نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۲۴، پاییز ۱۳۹۶
ص‌ص: ۵۷~۶۲

شیوع بالای آنتی‌بادی نئوسپورا کنینوم در شتر یک‌کوهانه در جنوب ایران

- **مهدی نام‌آوری** (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
- **حمیدرضا توانایی**
گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
- **آرزو عباسی‌فر**
گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
- **محسن معنویان**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
- **داود نیکو**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۷۳۳۹۸۱۳۲
Email: Namavari@yahoo.com

چکیده:

***نئوسپورا کنینوم*، تک‌یاخته‌ای از شاخه آپی‌کمپلکسا است که از نظر آنتی‌ژنی با *توکسوپلاسما* گونه‌ای متفاوت ولی از نظر ساختمانی بسیار شبیه می‌باشد و موجب بیماری نئوسپوروزیس می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی شیوع آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا* شتر در استان بوشهر واقع در جنوب ایران بود. برای دست‌یابی بدین منظور، نمونه سرم‌های ۹۲ شتر از استان بوشهر جمع‌آوری شد. نمونه‌ها برای تشخیص آنتی‌بادی علیه *نئوسپورا کنینوم* توسط آزمایش آگلوتیناسیون و با استفاده از ۲- مرکاپتواتانول بررسی شدند. نتایج نشان داد که ۲۷ درصد از شترهای آزمایش‌شده مثبت بودند و این نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی به *نئوسپورا کنینوم* در این استان می‌باشد. به‌دلیل شیوع نسبتاً بالا در شتر، می‌توان نتیجه گرفت که این حیوان می‌تواند نقش مهمی در نگه‌داری و انتقال آلودگی در منطقه داشته باشد. این مطالعه اولین گزارش از آلودگی به *نئوسپورا* در شترهای جنوب کشور است.**

واژه‌های کلیدی: آپی‌کمپلکسا، آگلوتیناسیون میکروسکوپیک، تاکی‌زوئیت، رده سلولی Vero ، سرم‌های هایپر ایمن

Applied Animal Science Research Journal No 24 pp: 57-62

High Seroprevalence of Neospora caninum Antibodies in Camels (Camelus dromedarius) in the South of Iran

By: Namavari M.[1]*, Tavanaei H.R. [2], Abasifar A.[2], Manavian M.[1], Nikoo D.[1]
1: Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran
2: Department of Microbiology, Islamic Azad university, Jahrom University

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan from the phylum Apicomplexa, which closely related to Toxoplasma gondii and causes Neosporoasis disease. The aim of this study was to investigate sero-prevalence of *N. caninum* infection in camels (*Camelus dromedaries*) in the south of Iran. A total of 92 camels sera from Bushehr province in the south of Iran were examined by the direct agglutination test for presence of *N. caninum* antibodies. IgG antibodies were assayed by the modified agglutination test using whole tachyzoites of *N. caninum*, incorporating 2-mercaptoethanol. Seropositivities were found in 27 % camels. The high seroprevalence observed in camels suggests that this species is highly exposed to N. caninum in this area. Because of high occurrence of anti- *N. caninum* antibodies in camels in this study, camels may play a serious role in other mammalian Neosporosis in south Iran. This is the first serological survey for *N. caninum* antibodies performed on camels in south Iran.

Key words: Apicomplexa, Cell line (Vero), Hyperimmune serum, Microscopic Agglutination, Tachyzoite

مقدمه

در بیش از ۶۵ درصد از اراضی کشور و به‌ویژه در فلات مرکزی، میزان بارندگی سالانه کمتر از ۱۰۰ میلی‌متر است. کمبود بارندگی و *نئوسپورا کنینوم*[1] به‌عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده سقط‌جنین درگاو مطرح بوده و دارای گسترش جهانی است (Levine, 1988). اهمیت این انگل به‌دلیل خسارات مستقیم ناشی از سقط‌جنین و زیان‌های غیرمستقیم مانند کاهش تولید شیر و تشخیص بیماری می‌باشد. برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد *نئوسپوراکنینوم* روش‌های سرولوژی از جمله روش الایزا[2]، آنتی‌بادی‌های فلوروسانت غیرمستقیم و آزمایش آگلوتیناسیون[3] مستقیم به‌کار می‌رود (Dubey, Buxton and Wouda, 2006; Dubey and Schares, 2011). در چرخه‌ی زندگی *نئوسپورا*، سگ و کایوت[4] میزبان نهایی بوده و گاو و سایر حیوانات اهلی میزبان واسط انگل مطرح هستند (Gondim, *et al*., 2004; King, *et al*., 2010; McAllister, *et al*., 2005; Montoya and Liesenfeld, 2004). گاو ممکن است از طریق خوردن اووسیت‌های هاگ‌دار به انگل مبتلا شود (انتقال افقی)، اما انتقال عمودی راه اصلی انتشار آلودگی در گاوها می‌باشد. انتقال عمودی زمانی اتفاق می‌افتد که تاکی‌زوئیت‌های انگل از جفت مادری که اخیراً به *نئوسپورا کنینوم* آلوده شده است، عبور نموده و جنین را آلوده نماید. این شکل از انتقال می‌تواند در آبستنی‌های بعدی هم در یک گاو صورت گیرد، بنابراین آلودگی می‌تواند از این طریق به نسل‌های بعدی منتقل و در گله‌های آلوده تثبیت شود. آلودگی به این انگل معمولاً مزمن

[1] *Neospora caninum*
[2] Elisa
[3] Agglutination test
[4] Coyote

بوده و می‌تواند تا پایان عمر، دام را تهدید کند (Dubey, Schares and Ortega-Mora, 2007). درحال حاضر اطلاعات محدودی در مورد شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های *نئوسپورا* در شتر در دسترس است. در بررسی منابع نیز موردی در ارتباط با این بیماری در جنوب کشور پیدا نشد. بنابراین بررسی شیوع سرمی *نئوسپورا* شتر در استان بوشهر مورد هدف این مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های خون ۹۲ شتر استان بوشهر، جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها کدگذاری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های خون جهت تشکیل لخته به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از آن لخته توسط اپلیکاتور جدا شد و سرم نیز پس از سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، جمع‌آوری گشت. سرم حاصل توسط نمونه‌بردار به داخل میکروتیوب‌های شماره‌گذاری شده، انتقال داده شد. پس از اتمام کار، میکروتیوب‌ها به فریزر منتقل و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- سلسیوس نگه‌داری شدند.

کشت *نئوسپورا کنینوم* و تهیه آنتی‌ژن آگلوتیناسیون

کشت سلولی برای تهیه تاکی‌زوئیت[5] مورد نیاز طبق روش دوبی و همکاران (۱۹۸۸) و با استفاده از رده سلولی Vero[6] انجام شد. زمانی که ۸۰ تا ۹۰ درصد سلول‌های Vero توسط تاکی‌زوئیت‌های N.C تخریب می‌شدند، محیط کشت حاوی تاکی‌زوئیت جمع‌آوری شد (Dubey, *et al.*, 1988). آنتی‌ژن براساس روش پک‌هامو همکاران (۱۹۹۸) تهیه شد (Packham, Sverlow and Conrad, 1998).

آزمایش آگلوتیناسیون اصلاح شده *نئوسپورا کنینوم* (N-MAT)

انجام آزمایش آگلوتیناسیون طبق روش رومانـد و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد (Romand, Thulliez and Dubey, 1998). از سرم‌ها رقت‌های مختلف از ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۴۰ و ۱:۸۰ میکرولیتر تهیه شد. سپس به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ته گرد ۲۵ میکرولیتر سرم و ۲۵ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول[7] (2ME) اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه برای جدا شدن پیوندهای دی‌سولفیدی از هم به حال خود باقی گذاشته شدند. پس از آن، به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن *نئوسپورا کنینوم* تهیه شده در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز اضافه و ۲۴ ساعت درانکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و روز بعد نتایج قرائت گردید. رقت‌های ۱:۲۰ به بالا به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شد. نمونه‌های سرم به‌همراه یک نمونه شاهد مثبت و یک نمونه منفی مورد آزمایش قرار گرفت. در صورتی که کف چاهک کاملاً پوشیده از رسوب بود، مورد مثبت در نظر گرفته می‌شد و درصورتی که کف چاهک تکمه تشکیل می‌شد، نتیجه منفی بود. در ضمن از سرم‌های هایپر ایمن[8] خرگوش تحت کنترل مثبت و خرگوش‌های غیرایمن برای کنترل منفی استفاده شد (خرگوش با استفاده از تاکی‌زوئیت کشته و ادجوانت فروند[9] ایمن شده بود).

نتایج و بحث

در این مطالعه میزان شیوع تک‌یاخته بیماری‌زای *نئوسپورا* در شترهای استان بوشهر مورد بررسی قرار گرفت. این تک‌یاخته از شاخه آپی‌کمپلکسا[10] بوده که عامل بیماری نئوسپوروزیس می‌باشد. در میان حیوانات اهلی مهم‌ترین شکل بیماری در گاو ایجاد می‌شود که از اهم خسارت آن، سقط‌جنین است. گزارش‌هایی مبنی بر آلودگی طبیعی سایر حیوانات از جمله گوسفند، بز، شتر، گوزن و اسب نیز وجود دارد (Dubey, Buxton and Wouda, 2006). مطالعات سرولوژیک نشان داده که شترها می‌توانند به‌عنوان میزان واسط در انتقال *نئوسپورا* نقش داشته باشند (Wolf, *et al.*, 2005۲۳). *نئوسپورا کنینوم* و *نئوسپوراهوگشی* می‌توانند باعث عفونت نئوسپورزیس در شترها شوند و منجر به از

[5] Tachyzoite
[6] Cell line (Vero)
[7] 2-mercaptoethanol
[8] Hyperimmune serum
[9] Freund's Adjuvant
[10] Apicomplexa

دست دادن جنین و اختلالات عصبی در این حیوانات گردند (Mentaberre, *et al*., 2013).

در این مطالعه از روش آگلوتیناسیون جهت تعیین شیوع *نئوسپورا* در شترها استفاده شد. به علت حضور طولانی مدت *نئوسپورا کنینوم*، اکثر عفونت‌های ناشی از این انگل مانند *توکسوپلاسما گوندی* به صورت مزمن بوده و باعث برانگیختن پاسخ ایمنی می‌گردند که توسط روش‌های مختلف نشان داده می‌شود. در طی دو دهه اخیر نیز روش آگلوتیناسیون قابلیت خود را به عنوان یک آزمایش حساس، اختصاصی، ساده، سریع و ارزان و دارای کاربردهای چندگانه[11] نشان داده است. همان‌گونه که روش انجام این آزمایش مشخص می‌کند، آزمایش آگلوتیناسیون نیاز به هیچ‌گونه دستگاه گران قیمت برقی ندارد و به‌راحتی در هر آزمایشگاه، انجام و به حداقل اطلاعات قبلی نیاز دارد. مقدار آنتی‌ژن لازم در غالب آزمایشاتی که از روش آگلوتیناسیون استفاده می‌کنند کم است (Dubey, Acland and Hamir, 1992). به این ترتیب این روش در مورد سیستم‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی که در آن‌ها مقدار آنتی‌ژن قابل دسترسی بسیار کم است کاملاً مناسب و شاید بی‌رقیب باشد (Packham, Sverlow and Conrad, 1998). هم‌چنین روش آگلوتیناسیون مستقیم به دلیل عدم نیاز به آنتی‌بادی ثانویه امکان بررسی گونه‌های مختلف حیوانی که ممکن است با *نئوسپورا کنینوم* آلوده شوند را به‌راحتی فراهم می‌سازد. آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپیک N-MAT[12]، اختصاصی حیوانات آلوده بوده و ضمن حساسیت بالا در آزمایش‌های تجربی و طبیعی، قابلیت تکرار بالایی دارد. به‌علاوه در مقایسه با سایر آزمایش‌های سرولوژیک نظر به استفاده از کمترین ابزار و مواد آزمایشگاهی، ارزان، سریع و آسان باشد و به‌راحتی خوانده می‌شود. در مقایسه با نتایج به دست آمده با روش آزمایش آنتی‌بادی‌های فلوروسانت (IFAT)[13] به نظر می‌رسد که روش آزمایشی فوق قابل اعتماد برای تشخیص سرولوژیکی در گونه‌های مختلف حیوانی باشد و به‌خوبی می‌تواند در بسیاری از مواقع جایگزین IFAT شود (Packham, Sverlow and Conrad, 1998). گزارش‌ها مشخص نموده که میزان تکثیر تاکی‌زوئیت *نئوسپورا* روی رده سلولی طبیعی Vero نسبت به سایر سل لاین‌ها بهتر عمل می‌کند (Khordadmehr, *et al*., 2013). لذا در این پژوهش برای تهیه آنتی‌ژن مناسب از کشت *نئوسپورا* روی رده سلولی Vero استفاده شد (Hemphill *et al*., 2009).

نتیجه این مطالعه نشان داد که در ۲۷ درصد (۲۵ از ۹۲ مورد) از سرم شترهای مورد آزمایش آنتی‌بادی علیه *نئوسپورا* وجود دارد. در سایر کشورها اختلاف فاحشی در میزان شیوع *نئوسپورا* در شتر گزارش شده است. شیوع این بیماری در مصر و آرژانتین به ترتیب ۳/۷ و ۴/۶ درصد و در جزایر قناری تا ۸۶ درصد نیز اعلام شده است (Lindsay, 2001; Al-Ani , 2004). در کشور امارت که در جنوب استان بوشهر واقع شده میزان شیوع برابر با ۱۳/۷ درصد نسبتاً نزدیک به مطالعه حاضر است (Wernery, *et al*., 2008). در یک بررسی در مورد شترهای شمال شرق کشور و استان یزد میزان شیوع *نئوسپورا* به‌ترتیب ۵/۸ و ۳/۹ درصد گزارش شده است (Sadrebazzaz, Haddadzadeh and Shayan, 2006). از مناطق مجاور استان بوشهر گزارشی از میزان آلودگی به *نئوسپورا* در شتر یافت نشد و مطالعه کنونی، اولین بررسی سرولوژیک برای آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا* در شتر در جنوب ایران می‌باشد. لیکن میزان شیوع *نئوسپورا* در گاو در استان فارس واقع در شمال استان بوشهر ۳۳ درصد است که بسیار نزدیک به میزان آلودگی در این مطالعه می‌باشد (Namavari, *et al*., 2011).

درمقایسه با گزارش‌های اعلام شده فوق در مورد سایر نقاط ایران، این ناحیه بالاترین میزان شیوع را به خود اختصاص داده است. این میزان شیوع در شترهای این منطقه نشان می‌دهد، این حیوان در معرض آلودگی نسبتاً بالای *نئوسپورا* قراردارد و می‌تواند سهم به‌سزایی به‌عنوان میزبان واسط بیماری نئوسپوروزیس برای سایر پستانداران در جنوب ایران داشته باشد. با توجه به این میزان از آلودگی، این منطقه، می‌تواند محل مناسبی برای ارزیابی واکسن‌های تحت مطالعه قرار بگیرد.

[11] Versatile

[12] Microscopic Agglutination Test (MAT)

[13] Immuno Flurescent Antibody Technique (*IFAT*)

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی استان فارس در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۱۱۱۶-۱۸-۸۴-۲ تامین شده است و در آزمایشگاه ملی *نئوسپورا* مراحل اجرایی آن انجام گرفته است .

منابع

Al-Ani, FK. (2004). Camel management and diseases. Al-Sharq Printing Press.

Dubey, J. P. and Schares, G. (2011). Neosporosis in animals – The last five years. Veterinary Parasitol. 180: 90–108.

Dubey, J. P., D. Buxton and Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine Neosporosis. Journal of Comparative Pathology.134:267–289.

Dubey, J. P., G. Schares and Ortega-Mora, L.M. (2007). Epidemiology and control of Nosporosis and Neosporacaninum. Clinical Microbiology Reviews. 20: 323–367.

Dubey, J. P., H. M. Acland and Hamir, A.N. (1992). Neosporacaninum (*apicomplexa*) in a stillborn goat. Journal of Parasitology. 78:532–534.

Dubey, J. P., J. L. Carpenter, C. A. Speer, M. J. Topper and Uggla, A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association.192:1269–1285.

Gondim, L. F., M. M. McAllister, W. C. Pitt and Zemlicka, D.E. (2004). Coyotes (*Canislatrans*) are definitive hosts of Neosporacaninum. International Journal of Parasitol. 34:159–161.

Hemphill, A., N. Vonlaufen, A. Naguleswaran, N. Keller, M. Riesen, N. Guetg, S. Srinivasan and Alaeddine, F. (2009). Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing Neosporacaninum and its interactions with the host cell. Microscopy and Microanalysis.10:602–620.

Khordadmehr, M., M. Namavari, A. Khodakaram-Tafti, M. Mansourian, A. Rahimian and Daneshbod, Y. (2013). Comparison of use of Vero cell line and suspension culture of murine macrophage to attenuation of virulence of Neosporacaninum. Research in Veterinary Science. 95:515–521.

King, J.S., J. Slapeta, D. J. Jenkins, S. E. Al-Qassab, J. T. Ellis and Windsor, P.A. (2010). Australian dingoes are definitive host of Neosporacaninum. International Journal of Parasitology. 40:945–950.

Levine, N.D. (1988). Progress in taxonomy of the apicomplexan protozoa. Journal of Eukaryotic Microbiology. 35:518–520.

Lindsay, D.S. (2001). Neosporosis: an emerging protozoal disease of horse. Equine Veterinary Journal. 33:116-118.

McAllister, M. M., R. L. Wallace, C. Björkman, L. Gao and Firkins, L.D. (2005). A probable source of Neosporacaninum infection in an abortion outbreak in dairy cows. Bovine Practice. 39:69–74.

Mentaberre, G. 1., C. Gutiérrez, N. F. Rodríguez, S. Joseph, D. González-Barrio, O. Cabezón, J. de la Fuente, C. Gortazar and Boadella, M. A (2013). Transversal study on antibodies against selected pathogens in dromedary camels in the Canary Islands, Spain. Veterinary Microbiology. 67(3-4):468-73.

Montoya, J. G. and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. Lancet. 363:1965–1976.

Namavari, M., M. Mansourian, A. Khodakaram-Tafti, M. H. Hosseini, A. Rahimiyan, M. Khordadmehr and Lotfi, M. (2011). Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of Neosporacaninum tachyzoites. Comparative Clinical Pathology.1346–1349.

Packham, A.E., K. W. Sverlow and Conrad, P.A. (1998). A modified agglutination test for Neosporacaninum: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 5: 467-473.

Romand, S., P. Thulliez and Dubey, J.P. (1998). Direct agglutination test for serologic diagnosis of Neosporacaninum infection. Parasitol Research. 84(1):50–53.

Wernery, U., R. Thomas, R. Raghaven, G. Syriac, S. Joseph and Georgy, N. (2008). Seroepidemiological studies for the detection of antibodies against 8 infectious diseases in dairy dromedaries of the United Arab Emirates using modern laboratory techniques – Part II. Journal Camel Practice Research.15: 139 - 145.

A. Cordero, A. Barwald, F. J. Conraths, M. Gauly, H. Zahner and Bauer, C. (2005). Detection of specific antibody to Neosporacaninum and oxoplasmagondin naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicunas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. Veterinary Parasitol.130 (1-2):81-7.