شناسایی *سارکوسیستیس تنلا* و *سارکوسیستیس آریتی‌کانیس* جدا شده از گوسفندان کشتاری در کشتارگاه تبریز به وسیله روش‌های انگل‌شناسی و PCR-RFLP

عباس شهبازی[۱]، شبنم اسفرم [۲،۳]، اسماعیل فلاح[*۲]، مجید خانمحمدی[٤]، احمد نعمت‌اللهی[٥]، تموچین محرمی[٦]

چکیده

سارکوسیستیس حدودا از ۱۳۰ گونه هتروگزنوز تشکیل شده است که از کوکسیدیاهای تشکیل دهنده کیست با چرخه زندگی و بیماریزایی متفاوت می‌باشند. سارکوسیستوزیس بوسیله گونه‌های سارکوسیستیس ایجاد می‌شود که انگل‌های تک‌یاخته‌ی داخل سلولی بوده و متعلق به شاخه اپی‌کمپلکسا هستند. در این مطالعه عضلات قلب و دیافراگم از ٦٠ گوسفند کشتار شده در کشتارگاه تبریز جمع‌آوری شد. گونه‌های میکروسکوپی سارکوسیستیس به وسیله تهیه گسترش مستقیم بافتی (Dob smear) از نمونه‌ها و رنگ‌آمیزی آنها به‌وسیله‌ی رنگ گیمسا و هضم نمونه‌ها به وسیله ی پپسین و در نهایت سانتریفیوژ و تهیه گسترش از رسوب و رنگ‌آمیزی آن با رنگ گیمسا و مشاهده براد‌ی‌زوئیتها در زیر میکروسکوپ تشخیص داده شدند. تخلیص DNA با استفاده ازکیت صورت گرفت. شرایط PCR برای تکثیر قطعه18s rRNA فراهم شد. باتوجه به محل جایگاه برش آنزیم محدودکننده TAG1 انتخاب شد.کیستهای میکروسکوپی در ٤٠٪ گسترش‌های بافتی و در ۱۰۰٪ هضم بافتی مشاهده شدند. ارزیابی PCR-RFLP نشان داد که کیستهای میکروسکوپی متعلق به *سارکوسیستیس آریتی‌کنیس* و *سارکوسیستیس تنلا* است. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط روش PCR-RFLP و آنزیم TAG1 می‌توان گونه‌های *سارکوسیستیس آریتی‌کنیس* و *سارکوسیستیس تنلا* را به طور دقیق از هم تفکیک داد.

واژگان کلیدی: *سارکوسیستیس، روش هضمی، PCR-RFLP*

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۲

مقدمه

سارکوسیستیس یکی از انگل‌های زئونوز بوده که آلودگی به آن از سراسر دنیا گزارش شده است. این انگل علاوه بر انسان تعداد زیادی از حیوانات را آلوده می‌سازد (۸). گونه‌های سارکوسیستیس دارای چرخه زندگی معمول کوکسیدیاها شامل مروگونی، گاموگونی و اسپروگونی می‌باشند (۱۵). آلودگی به سارکوسیستیس در میزبان واسط فقط با یک گونه سارکوسیستیس صورت گرفته و گربه یا سگ، نه هر دوی آنها به عنوان میزبان نهایی خواهند بود (۱۰و ۱۳، ۱۲). تمامی گونه‌های سارکوسیستیس برای میزبانان واسط بیماریزا نیستند و اغلب گونه‌های منتقله از طریق سگ‌سانان بیماریزاتر از سایر گونه‌هاست. *سارکوسیستیس تنلا* به دلیل سقط‌جنین در میش‌های آبستن و یا حتی مرگ حیوان در طی ابتلا به سارکوسیستیس حاد و کاهش وزن، کاهش شیر و پشم در طول سارکوسیستیس مزمن، باعث خسارات قابل توجهی در صنعت دامداری می‌شود و باعث ایجاد بیماریهای عصبی در برهها می‌گردد (۱۱و ۹، ۵). *سارکوسیستیس آریتی‌کانیس* دارای شیوع جهانی است و از مناطقی مانند استرالیا، اروپا، ایالات متحده آمریکا و نیوزیلند گزارش شده است (۸). شیوع *سارکوسیستیس تنلا* در گوسفندان سراسر دنیا متغیر است. آسیا بالاترین وقوع را دارد. شیوع بالا با وجود آزاد سگ‌ها به عنوان میزبانان نهایی در میان گله‌ها در مزارع مرتبط است. بندپایان نیز به عنوان ناقلین مکانیکی برای اسپروسیست سارکوسیست‌های دفع شده در مدفوع سگ عمل می‌کنند. سارکوسیست‌ها را می‌توان به وسیله بازرسی ماکروسکوپی، رنگ‌آمیزی با متیلن بلو، بررسی بافت‌شناسی و یا روش هضمی در عضلات تشخیص داد (۷).

۱-گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲*-گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
Efallah37@gmail.com
۳-کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
٤-گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، مرند، ایران
٥-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
٦- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چندین تست ایمونولوژیکی برای تشخیص سرولوژیکی عفونت‌های سارکوسیستیس در گوسفندان، توسعه یافته که شایع‌ترین تست استفاده شده تست الایزا و تست ایمونوفلورسانت آنتی بادی غیرمستقیم (IFA) و ثبوت مکمل(CF) است (۳). تا سال ۲۰۰۰ فقط یک گزارش استفاده از تکنیک PCR-RFLP در شناسایی تنوع گونه‌ای سارکوسیستیس منتشر شده بود در نتیجه هدف اولیه از مطالعات مولکولی بررسی توالی ژن هتروژن 18s rRNA در میان گونه-های مختلف سارکوسیستیس و شناسایی معمول گونه‌های ویژه سارکوسیستیس بر اساس PCR می‌باشد (٤).

مواد و روش‌کار

در کل ٦٠ نمونه از عضلات قلب و دیافراگم لاشه گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه شهرستان تبریز واقع در سعادتلو جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند و توسط روش‌های انگل‌شناسی مورد آزمایش قرار گرفتند.

روش گسترش فشاری

حدود یک گرم نمونه بر روی دو لام گذاشته و فشرده شد تا شیرابه بافت به صورت یک لایه نازک بر روی لام قرار گیرد. بعد از تهیه یک گسترش نازک، نمونه‌ها برای خشک شدن در مجاورت هوای آزاد قرار گرفتند. لام‌ها پس از خشک شدن، با استفاده از متانول فیکس شدند. ابتدا لام‌ها بدون رنگ‌آمیزی بررسی شدند و سپس با گیمسا رنگ شدند و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

روش گسترش هضمی

هضم بافت بر اساس روش ارائه شده توسط Dubey و همکاران در سال ۱۹۸۹ انجام گرفت برای تهیه محلول هضمی، به یک لیتر آب مقطر،۱۰میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۳۷٪ و ۲/۵ گرم پودر پپسین افزوده شد. نمونه‌ها بطور کاملا مجزا به گونه‌ای که آلودگی انگلی را به یکدیگر منتقل نکنند چرخ شدند. ۵۰ گرم از هر نمونه‌ی چرخ شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هضمی مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد مجهز به شیکر قرار داده شدند. پس از گذشت این زمان و هضم بافتی، نمونه های هضم شده با استفاده از تنظیف دو لایه صاف شدند. محلول‌های بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ و از رسوب بدست آمده، بر روی لام‌ها گسترش‌های یکنواختی تهیه و پس از خشک شدن، با متانول فیکس شدند و با گیمسا رنگ آمیزی شده و به کمک میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند (۸).

استخراج DNA

استخراج DNA **با استفاده** از کیت BIONEER و دقیقا طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. اندازه‌گیری مقدار DNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتر صورت گرفت.

PCR

توالی کامل ژن 18s rRNA *سارکوسیستیس آریتی‌کانیس* و *سارکوسیستیس تنلا* از http://www.ncbi.nih.gov/nucleotid انتخاب شد.

پرایمر مورد استفاده برای گونه *آریتی‌کانیس* عبارت بود از:

(Sar-F1): 5' GCA CTT GAT GAA TTC TGG CA 3'
(Sar-R1): 5' CAC CAC CCA TAG AAT CAA G 3'

پرایمر مورد استفاده برای گونه تنلا عبارت بود از:

(Sar-F2): 5' ACG GCG AAA CTG CGA ATG GCT3'
(Sar-R2): 5'CGC GCC TGC TGC CTT CCT TA3'

در میکروتیوب‌ها ١٦ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۷ میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۷ میکرولیتر آب و ۱ میکرولیتر از پرایمرِ ۱۰۰ پیکومول ریخته شد و در نهایت حجم واکنش ۳۱ میکرولیتر محاسبه گردید.

شرایط PCR

یک چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ۳۵چرخه ۵۷/۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۳۵ چرخه ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت یک دقیقه، یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه و نگهداری در ٤ درجه سانتی‌گراد. بعد از

پایان مرحله PCR برای مشاهده باندهای احتمالی از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید.

PCR-RFLP

پس از اطمینان از تکثیر قطعه هدف 18s rRNA به کمک الکتروفورز و بدست آوردن باندهای مطلوب، همانند انجام PCR ابتدا یک مخلوط اصلی شامل ٦ میکرولیتر از محصول PCR، ۹ میکرولیتر از آب مقطر دیونیزه استریل، ۲ میکرولیتر از بافر آنزیم ۱۰x ، ۱میکرولیتر از آنزیم مربوطه (TAG1)، ۲ میکرولیتر BSA تهیه شد سپس به هر تیوپ به میزان ٦ میکرولیتر از محصول PCR اضافه شد تا حجم نهایی هر تیوب به ۲۰ میکرولیتر برسد سپس به خوبی مخلوط و ورتکس گردید. تیوب‌ها در بن‌ماری و در حرارت ٦٥ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت قرار گرفتند.

الکتروفورز

به منظور قابل رویت کردن و تعیین وزن DNA ، ژل آگارز با غلظت ۲٪ تهیه شد. نمونه‌ها (محصول PCR) به میزان ۵ میکرولیتر در چاهکها ریخته شدند و در جریان الکتریسیته مستقیم به میزان ۷۰ ولت به مدت یک الی دو ساعت الکتروفورز گردیدند. پس از اتمام فرایند الکتروفورز، ژل با استفاده از دستگاه ترانس لومینانور (تشعشع UV با طول موج ٤٥٠ نانومتر) مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفت.

نتایج

در مطالعه حاضر طی یک دوره سه ماهه در کل٦٠ نمونه جمع‌آوری شد. و با روش‌های گسترش فشاری، روش هضمی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. در روش گسترش فشاری ٤٠ ٪ نمونه‌ها آلوده به برادی زوئیت سارکوسیستیس تشخیص داده شدند. در روش هضمی ۱۰۰٪ عضلات مورد مطالعه، حاوی انگل تشخیص داده شدند و برادی‌زوئیت ها در تمام لام‌ها مشاهده شد. از بین دو روش انگل‌شناسی مورد استفاده دراین تحقیق روش هضمی حساس ترین روش در آشکارسازی واقعی آلودگی گوسفند به سارکوسیستیس شناخته شد.

نتایج PCR نمونه‌های استخراج شده

باندهای واضح و مشخصی از ناحیه 18s rRNA گونه‌های میکروسکوپی سارکوسیستیس با اندازه‌های به‌ترتیب ٦١٦ bp و ۳۹۸ bp بدست آمد. از آنجا که پرایمرهای مربوطه کاملا اختصاصی بودند تمام DNAهای استخراجی از گونه های سارکوسیستیس در این واکنش باندهای مربوطه را نشان دادند (نگاره ۱).

نگاره ۱ـ الکتروفورز محصول PCR ژن 18s rRNA که در آن قطعه‌های ٦١٦bp، ۳۹۸ bp برای گونه‌های میکروسکوپی سارکوسیستیس تکثیر یافته، سایزمارکر ۱۰۰bp، NO (کنترل منفی)

نتایج PCR-RFLP

محصول PCR به‌دست آمده از گونه‌های میکروسکوپی سارکوسیستیس با آنزیم اندونوکلئاز TAG1 برش داده شد. با برش قطعه تکثیر شده 18s rRNA با آنزیم TAG1 دو گونه‌ی میکروسکوپی سارکوسیستیس شناسایی شد. الگوی PCR–RFLP آنزیمِ TAG1 برای دو گونه *سارکوسیستیس*

آریتی‌کانیس و *سارکوسیستیس تنلا* به ترتیب شامل قطعات ۳۳۹ bp، ۲۸۰ bp و قطعات ۲۸٤ bp، ۵۹ bp، ۵۵ bp می‌باشد (نگاره ۲). از میان کیست‌های میکروسکوپی ۳۰٪ آنها متعلق به *سارکوسیستیس آریتی‌کانیس* و ۷۰٪ آنها مربوط به *سارکوسیستیس تنلا* بود.

نگاره ۲ـ الگوهای PCR-RFLP ناحیه 18s rRNA با استفاده از آنزیم برش دهنده TAG1 باند (۱،۲،۳،٤،۵) مربوط به کیست‌های میکروسکوپی سارکوسیستیس آریتی‌کانیس، باند (٦) مربوط به سارکوسیستیس تنلا، سایز مارکر (۱۰۰bp)

بحث

در مطالعه‌ی ما که بررسی‌هایی بر روی عضلات به روش‌های گسترش بافتی و هضمی انجام گرفت، میزان آلودگی با این روش‌ها به ترتیب ٤۰ ٪ و ۱۰۰ ٪ مشاهده شد. با توجه به مطالعه‌ی رضوی و همکاران که از روش هضمی برای تعیین آلودگی به سارکوسیستیس استفاده کرده بودند نیز میزان آلودگی در لاشه‌های گوسفندان شیراز ۱۰۰٪ گزارش شده است (۱٤). در مطالعه ارشد و همکاران هم که میزان آلودگی دام‌های کشتار شده در کشتارگاه تبریز مورد بررسی قرار گرفته است با روش هضمی همه دام‌ها ۱۰۰٪ آلوده شناخته شده‌اند در برخی از مناطق ایران نیز حدود ۱۰۰٪ گوسفندان آلوده به سارکوسیستیس گزارش شده‌اند (٤). در شمال چین هم شیوع عفونت در حیوانات اهلی حدود ۱۰۰٪ گزارش شده است (۱۹). در یک مطالعه گزارش شده است که ۷۰ تا ۱۰۰٪ علفخواران درسرتاسر جهان به سارکوسیستیس آلوده‌اند (۱۸). نتایجی که در این تحقیق از روش‌های انگل‌شناسی حاصل شد با نتایج مطالعات فوق مطابقت دارد در بسیاری از نقاط ایران مطالعات زیادی از آلودگی گوشت‌ها به انگل سارکوسیستیس وجود دارد ولی فقط تعداد کمی از این مطالعات در ارتباط با تعیین گونه انگلی بوده است. در مطالعه مولکولی که دلیمی و همکاران بر روی گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه زیاران قزوین انجام دادند، سه گونه انگل سارکوسیستیس مورد شناسایی قرار گرفته است (۱). نتایج بدست آمده از تحقیقات آنها با نتایج موجود در این مطالعه مطابقت دارد با این تفاوت که در مطالعه دلیمی و همکاران از یک جفت پرایمر واحد برای تمام گونه‌ها استفاده شده است. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه Tenter و Johnson درسال ۱۹۹۷ مطابقت دارد (۱٦). با توجه به تحقیقاتی که در سالهای گذشته بر روی شیوع *سارکوسیستیس تنلا* در گوسفندان سراسر دنیا انجام گرفته بود نشان داده شد که *سارکوسیستیس تنلا* در آسیا بالاترین وقوع را داشته که به میزان ۹٦/۹ ٪ از مغولستان ارائه شده است (۱۰). میزان ۹۳٪ هم از اتیوپی گزارش شده است (۱۷). یک گزارش ۸٦/۵٪ و یک گزارش ٤۷/۳٪ از ترکیه (۵)، ۹۱/۷٪ از رومانی (۲)، ۸٤٪ از ایالات متحده (۷) و ۳۳/۹٪ از ایران وجود دارد (٦) که میزان درصد آلودگی به *سارکوسیستیس تنلا* در تحقیق ما بیشتر از میزان ذکر شده در گزارش اخیر در ایران توسط دریانی و همکاران می‌باشد. این اولین گزارش تشخیص مولکولی*سارکوسیستیس آریتی‌کنیس* و *سارکوسیستیس تنلا* در آذربایجان شرقی است. در این مطالعه نشان داده شد که توسط آنزیم TAG1 و روش PCR–RFLP، گونه‌های *سارکوسیستیس تنلا* و *سارکوسیستیس آریتی‌کانیس* را می‌توان ازهم تفکیک کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری تبریز انجام گرفت که بدین وسیله نویسندگان از این مرکز و آزمایشگاه انگل‌شناسی و آزمایشگاه ژنتیک دانشکده پزشکی تبریز نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

فهرست منابع

۱. دلیمی، ع.، پایکاری، ح.، اسماعیل زاده، م.، ولیزاده، م.، کریمی، غ.، معتمدی، غ.، عبدی گودرزی، م. (۱۳۸۷): تعیین گونه‌های سارکوسیستیس گوسفندان ذبح شده درکشتارگاه زیاران قزوین با روش PCR-RFLP، مجله علوم پزشکی مدرس، ۴۸، (۱و۲)، ۷۲-۱۱.

2. Adriana, T., Mircean, V., Blaga, R., Bratu, C.N., Cozma, V. (2008): Epidemiology and etiology in sheep sarcocystosis: Bull. UASVM. Vet. Med. 65:49-54.
3. Anja, R., Heckeroth, A., Astrid, M., Tenter, A. (1999): Comparison of Immunological and Molecular Methods for the Diagnosis of Infections with Pathogenic Sarcocystis species in Sheep.Tokai J Exp Clin. Med. 23:293-302.
4. Arshad, M., Dalimi, A., Ghaffarifar, F. (2007): Comparative study on sarcocystis diagnosis in meat of slaughtered sheep in Tabriz: Pajouhesh & Sazandegi. 75:68-72.
5. Beyazit, A., Yaziciog˘lu, O., Karaer, Z. (2007): The prevalence of ovine Sarcocystis species in Izmir province.Ankara. Univ. Vet. Fak. Derg. 54:111-116.
6. Daryani, A., Alaei, R., Dehghan, M.H., Arab, R., Sharif, M., Ziaei, H(.2006): Survey of Sarcocystis infection in slaughtered sheep and buffaloes in Ardabil. Iran: J. Anim. Vet. Adv. 5:60-62.
7. Dubey, J.P. (1988): Lesions in sheep inoculated with *Sarcocystis tenella* sporocysts from canine feces: Vet Parasitol. 26:237-252.
8. Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (1989): Sarcocystosis of Animals and Man; Boca Raton. CRCPress.166-170.
9. Dubey, J.P. (1990):Neospora caninum: a look at a new Toxoplasma-like parasite of dogs and other animals: Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 12:653-663.
10. Fukuyo, M., Battsetseg, G., Byambaa, B. (2002): Prevalence ofSarcocystisinfection in meat-producing animals in Mongolia:Southeast Asian J.Trop. Med. Public Health. 33:490-495.
11. Henderson, J.M., Dies, K.H., Haines, D.M., Higgs, G.W., Ayroud, M. (1997): Neurological symptoms associated with sarcocystosis in adult sheep: Can. Vet. J. 38:168-170.
12. Huong, L.T.T., Dubey, J.P., Uggla, A. (1997): Redescription of *Sarcocystis levinei* Dissanaike and Kan: Journal of Parasitolo.83:1148-1152.
13. Odening, K., Stolte, M., Bockhardt, I. (1996): On the diagnostics of Sarcocystisin cattle: Sarcocystis of a species unusual for Bos Taurus in a dwarf zebu. Veterinary Parasitology. 66:19-24.
14. Razavi, S.M., Shekarforoush, S.S., Farahani, M., Sarihi, K. (2003): Prevalence of Sarcocyst in slaughtered sheep in Shiraz, Iran:J. Vet Parasitol. 17:139-41.
15. Tenter, A.S. (1995): Current research on Sarcocystis spp. of domestic animals: Int. J. Parasitol. 25:1311-1330.
16. Tenter, A.M., Johnson A.M. (1997): Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian: Adv Parasitol. 39:69-139.
17. Woldemeskel, M., Gebreab, F. (1996): Prevalence of sarcocysts in livestockof northwest Ethiopia: Zentralbl. Veterinar. Med. B. 43:55-58.
18. Yang, Z.Q., Li, Q.Q., Zuo, Y.X., Chen, X.W., Chen,Y.J., Nie, L., Wei, C.G., Zen, J.S., Attwood, S.W., Zhang, X.Z., Zhang, Y.P. (2002): Characterization of Sarcocystis species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18srRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification: Exp Parasitol. 102:212-217.

19. Zuo, Y.X(.1992): Coccidia: Coccidia and Coccidiosis of Domestic Animals and Man. Tian Jing Scientific and Technical PublishingHouse, China.P:125.
20. Zuo, Y.X., Chen, X.W., Li, Y.J., Ma, T.C., Tan, D.H., Fan, L.X., and Zhao, M.L. (1995): Studies on Sarcocystis species of cattle and water buffalo withdescription ofa new species of Sarcocystis. In: Proceedings of TenthAnniversary of theFounding of Chinese Parasitological Society. ChineseScientific and TechnicalPublishing House,China p: 20.

JCP