل، بایستی اقدامات بهداشتی لازم توسط مسئولان ذیربط انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه‌ی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی به شماره‌ی ۴۳/۴۸۱۳/د می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تبریز و نیز از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر مساعدت در تأمین اعتبار مالی و امکانات مورد نیاز در به ثمر رسیدن این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

دریانی، احمد؛ شریف، مهدی؛ لاکتراشی، بهرام؛ ضیائی-هزارجریب، هاجر؛ غلامی، شیرزاد؛ عجمی، ابوالقاسم و همکاران (۱۳۸۵). بررسی سرولوژی آنتی‌بادی ضد *توکسوپلاسما گوندی* در گاو، گوسفند و بز در کشتارگاه‌های دام استان مازندران، سال ۱۳۸۳، مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دوره ۱۶، شماره ۵۴، صفحات ۶۶-۶۰.

ذوقی، اسماعیل (۱۳۶۸). زئونوزها و بیماری‌های قابل انتقال مشترک انسان و حیوان، چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی، تهران، صفحات ۶۸۳-۶۷۲.

صائبی، اسماعیل (۱۳۶۹). بیماری‌های انگلی در ایران، بیماری‌های تک‌یاخته‌ای، چاپ اول، سازمان انتشارات و آموزش انقلاب اسلامی، تهران، صفحات ۲۴۵-۲۳۱.

هاشم‌زاده‌فرهنگ، حسین؛ نوذری، نسرین و موذنی، فرید (۱۳۸۹). بررسی میزان شیوع توکسوپلاسموزیس در گوسفندان و بزهای شهرستان تبریز به روش الایزا، مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، جلد ۴، شماره ۱، صفحات ۷۵۷-۷۵۳.

Al-Adhami, B.H. and Gajadhar, A.A. (2014). A new multi-host species indirect ELISA using protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies with comparison to ELISA-IgG, agglutination assay and Western blot. Veterinary Parasitology, 200: 66-73.

Asgari, Q.; Mehrabani, D.; Moazzeni, M.; Akrami-Mohajeri, F.; Kalantari. M.; Motazedian, M.H. and Hatam, G.R. (2010). The seroprevalence of ovine toxoplasmosis in Fars province, southern Iran. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 4(6): 332-336.

Bisson, A.; Maley, S.; Rubaire-Akiiki, C.M. and Wastling, J.M. (2000). The seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic goats in Uganda. Acta Tropica, 76(1): 33-38.

Bonyadian, M.; Hematzade, F. and Manuchehri, K. (2007). Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in sheep in center of Iran. Pakistan Journal of Biology Sciences, 10: 3228-3230.

Caballero-Ortega, H.; Palma, J.M.; Garcia-Márquez, L-g.; Gildo-Cárdenas, A. and Correa, D. (2008). Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. Parasitology, 135: 1385-1389.

Cavalcante, A.; Carneiro, M.; Gouveia, A.; Pinheiro, R.R. and Vitor, R.W.A. (2008). Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceará, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 60: 36-41.

Cook, A.J.C.; Gilbert, R.E.; Buffolano, W.; Zufferey, J.; Petersen, E.; jenum, P.A. et al. (2000). Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. British Medical Journal; 321: 142-147.

Dubey, J.P.; Thulliez, P.; Weigel, R.M.; Andrews, D.C.; Lind, P. and Powell, E.C. (1995). Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. American Journal of Veterinary Research, 56: 1030-1036.

Dubey, J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. International Journal of Parasitology, 28(7): 1019-1024.

Gajadhar, A.A.; Scandrett, W.B. and Forbes, L.B. (2006). Overview of food and water-borne zoonotic parasites at the farm level. Revue Scientifique et Technique, 25: 595-606.

Ghazaei, C. (2006). Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii*. African Journal of Health Sciences, 13: 131-134.

Hamidinejat, H.; Goraninejad, S.; Ghorbanpoor, M.; Nabavi, L. and Akbarnejad, F. (2008). Role of *Toxoplasma gondii* in abortion of ewes in Ahvaz (South-West Iran). Bulletin of the Veterinary Institue in Pulawy, 52: 369-371.

Hamzavi, Y.; Mostafaie, A. and Nomanpour, B. (2007). Serological prevalence of toxoplasmosis in meat producing animals. Iranian Journal of Parasitology, 2: 7-11.

Havakhah, Y.; Esmaeili Rastaghi, A.R.; Amiri, S.; Babaie, J.; Aghighi, Z. and Golkar, M. (2014). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in three counties of Gilan province, North of Iran; the more humid climate the higher prevalence. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases, 2(2): 80-83.

Jittapalapong, S.; Sangvaranond, A.; Pinyopanuwat, N.; Chimnoi, W.; Khachaeram, W.; Koizumi, S. Maruyama, S. (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province Thailand. Veterinary Parasitology, 127: 17-22.

Keshavarz, H.; Mohebali, M.; Shahnazi, V. and Zarei, Z. (2007). Frequency of toxoplasma infection in livestock of Meshkin Shahr, by immune fluorescent antibody test and its health importance. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences, 2:115-118.

Khanmohammadi, M. (2011). Seroprevalence survey of *Toxoplasma gondii* antibodies among sheep in Tabriz district, northwest Iran. Annals of Biology Research, 2(6): 484-488.

Khezri, M.; Mohammadian, B.; Esmailnia, K. and Khezri, O. (2012). Toxoplasmosis in sheep from Kurdistan province, Iran. Asian Journal of Animal Sciences, 6: 182-188.

Magner, I.D.; Hehl, A.B. and Boothroyd, J.C. (1998). The surface of toxoplasma tachyzoites is dominated, by a family of glycosylphosphatidylinositol antigen related to SAG-1. Infection and Immunity, 66: 2237-2244.

Nematollahi, A.; Shahbazi, P. and Nosrati, S. (2014a). Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in sheep in north-west of Iran. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2(9): 2605-2608.

Nematollahi, A.; Allah Jafari, R.; Shahbazi, P.; Khoshkerdar, M.; Zaboli, N.; Nouruzi, M. (2014b). Survey on ovine toxoplasmosis by IFAT and double-tube nested-PCR in Tabriz, Iran. Comparative Clinical Pathology, 23(5): 1583-1586.

Raeghi, S.; Akaberi, A. and Sadeghi, S. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep, cattle and horses in Urmia north-west of Iran. Iranian Journal of Parasitology, 4: 90-94.

Raj, G.D.; Latha, B.; Chandrasekhar, M.S. and Thiagarajan. V. (2004). Production, characterization and application of monoclonal antibodies against chicken IgY. Veterinary Archive, 74:189-199.

Ramzan, M.; Akhtar, M.; Muhammad, F.; Hussain. I.; Hiszczyńska-Sawicka, E.; Haq, A.U. and Mahmood M.S. (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Rahim Yar Khan (Punjab), Pakistan. Tropical Animal Health and Production, 41(7): 1225-1229.

Rilling, V.; Dietz, K.; Krczal, D.; Knotek, F.; Enders, G. (2003). Evaluation of a commercial IgG/IgM Western Blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22(3):174-180.

Rodriguez, C.; Afchain, D.; Capron, A.; Dissous, C. and Santoro, F. (1985). Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (P30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. European Journal of Immunology, 15(7): 747-749.

Sensini, A. (2006). *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. Clinical Microbiology and Infection, 12: 504-512.

Sharif, M.; Gholami, Sh.; Ziaei, H.; Daryani, A.; Laktarashi, B.; Ziapour, S.P. et al. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. The Veterinay Journal, 174 (2): 422-424.

Teshale, S.; Dumetre, A.; Darde, M.L.; Merga, B. and Dorchies, P. (2007). Serological survey of caprine toxoplasmosis in Ethiopia: prevalence and risk factors. Parasite, 14(2): 155-159.

Towbin, H.; Staehelin, T. and Gorden, G. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and source applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76: 4350-4354.

Van der Puije, W.N.; Bosompem, K.M.; Canacoo, E.A.; Wastling, J.M. and Akanmori, B.D. (2000). The prevalence of anti- *Toxoplasma gondii* in Ghanaian sheep and goats. Acta Tropica, 76(1): 21-26.

Tissot Dupont, D.; Fricker-Hidalgo, H.; Brenier-Pinchart, M.P.; Bost-Bru, C.; Ambroise-Thomas, P.; Pelloux, H. (2003). Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22(2):122-125.

Youssefi, M.R.; Sefidgar, S.A.A. and Ghaffari, S. (2007). Seroepidemiology of sheep toxoplasmosis in Babol northern Iran 2004. Pakista Journal of Biological Sciences, 10(7): 1147-1148.

A survey on the seroprevalence of toxoplasmosis in sheep from rural areas of Tabriz by immunoblotting assays

Shahbazi, P.[1]; Nematollahi, A.[2]; Behniafar, H.[3] and Imani Baran, A.[1]

Received: 24.10.2016 Accepted: 22.04.2017

Abstract

Toxoplasmosis is a zoonotic disease with a worldwide distribution which is caused by *Toxoplasma gondii*. It infects various cells of human and approximately all animals. The current study was conducted to determine the seroprevalence of *T. gondii* in sheep from rural areas of Tabriz by Western blot and Dot blot assays in which *T. gondii* soluble antigen was reacted with antibodies raised in serum samples of sheep. From October 2012 to April 2013, a total of 186 blood samples were collected from sheep (93 ewes and 93 rams) rural areas of Tabriz. Initially, the sera were separated and evaluated to determine the seroprevalence of toxoplasmosis by Dot blot assay. Then, positive serum samples were evaluated by Western blot assay in order to final confirmation of infection and observation of 30 KDa specific bands. Based on Dot blot assay, the seroprevalence rate in the sheep from rural areas of Tabriz was 9.14%. The seroprevalence of toxoplasmosis was higher in ewes (11.83%) than that of rams (6.45%). However, this difference was not statistically significant (P> 0.05). The patterns of Western blot assay on all positive sera were manifested as distinct 30 KDa bands. In this study, no distinct difference was observed on the antigen/protein bands pertaining to infected samples and the proteins with 30 KDa molecular weight and those being smaller than 10 KDa were identified as the immunogenic proteins of *T. gondii* tachyzoites strain RH.

Keywords*:* Toxoplasmosis, Serology, Sheep, Tabriz

1- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3- DVM Graduated Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Corresponding Author: Imani Baran, A., E-mail: a.imani@tabrizu.ac.ir