شیوع آلودگی *سارکوسیستیس* درگاوهای کشتاری تبریز

علیرضا علی‌همتی [۱]، عباس شهبازی [۲]، اسماعیل فلاح [۳]، مجید خانمحمدی [٤]، شبنم اسفرم* [۳،۵]

چکیده

سارکوسیستیس یکی از شایعترین انگل‌ها در حیوانات اهلی است. این انگل از لحاظ اقتصادی و بیماریزایی در حیوانات اهلی مهم می‌باشد. در این مطالعه عضلات مری، دیافراگم و قلب ۳۰ رأس گاو کشتار شده در کشتارگاه تبریز جمع‌آوری شد. با بررسی لاشه‌ها و نمونه‌ها هیچ‌گونه کیست ماکروسکوپی مشاهده نگردید و وجود گونه‌های میکروسکوپی سارکوسیستیس به وسیله روش هیستوپاتولوژی و با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین و مشاهده برادی‌زوئیتها در زیر میکروسکوپ تشخیص داده شدند. میزان آلودگی در قلب (میانگین و انحراف معیار ۵۲/ ± ۸/۱)، مری (میانگین و انحراف معیار ٤٤/ ± ٦/۲) و در دیافراگم (میانگین و انحراف معیار ۳۵/ ± ۱/۲) بود. قلب به عنوان آلوده‌ترین بافت مورد بررسی شناخته شد. تخلیص DNA با استفاده از کیت صورت گرفت. شرایط PCR برای تکثیر قطعه ۱۸ s rRNA فراهم شد. کیست‌های میکروسکوپی در عضلات دیافراگم، مری و قلب مشاهده شد. ارزیابی PCR نشان داد که کیست‌های میکروسکوپی متعلق به *سارکوسیستیس کروزی* است.

واژگان کلیدی: *سارکوسیستیس، هیستوپاتولوژی، PCR*

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/٤/۲٦

مقدمه

سارکوسیستیس از شایعترین انگل‌ها در حیوانات اهلی است که می‌تواند در انسان نیز آلوده کننده باشد. تا اوایل دهه ۱۹۷۰ تصور می‌شد سارکوسیستیس، تک‌یاخته‌ای غیر بیماریزا باشد ولی بعدها ثابت شد که برخی از گونه‌های سارکوسیستیس می‌تواند منجر به بیماری شدید و یا حتی کشنده در میزبان‌های واسط گردد. بیماری حاصل از این تک‌یاخته به دلیل معدوم کردن لاشه‌های آلوده به سارکوسیستیس، از نظر دامپزشکی، اقتصاد و بهداشت عمومی دارای اهمیت بوده و سالانه میلیون‌ها دلار خسارت به صنعت دامداری وارد می‌کند(۷). سه گونه سارکوسیستیس در گـاو شناسایی شده کـه گونـه *S. Bovifelis* یا *S. hirsuta* در عضلات، کیست‌های ماکروسکوپی ایجاد کرده و میزبان نهایی آن گربه است و بیماریزایی خفیفی دارد. گونه *S. Bovicanis* یا *S. cruzi* ایجاد کیست‌های میکروسکوپی کرده و میزبان نهایی آن سگ‌سانان می‌باشد. این گونه، بیماریزاترین گونه سارکوسیستیس در گاو است و موجب اگزوفتالمی، یرقان، خونریزی در میوکارد، ذات‌الریه، ریزش مو، تب، بی‌اشتهایی، کم خونی، کاهش وزن، کاهش تولید شیر، یبوست، سقط-جنین، اختلالات عصبی و مرگ می‌شود و عامل ایجاد بیماری دالمنی در گاوها می‌باشد. گونه *S. Hominis* یا S. *bovi hominis* در عضلات گاو ایجاد کیست‌های میکروسکوپی کرده و میزبان نهایی آن پریمات‌ها و انسان است و برای گاو غیر بیماری‌زا بوده ولی عامل سارکوسیستوزیس روده‌ای در انسان می‌باشد. آلودگی در انسان با مصرف گوشت خام حاوی کیست‌های عفونی صورت می‌گیرد و اسپوروسیست‌ها همراه مدفوع انسان دفع می‌شود (۱۰). در تحقیقات گذشته، میزان آلودگی دام‌ها به سارکوسیستیس در نواحی مختلف جهان در حدود ۱۰۰-۷۰٪ تخمین زده شده است. Gracyدر سال ۱۹۹۲ میزان آلودگی گاوهای دنیا را ۹۰٪ گزارش کرد (۹). *Lukesova* و همکاران در سال ۱۹۸٦ توسط روش هضمی، میزان آلودگی گاوها را ۹۳-۷۵٪ گزارش کرد (۱۱). آلودگی توسط روش گسترش فشاری *(Impression smear)* در مطالعات محققین از جمله *Nevole* و همکاران گزارش شده است (۱۵).

۱- گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز،تبریز، ایران
۳- گروه انگل شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، تبریز، ایران
٤- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، مرند ایران
۵*- کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (shabnamdew90@yahoo.com)

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌کار

در کل ۳۰ نمونه از عضلات مری، قلب و دیافراگم لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه شهرستان تبریز واقع در سعادت لو جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند و توسط روش‌هیستوپاتولوژیکی مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت انجام آزمایشات پاتولوژیک از روشی که Herenda در مطالعه خود به کار برده بود استفاده شد(۱۰). بر این اساس ابتدا بافت‌های عضلات دیافراگم، مری و قلب به ابعاد حجمی ۵ میلی‌متر با استفاده از تیغ بیستوری برش داده شدند و در محلول فرمالین ٪ ۱۰ جهت ثبوت بمدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. مراحل پاساژ بافتی به صورت آبگیری، الکل‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی و قالب‌گیری با پارافین انجام گرفت و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروتوم برش داده شدند و روی لام قرار گرفتند سپس با روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی مقاطع بافتی انجام شد. با استفاده از چسب انتیلن لام‌ها لامل‌گذاری شدند و برای بررسی توسط میکروسکوپ مجهز به دوربین آماده شدند. سپس لام‌های تهیه شده از مقاطع بافتی در بخش بافت‌شناسی دانشکده پزشکی تبریز بررسی و گزارش شدند. جهت مطالعه مولکولی توالی کامل ژن ۱۸ s rRNA سارکوسیستهای گاوی پایگاه بین‌المللی ثبت اطلاعات ژنی انتخاب شد. استخراج DNA با استفاده از کیت BIONEER و دقیقا طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. اندازه‌گیری مقدار DNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتر صورت گرفت. پرایمر مورد استفاده برای تمام گونه‌ها عبارت بود از:

(Sar-F1): 5' GCA CTT GAT GAA TTC TGG CA 3'
(Sar-R1): 5' CAC CAC CCA TAG AAT CAA G 3'

در میکروتیوپ‌ها ۱۶ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۷ میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۷ میکرولیتر آب و ۱ میکرولیتر از پرایمر۱۰۰ پیکومول ریخته شد و در نهایت حجم واکنش ۳۱ میکرولیتر محاسبه گردید.

شرایط PCR

شرایط دمایی به صورت یک چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۳۵چرخه ۵۷/۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۳۵ چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود و در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از پایان مرحله PCR برای مشاهده باندهای احتمالی از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده گردید. بعد از انجام واکنش تکثیری (PCR) و مشاهده باند مطلوب، محصول DNA توسط شرکت Macrogen Korea تعیین توالی گردید.

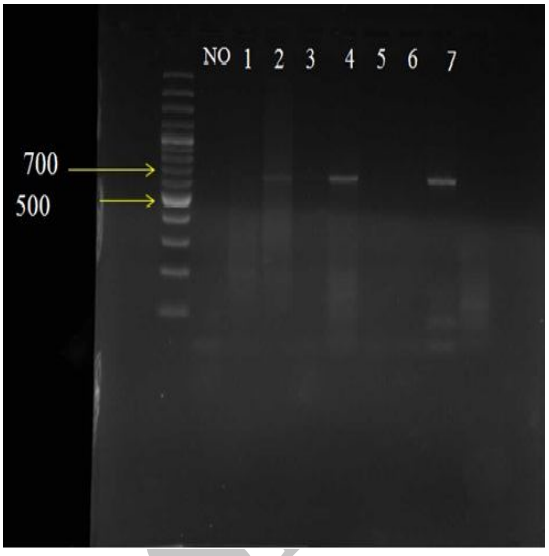
نتایج

در این مطالعه با استفاده از روش‌های هیستوپاتولوژی و مولکولی کیست‌های سارکوسیست بررسی شدند. با استفاده از روش هیستوپاتولوژی برادی‌زوئیت‌های سارکوسیست در عضلات مری، دیافراگم و قلب مشاهده شد. از میان نمونه‌هائی که از هر یک از عضلات گرفته شد، بیشترین میزان آلودگی بترتیب مربوط به عضلات قلب (میانگین و انحراف معیار (۵۲/ ±۸/۱)، عضلات مری (میانگین و انحراف معیار ٤٤/± ٦/۲) و عضلات دیافراگم (میانگین و انحراف معیار ۳۵/± ۱/۲) بود.

نتایج روش مولکولی

در نتایج حاصل از محصول PCR از میان ۳ گونه سارکوسیست در گاوها که شامل *سارکوسیستیس کروزی* با طول باند ٦۹۹ bp و *سارکوسیستیس هیرسوتا* با طول باند ٦۱۱ bp و گونه *سارکوسیستیس هومونیس* با طول باند ٦۳۳ bp می‌باشد فقط باندهای نزدیک به ۷۰۰ bp که مربوط به گونه *سارکوسیستیس کروزی* است مشاهده گردید. سپس توالی نوکلئوتیدها پس از بررسی دقیق در پایگاه اطلاعاتی (Blast, Ncbi) با *سارکوسیستیس‌کروزی* با شماره پذیرش (Accession number JX679468.1) =٪ ۹۹ همولوژی کامل نشان داد (نگاره ۱).

www.SID.ir



نگاره ۱ـ الکتروفورز محصول PCR ژن 18s rRNA که در آن حدودا قطعه bp ۷۰۰ برای گونه *S.cruzi* تکثیر یافته (۲،٤،۷)، سایز مارکر ۱۰۰bp، NO (کنترل منفی)

بحث

اصول و پایه این مطالعه استفاده از روشهای هیستوپاتولوژی و مولکولی می‌باشد. مزیت روش آسیب‌شناسی این است که می‌توان ویژگیهای ریخت‌شناسی کیست‌ها، محل استقرار کیست‌ها و عوارض مختلف پاتولوژی بر روی اندام مورد نظر را بررسی کرد اما تعیین گونه‌های انگل توسط روش هیستوپاتولوژی امکانپذیر نبوده و استفاده از روش مولکولی PCR در آشکارسازی گونه‌های سارکوسیست حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر که مشاهده مستقیم عضلات مری، قلب و دیافراگم در لاشه‌های گاوی صورت گرفت آلودگی به کیست‌های ماکروسکوپی در این عضلات مشاهده نشد. توسط روش هیستوپاتولوژیکی از میان ۱۰ عدد نمونه‌ای که از هر یک از عضلات دیافراگم، مری و قلب برداشته شد میزان آلودگی در عضله قلب (میانگین و انحراف معیار (۵۲/ ± ۸/۱)، عضلات مری (میانگین و انحراف معیار ٤٤/± ٦/۲) و عضلات دیافراگم (میانگین و انحراف معیار ۳۵/ ± ۱/۲) مشاهده شد. گزارشاتی از ابتلای گاوها در کشورهای مختلف وجود دارد که از دو روش آسیب‌شناسی و هضمی برای نشان دادن میزان آلودگی استفاده کرده‌اند. میزان آلودگی در کشور چک‌اسلواکی به روش هضمی ۹۳ ٪ (١٤) در نیوزلند ۱۰۰٪ (۸) در ژاپن با روش آسیب‌شناسی ۵۱ ٪ (١٦) در تایلند با روش هضمی ۹۹/۳۹ ٪ (۱۲) در کشور پرتغال با روش هضمی ۹۸٪ (٦) و در سومالی با روش هضمی و آسیب‌شناسی ۸۰–۷۰ ٪ (۵) بوده است.Singh و همکاران در سال ۲۰۰۳ گاوهای کشور هند را بررسی کردند که در ٦۰/٦ ٪ میکروکیست‌های انگل مشاهده گردید (۱۸). در تایلند در سال ۱۹۸۸ میزان آلودگی به کیست‌های ماکروسکوپی ۰/٦ ٪ گزارش شده است (۱۲). در استرالیا در سال ۱۹۷٤ بیش از ۹۰ ٪ گاوها آلوده تشخیص داده شدند (۱۳). در مطالعه‌ای که Wong و همکاران در سال ۱۹۹۲ بر روی عضلات اسکلتی انسان انجام دادند، نشان داده شد که در ۲۱ ٪ افراد مورد مطالعه میکروکیست‌ها وجود دارد. این موارد بدلیل استفاده از گوشت‌هایی که حرارت پخت آنها کافی نبوده، ایجاد شده بود (۱۹). با توجه به میزان آلودگی در کشورهای مختلف، بررسی شیوع سارکوسیست در مناطق مختلفی از ایران هم صورت گرفته است. مطالعه‌ای که رزمی و همکاران در سال ۱۳۷۹ در کشتارگاههای زیاران، تهران و گرگان انجام دادند میزان آلودگی به ماکروکیست انگل در گاوها صفر درصد و آلودگی به میکروکیست انگل ۷۳ ٪ گزارش گردید (۱). شکرفروش و همکاران در سال ۱۳۷۹ طی مطالعه‌ای که بر روی میزان آلودگی لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اصفهان داشتند در هیچکدام از نمونه‌های مورد مطالعه آلودگی به کیست‌های ماکروسکوپی انگل مشاهده نشد و ۹٤/۸٪ گاوها به کیست‌های میکروسکوپی سارکوسیستیس آلوده بودند. با توزیع آلودگی در عضله قلب، مری، دیافراگم، زبان و ران به ترتیب ۸٤/٤، ۵۳/٦، ۳۷/۲، ۲۹/٦، ۲٦/۸ ٪ بود و نیز در سال ۱۳۸۰ در اصفهان یک مطالعه با استفاده از روش گسترش تماسی انجام گرفت که ۹٤/۸ ٪ گاوها آلوده گزارش شدند (۲). در مطالعه دیگری که این محقق در گاوهای کشتار شده در شیراز انجام داد، میزان

Archive of SID
www.SID.ir

آلودگی به میکروکیست انگل را ۹۹٪ گزارش کرد (۳). شکرفروش و همکاران در سال ۲۰۰۵ در یک بررسی میزان شیوع آلودگی به کیست سارکوسیست در گاو را، با روش مشاهده مستقیم عضلات زبان، قلب، دیافراگم و مری، صفر و با روش گسترش بافتی ۹۹٪ و در روش هضم بافتی ۱۰۰٪ گزارش کردند (۱۷). در سال ۱۳۷٤ در همدان به دو روش هضم بافتی و آسیب‌شناسی مطالعه‌ای صورت گرفت که ۱۰۰٪ نمونه‌ها آلوده بوده‌اند (٤). تحقیقات صورت گرفته در این مطالعه بر روی سه گونه سارکوسیست در بافت‌های قلب، مری و دیافراگم تایید کننده وجود *سارکوسیستیس کروزی* بود. این اولین گزارش تشخیص مولکولی *سارکوسیستیس کروزی* در کشور است. از دلایل مهم و اصلی شیوع بالای انگل می‌توان به فراوانی سگ‌سانان در اطراف دام‌ها و مصرف باقیمانده گوشت و احشا دام توسط سگها و آلوده شدن آب و علوفه دام به فضولات آنها، کشتار غیر بهداشتی دام و چرای آزاد دام اشاره کرد. که با رعایت این موارد می‌توان آلودگی دام به سارکوسیست را تا میزان زیادی کاهش داد.

تشکر و سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری تبریز انجام گرفت که بدین وسیله نویسندگان از این مرکز و آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی تبریز نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

فهرست منابع

۱- رزمی، غ.، رهبری، ص. (۱۳۷۹): بررسی سارکوسیستیس نشخوادکنندگان اهلی در استان‌های تهران و گلستان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ، سال سوم، شماره ٤۰: ٤٦ -۳۹.

۲- شکرفروش، س.، احمدی،ب. (۱۳۸۳): میزان آلودگی لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اصفهان به سارکوسیستیس و اهمیت بهداشتی آن ، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ٦٤ ، ۱۰٤-۱۰۲.

۳- شکرفروش، س.، رضوی،س.، احمدی،ح.، صریحی،ک. (۱۳۸٤): بررسی فراوانی آلودگی سارکوسیست در گاوهای کشتاری شیراز با روش هضمی ، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

٤- درخشنده، ک.، قراگزلو، م. (۱۳۸۰): بررسی فراوانی کیست سارکوسیستیس در گاوهای کشتار شده در همدان با دو روش هضمی و آسیب شناسی،مجله دامپزشکی دانشگاه تهران ،جلد ٥٦ شماره ۱: ۷۹-۷۵.

5-Abdirahman, OM., Scanziani,E., Sironi,G. (1991): Prevalence of sarcosporidiosis in cattle slaughtered at the public abattoir in Mogadishu, Somali, Archivio Veterinario Italiano. 42(2), P: 72-79.

6-Carviho, S.P. (1993): Prevalence and identify of sarcocystis spp. Cysts in cattle slaughtered at Lisbon. Revita de Ciencias Veterinaryis. 88(505), P: 36-41.

7- Dubey, J.P., Saville, WJ., Lindsay DS., Stich, RW., Stanek, J., Speert, C.A. (2000): Completion of the life cycle of Sarcocystis neurona. Dec; 86(6): 1276-80.

8-Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (1989): Sarcocystosis of Animals and Man, C.R.C. Press, P: 1-125.

9- Gracy, I.F., (1992): Meat Hygiene.9 th ed. Bailliere Tindall,P: 60,433-435.

10- Herenda, D., Chambers, P.G., Ettriqui, A., Seneviratna,P. (1994): Manual on meat inspection for developing countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] Animal Production and Health Paper 119. FAO;. Speci.c diseases of sheep: Sarcocystosis in sheep.

11- Lukesova, D., Nevole, M., Haidova, B. (1986): Prevalence of sarcocystis in cattle and pig herds. J. Vet. Med.31:521-530.

12-Muanggai, M., Cholermchaiket, T. (1988): sarcocystosis in Thailand. The Incidence of sarcocystosis in cattle and buffaloes. Thai.J.Vet. Med. 18(4) P: 319-326.

13-Munday, B.L. (1975): The prevalence of Sarcosporidiosis in Australian meat animals. Aust. Vet. J. 51(10): 478-80.

Archive of SID
www.SID.ir

14- Nevola, M. (1982): Prevalence of sarcocystosis infection in cattle in Czechoslovakia, Veterinarstiv, 32, P: 1-24.
15-Nevola, M., Lukesova, D. (1981): Method for direct detection of Sarcocystis and diagnostic reliability. Veterinary Medicine, 10: 581-584.
16-Omata, Yedal. (1994): Survey of sarcocystis infection in cattle in east Hokkaido. Japanese Vet. Med. Sci. 56(3), P: 55-57.
17-Shekarforoush, S.S., Razavi, S.M., Dehghan, S.A., Sarihi, K.(2005): Prevalence of sarcocystis species in slaughtered goats in Shiraz, Iran. Vet Rec. Mar; 156(13): 418-20.
18-Singh, B.B., Sharma, J. (2004): Public health and zoonotic significance of sarcocystis species in cattle. 23rd World Buiatrics Congress, Quebec City, Canada.
19-Wong, K.T. and Pathmanathan, R.(1992): High prevalence of human skeletal muscle sarcocystosis in south-east Asia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Vol 86, 6, P: 631-632.

Archive of SID

www.SID.ir