

جدول ۱- توزیع فراوانی سارکوسیتیس براساس روشهای ماکروسکوپی، هضمی و آزمایش الایزا

روش آزمایش	تعداد نمونه	تعداد موارد مثبت
مشاهده ماکروسکوپی	۳۰۰	۶۰ (۲۰٪)
هضم عضلانی	۳۰۰	۱۷۱ (۵۷٪)
الایزا	۳۰۰	۱۶۳ (۵۴/۳٪)

بمدت ۲ ساعت صورت می‌گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سرم‌های مورد آزمایش با رقت ۱ به ۱۰۰ در بافر فسفات در هر حفره ریخته شده، یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر سرم کوژوگه پراکسیداز ضد IgG آگاو با رقت ۱ به ۳۰۰ در حفره‌های ریخته شده و پس از یک ساعت قرار گرفتن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً ریختن ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای حاوی کروموزن (بافر سترات با PH معادل ۵/۵) در هر حفره، قرائت جذب بر روی قرائت کننده الایزا با صافی جذب ۴۰۵ نانومتری صورت می‌گرفت. بین هر یک از مراحل فوق ۳ بار شستشو با بافر فسفات حاوی توین صورت می‌گرفت.

جذب نوری ۵۰ نمونه سرم گاومیش‌هایی که در روش هضمی و مشاهدات ماکروسکوپی فاقد هر گونه برادی زوئیت و یا کیست بودند بروش الایزا قرائت و پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار، با اضافه کردن ۲ برابر انحراف معیار به میانگین مذکور، میزان cut-off تست محاسبه گردید (۱۸، ۱۹). پس از طراحی الایزا، ۳۰۰ نمونه سرم گاومیش بررسی شد و حساسیت و ویژگی روش الایزا محاسبه گردید. در ضمن درصد آلودگی روشهای مشاهدات کشتارگاهی، هضم عضلانی و الایزا مورد مقایسه قرار گرفته و به منظور مقایسه درصد جوابهای مثبت در روشهای مذکور از آزمون آماری مک نمار (Mc Nemar) استفاده گردید.

نتایج

میانگین جذب نوری در تعداد ۵۰ نمونه که از نظر وجود کیست و برادی زوئیت در روش هضمی منفی بودند، 0.19 ± 0.154 به دست آمد که با در نظر گرفتن ۲ انحراف معیار ($\bar{X} + 2SD$)، میزان cut-off در این روش برابر ۰/۱۹۲ محاسبه گردید.

در این مطالعه و با روش الایزا نمونه‌های سرمی با جذب بالای ۰/۱۹۲ مثبت تلقی گردید که بر این اساس میزان آلودگی بروش الایزا ۵۴/۳ درصد بوده در حالی که درصد آلودگی گاومیش‌های مورد مطالعه بر اساس مشاهدات کشتارگاهی و هضم عضلانی بترتیب ۲۰٪ و ۵۷ درصد بوده است (جدول ۱).

درصد جوابهای مثبت در مشاهدات کشتارگاهی در مقایسه با هضم عضلانی و الایزا بر اساس آزمون آماری مک نمار اختلاف معنی داری داشت ($p < 0.01$) در حالی که اختلاف درصد جوابهای مثبت در روشهای هضم عضلانی و الایزا بر

میزبان اصلی آلوده می‌گردد (۸، ۱۴). آلودگی در میزبان واسط معمولاً به روشهای هیستولوژیک، تهیه گسترش از عضله و نیز هضم عضله جهت تشخیص مرونیت، برادی زوئیت و یا کیست تشخیص داده می‌شود. Dubey و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش نمودند که روش هضمی یک روش بسیار حساس حتی جهت تشخیص آلودگی‌های خفیف می‌باشد (۷). این در حالی می‌باشد که روش هضم عضلانی با تمام مزایا، بدلیل قابلیت انجام پس از کشتار و سختی آن، جهت مطالعات غربالگری و اپیدمیولوژیک در سطح وسیع مناسب نمی‌باشد. تا کنون بررسی‌های مختلف ایمونوسروولوژیک نظیر ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، هم‌آگلوتیناسیون، آگلوتیناسیون مستقیم، ایمونوبلات، الایزا و دات الایزا جهت ردیابی آنتی بادی‌های اختصاصی ضد سارکوسیتیس در حیوانات مختلف صورت گرفته است (۲۱، ۲۰، ۱۸، ۱۷، ۱۰، ۷، ۶، ۵). در این مطالعه تشخیص سرمی سارکوسیتوزیس گاومیش به روش الایزا با استفاده از آنتی ژن برادی زوئیت سارکوسیتیس فوزی فورمیس و مقایسه آن با روش هضم عضلانی و نهایتاً محاسبه حساسیت و ویژگی الایزا جهت تعیین اعتبار آن برای بررسی‌های وسیع اپیدمیولوژیک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

نمونه برداری - در فاصله مهر ۱۳۸۲ تا پایان اسفند ۱۳۸۲ از تعداد ۳۰۰ رأس گاومیش در کشتار گاه اهواز خونگیری بعمل آمد و سرم آن در ۲۰ - درجه سانتی‌گراد جهت آزمایش الایزا نگهداری گردید. هر یک از گاومیش‌ها ردیابی شده و پس از کشتار و پوست کنی، عضلات مختلف آن از نظر وجود آلودگی ماکروسکوپی به دقت مورد بازرسی قرار گرفته و سپس حداقل ۵۰ گرم از عضله مری جهت انجام روش هضم عضلانی بوسیله پپسین برداشت و برای مشاهده برادی زوئیت‌ها مورد مطالعه میکروسکوپی قرار می‌گرفت (۷).

روش هضم عضلانی - عضلات نمونه گیری شده از هر گاومیش در ۱۰ برابر حجم از محلول پپسین ۱ درصد و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به مدت ۱۲ الی ۲۴ ساعت قرار داده شده و سپس عضله هضم شده توسط میکروسکوپ نوری جهت ردیابی برادی زوئیت‌ها مورد بررسی قرار می‌گرفت (۷).

تهیه آنتی ژن - پس از جداسازی کیستهای نسبتاً درشت سارکوسیتیس فوزی فورمیس، کیستها جهت آزادسازی برادی زوئیت‌ها در بافر فسفات ($PH=7.2$) له شده و سپس ۶ مرتبه عمل ذوب و انجماد صورت گرفت. محلول به دست آمده ۲ بار و هر بار بمدت ۲۰ ثانیه سونیکه گردیده و پس از آن با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی به عنوان آنتی ژن محلول برداشته شد و نهایتاً غلظت پروتئین آن به روش کوماسی بلواندازه گیری گردید (۷، ۱۸، ۱۷).

روش آزمایش الایزا - جهت آشکار سازی آنتی بادی، صفحات مخصوص آزمایش حاوی ۹۶ حفره با ۱/۵ میکروگرم آنتی ژن رقیق شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر بی کربنات پوشیده شده، پس از این مرحله عمل مسدود کردن با بافر بلوکینگ (۵ درصد شیرپس چرخ در بافر فسفات محتوی ۰/۰۵ توین (tween))



(۱۱) در مطالعه بافت شناسی، آلوده به انگل سارکوسیستیس بودند. در ضمن در مطالعات انجام شده در سایر کشورها آلودگی به انگل سارکوسیستیس در گاو به شرح ذیل می باشد:

مغولستان: ۹۰ درصد (dob smear) (۹)، الجزایر: ۶۴/۵ درصد (ایمونوفلورسانس غیر مستقیم) (۱۶)، سریلانکا: ۶۹/۳ درصد (الایزا) (۱۲)، و چین ۷۹/۲۵ درصد (الایزا) و ۷۷/۳۶ درصد (هضم عضلانی) (۱۹).

بر اساس نتایج به دست آمده در این بررسی فراوانی سارکوسیستیس در مشاهده کشتارگاهی ۲۰ درصد و در روش هضمی و الایزا بترتیب ۵۷ درصد و ۵۴/۳ درصد بوده است که نشان دهنده آلودگی نسبتاً بالای گاو میش ها می باشد، ضمن اینکه بین درصد جوابهای مثبت در مشاهدات کشتارگاهی و در روش الایزا و هضم عضله اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P < 0/01$) در حالیکه بین درصد جوابهای مثبت در الایزا و هضم عضله اختلاف معنی داری دیده نشد ($P > 0/05$)، که بیانگر همبستگی بسیار خوب در تشخیص موارد مثبت بین دو روش فوق می باشد.

Zhao و Shi در سال ۱۹۸۷ نیز هیچ گونه تفاوت معنی داری ($P < 0/05$) را بین دو روش الایزا و هضم عضلانی در تشخیص موارد مثبت مشاهده نمودند (۱۹). وجود اختلاف معنی دار بین مشاهدات ماکروسکوپی در مقیسه با الایزا و هضم عضله احتمالاً به این دلیل است که برخی از گاو میش های آلوده هنوز به مرحله تشکیل کیست نرسیده اند و در بسیاری نیز کیست هنوز در حال سپری کردن مراحل میکروسکوپی می باشد.

در این مطالعه حساسیت و ویژگی الایزا با استفاده از آنتی ژن برادی زوئیت بترتیب ۹۷ و ۹۰/۵ درصد محاسبه گردید. در ۵ مورد نمونه ها از نظر هضمی منفی و در روش الایزا مثبت بودند. احتمالاً این امر مربوط به گاو میش هایی است که آلودگی آنها در مراحل اولیه، یعنی مرحله تشکیل مروزوئیت ها می باشد و هنوز به مرحله تشکیل کیست و برادی زوئیت نرسیده اند. این در حالیست که بر اساس مطالعات صورت گرفته به روش الایزا و ایمونوفلورسانس غیر مستقیم بر عدم وجود واکنش متقاطع، بین سارکوسیستیس و سایر انگلهای این خانواده از جمله نئوسپورا و توکسوپلازما تأکید شده است (۲۱)، ۱۰، ۱۳، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰.

Savini و همکاران در سال ۱۹۹۷ حساسیت و ویژگی الایزا در تشخیص سارکوسیستوزیس گاو با استفاده از آنتی ژن برادی زوئیت را بترتیب ۹۵ درصد و ۸۴ درصد و با استفاده از آنتی ژن مروزوئیت را بترتیب ۹۸ درصد و ۹۷ درصد گزارش نموده اند (۱۸).

به طور کلی نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می دهد که روش الایزا با توجه به حساسیت و ویژگی بالایی که دارد و نیز جهت سهولت کار و صرفه جویی در زمان، یک روش بسیار مناسب برای تشخیص سارکوسیستوزیس در گاو میش و احتمالاً سایر حیوانات می باشد و می توان آنرا بعنوان یک روش معتبر جهت بررسی های اپیدمیولوژیک پیشنهاد نمود.

جدول ۲- مقایسه نتایج دو روش هضم عضلانی و الایزا در تشخیص آلودگی به سارکوسیستوزیس گاو میش در نمونه های تحت مطالعه.

وضعیت آلودگی در روش هضم عضلانی				
نتایج	مثبت	آلوده (مثبت)		جمع
		غیر آلوده (منفی)	جمع	
آزمون	مثبت	۱۵۸	۵	۱۶۳
آزمون	منفی	۱۳	۱۲۴	۱۳۷
الایزا	جمع	۱۷۱	۱۲۹	۳۰۰

حساسیت = ۹۷ درصد، ویژگی = ۹۰/۵ درصد

اساس آزمون مک نماز اختلاف معنی داری نشان نداد ($p > 0/05$).

حساسیت روش الایزا نسبت به هضم عضلانی (حساسیت معادل ۱۰۰ درصد)، ۹۷ درصد (۹۹/۰۰ - ۹۴/۰۰) با حدود اطمینان ۹۵ درصد و ویژگی آن نسبت به روش هضم عضلانی (ویژگی معادل ۱۰۰ درصد)، ۹۰/۵ درصد (۹۲/۰۰ - ۸۸/۰۰) با حدود اطمینان ۹۵ درصد (محاسبه گردید (جدول ۲)

بحث

روشهای معمول تشخیص سارکوسیستیس برای مطالعات غربالگری در سطح وسیع و نیز در دام زنده امکانپذیر نمی باشند (۷). جهت رفع این معضل می توان از روشهای سرولوژیک استفاده نمود. علیرغم موفقیتهای به دست آمده، اعتبار این روشها در ارتباط با تشخیص آلودگی طبیعی کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۱۹). در این بین روش الایزا بعنوان یک روش معتبر، ساده و نسبتاً ارزان مطرح می باشد و این در حالیست که بر اساس جستجوهای صورت گرفته گزارشی در ارتباط با روش الایزا در تشخیص سارکوسیستوزیس گاو میش مشاهده نشده است.

در این بررسی جهت جداسازی موارد مثبت و منفی بر اساس قرائت جذب نوری در روش الایزا و نیز حذف مواردی که حاصل واکنش متقاطع می باشند، میانگین جذب نوری در ۵۰ نمونه سرم منفی با ۲ انحراف معیار برابر ۰/۱۹۲ - محاسبه و بعنوان cut-off آزمایش در نظر گرفته شد. جهت تعیین off-cut الایزا در تشخیص سارکوسیستوزیس گاو، Savini و همکاران در سال ۱۹۹۷ از میانگین جذب نوری با ۲ انحراف معیار و Shi و Zhao در سال ۱۹۸۷ از میانگین جذب نوری با ۱/۹۶ انحراف معیار استفاده نمودند (۱۸، ۱۹).

مطالعه حاضر ارتباط مناسبی را بین آزمایش الایزا و روش هضمی در تشخیص سارکوسیستوزیس گاو میش مشخص نمود که با نتایج سایر محققین تقریباً همخوانی داشته است.

راضی جلالی و همکاران در سال ۱۳۸۱ میزان آلودگی به روش مشاهده کشتارگاهی در کشتارگاه اهواز را ۱۸/۶ درصد و به روش dob smear، ۵۳/۵ درصد گزارش نموده اند (۲). در بررسیهای صورت گرفته دیگر بر روی گاو میش، در عراق ۱۵/۶ درصد در روش مشاهده کشتارگاهی، ۹۳/۳ درصد و ۸۸/۶ درصد در روشهای هضم عضلانی و ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (۱۳)، در فیلیپین ۶۵ درصد بر اساس روش dob smear (۴) و در ویتنام ۷۹ درصد



References

۱. دلیمی اصل، ع.، خداشناس، م.، نوری، ع.، مروتی، ح. (۱۳۷۸): مطالعه ریخت شناسی و فراریزینی کیست سارکوسیستیس جدا شده از گاو میشهای خوزستان. پژوهش و سازندگی، شماره ۴۳، صفحه: ۴۹-۴۷.
۲. راضی جلالی، م.، خضرائی نیا، پ.، حدادزاده، ح.، طاهری، م. (۱۳۸۰): بررسی فراوانی آلودگی به سارکوسیستیس در گاو میشهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه اهواز، سال چهارم، شماره ششم، صفحه: ۶۶-۵۸.
3. Astrid, M.T. (1988): Comparison of Dot-ELISA, ELISA and IFAT for detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* in experimentally infected and immunized mice. *Vet Parasitol*. 29: 89-104, 1988.
4. Claveria, F. G., Cruz, M. J., Lim, R. S. (2000): *Sarcocystis* spp. Infection in Philippine water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 31:44-47, 2000.
5. Durate, P. C., Daft, B. M., Conrad, P. A., Packham, A. E., Saville, W. J., Mackay, R. J., Barr, B. c., Wilson, W. D., Ng, T., Reed, S. M., Gardner, I. A. (2004): Evaluation and comparison of an indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to *Sarcocystis neurona*, using serum and cerebrospinal fluid of naturally and experimentally infected and vaccinated horses. *J Parasitol*. 90(2):379-386, 2004.
6. Dubey, J. P., Mitchell, S. M., Morrow, J. K., Rhyan, J. C., Stewart, L. M., Granstrom, D. E., Romand, S., Saville, W. J., Lindsay, D. S. (2003): Prevalence of antibodies to *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Toxoplasma gondii* in wild horses from central Wyoming. *J Parasitol*. 89(4):716-720, 2003.
7. Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (1989): *Sarcocystosis of Animal and Man*. CRC press Boca Raton, FL, pp:1-215.
8. Fayer, R., Johnson, A. J. (1973): Development of *Sarcocystis fusiformis* in calves infected with sporocysts from dogs. *J Parasitol*. 59:1135-1137, 1973.
9. Fukuyo, M., Battsetseg, G., Byambaa, B. (2002): Prevalence of *sarcocystis* infection in meat-producing animals in Mongolia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 33(3): 490-495, 2002.
10. Habeeb, Y. S., Selim, M. A., Ali, M. S., Mahmoud, L. A., Abde Hadi, A. M., Shafei, A. (1996): Serological diagnosis of extraintestinal *sarcocystosis*. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 26(2): 393-400, 1996.
11. Houg, L.T. (1999): Prevalence of *Sarcocystis* spp. In water buffaloes in Vietnam. *Vet Parasitol*. 86 (1): 33-39, 1999.
12. Kalubowila, D. G., Udagama-Randeniya, P. V., Perera, N. A., Rajapakse, R. P. (2004): Seroprevalence of *Sarcocystis* spp. In cattle and buffaloes from the wet and dry zones of Sri Lanka: a preliminary study. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 51(2):89-93, 2004.
13. Latif, B. M. A., Al-Delemi, J. K., Mohammed, B. S., Al-Bayati, S. M., Al-Amiry, A. M. (1999): Prevalence of *Sarcocystis* spp. In meat-producing animals in Iraq. *Vet Parasitol*. 84:85-90, 1999.
14. Levine, N. D., Tadros, W. (1980): Named species and hosts of *Sarcocystis* (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *Syst. Parasitol*. 2:42-60, 1980.
15. Morsy, T. A., Abdel Mawla, M. M., Salama, M. M., Hamdi, K. N. (1994): Assessment of intact *sarcocystis* cystozoites as an ELISA antigen. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 24(1): 85-91, 1994.
16. Nedjary, M. (2003): The occurrence of animal *sarcocystosis* in Algeria. *Berl Munch Tierarzti Wochens Chr*. 116 (3-4):139-141, 2003.
17. Savini, G., Dunsmore, J. D., Robertson, I. D. (1994): Evaluation of serological test system for the diagnosis of *Sarcocystis cruzi* infection in cattle using *S. cruzi* merozoite antigen. *Vet Parasitol*. 51 (3-4): 181-189, 1994.
18. Savini, G., Robertson, I. D., Dunsmore, J. D. (1997): Sensitivities and Specificities of two ELISA tests for detecting infection with *Sarcocystis* in cattle of Western Australia. *Prev. Vet. Med*. 32 (1-2): 35-40, 1997.
19. Shi, L. Z., Zhao, H. Y. (1987): Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of antibodies against *Sarcocystis* spp. In naturally infected cattle in China. *Vet Parasitol*. 24 (3-4):185-194, 1987.
20. Svobodova, V., Nevole, M. (1992): Diagnosis of *sarcocystosis* in sheep using the indirect fluorescence test and ELISA. *Vet Med (Praha)*. 37(2):109-112, 1992.
21. Svobodova, V., Nevole, M. (1991): Use of ELISA for the diagnostics of ovine *sarcocystosis*. *Folia Parasitol (Praha)*. 38 (4): 303-308, 1991.

