تمایز سارکوسیستیس هومینیس در گوشت گاو به روش PCR

ابراهیم رحیمی[۱*]، عباس دوستی[۲]، سید رضا حسینی[۳]، مجید همایونی[٤]، رحمان عبدی‌زاده[٥]

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی سارکوسیستیس هومینیس در گاوهای کشتار شده در کشتارگاه‌های اصفهان طراحی شد. در مجموع ۷٦۸ نمونه بافت ماهیچه‌ای قلب و دیافراگم از ۳۸٤ لاشه گاو مورد آزمایش میکروسکوپی قرار گرفته و نمونه‌های آلوده جهت تمایز سارکوسیستیس هومینیس با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز آزمایش شدند. بر پایه آزمون‌های میکروسکوپی میزان شیوع کیست‌های سارکوسیستیس در گاو ٦۲/۸ درصد بدست آمد و بر پایه آزمون PCR، ۲۰۷ نمونه از ٤۳۱ نمونه آلوده (٤۸/۱ درصد) از نظر سارکوسیستیس هومینیس مثبت بود. بررسی آماری بیانگر آن است که اختلاف آماری معنی‌داری بین شیوع آلودگی در بافت‌های ماهیچه قلب و دیافراگم وجود ندارد($P>0.05$). نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان آلودگی گوشت گاو در اصفهان به کیست‌ها سارکوسیستیس هومینیس بالاست و مصرف گوشت نیمه پز می‌تواند منجر به سارکوسیستیس موردی در انسان شود.

واژگان کلیدی: *سارکوسیستیس هومینیس، گاو، واکنش زنجیره ای پلی مراز*

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/٦ تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۱۹

مقدمه

سارکوسیستیس یک بیماری شایع با انتشار جهانی در انسان و بسیاری از گونه‌های حیوانی به وسیله گونه‌های متنوعی از سارکوسیست‌ها ایجاد می‌گردد. گونه‌های سارکوسیست انگل تک یاخته داخل سلولی دو میزبانه است که عموماً سیر تکاملی آن مابین یک میزبان واسط علف خوار و یک میزبان اصلی گوشتخوار می‌باشد(٦). سه گونه از این انگل در گاو شناسایی شده است که گونه *S. bovifelis* در عضلات گاو ایجاد کیست‌های ماکروسکوپی می‌نماید و میزبان نهایی آن گربه است. گونه *S. bovicanis* آن در عضلات گاو ایجاد کیست میکروسکوپی می‌نماید و میزبان‌های آن سگ و سگسانان است و گونه *S. hominis* که این گونه هم در عضلات گاو ایجاد میکروسیست کرد و میزبان نهایی آن پریمات ها و انسان می‌باشد (٦و ۷). آلودگی انسان به گونه سارکوسیستیس هومینیس از طریق مصرف گوشت خام یا نیم پز گاو و آلوده به کیست‌های عفونی این انگل اتفاق می افتد. شیوع سارکوسیستوزیس روده ای در انسان پایین، علائم آن گذرا و به صورت اختلالات گوارش مانند تهوع، استفراغ، اسهال و دردهای شکمی بروز کند(٦، ۷و ۱۳).

با وجود مطالعات فراوانی که در خصوص میزان شیوع سارکوسیستوزیس در گاو، گاومیش، گوسفند، بز و شتر در ایران و بسیاری از کشورها انجام شده است (۱، ۲، ۳، ٤، ۸، ۱۳، ۱۷و ۱۹)، اما اطلاعات بسیار کمی در خصوص میزان فراوانی سارکوسیستیس هومینیس در گاو وجود دارد. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع و تمایز سارکوسیستیس هومینیس در گاوهای کشتار شده در کشتارگاه‌های اصفهان طراحی شد. مطالعه حاضر احتمالاً جزء اولین گزارشات از میزان شیوع سارکوسیستیس هومینیس در گاو در ایران می‌باشد.

مواد و روش کار

طی سه فصل پاییز و زمستان ۱۳۸۵ و بهار ۱۳۸٦، در مجموع ۷٦۸ نمونه عضله دیافراگم و عضله قلب از ۳۸٤ لاشه گاو کشتار شده در کشتارگاه های اصفهان جمع آوری و به منظور بررسی حضور کیست‌های سارکوسیستیس هومینیس در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شد. بخشی از هر نمونه (حدود ۱ گرم) به قطعات کوچک (حدود ۳mm) خرد و بین دو لام

۱*ـ گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
ebrahimrahimi55@yahoo.com
۲ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳ـ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
٤ـ دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
٥ـ فوق لیسانس انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

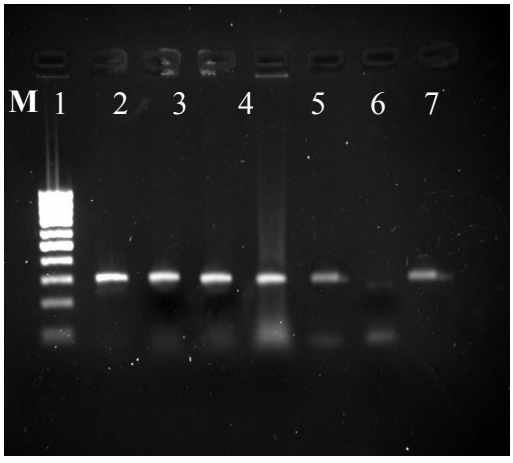
فشرده شد و اسمیرهای از آن تهیه گردید، سپس با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و به منظور بررسی حضور برادی زوایت‌های انگل سارکوسیست مورد بررسی میکروسکوپیک قرار گرفتند(۱۸). در ادامه DNAی ژنومی با استفاده از روش استاندارد فنل ـ کلروفرم استخراج گشته و جهت اطمینان از کیفیت DNAی استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم برماید استفاده شد. به منظور انجام PCR پرایمرهای اختصاصی گونه از روی ژنوم سارکوسیستیس هومینیس با توالی Sarc-F(5'-AGATACAGAACCAACACGCTCC-3') و Sarc-R(5'ATTTCCAGTGTGTTATTTCTTGTC3') طراحی و توسط شرکت سیناژن ایران سنتز و مورد استفاده قرار گرفت (اندازه محصول PCR ، ۳۰۰bp می‌باشد). حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل : ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq و ۲۰۰ میکرومولار dNTP Mix بود. برای انجام واکنش PCR از دستگاه مستر سایکلر گرادینت شرکت Eppendorf استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از : ۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمای به ترتیب ۹۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه. سپس محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گراید توسط اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد و با استفاده از UV مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

مطالعه میکروسکوپیک بافت دیافراگم و قلب از ۳۸۴ لاشه گاو مورد بررسی ۲۴۱ (۶۲/۸ درصد) لاشه آلوده به کیست‌های سارکوسیست بودند و به تفکیک این کیست‌ها در ۲۳۴ نمونه (۶۰/۹۳ درصد) بافت قلب و ۱۹۷ (۵۱/۳ درصد) نمونه بافت دیافراگم مورد مطالعه مشاهده شد.

نتایج حاصل از ارزیابی حضور سارکوسیستیس هومینیس در ۴۳۱ نمونه بافت قلب و دیافراگم آلوده به حداقل یکی از گونه‌های سارکوسیستیس با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نشان داد ۲۰۷ (۴۸ درصد) نمونه حامل کیست سارکوسیستیس هومینیس می‌باشند (تصویر ۱). به ترتیب در ۵۳ درصد (۱۲۴ از ۲۳۴) و ۴۷ درصد (۹۶ از ۱۹۷) از نمونه‌های قلب و دیافراگم آلوده به کیست‌های سارکوسیست‌ها، سارکوسیستیس هومینیس ردیابی شد. بر اساس آزمون مربع کای اختلاف آماری معناداری بین آلودگی در دو بافت مورد مطالعه مشاهده نشد (P>0.05).

با توجه به میانگین سنی پایین (۲ سال) دام های مورد مطالعه ارزیابی آماری اختلاف سن در میزان شیوع سارکوسیستیس هومینیس امکان پذیر نبود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان شیوع آلودگی در ۲۹۱ گاو نر و ۹۳ گاو ماده جوان به ترتیب ۱۳۹ (۴۷/۸ درصد) و ۴۸ (۵۲/۲ درصد) بوده است، به این ترتیب بررسی آماری نشان داد اختلاف آماری معناداری بین شیوع این آلودگی در جنس نر و ماده وجود ندارد (P>0.05).



نگاره ۱- محصول PCR مربوط به قطعه ۳۰۰bp ژن سارکوسیستیس هومینیس جدا شده از نمونه های گوشت گاو
ستون M- مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱- کنترل مثبت، ستون ۲- کنترل منفی، ستون ۳-۷- نمونه های مثبت

بحث

کیست‌های سارکوسیست در گاو معمولاً در عضلات دیافراگم، زبان، مری و قلب یافت می شوند. این کیست‌ها سیلندری شکل و سفید رنگ بوده و اندازه آنها از چند میکرون تا چند سانتی متر متغیر است (۷).

در بین گزارشات ثبت شده در ایران از بررسی آلودگی گوشت گاو به سارکوسیست ها، رزمی و همکاران در سال (۱۳۷۹) بررسی را از نظر آلودگی نشخوارکنندگان اهلی استان‌های تهران و گلستان انجام دادند. در این مطالعه میزان آلودگی میکروسیست های این انگل در گاو ۷۳/٤ درصد گزارش گردید (۲). مطالعه ای توسط شکرفروش و همکاران (۱۳۷۹) از بررسی آلودگی لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اصفهان نشان داد، ۹٤/۸ درصد از گاوهای مورد آزمایش به کیست‌های میکروسکوپیک سارکوسیست آلوده اند. توزیع این آلودگی در عضله قلب، مری، دیافراگم، زبان و ران به ترتیب ۸٤/٤، ۵۳/٦، ۳۷/۲، ۲۹/٦ و ۲٦/۸ درصد گزارش شده است (۱). از بین مطالعات مشابه در کشورهای دیگر میزان شیوع این کیست‌ها در بلژیک ۹۷ درصد (۱۷)، ژاپن ۵۱/۱-٦/۳۱ درصد (۱۲و ۱٤)، مونگولیا ۹۰ درصد (۸)، اتیوپی ۸۲ درصد (۱۹)، استرالیا ۵۲ درصد (۱٦) و عراق ۹۷/۸ درصد (۱۱) گزارش شده است.

در مطالعه حاضر میزان شیوع کیست‌های سارکوسیستیس در ۳۸٤ لاشه گاو کشتار شده در اصفهان با استفاده از روش میکروسکوپیک ٦۲/۸ درصد بدست آمد. اگرچه میزان آلودگی در نمونه های مورد مطالعه در تحقیق حاضر در قیاس با مطالعات مشابه در ایران و برخی از کشورها پایین‌تر است. با توجه به اینکه فاکتورهای زیادی چون سن دام های مورد مطالعه، اندام های نمونه برداری شده و روش آزمایش می تواند در نتایج گزارش شده از میزان شیوع عفونت سارکوسیستیس نقش داشته باشد، مقایسه نتایج مشکل است. گزارشات نشان می دهد میزان آلودگی با افزایش سن بالا می رود (۱٤و ۱٦). همچنین میزان آلودگی بخش‌های مختلف دام در گزارشات مختلف بسیار متفاوت است که برخی با نتایج ما همسو و برخی متفاوت بوده است (۱و ۷). Jain و همکاران (۱۹۸۷) از هند میزان شیوع سارکوسیست ها را در گاو بیش از ۸۰ درصد (۹۱ از ۲۳۸) و میزان شیوع سارکوسیستیس هومینیس را ۸/۲ درصد گزارش نموده اند (۱۰). در برزیل مطالعه ای توسط Pena و همکاران (۲۰۰۱)، ۹٤ درصد از کیست‌های سارکوسیستیس جدا شده از نمونه های گوشت گاو به عنوان سارکوسیستیس هومینیس تشخیص داده شده است (۱۵). بر اساس مطالعات مشابهی این میزان در انگلستان صفر و در آلمان ٦۳ درصد گزارش شده است(۷). Vercuysse و همکاران (۱۹۸۹) از بلژیک، Bottner و همکاران (۱۹۸۷) از نیوزلند و Ghisleni (۲۰۰٦) از ایتالیا میزان شیوع کیست‌های سارکوسیستیس با دیواره ضخیم را در گاو به ترتیب ۵٦ درصد، ۷۹/۸ درصد و ۷/۳۵ درصد گزارش نموده اند (٤، ۹و ۱۷).

در مطالعه حاضر بر اساس آزمون PCR سارکوسیستیس هومینیس در ۳٤/۱ درصد کل لاشه های مورد مطالعه ردیابی شد. با توجه به اینکه نمونه های اخذ شده عمدتاً از دام‌های نر، جوان و با میانگین سنی حدود ۲ سال بوده است احتمال داده می‌شود میزان آلودگی در جمعیت دامی بیشتر از این رقم باشد.

ارتباط مستقیمی بین میزان آلودگی در گاو به عنوان میزبان واسط و انسان به عنوان میزبان نهایی وجود دارد و خوردن گوشت خام و نیم پز آلوده به کیست‌های عفونی سارکوسیستیس هومینیس منجر به سارکوسیستوزیس روده ای در انسان می شود. مطالعات نشان می دهد پخت گوشت در حرارت‌های ٦۰، ۷۰ و ۱۰۰ درجه سانتی گراد به ترتیب برای ۲۰، ۱۵ و ۵ دقیقه منجر به کشته شدن کیست‌ها می شود. همچنین فریز نمودن گوشت در $-٤^{\circ}C$ و $-۲۰^{\circ}C$ به ترتیب برای ٤۸ و ۲٤ ساعت منجر به غیر عفونی شدن کیست‌ها خواهد شد (۷و ۱۲). لذا سالم سازی حرارتی گوشت قبل از مصرف و عدم استفاده از کودهای انسانی جهت بارورسازی مراتع کشاورزی پیشنهاد می‌گردد.

فهرست منابع

۱- شکرفروش. س ش و احمدی. ب (۱۳۸۳): میزان آلودگی لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اصفهان به سارکوسیستیس و اهمیت بهداشتی آن، مجله پژوهش و سازندگی، ٦٤: ١٠٤-١٠٢.

۲- رزمی. غ و رهبری. ص (۱۳۷۹): بررسی سارکوسیستیس نشخوارکنندگان اهلی در استانهای تهران و گلستان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، ۳ (٤٠) : ٤٦-٣٩.

۳- عامری. م (۱۳۷۲): سارکوسیستوزیس در نشخوارکنندگان، مجله پژوهش و سازندگی، ۵ (۱۸): ۱۳۲-۱۳۰.

4- Bottner, A., Charleston, W. A., Pomroy, W. E. and Rommel, M. (1987): The prevalence and identity of *Sarcocystis* in beef cattle in Newzealand. Veterinary Parasitology 24 (3-4): 157-168.

5- Claveria, F. G., Peterson, B., Macabagdal, M. R., Farolan, R. J., Farrol, M. A., Gonzalvo, F., Cadiz, R., Ajero, R., Roque, R. and Lozano, G. (1997): A Survey of bovine, bubaline and swine *Sarcocytosis* in the Philippines. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 28 (1): 173-178.

6- Dubey, J. P., Speer, C. A. and Fayer, R. (Edsi), (1989): *Sarcocystis* of animal and man. CRC Press, Inc., Florida, pp. 62-78.

7- Fayer, R. (2004). *Sarcocystis* spp. in human infections. Clinical Microbiological Review 17 (4): 894-902.

8- Fukuyo, M., Battsetseg, G. and Byambaa, B. (2002): Prevalence of *Sarcocystis* infection in meat – producing animals in Monogolia. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 33 (3): 490-495.

9- Ghisleni, G., Robba, S., Germani, O. and Scanziani, E. (2006): Identification and prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in bovine canned meat. Food Control. 17: 691-694.

10- Jain, P. C. and Shah, H. L. (1987): *Sarcocystis hominis* in cattle in Madhya Pradesh and its public health importance. Indian Veterinary Journal 64: 650-654.

11- Latif, B. M. A., Al-Delemi, J. K., Mohammad, B. S., Al-Bayati, S. M. and Al-Amiry A. M. (1999): Prevalence of *Sarcocystis* spp. in meat – producing animals in Iraq. Veterinary Parasitology 84: 85-90.

12- Leek, R. G. and Fayer, R. (1978): Infectivity of *Sarcocystis* in beef and beef products from a retail food store. Proceeding of the Helminthological Society of Washington 45: 135-136.

13- Omata, Y., XU, S. Z., Igarashi, I., Saito, A., Toba, H. and Suzuki, N. (1994): Survey of *Sarcocystis* infection in cattle in east Hokkaido, Japan. Journal of Veterinary Medicine Science 56 (3): 557-558.

14- Ono, M. and Ohsumi, T. (1999): Prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in Jaoanese and imported beef (Loin: Musculus longissimus). Parasitology International 48 (1): 91-94.

15- Pena, H. F., Ogassawara, S., Sinohorini, I. L. (2001): Occurrence of cattle *Sarcocystis* species in raw kibbe from Arabian food establishments in the city of saopalo, Brazil, and experimental transmission to humans. Journal of Parasitology 87: 1459-1465.

16- Savini, G., Dunsmore, J. D., Robertson, I. D. and Senviratna, P. (1992): The epidemiology of *Sarcocystis* spp. in cattle of Wastern Australia. Epidemiology and Infection 108 (1): 107-113.

17- Vercuysse, J., Fransen, J. and Van Goubergen, M. (1989): The prevalence and identity of *Sarcocystis* cysts in cattle in Blgium. Zenrtalbl Veterinarmed 36 (2): 148-158.

18- Wouda, W., Snoep, J. and Dubey, J. P. (2006): Eosinophilic myositis due to *Sarcocystis hominis* in a beef cow. Journal of Comparative Pathology 135 (4) : 249-253.

19- Woldemeskel, M. and Gebreab, F (1996): Prevalence of *Sarcostis* in livestock of northwest Ethiopia. Zentralbl veterinarmed B. 43 (1): 55-58.