

غربالگری موارد سرم مثبت سار کوسیستیس (آپی کمپلکسا: سار کوسیستیده) (Lankester ۱۸۸۲) 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

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۹

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۴۶۳۹۵۹

Email : m.yakhchali@urmia.ac.ir

چکیده

بیماری سار کوسیستوزیس در اکثر نقاط جهان گزارش شده است و در ایران نیز در دام‌های نشخوارکننده شیوع دارد. بنابراین در مطالعه حاضر الگوی ایمنوالکتروفورزی سار کوسیستیس سرم گوسفند و مقایسه نتایج با یافته‌های کشتارگاهی برای تعیین حساسیت و ویژگی آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس به عنوان یک آزمون غربالگری انجام شد. برای تهیه سرم ۱۰۰ 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 سار کوسیستیس تهیه شدند. آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس نیز با سرم‌های شاهد منفی و مثبت انجام شد. در کانترایمونوالکتروفورزیس از ۱۰۰ نمونه سرم گوسفندی، ۲۷ درصد سرم‌ها مثبت بودند. حساسیت آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس در حدود ۱۰۰ درصد و ویژگی آن ۸۳ درصد بود. بنابراین آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس برای شناسایی و جدا کردن حیوانات آلوده به سار کوسیستیس از حیوانات سالم گله آزمون قابل پیشنهاد است.

کلمات کلیدی: گوسفند، سار کوسیستیس، 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 specificity 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 specificity 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). تاکنون 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 سال ۱۳۵۱ 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 گاو میش ۴۰/۹ درصد بود (۴). در همدان ۵۴ نفر سرم مثبت نیز به دلیل مصرف گوشت گوسفندان آلوده به سارکوسیستیس گزارش گزاری 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 فلوراید (۵/۰ میلی‌مول) افزوده و ۱۲ بار فریز-ذوب شدند. مخلوط حاصل سانتریفیوژ گردید (۸۰۰ 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 قبلاً 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 مک‌فارلان). مقدار نرمال پروتئین پادگن برای این آزمایش در ۲/۵-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تنظیم شد (۱۵).

کانترایمنوالکتروفورزیس - برای انجام کانترایمنوالکتروفورزیس، 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 میلی‌متر روی ژل ایجاد گردید. فاصله ردیف‌های افقی ۱/۵ سانتی‌متر و فاصله حفره‌های پادگن-پادتن ۵ میلی‌متر بود. مطلوبترین کمان رسوبی

نتایج

در کانترایمونوالکتروفورزیس از ۱۰۰ نمونه سرم گوسفندی، ۲۷ درصد سرم‌ها مثبت بودند. ۱۵ درصد از دام‌های بدون کیست انگل، سرم مثبت بودند (جدول ۱). به طوری که دوازده نمونه با عیار ۲، نه نمونه با عیار ۴، چهار 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، حساسیت و ویژگی آزمون به ترتیب در حدود ۱۰۰ درصد و ۸۳ درصد بدست آمد.

بیشترین فراوانی موارد سرم مثبت مربوط به رقت ۱ به ۲ (با عیار ۲) در ۱۲ نمونه بود. کمترین تعداد موارد سرم مثبت در رقت ۱ به ۱۶ (با عیار ۱۶) در ۲ نمونه ثبت شد. در این مطالعه میزان آلودگی عضلات مختلف به ماکروکیست سارکوسیستیس نشان داد که بیشترین میزان آلودگی در دیافراگم (۱۴ درصد) و کمترین میزان آلودگی در عضله چهارسران (۶ درصد) می باشد (جدول ۳).

در فاصله‌ی ۳ میلی‌متر از دو حفره مشاهده شد. برای 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 مشخص شدن خط رسوبی پادگن-پادتن از رنگ بروموفل بلو (۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ سی سی بافر باربیتال) به نسبت دو قسمت سرم و یک قسمت رنگ استفاده گردید. در داخل هرکدام از حفره‌های مربوط به پادگن و پادتن مقدار ۵ میکرولیتر سرم و در حفره مقابل آن ۵ میکرولیتر پادگن تهیه شده از کیست ریخته شد. برای هر سری از سرم‌های نمونه که در یک نوبت آزمایش می‌شد، یک سرم شاهد منفی و یک سرم شاهد مثبت (تهیه شده از بخش انگل‌شناسی موسسه رازی حصارک) نیز جهت کنترل پادگن گذاشته شد. سپس اسلاید شیشه‌ای نمونه‌گذاری شده در تانک الکتروفورزیس قرار داده و در دو مرحله، ابتدا با ۲۵۰ ولت و ۳۰ میلی‌آمپر در ۱۵ دقیقه و سپس ۱۰۰ ولت و ۲۰ میلی‌آمپر به مدت ۷۵ دقیقه الکتروفورز انجام شد. برای نمایان شدن بهتر خط رسوبی زل رنگ آمیزی گردید (۱۰).

جدول ۱- موارد سرم مثبت گوسفندان آلوده به سارکوسیستیس در آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس

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

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

رقت‌های 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 یافته‌های کشتارگاهی آلودگی به کیست سارکوسیستیس در اندام‌های مختلف گوسفند در کشتارگاه شهرستان

موارد سرم مثبت				تعداد دام	یافته‌ها
عضله بین دنده‌ای	عضله چهارسران	دیافراگم	مری		
۸	۶	۱۲	۱۰	۱۰۰	کانترایمونوالکتروفورزیس

حیوانات سرم منفی فاقد کیست نیز غیر آلوده در نظر گرفته شدند. در این مطالعه از سرم‌های مورد آزمایش که همراه با کیست در بافت‌ها بودند، همگی در آزمون کانترایمونوالکتروفورزیز مثبت شدند و نمونه منفی کاذب مشاهده نگردید. از این رو حساسیت آزمون در تشخیص سرمی سارکوسیسیتوزیز ۱۰۰ درصد به دست آمد که از این جهت با آزمون الایزا برابری می‌کند. در حالی که از ۸۸ نمونه فاقد کیست ماکروسکوپی، ۱۵ نمونه در آزمون کانترایمونوالکتروفورزیز مثبت شدند که ۱۲ نمونه مثبت دارای خط رسوبی نازک و کوتاه بودند (مثبت مشکوک). در این رابطه، درصدی از مثبت‌های مشکوک را می‌توان مرتبط با موارد آلودگی در مرحله میکروکیست و واکنش‌های متقاطع با سایر تک یاخته‌های آپی کمپلکسا دانست که بایستی به عنوان بخشی از خطای آزمایش مد نظر قرار گیرد. بنابراین ویژگی آزمون کانترایمونوالکتروفورزیز ۸۳ درصد بدست آمد. البته در یک بررسی حساسیت آزمون کانترایمونوالکتروفورزیز برای تشخیص سارکوسیسیتیز لوپینی ۹۰ درصد گزارش شده بود (۱۶). نتایج این تحقیق نشان داد که آزمون کانترایمونوالکتروفورزیز از حساسیت و ویژگی مناسبی برخوردار بوده و می‌تواند یک روش غربالگری مناسب برای تشخیص موارد سارکوسیسیتوزیز در گله‌های گوسفند به دلیل سادگی در اجرا و ارزانی انجام آن باشد.

منابع مورد استفاده

- ۱- آغاز، ع. (۱۳۷۹) بررسی کشتارگاهی سارکوسیسیتوزیز در گاو میش‌های ذبح شده در کشتارگاه صنعتی ارومیه، پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه ارومیه، شماره ۵۶۵: ص ۱۴ و ۲۹.
- ۲- ارشد، م، دلیمی اصل، ع. و غفاری فر، ف. (۱۳۸۶) مطالعه مقایسه ای تشخیص سارکوسیسیتیز در لاشه گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه تبریز، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷۵: ص ۷۲-۶۸.
- ۳- رزمی، غ. (۱۳۶۶) فراوانی سارکوسیسیتیز در نشخوارکنندگان 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) بررسی سارکوسیسیتیز در نشخوارکنندگان اهلی در استان‌های تهران و گلستان، مجله علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، سال ۳ شماره ۴: ص ۳۹-۴۶.
- ۵- رفیعی، ع. (۱۳۵۷) تک یاخته‌شناسی دامپزشکی و مقایسه ای. انتشارات دبیر خانه شورای پژوهش‌های علمی کشور. ص ۷۶۰-۷۴۸
- ۶- شکر فروش، س، ش و علیخانی، ر. ۱۳۸۲ میزان آلودگی لاشه گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه اصفهان به سارکوسیسیتیز، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۸: ص ۷۲-۶۸.
- ۷- قراگزلو، م. ج؛ سجادی، م و سماواتی، م (۱۳۷۴) مطالعه حضور آنتی‌بادی ضد سارکوسیسیتیز گوسفند در پنجاه و چهار نفر از اهالی همدان. هفتمین کنگره بین‌المللی پزشکی جغرافیایی و سومین کنگره ایمونولوژی و آلرژی ایران، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
- ۸- کاظمی، ب.، خزان، ه.، عظیم زاده، ا.، صفری، خ.، تحویل‌دار بیدرونی، ف. و قجری، ع. (۱۳۸۵) خالص سازی و شناسایی باند پروتئینی از سارکوسیسیتیز گوسفند، مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، جلد پنجم، شماره دوم، ص ۸۸-

بحث

آزمون‌های سرم‌شناسی از روش‌های آزمایشگاهی تشخیص سارکوسیسیتوزیز می‌باشند که موفقیت آنها به در دسترس بودن پادگن اختصاصی انگل بستگی دارد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۵). از روش‌های کروماتوفوکوسینگ (۱۷) و ژل کروماتوگرافی برای جداسازی پروتئین‌های سارکوسیسیتیز استفاده کرده‌اند (۱۲، ۱۳). به طوری که از سارکوسیسیتیز جدا شده از سیستم‌های عضلات گاو به عنوان پادگن در تست الیزا استفاده گردیده است (۱۴).

در مطالعه حاضر با استفاده از پادگن کیست سارکوسیسیتیز بافتی ۲۷ درصد سرم گوسفندان تحت مطالعه به روش کانترایمونوالکتروفورزیز سرم مثبت بودند. از آنجایی که در هیچ یک از مناطق کشور کنترلی در مورد انگل سارکوسیسیتیز نمی‌شود، حضور ۲۷ درصد آلودگی سرمی بیانگر کاهش میزان آلودگی نسبت به گزارش‌های قبلی است (۲، ۳، ۴، ۶). این کاهش به دلیل نقش عوامل زیست محیطی نظیر تغییرات دوره ای دما در تابستان و زمستان و وضعیت نگهداری گوسفندان از جمله استفاده بیشتر از مراتع و یا نگهداری در آغل، از بین بردن سگ‌های ولگرد در مناطق شهری و روستاها باشد. بنابراین برای آگاهی از وضعیت آلودگی سارکوسیسیتیز در گله‌های گوسفندان کشور مطالعات کشتارگاهی و سرولوژیک پیشنهاد می‌شود. سگ و گربه از میزبانان قطعی برای گونه‌های شناخته شده سارکوسیسیتیز گوسفندی می‌باشند. بنابراین، یکی از علل وقوع آلودگی شدید در میزبان واسط به این علت نسبت داده می‌شود که حیوانات مزرعه در ارتباط نزدیکی با سگ‌های نگهبان گله هستند و سگ‌ها چراگاه‌ها را با اسپوروسیست‌های سارکوسیسیتیز آلوده می‌کنند (۸).

آزمون‌هایی نظیر الیزا، ایمنوفلورسانس و برخی از آزمون‌های رسوب در ژل در سرولوژی سارکوسیسیتوزیز کار برد دارند ولی هیچ‌یک آزمون گلداستاندارد محسوب نمی‌شوند. 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 مشکوک در نظر گرفته شدند، احتمالاً درصدی از آنها می‌تواند مربوط به مرحله میکروکیست باشد. در این تحقیق به دلیل عدم انجام آزمایش میکروسکوپی بافت جهت یافتن میکروکیست انجام نگردید، از این‌رو جزو خطای آزمایش در نظر گرفته شدند از آنجایی که برای تعیین حساسیت آزمون کانترایمونوالکتروفورزیز در تشخیص سارکوسیسیتوزیز نیاز به تعداد مثبت حقیقی و منفی بود، فقط نمونه‌های سرم مثبتی که ماکروکیست داشتند، مثبت حقیقی برای آزمون در نظر گرفته شدند. بنابراین نمونه‌های سرم مثبت فاقد ماکروکیست نیز به دلیل عدم انجام هیستوپاتولوژی برای یافتن میکروکیست، منفی در نظر گرفته شدند. با این وجود برای رفع هرگونه ابهام به جای مثبت کاذب موارد مثبت مشکوک در نظر گرفته شدند و در ارزیابی‌ها تعداد مثبت‌های حقیقی محاسبه نشدند. محاسبات به این روش فقط در تعیین میزان حساسیت و ویژگی آزمون کانترایمونوالکتروفورزیز با پادگن سارکوسیسیتیز کاربرد دارد و در تعیین میزان شیوع آلودگی گوسفندان به سارکوسیسیتیز، کلیه حیوانات سرم مثبت با عیار ۱ به ۲ و بالاتر اعم از دارای ماکروکیست و بدون ماکروکیست، آلوده به حساب آمدند.

