مقایسه دو روش ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک جهت تشخیص تک یاخته سارکوسیست گوسفند در کشتارگاه صنعتی شهرستان بروجرد

حسین وثوقی[1] * و ناصر حقوقی راد[2]

(تاریخ دریافت: 91/1/28 ؛ تاریخ پذیرش: 91/4/5)

چکیده

تک یاخته ی سارکوسیست از عوامل بیماری مشترک انسان و دام به شمار می رود. این انگل شیوع جهانی داشته و در بسیاری از حیوانات ایجاد آلودگی می‌کند. از نظر بهداشتی و اقتصادی ضررهای زیادی را به جوامع انسانی و حیوانی تحمیل می‌کند. سارکوسیستیس یکی از شایع‌ترین انگل‌های چهار پایان است. بسیاری از پستانداران وحشی، پرندگان، جانوران خونسرد و انسان را آلوده می‌کند. بعضی از گونه های سارکوسیست ممکن است منجر به بیماری شدید و حتی کشنده در میزبان واسط خود گردند. در این مطالعه، میزان آلودگی به سارکوسیستیس در گوسفندان کشتارگاه شهرستان بروجرد با دو روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی (هضمی) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. 60 لاشه گوسفند بطور تصادفی طی دو مرحله از کشتارگاه شهرستان بروجرد استان لرستان انتخاب شد. در مرحله‌ی اول، اندام‌های مری، دیافراگم، قلب، عضله سردست و ران به روش ماکرو سکو پی بررسی و در مجموع 17 مورد حاوی کیست ماکرو سکوپی تشخیص داده شدند. در مرحله دوم از 60 نمونه‌ی انتخاب شده نمونه برداری صورت گرفته و پس از استفاده از روش هضمی (پپسین2/5 گرم، اسید کلریدریک10 سی سی و فسفات بافر100 سی سی) جدا سازی و تهیه گسترش، رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت که 54 نمونه حاوی برادی زوئیت تشخیص داده شد. در این مطالعه اختلاف آماری معنا داری بین دو روش تشخیص ماکروسکوپی و میکروسکوپی دیده شد. (P<0/001) و حساسیت تشخیص میکروسکوپی نسبت به ماکرو سکوپی قابل ملاحظه بود.

کلمات کلیدی : بروجرد، سارکوسیست، زئونوز، ماکرو سکو پی، هضمی

---

1 -دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی دامپزشکی –دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات تهران –ایران

2 - استادگروه انگل شناسی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات تهران –ایران

*: مسئول مکاتبات ؛ پست الکترونیکی :Hosain_vosughi@yahoo.com

مقدمه

استان لرستان در غرب ایران بین 64 درجه و 15 تا 50 درجه و 3 دقیقه طول شرقی از نصف النهارگرینویچ و 23 درجه و 73 دقیقه تا 43 درجه و 22 دقیقه و وسعت آن در حدود 95582 کیلومتر مربع با متوسط بارندگی سالانه 500 میلی متر پس از استان‌های شمالی کشور قرار دارد که شهرستان بروجرد در شمال شرقی این استان با متوسط بارندگی 350 میلی متر در سال 1390 یکی از قطب‌های دامداری در کشور بوده و پرورش گوسفند در آن رواج دارد(20).

سارکوسیستیس، بیماری زئونوزی است که عامل آن تک یاخته سارکوسیست، با بیش از 120 گونه شناسایی شده در جهان، می باشد که اکثر گونه‌ها منجر به عفونت در حیوانات می‌گردد. برخی گونه های سارکوسیستیس در انسان باعث اختلالات گوارشی از جمله؛ تهوع، اسهال و استفراغ می‌شود. منشاء آلودگی در انسان، خوردن گوشت نیم پز و یا خام است (4).

گوسفند ممکن است به وسیله چهار گونه سارکوسیستیس آلوده شود که عبارتند از : سارکوسیستیس تنلا *Sarcocystis.tenella*، سارکوسیستیس آرتی کنیس *S.ariticanis*، سارکوسیستیس ژیگانته آ *S. gigantea*و سارکوسیستیس مدیزیفورمیس*S.medusiformis* که دو گونه اخیر غیر پاتوژن می‌باشند. دو گونه سارکوسیست تنلا و آرتی کنیس ممکن است باعث سقط جنین یا عفونت حاد در گوسفندان شود (8).

دو گونه *S.tenella*و *S.gigantea*در اقصی نقاط دنیا پراکندگی دارند. و دو گونه *S.gigantea* و *S.medusiformis* توسط میزبان نهایی گربه به شکل کیست‌های ماکرو سکوپی و غیرپاتوژن پراکنده می‌شوند. دو گونه *S.tenella* و*S. arieticanis* به شکل کیست‌های میکروسکوپی و توسط سگ پراکنده شده و پا تو ژن می‌باشند (8).

آلودگی توسط گونه های پاتوژن و غیر پا تو ژن با خوردن اسپوروسیست همراه مواد غذایی و آب به میزبان واسط منتقل می‌گردد (8). انگل از لحاظ تولید مثلی و چرخه زندگی، نیاز به دو مرحله‌ی سیر تکاملی دارد. نخست این که این انگل زندگی اجباری داخل سلولی داشته که سیر تکاملی در میزبان (نهایی- واسط) وجود دارد. مرحله غیر جنسی خود را در سلول‌های آندوتلیال میزبان واسط (که معمولاً عروق یک حیوان علف خوار است) طی می‌کند. اندوزوئیت های نسل چهارم (آندوپلوژنی) در عضلات مخطط، بافت عصبی و بافت عضلانی قلب میزبان واسط تشکیل می‌شود(19). میزبان نهایی با خوردن عضلات آلوده به کیست حاوی برادی زوئیت به تک یاخته مبتلا می‌گردند شیزونت ومتروسیت برای میزبان نهایی آلوده کننده نیستند؛ برادی زوئیت ها سیر تکاملی جنسی را در دیواره روده کوچک آغاز می‌کنند و تبدیل به اووسیست می گردند و اسپوروسیست حاوی اسپروزوئیت با مدفوع از میزبان نهایی دفع شده و با خوردن آنها توسط میزبان واسط سیکل زندگی انگل کامل می شود (19). در بازرسی های کشتارگاهی فقط کیست های ماکروسکوپی تشخیص داده می شوند و کیست های میکروسکوپی از دید بازرسان مخفی می مانند (1). هدف از این مطالعه مقایسه و ارزیابی دو روش تشخیصی ماکروسکوپی و میکروسکوپی (هضمی) در تشخیص آلودگی گوشت گوسفندان ذبح شده

در کشـــــتارگاه های اسـتان لرســتان به سارکوسیستیس بوده است.

مواد و روش ها

در بررسی حاضر؛ کشتارگاه شهرستان بروجرد انتخاب، و طی دوره دو ماهه مراجعه به کشتارگاه هر بار 30 نمونه در کشتارگاه به طور کاملا تصادفی گوسفندان ذبح شده انتخاب و در مرحله اول به شکل ماکروسکوپی، عضلات مری، قلب، سردست، دیافراگم مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده کیست به شکل ماکروسکوپی مورد مثبت ثبت می گردید. در مرحله دوم از گوسفندان ذبح شده، 50 گرم از عضلات مزبور نمونه برداری می گردید و درون کیسه نایلونی تمیز قرار داده می شد. پس از برچسب گذاری و کد بندی در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل می گردید، سپس با استفاده از روش هضمی دوبی (محلول هضمی حاوی پپسین 2/5 گرم، اسید کلریدریک 10 سی سی و 100 سی سی فسفات بافر) [12] 50 گرم نمونه با قیچی خرد و درون ارلن مایر ریخته و 100 سی سی محلول هضمی به آن اضافه و در بن ماری 37 درجه سانتی گراد به مدت سی دقیقه قرار داده می شد. پس از آن با کمک شیکر نمونه کاملا هضم و مخلوط می گردید. در مرحله بعد با استفاده از پارچه تنظیف به عنوان صافی روی قیف آزمایشگاهی قرار داده می شد و نمونه پس از هم زدن از صافی عبور داده می شد. شیرابه جمع آوری شده در بشر درون لوله آزمایش ریخته و به مدت 10 دقیقه با دور 1500 سانتریفیوژ می گردید. بعد از ریختن مایع رویی از رسوب به دست آمده بر روی لام، گسترش تهیه شده و پس از خشک شدن با الکل متیلیک ثابت می گردید. در مرحله آخر با رنگ آمیزی گیمسا به مدت 30-20 دقیقه نمونه ها رنگ و در پایان با میکروسکوپ نوری مدل Labomed (LX400) و اضافه کردن روغن ایمرسیون با عدسی 100 مورد بررسی و مطالعه قرار می گرفت. اشکال برادی زوئیت انگل به عنوان نمونه مثبت تلقی و ثبت می گردید. در پایان جهت مقایسه دو روش تشخیصی ماکروسکوپی و میکروسکوپی با نرم افزار SPSS 16 و با استفاده از روش آماری Non parametric test-chi-square مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

در این بررسی دو روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی (هضمی) جهت تشخیص تک یاخته سارکوسیست مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج جدول شماره یک در تشخیص سارکوسیستیس – روش هضمی نسبت به روش ماکروسکوپی داری اهمیت و ارزش بیشتری بود و اختلاف این دو روش از لحاظ آماری معنی دار بود (P<0/001).

جدول 1-نتایج آزمایشات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جهت تشخیص سارکوسیستیس در کشتارگاه صنعتی بروجرد

کل نمونه های بررسی شده در کشتارگاه شهرستان بروجرد (60 نمونه)	تشخیص ماکروسکوپی ابتلا به سارکوسیست		تشخیص میکروسکوپی ابتلا به سارکوسیست	
	مثبت	منفی	مثبت	منفی
	17	43	54	6

بحث

سارکوسیست برای اولین بار در سال 1843 به وسیله میشر در موش خانگی گزارش گردید. این تک یاخته در میزبانان واسط خود به صورت کاملا اختصاصی می باشد(18). درایران اولین تحقیقات در خصوص تشخیص سارکوسیستیس در سال 1974 توسط افشار و همکاران بررسی گردید(6).

سارکوسیستوزیس از بیماری های مشترک انسان و دام است. برخی گونه ها باعث سقط جنین، کاهش تولید وزن وشیر، کم خونی و حتی مرگ در میزبانان واسط می شود(1). در بررسی حاضر دوروش تشخیصی ماکروسکوپی (مشاهده ای) و میکروسکوپی (روش هضمی) جهت شناخت این تک یاخته در گوسفندان ذبح شده ی شهرستان بروجرد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن ارجحیت روش میکروسکوپی را نسبت به ماکروسکوپی آشکار ساخت و اختلاف معنی داری در تشخیص این دو روش مشاهده گردید. ($P<0/001$) . مطالعات مختلفی در خصوص جایگاه قرارگیری کیست سارکوسیست در اندام ها مختلف حیوانات به خصوص گوسفند در ایران و در جهان صورت پذیرفته است، و کمتر به تفاوت تشخیصی بین دو روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی پرداخته شده است(1).در مطالعه ای در سال 2011 توسط میرزایی دیهقی در کرمان بر روی 294 بز به روش ایمپرژن اسمیر و میکروسکوپی نتایج نشان داد که 98/97 درصد به روش ایمپرژن اسمیر و 100 درصد در روش هضمی ابتلا به سارکوسیست وجود داشته است. در این مطالعه میزان شیوع عفونت در مری بیشتر از سایر ارگان ها بود. میزان عفونت با سن ارتباطی نداشت و در جنس ماده میزان آلودگی بیشتر از نر ها تشخیص داده شد، که با نتایج ما در بخش اول و بهتر بودن روش هضمی مطابقت داشت(11). در مطالعه دیگری در شهر همدان در سطح کشتارگاه میزان شیوع سارکوسیستیس در گوسفند 6/9 درصد به روش مشاهده مستقیم عنوان شده است(4). در شهرستان سنندج میزان شیوع این آلودگی در گوشت با روش هضمی 93/33 درصد عنوان شده است (3). در مطالعه دیگری در استان تهران به صورت مقایسه ای نتایج ماکروسکوپی منفی ولی از نظر میکروسکوپی به روش هضمی 97 درصد میزان آلودگی بیان شد، که اختلاف معنی داری در تشخیص این تک یاخته با دو روش مشاهده گردید که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد(15). در مطالعه دیگری در شهرستان تبریز به سه روش هضمی، ماکروسکوپی و گسترش بافتی از گوسفندان ذبح شده نتایج زیر به دست آمد. با روش ماکروسکوپی از نواحی مری، ران، بازو، دیافراگم و قلب به ترتیب 24/7، 16/2، 17،27/7 و در روش بافتی 2/2 درصد آلودگی مشاهده شد. این در حالی بود که روش هضمی 100 درصد آلودگی را نشان می داد. در این بررسی روش های گسترش بافتی و ماکروسکوپی، آلودگی را کمتر از روش هضمی نشان دادند. بنابراین روش هضمی حساس ترین روش آشکارسازی واقعی گوسفندان به سارکوسیستیس شناخته شد(1). که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین در مطالعه دیگری در کشتارگاه قائم شهرستان شهریار وجود 100 درصد الودگی در گوشت با روش هضمی مشخص گردید. در این مطالعه روش هضمی را ارجح تر از روش

هیستو پاتولوژی دانسته است (5). که با نتایج ما در این تحقیق نیز همخوانی داشت.

در تنکابن به روش ماکروسکوپی، میزان شیوع سارکوسیستیس در کشتارگاه،14/55 درصد عنوان شد(7). در قزوین با روش PCR گونه های سارکوسیستیس در گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه زیاران مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه، کیست های ماکروسکوپی متعلق به سارکوسیستیس ژیگانته آ و کیست های میکروسکوپی متعلق به سارکوسیستیس آریتی کنیس بوده اند(2).

مطالعه ای در شهرستان شهرکرد میزان شیوع سارکوسیستیس در کشتارگاه به روش میکروسکوپی 91 درصد بوده است(10).

در کشور همسایه عراق نیز طی مطالعه ای به روش ماکروسکوپی 4/1 درصد گوسفندان و با روش هضمی 97 درصد میزان آلودگی را گزارش داده اند(14). در طی مطالعات خارجی در گوسفند، در کشورهای آلمان، اسپانیا، استرالیا و ایران به ترتیب 85/4، 96، 93، 61 درصد آلودگی مشاهده شده است(16). همچنین در کشور فرانسه 94/8 درصد، ترکیه 97 درصد، آمریکا 100 درصد می باشد(17). در اتیوپی 93 درصد و در اسلواکی 87/6 درصد آلودگی گزارش شده است(9).

در مطالعات صورت گرفته در گاو عنوان شده، گونه های آلوده کننده گاو که میزبان نهایی آن سگ و سگ سانان است، در میزبان واسط تولید کیست میکروسکوپی می نماید. همچنین عنوان گردیده، گونه هایی که میزبان نهایی آن گربه است، در مناطق محدود بوده که علت آن تماس کمتر گاو با گربه بوده است و یا این که دفع اسپروسیست از گربه در مقایسه با سگ کمتر است. به همین دلیل کیست های میکروسکوپی نسبت به ماکروسکوپی بیشتر می باشد(12).

از آن جایی که چهارگونه ی سارکوسیست در گوسفند وجود دارد و دو گونه ی پاتوژن آن، یعنی سارکوسیست تنلا و سارکوسیست آریتی کنیس توسط میزبان نهایی سگ منتشر می شود و شکل کیست میکروسکوپی است، اهمیت روش تشخیصی به تک یاخته سارکوسیستیس را به روش هضمی آشکارتر می سازد. سگ ها و گربه ها میزبانان قطعی برای تعدادی از گونه های شناخته شده سارکوسیستیس گوسفند هستند. یکی از دلایل وقوع عفونت شدید در میزبانان واسط، به این علت نسبت داده می شود، که حیوانات مزارع در ارتباط نزدیکی با سگ های نگهبان گله هستند و سگ ها چراگاهها را با اسپروسیت های سارکوسیستیس آلوده می کنند(1). در یک مطالعه در بغداد نشان داده شده است که سگ های آلوده، حدود 200 میلیون اسپروسیست (روزانه چهار میلیون اسپروسیست) در طول دوره آلودگی دفع می کنند (14). همچنین در مطالعه ای در سال 1977 توسط فایر اشاره شده که سگ های آلوده، حدود دو میلیون اسپروسیست در روز دفع می کنند و اسپروسیست ها در زمان دفع خاصیت آلوده کنندگی دارند که این فاکتور، نقش مهمی را در اشاعه و اپیدمیولوژی سارکوسیستیس بازی می کند(13).

لذا با توجه به بررسی حاضرکه اکثریت کیست ها در لاشه گوسفندان میکروسکوپی بوده ومیزبان نهایی آن سگ میباشد و از آنجا که ارتباط گله ی گوسفند با سگ گله نیز زیاد است و با توجه به آلودگی بالای دام ها و همچنین با توجه به بازرسی لاشه ها در کشتارگاه ها به صورت ماکروسکوپی ضرورت

در تغییر نحوه بازرسی و کنترل گوشت ها در کشتارگاه ها و همچنین تصمیم گیری روشهای ویژه در از بین بردن آلودگی گوشت قبل از مصرف برای جلوگیری از آلودگی انسان لازم باشد. همچنین پیشنهاد میگردد با توجه به عدم امکان جدا سازی سگ آلوده از گله ومراتع در صورت امکان سازمانهای مربوطه در خصوص واکسیناسیون سگ گله وگوسفندان کشوراقدامات لازم را هر چه سریعتر اجرایی نمایند تا هم میزان خسارات مستقیم ناشی از این آلودگی برطرف و هم ابتلای انسانی آن کنترل و پیشگیری گردد.

تقدیر وتشکر

از جناب آقای دکتر صادق رهبری استاد بزرگوار وجناب آقای دکتر عباسعلی مطلبی ونیز استاد محترم جناب آقای دکتر رضا گودرزی وجناب آقای دکتر شهرام نخجوان کمال تشکر وقدردانی را دارم.

منابع

1 -ارشد، م. دلیمی اصل، ع. غفاری فرد، ف.1386 ،مطالعه مقایسه ای تشخیص سارکوسیستیس در لاشه گوسفند ذبح شده در کشتارگاه تبریز. مجله پژوهش و سازندگی امور دام و آبزیان ،شماره 75،صفحات72-69.

2 - دلیمی، ع. پایکاری، ح. اسماعیل زاده، م. ولی زاده، م. کریمی، غ. معتمدی، غ. عبدی گودرزی، م.1387. تعیین گونه های سارکوسیستیس گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه زیاران قزوین با روش.PCR- RFLPمجله علوم پزشکی مدرس. دوره 11،شماره 1. صفحات 72-65.

3 - رسولی، س. صادقیان، م. کریمیان، ص. ولیزاده، الف، جعفری، ک.1388، بررسی میزان شیوع آلودگی گوشت به تک یاخته سارکوسیست در شهرستان سنندج با روش هضمی، مجله پژوهش نوین دامپزشکی. سال اول شماره 3 . صفحات :32-27.

4- فلاح، م. متینی، م. بیگم کیا، ع. موبدی، الف. 1388. بررسی شیوع آلودگی به انگل های مشترک انسان و دام (کیست هیداتیک، ترماتود های کبدی، سارکوسیستیس) در دامهای کشتار شده در کشتارگاه صنعتی همدان. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان. دوره 17 ،شماره 3 . صفحات12-5.

5- کامل، ع.1378 ،بررسی میزان فراوانی سارکوسیست در عضلات گوسفند و بز کشتارگاه قائم شهریار به دو روش هضمی و آسیب شناسی، پایان نامه شماره 370 برای دریافت دکترای حرفه ای . دانشکده دامپزشکی آزاد اسلامی واحد کرج. صفحات20-16.

6-Afshar,A.,Naghshineh,R.,Neshat,H.,1974. Incidence of Sarcosporidiosis in sheep in Iran.Tropical Animal Health and production.6(4) :1920-1927

7-Akbarian,H.,Jabelijavan,A.,Eizadi,S.S.,2008Infection to sarcocyst in cattle,sheep and goat in the slaughterhouse of tonekabon during one year study .6th national congress of parsitology and parasitic diseases of Iran. Karaj.Razi Institute.

8-Anja,H,.Tenter,R.,Astrie,M.,Tokai, J.,1999. Comparision of Immunologicil and Molecular Methods for the Diagnosis of Infections with Pathogenic Sarcocystis species in Sheep . Clinical Medicine . 23(6):293-30

9-Arshadi, M,.Dalimi, A.H,.Ghaffarifar,F,.2007. Comparative study of Sarcocystis diagnosis in Sheep carcauses Slaughterd in Tabriz Slaughterhouse . Journal of Pajouhesh va Sazandegi. 75:68-72

10-Bonyadian, M.,Meshki, B.,2004. Infection rate of Sarcocystis in Slaughtered Livestock in Shahrekord. Journal of pajouhesh va sazandagi .72:14-18.

11-Dehaghi,M.M,.Fathi,S,.Norozi Asl,E,.2011. Survey of Sarcocystis infection in Slaughtered goats in Kerman Abattoir,Southeast of Iran. Journal of Animal and veterinary advances. 10 (9):1205-1208
12-Dubey,G.P,.Speer,C.A,.Fayer,R,.1989. Sarcocystosis of animals and Man.Florida,CRC.Press.
13-Dubey,J.P,.1976. A review of Sarcocystis of domestic animals and of other Coccidian of Cats and Dogs .Journal of American Veterinary Medical Association.169(10) :1067-1078
14-Latif, B.M.A.,Al-Delemi, J.K.,Mohammed, B.S.,Al-Bayati, S.M., Amiry,A.M.,1999. Prevalance of Sarcocystis SPP.In meat production Animals in Iraq. Veterinary Parasitilogy.84:85-90
15- Mirian ,S.J.,Dalimi, A.H.,Habibi,G.,2008. Ferquency of sarcocystis in cattle slaughtered in tehran province. 6th natinnal congress of parsitology and parasitic diseases of Iran.Karaj.Razi Institute.
16-Oryan, A.,Moghaddar, N.,Gaur,S.N.,1996. The distribution pattern of Sarcocystis species,their transmission and pathogenesis in sheep in fars province of Iran. Veterinary Research communication .20(3):53-243
17-Razmi, G.,Rahbari, S.,2000. Study of Sarcocystis in the domestic ruminants of Tehran and Golestan Province. Journal of veterinary Medicine ,Shahid Chamran University.40:39-46
18-Ronald, F.,2004. Sarcocystis spp.in Human infections. Clinical Microbiology.17:894-902
19-Soulsbe,E.J.L,.1982. Helminths,Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.7thBailliere Tindall . 682-686
20-WWW.Lorestanmet.ir