

تعیین گونه‌های سارکوسیتیس گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه زیاران قزوین با روش PCR-RFLP

عبدالحسین دلیمی^۱، حبیب‌اله پایکاری^{۲*}، مجید اسماعیل زاده^۳، محسن ولی زاده^۴، غلامرضا کریمی^۵

غلامرضا معتمدی^۱، محمد عبدی گودرزی^۶

- ۱- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - ۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
 - ۳- مربی، گروه بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
 - ۴- مربی، گروه انگل‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
 - ۵- استادیار، گروه انگل‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
 - ۶- مربی، گروه انگل‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
 - ۷- استادیار، گروه انگل‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
- دریافت مقاله: ۸۷/۸/۵ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۳

چکیده

هدف: سارکوسیتیس از شاخه ای کمپلکسا است که زندگی دو میزبان اجباری دارد. علف‌خواران (میزبان واسط) با خوردن آب و غذای آلوده به اسپروسیست‌ها که توسط گوشت‌خواران (میزبان اصلی) دفع می‌شود، آلوده می‌شوند و متعاقب آن کیست‌های نسجی در احشاء ایجاد می‌شود. هدف از مطالعه حاضر شناسایی گونه‌های مختلف سارکوسیتیس گوسفندان با استفاده از PCR-RFLP بوده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر مجموعاً ۶۰ نمونه بافتی از عضلات قلب، مری و دیافراگم از گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه زیاران قزوین جمع‌آوری شد که ۴۰ نمونه آن حاوی کیست‌های ماکروسکوپی و ۲۰ نمونه آن حاوی کیست‌های میکروسکوپی بود. تخلیص DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت صورت گرفت. شرایط PCR برای تکثیر قطعه ۱۸S rRNA بهینه شد. برای بررسی اختصاصی بودن، آغازگرهای نمونه‌های DNA نئوسپورا و توکسوپلاسما نیز در کنار نمونه‌های سارکوسیتیس تحت مطالعه قرار گرفت. برای تعیین گونه سارکوسیتیس‌های تحت مطالعه، با توجه به موقعیت محل برش آنزیم‌های برش‌دهنده، اقدام به انتخاب آنزیم شد.

نتایج: نتایج نشان داد که آغازگرها کاملاً اختصاصی بوده و جنس سارکوسیتیس را از سایرین متمایز می‌سازد. ارزیابی PCR-RFLP روی نمونه‌ها نشان داد که کیست‌های ماکروسکوپی متعلق به سارکوسیتیس ژیگانتیه‌آ و کیست‌های میکروسکوپی متعلق به سارکوسیتیس آریتی کنیس است.

نتیجه‌گیری: با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و بر مبنای روش PCR-RFLP گونه‌های سارکوسیتیس گوسفندی را می‌توان از هم تفکیک داد. در این روش برای تفکیک گونه‌های متعلق به کیست‌های میکروسکوپی گوسفندان *TaqI* و برای تفکیک گونه‌های متعلق به کیست‌های ماکروسکوپی *TaqI* و *HincII* مؤثرتر از سایرین هستند.

کلیدواژگان: سارکوسیتیس، ۱۸S rRNA، PCR-RFLP، سارکوسیتیس ژیگانتیه‌آ، سارکوسیتیس آریتی کنیس.

* نشانی مکاتبه: کرج، مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، گروه انگل‌شناسی، صندوق پستی: ۱۴۸-۳۱۹۷۵.

۱- مقدمه

سارکوسیستیس (*Sarcocystis*) تک یاخته‌ای از شاخه اپی‌کمپلکسا (Apicomplexa) است که آلودگی به آن از سراسر دنیا گزارش شده است [۱، ۲]. این انگل علاوه بر انسان تعداد زیادی از حیوانات پستاندار و همچنین گونه‌های مختلف پرندگان را آلوده می‌سازد و قادر است در چندین میزبان قطعی آلودگی ایجاد نماید [۱، ۲]. سارکوسیست‌ها (*Sarcocysts*) کیست‌های بافتی انگل است که دارای دیواره کیستی بوده و مراحل متروسیت (*Metrocyt*) یا زوئیت (*Zoite*) انگل را احاطه می‌نماید. ساختمان و ضخامت دیواره کیست در بین گونه‌های سارکوسیستیس و با بالغ شدن سارکوسیست در درون هرگونه متفاوت است [۱، ۲].

اندازه و شکل سارکوسیست‌ها در ارتباط با گونه انگل متفاوت است برخی از سارکوسیست‌ها به اندازه میکروسکوپی باقی مانده (به‌عنوان مثال: سارکوسیستیس آریتی‌کانیس (*Sarcocystis arieticanis*)) در حالی که برخی دیگر ماکروسکوپی (به‌عنوان مثال: سارکوسیستیس ژیگانتیه‌آ (*S. gigantea*)) می‌شوند. سارکوسیست‌های میکروسکوپی از اندازه خیلی بلند و باریک تا کوتاه و پهن متغیرند. سارکوسیست‌های ماکروسکوپی به اشکال رشته‌ای شبیه دانه برنج یا کروی هستند [۱، ۲].

جنس سارکوسیستیس دارای ۹۳ گونه است که چهار گونه آن شامل سارکوسیستیس تنلا (*S. tenella*) و سارکوسیستیس آریتی‌کانیس که از طریق سگ‌سانان و سارکوسیستیس ژیگانتیه‌آ و سارکوسیستیس مدوزیفورمیس (*S. medusiformis*) که به‌وسیله گربه‌ها منتقل می‌شود، آلوده‌کننده گوسفندان هستند.

آلودگی گوسفندان به سارکوسیستیس تاکنون از اکثر نقاط جهان گزارش شده است. در ایران تاکنون گزارش‌های متعددی در مورد آلودگی گوسفند به سارکوسیستیس ارائه شده است [۳-۹]. در اکثر این مطالعات از روش هضمی برای تعیین درصد آلودگی استفاده نشده بود. بنابراین احتمال می‌رود که درصد آلودگی گزارش شده کمتر از مقدار واقعی باشد. در

مطالعه رضوی (Razavi) و همکاران (۲۰۰۳) و ارشد (Arshad) و همکاران (۲۰۰۷) که از روش هضمی برای تعیین آلودگی استفاده کرده‌اند، میزان آلودگی لاشه‌های گوسفندان شیراز و تبریز ۱۰۰ درصد گزارش شد [۸، ۹].

سابقاً برای طبقه‌بندی گونه‌های سارکوسیستیس از شاخص‌هایی از قبیل خصوصیات ریخت‌شناسی (Morphology) کیست‌ها (شکل اندازه و ضخامت دیواره)، میزبانان اختصاصی، خصوصیات فرا ریزینی دیواره کیست و خصوصیات ایزوآنزیمی گونه‌ها استفاده می‌شده است. در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص گونه‌های مختلف سارکوسیستیس رایج شده است. در این رابطه می‌توان به مطالعات تتر (Tenter) و همکاران (۱۹۹۲)، هولمدال (Holmdahl) و همکاران (۱۹۹۳)، تتر و همکاران (۱۹۹۴)، تتر (۱۹۹۵)، جفریز (Jeffries) و همکاران (۱۹۹۶)، جواشیم (Joachim) و همکاران (۱۹۹۶)، ماگریچ (Mugridge) و همکاران (۱۹۹۹) و هکروت (Heckeroth) و تتر (۱۹۹۹) و یانگ (Yang) و همکاران (۲۰۰۲) اشاره کرد [۱۰-۱۸]. در اکثر این مطالعات از تکثیر قطعه ژن rRNA ۱۸ برای شناسایی گونه‌ها استفاده شده است. هدف از مطالعه حاضر شناسایی گونه‌های مختلف سارکوسیستیس گوسفندان با استفاده از تکثیر قطعه rRNA ۱۸ و برش آنزیمی بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری و آماده‌سازی کیست‌ها

با مراجعه به کشتارگاه زیاران شهرستان قزوین عضلات قلب، مری و دیافراگم آلوده به سارکوسیستیس از لاشه گوسفندان کشتارگاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد.

علاوه بر برداشت ۲۵ گرم از عضلات، سارکوسیست‌هایی که با چشم به‌راحتی مشاهده می‌شدند با اسکالپل (Scalpel) به‌دقت از عضله خارج شده و در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند سپس سارکوسیست‌ها

۵ دقیقه، ۳۰ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد.

۲-۵- بهینه‌سازی پارامترهای PCR

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

۱۲ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و ۳ میکرولیتر بافر X ۱۰ و ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم (۱/۷۵ میلی‌مولار) و ۰/۵ میکرولیتر dNTP و ۲ میکرولیتر آغازگر (۱۰ پیکومول) و ۱۰ میکرولیتر از DNA و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمرز استفاده شد که حجم کلی محلول واکنش ۳۰ میکرولیتر بود. پس از پایان تکثیر، ۵ میکرولیتر از محصول PCR به روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) الکتروفورز شد باندهای حاصل مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای نمونه‌های DNA *Neospora* و توکسوپلازما (*Toxoplasma*) نیز در کنار نمونه‌های سارکوسیستیس تحت مطالعه قرار گرفت.

۲-۶- افزودن آنزیم‌های برش‌دهنده برای RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

آنزیم‌های *EcoRI*, *HincII*, *TaqI*, *AvaI* که جایگاه‌های برش آن‌ها به روی قطعه تکثیر شده در هر گونه مشخص است انتخاب و سپس شرایط مطلوب تأثیر آنزیم ارزیابی شد. مقادیر ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR و ۲ میکرولیتر از بافر X ۱۰ آنزیم و مقادیر ۱، ۲ و ۳ میکرولیتر آنزیم (۸-۱۰ واحد) و باقی‌مانده آب مقطر تزریقی اضافه شد تا حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس زمان‌های ۴، ۱۰ و ۱۶ ساعت آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

ابتدا یک‌بار با نرمال سالین استریل و دو بار با بافر TE (Tris-EDTA) (۱ میلی‌مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار) (pH = ۸) شستشو داده شدند.

۲-۲- مطالعه عضلات از لحاظ آلودگی به سارکوسیست

برای مطالعه عضلات از لحاظ آلودگی به سارکوسیست مجموعاً ۶۰ نمونه عضله با روش‌های گسترش مہری (Dob Smear) و هضمی مورد آزمایش قرار گرفتند در نتیجه، ۴۰ نمونه به کیست‌های ماکروسکوپی و ۲۰ نمونه به کیست‌های میکروسکوپی آلوده تشخیص داده شد.

۲-۳- استخراج DNA ژنومی

ابتدا نمونه عضلات را از فریزر خارج و در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت Cinnagen و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. مرحله رسوب DNA با اتانول انجام شد: سپس DNA به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

۲-۴- طراحی آغازگرهای PCR (Primers)

توالی کامل ژن rRNA ۱۸S سارکوسیستیس تنلا (L24383) و سارکوسیستیس آریتی کئیس (L24382) و سارکوسیستیس ژینگانته آ (L24384) از <http://www.ncbi.nih.gov/nucleotide> انتخاب شد. سپس با استفاده از این توالی و با کمک برنامه Gene Runner یک جفت آغازگر طراحی شد. طول بهینه بازها در حدود ۱۹-۲۰ باز است و دمای ذوب مطلوب ۵۸-۶۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت GC تقریباً ۶۰ درصد بوده است.

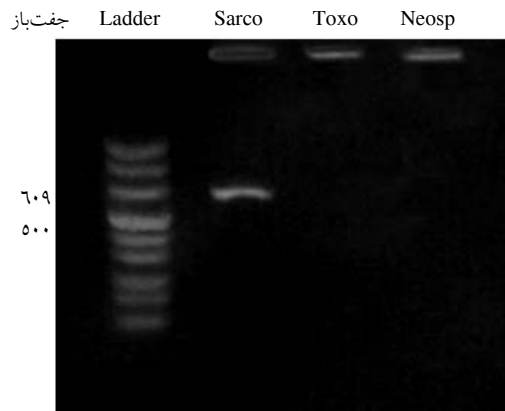
(Sar-F1): 5' GCA CTT GAT GAA TTC TGG CA 3'

(Sar-R1): 5' CAC CAC CCA TAG AAT CAA G 3'

شرایط PCR: یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت

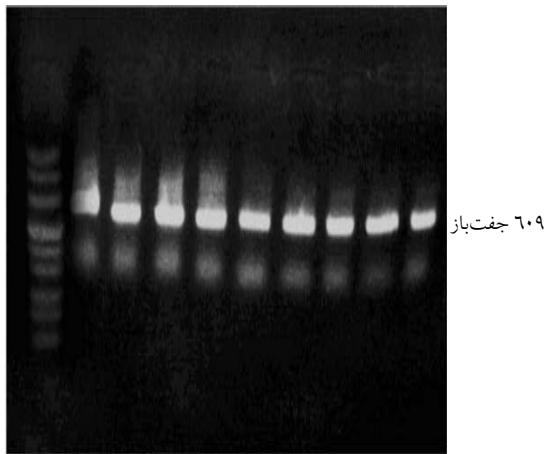
۲-۷- الکتروفورز نمونه‌های RFLP شده

سارکوسیستیس را مشخص نمود.



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن 18S rRNA که در آن قطعه 609 جفت‌بازی فقط برای سارکوسیستیس تکثیر شده است. از چپ به راست: ردیف ۱: نشانگر (Marker)، ردیف ۲: سارکوسیستیس، ردیف ۳: توکسوکارا، ردیف ۴: نئوسپورا.

آنزیم *EcoRI* گونه تنلا را برش نمی‌زند ولی گونه ژینگانته‌آ را در جایگاه ۱ و ۴ و گونه آریتی‌کنیس را در جایگاه‌های ۲، ۵ و ۶ برش می‌زند، پس انتظار می‌رود در باند 609 جفت‌بازی تغییر چندان محسوسی مشاهده نشود.



شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR ژن 18S rRNA که در آن قطعه 609 جفت‌بازی برای چندین نمونه سارکوسیستیس تکثیر شده است.

HincII گونه‌های تنلا و آریتی‌کنیس را برش نمی‌زند ولی گونه ژینگانته‌آ را در جایگاه ۱ و ۱۱ برش می‌زند. پس انتظار می‌رود دو باند ۴۱۰ و ۱۹۸ جفت‌بازی مشاهده شود. آنزیم *TaqI* گونه تنلا را در جایگاه ۱ و ۳۳۴ و گونه

ابتدا ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید تهیه شد. نمونه‌های آنزیم زده شده و محصول PCR همان نمونه قبل از افزودن آنزیم و پس از افزودن آنزیم در چاهک‌ها کنار هم در سمت کاتد لود (Load) شدند و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق الکتروفورز شدند. پس از پایان زمان الکتروفورز ژل از باندهای مشاهده شده عکس برداری شد.

۳- نتایج

در مطالعه حاضر مجموعاً ۶۰ نمونه بافت‌های عضلات بین دنده‌ای و دیافراگم از گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه زیاران قزوین جمع‌آوری شد که با روش‌های هضمی و گسترش مهری ۱۰۰ درصد عضلات مورد مطالعه حاوی انگل تشخیص داده شدند که ۴۰ نمونه آن حاوی کیست‌های ماکروسکوپی و ۲۰ نمونه آن حاوی کیست‌های میکروسکوپی بوده است. معمولاً گونه‌های سارکوسیستیس ژینگانته‌آ و سارکوسیستیس مدوزیفورمیس دارای کیست‌های ماکروسکوپی و گونه‌های سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی‌کنیس دارای کیست‌های میکروسکوپی هستند و برای تفکیک این گونه‌ها از یکدیگر از روش مولکولی استفاده شد.

۳-۱- نتایج PCR

از تکثیر ژن 18S rRNA مربوط به نمونه‌های DNA نئوسپورا و توکسوپلازما با آغازگر طراحی شده هیچ بانندی مشاهده نشد. در نتیجه آغازگرها کاملاً اختصاصی بوده و جنس سارکوسیستیس را از سایرین متمایز می‌سازد (شکل ۱).

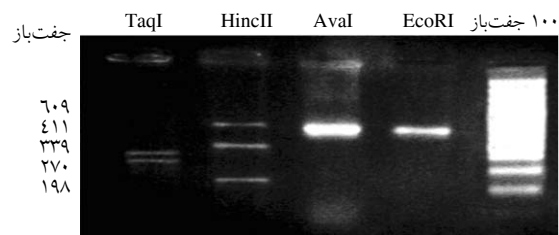
نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن 18S rRNA سارکوسیستیس قطعه‌ای 609 جفت‌بازی را نشان داد (شکل ۲).

۳-۲- نتایج RFLP

نتیجه برش قطعه تکثیر شده 18S rRNA با هر یک از آنزیم‌های *EcoRI*, *HincII*, *TaqI*, *AvaI* سه گونه

در شکل ۴ الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۸S rRNA سارکوسیتیس مربوط به ماکروکیست‌های جدا شده از گوسفند است که در آن قطعه ۶۰۹ جفت‌بازی با آنزیم‌های *TaqI*, *HincII*, *AvaI*, *EcoRI* برش داده شده است و همگی نمونه‌ها دارای الگوی واحد بودند؛ بدین ترتیب که همگی در اثر آنزیم *TaqI* برش خورده و دو باند ۲۷۰، ۳۳۸ جفت‌بازی و در مقابل آنزیم *HincII* نیز برش خورده و باندهای ۴۱۱ و ۱۹۸ جفت‌بازی را نشان دادند ولی در مقابل سایر آنزیم‌ها هیچ‌گونه برشی مشاهده نشد. این الگوی RFLP با الگوی سارکوسیتیس ژینگانته‌آ کاملاً مطابقت دارد (شکل ۴).

به‌طور کلی آنزیم *TaqI* گونه‌های آرتی‌کانیس و تنلا که به کیست‌های میکروسکوپی متعلقند و همچنین آنزیم‌های *TaqI* و *HincII* گونه‌های ژینگانته‌آ و مدوزیفورمیس که به کیست‌های ماکروسکوپی متعلق هستند را به‌راحتی از هم تفکیک می‌کنند.



شکل ۴ الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۸S rDNA سارکوسیتیس ژینگانته‌آ جدا شده از گوسفند که در آن قطعه ۶۰۹ جفت‌بازی با آنزیم‌های *EcoRI*, *AvaI* و *HincII* برش داده شده است. (از چپ به راست) ردیف ۱: برش قطعه با *TaqI* (دو باند ۳۳۸، ۲۷۰)، ردیف ۲: برش قطعه با آنزیم *HincII* (سه باند ۶۰۹، ۴۱۱ و ۱۹۸)، ردیف‌های ۳، ۴: برش قطعه با *EcoRI* و *AvaI* (بدون برش) و ردیف ۵: نشانگر (۱۰۰ جفت‌بازی) را نشان می‌دهد.

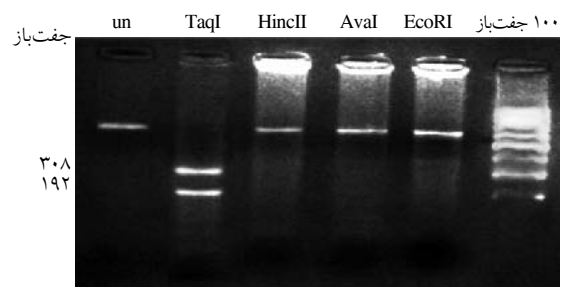
۴- بحث

سابقاً گونه‌های سارکوسیتیس را براساس خصوصیات ریخت‌شناسی کیست‌ها (شکل اندازه و ضخامت دیواره)، میزبانان اختصاصی، خصوصیات فرا ریزی‌نی دیواره کیست و خصوصیات ایزوآنزیمی گونه‌ها طبقه‌بندی می‌کردند. در سال‌های اخیر از روش‌های مولکولی برای تشخیص گونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف سارکوسیتیس استفاده شده است. در این

ژینگانته‌آ را در جایگاه ۱ و ۳۳۹ و گونه آرتی‌کانیس را در جایگاه‌های ۳، ۵۱، ۱۰۹ و ۳۰۱ را برش می‌زند، پس انتظار می‌رود باندهای ۲۷۵ و ۳۳۳ جفت‌بازی در گونه تنلا و باندهای ۲۷۰ و ۳۳۸ جفت‌بازی در گونه ژینگانته‌آ و باندهای ۴۸، ۵۸، ۱۹۲، و ۳۰۸ جفت‌بازی در گونه آرتی‌کانیس مشاهده شود.

آنزیم *AvaI* در گونه تنلا جایگاه‌های ۲، ۳۴ و ۱۰۸ را برش می‌زند پس انتظار می‌رود باندهای ۳۲، ۷۴ و ۵۰۱ جفت‌بازی مشاهده شود. ولی گونه‌های ژینگانته‌آ و آرتی‌کانیس را برش نمی‌زند. باندهای به‌دست آمده پس از الکتروفورز مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. الکتروفورز هر نمونه برش شده با آنزیم در کنار محصول PCR همان نمونه، قبل از افزودن آنزیم به چاهک‌ها افزوده و الکتروفورز شد. باندهایی که در اثر برش آنزیم ایجاد شده تشخیص داده شد.

در شکل ۳ الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۸S rRNA سارکوسیتیس مربوط به میکروکیست‌های جدا شده از گوسفند که در آن قطعه ۶۰۹ جفت‌بازی با آنزیم‌های *HincII*, *AvaI*, *EcoRI* و *TaqI* برش داده شده است و همگی نمونه‌ها دارای الگوی واحد بودند؛ بدین ترتیب که همگی در اثر آنزیم *TaqI* دو باند ۱۹۲، ۳۰۸ جفت‌بازی را نشان دادند ولی در مقابل سایر آنزیم‌ها هیچ‌گونه برشی مشاهده نشد. این الگوی RFLP با الگوی سارکوسیتیس آرتی‌کانیس کاملاً مطابقت دارد (شکل ۳).



شکل ۳ الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۸S rDNA سارکوسیتیس آرتی‌کانیس جدا شده از گوسفند که در آن قطعه ۶۰۹ جفت‌بازی با آنزیم‌های *EcoRI*, *AvaI* و *HincII* برش داده شده است. (از چپ به راست) ردیف ۱: محصول قبل از برش، ردیف ۲: برش قطعه با *TaqI* (دو باند ۱۹۲، ۳۰۸ و باندهای ۴۸، ۵۸ که قابل مشاهده نیستند)، ردیف‌های ۳، ۴، ۵ و ۶: برش قطعه با *EcoRI*، *AvaI* و *HincII* و ردیف ۷: نشانگر (۱۰۰ جفت‌بازی) را نشان می‌دهد.

در سال ۱۹۹۷ مطابقت دارد. در آن مطالعه براساس توالی ژنی قطعه ۱۸S rRNA گونه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا سارکوسیستیس دامی و سایر کوکسیدیاهای کیست‌زا مورد بررسی فیلوژنتیکی قرار گرفته‌اند [۱۹].

نتایج نشان دادند که سیستی‌زوئیت‌هایی (Cystozoites) که از نظر شکل و اندازه ظاهری یکسان دارند پس از تکثیر قطعه و برش با آنزیم‌ها و روی ژل باندهایی با الگوی مشابه دارند، بنابراین طبق نتایج این مطالعه کیست‌های ماکروسکوپی به‌عنوان سارکوسیستیس ژینگانته‌آ و کیست‌های میکروسکوپی به‌عنوان سارکوسیستیس آریتی‌کنیس تشخیص داده شد. این اولین گزارش تشخیص مولکولی سارکوسیستیس ژینگانته‌آ و سارکوسیستیس آریتی‌کنیس در ایران است.

سارکوسیستیس آریتی‌کنیس دارای انتشار جهانی است و از مناطقی مانند اروپا، استرالیا، نیوزیلند، ایالات متحده آمریکا گزارش شده است. میزبان قطعی این گونه سگ و سگ‌سانان هستند. سارکوسیستیس‌ها در عضلات مخطط گوسفندان یافت می‌شود و طول آن‌ها تا ۹۰۰ میکرومتر می‌رسد. سارکوسیستیس آریتی‌کنیس بیماری‌زاست ولی شدت آن کمتر از سارکوسیستیس تنلا است [۱].

سارکوسیستیس ژینگانته‌آ یا سارکوسیستیس اووی‌فلیس (*S. ovis*) دارای انتشار جهانی است. میزبان قطعی آن گربه اهلی گزارش شده است. سارکوسیستیس‌های سارکوسیستیس ژینگانته‌آ در عضلات مری، حنجره، زبان و تا حد کمتری در دیافراگم و سایر عضلات گوسفندان یافت می‌شوند. سارکوسیستیس‌ها در عضلات قلب و سیستم اعصاب مرکزی وجود ندارند. سارکوسیستیس‌های ماکروسکوپی در گوسفندان مسن دیده می‌شود. این سارکوسیستیس‌ها تا یک سانتی‌متر طول داشته به رنگ سفید کدر با شکل کروی بیضوی یا گلابی شکل بوده و گاهی به دانه‌های برنج شباهت دارند. سارکوسیستیس ژینگانته‌آ بیماری‌زایی خفیفی برای گوسفند دارد.

در اثر آلودگی حاد به گونه‌های تنلا و آریتی‌کنیس ممکن است سقط جنین گوسفندی رخ دهد [۲۰-۲۲]. از طرفی طبق مطالعات انجام شده در برخی از مناطق ایران حدود

رابطه می‌توان به مطالعات تتر و همکاران (۱۹۹۲)، هولمدال و همکاران (۱۹۹۳)، تتر و همکاران (۱۹۹۴) تتر (۱۹۹۵)، جفریز و همکاران (۱۹۹۶)، جواشیم و همکاران (۱۹۹۶)، ماگریچ و همکاران (۱۹۹۹) و هکروت و تتر (۱۹۹۹) یانگ و همکاران (۲۰۰۲) اشاره کرد [۱۰-۱۸]. در اکثر این مطالعات توالی ژن زیرواحد کوچک rRNA برای بررسی رابطه فیلوژنتیک گونه‌های سارکوسیستیس با یکدیگر و با سایر کوکسیدیاهای (Coccidia) کیست‌زا مانند توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) و نئوسپورا کانینوم (*Neospora caninum*) به‌کار گرفته شده است. از آنجایی که این مطالعات همه براساس 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 جفت‌باز بوده است.

در مرحله بعد آنزیم برش‌دهنده مناسب انتخاب شد. این آنزیم‌ها پس از برش قطعه، برای هر گونه، الگوی الکتروفورزی یا باندهایی با اندازه متفاوت ایجاد می‌کند. الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۸S rRNA سارکوسیستیس مربوط به میکروکیست‌های جدا شده از گوسفند است که در آن قطعه ۶۰۹ جفت‌بازی با آنزیم‌های *TaqI*, *HincII*, *AvaI*, *EcoRI* برش داده شده است و همگی نمونه‌ها دارای الگوی واحد بودند؛ بدین ترتیب که همگی در اثر آنزیم *TaqI* دو باند ۱۹۲، ۳۰۸ جفت‌بازی را نشان دادند ولی در مقابل سایر آنزیم‌ها هیچ‌گونه برشی مشاهده نشد. این الگوی RFLP با الگوی سارکوسیستیس آریتی‌کنیس کاملاً مطابقت دارد. از طرفی محصول تکثیر یافته ژن مذکور در نمونه ماکروکیست‌های سارکوسیستیس ژینگانته‌آ در مقابل آنزیم *TaqI* برش خورده دو باند ۲۷۰، ۳۳۸ جفت‌بازی و در مقابل آنزیم *HincII* نیز برش خورده و باندهای ۴۱۱ و ۱۹۸ جفت‌بازی را نشان داد ولی در مقابل سایر آنزیم‌ها هیچ‌گونه برشی مشاهده نشد. بنابراین در روش PCR-RFLP برای تفکیک گونه‌های متعلق به کیست‌های میکروسکوپی گوسفندان بهترین آنزیم، *TaqI* و برای تفکیک گونه‌های متعلق به کیست‌های ماکروسکوپی گوسفندان بهترین آنزیم‌ها، *TaqI* و *HincII* هستند. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه تتر و جانسون (Johnson)

سریع تر و با صرفه تر است.

در مرحله حاد ابتلا به سارکوسیستیس تنلا و آریتی کانیس انگل در خون با روش PCR قابل ردیابی است [۱۷]. با توجه به نقش این دو گونه انگل در ایجاد سقط جنین در میش های آبستن، انجام آزمایش های PCR-RFLP اختصاصی سارکوسیستیس روی خون برای علت یابی وقوع سقط جنین می تواند موضوعی جدید و قابل تأمل باشد.

۵- تشکر قدردانی

مقاله حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۸۵۰۳۶-۲۴-۰۰۰۰-۲۴-۰۲۴-۲ مصوب مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی است و کلیه اعتبارات آن توسط مؤسسه مذکور تأمین شده است. بنابراین نویسندگان از مسئولین و همکاران محترم معاونت پژوهشی، بخش های انگل شناسی و بیوتکنولوژی و همچنین سازمان دامپزشکی کشور خصوصاً آقایان دکتر مشکوه و دکتر نجار نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

۱۰۰ درصد گوسفندان آلوده به سارکوسیستیس هستند [۸، ۹]. بنابراین برای تشخیص گونه های بیماری زای سارکوسیستیس در دام زنده به روش بسیار حساس و اختصاصی نیاز است روش های سرولوژیکی از قبیل روش های الایزا (Enzyme-Linked immunosorbent Assay: ELISA) و IFA (Indirect Fluorecent Antibody) گرچه قادر به تشخیص آلودگی هستند ولی برای تفکیک گونه های بیماری زا از غیر بیماری زای سارکوسیستیس فاقد کارآمدی لازم هستند [۱۷]. بنابراین با روش سرولوژی نمی توان به درستی عامل سقط جنین را تشخیص داد.

در مطالعه حاضر با طراحی الیگونوکلوئوتید اختصاصی برای سارکوسیستیس گوسفندی ابتدا جنس سارکوسیستیس از سایر کوکسیدیاهای سازنده کیست بافتی از قبیل توکسوپلاسما تفکیک داده شد. سپس گونه های بیماری زا و غیر بیماری زا با روش RFLP از همدیگر متمایز شدند. مطالعه حاضر نشان داد که بر مبنای روش PCR-RFLP گونه های سارکوسیستیس گوسفندی را می توان از هم تفکیک کرد، این روش از روش DNA Sequencing

۶- منابع

- [1] Dubey JP, Speer CA, Fayer R. Sarcocystosis of animals and man. Boca Raton: Florida, CRC Press 1989; p: 95-9.
- [2] Collins GH, Atkinson E, Charleston WA. Studies on Sarcocystis species III: The macrocystic species of sheep. N Z Vet J 1979; 27: 204-6.
- [3] Afshar A, Naghshineh R, Neshat H. Incidence of sarcosporidiosis in sheep in Iran. Trop Anim Health Prod 1974; 6(4): 192.
- [4] Oryan A, Moghaddar N, Gaur SN. The distribution pattern of Sarcocystis species, their transmission and pathogenesis in sheep in Fars province of Iran. Vet Res Commun 1996; 20(3): 243-53.
- [5] Irajli N. Survey on Sarcocystosis in ruminants slaughtered in Khoi city. Presented for DVM Uromia, Uromia University, 1995. (Persian)
- [6] Razmi Gh, Rahbari S. Survey on Sarcocystosis in domesticated ruminants slaughtered in Tehran and Golestan provinces. IVJ, 2000; 4:39-46. (Persian)
- [7] Shekarforoush SSh, Alikhani R. Prevalence of sarcocyst in slaughtered sheep in Isfahan, Iran. Pajouhesh & Sazandegi 2003; 58: 68-72. (Persian)
- [8] Arshad M, Dalimi A, Ghaffarifar F. Comparative study on sarcocystis diagnosis in meat of slaughtered sheep in Tabriz. Pajouhesh &

- Sazandegi 2007; 75: 68-72. (Persian)
- [9] Razavi SM, Shekarforoush SS, Farahani M, Sarihi K. Prevalence of Sarcocyst in slaughtered sheep in Shiraz, Iran. *J Vet Parasitol* 2003; 17(2): 139-41.
- [10] Tenter AM, Baverstock PR, Johnson AM. Phylogenetic relationships of Sarcocystis species from sheep, goats, cattle and mice based on ribosomal RNA sequences. *Int J Parasitol* 1992; 22(4): 503-13.
- [11] 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.
- [12] Tenter AM, Luton K, Johnson AM. Species-specific identification of Sarcocystis and Toxoplasma by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. *Appl Parasitol* 1994; 35(3): 173-88.
- [13] Tenter AM. Current research on Sarcocystis species of domestic animals. *Int J Parasitol* 1995; 25(11): 1311-30.
- [14] Jeffries AC, Amaro N, Tenter AM, Johnson AM. Genetic diversity in Sarcocystis gigantea assessed by RFLP analysis of the ITS1 region. *Appl Parasitol* 1996; 37(4): 275-83.
- [15] Joachim A, Tenter AM, Jeffries AC, Johnson AM. A RAPD-PCR derived marker can differentiate between pathogenic and non-pathogenic Sarcocystis species of sheep. *Mol Cell Probes* 1996; 10(3): 165-72.
- [16] Mugridge NB, Morrison DA, Johnson AM, Luton K, Dubey JP, Votýpka J, Tenter AM. Phylogenetic relationships of the genus Frenkelia: a review of its history and new knowledge gained from comparison of large subunit ribosomal ribonucleic acid gene sequences. *Int J Parasitol* 1999; 29(6): 957-72.
- [17] Heckerroth AR, Tenter AM. Development and validation of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystiosis in sheep. *Int J Parasitol* 1999; 29(8): 1331-49.
- [18] 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.
- [19] Tenter, AM, Johnson AM. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv Parasitol* 1997; 39: 69- 139.
- [20] Leek RG, Fayer R. Sheep experimentally infected with Sarcocystis from dogs. II. Abortion and disease in ewes. *Cornell Vet* 1978, 68(1): 108-23.
- [21] Munday BL. Premature parturition in ewes inoculated with Sarcocystis ovis. *Vet Parasitol* 1981; 9(1): 17-26.
- [22] Fayer R, Dubey JP. Sarcocystis induced abortion and fetal death. *Prog Clin Biol Res* 1988; 281: 153-64.

