نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۸۹، زمستان ۱۳۸۹

غربالگری موارد سرم مثبت سارکوسیستیس (آپی کمپلکسا: سارکوسیستیده)(Lankester۱۸۸۲) گوسفند به روش کانترایمونوالکتروفورزیس و مقایسه آن با یافته‌های کشتارگاهی

● محمد یخچالی
دانشیار بخش انگل شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)
● احمد مرشدی
دانشیار بخش ایمنی شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
● فرین ملکی فرد
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
تاریخ‌دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۸ تاریخ‌پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۹
تلفن‌تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۴۶۳۹۵۹
Email : m.yakhchali@urmia.ac.ir

چکیده

بیماری سارکوسیستیوزیس در اکثر نقاط جهان گزارش شده است و در ایران نیز در دام‌های نشخوارکننده شیوع دارد. بنابراین در مطالعه حاضر الگوی ایمنوالکتروفورزی سارکوسیستیس سرم گوسفند و مقایسه نتایج با یافته‌های کشتارگاهی برای تعیین حساسیت و ویژگی آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس به عنوان یک آزمون غربالگری انجام شد. برای تهیه سرم۱۰۰ نمونه خون گوسفندان قبل از کشتار تهیه و سرم جدا گردید. پادگن محلول از کیست‌های بافتی از مری، دیافراگم، عضله رانی و بین دنده‌ای آلوده به کیست سارکوسیستیس تهیه شدند. آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس نیز با سرم‌های شاهد منفی و مثبت انجام شد. در کانترایمنوالکتروفورزیس از۱۰۰ نمونه سرم گوسفندی، ۲۷درصد سرم‌ها مثبت بودند. حساسیت آزمون کانترایمنو الکتروفورزیس در حدود ۱۰۰ درصد و ویژگی آن ۸۳درصد بود. بنابراین آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس برای شناسایی و جدا کردن حیوانات آلوده به سارکوسیستیس از حیوانات سالم گله آزمون قابل پیشنهاد است.

کلمات کلیدی: گوسفند، سارکوسیستیس ، کانترایمونوالکتروفورزیس

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 89 pp: 28-32

Screening of seropositive sarcocystis (Apicomplexa: Sarcocystidae, Lankester1882) in sheep using counterimmunoelectrophoresis.

By: Yakhchali, M, Department of Pathobiology, Parasitology Division, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University (Corresponding Author; Tel: +989144463959) Morshedi, A Department of Microbiology, Immunology division,Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University.and Malekifard, F. Educated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University.

Sarcocystosis has been reported from most parts of the world, including ruminant animals in Iran. Based on this, immunoelectrophoresis profile of Sarcocystis and comparison between serum and necropsy findings to determine sensitivity and specifity of counterimmunoelectrophoresis (CIE) was undertaken. For this purpose, serum was collected from a total number of 100 sheep. Soluble antigen provided using infected tissues, as well. CIE analysis was conducted using negative and positive controls. Results indicated that seropositive sheep sample was 27%. Data analysis showed that specifity and sensitivity of this test were 100% and 83%, respectively. It is concluded that CIE is a reliable test to screen infected animals by Sarcocystis spp.

Key words: Sarcocystis, Sheep, Counterimmunoelectrophoresis.

مقدمه

انگل سارکوسیستیس به عنوان یکی از تک یاخته‌های انگلی کوکسیدیایی ایجادکننده کیست در حیوانات اهلی به شمار می‌رود. از این انگل تاکنون بیش از ۱۳۰ گونه شناسایی شده است و از تک یاخته‌های شایع در بسیاری از چهارپایان اهلی و وحشی، پرندگان، جانوران خونسرد و نیز انسان می‌باشد(۱۱). تاکتون ۴ گونه آن در گوسفند شناسایی شده است. کیست انگل در عضلات و سیستم اعصاب مرکزی حیوانات خونگرم و خونسرد یافت می‌شود (۶).

در ایران، شیوع سارکوسیستوزیس گوسفند برای اولین بار توسط افشار و همکاران در سال۱۳۵۱ بررسی گردید (۵). مطالعات بعدی نشان داد که شیوع آلودگی سارکوسیستیس در گاو ۷۳/۷۹ درصد، گوسفند ۶۰/۹۳ درصد، بز ۷۰/۴۵ درصد و گاومیش ۴۰/۹ درصد بود (۴). در همدان ۵۴ نفر سرم مثبت نیز به دلیل مصرف گوشت گوسفندان آلوده به سارکوسیستیس گزارش گزارش شده اند (۷). از اهداف این مطالعه ارزیابی آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس به عنوان یک آزمون غربالگری سرم شناسی، تخمین میزان آلودگی گوسفندان به انگل سارکوسیستیس بر اساس روش کانترایمنوالکتروفورزیس و یافته‌های کشتارگاهی و مقایسه آن با میزان آلودگی‌های قبلی با توجه به عدم اقدام کنترلی در مورد انگل و نیز بررسی میزان حساسیت و ویژگی آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس بود.

مواد و روش‌ها

تهیه سرم- ۱۰۰ نمونه خون از گوسفندان قبل از کشتار تهیه و علامت‌گذاری شدند. هر نمونه خون در ۲۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سرم جدا شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تهیه پادگن - برای تهیه پادگن سارکوسیستیس طی مراجعات کشتارگاهی اقدام به بازرسی لاشه‌ها نموده و نمونه برداری بافتی از مری، دیافراگم، عضله رانی و بین دنده‌ای آلوده به کیست سارکوسیستیس انجام شد. به کیست‌های جدا شده انگل از بافت آلوده بافر PBS به همراه ترکیب آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلورایـد (۰/۵میلی‌مول) افزوده و ۱۲ بار فریز-ذوب شدند. مخلوط حاصل سانتریفیوژ گردید (۸۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه) و مایع رویی به عنوان پادگن محلول جدا گردید..

برای استاندارد کردن غلظت پادگن با استفاده از روش غلظت لوله شماره سه مک‌فارلان استفاده شد. به این منظور مقدار ۲ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک سه درصد را در لوله آزمایش ریخته و دو قطره سرم انسانی حاوی ۸-۶ میلی‌گرم پروتئین در هر دسی لیتر نیز اضافه گردید. مشاهده کدورت معرف غلظت آن بود که با افزودن سرم فیزیولوژی کدورت در محلول کمتر گردید. در اسپکتوفوتومتری که قبلا عاری از حباب هوا بود، آب مقطر اضافه شد و در ۴۵۰ نانومتر تنظیم گردید. در ۴۰ نانومتر، جذب نوری معادل ۱۸۸-۱۸۶ نشان داد (غلظت معادل غلظت لوله شماره ۳ مک فارلان). مقدار نرمال پروتئین پادگن برای این آزمایش در ۲/۵-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تنظیم شد (۱۵).

کانترایمنو الکترو فورزیس- برای انجام کانتر ایمنو الکتروفورزیس، از بافر باربیتال که بر اساس روش گراندبوک تهیه می‌شد استفاده گردید (pH ۸/۹-۹/۲). روی صفحات شیشه‌ای مخصوص به ضخامت ۴ میلی‌لیتر ژل آگاروز یک درصد ریخته شد تا منعقد گردد (۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). سپس توسط پانچر چاهک‌های به قطر ۳/۵ میلی متر روی ژل ایجاد گردید. فاصله ردیف‌های افقی ۱/۵ سانتی‌متر و فاصله حفره‌های پادگن-پادتن ۵ میلیمتر بود. مطلوبترین کمان رسوبی

در فاصله‌ی ۳ میلی‌متر از دو حفره مشـاهده شـد. بـرای انجام آزمایش نمونه‌های سرمی در دمای آزمایشگاه ذوب می‌گردید و از رقت‌های ۱/۲ تا ۱/۱۶ نمونه‌های سرم ۵ میکرولیتر به هر حفره ستون عمودی اضافه شد. برای مشـخص شدن خط رسوبی پادگن-پادتن از رنگ بروموفنل بلو (۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ سـی سی بافر باربیتال) به نسبت دو قسمت سرم ویک قسـمت رنگ اسـتفاده گردید. در داخل هرکـدام از حفره‌های مربوط به پادگن و پادتن مقدار ۵ میکرولیتر سرم و در حفره مقابل آن ۵ میکرولیتر پادگن تهیه شـده از کیست ریخته شد. برای هر سری از سرم‌های نمونه که در یک نوبت آزمایش می شد، یک سرم شاهد منفی ویک سرم شاهد مثبت (تهیه شده از بخش انگل‌شناسی موسسه رازی حصارک) نیز جهت کنترل پادگن گذاشـته شـد. سپس اسلاید شیشـه‌ای نمونه‌گذاری شده در تانـک الکتروفورزیـس قرار داده و در دو مرحلـه، ابتدا با ۲۵۰ ولت و ۳۰ میلی‌آمپر در ۱۵ دقیقه و سـپس ۱۰۰ ولت و ۲۰ میلی‌آمپر به مدت ۷۵ دقیقه الکتروفورز انجام شـد. برای نمایان شدن بهتر خط رسوبی ژل رنگ‌آمیزی گردید (۱۰).

نتایج

در کانترایمنوالکتروفورزیس از ۱۰۰ نمونه سرم گوسفندی، ۲۷درصد سرم‌ها مثبت بودند. ۱۵ درصد از دام های بدون کیست انگل، سرم مثبت بودنـد (جـدول ۱). به طوری که دوازده نمونه با عیـار۲، نه نمونه با عیار ۴، چهـار نمونه با عیار ۸ و دو نمونه با عیار ۱۶ بودند (جدول ۲). چنانچه ۱۵ مورد سرم مثبت و فاقد کیست، مثبت مشکوک در نظر گرفته شوند، حساسـیت و ویژگـی آزمون به ترتیب در حـدود ۱۰۰درصد و ۸۳درصد بدست آمد.

بیشـترین فراوانی موارد سـرم مثبـت مربوط به رقـت ۱ به ۲ (با عیـار۲) در ۱۲ نمونه بـود. کمترین تعداد موارد سـرم مثبت در رقت ۱ بـه ۱۶ (با عیار ۱۶) در ۲ نمونه ثبت شـد. در این مطالعه میزان آلودگی عضلات مختلف به ماکروکیسـت سارکوسیستیس نشان داد که بیشترین میزان آلودگی در دیافراگم (۱۴درصد) و کمترین میزان آلودگی در عضله چهارسرران (۶درصد) می باشد (جدول ۳).

جدول ۱—موارد سرم مثبت گوسفندان آلوده به سارکوسیستیس در آزمون کانترایمونو الکتروفورزیس

آزمون	تعداد سرم	موارد سرم مثبت		
		دارای کیست	فاقد کیست	جمع کل
کانترایمونوالکتروفورزیس	۱۰۰	۱۲	۱۵	۲۷

جدول ۲- عیار تعداد موارد سرم مثبت گوسفندان در رقت های مختلف در آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس

رقت های سرم	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶
موارد سرم مثبت با کیست	۵	۴	۲	۱
موارد سرم مثبت بدون کیست	۷	۵	۲	۱

جدول ۳- درصد فراوانی یافته های کشتارگاهی آلودگی به کیست سارکوسیستیس در اندام های مختلف گوسفند در کشتارگاه شهرستان

یافته ها	تعداد دام	موارد سرم مثبت			
		مری	دیافراگم	عضله چهارسرران	عضله بین دنده ای
کانترایمونوالکتروفورزیس	۱۰۰	۱۰	۱۲	۶	۸

بحث

آزمون‌هـای سرم‌شناسـی از روش هـای آزمایشـگاهی تشـخیص سارکوسیسـتوزیس می‌باشـند که موفقیـت آنها به در دسـترس بودن پادگـن اختصاصی انگل بسـتگی دارد (کاظمی و همـکاران، ۱۳۸۵). از روش‌های کـروماتوفوکوسینگ (۱۷) و ژل کروماتوگرافی برای جداسازی پروتئین‌های سارکوسیستیس اسـتفاده کرده‌اند (۱۲، ۱۳). به طوری که از سارکوسیسـتیس جدا شده از سیستوزوئیت‌های عضلات گاو به عنوان پادگن در تست الیزا استفاده گردیده است (۱۴).

در مطالعه حاضر با اسـتفاده از پادگن کیست سارکوسیستیس بافتی ۲۷ درصد سرم گوسفندان تحت مطالعه به روش کانترایمنوالکتروفورزیس سـرم مثبت بودند. از آنجایی که در هیچ یک از مناطق کشور کنترلی در مورد انگل سارکوسیسـتیس نمی‌شـود، حضور ۲۷ درصد آلودگی سرمی بیانگر کاهش میزان آلودگی نسبت به گزارش‌های قبلی است (۶،۴،۳،۲). این کاهش به دلیل نقش عوامل زیسـت محیطی نظیر تغییرات دوره ای دما در تابستان و زمستان و وضعیت نگهداری گوسفندان ازجمله استفاده بیشـتر از مراتع و یا نگهداری در آغل، از بین بردن سـگ‌های ولگرد در مناطق شهری و روستاها باشـد. بنابراین برای آگاهی از وضعیت آلودگی سارکوسیسـتیس در گله‌های گوسـفندان کشـور مطالعات کشتارگاهی و سـرولوژیک پیشـنهاد می‌شـود. سـگ و گربه از میزبانان قطعی برای گونه‌های شناخته شده سارکوسیسـتیس گوسفندی می‌باشند. بنابراین، یکی از علل وقوع آلودگی شـدید در میزبان واسـط به این علت نسـبت داده می‌شـود که حیوانات مزرعه در ارتباط نزدیکی با سـگ‌های نگهبان گله هستند و سـگ‌ها چراگاه‌ها را با اسپوروسیست‌های سارکوسیستیس آلوده می‌کنند (۸).

آزمون‌هایی نظیر الیزا، ایمنوفلورسـانس و برخی از آزمون‌های رسوب در ژل در سرولوژی سارکوسیستوزیس کار برد دارند ولی هیچ‌یک آزمون گلداسـتاندارد محسوب نمی شوند. از اینرو در مطالعه حاضر، پی بردن به موارد مثبت حقیقی و یا منفی حقیقی بر اساس بررسی‌های کشتارگاهی و مشاهده کیست بافتی طراحی گردید. بنابراین نمونه‌های سرم مثبت فاقد کیست بافتی که مثبت مشـکوک در نظر گرفته شدند، احتمالا درصدی از آنها می تواند مربوط به مرحله میکروکیسـت باشـد. در این تحقیق به دلیل عدم انجام آزمایش میکروسـکوپی بافت جهت یافتن میکروکیست انجام نگردید، از این‌رو جزو خطای آزمایش در نظر گرفته شدند از آنجایی که برای تعیین حساسـیت آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس در تشخیص سارکوسیستوزیس نیاز به تعداد مثبت حقیقی و منفی بود، فقط نمونه‌های سـرم مثبتی که ماکروکیست داشتند، مثبت حقیقی برای آزمون در نظر گرفته شـدند. بنابراین نمونه‌های سـرم مثبت فاقد ماکروکیسـت نیز به دلیل عـدم انجام هیسـتوپاتولوژی برای یافتن میکروکیسـت، منفی در نظر گرفته شـدند. با این وجـود برای رفع هرگونه ابهـام به جای مثبت کاذب موارد مثبت مشـکوک در نظر گرفته شـدند و در ارزیابی‌ها تعداد مثبت‌های حقیقی محاسبه نشدند. محاسبات به این روش فقط در تعیین میزان حساسـیت و ویژگـی آزمـون کانترایمونوالکتروفورزیس با پادگن سارکوسیستیس کاربرد دارد و در تعیین میزان شیوع آلودگی گوسفندان به سارکوسیسـتیس، کلیه حیوانات سـرم مثبت با عیـار ۱ به ۲ و بالاتر اعم از دارای ماکروکیسـت و بدون ماکروکیسـت، آلوده به حساب آمدند. حیوانات سرم منفی فاقد کیست نیز غیر آلوده در نظر گرفته شدند.

در این مطالعه از سـرم‌های مـورد آزمایش که همراه با کیسـت در بافت‌ها بودند، همگی در آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس مثبت شـدند و نمونه منفی کاذب مشاهده نگردید. از این رو حساسیت آزمون در تشخیص سرمی سارکوسیسـتوزیس ۱۰۰درصد به دسـت آمد که از این جهت با آزمـون الایزا برابـری می‌کند. در حالی که از ۸۸ نمونه فاقد کـیسـت ماکروسـکوپی، ۱۵ نمونه در آزمـون کانترایمنوالکتروفورزیس مثبت شـدند که ۱۲ نمونه مثبت دارای خط رسوبی نازک و کوتاه بودند (مثبت مشـکوک). در این رابطه، درصـدی از مثبت های مشـکوک را می‌توان مرتبط بـا موارد آلودگی در مرحله میکروکیسـت و واکنش‌های متقاطع با سـایر تـک یاخته‌های آپی کمپلکسـا دانسـت که بایسـتی به عنوان بخشـی از خطای آزمایـش مد نظر قرار گیرد. بنابرایـن ویژگی آزمـون کانترایمنوالکتروفورزیـس ۸۳درصد بدسـت آمد. البته در یک بررسـی حساسـیت آزمون کانترایمـنوالـکتروفـورزیس برای تـشـخیص سارکوسیستیس لوینی ۹۰ درصد گزارش شده بود (۱۶).

نتایج این تحقیق نشـان داد که آزمـون کانترایمونوالکتروفورزیس از حساسیت و ویژگی مناسبی برخوردار بوده و می‌تواند یک روش غربالگری مناسب برای تشـخیص موارد سارکوسیستوزیس در گله‌های گوسفند به دلیل سادگی در اجرا و ارزانی انجام آن باشد.

منابع مورد استفاده

۱- آغاز، ع .(۱۳۷۹) بررسـی کشتارگاهی سارکوسیستوزیس در گاومیش‌های ذبح شـده در کشـتارگاه صنعتی ارومیه، پایان نامه جهت اخـذ درجه دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه ارومیه. شماره ۵۶۵: ص ۱۴و ۲۹.

۲- ارشد، م، دلیمی اصل، ع. و غفاری فر، ف. (۱۳۸۶) مطالعه مقایسه ای تشخیص سارکوسیستیس در لاشه گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه تبریز، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷۵: ص ۷۲-۶۸.

۳- رزمـی، غ .(۱۳۶۶) فراوانی سارکوسیسـتیس در نشـخوارکنندگان اهلی ایران. پایان نامه دوره جهت اخذ درجه دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ۱۶۴۴، ص ۱۹-۱۶

۴- رزمی، غ و رهبری، ص .(۱۳۷۹) بررسـی سارکوسیستیس در نشخوارکنندگان اهلی در اسـتان‌های تهران و گلسـتان، مجله علمی دانشـکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، سال ۳ شماره ۴: ص ۳۹-۴۶.

۵- رفیعی، ع .(۱۳۵۷) تک یاخته‌شناسـی دامپزشکی و مقایسه ای. انتشارات دبیر خانه شورای پژوهش‌های علمی کشور. ص ۷۶۰-۷۴۸

۶- شـکر فروش، س، ش و علیخانی، ر .۱۳۸۲ میزان آلودگی لاشـه گوسـفندان کشتار شده در کشـتارگاه اصفهان به سارکوسیستیس، مجله پژوهش و سازندگی، شماره :۸، ص ۷۲-۶۸.

۷- قراگوزلو، م. ج؛ سـجادی،م و سماواتی،م (۱۳۷۴) مطالعه حضور آنتی‌بادی ضد سارکوسسیستیس گوسـفند در پنجاه و چهار نفر از اهالی همدان. هفتمین کنگره بین‌المللی پزشـکی جغرافیایی و سومین کنگره ایمونولوژی و آلرژی ایران، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۸- کاظمـی، ب.، خـزان، ه.، عظیم زاده، ا.، صفـری، خ.، تحویل‌دار بیدرونی، ف. و قجری، ع. (۱۳۸۵) خالص سـازی و شناسـایی باند پروتئینی از سارکوسیسـتیس گوسـفند، مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، جلد پنجم، شماره دوم، ص ۸۸-

.۸۵
۹- گرامی نیا، ا. (۱۳۷۵) بررســی سرودیاگنوستیک سارکوسیستیس با استفاده از تســت ایمونوالکتروفورز در گوسفند در ارومیه، پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۲۴۸۰، ص۴۳-۴۱.

10- Deka, D.K. and Gaur, S.N.S., (1990) Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of *Taenia hydatigena* cysticercosis in goats. *Veterinary Parasitology*, 37: 223-228.

11- Dubey, J.P., (1976) A review of Sarcocystis of domestic animal and of other coccidia of cats and dog. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 169(10): 1067-1078.

12- Hoana, J.S., Morrow, J.K., Saville, W.J., Dubey, J.P., Granstrom, D.E. and Howe, D.K., (2005) Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of equine antibodies specific to Sarcocystis neorona surface antigen. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(9):1050-1056.

13- Koudela, B., (1985) Purification of cystozoites of Sarcocystis spp. by the chromatographic gel. Folia. *Parasitologica*, 32(4): 295-302.

14- Morsy, T.A., Abdle Mawla, M.M. and Hamidi, K.N., (1994) Assessment of intact Sarcocystis cystozoites as an ELIZ Aantigen. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 24(1): 295-302.

15- Pagana, T.J. and Pagana, K.D., (2009) *Mosby's Manual of Diagnostic and laboratory Tests.* 4th edition, Mosby publisher, pp. 498-499, 559-560.

16- Rohini, K. and Hafeez, M., (1985) Serodiagnosis of sarcocystosis in buffaloes. *Indian Veterinary Journal*, 40: 314-318.

17- Tenter, A.M., Zimmerman, G.L. and Johonson, A.M., (1991) Separation of antigens from Sarcocystis species using chromatofocusing. *Journal of Parasitology,* 77(5):727-736.