

# شناسایی سارکوسیستیس کروزوی در گوساله با ایجاد عفونت تجربی در میزبان

## نهایی و واسط

دکتر ابوالقاسم نقیبی<sup>۱</sup>، دکتر غلامرضا رزمی<sup>۱</sup>، دکتر محمد قاسمی فرد<sup>۲</sup>

### Identification of *Sarcocystis cruzi* in cattle by using of experimentally infection in final and intermediate hosts

Naghibi, A.<sup>1</sup>, Razmi, G.R.<sup>1</sup>, Ghasemifard, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad - Iran. <sup>2</sup>Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad - Iran.

**Objective:** Identification of *sarcocystis cruzi* in calf, by induced experimentally of infected in final and intermediate hosts.

**Design:** Experimental study.

**Animals:** Two healthy pup and one calf.

**Procedure:** At first, two puppy (2.5 months old) were fed by infected bovine hearts with sarcocystis. One week post infection, regular fecal examination for detection and isolation of Sporocysts were done by claytone - lane method. When the numbers of sporocysts were reached to maximal rate, the sporocysts were harvested and stored in 2% potassium dichromate. In order to infect of intermediate host, a domestic female calf (5 months old) were inoculated orally with 360,000 sporocysts. The infected calf were regularly examined from beginning experiment to death time. At dead time calf were autopsied and done histopathological examination.

**Statistical analysis:** Descriptive statistics.

**Results:** The results were shown that the dogs were shed sporocysts in their feces, eight day post infection. At 15 D.F.I, the numbers of sporocysts were reached to maximal rate. The first signs of illness were seen in the infected calf with high fever (42 C) and diarrhoea in 17 D.P.I. After a few days diarrhoea was stopped, but regular fever was continued to death time. The other signs were anorexia, emaciation, anemia and icterus. At 37 D.P. I (at death time), the calf became recumbent, hypotermic and nervous signs like, trismus, nystagmus, opisthotonus were appeared. At necropsy, emaciation, anemia, icterus, petechial and echimosis on serosa, ascite, hydropericardium and large gallbladder were presented. At histopathological examination, cysts of *sarcocystis cruzi* were found in striated muscles, heart and brain.

**Conclusion:** With these results, it was exactly confirmed the presence of *sarcocystis cruzi* for the first time in Iran. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 1: 67-69, 2002.*

**Key words:** *Sarcocystis cruzi*, Cattle, Dog.

هدف: شناسایی سارکوسیستیس کروزوی (*Sarcocystis cruzi*) در گاو.

طرح: مطالعه تجربی.

حیوانات: دو قلابه توله سگ ۲/۵ ماهه و یک رأس گوساله ۵ ماهه. روش: ابتدا به دو توله سگ ۲/۵ ماهه، عضلات قلب آلوده گاوهای کشتاری به سارکوسیستیس خوراندند. یک هفته پس از آلودگی توله‌ها، نسبت به آزمایش منظم مدفوع با روش کلیتون-لین اقدام گردید. وقتی میزان اسپوروسیست به حداکثر رسید، اسپوروسیست‌ها در محلول دی کرومات پتاسیم ۲ درصد نگهداری شد. آنگاه به یک گوساله ۵ ماهه به طور دهانی با ۳۶۰۰۰۰ اسپوروسیست آلوده شد. گوساله پس از آلودگی تا هنگام مرگ به طور مرتب مورد معاینه قرار گرفت. در آخر گوساله مورد کالبد گشایی قرار گرفت و از بافتهای مختلف بدن گوساله جهت آزمایش هیستوپاتولوژی نمونه برداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: آمار توصیفی.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد که توله‌ها از روز هشتم پس از آلودگی شروع به دفع اسپوروسیست نموده که در روز ۱۵ پس از آلودگی این میزان در مدفوع به حداکثر میزان خود رسید. گوساله تا هنگام مرگ به طور مرتب مورد معاینه قرار گرفت. اولین علامت درمانگاهی در گوساله در روز هفدهم پس از آلودگی، با تب بالا (۴۲ درجه سانتیگراد) و اسهال ظاهر شد. اسهال پس از مدتی متوقف شد ولی تب تا هنگام مرگ با نوساناتی ادامه داشت. علاوه بر این گوساله دچار کم اشتها، لاغری، کمخونی و زردی پیش رونده گردید. در روز ۳۷ پس از آلودگی گوساله زمینگیر شد و درجه حرارت حیوان کاهش یافت و همچنین علایم عصبی مثل نیستاموس، ایستوتونوس قبل از مرگ ظاهر شد. در کالبد گشایی زردی، وجود پتشی و اکیموز روی لایه‌ها سرورزی، افزایش مایعات سرمی در حفرات بدن و اطراف قلب و پر شدن کیسه صفرآ مشاهده گردید. در بررسی هیستوپاتولوژی بافتهای مختلف بدن، در عضلات مخطط، قلب و مغز کیست سارکوسیستیس کروزوی دیده شد.

نتیجه‌گیری: در پایان با توجه به یافته‌های بالینی، انگل شناسی و پاتولوژی وجود سارکوسیستیس کروزوی برای اولین بار در ایران تأیید گردید. *مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۱، دوره ۵۷، شماره ۱، ۶۹-۶۷.* واژه‌های کلیدی: سارکوسیستیس کروزوی، گوساله، سگ.

در سالیان اخیر سارکوسیستوزیس به عنوان یک بیماری مستقل و مشخص مورد قبول پژوهشگران قرار گرفته است. لیکن تا دهه هفتاد اکثر انگل شناسان، مرحله کیستی انگل را در عضلات حیوانات اهلی بیشتر مد نظر داشته و وجود کیست در عضله را بی‌ضرر می‌دانستند، و اهمیت آن را در رابطه با عدم جلب نظر مشتری در خریدن گوشت اعلام نموده‌اند. بعضی از علایم بیماری نظیر لاغری، لنگش، فلج و حتی مرگ را برخی از محققین در ارتباط با وجود کیست انگل در بدن دام دانسته ولی دلایل کافی بر این مدعا اعلام نکردند. در سال ۱۹۶۳ بیماری ناشناخته‌ای از دره دالمنی (Dalmeny) کانادا در یک گله گاو گزارش شد که علایم آن همراه با کاهش اشتها، لاغری، تنگی تنفس، اسهال و خونریزی در واژن، ترشح بزاق و سقط جنین در گاوهای آبستن بود. به علت ناشناخته بودن اتیولوژی نام آن را از بیماری دالمنی گذاشتند (۶). از آن تاریخ به بعد گزارشات مشابهی

(۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد - ایران.

(۲) دانش آموزانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد - ایران.



آلودگی سارکوسیستیس در گاوهای ایران به میزان بالایی گزارش گردید (۲).

همچنین گزارشاتی مبنی بر وجود بیماری دالمنی در بعضی از گاو‌داریهای ایران داده شده است (۱). ولی وجود سارکوسیستیس کروزوی در گاوهای ایران به اثبات نرسیده است، بنابراین در این مطالعه سعی گردید وجود این گونه با ایجاد آلودگی تجربی در میزبان نهایی و واسط به اثبات برسد.

### مواد و روش کار

برای ایجاد آلودگی تجربی در توله سگها در آذر ماه ۱۳۷۸ ضمن مراجعه به کشتارگاه صنعتی مشهد از تعداد ۴۸ عضله قلب گاو نمونه برداری شد. میزان نمونه‌های تهیه شده از عضله قلب ۳۰ گرم بود. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه انگل شناسی، از هر یک از آنها با روش مهری (Dob smear) گسترش تهیه گردید. روش تهیه گسترش به این صورت بود که ابتدا قسمت کوچکی از بافت عضله را با قیچی بریده و با پنس به آرامی روی کاغذ صافی فشرده تا سطح مقطع کاملاً خشک گردد. آنگاه به طریق فشردن بر روی اسلاید گسترش مهری تهیه شد و پس از آن گسترشها با رنگ گیمسارنگ آمیزی گردید. پس از رنگ آمیزی هر گسترش به مدت ۵ دقیقه از لحاظ وجود Bradyzoite سارکوسیستیس مورد مطالعه قرار گرفت. در صورت مشاهده برادی زوییت نمونه مورد آزمایش، مثبت تلقی می‌شد. برای آلوده نمودن توله‌ها، ابتدا مدفوع آنها در چند نوبت مورد آزمایش انگل شناسی قرار گرفت. چون توله‌ها به *Toxocara* آلوده بودند با داروی لوامیزول مورد درمان قرار گرفتند. پس از درمان، توله‌ها به مدت دو روز با ۵۰۰ گرم قلب آلوده گاو تغذیه شدند. از روز هشتم بعد از خوراندن عضلات آلوده، مدفوع توله‌ها به طور جداگانه جمع آوری شده و در آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی با روش Clayton-lane از لحاظ وجود اسپوروسیست سارکوسیستیس مورد آزمایش قرار گرفتند. در این آزمایش بعد از همگن کردن مدفوع با آب، مدفوع از صافی عبور داده و پس از ریختن آنها در لوله‌های آزمایش با دور سه هزار به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ می‌گردید. پس از پایان سانتریفوژ و خارج نمودن مایع رویی، به رسوب حاصله آب شکر اشباع اضافه می‌شد. پس از گذاشتن لوله‌ها در داخل سانتریفوژ، آب شکر اشباع با قطره چکان آن قدر اضافه می‌گردید تا لوله‌های آزمایش به حالت لبریز در بیاید آنگاه لاملها را برداشته و روی لوله‌های آزمایش قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌گردید. پس از اتمام سانتریفوژ لاملها از روی لوله‌ها برداشته و روی یک اسلاید قرار داده می‌شد. سپس توسط میکروسکوپ به مدت ۵ دقیقه مورد بررسی قرار می‌گرفت و در صورت مشاهده یک اسپوروسیست نمونه مثبت تلقی می‌شد. و در صورت مثبت بودن نمونه، با میکروپیتت مقداری از محلول رویی لوله‌ها را به همراه باقیمانده مایع شستشو لاملهای مربوطه جمع‌آوری نموده و در محل محلول دی کرومات پتاسیم نگهداری می‌شد.

در این آزمایش جداسازی و جمع آوری اسپوروسیست تا روز هفده پس از آلودگی ادامه یافت که در نهایت با کالبد گشایی توله‌ها و تراشیدن مخاط روده کوچک تعداد بسیار زیادی اسپوروسیست سارکوسیستیس جمع آوری شد. برای آلودگی میزبان واسط یک رأس گوساله ماده بومی ۵ ماهه خریداری گردید. پس از اطمینان از سلامتی آن، گوساله با دوز ۳۶۰۰۰۰ اسپوروسیست با کمک لوله معدی آلوده شد. پس از آلودگی، هر سه روز یکبار گوساله از لحاظ بالینی و ثبت درجه حرارت مورد معاینه قرار می‌گرفت. گوساله پس از زمینگیری و مشاهده علائم مرگ مورد کالبد گشایی قرار گرفت و

علائم ماکروسکوپی ثبت و از بافتهای مختلف بدن به منظور آزمایشات پاتولوژی نمونه برداری و با روش هماتوکسلین ایوزین رنگ آمیزی گردید.

### نتایج

در این بررسی شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس گاو با روش آلودگی تجربی در میزبان نهایی و واسط و مشاهده سیکل زندگی انگل انجام گرفت. بررسی میکروسکوپی گسترشهای مهری رنگ‌آمیزی شده از چهل و هشت نمونه عضلات قلب گاوهای کشتارگاهی و مشاهده برادی زوییت سارکوسیستیس در آنها، نشان دهنده آلودگی تمامی این نمونه‌ها به تک یاخته مزبور بود. پس از خوراندن قلب گاوهای آلوده به توله‌ها پس از شش روز مدفوع آنها به طور مرتب برای مشاهده اسپوروسیست مورد آزمایش قرار گرفت. توله‌ها از روز هشتم به بعد شروع به دفع اسپوروسیست نمودند. اگر چه میزان اووسیست اسپوروله شده و نشده در این زمان با شدت کم دفع می‌گردید. ولی با مرور زمان این میزان بتدریج افزایش یافت تا اینکه در روز پانزدهم دفع اووسیست و اسپوروسیست به حداکثر خود رسید.

پس از خوراندن اسپوروسیست به گوساله، اولین علامت درمانگاهی در روز هفدهم با تب بالا ۴۲ درجه سانتیگراد به همراه اسهال ظاهر شد. از این زمان تا هنگام مرگ درجه حرارت بدن دارای نوساناتی بود که از روز سی و یکم پس از آلودگی درجه حرارت کاهش یافته و در روز سی و هفتم به پایینترین حد خود رسید در این مدت گوساله به شدت لاغر شده و در اواخر دوره حیات علائم کمخونی، زردی را نشان داد که همراه با زمینگیری بود و نشانهایی عصبی مثل *Strabismus*، *Opisthotonus*، و سفتی گردن نیز ظاهر گردید. مشاهدات کالبد گشایی گوساله تلف شده ناشی از آلودگی تجربی به سارکوسیستیس کروزوی نشان داد که گوساله مزبور علاوه بر لاغری دچار کمخونی شدید وزردی شده بود و در غشاهای سروزی اعضا مختلف بدن و اندوکارڈ قلب خونریزی مشاهده گردید. و همچنین کیسه صفرا سرشار از مایع غلیظ صفراوی بود. در حفرات صدی، بطنی و در پریکارڈ قلب، مایعات خونی رنگ تجمع یافته بود. نتایج هیستوپاتولوژیک نمونه‌های بافتی تهیه شده از مغز، مخچه، کبد، طحال، ریه، کلیه، روده، عقده‌های لنفاوی و عضلات مختلف نظیر قلب، زبان، بین دنده‌ای، دست و پا، جوشی و دیافراگم نشان دهنده آلودگی مغز، مخچه، قلب، عضله دست و پا و زبان به کیست انگل بود.

### بحث

محققین به منظور شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس از روشهای ایزو آنزیم مورفولوژی دیواره کیست و از طریق آلودگی تجربی میزبانان نهایی و واسط استفاده نموده‌اند (۳). در ایران با وجود تعیین آلودگی سارکوسیستیس در گاوها، گونه‌های بیماریزا و غیر بیماریزا به درستی شناخته نشده است (۲). در این بررسی از روش آلودگی تجربی استفاده شد. آلودگی موفقیت آمیز توله‌ها پس از خوراندن عضلات قلب و دفع اسپوروسیست پس از ۸ روز و اوج آلودگی در روز پانزدهم نشان دهنده وجود سارکوسیستیس کروزوی در ایران می‌باشد. نتایج به دست آمده با نتایج گزارش شده در مطالعات تجربی انجام شده توسط Dubey در سال ۱۹۸۲ و Jain در سال ۱۹۸۶ دقیقاً هماهنگی دارد (۷، ۹). هفده روز پس از آلودگی تجربی گوساله بومی ۵ ماهه به عنوان میزبان واسط با اسپوروسیست‌های جمع‌آوری شده از مدفوع توله‌ها، علائم بیماری به ترتیب بالا، اسهال، کم اشتها، لاغری پیشرونده، کمخونی، زردی



## References

۱. تقی پور بازرگانی، ت. رهبری، ص. مرادی گراوند، م. (۱۳۶۹): بروز بیماری دالمنی در تعدادی گاو در یکی از دامداریهای اطراف اصفهان. مجموعه سخنرانیهای علمی پاییزه، انتشارات دانشکده دامپزشکی تهران.
۲. رزمی، غ.ر. (۱۳۶۵): فراوانی سارکوسیستیس در نزد نشخوار کنندگان اهلی در ایران. پایان نامه دوره دکتری عمومی دامپزشکی. شماره ۱۶۴۴، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.
۳. رزمی، غ.ر. (۱۳۶۹): تایپینگ سارکوسیستیس. انتشارات دوره‌های تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۲.
۴. منصوری، ف. (۱۳۶۱): بررسی آسیب شناسی سارکوسیوریديوز مغز گوسفند و تحلیلی از سارکوسیوریديوز. پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی، شماره ۱۳۹۲، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.
5. Colley, R. (1989): The pathogenesis of acute bovine Sarcocystosis. I. Clinical sign and anemia. Irish Vet. Med. J. 41: 273-280.
6. Dubey, J.P., Speer, C.A and Fayer, R. (1989): Sarcocystosis of animal and man. Florida. C.R.C Press.
7. Dubey, J.P. (1982): Development of Ox-Coyote cycle of *Sarcocystis cruzi*. J. Protozool, 29: 591-601.
8. Fayer, R., and Dubey, J.P. (1986): Bovine Sarcocystosis. Compend. Food. Anim 8: 130-142.
9. Jain, P.C., Shah, H.L. (1986): Determination sporocysts discharged during the patent proid by dog fed with *Sarcocystis cruzi* from cattle. Ind. J. Anim. Sci. 59: 1005-1008.

ظاهر شد، که در زمان مرگ (روز ۳۷ پس از آلودگی) همراه با زمینگیری و علائم عصبی بود. این علائم با نشانیهای سارکوسیستوزیس حاد گزارش شده در گاو توسط سایر محققین در مطالعات تجربی همخوانی داشت (۵، ۶، ۷). در بعضی از مطالعات مشابه، نشانیهای دیگری چون سقط جنین، ریزش مو بویژه در ناحیه دم گزارش شده است (۶، ۸). در مطالعه حاضر چنین علائمی مشاهده نگردید. اگر چه گوساله مزبور به علت وضعیت سنی و فیزیولوژی نمی‌توانست دچار سقط جنین گردد ولی ریزش مو در ناحیه دم در صورت خوردن دوزهای پایین اسپوروسیست، مشاهده می‌شد (۶، ۸). بررسی هیستوپاتولوژی بافتهای مختلف بدن گوساله نشان دهنده آلودگی اکثر عضلات بدن به میکروکیست‌های سارکوسیستیس کروزوی بود. و همچنین در مغز و مخچه نیز این کیست مشاهده گردید. وجود کیست در سیستم اعصاب مرکزی بویژه مغز توسط سایر محققین در ایران و دنیا گزارش شده است (۴، ۶).



