

## بررسی فراریزینی کیست های ماکروسکوپیک گونه های سارکوسیستیس گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه زیاران قزوین

• عبدالحسین دلیمی (نویسنده مسئول)

استاد انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• عباس نوری

استادیار انگل شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• محسن ولی زاده

کارشناس ارشد انگل شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۹۱

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۰۴۷۹۳۱

Email: dalimi\_a@modares.ac.ir

### چکیده

سارکوسیستیس یک کوکسیدیای دومیزبانه اجباری بین گوشتخواران (میزبان اصلی) و علفخواران (میزبان واسط) است. در میزبانان واسط اندازه و شکل دیواره کیست در ارتباط با گونه انگل متفاوت است. خصوصیات ساختمانی و فراریزینی دیواره کیست می تواند شاخص خوبی برای تشخیص گونه انگل می باشد. در مطالعه حاضر ساختمان فراریزینی دیواره سارکوسیستیس جدا شده از گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه زیاران قزوین مورد بررسی قرار گرفته شد. کیست های ماکروسکوپیک جدا شده از عضلات گوسفند ابتدا با بافر فسفات سالین شستشو و در گلو تار آلدئید ۳ درصد فیکس شدند و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن ۴۰۰ (TEM۴۰۰) مورد مطالعه قرار گرفتند. کیست های ماکروسکوپیک درون عضلات با دیواره اولیه احاطه شده اند. با توجه به خصوصیات فراریزینی دیواره اولیه کیست ها دو گونه *S. gigantea* و *S. medusiformis* تشخیص داده شد. دیواره کیست *S. gigantea* در بزرگنمایی ۱۲۰۰× دارای برآمدگی های گل کلمی به ابعاد ۲/۵ میکرون و *S. medusiformis* در بزرگنمایی ۷۵۰۰× دارای زائده های پرز مانند ذوزنقه ای شکل به ابعاد ۲/۴ - ۱/۱ میکرون بوده است.

کلمات کلیدی: *S. medusiformis* و *S. gigantea*، فراریزینی، گوسفند، قزوین

Veterinary Journal (Pajouhesh &amp; Sazandegi) No 97 pp: 42-47

**Cyst wall ultrastructure of Sarcocystis spp. isolated from slaughtered sheep in Qazvin, Iran**

By: A. Dalimi (Corresponding Author; Tel: +98 21 82883838) Professor, Parasitology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Nouri, A. Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran and Valizadeh, M. instructor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Sarcocystis is a coccidia protozoan develops obligatory in two hosts consisting of the herbivores as an intermediate host (prey) and the carnivores as a host (predator). Depend on species, the size of cysts and structure of cyst wall in intermediate hosts are different. The ultrastructure of Sarcocystis cysts (Sarcocysts) could be a good indication for diagnosis of the parasite species. In the present study the ultrastructure of macroscopic Sarcocystis isolated from slaughtered sheep in Qazvin Ziara slaughterhouse were investigated. The macroscopic cysts isolated from sheep muscles were fixed in 3% glutaraldehyde following washing with buffer phosphate. Ultrastructural characters of the cysts were studied using transmission electron microscope (TEM400). The macroscopic cysts were located within muscles and were limited by a primary cyst wall (PCW). According to ultrastructural characters of PCW, two species of Sarcocystis, *S. gigantea* and *S. medusiformis* were identified as macroscopic cyst in sheep. The primary cyst wall of *S. gigantea* having cauliflower-like protrusions at 12000× magnification and *S. Medusiformis* having villous like protrusions at 7500× magnification.

**Key words:** Sarcocystis, Transmission electron microscope, *S. gigantea*, *S. medusiformis*, Sheep, Qazvin, Iran.

**مقدمه**

سارکوسیستیس تک یاخته ای است که در شاخه اپی کمپلکسا طبقه بندی شده است. سه گونه این تک یاخته بین انسان و دام مشترک بوده و چرخه آن بین گوشتخواران و علفخواران اهلی می باشد (Dubey و همکاران ۱۹۸۹). این انگل علاوه بر انسان تعداد زیادی از پستانداران و همچنین گونه های مختلف پرندگان را آلوده می سازد (Dubey و همکاران، ۱۹۸۹ و Collins و همکاران ۱۹۷۹). سارکوسیست ها کیست های بافتی انگل سارکوسیستیس است که دارای دیواره خاص بوده و مراحل متروسیست یا زوئیت انگل را احاطه می نماید. ساختمان و ضخامت دیواره کیست در بین گونه های مختلف سارکوسیستیس متفاوت است (Dubey و همکاران، ۱۹۸۹ و Collins و همکاران ۱۹۷۹).

برای طبقه بندی گونه های سارکوسیستیس معمولاً از شاخص هایی از قبیل خصوصیات مرفولوژی کیست ها (شکل اندازه و ضخامت دیواره)، میزبانان اختصاصی، خصوصیات فراریزی بینی دیواره کیست، خصوصیات آیزو آنزیمی و خصوصیات مولکولی گونه ها استفاده می شود. در سال ۱۹۷۲ طبقه بندی جدیدی بر اساس اختصاصی بودن میزبان نهائی ارائه گردید. (Levin و همکاران در ۱۹۸۰) ولی بعدها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ثابت شد که موضوع اختصاصی بودن برخی از گونه ها به میزبانان خاص فاقد جامعیت لازم است (Crum و همکاران در سال ۱۹۸۱، Fayer و همکاران در سال ۱۹۸۲، آسترید و همکاران در سال ۱۹۹۵ و Donoghue و همکاران در سال ۱۹۸۶). در میزبانان واسط اندازه و شکل کیست در ارتباط با گونه انگل متفاوت است. برخی از کیست ها میکروسکوپی بوده و برخی دیگر ماکروسکوپی

به اشکال رشته ای یا شبیه دانه برنج یا کروی می باشند. خصوصیات ساختمانی و فراریزینی دیواره کیست می تواند شاخص خوبی برای تشخیص اولیه نسبت به روش های هضمی و هیستوپاتولوژیکی انگل باشد (دلیمی و همکاران در سال ۱۳۷۸، Odening و همکاران در سال ۱۹۹۵، Nigro و همکاران در سال ۱۹۹۱، Radchenko و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Velmmas و همکاران در سال ۱۹۸۹). در ایران تنها مطالعه صورت گرفته درباره سارکوسیستیس ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در مورد کیست های جدا شده از گاومیش بوده که گونه شناسائی شده در گاومیش های خوزستان سارکوسیستیس فوزی فورمیس بوده است (دلیمی و همکاران، ۱۳۷۸). در مطالعه حاضر تعدادی از سارکوسیست های جدا شده از گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه زیاران قزوین از لحاظ ریخت شناسی و ساختمان فراریزینی دیواره مورد مطالعه قرار گرفته اند.

**مواد و روش کار**

در این مطالعه به صورت تصادفی، ۵۰ گرم از عضلات دیافراگم، قلب و ران ۱۰۰ راس گوسفند ذبح شده در کشتارگاه زیاران قزوین نمونه برداری انجام شد. پس از جداسازی کیست ها از عضله، آنها را در فسفات بافر (PBS) شستشو داده شد. برای جلوگیری از فساد بافتی، نمونه ها بلافاصله به قطعات بافتی کوچک به ابعاد یک سانتی متر مکعب تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در محلول ۳ درصد گلو تار آلدئید تهیه شده در بافر فسفات (pH=۷) قرار داده شدند. در آزمایشگاه نمونه ها را از محلول فیکساتیو خارج و در محلول بافر فسفات به مدت ۲ ساعت و سپس به مدت ۲ ساعت در محلول ۲ درصد

و همکاران، ۱۹۹۶، Donoghو و همکاران، ۱۹۹۰ و Slupeta و همکاران در سال ۲۰۰۳). معمولاً پادگن های سارکوسیستیس های بیماری زا (*S. tenella* و *S. arieticanis*) با پادتن های گونه های غیر بیماری زا (*S. medusififormis* و *S. giguntena*) واکنش متقابل می دهند. در نتیجه آزمون های سرولوژیکی بیشتر اهمیت اپیدمیولوژیکی داشته و توانائی افتراق گونه های بیماری زا از غیر بیماری زا را ندارد (Heckeroth و همکاران، ۱۹۹۸، قراگزلو و همکاران، ۱۳۸۳، Mertens و همکاران، ۱۹۹۶).

گرچه امروزه استفاده از تکنیک های ایزوآنزیم و روش های مولکولی برای تشخیص گونه ها و استرین انگل ها رایج است ولی با این حال خصوصیات مورفولوژیکی و فراریز ساختمانی دیواره کیست های بالغ عضلات به عنوان یکی از معیارهای مفید برای شناسائی گونه ها هنوز دارای اعتبار بوده و مورد استفاده قرار می گیرد (Mehlhorn و همکاران در سال ۱۹۷۶). تاکنون چهار گونه سارکوسیستیس با نام های تنلا، آرتی کانیس، ژیگانتیه آ و مدوزیفورمیس در گوسفند شناخته شده اند.

مطالعات متعددی در مورد خصوصیات فراریزینی دیواره کیست سارکوسیستیس صورت گرفته است. این مطالعات نشان میدهند که دیواره کیست ها در گونه های مختلف دارای تنوع متمایز می باشند لذا می توان از این خصوصیت برای طبقه بندی سارکوسیستیس استفاده کرد (Mehlhorn و همکاران در سال ۱۹۷۵، Munday و Obendorf، ۱۹۸۴، Obendorf و Dubey، ۱۹۸۷ و همکاران ۱۹۸۹). کیست *S. giguntena* دارای دیواره صاف و نازک (کمتر از ۲ میکرومتر) و دیواره ثانویه است و *S. medusififormis* دارای دیواره نازک (کمتر از ۲ میکرومتر) و فاقد دیواره ثانویه است (Dubey و همکاران، ۱۹۸۹). در بررسی میکروسکوپ الکترونی دیواره سارکوسیست، زوائد شبیه گل کلم در گونه ژیگانتیه آ و زوائد پرزمانند ذوزنقه ای شکل در گونه مدوزیفورمیس مشاهده می شود (Dubey و همکاران، ۱۹۸۹).

با توجه به خصوصیات فراریزینی دیواره کیست ها در این مطالعه دو گونه *S. medusififormis* و *S. giguntena* تشخیص داده شد. نتایج این مطالعه با نتایج Munday و Obendorf در سال های ۱۹۸۴ و ۱۹۸۷ کاملاً مطابقت دارد.

کیست *S. giguntena* معمولاً در عضلات مری، زبان و تا حد کمتری در دیافراگم و بقیه لاشه یافت می شود. و قلب و سیستم اعصاب مرکزی را آلوده نمی سازند. معمولاً سارکوسیست های ماکروسکوپی این گونه در گوسفندان مسن دیده می شوند این سارکوسیست ها تا یک سانتی متر طول داشته و برنگ سفید کدر و شکل کروی، بیضوی و یا گلابی شکل بوده و گاهی اوقات به دانه های برنج شباهت دارد (Dubey و همکاران ۱۹۸۹). بیماری زایی این انگل برای گوسفند خفیف می باشد.

کیست *S. medusififormis* تا ۸ میلی متر طول و ۰/۲ میلی متر عرض داشته و در دیافراگم، عضلات شکم و لاشه یافت می شود (Dubey و همکاران ۱۹۸۹). این انگل نیز برای گوسفند غیر بیماری زاست.

اسمیوم تتراکسید قرار داده شدند. مراحل شستشو مجدد در بافر فسفات و مرحله آبگیری با درجات مختلف الکل اتیلیک انجام گردید. به منظور آماده نمودن بافت برای تهیه قالب رزینی، نمونه های بافتی حاوی کیست بمدت ۲ ساعت در محلول پروپیلن اکسید قرار داده شد. سپس به مدت ۱۲ ساعت در مخلوط ۵۰ به ۵۰ پروپیلن اکسید و محلول رزین Epon ۸۱۲ غوطه ور گردید. قبل از قرار دادن تکه های بافتی حاوی کیست در قالب ها مخصوص به مدت ۲ ساعت در محلول رزین ۱۰۰ درصد نگهداری شده و سپس به منظور قالب گیری نهایی در قالب های BEEM قرار داده شدند. پس از پایان انکوباسیون ۷۲ ساعته در دمای ۶۰ درجه، به منظور بررسی کیفیت مراحل فوق و شناسایی موقعیت و محل کیست در نمونه های بافتی با دستگاه اولترامیکروتوم مقاطع بسیار نازک تهیه و با تلوفیدین بلو رنگ آمیزی کرده و با میکروسکوپ نوری مطالعه آن انجام شد. پس از اطمینان از کیفیت و شناسایی کیست در بافت اقدام به تهیه مقاطع نازک با استفاده از چاقوی الماسه Diamond Knife گردید. مقاطع تهیه شده با استفاده از اورانیل استات و محلول سترات سرب رنگ آمیزی و به روی گریدهای شماره ۲۰۰ قرار داده شدند و پس از خشک نمودن کامل در فضای آزمایشگاه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل فیلیپس ۴۰۰ و با توان KV ۸۰ اقدام به مشاهده و تهیه تصاویر گردید.

### نتایج

با توجه به تصاویر الکترونی حاصل از مطالعه حاضر دو گونه *S. medusififormis* و *S. giguntena* تشخیص داده شد.

در اشکال ۱ و ۲، با توجه به زوائد گل کلمی بر روی دیواره کیست، می توان گفت که مشخصات نمونه با مشخصات دیواره کیست *S. giguntena* مطابقت دارد با عنایت به اینکه گونه های دیگر سارکوسیستیس گوسفندی فاقد این خصوصیات هستند لذا نمونه مذکور *S. giguntena* تشخیص داده شد. دیواره کیست *S. giguntena* در بزرگنمایی  $\times 12000$  دارای برآمدگی های گل کلمی به ابعاد  $2/5$  میکرون است. رشته های مو مانند از کنار و در بین زائده ها آن منشعب می شوند.

در اشکال ۳ و ۴، با توجه به زوائد پرز مانند ذوزنقه ای شکل بر روی دیواره کیست، می توان گفت که مشخصات نمونه با مشخصات دیواره کیست *S. medusififormis* مطابقت دارد. با عنایت به اینکه گونه های دیگر سارکوسیستیس گوسفندی فاقد این خصوصیات هستند لذا نمونه مذکور *S. medusififormis* تشخیص داده شد. *S. medusififormis* در بزرگنمایی  $\times 7500$  دارای زائده های پرز مانند ذوزنقه ای شکل به ابعاد  $2/4 - 1/1$  میکرون است و رشته های مو مانند از سطح و بین زائده های آن منشعب می شوند.

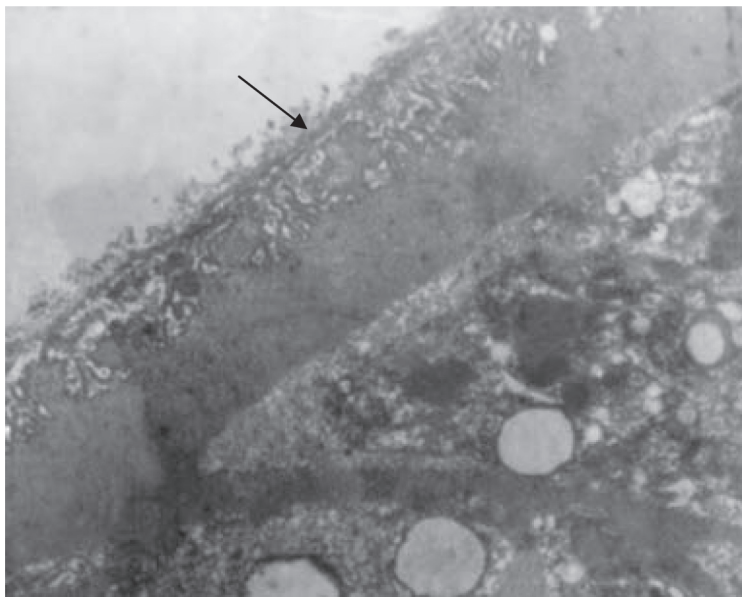
### بحث

تشخیص سارکوسیستیس در نشخوارکنندگان بر اساس ارزیابی آزمایشگاهی از قبیل روش های هیستوپاتولوژی و سرولوژیکی (از قبیل الایزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم) و روش مولکولی صورت می گیرد (Heckeroth و همکاران، ۱۹۹۸، Mertens

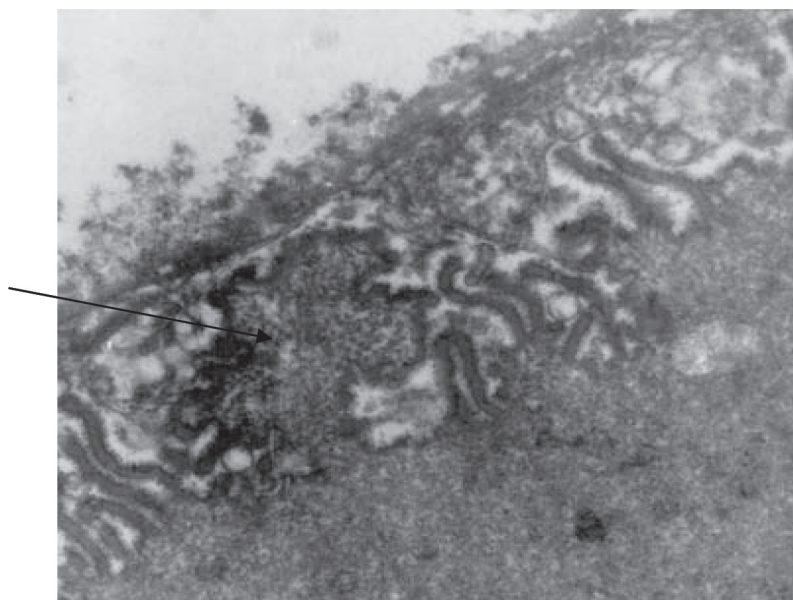
### منابع مورد استفاده

- 1- Dalimi A, Khodashenas M, Morovati H. (1999) A study on morphology and ultrastructure of Sarcocystis isolated from buffaloes in Khozestan. *Pajouhesh & Sazendegi*. 43:47-49.
- 2- Astrid MT. (1995) Current research on Sarcocystis species of domestic animals. *Int J Parasitol*. 25(11): 1311-1330.
- 3- Collins GH, Atkinson E, Charleston WAG. (1979) Studies on Sarcocystis species III: the macrocystic species of sheep. *New Zealand Vet J*. 27:204-206.
- 4- Crum JM, Fayer R, Prestwood AK (1981) Sarcocystis spp. In white-tailed deer. Definitive and intermediate host spectrum with a description of *Sarcocystis odocoileocanis* n.Sp. *J. Wildlife Dis*. 17:567-579.
- 5- Donoghue PJ, Adans M, Dixon BR, Ford GE, Baverstiock PR. (1986) Morphological and biochemical correlates in the characterization of Sarcocystis spp. *J.Parasitol*. ; 33 (1): 114-121.
- 6- Dubey JP, Speer CA, Fayer R. (1989) *Sarcocystosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton.
- 7- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA, Fayer R, Livingstone CW Jr. (1988) *Sarcocystis arieticanis* and other Sarcocystis species in sheep in the United States. *J Parasitol*. 74:1033-1038
- 8- Fayer R, Dubey JP, Leek RG. (1982) Infectivity of Sarcocystis spp. From bison, elk, moose and cattle for cattle via sporocysts from coyotes. *J Parasitol*. 68:681-685.
- 9- Heckerth AR, Tenter AM. (1998) 18S rDNA-based PCR : The first test for *in vivo* diagnosis of acute Sarcocystosis in sheep. *Parasitol Int*. 47(1): 223.
- 10- Levine ND, Tadros W. (1980) Named species and hosts of Sarcocystis (Protozoa: Apicomplexa Sarcocystidae). *Cyst. Parasitol.*; 2:41-60.
- 11- Mehlhorn H, Heydorn AO, Gestrich R. (1975) Licht- und elektronen mikroskopische Untersuchungen an cysten von *Sarcocystis ovicanis* Heydorn et al. in der Musculatur von Schafen. *Z Parasitenkd* 1975; 48:83-93
- 12- Mehlhorn H, Hartley WJ, Heydorn AO. (1976) A comparative ultrastructural study of the cyst wall of 13 *Sarcocystis species*. *Protistologica*. 12: 451-467.
- 13- Mertens CM, Tenter AM, Vietmeyer C, Ellis JT, Johnson AM. (1996) Production of a recombinant fusion protein of *Sarcocystis tenella* and evaluation of its diagnostic potential in an ELISA. *Vet Parasitol*. 65(3-4): 185-197.
- 14- Munday BL, Obendorf DL. (1984) Morphology of *Sarcocystis gigantea* in experimentally infected sheep. *Vet Parasitol*. 16:193-199.
- 15- Nigro M, Mancianti F, Rossetti P, Poli A. (1991) Ultrastructure of the cyst and life cycle of Sarcocystis sp. from wild sheep (*Ovis musimon*). *J W Dis*. 27(2): 217-224.
- 16- Obendorf DL, Munday BL. (1987) Experimental infection with *Sarcocystis medusiformis* in sheep. *Vet Parasitol*. 24:59-65.
- 17- Odenlmg K, Stolte M, Walter O, Bockhardt I. (1995) Cyst wall ultrastructure of two Sarcocystis spp. from European mouflon (*Ovis ammon musimon*) in Germany Compared with Domestic Sheep. *J W Dis*. 31(4): 550-554.
- 18- O'Donoghue P, Lumb R, Smith P, Brooker J, Mencke N. (1990) Characterization of monoclonal antibodies against ovine Sarcocystis spp. antigens by immunoblotting and immuno-electron microscopy. *Vet Immunol Immunopathol*. 24(1): 11-25.
- 19- O'Toole D. (1987) Experimental ovine sarcocystosis: sequential ultrastructural pathology in skeletal muscle. *J Comp Pathol*. 97:51-60.
- 20- Radchenko AI, Beier TV. (2004) Structural and functional characterization of cyst cells in Sarcocystis sp. (Sporozoa, Apicomplexa). *Tsitologiya*. 46(7):592-600 .
- 21- Slapeta JR, Modry, D, Votypka J, Jirku M, Lukes J, Koudela B. (2003) Evolutionary relationships among cyst-forming coccidia Sarcocystis spp. (Alveolata: Apicomplexa: Coccidia) in endemic African tree vipers and perspective for evolution of heteroxenous life cycle. *Mol Phylogen Evol*. 27(3): 464-475.
- 22- Vlemmas I, Kanakoudis G, Tsangaris Th, Theodorides I, (1989) Kaldrymidou E. Ultrastructure of *Sarcocystis tenella* (*Sarcocystis ovicanis*). *Vet Parasitol*. 33(3-4):207-217.

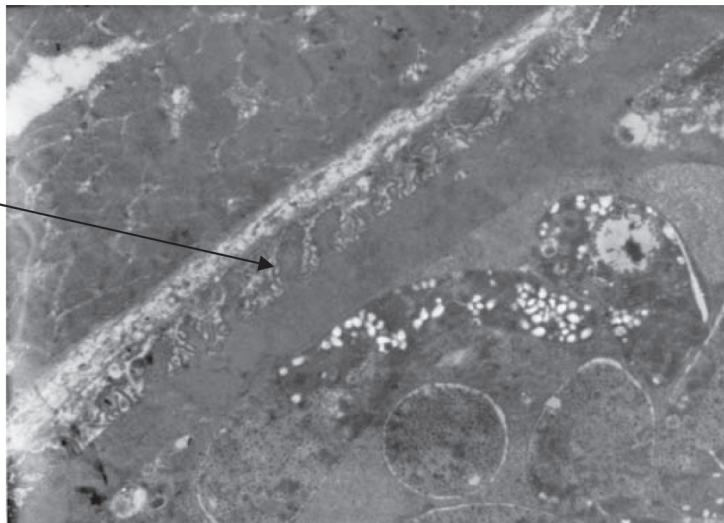




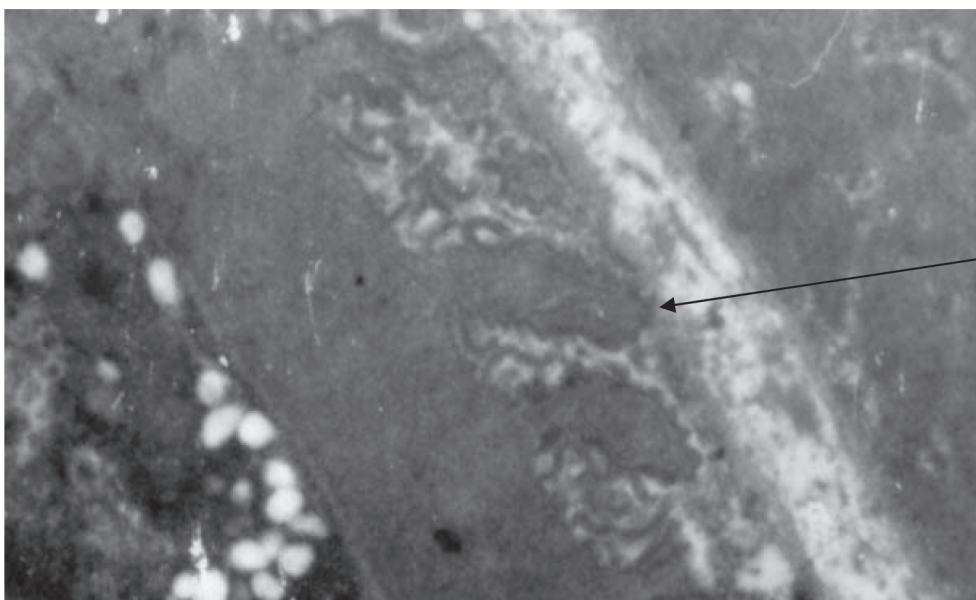
شکل ۱- نمای میکروسکوپ الکترونی دیواره کیست *S.gigantea* با بزرگنمایی  $\times 15000$ .  
زوائد گل کلمی دیواره با فلش نشان داده شده است.



شکل ۲- نمای میکروسکوپ الکترونی دیواره کیست *S.gigantea* با بزرگنمایی  $\times 47000$ .  
زوائد گل کلمی دیواره با فلش نشان داده شده است. دیواره کیست سارکوسیستیس ژیگانته آ در  
بزرگنمایی  $\times 47000$  دارای برآمدگی های گل کلمی به ابعاد  $2/5$  میکرون است. رشته های مو مانند از کنار  
و در بین زائده ها منشعب شده اند.



شکل ۳- نمای میکروسکوپ الکترونی دیواره کیست *S.medusiformis* با بزرگنمایی  $\times 9000$ .  
زوائد پرز مانند ذوزنقه ای شکل دیواره با فلش نشان داده شده است.



شکل ۴- نمای میکروسکوپ الکترونی دیواره کیست *S.medusiformis* با بزرگنمایی  $\times 15000$ . زوائد پرز مانند ذوزنقه ای شکل به ابعاد  $2/4 - 1/1$  میکرون دیواره با فلش نشان داده شده است. رشته های مو مانند از سطح و بین زائده ها منشعب شده اند.

■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■