مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۴، ۴۱۰- ۴۰۳
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.104493.2147

مطالعه شیوع و شناسایی خصوصیات مولکولی لینگواتولا سراتا در گوسفند و بز کشتارشده در کشتار گاه یزد

گیلدا اسلامی[1] سپیده خلعتبری لیماکی[2] احمد عریان[3] امین ظهور تبار[2] آسیه امیری[2] بهادر حاجی محمدی[1*]

۱) مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۲) گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۳) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

(دریافت مقاله: ۲۷ خرداد ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۱ شهریور ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: لینگواتولا سراتا انگلی زئونوز بوده که عامل ایجادکننده سندروم هالزون در انسان است. عفونت انسان درنتیجه مصرف احشای دامی خام و یا نیم پخته رخ می‌دهد. **هدف:** هدف اصلی از این مطالعه بررسی شیوع و شناسایی خصوصیت مولکولی لینگواتولا سراتا در گوسفندان و بزان کشتارگاه یزد بود. **روش کار:** به منظور تعیین شیوع و شدت آلودگی لینگواتولا سراتا، گره‌های لنفاوی ۲۰۰ رأس گوسفند و ۲۰۰ رأس بز کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یزد مورد آزمون قرار گرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت‌های تجاری استخراج DNA و براساس روش پیشنهادی در کیت انجام شد. به منظور بررسی ژنتیکی، ناحیه‌ای از ژن هدف ۱۸srRNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده با نرم افزار Primer۳ تکثیر شد. محصول تکثیر شده جهت تعیین توالی ارسال شد و توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده آزمون‌های χ^2 و همبستگی پیرسون در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. **نتایج:** در تحقیق حاضر شیوع آلودگی در بز و گوسفندان کشتار شده به ترتیب ۲۵/۵٪ و ۲۲/۵٪ بود. اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین شیوع آلودگی در سنین مختلف و همچنین جنس نر و ماده در ۲ گروه (بز و گوسفند) مشاهده نگردید. نتایج حاصل از تعیین توالی، اختصاصی عمل نمودن پرایمرها و نیز انگل مورد نظر را تأیید نمود. **نتیجه‌گیری نهایی:** این پژوهش اولین گزارش تشخیص مولکولی لینگواتولا سراتا در ایران بود. همچنین با توجه به شیوع قابل توجه آلودگی در دامهای منطقه و عدم آگاهی و عملکرد بهداشتی مناسب افراد در مصرف احشاء دامی احتمال آلوده شدن افراد به انگل لینگواتولا سراتا وجود دارد. لذا در این راستا به‌کارگیری روش‌های تشخیصی مناسب و قابل‌اعتماد جهت تشخیص عفونت در کشتارگاه‌ها و هم‌چنین آموزش به افراد جامعه در زمینه مصرف صحیح احشاء دامی گامی مؤثر در جهت پیشگیری از ابتلاء به این بیماری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لینگواتولا سراتا ،حیوانات اهلی، خصوصیت مولکولی

مقدمه

لینگواتولا سراتا (Linguatula serrata) انگلی زئونوز است که عامل ایجادکننده سندروم هالزون در انسان است (۱۷،۱۹،۲۲) این انگل اولین بار در سال ۱۷۹۸ میلادی شناسایی و جزء شاخه بندپایان طبقه‌بندی گردید. فرم بالغ این انگل که در مجاری تنفسی سگ‌سانان (میزبان نهایی) زندگی می‌کند، زبانی شکل بوده و سطح پشتی آن محدب و سطح شکمی آن صاف است. طول انگل بالغ ماده و نر به ترتیب cm ۱۳-۸ و ۲-۱/۸ است (۳۰). تخم حاوی لارو همراه با ترشحات بینی میزبان نهایی خارج شده و درون آب یا سبزی‌ها وارد می‌شود. زمانی که تخم توسط میزبان واسط مناسب (گوسفند، بز، گاو و غیره) خورده می‌شود، به روده رفته و در آنجا آزاد شده، سپس از آنجا عمدتاً به عقده لنفاوی مزانتر رفته و به مقدار کمی نیز به قلب، کبد، ریه، شش و سایر احشاء مهاجرت می‌کند (۱۸،۳۲) و در آنجا به نوچه عفونت‌زا تبدیل می‌شود. پس از ۶-۵ ماه و بعد از ۹-۶ مرتبه پوست‌اندازی در داخل کیستی حاوی مایعات غلیظ قرار می‌گیرند. نوچه‌های عفونی پس از بلعیده شدن توسط میزبان نهایی به بخش‌های فوقانی دستگاه گوارش اتصال یافته و درنهایت به ناحیه بینی-حلقی می‌رسند.اندازه نوچه در حدود mm ۱۰-۵ است (۳،۱۰).

انسان می‌تواند هم نقش میزبان واسط و هم میزبان نهایی را به ترتیب با خوردن تخم و نوچه انگل ایفا کند. عفونت انسان درنتیجه مصرف احشای دامی خام و یا نیم پخته رخ می‌دهد (۲۸، ۱۷). انسان با خوردن نوچه لینگواتولا سراتا دچار لینگواتولیازیس بینی-حلقی می‌گردد. بدین‌صورت که پس از مصرف احشاء آلوده، در کمتر از چند ساعت نوچه توسط اسید معده آزاد شده و از طریق مری به موکوس ناحیه فوقانی دستگاه تنفس رسیده و باعث تحریک شدید سیستم تنفسی و التهاب بینی می‌شود. از دیگر علائم می‌توان به سرفه، خفگی، سردرد، عطسه، ترشحات بینی اشاره کرد (۳). علائم ذکرشده در انسان شبیه به آلرژی یا حساسیت است.

موارد آلودگی انسان به لینگواتولا سراتا در نقاط مختلف جهان ازجمله آسیای جنوب شرقی و خاورمیانه گزارش شده است (۱۳،۱۵،۳۵). در ایران نیز مواردی از آلودگی انسانی در نقاط مختلف کشور گزارش شده است (۲۵،۲۹) که رایج‌ترین راه انتقال این بیماری مصرف خوراکی احشاء دامی آلوده خام یا نیم پخته است. به‌طوریکه Yeghaneh Moghadam و

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۵-۳۸۲۰۹۱۵۵، نمابر: ۰۳۵-۳۸۲۰۹۱۴۹ Email: b.hajimohammadi@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

همـکاران در سـال ۲۰۰۱، Anaraki Mohammadi و همـکاران در سال ۲۰۰۸ و Tabibian و همکاران در سال ۲۰۱۲، به ترتیب آلودگی به نوچه لینگواتولا سراتا را در یک خانم ۳۰ ساله اهل حسن‌آباد کاشان پس از مصرف جگر خام گوسفند (۳۷)، یک پسر ۱۰ ساله تهرانی به دنبال مصرف کبد نیم پخته گوسفند (۵) و ۲ زن افغانی در اصفهان پس از خوردن جگر خام گزارش کردند (۳۱).

بسیاری از عوامل انگلی مشـترک بین انسان و دام شیوع نسبتاً قابل توجهی در ایران دارند (۲۶،۲۷). از سـوی دیگر، علت مصرف احشاء دامی به‌صورت خام و نیم پخته به دلیل باورهای غلط و عادت‌های غذایی نادرست مردم در سراسر جهان و به‌ویژه ایران مبنی بر خون‌ساز بودن جگر خام برای افراد مبتلا به کم‌خونی به‌خصوص در کودکان و یا مناسـب بودن آن برای رشـد جنین در زنان باردار اسـت (۳،۱۷،۳۶). همچنین در نقاطی از جهان همانند سـودان و لبنـان از گره‌های لنفاوی به‌صورت خـام در تهیه نوعی خوراک استفاده می‌نمایند که این امر علت بالا بودن شیوع آلودگی در افراد در این مناطق است (۱،۱۱،۱۲).

برخی از مطالعات پیشین حاکی از شیوع نسبتاً بالای میزبانان مختلف این انگل در برخی از مناطق ایران بوده اسـت. بطوریکه شـیوع انگل بالغ لینگواتولا سراتا در سگ‌های شـهرکرد (۱۶) و شیراز (۱۹) بررسی گزارش گردیده اسـت. همچنین مطالعات مختلفی در خصوص شـیوع آلودگی به انگل لینگواتولا سـراتا در میزبانان واسطی چون گوسـفند (۳۶، ۲۴، ۲۲، ۱۸)، گاو (۳۲، ۲۲)، بـز (۱۷،۲۲،۲۴)، شـتر (۶،۹،۲۱) و گاومیش(۲۲) انجام شده است. با اینحال بر اساس جستجو در پایگاه داده‌های علمی، تاکنونی تحقیقی پیرامون شیوع این انگل در گوسفند و بز در منطقه مرکزی کویر ایران انجام نشده است.

امروزه تشخیص رابطه فیلوژنیک بین موجودات مختلف وطبقه بندی و تاکسـونومی دقیق آن‌ها توسـط روش‌های ریخت شناسـی و بیولوژی مولکولی همانند انواع روش‌های PCR وارد حیطه جدید و بسـیار متفاوتی شـده اسـت. به گونه‌ای که ارزیابی تفاوت‌های احتمالی و حتی تشخیص سویه یا گونه‌های جدید انگلی به وسیله روش‌های مذکور ضروری به نظر می‌رسد. همچنین به نظر می‌رسد مورفولوژی انگل لینگواتولا سراتا برای تأیید تشـخیصی کافی نمی باشـد و برای شناسـایی دقیق انگل در انواع مواد غذایی با منشا دامی نیاز به تأیید مولکولی می‌باشد (۷). به ویژه اینکه یافته‌های حاصل از مطالعات گذشـته و بررسـی‌های انجام شده پیرامون اطلاعاتی ژنتیکی و مولکولی برخی از انگل‌های منتقله از مواد غذایی، این فرضیه را مطرح می‌سـازد که نوچه‌های لینگواتولا سراتا دارای سویه‌های وابسته به میزبان باشند. این موضوع ممکن است در ارتباط با بالا بودن غیر طبیعی و قابل توجه شیوع آلودگی به این انگل در ایران باشد. با وجود این از آنجا که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه بررسی مولکولی و ژنتیکی این انگل در حیوانات در ایران انجام نشـده است، اثبات این فرضیات ضرورت انجام تحقیقی در این زمینه را دوچندان نموده است.

هدف اصلی از این مطالعه بررسـی شـیوع و شناسـایی خصوصیت مولکولی لینگواتولا سراتا در گوسفندان و بزان کشتارگاه یزد بود.

مواد و روش کار

نمونه گیری: به‌منظور تعیین شیوع و شدت آلودگی لینگواتولا سراتا، در طول ۲ ماه مراجعه به کشتارگاه صنعتی شهر یزد از دام‌های ذبح‌شده، شامل ۲۰۰ رأس گوسـفند و ۲۰۰ رأس بز نمونه‌گیری انجام شـد. بطوریکه از هر یک از دام‌های کشتاری حداقل ۳ گره لنفاوی اخذ شد. قبل از نمونه‌گیری با ثبت مشـخصات کامل (جنس و سن)، هر حیوان با شماره مشخص شد. لازم به ذکر است که سن دام‌ها بر اساس فرمول دندانی و میزان سائیدگی دندان‌هـای دائمی دام تعیین گردید. سـپس پس از مراحل پوسـت‌کنی و خروج امعاء و احشاء، گره‌های لنفاوی مزانتریک جمع‌آوری و در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردید.

تعیین شیوع و شدت آلودگی: در آزمایشگاه پس از حذف بافت چربی اطراف گره‌های لنفاوی، با استفاده از اسکالپل چند برش طولی روی آن‌ها داده شد. سپس گره‌های لنفاوی به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در آب ولرم (۵۵°C-۵۰) قرار داده شد (۲). نوچه‌ها زیر استریو میکروسکوپ مورد بررسی و تعداد آن در هر گره لنفاوی مورد شمارش قرار گرفت و داده‌ها ثبت گردید (تصویر ۱) که میانگین تعداد نوچه جداشده از هر دام مبنای تعیین شدت آلودگی بود. بلافاصله، تعدادی از نوچه‌ها به‌منظور انجام آنالیزهای مولکولی (استخراج DNA و بررسـی خصوصیت ژنتیکی انـگل) در الکل ° ۷۰ درجه قرار داده شد (۸).

استخراج DNA نوچه انگل لینگواتولا سراتا: استخراج DNA ژنومی از ۵ نوچه انتخابی بر اساس پروتکل همراه کیت استخراج DNA (۳۰۳۲-Bioneer, #K) انجام شـد. DNAهای استخراج‌شـده به صورت کمی و کیفی به ترتیب با روش‌های اسپکتروفتومتری و ژل آگاروز الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

تکثیر ژن: جهت بررسی ژنتیکی انگل لینگواتولا سراتا، ژن ۱۸srRNA به عنوان ژن هدف انتخاب شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) قطعه‌ای از ژن تکثیر گردید.

جهت تکثیر قطعه مورد نظـر، از (۱x) PCR buffer ، (۱/۵ mM) MgCl2، (۰/۲ mM) dNTP، آنزیم (۱U) Taq DNA Polymerase و پرایمرهای مورد نظر (۱۰ Mμ) اسـتفاده شـد. قابل ذکر است که غلظت ژنوم مورد اسـتفاده در واکنش تکثیری فوق ng ۱۰۰ در نظر گرفته شـد. برنامه‌ای که جهت تکثیر قطعه موردنظر مورد اسـتفاده قرار گرفت شامل واسرشتگی اولیه در دمای°C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه بود. سپس ۳۰ سیکل با واسرشـتگی در °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای°C ۵۲ به مدت ۱ دقیقه و گسترش در درمای°C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه بود. پس از اتمام

Archive of SID
www.SID.ir

سیکل، به جهت تکمیل مرحله گسترش، زمان ۵ دقیقه‌ای در ۷۲°C در نظر گرفته شد. در نهایت محصول تکثیر با استفاده از آگارز ژل الکتروفورز ۱٪ و در کنار مارکر مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

بررسی توالی قطعه تکثیری: محصول تکثیر شده جهت تعیین توالی ارسال شد. نتیجه آن با استفاده از BLAST مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها: داده‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از آمار توصیفی و آزمون‌های ٪۲ و همبستگی پیرسون در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

شیوع و شدت آلودگی: در این پژوهش تعداد ۴۰۰ رأس دام شامل ۲۰۰ رأس گوسفند و ۲۰۰ رأس بز مورد بررسی قرار گرفتند. اگرچه بیشترین آلودگی به انگل لینگواتولا سراتا در گوسفندان نر و در گروه زیر یک سال (جدول ۲) و در بزها در سنین ۱ تا ۲ سال و در جنس نر بیشتر بود (جدول ۳) اما اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین شیوع آلودگی در سنین مختلف و همچنین جنس نر و ماده در دو گروه (بز و گوسفند) مشاهده نگردید ($p<۰/۰۱$).

همچنین با اینکه بیشترین شدت آلودگی در گوسفندان زیر یکسال و در جنس نر و در بزها در سنین ۱ تا ۲ سال و در جنس نر وجود داشت با این حال بین شدت آلودگی در بز و گوسفند و جنس و سن دام اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید (جداول ۴،۵).

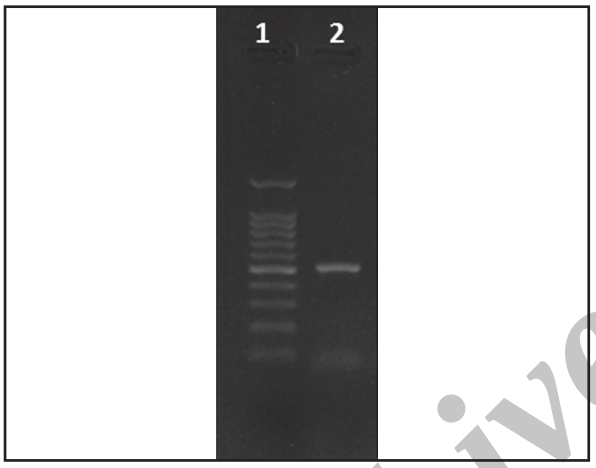
بررسی مولکولی انگل لینگواتولاسراتا: در این بخش از مطالعه، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه ۴۸۷ جفت بازی از ژن هدف ۱۸srRNA مربوط به انگل لینگواتولا سراتا تکثیر شد (تصویر ۲). نتایج حاصل از تکثیر و بررسی آن با استفاده از BLAST مشخص نمود که ایزوله‌های جداشده دارای تشابه کامل با توالی‌های موجود در بانک ژن هستند.

بحث

گزارشات مختلفی از شیوع لینگواتولاسراتا در سگ در مناطق مختلف ثبت گردیده است. بطوریکه شیوع انگل بالغ لینگواتولا سراتا در سگ‌های شهرکرد ٪۶۲/۲ (۱۶) و شیراز ٪۷۶/۵ (۱۹) گزارش شده است که نشان از آلودگی بالای میزبان نهایی در نقاط مختلف کشور است. این موضوع تهدیدی برای آلودگی میزبان واسط می‌باشد. هرچند در این مطالعه به بررسی آلودگی سگ‌های شهر یزد به این انگل پرداخته نشده است اما وجود آلودگی در دام‌های کشتاری در این تحقیق نشان از وجود آلودگی در سگ‌های منطقه است. با اینحال برای حصول اطلاعات موثق‌تر در این زمینه، ضرورت بررسی اپیدمیولوژی این انگل در میزبان نهایی به ویژه سگ‌های ولگرد این منطقه احساس می‌شود.

در تحقیق حاضر شیوع آلودگی در بز و گوسفندان کشتار شده به ترتیب ٪۲۵/۵ و ٪۲۲/۵ بود. چندین پژوهش دیگر در این زمینه در نقاط مختلف کشور انجام شده است که میزان آلودگی در بز (شمال غرب ایران ٪۵۰/۷۵ (۲۲)، کرمان ٪۴۹/۱ (۱۷)، همدان ٪۳۰/۶ (۲۴) و تبریز ٪۴۵/۱۳ (۲۳)) بیش از ٪۳۰ اعلام شده است. همچنین بررسی شیوع آلودگی در گوسفند نیز در تحقیقات انجام شده میزان مختلفی از آلودگی را در در مناطق مختلف کشور از جمله شمال غرب کشور ٪۴۲/۶۹ (۲۲)، ارومیه ٪۳۰/۹ (۳۶)، همدان

تصویر۱. نوچه‌های انگل لینگواتولا سراتا جدا شده از گره‌های لنفاوی یک راس دام کشتار شده.



تصویر ۲. بررسی محصول تکثیر توسط آگارز ژل الکتروفورز. ستون۱: DNA ۵۰bp ladder. ستون۲: محصول تکثیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ۱۸srRNA باندازه ۴۸۷ جفت باز.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه‌ای از ژن هدف ۱۸srRNA.

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول PCR
F-L۱۸	۳'-CCAGAGTCGTATGCTTGTCTCA-۵'	۴۸۷
R-L۱۸	۳'-TCCCGTATCGTTATTTTTCGTC-۵'	

Archive of SID

جدول ۲. فراوانی شیوع آلودگی به انگل لینگواتولا سراتا در گره‌های لنفاوی مزانتریک در گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه یزد در گروه‌های مختلف جنس و سن.

گروه سنی	نر		ماده		کل	
	تعداد گوسفند کشتار شده	تعداد گوسفند آلوده (٪)	تعداد گوسفند کشتار شده	تعداد گوسفند آلوده (٪)	تعداد گوسفند کشتار شده	تعداد گوسفند آلوده (٪)
<۱	۵۳	۱۱ (٪۲۰/۷۵)	۱۷	۳ (٪۲۳/۵۲)	۷۰	۱۴ (٪۲۰)
۱-۲	۴۱	۱۰ (٪۲۳/۸)	۱۸	۵ (٪۲۳/۹۱)	۵۹	۱۵ (٪۲۵/۴۲)
۲-۳	۲۳	۵ (٪۲۶/۸)	۳۰	۷ (٪۲۳/۳۳)	۵۳	۱۲ (٪۲۲/۶۴)
۳<	۹	۲ (٪۲۲/۵)	۹	۲ (٪۲۲/۵)	۱۸	۴ (٪۲۲/۲۲)
کل	۱۲۶	۲۹ (٪۲۳/۱)	۷۴	۱۶ (٪۲۱/۶۲)	۲۰۰	۴۵ (٪۲۲/۵)

جدول ۳. فراوانی شیوع آلودگی به انگل لینگواتولا سراتا در گره‌های لنفاوی مزانتریک در بزهای کشتار شده در کشتارگاه یزد در گروه‌های مختلف جنس و سن.

گروه سنی	نر		ماده		کل	
	تعداد بزهای کشتار شده	تعداد بزهای آلوده (٪)	تعداد بزهای کشتار شده	تعداد بزهای آلوده (٪)	تعداد بزهای کشتار شده	تعداد بزهای آلوده (٪)
<۱	۴۱	۹ (٪۲۱/۹۵)	۲۰	۵ (٪۲۵)	۶۱	۱۴ (٪۲۲/۹۵)
۱-۲	۷۵	۱۸ (٪۲۳/۶۸)	۲۴	۶ (٪۲۵)	۹۹	۲۴ (٪۲۴/۲۴)
۲-۳	۱۳	۳ (٪۲۳/۷)	۱۴	۴ (٪۲۸/۵۷)	۲۷	۷ (٪۲۵/۹۲)
۳<	۹	۲ (٪۲۲/۵)	۴	۱ (٪۲۵)	۱۳	۶ (٪۴۶/۱۵)
کل	۱۳۸	۳۲ (٪۲۳/۱۸)	۶۲	۱۶ (٪۲۵/۸۰)	۲۰۰	۵۱ (٪۲۵/۵)

جدول ۴. فراوانی شدت آلودگی به انگل لینگواتولا سراتا در گره‌های لنفاوی مزانتریک بزهای کشتار شده در کشتارگاه یزد درگروهای سنی و جنس مختلف.

سن	<۱		۱-۲		۲-۳		۳<		کل
جنس	نر	ماده	نر	ماده	نر	ماده	نر	ماده	
تعداد بز کشتار شده	۴۱	۲۰	۷۵	۲۴	۱۳	۱۴	۹	۴	۲۰۰
تعداد بز آلوده با کمتر از ۵ نوچه (٪)	۳۹ (٪۹۵/۱۲)	۱۸ (٪۹۰)	۷۲ (٪۹۶)	۲۳ (٪۹۵/۸۳)	۱۲ (٪۹۲/۳۱)	۱۳ (٪۹۲/۸۶)	۷ (٪۷۷/۷۸)	۴ (٪۱۰۰)	۱۹۱ (٪۹۵/۵)
تعداد بز آلوده با ۱۰-۵ نوچه (٪)	۲ (٪۴/۸۸)	۱ (٪۵)	۲ (٪۲/۶۷)	۱ (٪۴۱/۶۷)	۱ (٪۰۷/۶۹)	۱ (٪۰۷/۱۴)	۱ (٪۱۱/۱۱)	۰	۷ (٪۳/۵)
تعداد بز آلوده با بیشتر از ۱۰ نوچه (٪)	۰	۱ (٪۵)	۱ (٪۱/۳۳)	۰	۰	۰	۱ (٪۱۱/۱۱)	۰	۲ (٪۱)

جدول ۵. فراوانی شدت آلودگی به انگل لینگواتولا سراتا در گره‌های لنفاوی مزانتریک گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه یزد در گروهای سنی و جنس مختلف.

سن	<۱		۱-۲		۲-۳		۳<		کل
جنس	نر	ماده	نر	ماده	نر	ماده	نر	ماده	
تعداد گوسفند کشتار شده	۵۳	۱۷	۴۱	۱۸	۲۳	۳۰	۹	۹	۲۰۰
تعداد گوسفند آلوده با کمتر از ۵ نوچه	۵۰ (٪۹۴/۳۳)	۱۶ (٪۹۴/۱۲)	۳۷ (٪۹۰/۲۴)	۱۶ (٪۸۸/۸۹)	۱۹ (٪۸۲/۶۱)	۲۷ (٪۹۰)	۷ (٪۷۷/۷۸)	۸ (٪۸۸/۸۹)	۱۸۰ (٪۹۰)
تعدادگوسفند آلوده با ۱۰-۵ نوچه (٪)	۳ (٪۵/۶۷)	۱ (٪۵/۸۸)	۳ (٪۷/۳۲)	۲ (٪۱۱/۱۱)	۳ (٪۱۳/۰۴)	۳ (٪۱۰)	۱ (٪۱۱/۱۱)	۱ (٪۱۱/۱۱)	۱۷ (٪۸/۵)
تعداد گوسفند آلوده با کمتر از ۱۰ نوچه (٪)	۰	۰	۱ (۲/۴۴)	۰	۱ (٪۴/۳۵)	۰	۱ (٪۱۱/۱۱)	۰	۳ (٪۱/۵)

۱۰/۲٪ (۲۴) و کرمان ۱۶/۱٪ (۱۸) نشان می‌دهند.

در مطالعه حاضر درصد آلودگی گره‌های لنفاوی مزانتر بزها به لینگواتولا سراتا از مطالعات انجام شده بسیار پایین‌تر می‌باشد. به طوریکه Nourollahi Fard و همکاران در سال ۲۰۱۰ میزان آلودگی را در بز در کرمان ۴۹/۱٪ (۱۷) و Rezaei و همکاران در سال ۲۰۱۱ این میزان را در بزهای شمال غرب ایران ۵۰/۷۵٪ اعلام نمودند (۲۲). از طرفی درصد آلودگی گره‌های لنفاوی مزانتر گوسفندان در این پژوهش با تحقیق انجام شده توسط Tavassoli و همکاران در سال ۲۰۰۷ که میزان آلودگی را ۲۰/۶٪ اعلام کردند (۳۳) مطابقت دارد ولی از طرف دیگر Shekarforoush و همکاران در سال ۲۰۰۴ میزان آلودگی گره‌های لنفاوی مزانتر گوسفندان در شیراز را پایین‌تر (۱۰/۲٪) (۲۸) و Rezaei و همکاران در سال ۲۰۱۱ میزان آلودگی بالاتر (۴۹/۶۲٪) را در شمال غرب ایران گزارش دادند (۲۲). همان‌طور که ملاحظه می‌شود میزان آلودگی در مقایسه با گوسفند و بز در سایر مناطق متفاوت بوده که از دلایل احتمالی آن می‌توان تفاوت در روش و زمان نمونه‌گیری، سن دام‌های مورد مطالعه و شرایط آب و هوایی (آب و هوای گرم و خشک منطقه) نام برد زیرا در این مطالعه جمع آوری گره‌های لنفاوی مزانتر به صورت تصادفی بوده و انتخابی از نظر شکل و رنگ و قوام عقده‌ها صورت نگرفته است چراکه درصورت انتخاب عقده‌های

Archive of SID

www.SID.ir

با رنگ تیره و قوام شـل می‌توانسـت باعث افزایش احتمالی میزان شیوع شود. دلیل احتمالی دیگر پائین بودن میزان آلودگی، زمان نمونه گیری بود که در اواسـط تابسـتان انجام گرفت به این معنی که در این زمان چرخه انگل تکمیل نگردیده است و در نتیجه دام‌هایی که به تازگی با تخم انگل آلوده شده باشند، آلودگی به نوچه را نشان نمی دهند. از طرفی آب و هوای گرم و خشـک بودن منطقه یزد هم در بسـیاری موارد سـبب از بین رفتن تخم‌ها می‌گردد و در نتیجه چرخه انگل کامل نمی گردد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که معمولاً شیوع لینگواتولا سراتا در گوسفند و بز در مناطق کویری ایران پائین‌تر از مناطق کوهستانی است. به عنوان مثال آلودگی در گوسفندان کشتار شده در کرمان برابر با ۱۶/۱٪ گزارش شده که علت عمده آن وجود آب و هوای خشک در این مناطق یاد شده است (۱۸).

در مطالعات مختلف بین شـیوع آلودگی در حیوانات نشخوارکننده در سنین مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت (۱۷،۲۰،۲۸). درحالی که در پژوهش حاضر، تفاوت آماری معنی‌داری در بین سنین مختلف مشاهده نگردید. هم‌چنین درحالی‌که مطالعات گذشـته تفاوت آماری معنی‌داری را بین شیوع لینگواتولا سـراتا در جنس‌های مختلف از حیوانات نشان دادند (۲۳،۲۸)، در تحقیق حاضر همانند مطالعه Nourollahi Fard و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۱۷) و Razavi و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۰) تفاوت آماری معنی‌داری بین شـیوع لینگواتولا سـراتا در بین جنس نر و ماده در سـنین یکسان مشاهده نشد. علت این امر می‌تواند همراهی همیشگی دامهای نر و ماده با یکدیگر و درنتیجه شانس ابتلاء یکسان هر دو گروه باشد.

مطالعات نشـان دهنـده مصرف گره‌هـای لنفاوی مزانتـر به همراه چربی‌های اطراف آن به صورت کبابی در نقاط مختلف کشور (۳۳، ۳) و سایر نقاط جهان (۱۱،۱۲) وجود دارد. لذا در صورت آلودگی گره‌های لنفاوی مزانتر به انگل لینگواتولا سراتا امکان آلودگی افراد و ایجاد لینگواتولیازیس بینی- حلقی (سندروم هالزون) در افراد وجود دارد. ضمن اینکه بر اساس مطالعه‌ای که اخیراً انجام شـده است گره‌های لنفاوی دارای آلودگی میکروبی بالایی بوده و در صورت آلودگی به انگل این آلودگی باکتریایی چند برابر شده است (گزارش منتشر نشـده). لذا مصرف خام و نیم پخته این احشاء دامی برای مصرف کنندگان خطرناک می‌باشد. لذا آموزش‌های لازم در خصوص عدم مصرف این گونه احشاء به مصرف کنندگان لازم به نظر می‌رسد.

بررسی ژن هدف ۱۸srRNA انگل لینگواتولاسراتا جداشده از گره‌های لنفاوی پس از تعیین توالی و بررسی با استفاده از BLAST نشان داد که این قسـمت از ژن مورد نظر ۱۰۰٪ هومولوژی با ژن مزبور در داده پایگاه بانک ژنی را دارد. در ضمن توالی مزبور با شـماره شناسـائی KJ۰۰۹۳۳۳ در داده پایگاه ژنومی ثبت شد.

بر اساس نتایج حاصله و بر اساس جستجوهای به عمل آمده در منابع پایگاههای اطلاعات علمی این پژوهش اولین گزارش تشخیص مولکولی لینگواتولا سراتا در ایران بود. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه و با توجه به شـیوع آلودگی در بز و گوسفند منطقه و عدم آگاهی و عملکرد مناسب افراد در مصرف احشـاء دامی احتمال آلوده شـدن افراد به انگل لینگواتولا سراتا وجود دارد. لذا در این راستا به‌کارگیری روش‌های تشخیصی مناسب و قابل‌اعتماد جهت تشـخیص عفونت در کشتارگاه‌ها و هم‌چنین آموزش به افراد جامعه و ارائه راهکارهای مناسب در جلوگیری از آلودگی دام (عدم دسترسی سگ‌ها به احشاء آلوده) و در کنار آن به‌کارگیری اقدامات بهداشتی مناسب در زمینه مصرف صحیح احشاء دامی گامی مؤثر در جهت پیشگیری از ابتلاء به این بیماری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل انجام طرح پژوهشـی مصوب معاونت پژوهشـی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد. لذا بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشـگاه جهت حمایت‌های مالی سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا به علت مشارکت علمی در آماده سازی این مقاله قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Alzohairy, M.A. (2014) Letter to the editor. J Food Qual Hazards Control. 1: 35.
2. Akhondzadeh Basti, A., Haddadzadeh, H., Tajik, H., Hajimohammadi, B., Shirali, S., Hemati M., Ahmadiara, E. (2011) Effect of different temperature conditions on survival time of Linguatula serrata nymphs. HVM Bioflux. 3: 76-82.
3. AkhondzadehBasti, A., Hajimohamadi, B. (2010) Principles of meat and abattoirs hygiene. First edition. Iran, University of Tehran Press. 93-95: 121-124.
4. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-402.
5. Anaraki Mohammadi, G., Mobedi, I., Ariaiepour, M., Pourmohammadi, Z., Bidaki, M.Z. (2008) A case report of Nasopharyngeal Linguatuliasis in Tehran, Iran and characterization of the isolated Linguatula serrata. Iran J Parasitol. 3: 53-5.
6. Bamorovat, M., Zarandi, M.B., Mostafavi, M., Kheirandish, R., Sharifi, I., Radfar, M.H. (2013) The prevalence of Linguatula serrata nymphs in mesenteric and mediastinal lymph nodes in one-humped camels (Camelus dromedarius) slaugh-

Archive of SID
www.SID.ir

tered in Rafsanjan slaughterhouse, Iran. J Parasit Dis. 38: 374-377.
7. Boughattas, S., Salehi, R. (2014) Molecular approaches for detection and identification of foodborne pathogens. J Food Qual Hazards Control. 1: 1-6.
8. Eslami, G., Hajimohammadi, B., Gholamrezaei, M., Khalatbary, S., Zohortabar, A., Ardian M. (2014) Practical Approach for DNA Extraction of Food Born Linguatula Serrata Nymphs: An Analytical Method. Galen Med J. 3: 115-9.
9. Haddadzadeh, H., Athari, S., Abedini, R., Nabian, S., Haji-Mohamadi, B. (2010) One-Humped Camel) Camelus dromedarius) Infestation with Linguatula serrata in Tabriz, Iran. Iran J Arthropod Borne Dis. 4: 54-59.
10. Hajimohammadi, B., Akhondzadeh Basti, A., Shirali, S. (2012) Impact of Sodium Chloride and Heat on Survival Time of Linguatula Serrata Nymphs in vitro: An Experimental Study. J Health Res. 1: 54-61.
11. Khalil, G., Haddad, C., Otrock, Z.K., Jaber, F., Farra, A. (2012) Halzoun, an allergic pharyngitis syndrome in Lebanon: the trematode *Dicrocoelium dendriticum* as an additional cause. Acta Trop. 125: 115-118.
12. Khalil, G.M., Schacher, J.F. (1965) Linguatula serrata in relation to halzoun and the marrara syndrome. Am J Trop Med Hyg. 14: 736-46.
13. Koehsler, M., Walochnik, J., Georgopoulos, M., Pruente, C., Boeckeler, W., Auer, H., Barisani-Asenbauer, T. (2011) Linguatula serrata tongue worm in human eye, Austria. Emerg Infect Diseases. 17: 870-2.
14. Lazo, R., Hidalgo, E., Lazo, J., Bermeo, A., Llaguno, M., Murillo, J., Teixeira, VP. (1999) Ocular linguatuliasis in Ecuador: case report and morphometric study of the larva of Linguatula serrata. Am J Trop Med Hyg. 60: 405-9.
15. Ma, KC., Qiu, M.H., Rong, Y.L. (2002) Pathological differentiation of suspected cases of pentastomiasis in China. Trop Med Int Health. 7: 166-77.
16. Meshgi, B., Asgarian, O. (2003) Prevalence of Linguatula serrata infestation in stray dogs of Shahrekord, Iran. J Vet Med B. 50: 466-7.
17. Nourollahi Fard, SR., Kheirandish, R., Norouzi-Asl, E., Fathi S. (2010) The prevalence of Linguatula serrata nymphs in goats slaughtered in Kerman slaughterhouse, Kerman, Iran. Vet Parasitol. 171: 76-8.
18. Nourollahi Fard, SR., Kheirandish, R., Norouzi Asl, E., Fathi, S. (2011) Mesenteric and mediastinal lymph node infection with Linguatula serrata nymphs in sheep slaughtered in Kerman slaughterhouse, southeast Iran. Trop Anim Health Prod. 43: 1-3.
19. Oryan, A., Sadjjadi, S., Mehrabani, D., Rezaei, M. (2008) The status of Linguatula serrata infection of stray dogs in Shiraz, Iran. Comp Clin Path. 17: 55-60.
20. Razavi, S., Shekarforoush, s.s., Izadi, M. (2004) Prevalence of Linguatula serrata nymphs in goats in Shiraz, Iran. Small Ruminant Res. 54: 213-7.
21. Rezaei, F., Tavassoli, M., Javdani, M. (2012) Prevalence and morphological characterizations of Linguatula serrata nymphs in camels in Isfahan Province, Iran. Vet Res Forum. 3: 61-65.
22. Rezaei, F., Tavassoli, M., Mahmoudian, A. (2011) Prevalence of Linguatula serrata infection among dogs (definitive host) and domestic ruminants (intermediate host) in the North West of Iran. Vet Med (Praha).11: 561-7.
23. Rezaei, H., Ashrafihelan, J., Nematollahi, A., Mostafavi, E. (2012) The prevalence of Linguatula serrata nymphs in goats slaughtered in Tabriz, Iran. J Parasit Dis. 36: 200-2.
24. SadeghiDehkordi, Z., Pajohi-Alamoti, M.R., Azami, S., Bahonar, A.R. (2014) Prevalence of Linguatula serrata in lymph nodes of small ruminants: case from Iran. Comp Clin Pathol. 23: 785-788.
25. Sajjadi, S., Ardehali, S., Shojaei, A. (1998) A case report of Linguatula serrata in human pharynx from Shiraz, southern Iran. Med J Islam Repub Iran. 12: 193-4.
26. Salavati, Z, Chalehchaleh, A, Rezaei, F. (2017) Parasitic infections in raw vegetables of Kermanshah, Western iran and their relation with season and washing procedures. J Food Qual Hazards

Archive of SID
www.SID.ir

Control. 4: 37-41.
27. Shahbazi, Y, Chalehchaleh, A. (2017) Prevalence of common food-borne parasitic diseases in slaughtered ruminants in west part of Iran. J Food Qual Hazards Control. 4: 85-9.
28. Shekarforoush, S.S., Razavi, S., Izadi, M. (2004) Prevalence of Linguatula serrata nymphs in sheep in Shiraz, Iran. Small Rumin Res. 52: 99-101.
29. Siavoshi, M., Asmar, M., Vatankhah, A. (2002) Nasopharyngeal pentastomiasis (Halzoun): report of 3 cases. Iran J Med Sci. 27: 191-2.
30. Soulsby, EJL. (1982) Helminths, Arthropods and Protozoa of Demestocated Animals. (7th ed.) England, London, Bailliere Tindall.
31. Tabibian, H., Yousofi Darani, H., Bahadoran-Bagh-Badorani, M., Farahmand Soderjani, M., Enayatinia, H. (2012) A case report of Linguatula serrata infestation from rural area of Isfahan city, Iran. Adv Biomed Res. 1: 42-42.
32. Tajik, H., Tavassoli, M., Dalir-Naghadeh, B., Danehloipour, M. (2006) Mesenteric lymph nodes infection with Linguatula serrata nymphs in cattle. Iran J Vet Res. 7: 82-7.
33. Tavasoli, M., Tajik, H., Dalir-Naghadeh, B., Lotfi, H.(2007) Study of Linguatula serrata infestation in mesenteric lymph nodes of goats in slaughterhouse of Urmia, Iran. SCI Res Iran Vet J. 2: 85-9
34. Tavassoli, M., Tajic, H., Dalir-Naghadeh, B., Hariri, F. (2007) Prevalence of Linguatula serrata nymphs and gross changes of infected mesenteric lymph nodes in sheep in Urmia, Iran. Small Ruminant Res. 72: 73-6.
35. Yagi, H., El- Bahari, S., Mohamed, H.A., Ahmed, E.R.S., Mustafa, B., Mahmoud, M., Saad, MB., Sulaiman, SM., el Hassan, AM. (1996) The Marrara syndrome: a hypersensitivity reaction of the upper respiratory tract and buccopharyngeal mucosa to nymphs of Linguatula serrata. Acta Trop. 62: 127-34.
36. Yakhchali, M., Athari, S., Hajimohammadi, B., Raeisi, M. (2009) prevalence of linguatula serrata in the ruminants slaugtered in urmia slauhterhouse. Iran J Vet Res. 64: 329-32.
37. Yeghaneh Moghadam, A., Talari, S.A., Dehghani, R. (2001) A case of Human Linguatula serrata infestation in Kashan. J Kerman Uni Med Sci. 8: 175-8.

Archive of SID

www.SID.ir

A survey on prevalence and molecular characteristics of Linguatula serrata isolated from slaughtered sheep and goat in Yazd slaughterhouse

Eslami, G.[1], Khalatbari- Limaki, S.[2], Oryan, A.[3], Zohortabar, A.[2], Amiri, A.[2], Hajimohammadi, B.[1*]

[1]*Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

[2]*Department of Food Hygiene and Safety, School of Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

[3]*Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran*

(Received 17 June 2017, Accepted 20 September 2017)

Abstract:

BACKGROUND: *Linguatula serrata* is a zoonotic parasite causing Halazoun syndrome in humans. Consumption of raw or semi-cooked infected edible offal induces the infection in human. **OBJECTIVES:** The main objective of this study was to investigate the outbreak and molecular characterization of *Linguatula serrata* in sheep and goat of Yazd slaughterhouse. **METHODS:** To determine the prevalence and severity of *Linguatula serrata*, mesenteric lymph nodes of 200 slaughtered sheep and 200 slaughtered goats in the Yazd industrial slaughterhouse were examined. DNA extraction was performed using commercial DNA extraction kit per the manufacturers' protocol. In order to genetic evaluation, the partially 18srRNA gene as a target was amplified using the specific primer pair which was designed by Primer3 software. The PCR product was sent for sequencing and the sequence was BLAST. Data were then analyzed using SPSS version 16.0 and by the Pearson correlation test and $\chi 2$ at a significance level of 0.01. **RESULTS:** In the present study, prevalence of the infection of slaughtered goats and sheep was 25.5% and 22.5%, respectively. No statistically significant difference was observed between the prevalence of this parasite in different ages and sexes groups (goats and sheep). The results of genetic evaluation showed no variation in this isolate in comparison with the ones in GenBank. **Conclusions:** This study was the first report of molecular identification of Linguatula serrate in Iran. Considering the high prevalence of infection in domestic animals and lack of knowledge and hygienic practice of the people about consumption of animal offal, infection of the people to *Linguatula serrata* is probable. Therefore, in this context, using appropriate and reliable diagnostic methods for detection of infection in abattoirs as well as educating people on the proper use of animal offal are effective steps to prevent this disease.

Keyword: *Linguatula serrata*, domestic animals, molecular characterization

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. *L. serrata* nymphs isolated from mesenteric lymph nodes of slaughtered animal.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of amplified genes. Lane 1=50 bp DNA ladder; Lanes 2= Gene-specific amplification bands on agarose gel (487 bp).

Table 1. Primer Combinations Used for the PCR Amplification of the 18SrRNA Genes.

Table 2. Prevalence rate of *L. serrata* (nymph) in mesenteric lymph nodes of slaughtered sheep in different sex and age groups.

Table 3. Prevalence rate of *L. serrata* (nymph) in mesenteric lymph nodes of slaughtered goats in different sex and age groups.

Table 4. Infection rate of *L. serrata* in mesenteric lymph nodes of slaughtered goats in different sex and age groups.

Table 5. Infection rate of *L. serrata* in mesenteric lymph nodes of slaughtered sheep in different sex and age groups.

***Corresponding author's email: b.hajimohammadi@gmail.com, Tel: 035-38209155, Fax: 035-38209149**

www.SID.ir