Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 17, No. 3, Autumn 2017, Pages 343-352

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

Genotyping of Zoonotic *Toxoplasm gondii* Isolated from Aborted Fetuses of Ewes of Lorestan Province Based on SAG2 ،SAG3 and GRA6 Molecular Markers

Nourmohammadi M[1], Hamidinejat H[1*], Tabandeh MR[2], Goraninejad S[3], Bahrami S[1]

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, Email: hamidinejat@yahoo.com

received: Apr 21, 2017 accepted: Sep 23, 2017

ABSTRACT

Background & objectives: *Toxoplasma gondii* is a zoonotic obligate intracellular protozoan parasite that infects all warm-blooded animals as well as human worldwide. Determining the parasite genotype in intermediate hosts is crucial in evaluating the role of these types in human infections as wll as in prevention programs. Therefore, this study aimed to identify and detect the genotypes of Toxoplasma gondii in aborted fetuses of ewes in Lorestan province.

Methods: Identification of the parasite was performed on the brain and liver tissues of 142 aborted fetuses using a conventional PCR based on amplification of highly repetitive 529 bp region of the parasite genome. Genotyping of positive samples, which were isolated from the brain and liver, was performed by PCR-RFLP based on SAG2, SAG3 and GRA6 molecular markers.

Results: From a total of 142 samples obtained from brain and fetus, 10 cases (7%) were determined as positive samples based on conventional PCR. The precence of parasite DNA was also confirmed in the liver of 3 positive samples. Evaluation of RFLP pattern of amplified SAG2, SAG3 and GRA6 genes showed the presence of various types of parasites, incuding type I in 3 samples, type II in 2 samples and atypical type in 5 samples.

Conclusion: Isolation of types I, II and atypical type of *T. gondii* from ewes in Lorestan province suggests the need for greater attention to parasite transmission from livestock to human, particularly in pregnant women and people with weakened immune system.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Zoonotic; Abortion; Genotype; PCR-RFLP.

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

تعیین ژنوتیپ ایزوله‌های زئونوز *توکسوپلاسما گوندای* از جنین‌های سقط‌شده میش‌های استان لرستان بر پایه نشانگرهای مولکولی SAG2، SAG3، GRA6

مرتضی نورمحمدی[۱]، حسین حمیدی نجات [۱]، محمدرضا تابنده[۲]، سعد گورانی‌نژاد[۳]، سمیه بهرامی[۱]*

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران 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: hamidinejat@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: تک یاخته *توکسوپلاسما گوندای* یک انگل تک یاخته‌ای داخل سلولی اجباری زئونوز است که همه حیوانات خونگرم از جمله انسان را در سراسر دنیا آلوده می‌کند. تعیین ژنوتیپ انگل در میزبان‌های واسط در ارزیابی نقش این تیپ‌ها در عفونت‌های انسانی و همچنین برنامه‌های پیشگیری نقش مهمی دارد. لذا این مطالعه با هدف شناسایی و تشخیص ژنوتیپ‌های *توکسوپلاسما گوندای* در جنین‌های سقط شده میش‌های استان لرستان انجام گرفت.

روش کار: شناسایی انگل در نمونه های بافت های مغز و کبد ۱٤۲ راس میش استان لرستان با استفاده از PCR متعارف بر پایه تکثیر قطعه ۵۲۹ جفت بازی نواحی پرتکرار ژنوم انگل انجام شد. شناسایی ژنوتیپ های انگل بر روی نمونه‌های مثبت مغز و کبد نمونه جنین سقط شده میش آلوده با روش PCR-RFLP و با استفاده از ۳ مارکر ژنتیکی SAG3، SAG2،GRA6 انجام پذیرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۱٤۲ نمونه مغز و جنین جمع آوری شده، در ۱۰ مورد (۷٪) حضور انگل با روش PCR مستقیم شناسایی شد. حضور DNA انگل در کبد ۳ مورد از نمونه‌های مثبت نیز شناسایی گردید. ارزیابی الگوی RFLP محصولات ژنی SAG2، SAG3 و GRA6 وجود ۳ نمونه سویه تیپ I، ۲ نمونه سویه تیپ II و ۵ نمونه سویه غیرتیپیک را تایید نمود.

نتیجه‌گیری: جداسازی سویه‌های تیپ I، II و غیرتیپیک *توکسوپلاسما گوندایی* از میش‌های استان لرستان نشان دهنده ضرورت توجه بیشتر به انتقال انگل از حیوانات پرورشی به انسان به‌ویژه زنان باردار و افراد با ضعف سیستم ایمنی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *توکسوپلاسما گوندای*، زئونوز، سقط، ژنوتیپ، PCR-RFLP

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۱ **پذیرش:** ۱۳۹۶/۰۷/۰۱

مقدمه

توکسوپلاسما گوندای[۱]، یک تک‌یاخته زئونوز[۲] داخل سلولی اجباری مهم از شاخه آپی‌کمپلکسا[۳] است که توانایی ایجاد توکسوپلاسموز در همه مهره‌داران خون‌گرم از جمله پستانداران و پرندگان در سراسر جهان را دارد. گربه و گربه‌سانان تنها میزبانان نهایی شناخته شده این انگل هستند که اُآسیست‌های[٤] انگل را از راه مدفوع در محیط پخش می‌کنند [۲،۱]. در بدن میزبان واسط انگل به اشکال تاکی‌زوئیت[۵] و سپس برادی‌زوئیت[۶] درون کیست‌های نسجی در می‌آید.

[1] *Toxoplasma gondii*
[2] Zoonosis
[3] Apicomplexa
[4] Oocystes
[5] Tachyzoite
[6] Bradyzoite

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

آلودگی انسان از راه‌های مختلفی صورت می‌گیرد اما انسان عمدتاً از سه طریق بلع ٱٱسیست‌های عفونت زا از راه آب یا مواد غذایی آلوده، خوردن گوشت خوب پخته نشده حاوی کیست‌های انگل و نیز انتقال آلودگی از مادر به جنین به توکسوپلاسموز مبتلا می‌شود. محدوده تظاهرات این بیماری در میزبانان واسط از عفونت‌های مزمن در اغلب حیوانات تا اشکال حاد و کشنده در برخی دیگر متغیر است [۳]. علامت مهم بالینی بیماری در میزبانان واسط (انسان، گوسفند و بز)، سقط و یا آسیب‌های دیگر به جنین از قبیل آنسفالیت، آب آوردگی سر در جنین و متعاقباً زایش جنین ناقص‌الخلقه است [٤]. در افراد دارای نقص ایمنی نیز توکسوپلاسموز منجر به آنسفالیت‌های کشنده می‌گردد. اختلال در جنین‌های آلوده در اثر توکسوپلاسموز در سراسر جهان مورد تأمل قرار گرفته و این امر باعث خسارات بهداشتی و اقتصادی قابل توجه به جوامع انسانی و صنعت دامپروری در تمام دنیا از جمله نیوزلند، استرالیا، بریتانیا، نروژ، ایالات متحده آمریکا و سایر کشورها شده است [۵،۲]. تشخیص توکسوپلاسموز عمدتاً بر پایه روش‌های مولکولی، بیولوژیکی، سرولوژیکی، هیستوپاتولوژی، ایمیونوهیستوشیمی، گسترش مستقیم و یا ترکیبی از آن‌ها صورت می‌گیرد [۶،۲]. در سال‌های اخیر تأکید زیادی بر روی آنالیز ژنتیکی جدایه‌های *توکسوپلاسما گوندای* و اهمیت آنها در ایجاد بیماری شده، بطوریکه مدارک زیادی در مورد ارتباط بین تیپ سویه و نتیجه بیماری ناشی از آن بدست آمده است [۷]. از آنجائیکه شناسایی ژنوتیپ‌های انگل در میزبان‌های واسط در ارزیابی نقش آن‌ها در عفونت‌های انسانی و برنامه‌های پیشگیری نقش مهمی دارد و با توجه به اهمیت *توکسوپلاسما گوندای* در پزشکی و دامپزشکی، می‌توان با بکارگیری تکنیک‌های تعیین ژنوتیپ تا حدودی ویژگی‌های بیولوژیکی این انگل را پیش‌بینی و با استفاده از راه‌های کنترل و پیشگیری، از جمله طراحی دی.ان.ای. واکسن‌ها، میزان شیوع عفونت را در جمعیت‌های انسانی و حیوانی کاهش داد. مغز و کبد مهم‌ترین اندام‌های استقرار *توکسوپلاسما* هستند. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی مغز و کبد جنین‌های سقط شده میش‌های استان لرستان جهت شناسایی *توکسوپلاسما گوندای* و تعیین ژنوتیپ جدایه‌های انگل به روش PCR-RFLP[1] بر روی ژن‌های SAG_2[2]، SAG3 (آنتی‌ژن‌های اصلی سطحی)و GRA6[3] (پروتئین متراکم گرانولی که توسط تاکی‌زوئیت و برادی‌زوئیت بیان می‌شود) به عنوان یک روش کارآمد و مطمئن بوده است.

روش کار

این مطالعه به روش مقطعی[4] صورت گرفته است. از مرداد ماه سال ۱۳۹٤ تا دی ماه ۱۳۹۵، تعداد ۱٤۲ نمونه جنین سقط شده میش‌های ارجاعی به بیمارستان‌های دامپزشکی شهرستان‌های استان لرستان (خرم‌آباد، الشتر، پلدختر، الیگودرز، کوهدشت و بروجرد) با عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۳۷ دقیقه تا ۳٤ درجه و ۲۲ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ٤۶ درجه و ۵۱ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۳۰ دقیقه شرقی، واقع در غرب ایران به‌صورت نمونه‌برداری تصادفی خوشه‌ای جداسازی شدند. شهرهای واقع در چهار جهت اصلی جغرافیایی (شمال، جنوب، شرق و غرب) و مرکز استان به عنوان خوشه‌های اصلی در نظر گرفته شدند. نمونه‌های مغز و کبد جنین‌ها تا انجام آزمایشات تکمیلی در دمای ۷۰°C- نگهداری و سپس به‌منظور ارزیابی‌های مولکولی به دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز انتقال و بررسی‌های ژنوتیپی صورت پذیرفت.

---

[1] Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
[2] Surface Antigen
[3] Dense Granule Antigen
[4] Cross-Sectional

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

استخراج DNA

در ابتدا ۱ گرم از نمونه‌های بافتی با ازت مایع پودر شد و جدا سازی DNA[1] با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA[2] (سینا کلون، ایران) بر روی حداقل ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافتی انجام پذیرفت.

آزمون PCR بمنظور تشخیص *توکسوپلاسما گوندای*

به‌منظور شناسایی حضور انگل در نمونه‌های بافتی، پس از جداسازی DNA، آزمون PCR به‌منظور تکثیر توالی تکراری ۵۲۹bp[3] اختصاصی انواع تیپ‌های *توکسوپلاسما گوندای* با استفاده از پرایمرهای TOX[4] انجام پذیرفت (تصویر ۱). برای کنترل مثبت از DNA تهیه شده از تاکی‌زوئیت انگل موجود در بخش انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید [۸].

آزمون PCR-RFLP به‌منظور تعیین ژنوتیپ‌های *توکسوپلاسما گوندای*

به‌منظور تعیین ژنوتیپ نمونه‌های انگلی تایید شده، از ۳ مارکر ژنتیکی SAG3، SAG2،GRA6 استفاده گردید [۹].

جدول ۱. خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق [۱۰].

نام ژن	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر	آنزیم‌های برشی
Tox	۵۲۹	CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-5 CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT	---------
SAG2	۵۴۶	ACCCATCTGCGAAGAAAACG ATTTCGACCAGCGGGAGCAC	Hinf I.Taq I
SAG3	۳۱۱	CAACTCTCACCATTCCACCC3 GCGCGTTGTTAGACAAGACA	Nci I
GRA6	۳۴۴	GRA6-F1:TTTCCGAGCAGGTGACCT GRA6-R1x:TCGCCGAAGAGTTGACATAG	Mse I

توالی‌های DNA مارکرهای ژنتیکی مذکور با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی تکثیر شدند. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول شماره ۱ آمده است. واکنش PCR در حجم ۲۰µL حاوی ۱۰µL از مخلوط واکنش آماده PCR (آمپلیکون، دانمارک) (دارای کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مول، مخلوط dNTP[5] ۲۵۰ میلی مول و ۵ IU آنزیم Taq DNA polymerase)، ۰/۵µL از هر کدام از پرایمرهای جلویی و عقبی با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۳µL (۱۰۰ نانو گرم) از DNA استخراج شده و ۶µL آب مقطر انجام گرفت. واکنشPCR در دستگاه ترموسایکلر matercycler (اپندورف، آلمان) شامل ۳۵ چرخه، ۹۴°C به‌مدت ۱ دقیقه، ۵۸°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۱ دقیقه انجام پذیرفت. یک مرحله واکنش در دمای ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه در ابتدای واکنش و یک مرحله در دمای ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه در انتهای واکنش انجام شد (تصویر۲). به‌منظور ارزیابی الگوی RFLP، محصولات PCR ژن‌های SAG2، SAG3 وGRA6 واکنش هضم با استفاده از آنزیم‌های برشی هر ژن انجام گرفت. به‌منظور انجام واکنش هضمµL۱۰ از محصولات PCR مر حله دوم با ۱۰µL از محلول واکنش هضمی حاوی ۲µL از بافر هر آنزیم، ۲µL از آنزیم‌های برشی اختصاصی (فرمنتاز، لیتوانی) (Hinf I و Taq I برای ژن SAG2، Mse I برای ژن GRA6 و Nci برای SAG3) و ۶µL آب مقطر مخلوط و نمونه ها به مدت ۲ تا ٤ ساعت

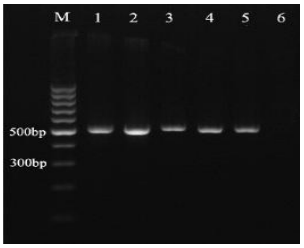
[1] Deoxy Ribonucleic Acid
[2] Extraction Kit (DNP TM)
[3] base pair
[4] *Toxoplasma*
[5] Deoxynucleotides

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در ژل آگارز ۲ درصد حاوی رنگ بی‌خطر[1] (سیناژن، ایران) الکتروفورز گردید. ژنوتیپ هر انگل با استفاده از الگوی برش محصولات PCR توصیف شده توسط سو سی[2] و همکاران تعیین گردید [۱۰].

یافته‌ها

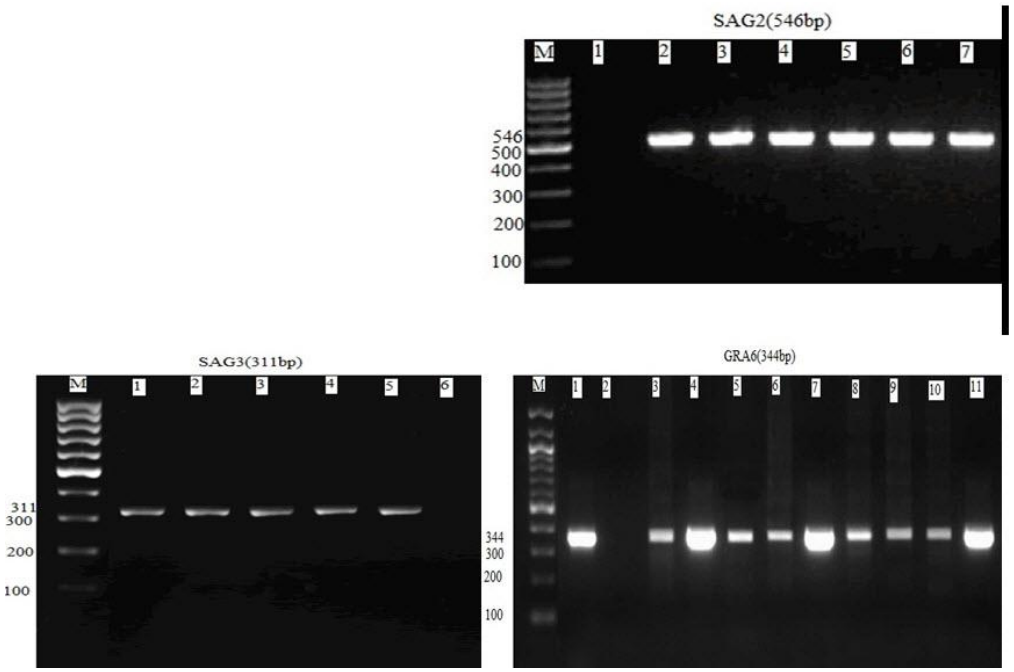
از مجموع ۱٤۲ نمونه مغز جنین جمع آوری شده، در ۱۰ مورد (۷٪) حضور انگل با روش PCR مستقیم تایید گردید. حضور DNA انگل در کبد ۳ مورد از نمونه‌های مثبت نیز شناسایی گردید (جدول ۲).



تصویر ۱. محصول PCR ناحیه پرتکرار ۵۲۹ bp ژنوم *توکسوپلاسما گوندای* در نمونه‌های مغز و کبد جنین‌های سقط شده. M: مارکر استاندارد DNA به طول ۱۰۰ bp، شماره ۱، ۲ و ۳ نمونه مغز، ٤ نمونه کبد، ۵ کنترل مثبت و ۶ کنترل منفی

جدول ۲. تعداد نمونه‌های جمع آوری شده و موارد مثبت جداسازی شده در شهرستان‌های استان لرستان

شهرستان	خرم‌آباد	الشتر	بروجرد	الیگودرز	کوهدشت	پلدختر	جمع
تعداد نمونه	۲۸	۲۱	۲۲	۲۰	۲۵	۲۶	۱٤۲
مغز(+)	۳	۰	۱	۰	۲	٤	۱۰
کبد(+)	۰	۰	۰	۰	۱	۲	۳



تصویر ۲. نتایج آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن‌های SAG2، SAG3 و GRA6 منجر به تکثیر باندهایی به طول ۵٤۶، ۳۱۱ و ۳٤٤ گردید. M: مارکر استاندارد DNA ۱۰۰bp

پس از ژنوتیپینگ با استفاده از روش PCR-RFLP با استفاده از ۱۰ نمونه مثبت جداسازی شده، ۳ نمونه (۳۰٪) سویه تیپ I، ۲ نمونه (۲۰٪) سویه تیپ II و ۵ نمونه (۵۰٪) سویه غیرتیپیک تشخیص داده شدند که در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.

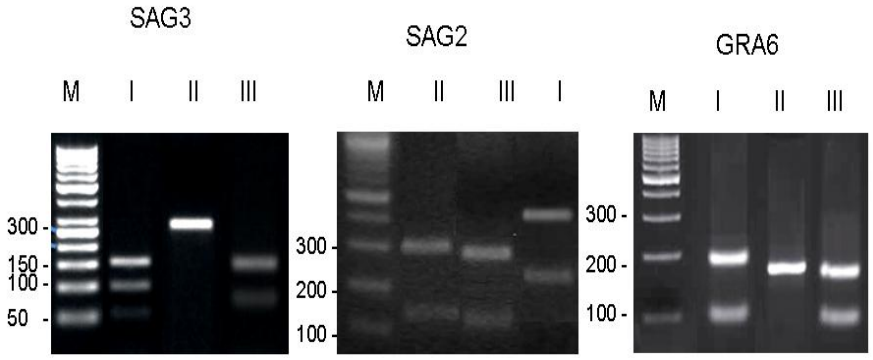
[1] SafeStain
[2] Su c

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

جدول ۳. ژنوتیپینگ جدایه‌های *توکسوپلاسما گوندای* در استان لرستان

شماره	نمونه	نمونه	SAG2	GRA6	SAG3	ژنوتیپینگ
1	مغز	-	I	I	I	I
2	مغز	-	I	I	III	غیرتیپیک
3	مغز	کبد	II	II	II	II
4	مغز	-	I	I	I	I
5	مغز	-	II	I	I	غیرتیپیک
6	مغز	-	I	III	I	غیرتیپیک
7	مغز	-	II	II	II	II
8	مغز	کبد	I	I	III	غیرتیپیک
9	مغز	کبد	II	II	III	غیرتیپیک
10	مغز	-	I	I	I	I

برش ژن SAG2 با استفاده از آنزیم Hinf I و Taq Iدر ژنوتیپ I باندهایی به طول۱۸۰ و ۳۸۰bp، در ژنوتیپ II باندهایی به طول ۱۰۰ وbp ۲۸۰ و در ژنوتیپ III باندهایی به طول ۱۲۰ و ۳۰۰bp بر روی ژل آگارز را نشان داد (تصویر ۳). برش ژن SAG3 با استفاده از آنزیمNci I در ژنوتیپ I باندهایی به طول ۶۰، ۸۰ و ۱۲۰ bp و در ژنوتیپ II باندهایی به طول ۲۸۰ bp و در ژنوتیپ III باندهایی به طول ۸۰ و bp ۱۸۰ بر روی ژل آگارز را نشان داد (تصویر ۳). برش ژن GRA6 با استفاده از آنزیم Mse I در ژنوتیپ I باندهایی به طول ۱۰۰ و bp ۲۰۰، در ژنوتیپ II باندهایی به طول bp ۱۷۰ و در ژنوتیپ III باندهایی به طول ۱۰۰ و bp ۱۷۰ بر روی ژل آگارز را نشان داد (تصویر ۳).



تصویر ۳. برش ژن‌های SAG2، SAG3، GRA6 بر روی ژل آگاروز را نشان می‌دهد. M: مارکر استاندارد DNA، ژنوتیپ I، ژنوتیپ II، ژنوتیپ III

بحث

مطالعه حاضر به عنوان اولین اقدام برای شناسایی ژنوتیپ‌های *توکسوپلاسما گوندای* بر روی جنین‌های سقط شده میش‌های استان لرستان صورت گرفته تا بتواند زمینه انجام مطالعات بعدی جهت کنترل و مبارزه با این انگل را در جمعیت انسانی و حیوانی فراهم نماید. خوردن گوشت‌های نپخته آلوده به کیست‌های بافتی، آب و غذای آلوده شده با اُاُسیست‌ها و یا خوردن اتفاقی اُاُسیست‌های موجود در محیط اطراف به همراه انتقال مادرزادی، از مهمترین راه‌های آلودگی انسان هستند هرچند که خوردن گوشت نپخته بره‌ها به عنوان یک منبع مهم عفونت برای انسان به‌ویژه زنان باردار مطرح است [۱۱]. نقش *توکسوپلاسما گوندای* در سقط نشخوارکنندگان کوچک به صورت جهانی گزارش شده و در ایران نیز میزان بالایی از بروز سقط و ضررهای اقتصادی ناشی

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

از توکسوپلاسموز در گوسفندان دیده شده است [۱۲]. اغلب جدایه‌های *توکسوپلاسما گوندای* از منابع انسانی و حیوانی در ۳ گروه ژنوتیپی I، II و III دسته بندی شده‌اند. تفاوت‌های بیولوژیکی چشمگیری میان تیپ سویه‌های مختلف *توکسوپلاسما گوندای* مشاهده گردیده، بطوریکه تیپ I برای موش‌ها کشنده ولی تیپ‌های II و III، حدت کمتری دارند. تیپII به‌عنوان عامل اصلی ماندگاری عفونت در گوسفند و بز شناسایی شده و بیشترین عفونت‌های انسانی نیز در ارتباط با همین تیپ می‌باشند [۱۳،۱٤،۱۵]. نتایج تحقیقات اخیر، نشان دهنده ارتباط بین تیپ II و سقط جنین در گوسفند می‌باشند ولی با این وجود عفونت تیپ I نیز ممکن است به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده سقط در میش‌ها مطرح باشد در نتیجه می‌توان با بکارگیری تکنیک‌های ژنوتیپینگ انگل تا حدودی ویژگی‌های بیولوژیکی آن را پیش‌بینی و قابلیت زئونوتیک آن را بررسی نمود [۱۵،۱۶،۱۷]. در مطالعه حاضر، اطلاعات به دست آمده بر اساس استخراج مستقیم DNA از بافت‌های عفونی شده طبیعی صورت گرفته است. نتایج این مطالعه نشان داد که مطالعات مولکولی برای شناسایی عفونت‌های *توکسوپلاسما گوندای* و تعیین ژنوتیپ آن می‌تواند به‌صورت مستقیم بر روی نمونه‌های بافتی آلوده به عنوان روشی سریع و با حساسیت و ویژگی بالا انجام پذیرد. تعیین مستقیم ژنوتیپ انگل بر روی نمونه‌های کلینیکی در مقایسه با تکنیک‌های وقت‌گیر که نیازمند رشد انگل بوده و احتمال از دست رفتن نمونه ها در طول کشت یا تزریق به موش وجود دارد، مفیدتر و کارآمدتر می‌باشد [۱۶،۱۸]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ۳۰ درصد سویه‌ها تیپI، ۲۰ درصد تیپ II و ۵۰ درصد غیر تیپیک بودند. تیپII شایع‌ترین سویه در اروپا و آمریکای شمالی است [۱۹]. ممکن است شرایط ژئوگرافی و اکولوژی مشابه باعث گسترش ژنوتیپ‌های مشابه در دو منطقه مختلف گردد [۲۰]. برتری و شیوع بالای تیپ II ممکن است به دلیل قابلیت سازگاری و قدرت تکثیر بالای آن برای رقابت و ماندگاری نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها و همچنین به‌دلیل توانایی بالای انگل در تشکیل کیست‌های بافتی مربوط به آن باشد [۲۱]. تیپII سویه برتر در عفونت‌های فرصت طلب در افراد با نقص سیستم ایمنی و نیز توکسوپلاسموز مادرزادی در اروپا است [۱۹]. نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که تنوع بالای ژنتیکی *توکسوپلاسما گوندای* با شرایط اقلیمی نیز ارتباط مستقیم دارد. برتری کلونی تیپII در منطقه اتیوپی، بر اساس تاریخچه طولانی پرورش حیوانات و اهلی‌سازی و همنشینی آن‌ها با حیوانات مزرعه صورت گرفته و بهبود شرایط مکان‌های طبیعی متعاقب آن منجر به کاهش تنوع ژنتیکی انگل گردیده است [۲۱]. عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۱، از ارگان‌های مختلف گوسفند و بز کشتار شده در کشتارگاه شیراز نمونه برداری و با استفاده از روش PCR، شیوع عفونت *توکسوپلاسما گوندای* را در گوسفند، ۳۷/۵ و در بز ۲۲/۷ درصد گزارش کردند. این یافته‌ها سطح بالایی از عفونت *توکسوپلاسما گوندای* را در حیوانات کشتار شده که ممکن است به‌عنوان منبع اصلی عفونت برای انسان مورد تامل قرار گیرند را نشان می‌دهد[۲۲]. ضیاعلی و همکاران در سال ۲۰۰۷، با بررسی مولکولی ۱۰۵ گوسفند به روش PCR-RFLP، توانستند ٤ سویه *توکسوپلاسما گوندای* را جدا سازی کنند، بطوری‌که دو مورد از جدایه‌ها، سویه تیپ II و دو مورد دیگر سویه تیپ III بودند. نشانگر GRA6 می‌تواند تفاوت بین ۳ ژنوتیپ اصلی *توکسوپلاسما گوندای* و همچنین برخی از ژنوتیپ‌های غیر تیپیک را به‌خوبی مشخص کند [۲۰]. داده‌های منتشر شده قبلی نشان می‌دهند که ژنوتیپ II، سویه غالب در گوسفند است، اما مطالعات اخیر حاکی از حضور تیپ I نیز در این حیوان است [۲،۲۳]. در ایران حبیبی و همکاران در سال ۲۰۱۲، با بررسی ۱۸ جنین سقط شده گوسفند در استان قزوین به روش PCR-RFLP نشان دادند که ۶۶ درصد

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

نمونه‌های جنین سقط شده گوسفند به وسیله تیپ I عفونی شده‌اند و درنتیجه عفونت تیپ I *توکسوپلاسما گوندای* ممکن است بعنوان یکی از عوامل ایجاد کننده سقط در میش‌های آبستن مطرح باشد [۱۷]. دانه چین و همکاران در سال ۲۰۱۳ توانستند DNA *توکسوپلاسما گوندای* را از ٥٤ درصد مغز جنین‌های سقط شده میش‌ها به‌روش PCR-RFLP در استان خراسان رضوی جدا کنند. تمامی جدایه‌ها بر پایه لوکوس GRA6، وابسته به تیپ I بودند(٢٤). دومتری[1] و همکاران با بررسی ۸ جدایه *توکسوپلاسما گوندای* از گوسفندان عفونی به‌روش PCR-RFLP در فرانسه بر پایه لوکوس SAG_2 نشان دادند که تمامی جدایه‌ها متعلق به سویه تیپ II بودند [۲]. جیووانا چزا[2] و همکاران، از ۱۶۱ نمونه بافتی جنین‌های سقط شده گوسفند به روش PCR-RFLP در ایتالیا، DNA *توکسوپلاسما گوندای* را از ۵ جفت، ١٤ مغز و ۲ کبد جدا کردند. تمام جدایه‌ها متعلق به سویه تیپ II بودند [۹]. ترکیب ژنتیکی ژنوتیپ‌های غیر کولونال *توکسوپلاسما گوندای* کاملاً متنوع است و اغلب ژنوتیپ‌های غیر کولونال، ترکیبی از آلل‌های تیپ I، II و III از لوسی‌های متفاوت هستند هرچند که این مساله کاملاً روشن نشده که ژنوتیپ‌های آن‌ها نوترکیب‌های ساده از تقاطع‌های ژنتیکی از کلونی تیپ I، II و III هستند یا اینکه سویه‌های انشعاب یافته از این سویه‌ها می‌باشند [۲۵].

نتیجه‌گیری

شناسایی سویه‌های غیر تیپیک (٥٠٪) و اختلاف در نوع ژنوتیپ‌های گزارش شده *توکسوپلاسما گوندای* در استان لرستان می‌تواند به علت تفاوت در نوع سویه انتخابی، شیوع اپیدمیولوژیکی انگل و راه‌های انتقال آلودگی در مناطق مختلف این استان باشد. دسترسی گربه‌های خانگی به محیط بیرونی، فراوانی گربه‌ها و گربه‌سانان وحشی و همراه شدن با روش‌های گسترده مدیریت حیوانات اهلی در این استان، ممکن است شرایط مطلوبی برای افزایش انتقال توکسوپلاسموز و احتمال افزایش آلودگی تصادفی گربه‌ها با ۲ ژنوتیپ مختلف را فراهم کند که متعاقباً این مساله باعث نوترکیبی جنسی و ظهور ژنوتیپ‌های غیرتیپیک می‌گردد [۲۱]. لذا پیشنهاد می‌گردد که با استفاده از تعداد بیشتری از نشانگرهای مولکولی و همچنین نمونه‌های جنین‌های سقط شده گوسفندان در این استان، زمینه تحقیقات گسترده‌تری فراهم گردد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که جدایه‌های تیپ I و II *توکسوپلاسما گوندایی* می‌توانند به عنوان یکی از عوامل مهم سقط جنین میش‌ها و همچنین یک منبع مهم عفونت برای انسان (گوشت نپخته بره‌ها) به‌ویژه زنان باردار مطرح باشند. همین امر می‌تواند پایه‌گذار روش‌هایی برای کنترل، پیشگیری و توسعه یک واکسیناسون موثر و کارآمد در جمعیت انسانی این استان برعلیه این بیماری زئونوز باشد، هرچند که در این تحقیق به دلیل روش‌های سنتی پرورش گوسفندان و صعب العبور بودن جاده‌های عشایری و روستایی استان لرستان، دسترسی آسان به جنین‌های سقط شده، بسیار سخت و دشوار بود و از طرف دیگر بایستی به صورت کاملاً جدی، خطرات ناشی از انتقال بیماری‌های مشترک به‌خصوص بروسلوز، مد نظر محققین قرار می‌گرفت.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکترای تخصصی انگل‌شناسی دامپزشکی مصوب گروه پاتوبیولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز می‌باشد. نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران بدلیل تامین هزینه‌های تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

[1] Dumetre
[2] Giovanna Chessa

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021

References

1-Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009 Jul;39(8):895-901

2-Dubey JP. Toxoplasmosis of Animals and Humans, 2nd ed. USA: CRC Press, 2009:119-136

3-Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000 Nov;30(12-13):1217-58.

4-Abu-Dalbou MA, Ababneh MM, Giadinis ND and Lafi SQ. Ovine and Caprine Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). IJVST. 2010; 2(2): 61-76.

5-Buxton D, Maley SW, Wright SE, Rodger S, Bartley P, Innes EA. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. Vet Parasitol. 2007 Oct; 149(1-2): 25-8.

6-Terpsidis K, Papazahariadou MG, Taitzoglou IA, Papaioannou NG, Georgiadis MP, Theodoridis IT. *Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats. Exp Parasitol. 2009 Mar; 121(3): 238-41.

7-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 Aug;5(4): 438–42.

8-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 Jan; 30(1): 69–75.

9-Chessa G, Chisu V, Porcu R, Masala G. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* Type II in sheep abortion in Sardinia, Italy. Parasite. 2014 Feb; (21): 6.

10-Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCRRFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. Int J Parasitol. 2006 Jun; 36(7): 841-8.

11-Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ. 2000 Jul; 321(7254): 142-7.

12-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 Puawy. 2008 Apr; (52): 369–71.

13-Saeij JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. Trends Parasitol. 2005Oct; 21(10): 476–481.

14-Dubey JP, Weiss, LM, Kim K. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii*, the model apicomplexan: perspectives and methods, 1st ed. Great Britain: Elsevier, 2007: 1-17.

15-Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 1995 Des;172 (6): 1561–6.

16-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 Apr; 39(4): 1566-70.

17-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 May; 7(3): 64-72.

18-Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Hill DE, et al. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. Int J Parasitol. 2011 Jul; 41(8): 827–33.

19-Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J Infect Dis. 2002 Sep;186 (5): 684–9.

20-Zia-Ali N, Fazaeli A, Khoramizadeh M, Ajzenberg D, Darde M, Keshavarz-Valian H. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. Parasitol Res. 2007 Jun;101 (1): 111–115.

21-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. Parasite Vectors. 2014 Sep; (7): 425.

22-Asgari Q, Sarnevesht J, Kalantari M, Sadat SJ, Motazedian MH, Sarkari B. Molecular survey of *Toxoplasma* infection in sheep and goat from Fars province, Southern Iran. Trop Anim Health Prod. 2011 Feb; 43(2): 389-92.
23-Dubey JP. Toxoplasmosis in sheep--the last 20 years. Vet Parasitol. 2009 Jul; 163(1-2): 1-14.
24-Danehchin L, Razmi Gh, Naghibi A. Isolation and genotyping of Toxoplasma gondii strains in ovine aborted fetuses in Khorasan Razavi province, Iran. Korean J Parasitol. 2016 Feb; 54(1): 15-20
25-Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC, et al. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. Int J Parasitol. 2008 Jul; 38(8-9): 999–1006.

Downloaded from ejournals.arums.ac.ir at 14:33 IRST on Monday January 18th 2021