کالج پروژه

www.collegeprozheh.ir

دانلود پروژه های دانشگاهی

بانک موضوعات پایان نامه

دانلود مقالات انگلیسی با ترجمه فارسی

آموزش نگارش پایان نامه ، مقاله ، پروپوزال

دانلود جزوه و نمونه سوالات استخدامی

دانشگاه آزاد اسلامی

واحد بروجرد

دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد (M.Sc)

گرایش : سلولی و مولکولی

عنوان:

شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس در گوسفندان ذبح‌شده کشتارگاه شهرستان نهاوند به روش PCR-RFLP

استاد راهنما:

دکتر فرزاد پارسا

استاد مشاور:

دکتر رضا یاری

نگارش:

الهام سیاوشی

زمستان ۱۳۹۵

بسم الله الرحمن الرحيم

صورت‌جلسه دفاع

با تأییدات خداوند متعال جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم/آقای **الهام سیاوشی** در رشته: **زیست‌شناسی** گرایش: **سلولی و مولکولی** تحت عنوان: **شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس در گوسفندان ذبح‌شده کشتارگاه شهرستان نهاوند به روش PCR-RFLP** با حضور استاد راهنما، استاد (استادان) مشاور و هیأت داوران در دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد در تاریخ **۱۳۹۵/۱۲/۱۵** تشکیل گردید. در این جلسه ، پایان‌نامه با موفقیت مورد دفاع قرار گرفت.

نامبرده نمره _____ با امتیاز دریافت نمود.

۱- استاد راهنما: **دکتر فرزاد پارسا** امضاء تاریخ

۲- استاد مشاور: **دکتر رضا یاری** امضاء تاریخ

۳- استاد داور : **دکتر محسن میرزایی** امضاء تاریخ

۴- مدیر گروه آموزشی: **دکتر ابوالفضل عرب جوشقانی** امضاء تاریخ

۵- رئیس دانشکده علوم پایه: **دکتر ابوالفضل عرب جوشقانی** امضاء تاریخ

معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

دکتر محمدرضا معظمی گودرزی

تعهدنامه اصالت رساله یا پایان‌نامه

این‌جانب **الهام سیاوشی** دانش‌آموخته مقطع کارشناسی ارشد ناپیوسته/دکترای حرفه‌ای / دکتری تخصصی در رشته **زیست‌شناسی سلولی و مولکولی** که در تاریخ **۱۳۹۵/۱۲/۱۵** از پایان‌نامه / رساله خود تحت عنوان" **شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس در گوسفندان ذبح‌شده کشتارگاه شهرستان نهاوند به روش PCR-RFLP** " با کسب نمره و درجه دفاع نموده‌ام بدین‌وسیله متعهد می‌شوم:

۱) این پایان‌نامه / رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام‌شده توسط این‌جانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان‌نامه، کتاب، مقاله و) استفاده نموده‌ام، مطابق ضوابط و رویه موجود، نام منبع مورداستفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده‌ام.

۲) این پایان‌نامه / رساله قبلاً "برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم‌سطح، پائین تریا بالاتر) در سایر دانشگاه‌ها و مؤسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره‌برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان‌نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

۴) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می‌پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با این‌جانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی‌ام هیچ‌گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی :
الهام سیاوشی
تاریخ و امضاء

تقدیم به

دست‌های پدرم

کسی که برای اولین بار هم هنر فکر کردن را و هم فن انسان بودن را به من آموخت. طعم مناعت، استواری، ایمان و استقلال دل را

چشم‌های مهربان مادر صبور و فداکارم

دریای بی‌کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر. خاک‌پایش را مرا تاجی است هدیه‌ای از بهشت برین

سپاسگزاری

سپاس به پیشگاه حضرت دوست که هرچه هست از اوست.

بدین‌وسیله مراتب سپاس،تقدیر و تشکر خویش را از استادان گرامی و فرزانه:

از استاد گران‌قدر جناب آقای دکتر فرزاد پارسا که در کمال سعه‌صدر، با حسن خلق و فروتنی از هیچ کمکی بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان‌نامه را بر عهده گرفتند، کمال تشکر و قدردانی رادارم.

مراتب سپاس قدردانی خود را از جناب آقای دکتر رضا یاری که زحمت مشاوره این پایان‌نامه را متقبل شدند ابراز می‌دارم و از خداوند بلندمرتبه برای ایشان سلامتی آرزومندم.

با تقدیر و تشکر از زحمات و همکاری صمیمانه:

مسئولین آزمایشگاه دانشگاه که در این تحقیق ما را یاری کردند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده

فصل اول :مقدمه و کلیات

۱-۱-مقدمه ۲

۱-۲-تاریخچه ۲

۱-۳-ویژگی‌های انگل ۳

۱-۴-اصطلاحات ۴

۱-۵-طبقه‌بندی تک‌یاخته ۵

۱-۶-تاکسونومی اپی کمپلکسا ۶

۱-۷-ساختمان اپی کمپلکسا ۶

۱-۸-نام‌گذاری سارکوسیستیس ۷

۱-۹-چرخه زندگی سارکوسیستیس ۱۰

۱-۱۰-بیماری‌زایی سارکوسیستیس در میزبانان واسط ۱۴

۱-۱۱-بیماری‌زایی سارکوسیستیس در میزبانان نهایی ۱۵

۱-۱۲-بیماری‌زایی و علائم در انسان ۱۵

۱-۱۳-ضایعات کالبدگشایی ۱۵

۱-۱۴-نشانه‌های بالینی ۱۵

ادامه فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۱۵-اپیدمیولوژی ۱۷

۱-۱۶-کنترل ۱۷

۱-۱۷-تشخیص سارکوسیستوزیس ۱۸

۱-۱۸-ایمنی ۲۰

۱-۱۹-درمان ۲۰

۱-۲۰-بیان مسئله ۲۱

۱-۲۱-اهداف ویژه ۲۲

فصل دوم :مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق

۲-۱- سارکوسیستوزیس در ایران ۲۴

۲-۲- وضعیت سارکوسیست در جهان ۲۶

فصل سوم :مواد و روش اجرای تحقیق

۳-۱- جمع‌آوری و آماده‌سازی کیست‌ها ۳۰

۳-۲- روش هضمی ۳۰

۳-۳- استخراج DNA ۳۲

۳-۴- PCR ۳۴

۳-۵- افزودن آنزیم‌های برش دهنده برای RFLP ۳۷

ادامه فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۶- الکتروفورز نمونه‌های RFLP شده..... ۳۸

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- نتایج روش هضمی..... ۴۰

۴-۲- نتایج PCR..... ۴۰

۴-۳- نتایج RFLP..... ۴۰

فصل پنجم: بحث

۵-۱- بحث..... ۴۵

۵-۲- پیشنهادات..... ۵۰

منابع و مآخذ..... ۵۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- پراکندگی گونه‌های سارکوسیست در حیوانات اهلی ۱۰

جدول ۳-۱- پرایمرهای مورداستفاده در تکثیر ژنوم سارکوسیستیس ۳۴

جدول ۳-۲- مراحل انجام PCR ۳۵

جدول ۳-۳- جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر ۳۷

فهرست تصاویر

عنوان صفحه

تصویر ۱-۱- اووسیست‌های عفونی سارکوسیستیس ۴

تصویر ۱-۲- اووسیست سارکوسیست..... ۴

تصویر ۱-۳- سارکوسیست های ماکروسکوپی در مری ۵

تصویر ۱-۴- کیست‌های ماکروسکوپی سارکوسیست در دیافراگم..... ۵

تصویر ۱-۵- ساختمان تک‌یاخته‌های خانواده اپی‌کمپلکسا..... ۷

تصویر ۱-۶- چرخه کلی تک‌یاخته سارکوسیت..... ۱۱

تصویر ۱-۷- چرخه زندگی سارکوسیستیس کروزی در گاو ۱۲

تصویر ۱-۸- چرخه زندگی سارکوسیست..... ۱۳

تصویر ۳-۱- نمونه شاهد از مری دارای کیست‌های ماکروسکوپی..... ۳۰

تصویر ۳-۲- مقدار ۱.۳گرم پپسین وزن شده در آزمایشگاه..... ۳۱

تصویر ۳-۳- صاف کردن نمونه هضم شده با گاز غیر استریل ۳ لایه‌ای ۳۱

تصویر ۳-۴- کیت Cinnagen برای استخراج DNA در آزمایشگاه..... ۳۳

تصویر ۳-۵- سانتریفیوژهای استفاده‌شده در آزمایشگاه..... ۳۳

تصویر ۳-۶- دستگاه ترموبلاک..... ۳۴

تصویر ۳-۷- مراحل انجام PCR..... ۳۵

تصویر ۳-۸- پودر آگار وزن شده در آزمایشگاه ۳۶

ادامه فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر ۳-۹- بافر ۱۰X TBE..... ..... ۳۷

تصویر ۳-۱۰- آنزیم برش دهنده TaqI در بن ماری در دمای ۶۵ ° C..... ..... ۳۸

تصویر ۳-۱۱- لود شدن نمونه‌ها در الکتروفورز..... ..... ۳۸

تصویر ۴-۱-الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۸s rRNA که در آن قطعه ۶۰۹ جفت.... ..... ۴۰

تصویر ۴-۲-الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۸s rRNA سارکوسیستیس آریتی کنیس. ۴۲

تصویر ۴-۳-الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۸s rRNA سارکوسیستیس تنلا جداشده از گوسفند. ۴۳

چکیده

هدف:. سارکوسیستیس از شاخه اپی کمپلکسا است که زندگی دو میزبانه اجباری دارد. علف خـواران (میزبـان واسـط) بـا خوردن آب و غذای آلوده به اسپروسیست ها که توسط (گوشت‌خواران) میزبان اصلی دفع می‌شود، آلـوده می‌شوند و متعاقب آن کیست‌های نـسجی در احـشاء ایجـاد می‌شود. هـدف از مطالعـه حاضـر شناسـایی گونه‌های مختلـف سارکوسیستیس گوسفندان با استفاده از روش PCR-RFLP بوده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر مجموعاً ۵۰ نمونه بافتی از عضلات مری و دیافراگم از گوسفندان ذبح‌شده در کشتارگاه نهاوند جمع‌آوری شد که حاوی کیست‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی بود. تخلیص DNA نمونه‌ها با استفاده از کیـت صـورت گرفـت. شـرایط PCR برای تکثیر قطعه ۱۸s rRNA بهینه شد. برای تعیین گونه سارکوسیست های تحت مطالعه، با توجه به موقعیت محل برش آنزیم‌های برش دهنده، اقدام به انتخاب آنزیم شد.

نتایج: نتایج نشان داد که آغازگرها کاملاً اختصاصی بوده‌اند. ارزیابی PCR-RFLP روی نمونه‌ها نشان داد که اکثر کیست‌ها متعلق بـه بافت دیافراگم و در جنس ماده بوده است. کیست‌های میکروسکوپی متعلق به سارکوسیستیس آریتی کنیس و سارکوسیستیس تنلا است.

نتیجه‌گیری: با استفاده از آغازگرها برمبنای روش PCR-RFLP گونه‌های سارکوسیستیس میکروسکوپی و ماکروسکوپی گوسفندی را می‌توان از هم تفکیک داد.

واژگان کلیدی:

سارکوسیستیس، ۱۸s rRNA، PCR-RFLP، سارکوسیستیس آریتی کنیس، سارکوسیستیس تنلا، شهر نهاوند.

فصل اول:
مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

سارکوسیستیس[1]، تک‌یاخته‌ای انگلی است که موجب بیماری سارکوسیستوزیس[2] می‌شود (۱). این انگل تک‌یاخته داخل سلولی اجباری هست و از معمول‌ترین تک‌یاخته‌های نشخوارکنندگان اهلی هست (۶،۴). برخی از گونه‌های سارکوسیستیس می‌توانند با ایجاد بیماری‌های بالینی باعث بروز خسارات اقتصادی فراوانی شوند. چرخه زندگی آن بین دو میزبان واسط و نهایی سپری می‌شود و شامل مراحل: مروگونی، گامتوگونی و اسپوروگونی هست (۸۵،۹). سارکوسیستیس تقریباً ۱۲۰ گونه دارد که گونه‌های بیماری‌زای آن باعث بیماری در میزبان واسط بخصوص گاو، گوسفند و خوک می‌شوند. امروزه به‌آسانی می‌توان میزان شیوع کیست ماکروسکوپی و میکروسکوپی انگل سارکوسیستیس را به روش‌های مشاهده مستقیم، گسترش بافتی و هضم بافتی موردبررسی قرار داد (۵).

۱-۲- تاریخچه

سارکوسیستوزیس یک بیماری تک‌یاخته‌ای پستانداران به‌خصوص علفخواران، پرندگان، سگ، انسان، گوشت‌خواران وحشی، جوندگان و خزندگان هست که توأم با یک تهاجم کیستی به اغلب بافت‌های بدن به‌خصوص تهاجم به عضلات مخطط و بافت‌های عصبی هست و گاهی باعث علائم بالینی شدید و مرگ می‌شود. درگذشته فکر می‌کردند که سارکوسیستوز از اهمیت چندانی برخوردار نیست ولی باگذشت زمان به این نتیجه رسیده‌اند که می‌تواند منجر به آنسفالیت، بیماری عمومی و حتی سقط شود (۲۴،۲۰،۱).

در سال ۱۸۴۳ میلادی اولین بار شخصی بنام میشر[3]، سارکوسیست را در موش شناسایی کرد و به همین خاطر کیسه، توبول و یا اجسام میشر نامیدند (۴۸).

پس از میشر در سال ۱۸۸۲، Lankester اولین نام‌گذاری علمی را انجام داد. در سال ۱۹۱۰ سارکوسیستیس در شتر توسط Mason برای اولین بار گزارش گردید. در سال ۱۹۶۰ ساختمان

---

[1] - *Sarcocystis*
[2] - *Sarcocystosis*
[3] - Miescher

سارکوسیستیس میشریانا[1] توسط Ludvik توصیف شد. در سال ۱۹۶۵ Mandour ، سارکوسیستیس گران هامین[2] را در اپوسوم توصیف کرد (۷۸،۶۴).

۱۲۴ سال پس از اولین گزارش یعنی در سال ۱۹۶۷ کیست‌های سارکوسیستی توسط میکروسکوپ الکترونی موردبررسی و مقایسه قرار گرفتند و اندامک‌هایی مانند آنچه در تک‌یاخته‌های شاخه اپی‌کمپلکسا[3] دیده می‌شد (توکسوپلاسما و ایمریا) شناسایی شد و آغازی برای مطالعات بعدی و نام‌گذاری علمی دقیق‌تر در این خصوص بود (۴۸).

همچنین در سال ۱۹۶۹ ماندور، سارکوسیستیس نسبیت[4] را از میمون روزس[5] جداسازی و توصیف کرد. کاتلانی و چامبر نیز در سال ۱۹۵۵ گونه سارکوسیستیس کورته ئی[6] را از ماهیچه‌های مخطط میمون روزس جدا کردند (۶۴). تا سال ۱۹۷۰ همچنان چرخه زندگی انگل و مراحل دیگر زندگی ناشناخته باقی ماند. چند سال بعد برادی زوئیت ها از عضلات پرندگان جدا و داخل سلول‌های پستانداران کشت داده شد و درباره مراحل جنینی و اووسیست انگل توضیح بیشتری داده شد (۴۸).

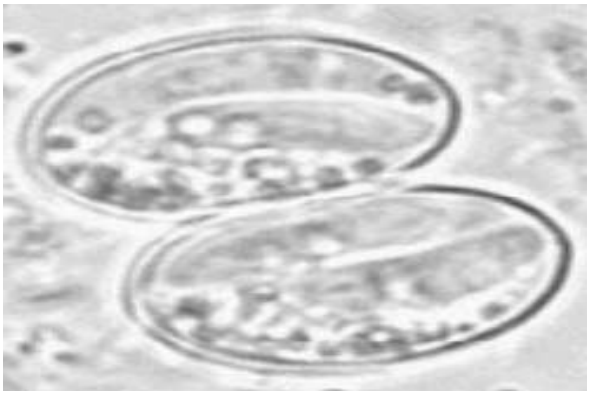
در سال ۱۹۸۰، Hilali و همکاران چرخه زندگی انگل را موردمطالعه قراردادند و آن را توصیف نمودند (۴۶). در سال ۱۹۸۱ Kuraer و در سال ۱۹۸۹ Dubey و همکاران، ساختمان سارکوسیستیس را در شتر بررسی و مطالعه نمودند (۶۴).

۱-۳- ویژگی‌های انگل

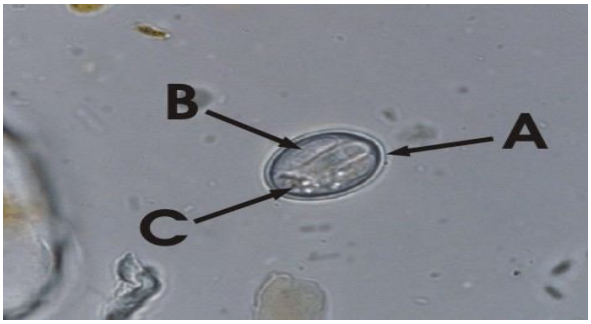
سارکوسیستیس از خانواده سارکوسیستیده هست اووسیست این انگل دارای دو اسپوروسیست است که هر یک واجد چهار اسپوروزوئیت[7] هست (تصاویر۱-۱و۱-۲). میزبان قطعی آن گوشت‌خواران و میزبان واسط، پستانداران و پرندگان هست. محل جایگزینی انگل در میزبان نهایی، روده باریک و محل جایگزینی در میزبان واسط ،اندام‌های مختلف هست. این انگل به‌صورت کیست در عضلات مستقر می‌شود. (۴۴،۴).

---

[1] - *S. meischeriana*
[2] - *S. garnhamin*
[3] - *Apicomplexa*
[4] - *S. nesbitti*
[5] - Rhesus
[6] - *S. kortei*
[7] - *Sporozoites*



تصویر ۱-۱- : اووسیست‌های عفونی سارکوسیستیس (۳۲) (sarcocystis- micro ipg)



تصویر ۱-۲- : A: اووسیست سارکوسیست عفونی، B: دیواره اووسیست، C: اسپوروسیست های حاوی اسپوروزوئیت (stanford.edu) (۳۴)

۱-۴- اصطلاحات

Sarcocyst: به‌تمامی اعضا یا هر کیست تشکیل‌شده توسط گونه‌های جنس سارکوسیستیس، سارکوسیست گویند.

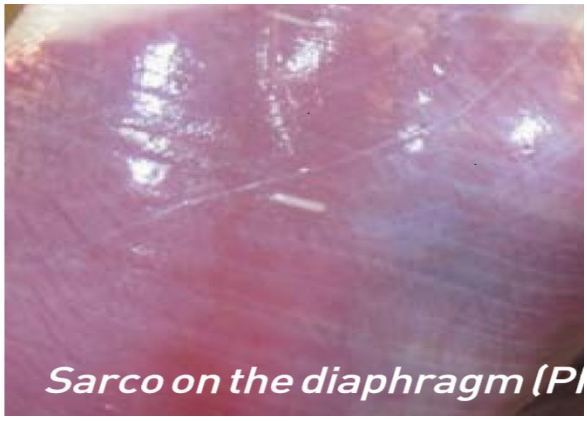
Sarcocystis : به یک جنس از تک‌یاخته‌های انگل در خانواده *Sarcocystidae*، سارکوسیستیس اطلاق می‌شود.

Sarcocystosis : به بیماری و اثرات ناشی از سارکوسیست، سارکوسیستوزیس گفته می‌شود.

Sarcocysticin : به سم حاصل از سارکوسیست، سارکوسیستین گفته می‌شود.

Sarcosporidiosis : بیماری ناشی از سارکوسیستیس، سارکوسیستوزیس یا سارکوسپوریدیوزیس نامیده می‌شود (۲۴،۶،۱). کیست‌های سارکوسیستیس بیشتر در عضلات مری، دیافراگم، قلب و عضلات بین دنده‌ای وجود دارد. در سال‌های گذشته با بررسی محتوای کیست، توکسین سارکوسیستین یافت شد که می‌تواند باعث ایجاد عوارض گوارشی شود البته این توکسین در حرارت بالا غیرفعال می‌شود (۱۶،۱۵).

تصویر ۱-۳- : سارکوسیست های ماکروسکوپی در مری (۴۳)



تصویر ۱-۴- : کیست‌های ماکروسکوپی سارکوسیست در دیافراگم(۴۳)

۱-۵- طبقه‌بندی تک‌یاخته‌ها

ازنظر تک یاخته‌شناسی دامپزشکی، مهم‌ترین شاخه‌های انگلی عبارت‌اند از :

شاخه: سارکوماستیگوفورا Phylum: Sarcomastigophora

شاخه: اپی‌کمپلکسا Phylum: Apicomplexa

شاخه: سیلیوفورا Phylum: Ciliophora

شاخه: میکروسپورا Phylum: Microspora

از بین این شاخه‌های انگلی، اپی‌کمپلکسا موردبحث ما بوده که این شاخه یک گروه منحصربه‌فرد هست، چون تمام اعضای این شاخه انگل می‌باشند. اعضای این گروه انگل داخل سلولی هستند و همه آن‌ها چرخه زندگی پیچیده دارند. آن‌ها در یک مرحله یا مراحل بیشتری از چرخه زندگی، ساختمان رأسی دارند (۸۵،۱۶).

۱-۶- تاکسونومی اپی‌کمپلکسا

در شاخه اپی‌کمپلکسا، رده اسپوروزوآ[1] وجود دارد که این رده به دو زیررده کوکسیدیا[2] و پیروپلاسمیا[3] تقسیم می‌شود. تک‌یاخته‌های زیررده کوکسیدیا، دارای دو نوع تولیدمثل جنسی و غیرجنسی می‌باشند. برخی از کوکسیدیاها، یک میزبانه هستند، مانند ایمریاها و برخی دارای دو میزبان اجباری مانند پلاسمودیوم می‌باشند.

زیررده کوکسیدیاها دارای راسته‌های کوکسیدیاهای حقیقی و غیرحقیقی می‌باشند. در راسته کوکسیدیاهای حقیقی، دو زیر راسته ایمرینا[4] و هموسپورینا[5] دیده می‌شود. زیر راسته ایمرینا دارای خانواده ایمریده[6] ، کریپتوسپوریده[7] و سارکوسیستیده[8] می‌باشند. جنس‌های مهم خانواده ایمریده شامل: ایمریا و ایزوسپورا و جنس کریپتوسپوریدیوم از خانواده کریپتوسپوریده بوده و جنس‌های مهم خانواده سارکوسیستیده شامل :سارکوسیستیس و توکسوپلاسما و بسنوئیتیا می‌باشند .(۸۵،۴).

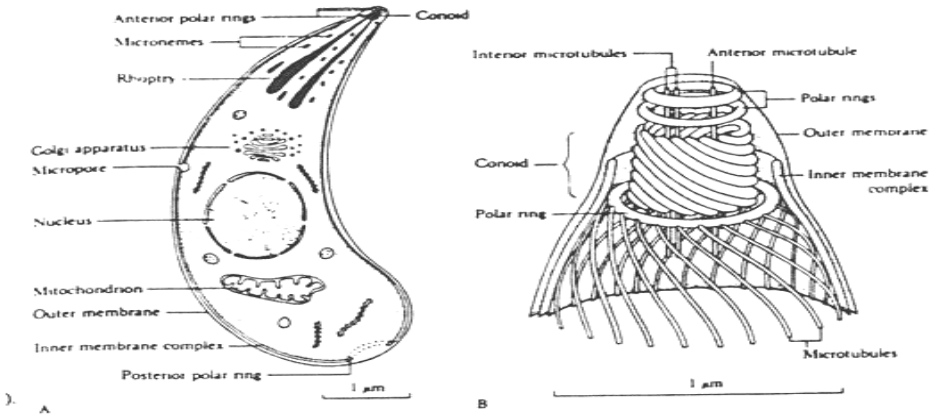
۱-۷- ساختمان اپی‌کمپلکسا

مهم‌ترین عمل ساختمان رأسی، نفوذ به داخل سلول است. ساختمان رأسی (تصویر۱-۵) در مرحله اسپوروزوآیت و مروزوآیت[9] تمام جنس‌های پلاسمودیوم، پیروپلاسما و کوکسیدیا (و ارگانیسم‌های وابسته) دیده می‌شود (۸۵،۴). ساختمان رأسی در بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی از یک یا دو حلقه قطبی (Polar ring) با تراکم الکترونی در انتهای قدامی سلول، یک کونوئید (Conoid) که کونوئید در برخی از کوکسیدیاها دیده می‌شود، دو یا تعداد بیشتری روپتری[10] که در میان حلقه قطبی قرارگرفته‌اند. میکروتوبول‌های زیر غشایی از حلقه قطبی به‌موازات محور طولی سلول امتداد می‌یابند و به نظر می‌رسد عمل آن‌ها محافظت از سلول هست. میکرونم‌ها[11] به‌موازات روپتری‌ها قرارگرفته‌اند

---

[1] - Sporozoea
[2] - Coccidia
[3] - Piroplasmia
[4] - *Eimerina*
[5] - *Haemosporina*
[6] - *Eimeridae*
[7] - *Cryptosporidae*
[8] - *Sarcocystidae*
[9] - *Merozoites*
[10] - Rhopteries
[11] - Micronemes

و اغلب با آن‌ها، در قسمت رأسی سلول ادغام‌شده‌اند. روپتری‌ها و میکرونم‌ها احتمالاً ارگانل‌های ترشحی می‌باشند و عامل تسهیل در نفوذ به داخل سلول میزبان هستند(۷۹).



تصویر ۱-۵- : A : ساختمان کلی تک‌یاخته‌های خانواده اپی‌کمپلکسا، B : ساختمان بخش رأسی (۳۵) (Wikipedia.org)

۱-۸- نام‌گذاری سارکوسیستیس

نام‌گذاری بر اساس میزبان واسط و نهایی، موردپذیرش برخی از دانشمندان نیست ولی این نوع طبقه‌بندی، منحصراً برای آسانی کار خواهد بود. امروزه نام‌گذاری فوق گسترده‌تر شده و بر همین اساس مهم‌ترین گونه‌های شناسایی‌شده در سگ به‌عنوان میزبان نهایی به شرح زیر نام‌گذاری شده است:

S.bovicanis (syn: *S.cruzi*)
S.ovicanis (syn: *S.tenslla*)
S.capricanis
S.porcicanis (syn: *S.miescherina*)
S.equicanis (syn. *S.bertrami*)
S.fayeri (horse/dog)

و آن‌هایی که گربه میزبان نهایی آن‌ها است، شامل گونه‌های زیر هست:

*S.bovifelis (*syn: *S.hirsuta)*
S.ovifelis (syn: *S.tenella)*
S.porcifelis

انسان نیز میزبان چندین گونه هست:

S.bovihominis (syn: *S.fusiformis*)

S.meischeriana (syn: *S.suihominis*)
S.lindemanni

که *سارکوسیست لیندمانی*، انسان میزبان واسط آن بوده و تعدادی از گونه‌های ناشناس نیز وجود دارند، که عامل بی‌اشتهایی، استفراغ و اسهال می‌باشند (۷۸،۴۸).

گونه‌های سارکوسیستیس انگل‌های تک‌یاخته‌ای درون سلول اجباری با دو میزبان بوده که چرخه زندگی آن‌ها مبتنی بر شکار (میزبان واسط) و شکارچی (میزبان قطعی) هست (۲۴،۱). تمایز گونه‌ها در ساختار دیواره کیست با میکروسکوپ الکترونی قابل‌تشخیص هست (۱۶).

- **سارکوسیستیس در گوسفند:**

گوسفند به چهار گونه سارکوسیستیس مبتلا می‌شود دو گونه پاتوژنیک که توسط میزبان نهایی سگ منتقل‌شده و حاوی کیست‌های میکروسکوپی می‌باشند و عبارت‌اند از:

Sarcocystis tenella (syn. S.ovicanis)
Sarcocystis arieticanis

دو گونه غیر پاتوژنیک که توسط میزبان نهایی گربه منتقل‌شده و دارای کیست‌های ماکروسکوپی می‌باشند عبارت‌اند از:

Sarcocystis gigantea(syn.s.ovifelis)
Sarcocystis medusiformis

- **سارکوسیستیس در بز:**

چهار گونه سارکوسیستیس در بز گزارش‌شده است که عبارت‌اند از :

S.capraccanis
S.hircicanis
S.caprafelis
S.moulei

که دو گونه *سارکوسیستیس کاپراکنیس* و *سارکوسیستیس هیرسی‌کنیس*، ایجاد کیست‌های میکروسکوپی و گونه *سارکوسیستیس کاپرافلیس*، ایجاد کیست‌های ماکروسکوپی در میزبان واسط می‌نماید و گونه *سارکوسیستیس کاپراکنیس* پاتوژن بوده و ایجاد بیماری و عوارض می‌نماید (۷۴،۶۶،۱۶).

- **سارکوسیستیس در گاو:**

گاو نیز به سه گونه سارکوسیستیس مبتلا می‌شود که عبارت‌اند از :

S.cruzi(Syn.S.bovicanis)
S.hirsota(Syn.S.bovifelis)

S.hominis(Syn.S.bovihominis)

دو گونه *سارکوسیستیس کروزی* و *سارکوسیستیس هومینیس* به ترتیب ایجاد بیماری دالمنی در گاو و بیماری گوارشی در انسان می‌کنند (۳۲،۲۴،۴). در انتها برخی از گونه‌های سارکوسیستیس که در دام‌های اهلی و انسان وجود دارند، ذکر می‌گردد که عبارت‌اند از :

۱- *S.cruzi* (گاو میزبان واسط، سگ و روباه میزبان نهایی)

۲- *S.hominis* (گاو میزبان واسط، انسان میزبان نهایی)

۳- *S.hirsuta* (گاو میزبان واسط، گربه میزبان نهایی)

۴- *S.tenella* (گوسفند میزبان واسط، سگ و روباه میزبان نهایی)

۵- *S.capracanis* (بز میزبان واسط، سگ میزبان نهایی)

۶- *S.porcihominis* (خوک میزبان واسط، انسان میزبان نهایی)

۷- *S.lindemanni* (انسان میزبان واسط، میزبان نهایی نامشخص)

۸- *S.bertrami* (اسب میزبان واسط، سگ میزبان نهایی)

۹- *S.bovifelis* (گاو میزبان واسط، گربه میزبان نهایی)

۱۰- *S.neurona* (اسب میزبان واسط، میزبان نهایی نامعلوم)

۱۱- *S.fusiformis* (بوفالو میزبان واسط، سگ میزبان نهایی)

۱۲- *S.lerinei* (بوفالو میزبان واسط، سگ میزبان نهایی)

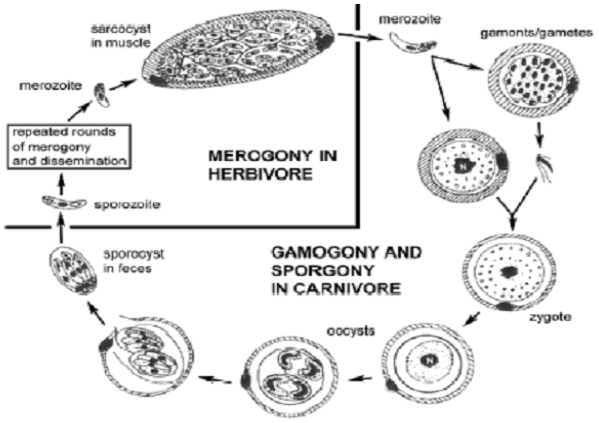
جدول ۱-۱- : میزبان اختصاصی، سایز کیست، پاتوژنسیته و پراکندگی گونه‌های سارکوسیست در حیوانات اهلی (۷۴)

میزبان واسط	گونه سارکوسیست	اندازه کیست	میزان پاتوژنسیته برای میزبان واسط	میزبان نهایی	پراکندگی
گوسفند	*S.tenella*	≤700µm	زیاد	سگ‌سانان	تمام جهان
	S.arieiticanis	≤900µm	متوسط	سگ	شاید تمام جهان
	S.gigantea	≤10mm	غیر پاتوژن	گربه	تمام جهان
	S.medusiformis	≤8mm	غیر پاتوژن	گربه	استرالیا-نیوزلند-ایران
گاو	*S.cruzi*	≤500µm	زیاد	سگ سانان-راکون	تمام جهان
	S.hirsuta	≤8mm	کم	گربه‌سانان	شاید تمام جهان
	S.hominis	≤950µm	کم	پریمات ها	اروپا-برزیل-شاید قسمت‌های دیگری از جهان
بز	*S.capracanis*	≤1mm	زیاد	سگ‌سانان	شاید قسمت‌هایی از جهان
	S.hircicanis	≤2.5mm	متوسط	سگ	اروپا-آسیا
	S.moulei	≤12mm	غیر پاتوژن	گربه	اروپا -آسیا-آفریقا
	S.caprifelis	-	-	گربه	یونان
شتر	*S.cameli*	≤390µm	نامشخص	سگ	آسیا-آفریقا
گاومیش	*S.levinei*	≤1.2mm	متوسط	سگ	شاید همه کشورها
	S.fusiformis	≤32mm	غیرپاتوژن	سگ	شاید همه کشورها
اسب	*S.neurona*	-	زیاد	نامشخص	آمریکا
	S. bretrami	-	-	-	-
خوک	*S.miescheriana*	≤1.5mm	زیاد	سگ سانان-راکون	شاید تمام جهان
	S.suihominis	≤1.5mm	زیاد	پریمات ها	اروپا-آسیا
	S.porcifelis	-	نامشخص	گربه	USSR
مرغ	*S.horvathi*	≤980µm	نامشخص	نامشخص	شاید تمام جهان

۱-۹- چرخه زندگی سارکوسیستیس

میزبان نهایی یک هفته پس از خوردن بافت‌های آلوده به سارکوسیست، اووسیست‌های اسپوروسیت شده یا اسپوروسیست را دفع می‌کند. میزبان واسط با خوردن اووسیست‌های اسپورله شده یا اسپوروسیت دفع شده از میزبان نهایی همراه با غذا و یا آب آلوده، آن‌ها را وارد دستگاه گوارش خود می‌کنند. در داخل روده باریک میزبان واسط تحت تأثیر ترشحات دستگاه گوارش (آنزیم‌های گوارشی و مایع صفرا) اسپوروزوایت‌ها آزاد می‌شوند این‌ها مخاط روده‌ای را پاره و وارد آرتریول‌ها (شریان‌های

باریک) و غدد لنفاوی دیواره روده باریک می‌شوند، هرکدام از این اسپوروزوایت‌ها با تقسیم چندتایی[1] اولین شیزونت[2] را به وجود می‌آورند پس‌ازاین که شیزونت اولیه به وجود آمد نهایتاً این شیزونت‌ها پاره و تعداد زیادی مروزوایت از هرکدام از شیزونت آزاد می‌شوند و وارد گردش خون می‌شوند و در سرتاسر بافت پوششی (اندوتلیوم) مویرگ‌ها دومین سری شیزونت (شیزونت ثانویه) را به وجود می‌آورند. مروزوایت‌های آزادشده از دومین شیزونت‌ها در داخل سلول‌های تک‌یاخته‌ای در خون گردش می‌کنند (تصاویر۱-۶و۱-۸). مروزوایت‌های حاصل از دومین و سومین شیزونت‌ها به داخل سلول‌های عضلانی، سلول‌های مغزی و سلول‌های گلیا[3] در مغز نفوذ می‌کنند و در آنجا تشکیل کیست می‌دهند. این کیست‌ها بافتی شامل یک یا دو فرم انگل می‌باشند که به آن‌ها متروسیت[4] گفته می‌شود هرکدام از این متروسیت‌ها برای تولید کیست عفونی شروع به تقسیم شدن می‌کنند و تعداد زیادی برادی‌زوآیت[5] را به وجود می‌آورد و در این حالت کیست‌های عفونی سارکوسیست به وجود می‌آید. این کیست‌های عفونی ۲ تا ۳ ماه بعد از خوردن اووسیست‌ها اسپوروله شده یا اسپوروسیت‌ها توسط میزبان واسط به وجود می‌آیند مرحله جنسی انگل در داخل بدن میزبان نهایی است که در آن گامت نر و گامت ماده به وجود می‌آیند و باعث تخریب سلول‌های پوششی دستگاه گوارش می‌شوند که هضم و جذب سلولی را در بدن میزبان مختل می‌کنند و در این مرحله سم سارکوسیستین را نیز تولید می‌کنند که در این مرحله بسته به‌شدت بیماری و حساسیت فردی علائم فرق می‌کند (۸۵،۶،۴).

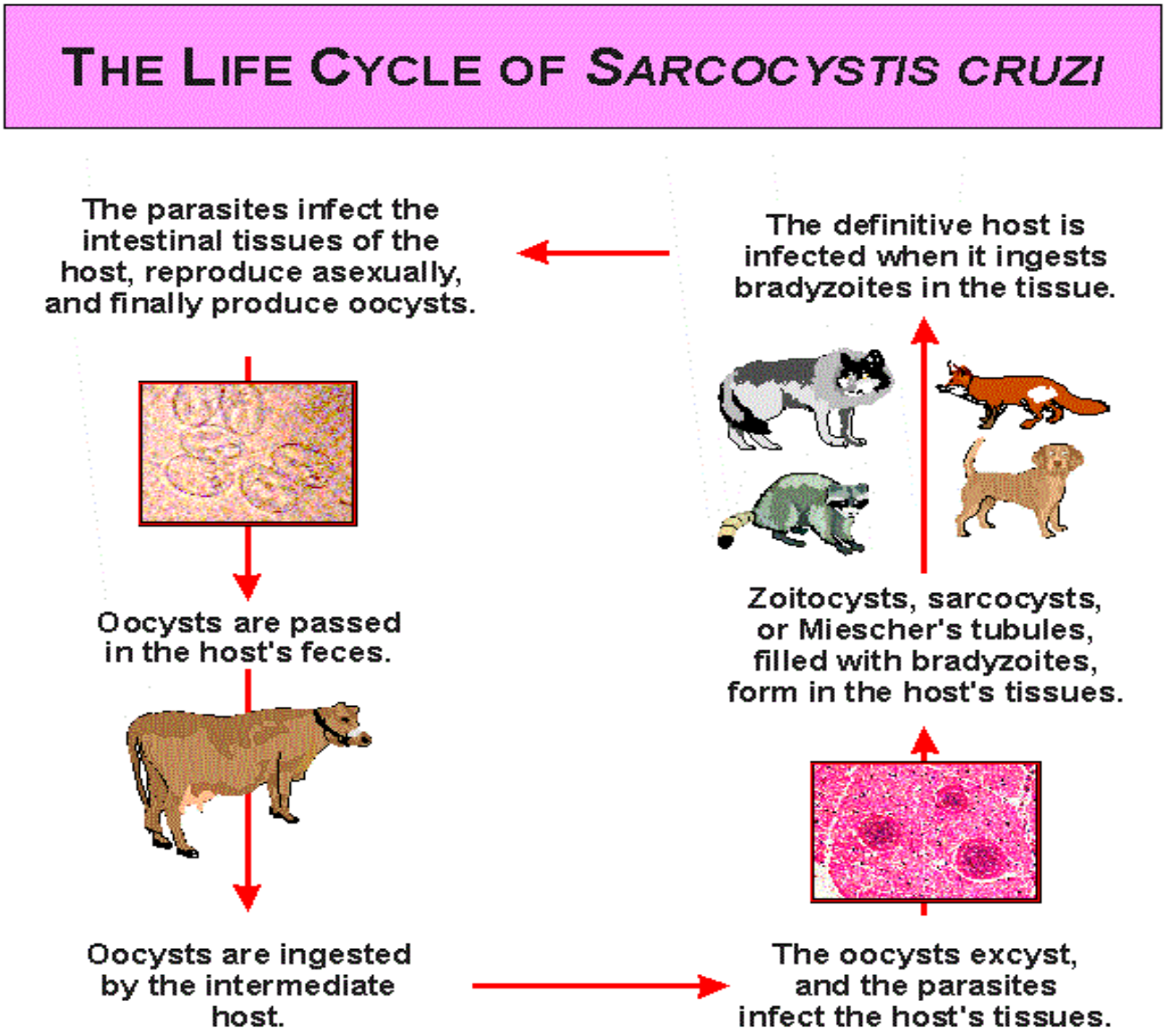


تصویر ۱-۶- : چرخه کلی تک‌یاخته سارکوسیت، در شکل روبرو مرحله جنسی و غیرجنسی در سیر تکاملی سارکوسیست به‌صورت جداگانه مشخص‌شده است (۴۰).

---

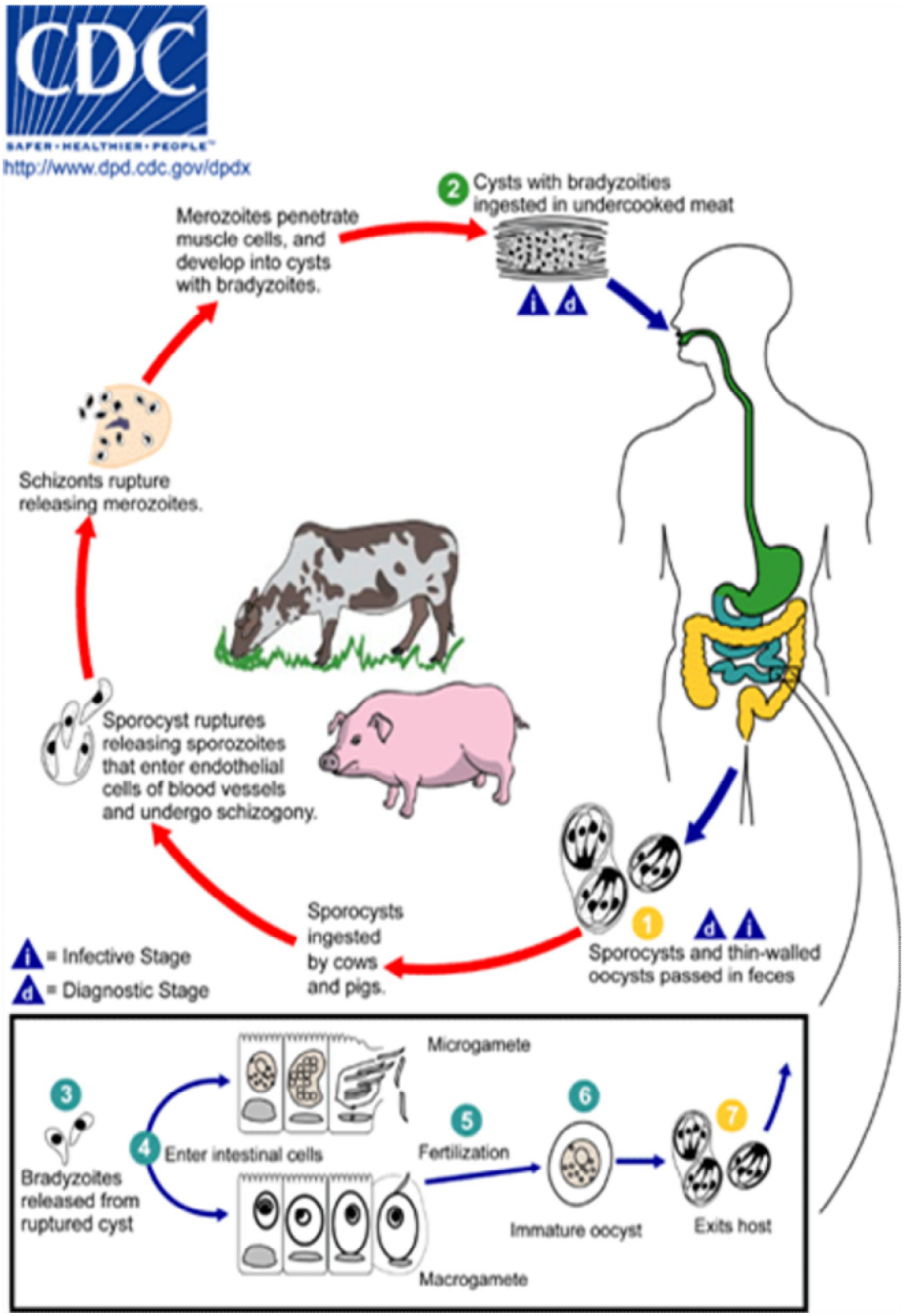
[1] - Multiplefission
[2] - Shizonts
[3] - Gelia
[4] - *Metrocyte*
[5] - *Bradyzoite*

(Refrense:Life cycle of sarcocystis)



(Pathobia. Sdu. Edu. Cn)

تصویر ۱-۷- : چرخه زندگی *سارکوسیستیس کروزی* در گاو (۴۲)



تصویر ۱-۸- : چرخه زندگی سارکوسیست (۴۸)

۱-۱۰- بیماری‌زایی سارکوسیستیس در میزبانان واسط

آلودگی به انگل سارکوسیستیس در طیف وسیعی از دام‌های اهلی در کشورهای مختلف جهان گزارش‌شده است. بررسی‌های انجام‌گرفته در کشور ما، فراوانی آن در برخی گونه‌های دامی را مشخص نموده است. یکی از مهم‌ترین موارد اهمیت این آلودگی وجود پروتئین سمی به نام سارکوسیستین هست که وجود آن در گوشت‌های آلوده به کیست‌های این انگل موجب بروز نگرانی‌های فراوانی برای مصرف‌کنندگان گردیده است. سمیت این پروتئین سمی در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه از بین می‌رود (۱۶).

بیماری طبیعی و تجربی در گوسفند و گوساله، همراه با بی‌اشتهایی، تب، لاغری، کم‌خونی و سقط‌جنین هست. در گوساله‌ها که به‌طور تجربی آلوده شدند، بین روزهای ۱۰ الی ۲۴ پس از آلودگی، درجه حرارت به بالای ۴۱-۴۰ درجه سانتی‌گراد رسیده و در ۲۹ الی ۵۷ روزگی کم‌خونی خفیف (هماتوکریت به ۴۰ درصد تعداد اولیه کاهش یافت) دیده‌شده است. در گاوهایی که به‌شدت با سارکوسیستیس کروزی آلوده‌شده‌اند، نشانه‌های بالینی شامل تب، بی‌اشتهایی، لاغری مفرط، کاهش تولید شیر، اسهال، اسپاسم عضلانی، کم‌خونی، افزایش تحریک‌پذیری، بی‌حالی و تلفات دیده می‌شود. گاوهایی که در سه‌ماهه اول آبستنی آلوده‌شده‌اند، ممکن است سقط کنند. سارکوسیستیس در گروهی از گاوهای پرواری نیز با موریختگی موشی ناحیه دم همراه است. گاوها بعد از بهبود شکل حاد بیماری، رشد مطلوبی نداشته و درنهایت در اثر لاغری مفرط می‌میرند (۱۳).

در میزبان واسط، اثر بیماری‌زایی اصلی به دومین مرحله شیزوگونی در اندوتلیوم رگ‌های خونی نسبت داده می‌شود (۲۰) و شدت بیماری به تعداد اسپوروسیست‌های خورده شده و سیستم ایمنی میزبان واسط بستگی دارد (۵۱).

بیماری مزمنی که به‌طور طبیعی در گاو روی می‌دهد، بیماری دالمنی[1] نام دارد. در آلودگی‌های تجربی گاوهای بالغ، سقط‌جنین نیز دیده‌شده است. همچنین در این بیماری لاغری، ادم زیر فکی، زمین‌گیر شدن، اگزوفتالمی نیز دیده می‌شود (۴).

در میش‌ها سقط‌جنین و تورم عضلات، در بره‌ها تورم مغز و نخاع دیده می‌شود (۲۰) همچنین تولد زودهنگام بره‌ها و مرگ جنین نیز یکی دیگر از علائم بیماری و بیماری‌زایی انگلی هست (۸۶،۴).

---

[1] - Dalmeny disease

به‌هرحال، در این آلودگی، نشانه‌های بالینی کم دیده می‌شود و مهم‌ترین اثر آن ضبط لاشه و بی‌ارزش شدن لاشه‌ها و نیز خسارات اقتصادی ناشی از آن است (۲۰،۹).
عفونت‌های اولیه در گونه‌های بیماری‌زا در گوسفند وارد مرحله حاد سارکوسیستی شده و منجر به آنسفالیت، آنسفالومیلیت، خونریزی و حتی مرگ در گوسفندان می‌شود (۸۵).

۱-۱۱- بیماری‌زایی سارکوسیستیس در میزبانان نهایی

آلودگی در میزبان نهایی، معمولاً غیر بیماری‌زا است، هرچند که گاهی اسهال خفیف از میزبان نهایی گزارش‌شده است (۲۰).

۱-۱۲- بیماری‌زایی و علائم در انسان

انسان ممکن است در اثر خوردن گوشت نپخته و نیم‌پز و یا اسپوروسیست به‌عنوان میزبان نهایی و واسط به اسهال، آلرژی، شکم‌درد، میوزیت ائوزینوفیلیک، ائوزینوفیلی در خون محیطی، نفخ، تهوع، کم‌اشتهایی، استفراغ، مشکل تنفسی و شدید شدن نبض مبتلا شود. در همین حال واکنش‌های فردی متفاوت بوده و بسته به دریافت برادی‌زوئیت‌ها یا اسپوروسیست‌ها متفاوت هست (۴۸،۳۹).

۱-۱۳- ضایعات کالبدگشایی

خونریزی پتشی یا خونریزی‌های نقطه‌ای تقریباً در تمام اندام‌ها همچون قلب، همراه با ناراحتی‌های عمومی غدد لنفاوی دیده می‌شود. میوزیت التهاب قلبی نیز در کالبدگشایی دیده‌شده است (۴۸).

۱-۱۴- نشانه‌های بالینی

در آلودگی‌های سنگین میزبانان واسط، بی‌اشتهایی، تب، کم‌خونی، کاهش وزن و عدم تمایل به حرکت و گاهی زمین‌گیر شدن حیوان وجود دارد. در بره‌ها حالت ویژه‌ای مانند نشستن سگ، گزارش‌شده است. در گاوها غالباً ریزش مو از ناحیه قاعده دم وجود دارد، که ممکن است با بزرگ شدن غدد لنفاوی همراه باشد. سقط در دام‌ها نیز از نشانه‌های بالینی سارکوسیستیس هست (۲۰). ریختن پشم یا مو، شکستگی، کاهش یا توقف رشد، آتروفی عضلانی، بی‌حالی و ضعف نیز از دیگر علائم بالینی سارکوسیستیس گزارش‌شده است (۴۸).

ازنظر بالینی به دو شکل روده‌ای و عضلانی بروز می‌کند. سارکوسیستیس در بدن میزبان نهایی انگل لوله گوارش و در بدن میزبان واسط به‌صورت انگل عضلات هست. تشخیص به یک ارزیابی دقیق در گله و ارتباط آن با سگ‌ها و گربه‌ها با نشانه‌های بالینی، ردیابی آنتی‌بادی‌های خونی و معاینات هیستوپاتولوژیکی ارگان‌ها ازجمله کلیه‌ها، کبد، طحال، عضلات، طناب نخاعی و غدد لنفاوی قرار دارد. چنانچه میزبان نهایی سارکوسیستیس سگ باشد کیست‌های ایجادشده در عضلات میزبان واسط یا شکار شونده کمتر از ۵۰۰ میکرون (میکروکیست) و قابل‌رؤیت با چشم نیست. چنانچه میزبان نهایی گربه‌سانان باشند کیست‌های ایجادشده در عضلات میزبان واسط بیش از ۵۰۰ میکرون (ماکروکیست) و با چشم قابل‌رؤیت است (۸۵،۴).

معمولاً این تک‌یاخته در سگ و گربه به روده محدود می‌شوند و بندرت به دلیل ضعف سیستم ایمنی ممکن است سایر بافت‌ها هم مورد هجوم قرار گیرد. شیزوگونی در آندوتلیال سرخرگ‌ها و مویرگ‌ها موجب خونریزی‌های پراکنده و آنمی می‌گردد. تب نیز هم‌زمان با پارازیتمی دیده می‌شود. در آلودگی تجربی علائم با تکامل شیزونت مرحله اول و شیزونت مرحله دوم همراه است. علائم دیگر شامل : بی‌اشتهایی، بی‌قراری، ریزش مو به‌ویژه در ناحیه دم ، کاهش وزن، کاهش تولید شیر، افزایش ترشح بزاق، سقط‌جنین و در آلودگی‌های شدید مرگ را نیز به دنبال دارند. سارکوسیستیس کروزی موجب بیماری دالمنی در گاو می‌شود. در سال ۱۹۸۶ مارکوس این بیماری را موردبحث قرار دارد و مشخص شد به علت تخریب آندوتلیال مویرگ‌ها و خصوصیات آنمی همولیتیک ناشی از ایمنی تظاهراتی به‌این‌ترتیب در گاو ایجاد می‌شود: ابتدا موجب بروز تب زودگذر در دوران پارازیتمی، قطع اشتها، تورم غدد لنفاوی، به‌خصوص غده لنفاوی چشمی (اگزوفتالمی) و درنهایت ایجاد بطری (ادم) زیر فکی می‌شود. حیوان مبتلا از نور می‌ترسد (فتوفوبیا) و دچار لاغری و فرسودگی می‌شود و موهای انتهای دم به‌تدریج می‌ریزد که این مرحله، مرحله آخر بیماری است و به این حالت، دم‌موشی[1] گفته می‌شود (۱۶،۹).

سارکوسپوریدوز یک حالت تحت بالینی است زیرا دام‌ها معمولاً تعداد زیادی از اسپوروسیست‌ها را یک‌باره نمی‌خورند. گونه‌های سارکوسیستیس درشدت بیماری تعیین‌کننده است. در گاو آلوده، تب، بی‌اشتهایی، کاهش وزن، کاهش تولید شیر، اساسم عضلانی، اسهال، ضعف و کم‌خونی و گاهی مرگ مشاهده می‌شود. سقط‌جنین در برخی موارد رخ می‌دهد (۱۶).

---

[1] - Rat tail

سارکوسیستیس تنلا در گوسفند باعث سقط‌جنین و در بره‌ها تورم مغز و ماهیچه می‌شود. سارکوسیستوزیس اغلب کشنده نیست. آلودگی به این انگل معمولاً تحت درمانگاهی است و معمولاً یک عفونت بدون علامت است. این انگل در تمام دنیا پراکنده است و در آلودگی شدید، لنگش، ضعف و فلجی ممکن است ظاهر شود. خسارات عمده حاصل از این انگل به دلیل تولید کیست‌های ماکروسکوپی است که موجب ضبط موضعی یا عمومی لاشه می‌گردد. در آلودگی شدید و در مواردی سقط‌جنین در گله‌های آلوده دیده می‌شود (۴و۶).

۱-۱۵- اپیدمیولوژی

نکات چندانی از اپیدمیولوژی، شناخته‌نشده است ولی از فراوانی آلودگی مشخص است که جاهایی که سگ‌ها و گربه‌ها با حیوانات مزرعه یا غذای آن‌ها در ارتباط هستند، احتمال آلودگی و انتقال فراهم می‌شود. ثابت شده است که سگ‌های گله، در انتقال سارکوسیستیس اوی‌کنیس نقش عمده‌ای دارند. طول عمر اسپوروسیست‌های دفع شده در مدفوع، هنوز شناخته‌نشده است (۲۴،۲۰). این تک‌یاخته انتشار جهانی داشته و از اکثر کشورهای جهان گزارش‌شده است (۲۴).

۱-۱۶- کنترل

عملی‌ترین راه کنترل سارکوسیستوزیس، کشتار دام‌ها در کشتارگاه‌های بهداشتی و جلوگیری از تماس میزبانان نهایی با بافت‌های آلوده به کیست هست. همچنین دقت در سالم‌سازی گوشت‌های آلوده به سارکوسیست از راه حرارت دادن و انجماد گوشت‌ها، می‌تواند از آلودگی انسان و حیوانات گوشت‌خوار جلوگیری نماید. استفاده از روش‌های انجماد در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷ روز موجب برطرف شدن آلودگی در گوشت‌های مصرفی می‌شود (۴). گوشت‌های پخته‌شده در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه منجر به از بین رفتن کیست‌های سارکوسیستی می‌شود (۳۹،۲۴). پختن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه نیز جهت جلوگیری از آلودگی توصیه می‌شود. همچنین منجمد کردن در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد برای ۴۸ ساعت و ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت منجر به از بین رفتن برادی‌زوئیت‌ها نیز می‌شود (۴۸).

۱-۱۷- تشخیص سارکوسیستوزیس

۱- تهیه مقاطع میکروسکوپی: در این روش مقاطع میکروسکوپی تهیه‌شده جهت تشخیص کیست‌های میکروسکوپی آزمایش می‌گردد. در کیست دوجداره وجود دارد یکی دیواره اولیه[1] که همان جداره سلول عضلانی است که اجرام در داخل آن رشد کرده‌اند و دیگری دیواره ثانویه[2] است که در حقیقت واکنش حفاظتی میزبان در مقابل کیست است. از میکروسکوپ نوری برای مشاهده دیواره ثانویه و از میکروسکوپ الکترونی برای مشاهده دیواره اولیه (برای تشخیص گونه) استفاده می‌گردد (۲۱).

۲- استفاده از ایزو آنزیم: با گرفتن عصاره کیست و بردن آن روی ژل الکتروفورز مقایسه با شاهد می‌توان گونه سارکوسیستیس را مشخص نمود (۲۱،۱۶).

۳- روش هضمی[3]: هضم بافت میزبان، حساس‌ترین روش جهت آشکارسازی در آلودگی‌های کم و یا آلودگی با اشکال میکروسکوپی سارکوسیستیس است. در این روش حدود ۵۰ گرم از بافت عضلانی چرخ شده در ۱۰۰ سی‌سی محلول هضمی (پودر پپسین به میزان ۶ گرم، اسیدکلریدریک ۱۰ سی‌سی و آب مقطر ۶۰۰ سی‌سی) داخل بشر اضافه می‌گردد و پس از مخلوط نمودن در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده می‌شود. سپس محلول حاصل را روی تنظیف دو تا سه لایه ریخته، خوب صاف می‌کنیم. مایع حاصل از تخلیص به لوله‌آزمایش منتقل می‌گردد. مایع صاف‌شده داخل لوله‌آزمایش به مدت ۶ دقیقه با دور۲۰۰۰ سانتریفیوژ می‌گردد. سپس مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ دور ریخته، از رسوب حاصل بر روی لام گسترش تهیه می‌شود .لام‌های حاصل را پس از خشک‌کردن با متانول ثابت گردیده و ۳۰ دقیقه بارنگ گیمسا رنگ‌آمیزی می‌گردد. گسترش با استفاده از عدسی ۴۰ میکروسکوپ به‌منظور دیدن برادی‌زوئیت انگل بررسی می‌گردد. در صورت عدم مشاهده برادی زوئیت آزمایش جهت حصول اطمینان تکرار می‌شود (۳۳).

۴ - روش گسترش بافتی[4]: از بافت به‌اندازه یک نخود برداشته و بین یک پنس قرار داده و مقطع آن را بریده و مانند عمل مهر زدن روی لام فشار داده و در هر بار فشار دادن یک دایره نازکی از بافت روی سطح لام می‌چسبد که در صورت آلودگی بافت با پاره نمودن جداره آن مروزوایت‌ها در این

---

[1] - Primary cyst wall
[2] - Secondary cyst wall
[3] - Peptic digestion method
[4] - Dab Smear method

مقطع رهاشده و به لام می‌چسبند که سپس بارنگ آمیزی گیمسا می‌توان آلودگی سارکوسیستیس را مشخص نمود. برای نمونه‌برداری عضلات مری، دیافراگم، بین دنده‌ای و قلب بهترین نواحی برای نمونه‌برداری است (۲۹).

۵ – تشخیص سرم‌شناسی: آنالیز ایمنوبلات سرم و مایع مغزی نخاعی اطلاعاتی را درزمینه آلودگی با سارکوسیستیس نرونا در اختیار قرار می‌دهد در این تست از کشت مروزوئیت ها برای تشخیص پادتن‌هایی استفاده می‌شود که مستقیماً علیه پروتئین‌های مختص سارکوسیستیس نرونا ایجاد می‌شود (۶).

۶ – روش PCR[1]: این روش یا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکنیکی است که با استفاده از آن می‌توان در مدت‌زمان کوتاهی قطعه خاصی از مولکول DNA را در شرایط آزمایشگاهی میلیون‌ها بار تکثیر نمود. این قطعه DNA ممکن است یک ژن، بخشی از یک کروموزوم یا بخش‌هایی از ژنوم یک موجود باشد البته در تکثیر DNA با روش PCR محدودیت‌هایی نیز وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها اندازه قطعات قابل تکثیر هست به‌طوری‌که حداکثر اندازه قطعه‌هایی که با روش PCR معمولی تکثیر می‌گردد ۵ هزار نوکلئوتید (۵ کیلودالتن)و درروش بهینه‌شده تا ۲۰ هزار نوکلئوتید (۲۰ کیلودالتن) هست.

پس PCR مانند یک دستگاه فتوکپی عمل می‌کند که به‌وسیله آن می‌توان صفحاتی از کتاب ژنوم هر موجود را به تعداد دلخواه و مشابه نسخه اصلی (البته در مواردی همراه با خطاهایی جزئی) تکثیر نمود. در یک واکنش PCR از نمونه DNA ، آنزیم Taq Polymerase – پرایمرها – بافر– یون منیزیم – نوکلئوتیدها و آب استفاده می‌شود (۵۱).

۷ – PCR-RFLP[2]: مشخص شده است که ژنوم موجودات به‌طور طبیعی دارای تفاوت‌هایی در ردیف بازهای خطی می‌باشند. این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می‌شود، چندشکلی ژنتیکی[3] نام دارد. اگر این چندشکلی در ردیف بازهای DNA در جایگاه شناسایی آنزیم محدودکننده ایجاد شده باشند به‌راحتی قابل‌ردیابی است. وجود الگوهای غیر یکسان که براثر هضم آنزیمی یک ناحیه خاص از DNA به‌وسیله آنزیم‌های محدودکننده مشخص می‌شود. این الگوهای غیر یکسان به علت تفاوت DNA بسته به حضور و عدم حضور جایگاه آنزیم‌های محدودکننده به

---

[1] - Polymerase Chain Reaction
[2] - Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism
[3] - genetic polymorphism

وجود می‌آید. آنزیم‌های برشی دسته‌ای از آنزیم‌های آندونوکلئاز به شمار می‌روند که یک ردیف اختصاصی از بازها را در درون مولکول DNA دو رشته‌ای شناسایی می‌کنند. در اینجا برای تعیین گونه انگل، ابتدا قطعه ژن ۱۸s rRNA حاوی جایگاه چندشکلی را با واکنش زنجیره پلی مراز و استفاده از دو پرایمر مخصوص که به همین منظور طراحی شده است تکثیر می‌نمایند و پس از هضم آنزیمی، الکتروفورز می‌کنند. با توجه به محل برش آنزیم‌های محدودکننده، گونه انگل سارکوسیستیس مشخص می‌شود (۹۲،۹۳).

۸ - (روش آنتی‌بادی فلورسنت غیرمستقیم) IFAT[1] : تهیه مقاطع بافتی به روش هیستولوژی در تشخیص میکروکیست‌ها نیز مفید می‌باشند (۷). البته روش‌های سرولوژیکی در حالت مزمن بیماری مؤثر هست (۳۷). برای تشخیص اسپوروسیست‌های انگل در مدفوع میزبان‌های نهایی روش‌های آزمایش مدفوعی توصیه می‌گردد (۴) همچنین روش IFAT نیز برای بررسی مرحله روده‌ای میزبان نهایی انجام‌پذیر هست (۷).

۱-۱۸- ایمنی

حیواناتی که از اولین آلودگی با سارکوسیستیس زنده می‌مانند ممکن است ایمنی را حاصل کرده و قادر به محافظت از خود در برابر بیماری حاد سارکوسیستیس باشند که ناشی از گونه‌های غیر پاتوژن (همولوگوس) انگل هست. اما با گونه‌های حاد (هترولوگوس) وپاتوژن ایمنی به وجود نمی‌آید(۲۱). پس از طی ۵-۳ هفته بعد از تلقیح به‌صورت تجربی با گونه‌های متفاوت تولید آنتی‌بادی‌های IgG شروع می‌شود ایمنوگلوبین نوع IgM زودتر از IgG ظاهر می‌شود ولی دوام کمی دارد. آنتی‌بادی‌های نوع IgA و IgA2 تولید نمی‌شود (۲۴).

۱-۱۹- درمان

تاکنون موفقیت کمی در رابطه با درمان سارکوسیستوزیس به‌دست‌آمده است ولی داروهای ضد کوکسیدیایی احتمالاً میزان آلودگی را در میزبانان واسط کاهش می‌دهند. داروهایی از قبیل آمپرولیوم (به مقدار ۱۰۰mg/kg)، سالینومایسین (به مقدار۲mg/kg-۱)، مونسین (به مقدار ۴۰mg/kg-۳۰) تاکنون برای درمان سارکوسیستوزیس استفاده‌شده‌اند (۲۴،۲۱).

---

[1] - Indirect Fluorescent Antibody Test

۱-۲۰- بیان مسئله

گوسفند ممکن است به‌وسیله چهار گونه سارکوسیستیس آلوده شود که عبارت‌اند از: سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی کنیس که این دو گونه پاتوژن هستند و سارکوسیستیس ژیگانته آ و سارکوسیستیس مدیوزیفورمیس که دو گونه اخیر غیر پاتوژن می‌باشند. دو گونه سارکوسیست تنلا و آریتی کنیس ممکن است باعث سقط‌جنین یا عفونت حاد در گوسفندان شود. سارکوسیستیس ژیگانته آ و سارکوسیستیس مدیوزیفورمیس توسط گربه‌سانان انتقال می‌یابند و بیماری‌زا نیستند، ولی سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی کنیس ک توسط سگ‌سانان منتقل می‌شوند بیماری‌زا هستند (۸۶،۷۰،۴۴). برخی گونه‌ها باعث سقط‌جنین، کاهش تولید وزن و شیر، کم‌خونی و حتی مرگ در میزبانان واسط می‌شود. سارکوسیستیس ازنظر بالینی به دو شکل روده‌ای و عضلانی بروز می‌کند. در بدن میزبان نهایی انگل لوله گوارش و در بدن میزبان واسطه به‌صورت انگل عضلات هست (۴۲). سارکوسیست ها را می‌توان به‌وسیله بازرسی ماکروسکوپی، رنگ‌آمیزی با متیلن بلو، بررسی بافت‌شناسی و یا روش هضمی در عضلات تشخیص داد (۷۰). امروزه برای تشخیص سارکوسیستیس از روش‌های مولکولی استفاده می‌شود از این روش حتی برای تشخیص آلودگی در دام زنده هم می‌توان استفاده کرد (۵۱). هدف از مطالعه حاضر استفاده از یک روش مولکولی بوده که یک روش حساس و اختصاصی برای شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس مربوط به کیست‌های بزرگ در گوسفندان از طریق تکثیر ژن sus rRNA[1] (بخشی از ژن ۱۸s rRNA) انگل موردمطالعه بوده است. این ژن برای تشخیص گونه‌های مختلف کاملاً اختصاصی است. بر اساس مطالعات sus rRNA برای گونه‌های سارکوسیستیس بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا درختی ترسیم گردیده است بدین ترتیب که گونه‌های سارکوسیستیس بیماری‌زای منتقله از سگ‌سانان به‌عنوان یک گروه مجزا و متفاوت از گونه‌های سارکوسیستیس غیر بیماری‌زای منتقله از گربه‌سانان معرفی‌شده‌اند (۸۶). بر همین اساس آزمایش PCR مبتنی بر تکثیر این ژن از کارآمدی خوبی برای تشخیص گونه‌های انگل برخوردار است و چون اختلاف کمی بین گونه‌های مختلف انگل وجود دارد. لذا با انتخاب آنزیم مناسب و انجام RFLP می‌توان گونه‌های مختلف انگل را شناسایی کرد (۹۲). علاوه بر این محققین با مقایسه ترادف sus rRNA نشان دادند که گونه‌های جنس سارکوسیستیس و توکسوپلاسما اصل مشترکی دارند (۵۸). ازآنجایی‌که این مطالعات همگی بر اساس مطالعه sus rRNA بود به همین

[1] -Small Unit Site rRNA

دلیل در این مطالعه نیز قطعه ژن ۱۸s rRNA برای تعیین گونه‌های سارکوسیستیس گوسفندی انتخاب شد.

۱-۲۱-اهداف ویژه

- هدف اصلی:

شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس در گوسفندان از طریق تکثیر ژن ۱۸s rRNA .

- هدف فرعی:

تعیین فراوانی گونه‌های سارکوسیستیس

- هدف کاربردی:

مطالعه حاضر می‌تواند در بخش‌های درمانی و بهداشتی ازنظر شناسایی الگوهای کنترل و پیشگیری مورداستفاده قرار بگیرد.

- جنبهٔ نوآوری و جدید بودن تحقیق:

این مطالعه در شهرستان نهاوند برای اولین بار انجام می‌شود.

فصل دوم:
ادبیات و مستندات

۲-۱- سارکوسیستوزیس در ایران

سارکوسیستوزیس بیماری زئونوزی است که عامل آن تک‌یاخته سارکوسیست، با بیش از ۱۲۰ گونه شناسایی‌شده در جهان، هست که اکثر گونه‌ها منجر به عفونت در حیوانات می‌گردد. برخی گونه‌های سارکوسیستیس در انسان باعث اختلالات گوارشی ازجمله تهوع، اسهال و استفراغ می‌شود. منشأ آلودگی در انسان خوردن گوشت نیم‌پز یا خام است (۳۵،۱). در ایران اولین تحقیقات در خصوص سارکوسپوریدیوزیس در گوسفندان در سال ۱۳۵۳ توسط افشار و همکاران بررسی گردید (۳۵).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Mirzaei و همکاران در کرمان به روش ایمپرژن اسمیر و میکروسکوپی بر روی بزهای این منطقه انجام گرفت، آلودگی درروش ایمپرژن اسمیر، ۹۸/۹۷ درصد و درروش هضمی۱۰۰ درصد عنوان شد. میزان شیوع عفونت در مری بیشتر از سایر ارگان‌ها بود. میزان عفونت یا سن ارتباطی نداشت و در جنس ماده میزان آلودگی بیشتر از نرها بود (۶۶).

در یک بررسی که در کشتارگاه شهر همدان به انجام رسید، میزان شیوع سارکوسیستیس در گوسفندان ۶/۹ درصد به روش مشاهده مستقیم عنوان‌شده است (۲۶). همچنین در بررسی دیگری که توسط قراگزلو در شهر همدان بر روی ۵۴ نفر به انجام رسید، حضور آنتی‌بادی در سرم ساکنین شهر همدان را نیز گزارش نمودند (۲۸،۲۷). در شهر سنندج میزان شیوع این آلودگی را در گوشت با روش هضمی ۹۳/۳۳ درصد عنوان کرده‌اند (۱۹).

در پژوهشی که در بوکان به روش هضمی صورت گرفت آلودگی به سارکوسیست، در گاومیش ۷۲/۵۴ درصد و در گاو ۵۶/۹۲ درصد گزارش گردید (۱۸).

در تنکابن به روش ماکروسکوپی میزان شیوع سارکوسیستیس در نشخوارکنندگان کشتاری، ۱۴/۵۵ درصد عنوان شد (۳۶).

در مطالعه دیگری که بر روی گاوهای استان تهران انجام شد ازنظر ماکروسکوپی نتایج منفی ولی ازنظر میکروسکوپی به روش هضمی ۹۷ درصد میزان آلودگی بیان شد (۶۵). همچنین در بررسی همبرگرهای تهران میزان آلودگی در سطح تهران، تنها در یک مورد آلودگی ماکروسکوپیک به کیست سارکوسیست گزارش شد اما درروش میکروسکوپیک ۵۶ نمونه آلوده تشخیص داده شدند (۱۰).

در قزوین با روش PCR گونه‌های سارکوسیستیس در گوسفندان ذبح‌شده در کشتارگاه زیاران موردمطالعه قرار گرفت. در این مطالعه کیست‌های ماکروسکوپی متعلق به سارکوسیستیس ژیگانتهآ و کیست‌های میکروسکوپی متعلق به سارکوسیستیس آریتی‌کنیس بوده‌اند این اولین گزارش تشخیص مولکولی سارکوسیستیس ژیگانتهآ و سارکوسیستیس آریتی‌کنیس در ایران است. سارکوسیستیس

آریتی‌کنیس دارای انتشار جهانی است و در عضلات مخطط گوسفندان یافت می‌شود و طول آن‌ها تا ۹۰۰ میکرومتر می‌رسد. این انگل بیماری‌زا بوده ولی شدت بیماری‌زایی آن کمتر از سارکوسیستیس تنلا است. سارکوسیستیس ژیگانتهآ نیز دارای انتشار جهانی بوده و در عضلات مری ،حنجره، زبان و تا حد کمتری دیافراگم و سایر عضلات گوسفندان یافت می‌شود و بیشتر در گوسفندان مسن‌تر دیده می‌شوند و تا یک سانتی‌متر طول دارند و دارای بیماری‌زایی خفیفی برای گوسفند است (۱۴).

همچنین در مطالعه مختاریان و همکاران که در کشتارگاه شهرکرد صورت گرفت، ۱۵/۷ درصد گوسفندان به روش ماکروسکوپی مثبت بودند و در بررسی هیستوپاتولوژی، ۸۰ درصد اندام‌های آزمایش‌شده مثبت بودند. در این مطالعه با توجه به شیوع بالای آلودگی سارکوسیستی در جهان و ایران پیشنهادشده جهت تعیین حساسیت و ویژگی روش پاتولوژی در مقایسه با سایر روش‌ها بررسی کامل‌تری صورت گیرد. در این مطالعه توجه به پخت گوشت و تغییر در نحوه نگهداری دام‌ها، از روش سنتی به صنعتی توصیه‌شده است. همچنین در این مطالعه میزان آلودگی گوسفندان نر بیشتر از ماده‌ها گزارش شد (۳۱). و در بررسی دیگری که توسط بنیادیان و مشگی در سال ۱۳۸۵ بر روی گاوهای کشتاری شهرکرد صورت گرفت در ۹۱ درصد نمونه‌ها آلودگی گزارش گردید (۳).

در مطالعه دیگری که در تبریز به روش هضمی، گسترش بافتی و ماکروسکوپی به انجام رسید، از ۴۰۰ گوسفند ذبح‌شده، نتایج زیر به‌دست آمد، با روش ماکروسکوپی از نواحی مری، ران، بازو، دیافراگم و قلب به ترتیب ۲۴/۷، ۱۶/۲، ۱۷/۷، ۲۷ و۲/۲ درصد که درمجموع ۲۷ درصد و درروش گسترش بافتی بارنگ آمیزی ۳۹/۳۳ درصد آلودگی و بدون رنگ‌آمیزی ۱۹/۳۳ درصد مشاهده شد ولی با روش هضمی ۱۰۰ درصد آلودگی مشاهده گردید. در این بررسی روش گسترش بافتی آلودگی را کم‌تر از روش هضمی نشان داد. بنابراین، روش هضمی حساس‌ترین روش آشکارسازی واقعی گوسفندان به سارکوسیستیس شناخته شد. همچنین پیشنهاد شد باید بدون توجه به نتیجه بازرسی کشتارگاهی نسبت به پخت گوشت نهایت دقت را نمود (۲).

در کشتارگاه اصفهان میزان آلودگی سارکوسیستیس به روش میکروسکوپی ۹۴/۸ درصد بیان شد (۸۲). همچنین آلودگی به این انگل از شترهای این استان نیز گزارش‌شده است (۹۰). همچنین در این مطالعه در شهرستان نقده از ۲۰۰ لاشه گوسفند و۱۸۳ لاشه بز به ترتیب ۱۳/۵ درصد و ۱۰/۳۸ درصد به روش مستقیم آلودگی مشاهده گردید (۲۱).

در مطالعه‌ای که توسط رزمی در سال ۱۳۷۹در استان گلستان میزان شیوع سارکوسیستیس را در نشخوارکنندگان اهلی ۷۳/۴ درصد عنوان داشته است (۱۶).

در کشتارگاه قائم شهرستان شهریار، ۱۰۰ درصد آلودگی، با روش هضمی مشخص گردید. این مطالعه روش هضمی را ارجح از روش هیستوپاتولوژی دانسته است، به دلیل سرعت بیشتر، ارزان‌تر بودن و استفاده کمتر از تجهیزات، بر اساس همین بررسی درروش هضمی مقدار بیشتری از نمونه‌ها موردبررسی قرار می‌گیرد (۳۰). در بررسی دیگری که در سال ۱۳۸۷ در شهرستان شهریار انجام شد، درروش گسترش تماسی ۹۲/۲ درصد و درروش هضمی ۹۹/۹ درصد آلودگی به سارکوسیست در نشخوارکنندگان کشتاری این شهرستان بیان گردید (۳۲).

در بررسی دیگری در شهرستان اردبیل توسط دریانی و همکاران در سال ۲۰۰۶ به روش ماکروسکوپی بر روی گوسفند و بوفالو، از ۲۱۱۰ گوسفند بررسی‌شده و ۳۵۷ بوفالو شیوع گونه‌های مختلف سارکوسیست در گوسفند ۳۳/۹ درصد و در بوفالو ۸/۱۲ درصد مشاهده گردید (۴۱).

در یک بررسی در شهرستان خرم‌آباد به روش ماکروسکوپی که توسط آتش پرور و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، شیوع سارکوسیستیس در گوسفند ۶/۶۷ درصد و در بز ۱۲/۲۵ درصد گزارش گردید (۳۷). همچنین در بررسی دیگری که در استان لرستان انجام شد آلودگی به سارکوسیست از ۱۸۰ نمونه موردبررسی، در ۱۱۹ مورد به روش هضمی آلودگی گزارش گردید (۳۳).

دلیمی و همکاران در سال ۱۳۸۷ در کشتارگاه تبریز، میزان آلودگی گوشت‌های بزهای آلوده به سارکوسیستیس با روش‌های ماکروسکوپی، هضمی و تهیه گسترش بافتی موردبررسی و مقایسه قرارگرفته است. در این بررسی روش هضمی، حساس‌ترین روش آشکارسازی واقعی و تعیین میزان آلودگی نشخوارکنندگان به سارکوسیستیس گزارش‌شده است. در این بررسی، روش ماکروسکوپی ۱/۷۵ درصد و روش هضمی ۱۰۰ درصد آلودگی را نشان داد (۱۳).

در مطالعه‌ای که توسط ولی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۸ به انجام رسید، از ۲۵۰ شتر کشتاری در شرق ایران (کشتارگاه مشهد) به روش ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژیک موردبررسی قرار گرفت که کلیه نمونه‌هایی که به روش ماکروسکوپیک (مشاهده‌ای) بررسی‌شده بودند، عاری از کیست گزارش گردید، ولی نمونه‌های هیستوپاتولوژیک، ۸۳/۶ درصد آلودگی به سارکوسیستیس گزارش گردید (۹۰).

۲-۲- وضعیت سارکوسیست در جهان

در طی مطالعات خارجی، در کشورهای آلمان، اسپانیا، استرالیا و ایران به ترتیب: ۸۵/۴، ۹۶، ۹۳ و ۶۱ درصد آلودگی مشاهده‌شده است (۷۴).

در مطالعه Dubey در آمریکا که به روش هضمی صورت گرفت، در کشورهای مختلف جهان، شیوع سارکوسیستوزیس در گاو و گوسفند را ۱۰۰ درصد برآورد کرده است (۴۲).

Heckeroth و همکاران در سال ۱۹۹۹ دو روش ایمنولوژیکی و مولکولی را به‌منظور تشخیص آلودگی در گوسفند مقایسه نمودند، چهار گونه سارکوسیستیس که شامل سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی‌کنیس (گونه‌های پاتوژن) و سارکوسیستیس ژیگانته‌آ و سارکوسیستیس مدیوزیفورمیس (گونه غیرپاتوژن) می‌باشند، تشخیص داده شد. در این مقاله تأکید شده است که دو گونه سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس ژیگانته‌آ در اقصی نقاط دنیا دیده‌شده اما گونه آریتی‌کنیس در اروپا، آمریکا، استرالیا و نیوزلند مشاهده می‌گردد و گونه مدیزیوفورمیس از استرالیا و نیوزلند گزارش‌شده است همچنین گونه مدیزیفورمیس در ایران نیز جداشده است (۵۱،۱۴).

در مطالعه‌ای که توسط Latif و همکاران در سال ۱۹۹۹ در کشتارگاه شهر بغداد کشور عراق بر روی گوسفند، بز، گاو، گاومیش و شتر صورت گرفت آلودگی به سارکوسیست به ترتیب به روش ماکروسکوپی ۴/۱ درصد، ۳۳/۶ درصد، ۰/۲ درصد، ۱۵/۶ درصد و صفر درصد گزارش گردید، درحالی‌که درروش میکروسکوپی به ترتیب ۹۷ درصد، ۹۷/۴ درصد، ۹۷/۸ درصد، ۸۲/۹ درصد و ۹۱/۶ درصد نشان داده شد. در این بررسی آلوده‌ترین عضو بررسی‌شده، مری و کمترین آلودگی در قلب گزارش گردید. در بررسی روش هضمی، بالاترین میزان آلودگی ۹۳/۳ درصد نشان داده شد و بعدازاین روش، روش IFA با ۸۸/۶ درصد بهترین روش‌های میکروسکوپی جهت تشخیص سارکوسیست معرفی گردید (۶۱).

Seneviratna و همکاران در سال ۱۹۷۵ که در میشیگان آمریکا گزارش داده شد، روش هضمی، روش مناسب‌تری نسبت به بقیه روش‌ها در تشخیص سارکوسیستیس هست و در این مطالعه برای اولین بار از روش Squeczing استفاده شد. اما ثابت گردید که این روش حساسیت کمتری نسبت به روش هضمی داشته اما با توجه به‌سرعت پایین، جهت شناسایی می‌توان از این روش در مقیاس بزرگ در کشتارگاه‌ها استفاده بهینه برد (۸۱).

بررسی در مورد آلودگی به سارکوسیست علاوه بر گاو، گوسفند و بز که گوشت آن‌ها مصرف انسانی دارد، در حیوانات دیگر مانند شتر، سمور آبی، خوک و سایر پستانداران کوچک صورت گرفته است (۸۴،۵۹،۴۲،۸).

چون ابتلا به سارکوسیست در انسان از طریق گوشت نیمه‌پخته صورت می‌گیرد لذا در مطالعات و بررسی‌های متعددی موردتوجه محققین بوده است. اکثر محققین به شیوع آلودگی در سطح ماکروسکوپی اکتفا کرده و کمتر به روش میکروسکوپی پرداخته‌اند لذا در این بررسی از روش تشخیصی میکروسکوپی[1] پرداخته می‌شود تا نتایج آن اهمیت موضوع را بیش‌ازپیش مشخص سازد.

[1] - Dab Smear

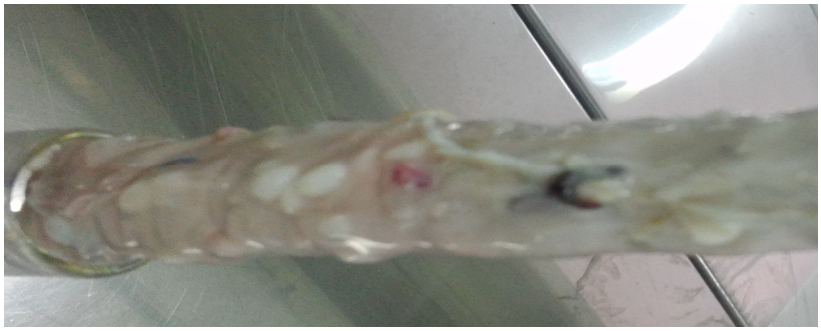
فصل سوم:

مواد و روش‌ها

۳-۱- جمع‌آوری و آماده‌سازی کیست‌ها

در بررسی حاضر، کشتارگاه شهر نهاوند انتخاب، و طی دوره دوماهه اردیبهشت و خرداد ۹۵ ، با مراجعه به کشتارگاه و هر بار ۲۵ نمونه به‌طور کاملاً تصادفی گوسفندان ذبح‌شده انتخاب و از عضلات مری و دیافراگم ۵۰ گرم نمونه‌برداری شده و در کیسه نایلونی برچسب‌گذاری و کدبندی به آزمایشگاه منتقل شد. از یک نمونه مری که دارای سارکوسیست های ماکروسکوپی بود و به‌راحتی با چشم مشاهده می‌شد، به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد (تصویر۳-۱).

.



تصویر ۳-۱- : نمونه شاهد از مری دارای کیست‌های ماکروسکوپی

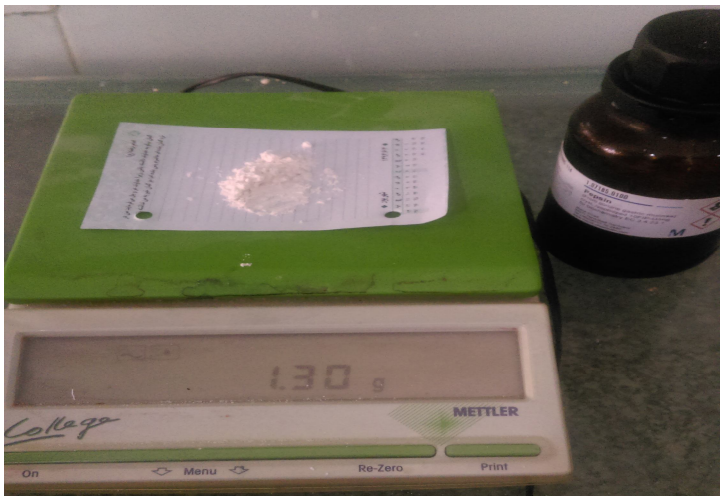
۳-۲- روش هضمی

هضم بافت توسط روش ارائه‌شده توسط Dubey و همکاران صورت گرفته است (۴۴،۴۳). پس از تهیه نمونه عضله از اندام‌های موردنظر، تا حد امکان توسط اسکالپر و قیچی و پنس استریل بافت‌های همبند و چربی از عضلات جدا شد. نمونه‌ها را به‌طور کاملاً مجزا به‌گونه‌ای که آلودگی انگلی را به یکدیگر منتقل نکنند با تیغ استریل به قطعات کوچک تقسیم شد. ۵۰ گرم از نمونه خرد شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر شیره هاضمه قرار داده شد. محلول هضمی حاوی:

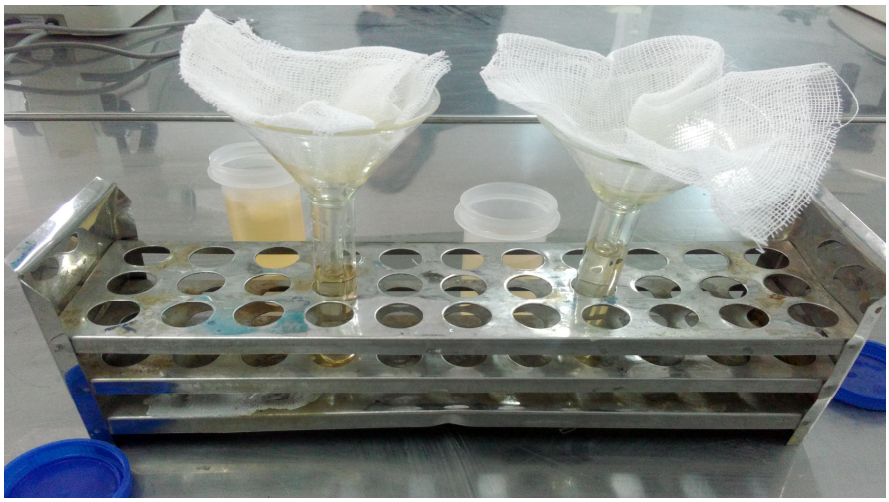
- ۱.۳ گرم پودر پپسین (Merck)، (تصویر۳-۲)
- ۲.۵ گرم سدیم کلرید (Nacl)
- ۳.۵ گرم اسیدکلریدریک (Hcl)
- ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر

۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول هضمی را درون تیوبی که حاوی ۵۰ گرم بافت خرد شده بود، ریخته شد و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. پس از گذشت این زمان و هضم بافتی، محلول از صافی عبور داده شد. برای صاف کردن از گاز غیر استریل به‌صورت سه لایه

استفاده شد (تصویر۳-۳). محلول صاف‌شده به مدت ۳ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب به‌دست‌آمده با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و برای بار دوم به مدت ۳ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. پس از گذشت این زمان محلول رویی را دور ریخته و رسوب نگه داشته شد و به رسوب به‌دست‌آمده ۱.۵ cc الکل ۹۵٪ اضافه گردید و سپس به مدت ۱۰-۵ ثانیه ورتکس شد، سپس با استفاده از سمپلر[1] محلول به‌دست‌آمده به میکروتیوب ۱.۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و تا زمان استخراج DNA در فریزر نگهداری شد.



تصویر ۳-۲- : مقدار ۱.۳گرم پپسین وزن شده در آزمایشگاه



تصویر ۳-۳- : مرحله صاف کردن نمونه هضم شده با گاز غیر استریل ۳ لایه‌ای

[1] - micropipet

۳-۳-استخراج DNA

ابتدا نمونه هضم شده از فریزر خارج و در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس میکروتیوب را با آب مقطر استریل پرکرده و پس از شیک کردن به مدت ۳ دقیقه با دور rpm ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شد. این مرحله دوباره تکرار شد و درنهایت تا حد امکان مایع رویی خارج گردید.

استخراج DNA با استفاده از کیت Cinnagen و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد (تصویر۳-۴):

۱- به هرکدام از میکروتیوب ها ۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتئاز Protease Baffer و ۵ میکرو لیتر پروتئاز Protease با استفاده از سمپلر اضافه گردید، سپس میکروتیوب ها ۳-۱ ساعت با درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه بن ماری[1] قرار داده شد.

۲- محلول Lysis Solution از فریزر خارج شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۴۰۰ میکرولیتر Lysis Solution با سمپلر درون میکروتیوب ۰.۵ میلی‌لیتری ریخته شد و حدود ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس گردید.

۳- ۳۰۰ میکرولیتر محلول Precipitation Solution به هر میکروتیوب اضافه شد و ۵ ثانیه ورتکس گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰ [2] میکروسانتریفیوژ شد (تصویر۳-۵).

۴- محلول رویی به‌آرامی دور ریخته شد و۳-۲ ثانیه میکروتیوب ها با دستمال‌کاغذی خشک گردید (tissue paper)، که این عمل با دقت و به‌آرامی انجام شد.

۵- یک میلی‌لیتر (۱۰۰۰ میکرولیتر) Wash Baffer به هر میکروتیوب اضافه شد، ۵-۳ ثانیه ورتکس و به مدت ۵ دقیقه با دور g۱۲۰۰۰ میکروسانتریفیوژ گردید. این مرحله مجدد تکرار شد.

۶- میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد با دستگاه ترموبلاک خشک شد (تصویر۳-۶). در این مرحله درب میکروتیوب ها باز ماند.

۷- ۵۰ میکرولیتر Solvent Baffer به میکروتیوب اضافه شد و با شیکر هم زده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرارداده شد. سپس نمونه‌ها تا زمان انجام PCR فریز گردید.

---

[1] - bain marie
[2] - 324 rpm

تصویر ۳-۴- : کیت Cinnagen استفاده‌شده برای استخراج DNA در آزمایشگاه

تصویر ۳-۵- : سانتریفیوژهای استفاده‌شده در آزمایشگاه

تصویر ۳-۶- : دستگاه ترموبلاک

PCR -۴-۳

- برای تهیه محلول واکنش (Mixed PCR) به روش زیر عمل شد:

- ۱۲.۵ میکرو لیتر Taq 2X Master Mix red ،(AMPLIQON) Master Mix
- ۱۰.۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی
- ۱ میکرولیتر DNA
- ۱ میکرولیتر پرایمر (آغازگر)، (macrogen) (جدول ۳-۱)

از هرکدام ۰.۵ میکرولیتر

جدول ۳-۱- : ترادف زوج پرایمر های مورداستفاده در تکثیر ژنوم سارکوسیستیس(۷۶)

نام پرایمر	ترادف از '5 به '3	طول پرایمر جفت باز
Reverse Sar-F1	5'- GCA CTT GAT GAA TTC TGG CA - 3'	۲۰ mer
Forward Sar-F2	5'- CAC CAC CCA TAG AAT CAA G - 3'	۱۹ mer

که حجم کلی محلول واکنش ۲۵ میکرولیتر شد. پس از اضافه کردن هرکدام از این محلول‌ها به میکروتیوب ها، ورتکس شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر روغن معدنی به میکروتیوب ها اضافه شد و به دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر DNA انتقال داده شد (تصویر۳-۷ و جدول ۳-۲).

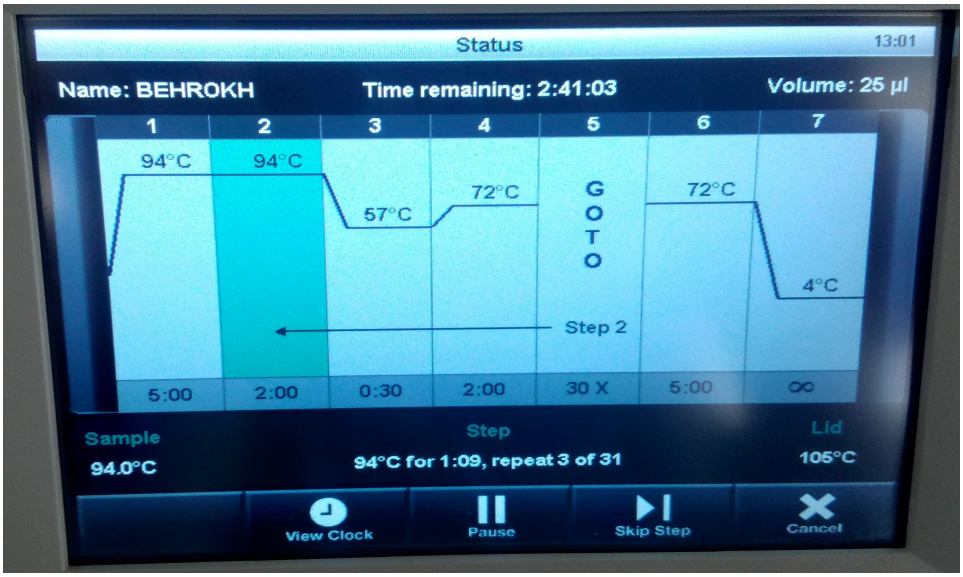
شرایط PCR طبق جدول زیر:

جدول ۳-۲- : مراحل انجام PCR (۷۶)

مراحل	حرارت (°C)	زمان	تعداد چرخه
شروع دناتوره شدن اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون در چرخه اتصال طویل شدن	۹۴ ۵۷ ۷۲	۲ دقیقه ۳۰ ثانیه ۲ دقیقه	۳۰
طویل شدن نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

و در پایان سیکل آخر نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

بعد از پایان سیکل‌های PCR برای اطمینان از تکثیر قطعه ۱۸s rRNA و برای مشاهده باندهای احتمالی از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱.۵٪ استفاده شد.



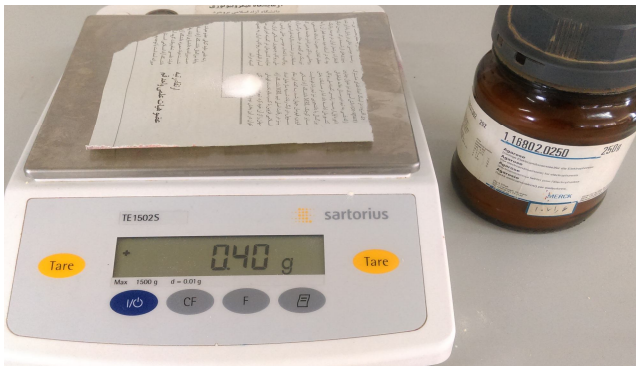
تصویر ۳-۷- : مراحل انجام PCR

تهیه ژل آگارز ۱.۵٪ :

- ۰.۳ گرم پودر آگار (تصویر۳-۸)
- بافر TBE (بسته به مساحت سینی ژل متفاوت است و طبق فرمول مقدارش تعیین می‌شود)، (تصویر۳-۹)

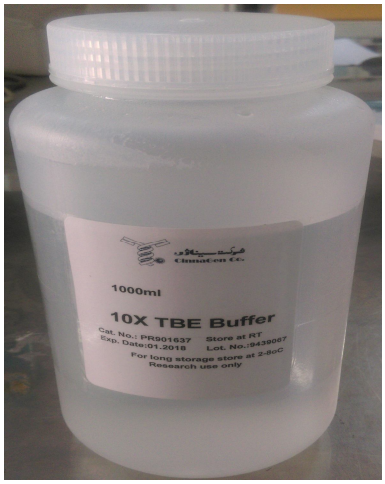
- رنگ سایبرگرین ۱ میکرولیتر

ابتدا سینی مخصوص ژل را آماده و شانه مخصوص در آن قرارداده شد و مقدار بافرTBE تعیین گردید. پودر آگار و بافر باهم مخلوط، و ارلن مخلوط روی حرارت قرارداده شد. حین حرارت مخلوط را هم زده، بعد از به جوش آمدن مخلوط ارلن از روی حرارت برداشته شد و در محیط آزمایشگاه قرارداده شد تاکمی از دما بیفتد. سپس رنگ به مخلوط اضافه شده و درون سینی ژل ریخته شد، شانه چاهک‌ها درون سینی ژل گذاشته شد و این کار به آهستگی و به‌طور یکنواخت انجام داده شد تا حبابی در ژل ایجاد نشود. بعد از بستن ژل، شانه از درون ژل درآورده شد و سینی به ظرف تانک منتقل شد. برای لود کردن محصول PCR در ژل از Loading استفاده گردید و همچنین در اولین چاهک ژل Lader 100 ریخته شد. تانک الکتروفورز را روشن کرده با تنظیم ولتاژ ۸۰ ولت و زمان ۳۰ دقیقه عمل الکتروفورز انجام شد. بعد از اتمام این زمان ژل به دستگاه ژل داک[1]، برای مشاهده و تصویر برداری از باندها منتقل شد.



تصویر۳-۸- : پودر آگار وزن شده در آزمایشگاه

[1] - Gel Document



تصویر ۳-۹- : بافر ۱۰x TBE

۳-۵- افزودن آنزیم‌های برش دهنده برای RFLP [1]

آنزیم‌های *AvaI*، *TaqI*، *HincII*، *EcoRI* (Cinacolon) که جایگاه‌های برش آن‌ها به روی قطعه تکثیرشده در هر گونه مشخص است انتخاب و سپس شرایط مطلوب تأثیر آنزیم ارزیابی شد (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۳- : جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر (۷۴)

آنزیم محدودگر	AvaI	TaqI	HincII	EcoRI
جایگاه برش	5'...C↓CGG...3' 3'...GGC↑C...5'	5'...T↓CGA...3' 3'...AGC↑T...5'	5'...GT↓AC...3' 3'...CA↑TG...5'	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'

۱- ۱۸ میکرولیتر آب مقطر تزریقی به هر میکروتیوب اضافه شد.

۲- میزان ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X مخصوص هر آنزیم اضافه گردید.

۳- از هرکدام از آنزیم‌های محدودکننده ۲ میکرولیتر به میکروتیوب اضافه شد.

۴- ۱۰ میکرو لیتر از DNA (محصول PCR) به میکروتیوب ها اضافه گردید.

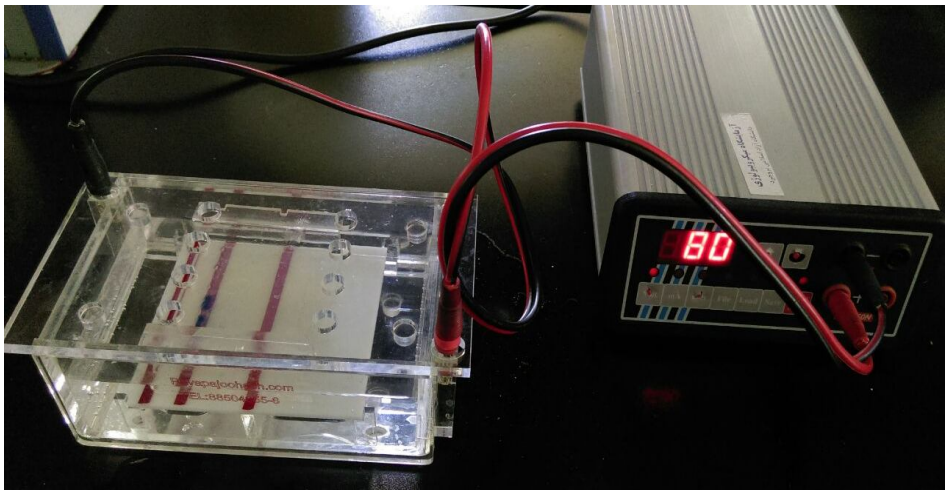
[1] - Restriction Fragment Length Polymorphism

میکروتیوب‌های حاوی آنزیم‌های ***EcoRI*** ،***HincII*** ،***AvaI*** در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و میکروتیوب حاوی آنزیم ***TaqI***، در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در بن ماری قرار داده شد (تصویر۳-۱۰).

تصویر ۳-۱۰- : آنزیم برش دهنده TaqI در بن ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد

۳-۶- الکتروفورز نمونه‌های RFLP شده

ابتدا ژل آگارز ۲٪ تهیه شد. نمونه‌های آنزیم زده‌شده محصول PCR در چاهک‌ها کنار هم در سمت کاتد لود (Load) شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق الکتروفورز شدند(تصویر ۳-۱۱). پس از پایان زمان الکتروفورز ژل از باندهای مشاهده شده عکس‌برداری شد.



تصویر۳-۱۱- : لود شدن نمونه‌ها در الکتروفورز

فصل چهارم:

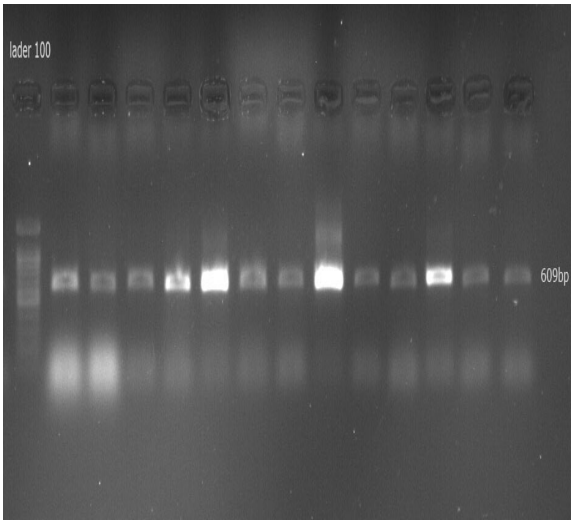
نتایج

۴-۱- نتایج روش هضمی

در مطالعه حاضر مجموعاً ۵۰ نمونه بافت‌های عضلات مری و دیافراگم از گوسفندان ذبح‌شده در کشتارگاه نهاوند جمع‌آوری شد که با روش هضمی ۸۷ ٪ عضلات موردمطالعه حاوی انگل تشخیص داده شدند. معمولاً گونه‌های سارکوسیستیس ژیگانته آ و سارکوسیستیس مدیوزیفورمیس دارای کیست‌های ماکروسکوپی و گونه‌های سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی کنیس دارای کیست‌های میکروسکوپی هستند و برای تفکیک این گونه‌ها از یکدیگر از روش مولکولی استفاده شد. بیشترین آلودگی در بافت دیافراگم و در جنس ماده گزارش شد.

۴-۲- نتایج PCR

نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA ۱۸s سارکوسیستیس قطعه‌ای ۶۰۹ جفت بازی را نشان داد (تصویر۴-۱).



تصویر ۴-۱- : الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA ۱۸s که در آن قطعه ۶۰۹ جفت بازی برای چندین نمونه سارکوسیستیس تکثیرشده است.

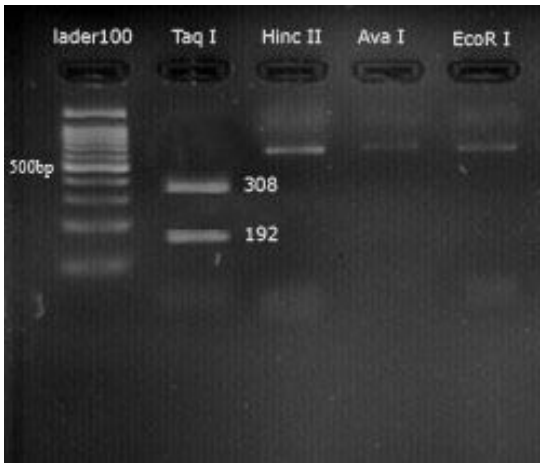
۴-۳- نتایج RFLP

نتیجه برش قطعه تکثیرشده ژن rRNA ۱۸s با هر یک از آنزیم‌های *AvaI*، *TaqI*، *HincII*، *EcoRI* دو گونه سارکوسیستیس مشخص شد.

- آنزیم *EcoRI* گونه تنلا را برش نمی‌زند ولی گونه ژیگانته آ را در جایگاه ۱ و ۴ و گونه آریتی کنیس را در جایگاه‌های ۲ و ۵ ۴۶ برش می‌زند، پس انتظار می‌رود در باند ۶۰۹ جفت بازی تغییر چندان محسوسی مشاهده نشود.
- آنزیم *HincII* گونه‌های تنلا و آریتی کنیس را برش نمی‌زند ولی گونه ژیگانته آ را در جایگاه ۱ و ۴۱۱ برش می‌زند پس انتظار می‌رود دو باند ۴۱۰ و ۱۹۸ جفت بازی مشاهده شود.
- آنزیم *TaqI* گونه تنلا را در جایگاه ۱ و ۳۳۴ و گونه ژیگانته آ را در جایگاه ۱ و ۳۳۹ و گونه آریتی کنیس را در جایگاه‌های ۳، ۵۱، ۱۰۹ و ۳۰۱ برش می‌زند، پس انتظار می‌رود باندهای ۲۷۵ و ۳۳۳ جفت بازی در گونه تنلا و باندهای ۲۷۰ و ۳۳۸ جفت بازی در گونه ژیگانته آ و باندهای ۴۸، ۵۸، ۱۹۲ و ۳۰۸ جفت بازی در گونه آریتی کنیس مشاهده شود.
- آنزیم *AvaI* در گونه تنلا جایگاه‌های ۲، ۳۴ و ۱۰۸ را برش می‌زند، پس انتظار می‌رود باندهای ۳۲،۷۴، ۵۰۱ جفت بازی مشاهده شود ولی گونه زیگانته آ و آریتی کنیس را برش نمی‌زند.

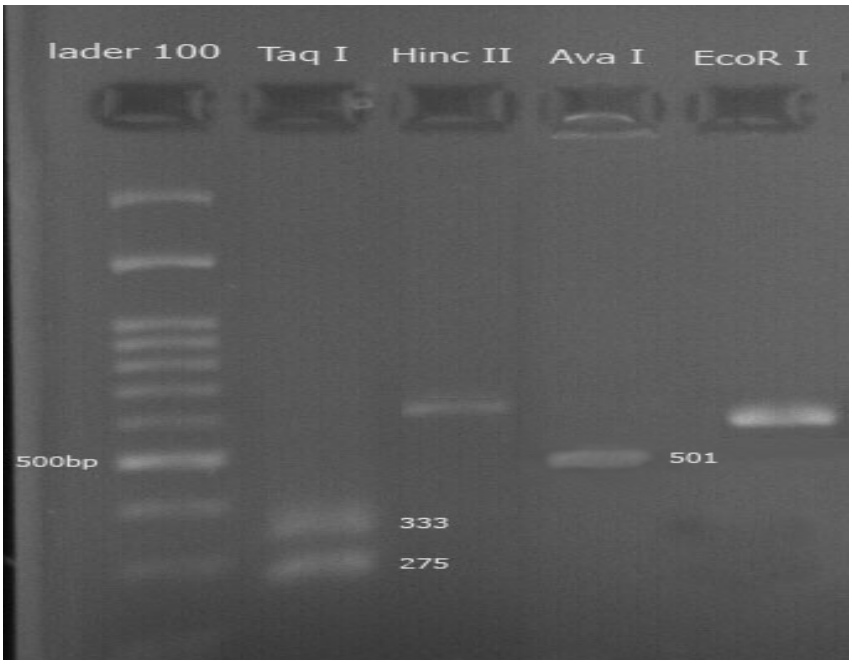
باندهای به‌دست‌آمده پس از الکتروفورز موردبررسی و ارزیابی قرار گرفتند. الکتروفورز هر نمونه برش شده با آنزیم بررسی شد. باندهایی که در اثر برش آنزیم ایجادشده تشخیص داده شد.

در تصویر ۴-۲ الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA ۱۸s سارکوسیستیس مربوط به میکروکیست های جداشده از گوسفند که در آن قطعه ۶۰۹ جفت بازی با آنزیم‌های *TaqI*، *AvaI*، *EcoRI*، *HincII* برش داده‌شده است و ۳۳ مورد از نمونه‌ها دارای الگوی واحد بودند، بدین ترتیب که در اثر آنزیم *TaqI* دو باند ۱۹۲ و ۳۰۸ جفت بازی را نشان دادند ولی در مقابل سایر آنزیم‌ها هیچ‌گونه برشی مشاهده نشد. این الگوی RFLP با الگوی سارکوسیستیس آریتی کنیس مطابقت دارد (تصویر۴-۲).



تصویر ۴-۲- : الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA ۱۸s سارکوسیستیس آریتی کنیس جداشده از گوسفند که در آن قطعه ۶۰۹ جفت بازی با آنزیم‌های ***TaqI***، ***AvaI***، ***EcoRI***، ***HincII*** برش داده‌شده است. (از چپ به راست) ردیف ۱: نشانگر (۱۰۰ جفت بازی)، ردیف۲: برش قطعه با ***TaqI*** (دو باند ۱۹۲و ۳۰۸ جفت بازی و باندهای ۴۸ و ۵۸ که قابل‌مشاهده نیستند)، ردیف ۳، ۴، ۵ برش قطعه با آنزیم‌های ***HincII***، ***AvaI***، ***EcoRI*** را نشان می‌دهد (بدون برش).

در تصویر ۴-۳ الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA ۱۸s سارکوسیستیس مربوط به میکروکیست های جداشده از گوسفند است که در آن قطعه ۶۰۹ جفت بازی با آنزیم‌های ***TaqI***، ***AvaI***، ***EcoRI***، ***HincII*** برش داده‌شده است و ۱۲ مورد از نمونه‌ها دارای الگوی واحد بودند، بدین ترتیب که در اثر آنزیم ***TaqI*** برش خورده و دو باند ۲۷۵ و ۳۳۳ جفت بازی و در مقابل آنزیم ***AvaI*** نیز برش خورده و باند ۵۰۱ جفت بازی را نشان داد ولی در مقابل سایر آنزیم‌ها هیچ‌گونه برشی مشاهده نشد. این الگوی RFLP با الگوی سارکوسیستیس تنلا مطابقت دارد (تصویر۴-۳).



تصویر ۴-۳- : الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA ۱۸s سارکوسیستیس تنلا جداشده از گوسفند که در آن قطعه ۶۰۹ جفت بازی با آنزیم‌های *TaqI*، *AvaI*، *EcoRI*، *HincII* برش داده‌شده است

(از چپ به راست) ردیف ۱: نشانگر (۱۰۰ جفت بازی)، ردیف۲: برش قطعه با *TaqI* (دو باند ۲۷۵ و ۳۳۳ جفت بازی)، ردیف ۳ : برش قطعه با *HincII* (بدون برش)، ردیف ۴ : برش قطعه با *AvaI* (باند ۵۰۱ جفت بازی و باندهای ۳۲ و ۷۴ که قابل‌مشاهده نیستند)، ردیف ۵ : برش قطعه با *EcoRI* (بدون برش) را نشان می‌دهد.

فصل پنجم

بحث

۵-۱- بحث

سارکوسیستوزیس از بیماری‌های مشترک انسان و دام است .برخی گونه‌های عامل این بیماری در دام‌ها باعث سقط‌جنین ، کاهش وزن، کاهش تولید شیر، کم‌خونی و حتی مرگ می‌شود بنابراین ازلحاظ اقتصادی و نیز بهداشت انسانی دارای اهمیت بسیار است . سارکوسیست برای اولین بار به‌وسیله میشر در موش خانگی گزارش گردید . این تک‌یاخته در میزبانان واسط خود به‌صورت کاملاً اختصاصی هست (۷۸). در ایران اولین تحقیقات در خصوص تشخیص سارکوسیستیس توسط Afshar و همکاران عنوان گردید. مطالعات آن‌ها بر اساس روش‌های هضمی صورت گرفت (۳۵).

در گوسفند ۴ گونه سارکوسیستیس وجود دارد که سارکوسیستیس تنلا و آریتی کنیس پاتوژن بوده و به‌صورت کیست میکروسکوپی توسط میزبان نهایی (سگ) پراکنده می‌شوند و سارکوسیستیس ژیگانته آ و سارکوسیستیس مدیزوفورمیس غیر پاتوژن بوده و به‌صورت کیست ماکروسکوپی می‌باشند و توسط میزبان نهایی (گربه) پراکنده می‌شوند. گاو امکان آلوده شدن به سه گونه انگل سارکوسیستیس را دارا هست که گونه‌های سارکوسیستیس کروزی ایجاد بیماری دالمنی در گاو و سارکوسیستیس هومینیس باعث بیماری گوارشی در انسان می‌کند (۴۵،۴۳). یکی از دلایل وقوع عفونت شدید در میزبان واسط به‌این‌علت نسبت داده می‌شود که حیوانات مزارع در ارتباط نزدیکی با سگ‌های نگهبان گله هستند و سگ‌ها چراگاه‌ها را با اسپوروسیست های سارکوسیستیس آلوده می‌کنند (۲).

در میان این گونه‌ها، سارکوسیستیس آریتی کنیس و سارکوسیستیس تنلا کیست‌های میکروسکوپی تولید می‌کنند و عواقب بیماری‌زا به شکل یک بیماری حاد دارند که خود را با علائم سقط‌جنین، تب، کم‌خونی و بی‌اشتهایی در دوره اولیه عفونت نشان می‌دهد و پس‌ازآن ممکن است باعث توسعه برخی اختلالات مزمن گردد (۸۷،۷۷). از طرف دیگر، گونه‌های شکل‌دهنده کیست‌های ماکروسکوپی سارکوسیستیس ژیگانته آ و سارکوسیستیس مدیوزیفورمیس غیر بیماری‌زا در نظر گرفته می‌شوند، اما می‌توانند بر کیفیت گوشت و بازاریابی تأثیر بگذارد و باعث زیان اقتصادی گردند. گوسفند می‌تواند به‌طور هم‌زمان با این چهار گونه آلوده شود (۸۶،۴۲). تابه‌حال، روش‌های مختلف مرسوم مانند تریچینوسکوپی[1]، رنگ‌آمیزی با متیلن بلو[2]، داب-اسمیر[3]، هضم و بافت‌شناسی برای تشخیص

---

[1]- Trichinoscopy
[2]- Staining with methylene blue
[3]- Dob-smear

سارکوسیستیس در نمونه گوشت استفاده شده است. این روش‌ها، خاص جنس[1] و فقط قابل‌اجرا روی لاشه کشتار شده هستند (۵۵). از سوی دیگر، برخی تست‌های سرولوژی ازجمله سنجش جذب ایمنی اتصال به آنزیم (ELISA)[2] و سنجش آنتی‌بادی فلورسنت غیرمستقیم (IFAT)[3]، بر اساس برادی زوئیت[4] های به‌دست‌آمده از سارکوکیست ها برای تشخیص سرولوژیک سارکوسیستیس در گوسفند و همچنین برخی از حیوانات دیگر موردبررسی قرارگرفته است (۸۹). ازآنجایی‌که برادی زوئیت های گونه‌های مختلف سارکوسیستیس شباهت‌های آنتی‌ژنی بسیاری دارند؛ درنتیجه واکنش متقابل قابل‌توجهی با دیگرگونه‌های سارکوسیستیس و دیگر انگل‌های مرتبط دارند (۶۸). آشکار است که این روش‌های سرولوژی دارای محدودیت‌های جدی برای تشخیص گونه و همچنین تعیین جنس می‌باشند.

در سال‌های اخیر، روش‌های تشخیصی مولکولی برای تعیین خاص گونه‌های سارکوسیستیس ارزیابی‌شده‌اند (۹۴،۹۳). امروزه با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان مستقیماً تفاوت‌های ژنتیکی را شناخت و بر اساس این تفاوت، گونه‌ها را از یکدیگر متمایز نمود. مطالعات برخی از محققان در نقاط مختلف جهان نشان داد که مقایسه ترادف ژن SSU rRNA [5] که بخشی از ژن ۱۸s rRNA است برای بررسی رابطه فیلوژنتیک گونه‌های سارکوسیستیس با یکدیگر و با سایر کوکسیدیاهای کیست زا مانند توکسوپلاسما گوندی و نئوسپورا کنینوم بسیار نتیجه‌بخش است. در این رابطه می‌توان به مطالعات Tenter و همکاران، هولمدالHolmdal و همکاران و یانگ Yang و همکاران اشاره کرد (۸۸،۵۶،۹۲).

در میان اهداف مختلف ژنومی، زیر واحد ریبوزومی بسیار حفاظت‌شده ۱۸s به‌طور گسترده‌ای برای تشخیص خاص گونه[6] تک‌یاخته‌های مختلف و همچنین گونه‌های سارکوسیستیس با توجه به مشاهده مناطق بسیار متغیر استفاده می‌شود (۹۴). مناطق حفاظت‌شده ژن ۱۸s rRNA می‌تواند در طراحی آغازگرهایی برای تقویت ژن در گونه‌های وابسته مورداستفاده قرار گیرد. ساختار موزاییک آن اجازه انعطاف‌پذیری در طرح‌های تجربی برای مطالعات مختلف فیلوژنی را می‌دهد (۷۲). بعلاوه، در گونه‌های مختلف سارکوسیستیس، توالی این ژن دارای رفتار ژنوتیپی متغیر است (۵۶). علاوه بر این،

---

[1]- Genus specific
[2]- Enzyme linked immune-sorbent assay
[3]- Indirect Fluorescent Antibody Test
[4]- *Bradyzoites*
[5]- Small Sub Unit
[6]- Species-specific

هولمال و همکاران، دریافتند که ژن ۱۸s rRNA ، تناسب بالایی از ارزش‌های هویتی درون گونه نشان داد، پس شناسایی گونه‌های مختلف سارکوسیستیس بر اساس تجزیه‌وتحلیل این ژن باارزش است (۵۶). ژن ۱۸s rRNA با حضور جایگاه‌های مختلف چندریختی[1] بین گونه‌های مختلف سارکوسیستیس و در همان‌گونه مشخص می‌شود (۵۶،۵۵). از سوی دیگر، بسیاری از نویسندگان ۱۸s rRNA را به‌عنوان تفکیک‌کننده پایدار خاص گونه سارکوسیستیس گوسفند تائید کردند (۹۴،۹۲،۴۵). علاوه بر این، عریان و همکاران، نشان دادند که ژن ۱۸s rRNA دارای تنوع‌های ژنتیکی مختلف است که ممکن است درنتیجه عدم شباهت در میان نسخه‌های متعدد این ژن به وجود آمده باشد که از مروزوئیت های مختلف در داخل سارکوکیست تکثیر شده باشند (۷۷).

بنابراین، هدف مطالعه حاضر، تعیین گونه‌های مختلف سارکوسیستیس گوسفندان در شهر نهاوند با استفاده از روش PCR–RFLP[2] بر مبنای تکثیر ژن ۱۸s rRNA بود. نمونه‌گیری از عضلات مری و دیافراگم صورت گرفت. بر اساس گزارش باکستون اندام‌های ترجیحی برای گونه‌های سارکوسیستیس در میزبان واسط قلب، دیافراگم و عضلات اسکلتی هستند که انگل می‌تواند تمام عمر میزبان واسط در این مکان‌ها بگذراند (۳۸). پایکاری و همکاران گونه ژیگانته آ را برای اولین بار در شهرستان قزوین، ایران گزارش کردند اما آن‌ها گونه سارکوسیستیس آریتی کنیس را نیز در مطالعه خود پیدا کردند، که از این نظر بامطالعه ما شباهت داشت (۷۶). هومن و همکاران بین توکسوپلاسما گوندی و گونه سارکوسیستیس یا نئوسپورا کنینیوم در نتایج PCR واکنش متقاطعی را گزارش نکردند (۵۷). از دیدگاه دیگر، ازآنجایی‌که کار ما حضور سارکوسیستیس آریتی کنیس و سارکوسیستیس تنلا را نشان می‌دهد، می‌توانیم نتیجه بگیریم که، چون میزبان‌های قطعی این گونه‌ها سگ هستند، بر ایران، ازلحاظ اقتصادی، اثر قابل‌ملاحظه‌ای دارند؛ بنابراین ما باید در برنامه‌های کنترل و پیشگیری از عفونت سارکوسیستیس در گوسفند بر روی این حیوان تمرکز کنیم (۳۴). این نتیجه‌گیری به‌وضوح اهمیت تحقیقات مولکولی برای شناسایی علت بیماری‌های مختلف، به‌ویژه هنگامی‌که این روش‌ها دقیق‌تر و ازلحاظ اقتصادی در مقایسه با روش‌های دیگر برتر باشند، را نشان می‌دهد و از آن پشتیبانی می‌کند (۷۷).

---

[1]- Polymorphism
[2]- Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism

در بررسی که توسط هکروت و همکاران به روش Nested-PCR انجام شد، چهار گونه سارکوسیستیس از گوسفند جدا گردید، دو گونه سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی کنیس به‌عنوان دو گونه پاتوژن و میکروسکوپی که می‌تواند منجر به بیماری حاد و یا سقط‌جنین در اوایل دوران آبستنی شود و یا منجر به بیماری مزمن در اواخر مراحل عفونت گردد، تشخیص داده شد (۵۲). در این بررسی روش‌های سنتی در تشخیص گونه‌های گوسفندی را بر اساس آنتی‌بادی فقط قادر به تشخیص جنس سارکوسیست دانسته و عدم توانایی این روش‌ها را در شناسایی گونه‌ها بررسی می‌نماید (۵۱). نتایج این بررسی با نتایج مطالعه ما کاملاً مطابقت دارد، با این تفاوت که در این مطالعه از روش Nested-PCR استفاده شد اما مطالعه ما با روش PCR-RFLP انجام شد.

در بررسی عریان با استفاده از روش PCR در گاومیش‌های آبی بیشترین میزان آلودگی را مربوط به سارکوسیستیس فوزی فورمیس پیدا کرد که گربه میزبان نهایی است (۷۵).

سارکوسیستیس آریتی کنیس بیماری‌زاست ولی شدت آن کمتر از سارکوسیستیس تنلا است (۵۵). در مطالعه ما مشخص شد که اکثر کیست‌ها مربوط به بافت دیافراگم هست. به نظر می‌رسد تفاوت در میزان آلودگی بافت‌های موردمطالعه با گونه‌های انگل در ارتباط باشند زیرا هر گونه از انگل ترجیحاً بافت خاصی را برای استقرار و تولید کیست انتخاب می‌کند (۴۸). همچنین نوع تکنیک بکار رفته در مطالعه، در تعیین میزان آلودگی بافت‌هایی که موردبررسی قرار می‌گیرند مؤثر است به‌طوری‌که در همدان روش هضمی حساس‌تر از روش آسیب‌شناسی شناخته‌شده است (۱۲). در مطالعه‌ای که به روش گسترش بافتی در جهرم انجام شد، آلوده‌ترین بافت را دیافراگم دانستند (۲۹)، که از این نظر بامطالعه ما کاملاً مطابقت دارد و همچنین با تحقیقات انجام‌شده در تبریز هم‌خوانی دارد (۲). از طرفی بیشترین آلودگی در مطالعه ما در جنس ماده گزارش شد که یکی از دلایل آن می‌تواند ذبح شدن زودتر در گوسفندان نر باشد، و بامطالعه‌ای که در استان کرمان انجام شد و نشان دادند که آلودگی در جنس ماده بیشتر است، مطابقت دارد (۲۵).

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 با روش PCR-RFLP که دلیمی و همکاران بر روی گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه زیاران قزوین انجام دادند، سه گونه انگل سارکوسیستیس مورد شناسایی قرارگرفته است. در این مطالعه، کیست‌های ماکروسکوپی متعلق به سارکوسیستیس ژیگانته آ و کیست‌های میکروسکوپی متعلق به سارکوسیستیس آریتی کنیس و سارکوسیستیس تنلا بوده‌اند که این اولین گزارش تشخیص مولکولی سارکوسیستیس

ژیگانته آ و سارکوسیستیس آریتی کنیس در ایران است (۱۴)، که ازنظر کیست میکروسکوپی آریتی کنیس و سارکوسیستیس تنلا با تحقیق ما مطابقت دارد با این تفاوت که نتایج مطالعات ما هیچ گونه کیست ماکروسکوپی را نشان نداد.

در مطالعه ای که توسط دلیمی اصل و همکاران در شهریار به روش PCR-RFLP انجام گرفت، شناسایی گونه سارکوسیستیس ژیگانته آ موردمطالعه قرار گرفت. در این مطالعه با استفاده از تکثیر قطعه ژن ۱۸s rRNA و برش آنزیمی گونه سارکوسیستیس ژیگانته آ مورد شناسایی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا کیست‌های ماکروسکوپی از عضلات مری و بین دنده‌ای گوسفندان کشتار شده جمع‌آوری شدند. سپس با استخراج DNA و تکثیر قطعه ۱۸s rRNA با پرایمر طراحی‌شده به روش PCR تکثیر شد. درنهایت با آنزیم MsPI و MboI برش داده شد. با توجه به مشخصات باندهای برش شده با آنزیم، تمام نمونه‌ها سارکوسیستیس ژیگانته آ تشخیص داده شدند (۱۳)، که با مطالعه ما هم در آنزیم‌های برش دهنده و هم در گونه یافت شده، تفاوت دارد. گونه یافت شده در شهریار ماکروسکوپی بوده و گونه به‌دست‌آمده توسط مطالعه ما میکروسکوپی است.

ازآنجایی‌که اکثر این مطالعات همه بر اساس مطالعه ۱۸s rRNA بود به همین دلیل در این مطالعه نیز ۱۸s rRNA برای تعیین گونه‌های سارکوسیستیس گوسفندی انتخاب شد. طول این قطعه در همه گونه‌ها ۶۰۹ جفت باز بوده است. در مرحله بعد که آنزیم برش دهنده مناسب انتخاب شد، هر چهار آنزیم *TaqI*، *AvaI*، *EcoRI*، *HincII* از بهترین آنزیم‌ها جهت تفکیک گونه‌های متعلق به کیست‌های میکروسکوپی گوسفندان، تشخیص داده شدند. پس از برش قطعه، برای هرگونه، الگوی الکتروفورزی با باندهایی با اندازه متفاوت ایجاد می‌کند.

با توجه به نقش این دو گونه انگل در ایجاد سقط‌جنین در میش‌های آبستن، انجام آزمایش‌های PCR-RFLP اختصاصی سارکوسیستیس برای علت‌یابی وقوع سقط‌جنین می‌تواند موضوعی جدید و قابل‌تأمل باشد.

۵-۲- پیشنهادات

- پیشنهاد می‌گردد مشابه این مطالعه در اقلیم‌های مختلف کشور انجام پذیرد تا نقش آب‌وهوا در میزان آلودگی مشخص شود.
- پیشنهاد می‌گردد مطالعه مولکولار اپیدمیولوژی بر روی این انگل انجام گردد تا نقش گوشت‌خواران در فراوانی انگل مشخص شود.
- پیشنهاد می‌گردد اطراف کشتارگاه‌ها حصاربندی گردد تا از ورود میزبانان نهایی به محوطه کشتارگاهی و شیوع آلودگی بیشتر جلوگیری گردد.
- همچنین پیشنهاد می‌گردد بررسی در سایر حیوانات و دام‌های کشتارگاهی انجام پذیرد.

منابع و مأخذ

منابع فارسی

۱. ادریسیان. غ.ح، رضائیان. م، قربانی. م، کشاورز. ح، محبعلی، م. (۱۳۸۶): تک‌یاخته شناسی پزشکی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران. صفحات: ۱۶۵-۱۶۸.

۲. ارشد. م، دلیمی اصل. ع، غفاری فرد. ف.(۱۳۸۶): مطالعه مقایسه‌ای تشخیص *سارکوسیستیس* در لاشه گوسفند ذبح‌شده در کشتارگاه تبریز. مجله پژوهش و سازندگی امور دام و آبزیان، ۷۵، صفحات:۷۲-۶۹.

۳. بنیادیان. م، مشگی. ب. (۱۳۸۵): بررسی میزان آلودگی لاشه گاوهای کشتارشده در کشتارگاه شهرکرد به *سارکوسیست*. مجله پژوهش و سازندگی امور دام و آبزیان، ۷۲،صفحات: ۱۴-۱۸.

۴. توسلی. م.(۱۳۸۵): تک یاخته‌شناسی دامپزشکی. انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه. صفحات:۵-۱ و۹۵-۹۳و۱۶۵-۱۶۰.

۵. توسلی. م.(۱۳۸۵): انگل‌شناسی تشخیصی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه ارومیه. صفحات:۴۱-۴۲.

۶. حدادزاده. ح.(۱۳۸۸): انگل‌شناسی ۳ (بندپایان و تک‌یاخته‌ها). انتشارات موسسه آموزش عالی علمی-کاربردی جهاد کشاورزی، صفحات:۷۵-۷۳.

۷. حدادزاده. ح.ر، راضی جلالی. م، خضرائی‌نیا. پ، طاهری. م، راسخ. ع. (۱۳۸۳): بررسی سرولوژیکی *سارکوسیستوزیس* به روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم و مقایسه آن با نتایج کشتارگاهی در گاومیش‌های اهواز. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۹، شماره۲، صفحات: ۱۸۸-۱۸۳.

۸. حداد مولایان. پ، حمیدی نجات. ح، درخشان. ل، جعفری. ه، سازمند. ع، میرعبدالهی. م، دهقان فراشاه. س، محمدی .م.م.(۱۳۹۰): بررسی میزان شیوع *سارکوسیستیس* در شتران کشتار شده در کشتارگاه‌های یزد. هفدهمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، ش مقاله۱۲۱۶-VC، صفحات:۱۳۴-۱۳۰.

۹. حسینی، س.ح، حدادزاده. ح.م، مشگی. ب، نبیان. ص، رضوی دینانی. م. (۱۳۸۲): عفونت‌های انگلی دام‌های اهلی. انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۸۵-۸۶ و ۱۷۴-۱۷۵.

۱۰.حسینی. ه، خاکسار. ر، شمشادی. ب. (۱۳۸۶): مطالعه همبرگرهای خام عرضه‌شده در شهر تهران ازنظر کیست‌های *سارکوسیست* .فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران،دوره ۴، شماره ۴، صفحات:۷۰-۶۵.

۱۱.حمیدی نجات. ح، نبوی. ل، خواجه. غ، قربان پور. م، راضی جلالی. م، راسخ. ع. (۱۳۸۴): تشخیص سرمی *سارکوسیستوزیس* گاومیش با آزمایش ELISA و مقایسه آن با روش هضم عضلانی. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۷۳-۲۷۶.

۱۲.درخشنده، کامران و قراگزلو،محمدجواد(۱۳۸۰): بررسی فروانی کیست *سارکوسیستیس* در گاوهای کشتارشده در همدان با دو روش هضمی و آسیب‌شناسی،مجله دامپزشکی دانشگاه تهران،جلد ۵۶ شماره ۱ ص ۷۹-۷۵

۱۳.دلیمی. ع، ارشد. م، غفاری فر. ف.(۱۳۸۷): تعیین میزان آلودگی بزهای ذبح‌شده به *سارکوسیستیس* با روش‌های مختلف. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان شهریار، شماره۸۱، صفحات: ۴۲-۳۸.

۱۴.دلیمی. ع، پایکاری. ح، اسماعیل‌زاده. م، ولی زاده. م، کریمی. غ، معتمدی. غ، عبدی گودرزی. م. (۱۳۸۷): تعیین *گونه‌های سارکوسیستیس* گوسفندان ذبح‌شده در کشتارگاه زیاران قزوین با روش PCR-RFLP. مجله علوم پزشکی مدرس، دوره ۱۱، شماره ۱و۲ ، صفحات :۷۲-۶۵.

۱۵.راضی جلالی. م، خواجه. غ، راسخ. ع، خجسته نژاد. ه. (۱۳۸۷): بررسی اثرات تجویز خوراکی و تزریقی عصاره کیست‌های *سارکوسیستیس فوزی فورمیس* بر عملکرد سیستم انعقاد خون در خرگوش. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۳، شماره ۱، صفحات: ۳۲-۲۹.

۱۶.رزمی. غ، رهبری. ص. (۱۳۷۹): بررسی *سارکوسیستیس* نشخوارکنندگان اهلی در استان‌های تهران و گلستان.مجله علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، سال سوم، شماره ۴، صفحات:۴۶-۳۹

۱۷.رزنبرگ،گ، ۱۳۷۱; معاینه بالینی گاو. ترجمه دکتر ساسان رسول نژاد و دکتر مرتضی گرجی دوز ،انتشارات جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ،صفحه ۷۳-۶۸

۱۸.رسولی. س، رحمان پور.ک، جعفری. ک، سهندی. ع. (۱۳۸۸): بررسی میزان آلودگی گوشت‌های شهرستان بوکان به تک‌یاخته *سارکوسیست* توسط روش هضمی. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، شماره ۸، سال سوم، صفحات: ۷۵-۷۱.

۱۹.رسولی. س، صادقیان. م، کریمیان. ص، ولیزاده. الف، جعفری. ک. (۱۳۸۸): .بررسی میزان شیوع آلودگی گوشت به تک‌یاخته *سارکوسیست* در شهرستان سنندج با روش هضمی. مجله پژوهش نوین دامپزشکی، سال اول، شماره ۳، بهار۸۹، صفحات :۳۲-۲۷.

۲۰.شاددل، ف. (۱۳۷۷): انگل‌شناسی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه شیراز. صفحات: ۵۴۹-۵۴۳ و۶۲۵-۶۱۷.

۲۱.شریعت پناه. ک. (۱۳۸۲): بررسی آلودگی به *سارکوسیست* در نشخوارکنندگان اهلی نقده و ارومیه و اهمیت اقتصادی آن. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، شماره ۶۲۰، دانشکده ارومیه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، صفحات: ۲۰-۱۱.

۲۲.شکرفروش. ش، رضوی. م، احمدی. ح، صریحی. ک. (۱۳۸۳): بررسی فراوانی *سارکوسیستیس* در گاوهای کشتار شده در کشتارگاه شیراز. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۹، شماره ۱، صفحات ۳۷-۳۳.

۲۳.شکرفروش،شهرام و احمدی،بهزاد(۱۳۸۳): میزان آلودگی لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اصفهان به *سارکوسیستیس* و اهمیت بهداشتی آن.مجله پژوهش و سازندگی.جلد ۱۷ شماره ۳ پی آیند۶۴:ص:۱۰۴-۱۰۲

۲۴.صائبی. ا.(۱۳۸۸): بیماری‌های انگلی در ایران- تک‌یاختگان. انتشارات آییژ. صفحات: ۲۱۷-۲۲۱.

۲۵.فلاحی. م. (۱۳۹۰): بررسی میزان آلودگی به *سارکوسیست* در گوسفندان ذبح‌شده در کشتارگاه کرمان. هفدهمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، ش مقاله۱۲۲-VC، صفحات: ۶۹-۶۶.

۲۶.فلاح. م، متینی. م، بیگم کیا. ع، موبدی. ا. (۱۳۸۸): بررسی شیوع آلودگی به انگل‌های 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 ۱۷ ، شماره ۳ ، ۵۷ .صفحات:۱۲-۵.

۲۷.قراگزلو. م. ج، سجادی. م، سماواتی. م. (۱۳۷۴): مطالعه حضور آنتی‌بادی ضد *سارکوسیست* گوسفند در پنجاه‌وچهار نفر از اهالی همدان. هفتمین گنکره بین‌المللی پزشکی جغرافیایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز و سومین کنگره ایمنولوژی و آلرژی ایران-شیراز.

۲۸.قراگزلو. م. ج، سجادی. م، بکائی. س. (۱۳۸۳): بررسی حضور آنتی‌بادی‌های ضد برادی‌زوآیت *سارکوسیست* جداشده از گوسفند در انسان با استفاده از روش ایمونوفلورسانس. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز)، مسلسل ۹، ۱۵۰-۱۵۶.

۲۹.کارگر جهرمی. ز، صلح‌جو. ک، زارعیان جهرمی. م، کارگر جهرمی. ح، عرفانیان. س، اسمی. م. (۱۳۹۱): بررسی آلودگی به *سارکوسیست* در بزهای ذبح‌شده در کشتارگاه جهرم. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، سال ۲، شماره ۳، ۱۶۳-۱۶۷.

۳۰.کامل، ع. (۱۳۷۸): بررسی میزان فراوانی *سارکوسیست* در عضلات گوسفند و بز کشتارگاه قائم شهریار به دو روش هضمی و آسیب‌شناسی، پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای تخصصی شماره۳۷۰، دانشکده دامپزشکی آزاد اسلامی واحد کرج، صفحات:۲۰-۱۶.

۳۱.مختاریان. ک، خلیلی. ب، کریمی. ا، یزدان‌پرست. م، کثیری.ک، ترشیزی. ر، تکتاز. ت.(۱۳۸۹): بررسی میزان آلودگی *سارکوسیستیس* در دام‌های کشتار شده در کشتارگاه شهرکرد در تابستان ۱۳۸۶ با روش هیستوپاتولوژی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره ۱۲ شماره ۱، صفحات: ۳۶-۳۲.
۳۲.نجفیان. ح، محبعلی. م، کشاورز. ح. (۱۳۸۷): بررسی فراوانی عفونت *سارکوسیستی* در گاوهای کشتار شده شهرستان شهریار بهروش‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی در سال ۱۳۸۴ و اهمیت بهداشتی آن در انسان. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره ۷۸، صفحات: ۱۹-۱۵.
۳۳.وثوقی. ح، حقوقی‌راد. ن، رهبری. ص. (۱۳۹۱): مقایسه دو روش ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک جهت تشخیص تک‌یاخته *سارکوسیست* گوسفند در کشتارگاه‌های استان لرستان. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، دوره ۶، شماره۱، ۶۳-۷۱.

منابع لاتین

34. Adriana T, Mircean V, Blaga R, Bratu CN, Cozma V (2008) Epidemiology and etiology in sheep *Sarcocystosis*. Bull UASVM Vet Med 65:49–54.
35. Afshar, A., Naghshineh, R., Neshat, H. (1974)*:* Incidence of *Sarcosporidiosis* in sheep in Iran. Trop Anim Health prod. 6(4): 1920.
36. Akbarian, H. Jabelijavan, A. Eizadi, S.S. (2008). Infection 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.
37. Atashparvar, N., Soukhtezari, A. and Asalani, A.A. (2001). Survey of *Sarcocystis* Sheep and goats in Khoram Abad. Proceedings of the 3rd National congress of Medical Parasitology (MP 01), Sari, Iran. Pp: 250-251.
38. Buxton D (1998) Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. Vet Res 29:289–310.
39. Bunyaratvej, S., Unpunyo, . (2007). The *Sarcocystis*-Cyst Containing Beef and Pork P., Pongtippan, A as the Sources of Natural Intestinal *Sarcocystosis* in Thai People. j. Med. Assoc. 90(10): 2128-2135.
40. Carvalho sp. 1993:prevalence and identitiy of *Sarcocystis spp.* Cysts in cattle slaughtered at Lisbon.revist protuguesa de ciencias vet.88:36-41.
41. Daryani, A., ALlaei, R., Dehghan, M.H., Arab, R., Sharif, M., Ziaei, H. (2006). Survey of *Sarcocystis* Infection in Slaughtered Sheep and Buffaloes in Ardabil, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances, 5(1):60-62.
42. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Rosenthal, B.M. and Thomas, N.J. (2003). *Sarcocystis* an Unidentified Species of *Sarcocystis* in the Sea Otter (Enhydra Iutris). J.Parasitol, 89(2): 397-399.
43. Dubey JP, Lindsay DS (2006) *Neosporosis*, *Toxoplasmosis*, and *Sarcocystosis* in ruminants. Vet Clin Food Anim 22:645–671.
44. Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (1989). *Sarcocystosis* of animals and man. Florida, CRC Press 1989; p: 95-9.
45. Ellis JT, Luton K, Baverstock PR, Whitworth G, Tenter AM, Johnson AM (1995) Phylogenetic relationships between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rRNA sequences. Parasitology 110:521–528.
46. Fatani, A., Hilali, M., AL-Atiya, S., AL-Shami, S. (1995). Prevalance of *Sarcocystis* in Camels (Camelus dromedaries) from AL-Ahsa, Saudi Arabia. J.Vet.Parasitol, 62: 241-245.

47. Fayer,R. and Johnson,A.J.,1973,Development of *Sarcocystis fuziformis* incalves infected with sporocysts from dog j.parasitology,59 ,pp: 1135-1139.
48. Fayer, R. (2004). *Sarcocystis spp.* in Human infections. clincal microbial Reviews, 17(4): 894-902.
49. Gabriele, G., Robba,S., Germani,O. and Scanziani,E. 2006, Identification and prevalence of *Sarcocystis spp.* cysts in bovine canned meat, Food Control, Volume 17, Issue 9, Pages 691-694.
50. Gracy,j.f.,1992,meat hygiene.9 th ed.bailliere tindall,pp: 433-435.
51. Heckeroth, A.R., Tenter, A.M. (1999). Comparison of Immunological and molecular Methods for the Diagnosis of Infections with Pathogenic *Sarcocystis* Species in Sheep. Tokai J Exp Clin Med, 23(6): 293-302.
52. Heckeroth AR, Tenter AM (1999) Development and validation of species-specific Nested PCR for diagnosis of acute *Sarcocystosis* in sheep. Int J Parasitol 29:1331–1349.
53. Huong, T. and Lam,T.,1999,prevalence of *Sarcocystis spp.* In water buffaloes in Vietnam.j.veterinary parasitology, vol 86,1,pp: 33-39.
54. .Husseni, H.S, Warrag, H. (1985). Prevalence of *Sarcocystis* in food Animals in Sudan. Trop.Anim.Health.17, Pp: 100-101.
55. Holmdahl OJ, Mattsson JG, Uggla A, Johansson KE. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of 18S rRNA from *Sarcocystis* species. Mol Cell Probes 1993; 7(6): 481-6.
56. Holmdahl, O.J., D.A. Morrison, J.T. Ellis and L.T. Huong, 1999. Evolution of ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa) parasites based on small sub unit rDNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 11: 27- 37. PMID: 10082608.
57. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H (2000) Identification of a 200–300 fold repetitive 529 bp DNA frag- ment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol 30:69–75.
58. Johnson,A.J.,Hhildebrandt,P.K. and Fayer,r.,1975,Experimentally induced *Sarcocystis* infection in calves. Pathology Am.J.Vet.Res.36,pp:995-999.
59. Kia, E.B. (2003). A Simple and Large Scale Performing Protocol for the Detection of *Sarcocystis* in Muscles of Some Small Mammals. Iranian J Publ Health, 32(2):28-30.
60. Kirkpatrick, C., Dubey, J.P.,Goldschmidt, M.H., Saik, J.E., 1986,*Sarcocystis sp.* in muscles of domestic cats.Vet Pathol. 23, pp: 88-90.
61. Latif, B.M.A. Al-Delemi, J.K. Mohammed, B.S., AL-Bayati, S.M. and Amiry, A.M. (1999). Prevalence of *Sarcocystis spp.* in meat production animal in Iraq.Veterinary parasitology, 84: 85-90.

62. Lukesova, D.Nevole,M. and Haidova,B. 1986 prevalence of *Sarcocystis* in cattle and pig herds, j.vet.med..31:521-530.
63. Mahmoud, N., Abo-Shehada, J. (1996). Age variations in the prevalence of *Sarcocystis* in Sheep and Goats from northern and central Jordan. J.Preventive veterinary Medicin, 27(3-4):135-140.
64. Mandour, A.M., Rabie, S.A., Mohammed, N.I. and Hussein, N.M. (2011). On the prosonce of *Sarcocystis mischeri* in camels of Qena Governorate. Acad. J. biolog sci. 3(1):1-7.
65. 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.
66. Mirzaei Dehaghi, M., Fathi, S. and Norouzi 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.
67. Mirzaei Dehaghi, M., Fallahi, M., Sami, M. and Radfar, M.H. (2012). Survey of *Sarcocysyis* infection in Slaughtered Sheep in Abaddoir Kerman, Kerman, Iran. Comparative clinical Pathology. 21(89): 1991-2012.
68. More ´ G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Venturini MC, Venturini L (2010) Serologic profiles for *Sarcocystis sp.* and Neospora caninum and productive performance in naturally infected beef calves. Parasitol Res 106:689–693.
69. Muangyai, m. and chalermchikit,t,,1988:*Sarcocystis* in Thailand.the incidence of *Sarcocystis* in cattle buffaloes.thai.j.vet.med..18: 319-320.
70. Nevol, M. and Lukesova, D. (1981). Method for the direct detection of *Sarcocystis* and diagnisies reliability.Veterinary Medicine, 10: 581-584.
71. Okur, h.k.and Emir,o.and sahin,I.,1995:an investigation on *Sarcocystis* species in cattle and sheep from bayburt. Turkiye parazitol.devgisi..19:113-118.
72. Olsen, G.J. and C.R. Woese, 1993. Ribosomal RNA: A key to phylogeny. FASEB J., 1: 113-123. PMID: 8422957.
73. Oryan, A., Ahmadi, N. and Mousavi, S.M. (2010). Prevalence, biology, and distribution pattern of *Sarcocystis* infection in water buffalo (Bubalus bubalis) in Iran. Trop Anim Health Prod. 42(7):1513-8.
74. Oryan, A., Moghaddar, N. and Gaur, S.N. (1996).The distribution pattern of *Sarcocystis* species, their transmission and pathogenesis in sheep in fars province of Iran.Vet. Res. commun. 20(3): 53-243.
75. Oryan, A., Sharifiyazdi, H., Khordadmehr, M. and Larki S. (2011). Characterization of *Sarcocystis fusiformis* based on sequencing and PCR-

RFLP in water buffalo (Bubalus bubalis) in Iran. Parasitol Res. 109(6):1563-70.
76. Paikari HA, Dalimi AAH, Esmaeilzadeh M, Valizadeh M, Karimi GHR, Motamedi GHR, Abdi Goudarzi M (2008) Identification of *Sarcocystis* species of slaughtered sheep in qazvin. Modares J Med Sci 11:65–72 (In Persian).
77. Pescador CA, Corbellini LG, de Oliveira EC, Bandarra PM, Leal JS, Pedroso PMO, Driemeier D (2007) Aborto ovino associado com infecc¸a ˜o por *Sarcocystis spp.* Pesq Vet Bras 27:393–397.
78. Ronald, f. (2004) *Sarcocystis spp.* In Human infections. Clinical Microbiology Reviews. 17(4): 894-902.
79. Sam- Yellowe.T.Y(1996).Rhoptry organelles of the *Apicomplexa*: Their role in host cell invasion and intracellular survival. Parasitology today. 12 p_p : 308-315.
80. Savini.,G.Robertson,I.D.Dunsmore I.D.and seneviratna,p.,1992; the epidemiology of *Sarcocystis spp.* in cattle of western Australia .epidemiol.infect..108:107-113.
81. Seneviratna, P., Edward, A.G. and Deguisti, D.L. (1975). Frequency of *Sarcocystis SPP*. in Detroit metropolitan area, Michigan. AM. J. Vet. Res., l36: 377-389.
82. Shekarforoosh, S.S. and Ahmadi,B. (2004). Infection rate of *Sarcocystis* in Slaughtered Livestock in Isfahan and its Human health importance. Journal of pojouhesh va sazandagi. 64. Pp: 102-103.
83. Singh,b.b.sharma,J.,2004, public heolth and zoonotic significance of *Sarcocystis* species in cattle. 23 rd world buiatrics congress,Quebec city, Canada.
84. Solaymani-Mohammadi, S. and Petri Jr., W.A. (2006). Zoonotic implications of the swine-transmitted protozoal infections. Veterinary Parasitology 140: 189–203.
85. Soulsby, E.J.L. (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.7th Edition. Bailliere Tindall. Pp: 505-513.
86. Tenter,A.M.,(1995).Current Research on *Sarcocystis* Species of Domestic Animals. International Journal for Parasitology,Vol.25,No,11.Pp:1311-1330.
87. Tenter AM, Baverstock PR, Johnson AM (1992) Phylogenetic relationships of *Sarcocystis* species from sheep, goats, cattle and mice based on ribosomal RNA sequences. Int J Parasitol 22:503–513.
88. Tenter AM, Luton K, Johnson AM (1994) Species-specific identifi- cation of *Sarcocystis* and *Toxoplasma* by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. Appl Parasitol 35:173–188.

89. Uggla, A., Buxton, D. (1990) Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 9:441-62.
90. Valizhad, A., Oryan, A and Ahmadi, N. (2008). *Sarcocyctis* and its complications in camels (camelus dromedaries) of Eastern Provinces of Iran. Korean. J. Parasitol. 46(4): 229-234.
91. Wouda, W ., Snoep,J. and Dubey, J.P.2006, Eosinophilic Myositis due to *Sarcocystis hominis* in a Beef Cow , journal of Comparative Pathology,Volume 135, Issue 4, Pages 24.
92. Yang ZQ, Li QQ, Zuo YX, Chen XW, Chen YJ, Nie L, Wei CG, Zen JS,. Attwood SW, Zhang XZ, Zhang YP. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. Exp Parasitol 2002; 102(3-4): 212-7.
93. Yang ZQ, Zuo YX, Yao YG, Chen XW, Yang GC, Zhang YP (2001) Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. Mol Biochem Parasitol 115:283–288.
94. Yang ZQ, Zuo YX (2000) The new views of the researchers on cyst forming coccidia species including *Sarcocystis* by using the molecular biological techniques. Chin J Parasitol Parasit Dis 18:120–126.

Abstract

Objective: *Sarcocystis* from branch *Apicomplexa* has two mandatory hosts. Herbivores (intermediate host) are infected to Spirosites excreted by main host (carnivores) and eating contaminated food and water, subsequently creating tissue cysts in corpses. The aim of this study was to identify Sarcocystis species of sheep using PCR-RFLP method.

Materials and Methods: In this study, a total of 50 tissue samples from the esophagus and diaphragm muscles of slaughtered sheep in a slaughterhouse in Nahavand were collected that had macroscopic and microscopic cysts. Sample DNA extraction was performed using the kit. PCR conditions were optimized for amplification 18s rRNA. To determine Sarcocystis species under study, enzymes were selected according to the location of restriction enzymes.

Results: Results indicated that the primers were quite specific. PCR-RFLP evaluation of samples showed that most of cysts belonged to female and diaphragm tissue. Microscopic cysts belong to *Sarcocystis ariticanis* and *Sarcocystis tenella*.

Conclusion: Using primers based on PCR-RFLP method, macroscopic and microscopic *Sarcocystis* species of sheep can be isolated.

Keywords:

Sarcocystis, 18s rRNA, PCR-RFLP, *Sarcocystis ariticanis*, *Sarcocystis tenella*, Nahavand city.

Islamic Azad University

Borujerd Branch

Faculty of Science ، Department of Biology

Thesis «M.Sc»

On: Cell and Molecular Biology

Subject:

Identification the species of *Sarcocystis* of slaughtered sheep of slaughterhouse of PCR-RFLP in Nahavand

Advisor:

Farzad Parsa Ph.D

Supervisor:

Reza Yari Ph.D

By:

Elham siavashi

Winter 2017