مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۲، ۱۴۶-۱۴۱
DOI: 10.22059/jvr.2017.207832.2489
Original Article

ردیابی مولکولی توکسوپلاسموزیس مادرزادی در جنین میش‌های کشتارشده در شهرستان خرم‌آباد

زهرا تقی‌زاده[۱] حمیدرضا شکرانی[۲*] علی سوخته‌زاری[۳] حسن نایب‌زاده[۲]
۱) دانش آموخته انگل‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۳) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

(دریافت مقاله: ۲۶ شهریور ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۷ آذر ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: تو کسوپلاسما گوندی یک انگل داخل سلولی است که به طور گسترده در بین گوسفندان در سرتاسر جهان شایع است. آلودگی به این انگل می‌تواند مادرزادی یا اکتسابی باشد. توکسوپلاسموزیس مادرزادی در گوسفند بدنبال نخستین آلودگی در میش آبستن رخ می‌دهد و منجر به سقط جنین و مرده‌زایی و در نتیجه خسارات اقتصادی فراوان به صنعت پرورش گوسفند می‌شود. **هدف:** مطالعه حاضر با هدف ارزیابی حضور DNA تو کسوپلاسما گوندی در نمونه‌های مغزی بدست آمده از جنین میش‌های کشتارشده در شهرستان خرم‌آباد، غرب ایران انجام گردید. **روش کار:** در مجموع ۶۰ نمونه مغز جنین گوسفند جمع‌آوری گردید. جنین‌های مورد مطالعه در سه گروه سنی دسته‌بندی شدند (کمتر از ۲ ماه، ۴-۲ ماه و بیشتر از ۴ ماه). از هر نمونه g ۵۰ درون هاون چینی هموژنیزه گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری (MBST، ایران) انجام شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به منظور تکثیر توالی تکرارشونده (RE) توکسوپلاسما در نمونه‌های بافتی استفاده گردید. نمونه‌هایی که باند مورد انتظار (۵۲۹ bp) را نشان دادند به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شدند. **نتایج:** تو کسوپلاسما گوندی در ۶/۷٪ از جنینهای مورد مطالعه ردیابی شد. در هیچ‌یک از جنین‌های کمتر از ۲ ماه آلودگی مشاهده نشد. بین آلودگی و سن جنین در گروه‌های سنی مختلف ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نشد (p=۰/۳۰). **نتیجه‌گیری نهایی:** سطح بالای انتقال مادرزادی در بین جنین‌های مورد مطالعه، نشانگر آن است که تو کسوپلاسما گوندی احتمالاً به عنوان یکی از عوامل اصلی سقط جنین در گوسفندان این ناحیه مطرح است.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسما، جنین گوسفند، انتقال مادرزادی، توالی تکرارشونده (RE)، PCR

مقدمه

تو کسوپلاسما گوندی یک انگل تک‌یاخته‌ای داخل سلولی است که به طور گسترده در بین جانوران خونگرم، پرندگان و انسان شایع است. گربه به عنوان میزبان اصلی و سایر پستانداران و پرندگان به عنوان میزبان واسط، مورد هجوم این تک‌یاخته قرار می‌گیرند. این انگل پس از یک فاز کوتاه و حاد، وارد فاز نهفته شده که در این مرحله کیست‌ها تشکیل می‌شوند. کیست‌ها عمدتاً در بافت‌های عصبی و عضلانی مستقر شده و تا پایان عمر میزبان زنده می‌مانند (۱۵). علف‌خواران اهلی عمدتاً از طریق آب، خاک و گیاهان آغشته به مدفوع گربه آلوده می‌شوند.

در انسان، خوک، گوسفند و بز انگل می‌تواند از طریق جفت به جنین انتقال یابد. آلودگی به توکسوپلاسما در گوسفند در اکثر موارد فاقد علائم بالینی است با این حال عفونت مادرزادی اختلالات تولیدمثلی شدیدی را به همراه دارد (۱۸). بدنبال نخستین آلودگی در طول دوره آبستنی، تاکی‌زوییت‌ها جفت را مورد حمله قرار داده و تورم جفت همراه با تب مشاهده می‌شود. در این فرم از آلودگی ضایعات بافتی در ناحیه جفت و مغز جنین قابل مشاهده است لیکن این ضایعات غیراختصاصی بوده و در بسیاری از موارد با توجه به زوال جنین قابل تشخیص نمی‌باشند (۱۱). سایر علائم شامل جذب‌جنین، مومیایی‌شدن، سقط، مرده‌زایی و یا تولد نوزاد زنده و ضعیف بستگی به مرحله آبستنی و شدت آلودگی دارد (۲،۶).

تخمین خسارات اقتصادی ناشی از توکسوپلاسموزیس در گوسفند امری دشوار است زیرا علاوه بر سقط جنین در مراحل پایانی آبستنی، انگل می‌تواند منجر به از دست دادن جنین در مراحل اولیه بارداری شود که معمولاً قابل شناسایی نیست. در بریتانیا میزان خسارات ناشی از سقط‌جنین و مرده‌زایی و هزینه‌های مصرفی جهت تدابیر کنترلی، بالغ بر ۱۲/۴ میلیون یورو در سال تخمین زده شده است (۱۱). تشخیص سریع و دقیق آلودگی به توکسوپلاسما امکان اتخاذ تدابیر کنترلی مناسب به منظور کاهش خسارات اقتصادی ناشی از آلودگی در سال‌های بعد را فراهم می‌کند. در مطالعه حاضر به منظور تعیین فراوانی توکسوپلاسموزیس مادرزادی، جنین تعدادی از میش‌های کشتارشده در شهرستان خرم‌آباد از نظر آلودگی به توکسوپلاسما بررسی گردیدند.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه: طی مدت ۳ ماه با مراجعه به کشتارگاه گلشن شهرستان خرم‌آباد در مجموع از مغز ۶۰ رأس جنین گوسفند نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها به صورت تصادفی در روزهای مختلف و از گله‌های مختلف اخذ شدند. در بازرسی پس از کشتار، ابتدا جنین میش‌های کشتارشده از نظر

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۱۰۹ نمابر: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۱۰۹ Email: hamidreza_shokrani@yahoo.com

سن مورد بررسی قرار گرفتند. تخمین سن با استفاده از فرمول ریچاردسون انجام شد. بدین منظور طول بدن جنین از تاج سر تا برجستگی دنبه اندازه‌گیری شد (۸). سپس سر جنین جدا شده به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی منتقل شد. در آزمایشگاه جمجمه باز شده از قسمتهای مختلف مغز در مجموع به میزان g ۵۰ نمونه‌گیری گردید.

استخراج DNA: با توجه به انتشار ناهمگون کیست در بافت مغز و همچنین حجم اندک نمونه مورد بررسی در PCR (حداکثر mg ۵۰) به منظور افزایش احتمال شناسایی انگل، نمونه‌گیری از حجم بزرگتری از بافت هموژنیزه شده انجام شد. بدین منظور g ۵۰ از هر نمونه مغز به صورت مجزا به وسیله هاون چینی له شده و هموژنیزه گردید. به میزان g ۱ از هر نمونه هموژنیزه شده به ویال‌های استریل منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در °C ۲۰- نگهداری شد.

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری شرکت MBST ایران انجام شد. بدین منظور به تیوب‌های حاوی نمونه، بافر تجزیه کننده و پروتئیناز K اضافه شد. سپس محتویات تیوب ورتکس گشته و در دمای °C ۵۵ به مدت یک شب نگهداری شد تا بافت به طور کامل هضم گردد. پس از انجام سایر مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده محلول جمع آوری شده جهت انجام آزمایشات مولکولی در °C ۲۰- نگهداری گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): توالی تکرارشونده (RE) به طول bp ۵۲۹ در ژنوم توکسوپلاسما گوندی ۳۰۰-۲۰۰ کپی داشته و کاملاً اختصاصی است. در این مطالعه به منظور تشخیص آلودگی به توکسوپلاسما، این توالی با روش PCR در نمونه مغز جنین‌های مورد مطالعه ردیابی گردید. بدین منظور از پرایمرهای Tox۴ (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) و Tox۵ (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) استفاده شد (۱،۱۴).

در هر واکنش پرایمرهای Tox۴ وTox۵ (شرکت سیناژن) هر یک ۰/۲ mM، بازهای نیتروژن‌دار dNTP (شرکت سیناژن) هر یک ۱۰۰ µM، آنزیم Taq DNA Polymerase (شرکت سیناژن) ۲ واحد، MgCL۲ به میزان ۲/۵ mM، بافر ۱۰X به میزان ۵ µl و نمونه DNA به میزان ۵ µl استفاده شد و حجم نهایی با آب مقطر به ۵۰ µl رسید. در تمامی واکنش‌ها از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از DNA توکسوپلاسما سویه RH (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Primus ۹۶ و با شرایط دمایی و زمانی واسرشت اولیه: °C ۹۴ به مدت ۷ دقیقه؛ ۳۳ سیکل شامل واسرشت: °C ۹۴ به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال: °C ۵۴ به مدت ۹۰ ثانیه، تکثیر: °C ۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه؛ سیکل تکثیر نهایی: °C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه انجام گردید.

برای بررسی محصول PCR از ژل آگاروز ۱٪ در بافر ۰/۵X TBE استفاده شد. محصول واکنش باندی به طول bp ۵۲۹ است. نمونه‌هایی که این باند را نشان دادند به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شدند.

جدول ۱. نتایج واکنش PCR نمونه‌های مغز جنین در گروه‌های سنی مختلف. * تفاوت میزان آلودگی مادرزادی در گروه‌های سنی مختلف معنی‌دار نیست (p=۰/۳۰).

سن جنین	آلوده		سالم		جمع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
کمتر از ۲ ماه	۰	٪۰	۱۷	٪۱۰۰	۱۷
۴-۲ ماه	۲	٪۱۰	۱۸	٪۹۰	۲۰
بیشتر از ۴ ماه	۲	٪۸/۷	۲۱	٪۹۱/۳	۲۳
جمع	۴	٪۶/۷*	۵۶	٪۹۳/۳	۶۰

تحلیل آماری: ارتباط انتقال مادرزادی توکسوپلاسما و سن جنین در گروه‌های سنی مختلف (کمتر از ۲ ماه، ۴-۲ ماه و بیشتر از ۴ ماه) به کمک نرمافزار GraphPad Prism نسخه ۵ (GraphPad Inc., San Diego, CA) و با استفاده از آزمون مربع کای در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد بررسی قرار گرفت.

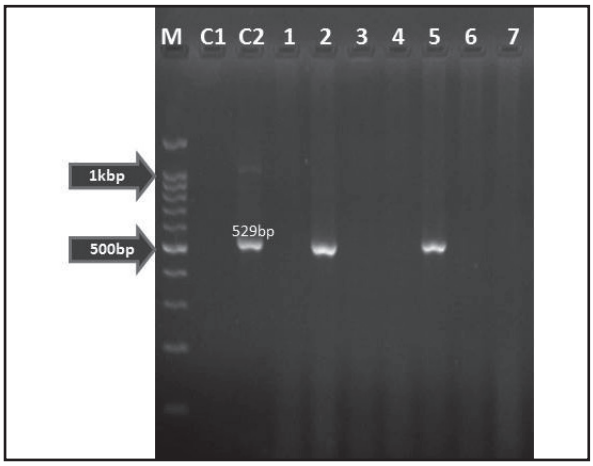
نتایج

از مجموع ۶۰ نمونه مغز جنین مورد بررسی، ۴ نمونه (٪۶/۷) آلوده به توکسوپلاسما بودند (تصویر ۱). بین آلودگی به توکسوپلاسما و سن جنین در گروه‌های سنی مختلف ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (χ۲=۱/۰۴۴، df=۱، p=۰/۳۰). بیشترین میزان آلودگی مادرزادی (٪۱۰) مربوط به گروه سنی ۴-۲ ماه بود ضمن آنکه آلودگی به توکسوپلاسما در هیچ‌یک از جنین‌های زیر ۲ ماه شناسایی نشد (جدول ۱).

بحث

توکسوپلاسما گوندی به عنوان یکی از عوامل مهم سقط و مرده‌زایی در گوسفند مطرح است و منجر به خسارات اقتصادی فراوان به صنعت پرورش گوسفند می‌شود. در استان لرستان با توجه به وجود مراتع فراوان، شرایط آب و هوایی مناسب در اکثر فصول سال (جهت اسپوروله شدن و بقای اُوسیست)، رونق پرورش دام به شکل سنتی و همچنین فراوانی مخازن حیوانی شرایط برای گسترش آلودگی فراهم است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ میزان شیوع آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما در گوسفندان استان لرستان با استفاده از روش‌های IFAT و الایزای غیرمستقیم ٪۵۳/۱ گزارش شده است (۱۳).

راه اصلی آلودگی در گوسفند بلع اُوسیست همراه با آب، خاک و یا گیاهان آلوده است. اطلاعات دقیقی در ارتباط با میزان انتقال مادرزادی توکسوپلاسما در گوسفند در دسترس نیست. تصور بر آن است که کمتر از ۲ ٪ از گوسفندان به طور مادرزادی آلوده می‌شوند. همچنین کمتر از



تصویر ۱. الکتروفورز محصولات PCR به منظور ردیابی توالی تکرار شونده (RE) در مغز جنین میش‌های کشتارشده در خرم‌آباد. :M مارکر DNA (bp۱۰۰)؛ C۱: کنترل منفی (آب مقطر)؛ C۲: کنترل مثبت (سویه RH)؛ ستون‌های ۲ و ۵: نمونه‌های مثبت که باند مورد انتظار (bp۵۲۹) را نشان داده‌اند؛ ستون‌های ۱، ۳، ۴، ۶ و ۷: نمونه‌های منفی.

۴٪ از میش‌های آلوده توکسوپلاسما را از طریق جفت به نسل بعد انتقال می‌دهند (۵). بر اساس نتایج تحقیق حاضر از مجموع ۶۰ نمونه مغز جنین، ۴ مورد (۶/۷٪) آلوده به توکسوپلاسما بودند. این میزان از انتقال مادرزادی قابل توجه بوده و بر فراوانی بالای آلودگی از طریق جفت در این ناحیه دلالت دارد.

تفاوت در میزان شیوع توکسوپلاسما در نواحی مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط آب و هوایی، فراوانی گربه‌ها، نحوه مدیریت گله و همچنین روش‌های تشخیص باشد که در این بین تفاوت در روش‌های تشخیص از اهمیت بیشتری برخوردار است (۴). در اکثر مطالعات پیشین تشخیص توکسوپلاسموزیس مبتنی بر آزمون‌های سرولوژیک بوده است. این روش‌ها در مواردی کارایی لازم را ندارند. به نظر می‌رسد روش‌های مستقیم تعیین حضور انگل در بافت به ویژه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به دلیل حساسیت کافی، اختصاصی بودن و همچنین حصول نتیجه سریع جهت شناسایی توکسوپلاسما در بافت کاربردی‌تر است. در مطالعات مولکولی مختلف جهت شناسایی توکسوپلاسما از ژن‌های SAG۱،B۱، SAG۲´۳، SAG۲´۵، SAG۳، ITS۱ و همچنین توالی تکرارشونده (RE) که پروتئینی را کد نمی‌کند استفاده شده است. توالی RE به طول ۵۲۹ bp در ژنوم توکسوپلاسما گوندی ۳۰۰-۲۰۰ کپی داشته و کاملاً اختصاصی است. برخی منابع نشان می‌دهند در بین روش‌های مولکولی رایج به منظور ردیابی DNA توکسوپلاسما گوندی در نمونه‌های بافتی، ردیابی توالی تکرارشونده (RE) از حساسیت بیشتری برخوردار است (۳،۹،۱۴).

در این مطالعه نمونه‌گیری از جنین‌های به ظاهر سالم صورت گرفته است لذا این نتایج بر فراوانی انتقال مادرزادی توکسوپلاسما و نه لزوماً بر میزان سقط جنین توکسوپلاسمایی دلالت دارد. در اکثر مطالعات پیشین شیوع آلودگی در جنین‌های سقط شده بررسی شده است لذا میزان آلودگی در مقایسه با مطالعه حاضر بالاتر گزارش شده است.

جالب آنکه در تحقیقات پیشین نشان داده است که در تعدادی از بره‌ها که آلودگی مادرزادی در زمان تولد با آزمایشات مولکولی روی جفت و بندناف تأیید شده است، در چند ماهگی پاسخ IgG مشاهده نمی‌شود. محققین علت را عدم توانایی انگل در بقاء و یا ناتوانی آن در هجوم به بافت‌های مختلف میزبان دانسته‌اند (۱۷). در مطالعات مولکولی انجام شده در ایتالیا و آمریکا میزان آلودگی به توکسوپلاسما در جنین‌های سقط شده گوسفند به ترتیب ۱۸/۱٪ و ۱۷/۵٪ گزارش شده است (۶،۱۶). در مطالعه انجام شده در آمریکا در گله‌ای با سابقه سقط توکسوپلاسمایی در آزمایشات بافتی از ۳۰ بره مرده متولد شده در ۱۱ مورد (۳۶/۶ ٪) آلودگی شناسایی شده است (۷). در ایران نیز Rassouli و همکاران در سال ۲۰۱۱ در استان خراسان رضوی، ۲۰۰ نمونه مغز جنین‌های سقط شده و یا بره‌هایی که پس از تولد تلف شده بودند را به همراه سرم مادری بترتیب با روش‌های B۱-PCR و ایمونوفلورسنت غیرمستقیم (IFAT) بررسی کردند. در این مطالعه ۳۱ نمونه سرمی (۱۵/۵٪) و ۲۷ نمونه بافتی (۱۳/۵٪) آلوده به توکسوپلاسما گزارش گردید (۱۸). در قزوین در سال ۲۰۱۲ نمونه‌های به دست آمده از ۱۸ جنین سقط شده گوسفند با استفاده از روش‌های هیستوپاتولوژی، بایواسی در موش و nested-PCR-RFLP بررسی گردیدند و میزان آلودگی ۶۶٪ گزارش گردید (۱۲).

در مطالعه حاضر بین آلودگی جنین به توکسوپلاسما و فاکتور سن ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. Razmi و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مشهد با مطالعه بر روی ۳۲۵ جنین سقطشده گوسفند با استفاده از روش IFAT، آلودگی به توکسوپلاسما را در ۱۷ جنین سقطشده ۶-۳ ماهه شناسایی کردند. در این بین سن ۱۳ جنین بالای ۵ ماه بود (۱۹). در مطالعه دیگری در مشهد در سال ۲۰۱۱، از بین ۸۱ جنین سقطشده بالای ۴ ماه در ۱۰ مورد (۱۲/۴٪) و از بین ۳۹ جنین سقطشده ۴-۲ ماه در ۵ مورد (۱۲/۸٪) DNA انگل ردیابی شد. آلودگی به توکسوپلاسما در هیچ یک از ۳ جنین زیر ۲ ماه گزارش نشد (۱۸). نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر که در آن تمامی نمونه‌های آلوده بالای ۲ ماه بودند مطابقت دارد. برخی محققین عدم مشاهده آلودگی در گروه سنی زیر ۲ ماه را ناشی از جذب جنین‌های آلوده در سنین کمتر از ۶۰ روز می‌دانند (۱۰،۱۸).

با توجه به عدم درمان دام‌های آلوده، تشخیص و کنترل آلودگی در مزارع پرورش گوسفند از اهمیت به سزایی برخوردار است. نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی انتقال مادرزادی توکسوپلاسما در گوسفندان این ناحیه قابل توجه است لذا به نظر می‌رسد توکسوپلاسما گوندی ممکن است به عنوان یک عامل پاتوژن مهم در سقط جنین گوسفندان در این ناحیه مطرح باشد. به منظور تعیین شیوع سقط جنین توکسوپلاسمایی در گوسفندان شهرستان خرم‌آباد، انجام مطالعات تکمیلی بر روی تعداد مناسبی از جنین‌های سقطشده و دارای نشانه‌های آسیب‌شناسی ضرورت دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مســتخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی دامپزشکی بوده و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان به انجام رسیده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری کارکنان کشتارگاه گلشن خرم‌آباد قدردانی نمایند.

References

1. Bezerra, R.A., Carvalho, F.S., Guimarães, L.A., Rocha, D.S., Silva, F.L., Wenceslau, A.A., Alburque, G.R. (2012) Comparasion of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs. Parasitol Res. 110(2): 509–514.
2. Buxton, D., Maley, S.W., Wright, S.E., Rodger, S., Bartlry, P., Innes, E.A. (2007) *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis, new aspect and old history. Vet Parasitol. 149: 25-28.
3. Cassaing, S., Bessières, M., Berry, A., Berrebi, A., Fabre, R., Magnaval, J. (2006) Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. J Clin Microbiol. 44(3): 720-724.
4. Dubey, J.P. (2005) Neosporosis in cattle. Vet Clin Food Anim. 21: 473–483.
5. Dubey, J.P. (2009) Toxoplasmosis in sheep-The last 20 years. Vet Parasitol. 163: 1-14.
6. Dubey, J.P. (2010) Toxoplasmosis of animals and humans. (2nd ed.) CRC Press. Boca Raton, FL, USA. p. 1-98.
7. Dubey, J.P., Kirkbride, C.A. (1989) Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. J Am Vet Med Assoc. 195: 1715-1716.
8. Evans, H.E., Sack, W.O. (1973) Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected refrences. Anat Histol Embryol. 2: 11-45.
9. Fallahi, S., Kazemi, B., Seyyed tabaei, S.J., Bandehpour, M., Lasjerdi, Z., Taghipour, N., Zebardast, N., Nikmanesh, B., Omrani, V.F., Ebrahimzadeh, F. (2014) Comparison of the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* infection in children with cancer. Parasitol Int. 63: 37-41.
10. Givens, M.D., Marley, M.S.D. (2008) Infectious causes of embryonic and fetal mortality. Theriogenology. 70(3): 270–285.
11. Gutierrez, J., O'Donovan, J., Proctor, A., Brady, C., Marques, P.X., Worrall, S., Nally, J.E., McElroy, M., Bassett, H., Fagan, J., Maley, S., Buxton, D., Sammin, D., Markey B.K. (2012) Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of ewes. J Vet Diagn Invest. 24: 846-854.
12. Habibi, G.R., Imani, A.R., Gholami, M.R., Hablolvarid, M.H., Behroozikhan, A.M., Lotfi, M., Kamalzade, M., Najjar, E. (2012) Identification of *Toxoplasma gondii* Type One Infection In sheep Aborted Fetuses in Qazvin Province of Iran. Iran J Parasitol. 7: 67-72.
13. Hashemi, S. (2013) Seroprevalence of Toxoplasmosis in sheep and cattle in Lorestan province. J Vet Clin Pathol. (In persian). 7: 221-228.
14. Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J. (2000) 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. 30: 69-75.
15. Joni, B., Torry, B.L. (1999) Common questions about the diagnosis and management of congenital toxoplasmosis. Paediatr Child Health. 4: 137-47.
16. Masala, G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, G., Patta, C., Tola, S. (2007) Detection of pathogens in ovine and caprine abortion sample from Sardinia Italy by PCR. J Vet Diag Invest.19: 96-98.
17. Mason, S., Quinnell, R.J., Smith, J.E. (2010) Detection of *Toxoplasma gondii* in lambs via PCR screening and serological follow-up. Vet Parasitol. 169: 258-263.
18. Rassouli, M., Razmi, G.R., Bassami, M.R., Movassaghi A.R., Azizzadeh M. (2011) Study on ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in affected herds of Khorasan Razavi Province, Iran based on PCR detection of fetal brains

and maternal serology. Parasitology. 138: 691-697.

19. Razmi, G.R., Ghazi, K., Mahooti, A., Naseri, Z. (2010) A serological study and subsequent isolation of *Toxoplasma gondii* from aborted ovin fetuses in Mashahhad area, Iran. J Parasitol. 96: 812-814.

Molecular Detection of Congenital Toxoplasmosis in Fetuses of Slaughtered Ewes in Khorramabad

Taghizadeh, Z.[1], Shokrani, HR.[2*], Sookhtehzari, A.[3], Nayebzadeh, H.[2]

[1]*Graduate Student in Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran*

[2]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran*

[3]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran*

(Received 17 September 2017, Accepted 28 November 2017)

Abstract:

BACKGROUND: *Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite which is widely prevalent in sheep throughout the world. Parasite infection can occur pre- or post-natally..Congenital ovine toxoplasmosis occurs following a primary infection in a pregnant ewe and leads to abortion and stillbirth of the fetus causing important economic losses to sheep industry. **OBJECTIVES:** The present study was conducted to evaluate the presence of *T. gondii* DNA in brain samples from fetuses of slaughtered ewes in Khorramabad, western Iran. **METHODS:** In total, 60 brain samples of ovine fetuses were collected. Examined fetuses were categorized in three age groups (<2 months, 2-4 months and >4 months). Fifty grams of each sample was homogenized by mortar and pestle. DNA extraction was performed using a DNA isolation kit (MBST, Iran). A polymerase chain reaction (PCR) which targets the repeated element (RE) of the organism was used for tissue samples. Brain samples were considered *T. gondii*-positive if the expected band size (529 bp) appeared. **RESULTS:** *T. gondii* was detected in 4 out of 60 (6•7%) examined fetuses. No case was recorded in the age group <2 months. No significant association was found between the infection and different fetal age categories (p=0.30). **CONCLUSIONS:** The high level of congenital transmission among examined fetuses indicates that *T. gondii* might be considered as one of the major causes of ovine abortion in this region.

Keyword: Toxoplasma, Sheep fetus, Congenital transmission, Repeated element (RE), PCR

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Results of PCR examination on fetus brain samples in different age groups. No significant association was found between the congenital infection and different age groups (p=0.30).

Figure 1. Electrophoresis of PCR products for detection of the repeated element (RE) in brain fetuses of slaughtered ewes in Khorramabad. M: DNA ladder (100 bp); C1: negative control (distilled water); C2: positive control (RH strain); lanes 2 and 5: positive samples which appear expected band (529bp); lanes 1, 3, 4, 6 and 7: negative samples.

***Corresponding author's email: hamidreza_shokrani@yahoo.com, Tel: 066-33120109, Fax: 066-33120109**