بررسی سرولوژیکی توکسوپلاسموزیس گوسفند در منطقه فارس

● **دکتر ناصر وصال**، عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
● **دکتر سیدضیاءالدین تابعی**، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
● **دکتر زهرا فقیری**، عضو هیأت علمی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
● **دکتر سعید حسین‌زاده**، عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی شیراز

چکیده

به منظور بررسی میزان آلودگی گوسفندان منطقه فارس به توکسوپلاسموز، آزمایش هماگلوتیناسیون بر روی نمونه‌های سرمی جمع‌آوری شده انجام گردید. پادکن مورد نیاز جهت انجام آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA)، از طریق تکثیر انگل *Toxoplasma gondii* بر روی ۳۳ موش سفید کوچک (با تزریق سوبه RH توکسوپلاسما به صورت داخل صفاقی) و جمع‌آوری مایع صفاقی تهیه گردید و پس از طی مراحل متعدد محلول پادکن بر روی گلبولهای قرمز انسان (گروه O منفی) قرار داده شد. پس از استاندارد کردن غلظت پادکن حاصل با سرمهای کنترل مثبت و منفی، سرمهای جمع‌آوری شده مورد آزمایش قرار گرفتند. برای انجام این مطالعه تعداد ۴۰۰ نمونه خون از گوسفندان به ظاهر سالم جمع‌آوری گردید. گوسفندان از دو جنس نر و ماده نژادهای ایرانی و در گروههای مختلف سنی قرار داشتند. پس از جداکردن سرم، ۳۵۲ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت. از این تعداد ۱۴۰ نمونه سرم از گوسفندان نر و ۲۱۲ نمونه از گوسفندان ماده در گروههای سنی چهارگانه (زیر یک سال، ۲ - ۱ سال، ۴ - ۲ سال و بالای چهار سال) به روش Microtiter IHA آزمایش و تیترهای ۱:۶۴ به بالا به عنوان مثبت تلقی شد. نتیجه اینکه ۲۸/۶۷ درصد از نرها و ۲۹/۲۶ درصد از ماده‌ها مثبت بودند و با افزایش سن یک افزایش نسبی در میزان آلودگی مشاهده شد. میانگین آلودگی ۲۹/۰۳ درصد تعیین گردید. در مورد ۱۱ سرم (۴ راس نر و ۷ راس ماده) نتیجه قرائت شده مشکوک بود که جزء آمار فوق به حساب نیامده است. تست آماری مربع کای (Chi-square) هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین دو جنس نر و ماده و همچنین بین گروههای سنی مختلف نشان نداده است ($P>0/05$).

مقدمه و هدف

توکسوپلاسموز بیماری مشترکی است که در آن گربه و گربه‌سانان میزبانهای نهائی بوده و اکثر پستانداران و پرندگان نقش میزبان واسط را به عهده دارند. میزبان نهائی همراه با دفع مدفوع، توکسوپلاسما را دفع می‌نماید که منبع مهم آلودگی برای انسان و سایر حیوانات به شمار می‌رود (۱۳). عفونت توکسوپلاسمائی دارای انتشار جهانی بوده و شیوع آن در مناطق مختلف متفاوت است. بالاترین میزان آلودگی در مناطق گرم و مرطوب مشاهده می‌شود و از طرف دیگر پائین‌ترین میزان آلودگی در ساکنین مناطق گرم و خشک و سرد دیده می‌شود (۹).

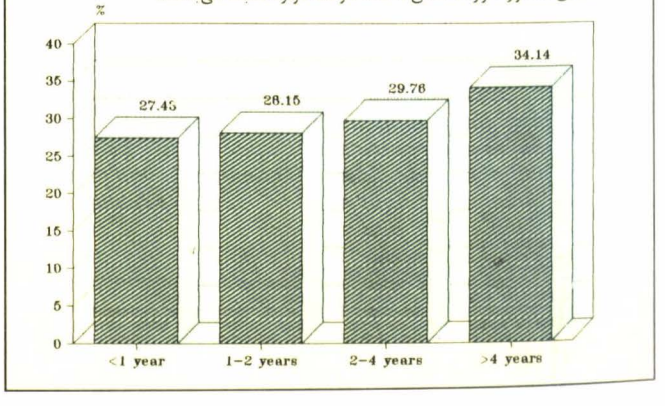
به طور کلی مطالعات بافت شناسی، سلول و سرولوژیکی و تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند در تشخیص توکسوپلاسموز مورد استفاده قرار گیرد (۶).

مطالعه سرولوژیکی انجام شده در ایران نشان می‌دهد که میزان آلودگی در ساکنین سواحل دریای مازندران ۵۵ درصد است در صورتی که در مورد ساکنین اطراف ارومیه و ماکو ۲۳ درصد و در ساکنین اطراف سردشت و ایذه به ترتیب ۶ و ۹ درصد بوده است (۱).

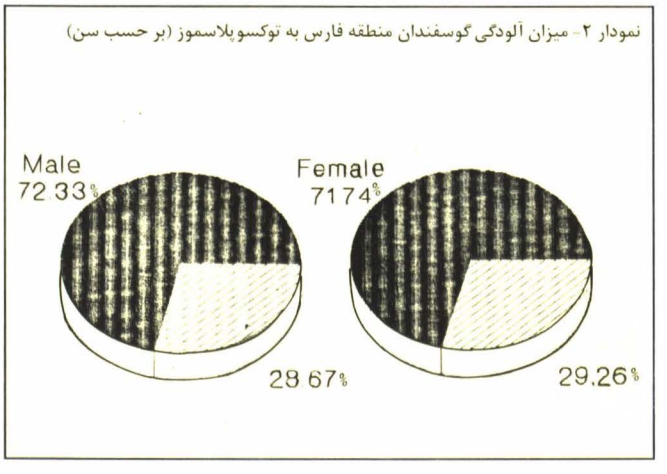
انتقال توکسوپلاسموز از طریق جفت در حیوانات مختلف مشاهده شده است. در گوسفند انتقال بیماری از مادر به جنین فقط در صورت بروز عفونت اولیه در طی دوران آبستنی روی می‌دهد که در نتیجه آن مرده‌زائی، سقط جنین و تولد بره‌های ضعیف از علائم بسیار معمول است (۵). در سال ۱۹۸۰، Dubey توانست انگل را از کبد، کلیه، قلب، دیافراگم، عضلات مخطط و مغز بزهائی که به طور طبیعی و تجربی آلوده شده بودند جدا سازد (۴).

انسان نیز به صورت اکتسابی یا مادرزادی به

نمودار شماره ۱- میزان آلودگی گوسفندان منطقه فارس به توکسوپلاسموز (برحسب جنس) (قسمت‌های هاشور خورده نشان دهندهٔ درصد موارد مثبت می‌باشد).



نمودار ۲- میزان آلودگی گوسفندان منطقه فارس به توکسوپلاسموز (بر حسب سن)



تصویر۱- تزریق داخل صفاقی *T. gondii* به موش آزمایشگاهی

توکسوپلاسموز مبتلا می‌شود. توکسوپلاسموز کودکان در اغلب موارد منشاء مادرزادی دارد در حالیکه مادران آنها ممکن است علائم خاصی را نداشته باشند و یا به فرم خفیف بیماری مبتلا باشند (۱۲).

اصولاً بررسی وضعیت بیماری توکسوپلاسموز و چگونگی انتشار آن و تعیین میزان آلودگی انسان و حیوانات در نقاط مختلف کشور که دارای آب و هوای متنوعی است نیاز به تحقیق و بررسی جامعی دارد.

با توجه به حساسیت کامل گوسفند به عفونت با توکسوپلاسما و بالا ماندن تیتر پادتن در این حیوان، تعیین میزان آلودگی در گوسفند شاخص معتبری برای نشان دادن عفونت توکسوپلاسمائی در هر ناحیه می‌باشد (۳).

روش پادگن‌سازی

ابتدا سویه RH انگل *T. gondii* (بر روی ۱۰ موش سفید سوری آلوده) تهیه و انگل به دست آمده از حفره صفاقی این موشها به طور متوالی و با فواصل ۴-۳ روز به روش داخل صفاقی به موشهای سالم تزریق گردید (تصویر شماره ۱).

پس از گذشت ۴-۳ روز حفره صفاقی موشهای آلوده با محلول نمکی ۸/۵ در هزار شستشو و مایع صفاقی جمع‌آوری گردید. مایع بدست آمده با سرم فیزیولوژی رقیق شده و موشهای سالم باتزریق یک میلی‌لیتر از این محلول آلوده می‌شدند. پس از جمع‌آوری مایع صفاقی موشهای آلوده، تروفوزوئیتهای حاصله با محلول نمکی در ۱۰۰۰۰ - ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و به رسوب حاصله به میزان ۱۰ برابر آب مقطر استریل اضافه می‌شد. جهت لیزشدن انگلها، آنها را به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و در این مدت چندین بار شدیداً به هم زده می‌شدند در انتها نیز ندیدن انگل سالم در زیر میکروسکوپ نشان دهنده لیزه شدن کامل انگلها بود. در نهایت محلول حاوی انگل را با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده و مایع رونی جمع‌آوری می‌گردید. در این محلول فقط قسمتهای محلول در آب انگل موجود است. پادگن حاصله تا هنگام استفاده در فریزر ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد (۱۰).

پس از انجام خونگیری از ورید وداج و جداسازی سرم، آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم بر روی نمونه‌ها انجام می‌شد.

ابتدا سرم بیمار را غیر فعال کرده (در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) با استفاده از سرم طبیعی خرگوش رقتهای مختلف سرم بیمار به روش زیر تهیه می‌گردید:

۱- در ۱۲ خانه میکرو پلیت با استفاده از میکروپیپت مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر از سرم طبیعی خرگوش ریخته می‌شد سپس ۰/۰۵ میلی‌لیتر از سرم مورد آزمایش به خانه اول که محتوی ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول نمکی نرمال یک درصد بود اضافه می‌گردید. این مجموعه را مخلوط کرده ۰/۰۵ میلی‌لیتر از آن را به خانه دوم انتقال داده و این عمل تا خانه ۱۱ میکرو پلیت تکرار می‌شد.

۲- پلیت را بر روی دستگاه به هم زن گذاشته و سپس ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر از گلبولهای حساس شده به تمام خانه‌ها اضافه می‌گردید. مجدداً محتویات پلیت را توسط به هم زن مخلوط کرده و به مدت ۲ الی ۳ ساعت در درجه حرارت اطاق بدون حرکت قرار داده می‌شد. سرانجام نتیجه آزمایش را از روی طرحی که گلبولها در ته خانه‌های پلیت ایجاد کرده‌اند خوانده می‌شد. در صورتی که لایه نازکی از گلبولها خانه را پوشانده باشد جواب مثبت است. اگر واکنش قوی باشد اطراف لایه چین‌خوردگی مشاهده می‌شود و اگر جواب منفی باشد گلبولها به صورت دایره متراکم در مرکز خانه پلیت دیده می‌شود.

کنترل‌ها

۱- کنترل رقیق کننده

از سرم یک درصد خرگوش به مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر در تعدادی از خانه‌های پلیت ریخته و ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر از گلبولهای حساس شده به آنها اضافه می‌شد. واکنش در این خانه‌ها بایستی منفی باشد.

۲- کنترل سرم

از گلبولهای مجاور شده با اسید تانیک که با پادگن توکسوپلاسما حساس نشده‌اند با استفاده از سرم یک درصد خرگوش محلول گلبولی ۱/۵ درصد تهیه کرده در خانه ۱۲ هر ردیف پلیت ریخته و به آن سرم مورد آزمایش اضافه می‌شود. نتیجه این آزمایش نیز بایستی منفی شود (۱۱).

۳- کنترل مثبت

در این تحقیق از سرمهای مثبت با تیترهای مختلف به عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شد.

جدول شماره ۱- میزان آلودگی گوسفندان ماده منطقه فارس به توکسوپلاسموز

گروه سنی گوسفندان ماده	تعداد کل	تعداد مثبت	درصد مثبت	۱/۶۴	۱/۱۲۸	۱/۲۵۶	۱/۵۱۲	۱/۱۰۲۴	۱/۲۰۴۸<
زیر یک سال	۷۳	۲۱	۲۸/۷۶	۵	۹	۵	۲	۰	۰
۲-۱ سال	۳۹	۱۰	۲۵/۶۴	۳	۳	۲	۱	۱	۰
۴-۲ سال	۵۲	۱۵	۲۸/۸۴	۳	۲	۴	۵	۰	۱
بالای ۴ سال	۴۱	۱۴	۳۴/۱۴	۱	۲	۲	۴	۳	۲
جمع	۲۰۵	۶۰	۲۹/۲۶	۱۲	۱۶	۱۳	۱۲	۴	۳

جدول شماره ۲- میزان آلودگی گوسفندان نر منطقه فارس به توکسوپلاسموز

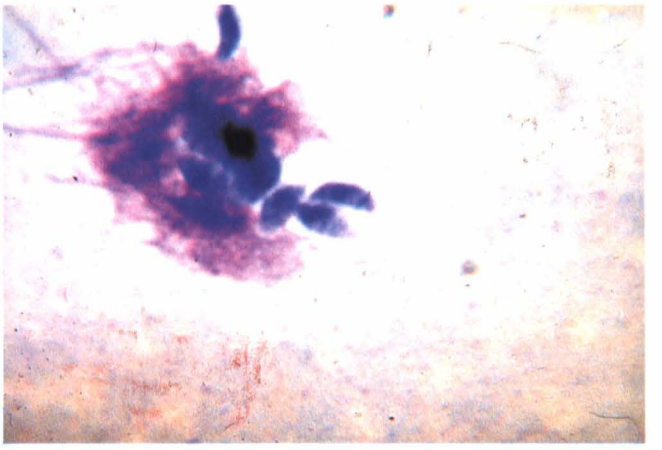
گروه سنی گوسفندان نر	تعداد کل	تعداد مثبت	درصد مثبت	۱/۶۴	۱/۱۲۸	۱/۲۵۶	۱/۵۱۲	۱/۱۰۲۴	۱/۲۰۴۸<
زیر یک سال	۴۰	۱۰	۲۵	۳	۴	۲	۱	۰	۰
۲-۱ سال	۶۴	۱۹	۲۹/۶۸	۵	۶	۴	۲	۱	۱
۴-۲ سال	۳۲	۱۰	۳۱/۲۵	۳	۴	۱	۱	۱	۰
جمع	۱۳۶	۳۹	۲۸/۶۷	۱۱	۱۴	۷	۴	۲	۱

جدول شماره ۳- میزان آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به توکسوپلاسموز (برحسب جنس)

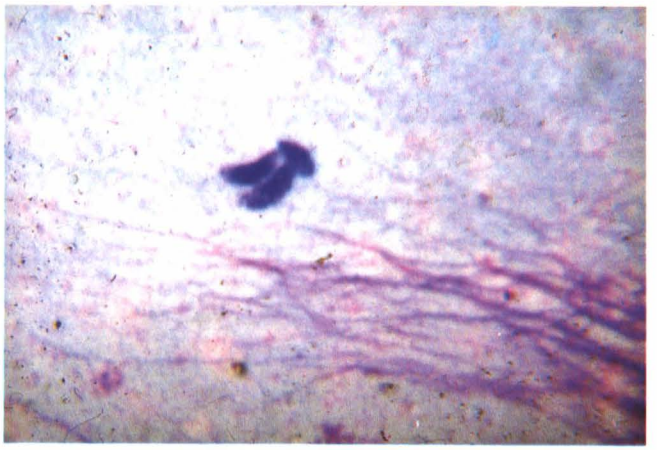
جنس	توکسوپلاسموز		جمع	درصد موارد مثبت
	+	-		
نر	۳۹	۹۷	۱۳۶	۲۸/۶۷
ماده	۶۰	۱۴۵	۲۰۵	۲۹/۲۶
جمع	۹۹	۲۴۲	۳۴۱	۲۹/۰۳

جدول شماره ۴- میزان آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به توکسوپلاسموز (برحسب سن)

سن (سال)	توکسوپلاسموز		جمع	درصد موارد مثبت
	+	-		
<۱	۳۱	۸۲	۱۱۳	۲۷/۴۳
۲-۱	۲۹	۷۴	۱۰۳	۲۸/۱۵
۴-۲	۲۵	۵۹	۸۴	۲۹/۷۶
>۴	۱۴	۲۷	۴۱	۳۴/۱۴
جمع	۹۹	۲۴۲	۳۴۱	۲۹/۰۳



تصویر شماره ۲- پاره شدن ماکروفاژ و بیرون ریختن تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما، گسترش از مایع صفاقی موش آلوده، رنگ‌آمیزی گیمسا



تصویر شماره ۳- تاکی‌زوئیت‌های آزاد در مایع صفاقی موش - رنگ‌آمیزی گیمسا

نتایج

براساس روش کار فوق، ۳۵۲ سرم از طریق هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA) مورد بررسی قرار گرفت و تیترهای ۱:۶۴ به بالا به عنوان مثبت تلقی می‌شد (۷ و ۸).

نتیجه آزمایشات بر روی گوسفندان مورد مطالعه بدین ترتیب بود که ۲۸/۶۷ درصد از نرها و ۲۹/۲۶ درصد از ماده‌ها تیتر مثبت داشتند و با افزایش سن یک افزایش نسبی در میزان آلودگی مشاهده شد. در مورد ۱۱ سرم (۴ رأس نر و ۷ رأس ماده) نتیجه قرائت شده مشکوک بود که از جدول نتایج حذف گردیده است نتایج حاصله در جداول ۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودارهای ۱ و ۲ خلاصه شده است.

بحث

در آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA) از گلبول قرمز گوسفند یا انسان به عنوان ذره خنثی استفاده می‌شود. از آنجائی که در این روش پادگن به دست آمده از طریق لیز کردن انگل، بیشتر پادگن‌های داخل سلولی هستند بنابراین پادتن بر علیه آن در مراحل انتهائی عفونت یا در حالت مزمن بیماری یعنی زمانی که تعداد زیادی از انگلها به واسطه فعالیت سیستم دفاعی بدن لیزه شده باشند تولید می‌شود.

بنابراین تست IHA جهت تشخیص مراحل ابتدائی بیماری یا عفونت حاد مناسب نیست اما به خوبی قادر است عفونتهای مزمن را تعیین نماید. به همین دلیل می‌توان از آن به عنوان یک آزمایش بیمارياب (Screening test) استفاده نمود (۲ و ۱۰). وجود پادتن توکسوپلاسما در سرم گوسفندان حاکی از توکسوپلاسموز مزمن می‌باشد.

گزارشات مختلف نشان می‌دهند که میزان شیوع توکسوپلاسموز در گوسفند نسبت به گاو و اسب بالاتر است. علت آن حساستر بودن گوسفند به توکسوپلاسموز و تمایل به بالا ماندن تیتر پادتن در گوسفند است. براساس مطالعات انجام شده شیوع توکسوپلاسموز در انسان و گوسفند نسبتاً مشابه است اما باید توجه داشت که گوسفندان این میزان آلودگی را در طی عمر کوتاه ۶-۵ ساله خود کسب می‌نمایند (۳).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عفونت توکسوپلاسمائی در اطراف شیراز نسبتاً معمول است و براساس گزارشات مختلف در مورد ارتباط شیوع توکسوپلاسموز و ارتفاع منطقه (۶) ممکن است میزان عفونت در مناطقی که ارتفاع آنها کمتر از شیراز است به مراتب بیشتر باشد.

در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده در مورد گوسفندان ایران، منطقه فارس از نظر میزان آلودگی (۲۹/۰۳ درصد) حدواسط استانهای گیلان و مازندران (۳۲/۵ درصد) و خوزستان (۱۲/۰۶ درصد) می‌باشد (۱).

به علت شیوع گسترده عفونت توکسوپلاسمائی در حیواناتی که گوشت آنها به مصرف انسان می‌رسد احتمال انتقال عفونت به انسان از طریق تماس با لاشه آلوده و مصرف گوشت آنها وجود دارد و با توجه به اینکه عمده‌ترین بخش گوشت مصرفی مردم ایران را گوشت گوسفند تشکیل می‌دهد، بالا بودن میزان آلودگی در این حیوان می‌تواند از نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت باشد.

منابع مورد استفاده

۱- قربانی، مهدی، ۱۳۶۴. توکسوپلاسما و توکسوپلاسموز. انتشارات علمی دانشگاه بهداشت و مؤسسه تحقیقاتی بهداشتی. نشریه شماره ۲۰۸۳.

2- Balfore, A.H. et al, 1982, Comparative study of three tests (dye test, indirect haemagglutination test, latex agglutination test) for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human serum. J. X1in. path. 35: 228-232.

3- Blewett, D.A., 1983, The epidemiology of ovine toxoplasmosis: I. The interpretation of data for the prevalence of antibody in sheep and other host species. Brit. Vet. J.139: 537-545.

4- Dubey, J.P., 1980, Persistance of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. J. Am. Vet. Med. Asso. 177 (12): 1203-1207.

5- Dubey, J.P. and Schmitz, J.A., 1981, Abortion associated with toxoplasmosis in sheep in Oregon. J. Am. Vet. Med. Asso. 178 (7): 675-678.

6- Dubey, J.P. and Beattie, C.P., 1988, Toxoplasmosis of animals and man. CRC press INC. Florida. PP: 61-80.

7- Gelatt, K.N., 1981, Textbook of veterinary ophthalmology. pp: 709-711. Bailliere Tindall.

8- Hofstad, M.S. et al., 1991, Diseases of poultry, 8th ed. pp: 821-826, Iowa State University Press.

9- Hartley, W.J. et al., 1954, New Zealand type II abortion in ewes. Aust. Vet. J. 30: 216-218.

10- Hughes, H.P.A. et al., 1982, A new stable antigen preparation of *Toxoplasma gondii* and its use in serological diagnosis. Clin. Exp. Immunol. 49: 239-246.

11- Rose, N. and Fridman, H., 1976., Manual of clinical immunology pp: 392-394. The Am. Societ. for Microbiol.

12- Soulsby, E.J.L., 1982, Helminths, arthropodes and protozoa of domesticated animals. 7th ed. Baillier Tindall pp: 670-681.

13- Wallace, G.D., 1969,. Serologic and epidemiologic observation on toxoplasmosis on three pacific Atolls. Am. J. Epidemiol. 90 (2): 103-111.