نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۲ پاییز ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.106301

بررسی سارکوسیستیس در شتر و بز با میکروسکوپ الکترونی و PCR - RFLP

• **محمد اسلام پناه**
بخش آسیب شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **غلامرضا معتمدی (نویسنده مسئول)**
بخش انگل شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **عبدالحسین دلیمی**
بخش انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
• **عباس نوری**
بخش میکروسکوپ الکترونی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **غلامرضا حبیبی**
بخش تک یاخته شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **خسرو آقایی پور**
بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **محی الدین نیرومند**
بخش تحقیق و تولید واکسن های هوازی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۵

Email: peregra85@yahoo.com

چکیده

سارکوسیستیس یکی از بزرگ‌ترین گونه‌های تک‌یاخته در شاخه اپی کمپلکسا و رده اسپوروزوآ می‌باشد. سارکوسیستیس یکی از شایع‌ترین انگل‌های تک یاخته‌ای در حیوانات اهلی و وحشی است که گسترش جهانی دارد. بعضی از گونه‌های آن باعث آلودگی انسان می‌شود. در نتیجه این انگل از نظر دام‌پزشکی و پزشکی(زئونوز) دارای اهمیت می‌باشد. این مطالعه با هدف شناسائی میکروکیست و ماکروکیست گونه‌های سارکوسیستیس در اندام‌های مورد نظر شتر و بزهای ذبح شده در کشتارگاه با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی و PCR- RFLP انجام گرفت. ۱۶۶ نمونه بافتی تازه از شتر و بز کشتار شده جمع‌آوری و به کمک روش‌های مهری و هضمی، آلوده و غیرآلوده بودن آن‌ها تائید شد. نمونه‌های مثبت در ظرف حاوی سرم فیزیولوژی شسته و برای بررسی ساختار فراریزبینی دیواره کیست‌ها؛ آن‌ها را در گلوتارآلدئید ۴٪ و جهت بررسی مولکولی تا زمان استفاده در دمای ۲۰- قرار داده شدند. در این مطالعه نشان داده شده که شتر فقط به میکروکیست آلوده می‌شود و همگی یک گونه(سارکوسیستیس کملی) می‌باشند. در بز با توجه به توالی‌های به دست آمده در کیست‌های کوچک و بزرگ مشخص گردید که تشابه آن با سارکوسیستیس مولی نزدیک‌تر است. تجزیه و تحلیل توالی‌های بدست آمده نشان می‌دهد PCR- RFLP روشی مناسب برای تفکیک گونه‌های سارکوسیستیس در میزبان‌های متفاوت می‌باشد. بر اساس ساختار فراریزبینی دیواره کیست و اطلاعات مولکولی توالی DNA، ماکروکیست‌های ضخیم و نازک در بز می‌تواند یک گونه باشد.

کلمات کلیدی: سارکوسیستیس، بز، شتر، PCR- RFLP، میکروسکوپ الکترونی

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 112 pp: 77-84

Study of camel and goat Sarcocystis by electron microscopic and PCR- RFLP

By: Eslampanah, M., Depatment of Pathology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation. Motamedi, GH.R., (Corresponding Author) Depatment of Parasitology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation. Dalimi, A., Department of Parasitology. Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University; Noori, A., Depatment of Electron Microscopy, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation. Habibi, Gh.R., Depatment of Protozoology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation. Aghaeepour, Kh., Depatment of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation. Niroumand, M., Depatment of Aerobic Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation.

Email: peregra85@yahoo.com

Received: April 2015 Accepted: April 2015

Sarcocystis is one of the largest genera of the protozoan phylum apicomplexa, order sporozoa. It is one of the most prevalent parasites in domestic and wild animals, and is a worldwide distributed parasite. Certain species also infect humans, therefore it has economic and public health importance as a zoonosis. Diagnosis of Sarcocystis in camels and goats with Electron microscopy and PCR- RFLP methods and discriminating of different species of Sarcocystis in different hosts was carried out. 166 small pieces of tissues were collected from freshly slaughtered camels and goats by squash and trypsin digestion techniques were applied for the detection of the cysts. The infected organs fixed in glutaraldehyd and frozen at -20 until use for ultrastracturtural and molecular study, respectively. In this study no macrocyst were found in the samples of camels. In camels only microcysts were observed. The cysts in the goats may be probably *S. moulei* species. But to verify this statement needs more investigation. The results of this study will be helpful in discriminating of different species of Sarcocystis in different hosts. Based on ultrastructural cyst wall and molecular information of DNA sequences in goat, fat and thin macrocysts represent one species.

Key words: Sarcocystis, Electron microscopy , PCR - RFLP, Camel, Goat

مقدمه

سارکوسیستوزیس توسط گونه‌های سارکوسیستیس ایجاد می‌گردد. سارکوسیستیس تک‌یاخته‌ای داخل سلولی از شاخه اپی کمپلکسا می‌باشد. بر اساس گزارش‌های متعدد میزان آلودگی به این انگل در دام‌های مناطق مختلف دنیا ۱۰۰-۴۹٪ می‌باشد. این انگل انتشار جهانی دارد و از نظر بهداشت عمومی و جنبه اقتصادی و همچنین بعنوان یک بیماری مشترک بسیار پراهمیت است (۶ و ۱۲). تحقیقات نشان داده است که آلودگی شتر و بز به این انگل در ایران به ترتیب ۵۲/۳ و ۹۹/۴ درصد می‌باشد (۲۶و۲۷). با توجه به مصرف گوشت شتر و بز بعنوان منبع پروتئینی و اثبات وجود انگل در عضلات این دو حیوان احتمال وجود آلودگی در انسان از طریق این حیوانات دور از ذهن نمی‌باشد. به دلیل اهمیت این انگل از دو جنبه بهداشت عمومی و زیان اقتصادی می‌توان با بیماریابی و پیشگیری از بیماری در شتر و بز که بعنوان یک منبع انتشار بیماری در جامعه محسوب می‌شوند قدمی مفید برداشت (۱۸). اولین بار سارکوسیستیس در سال ۱۸۴۳ به صورت کیست‌های نخی شکل سفید رنگ در عضلات مخطط موش خانگی بوسیله میشر گزارش شد. کوهن در سال ۱۸۶۵ ساختارهای مشابهی در عضله خوک دید. اولین نام‌گذاری جنس انگل در سال ۱۸۸۲ توسط لانکستر انجام شده است. انگل در چرخه زندگی به دو میزبان شامل میزبان قطعی(شکارگر) ومیزبان واسط(شکار شونده) نیاز دارد. این تک یاخته عفونت روده‌ای را در میزبان قطعی و حمله بافتی در میزبان واسط ایجاد می‌کند. ساختمان میکروسکوپ الکترونی دیواره سارکوسیست معیار مفیدی برای شناسایی گونه‌ها می‌باشد، بطورمثال دیواره کیست چهار نوع سارکوسیست گوسفند با هم متفاوت می‌باشند. در بررسی چرخه زندگی انگل مشخص شده است که برخی سارکوسیست‌ها با ساختمان مشابه(بطورمثال *سارکوسیستیس تنلا* در گوسفند و *سارکوسیستیس کاپراکنیس* در بز) به علت اختصاصی بودن میزبان واسط گونه‌های متفاوتی هستند (۲۲ و ۲۴). برخی گونه‌های دیگر سارکوسیستیس(*سارکوسیستیس فالکاتولا* در طوطی) قادرند انواع متعدد میزبان‌ها را آلوده سازند. شکل و اندازه سارکوسیست بر حسب سن سارکوسیست، نوع یاخته میزبان و روش‌های مورد استفاده در بررسی، متفاوت است. تمامی گونه‌های سارکوسیستیس برای میزبانان واسط بیماری‌زا نیستند. گونه‌های قابل انتقال از طریق سگ‌سانان بیماری‌زاتر از گونه‌های قابل انتقال به وسیله

دیگر میزبانان قطعی‌اند. جهت جداسازی و نگهداری سارکوسیست‌ها را می‌توان به وسیله بازرسی ظاهری و ریزبینی عضلات آلوده، بررسی بافت شناسی و یا استفاده از روش هضمی در عضلات آشکار ساخت (۱۲و۱۰). سه گونه *سارکوسیستیس کاپراکنیس*، *سارکوسیستیس هیرسی کنیس*، *سارکوسیستیس مولی* در بز گزارش شده است (۱۲و ۹). اولین بار مولی، سارکوسیست‌های ماکروسکوپی در بز را از فرانسه (۱۸۸۸) گزارش نمود. سارکوسیست‌های ماکروسکوپی با دیواره نازک کمتر از یک میکرومتر و زوائد تکمه مانند و با طول بیشتر از ۴ و عرض ۲ میلی متر توصیف شده‌اند (۱۲و۱۱و۱). در شتر تنها یک گونه در *سارکوسیستیس کملی* نامگذاری شده است. برای اولین بار ماسون (۱۹۱۰) سارکوسیست‌ها را در عضلات مخطط از جمله قلب یک شتر در قاهره گزارش نمود. نامبرده دو نوع سارکوسیست، یکی با دیواره مخطط به ضخامت ۱ تا ۲ میکرومتر و دیگری با دیواره صاف نازک کمتر از یک میکرومتر را مشاهده کرد. به تصور ماسون هر دو سارکوسیست مراحل مختلف یک انگل بوده و آن‌ها را *سارکوسیستیس کملی* نام نهاد. میزبان قطعی این انگل سگ و جزء سارکوسیست‌های میکروسکوپی می‌باشد (۲۱). لذا این مطالعه با توجه به توضیحات فوق به منظور شناسائی میکروکیست و ماکروکیست گونه‌های سارکوسیستیس در شتر و بزهای ذبح شده در کشتارگاه با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی و PCR - RFLP انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

در کشتارگاه از عضلات مختلف ۵۰ نفر شتر و ۵۰ راس بز ذبح شده جهت مطالعه سارکوسیستیس در این دو حیوان نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌ها شامل عضلات مخطط، مری، دیافراگم، قلب (آلوده به سارکوسیست‌های ماکروسکوپی و یا با بررسی اولیه غیرآلوده) بودند. نمونه‌ها با تعیین مشخصات هر حیوان(سن، جنس و نوع حیوان) به آزمایشگاه منتقل شد. ابتدا نمونه‌ها از نظر وجود ماکروکیست‌های سارکوسیستیس بطور کامل بررسی شدند. در مرحله بعد اندام‌های مشکوک را برای آزمایش مهری، آزمایش بوسیله استریو میکروسکوپ و هضم به کمک پپسین-اسید به قطعات کوچکتر تقسیم نموده و برای بررسی وجود یا عدم وجود میکروکیست‌ها آماده شدند. نمونه‌های حاوی ماکروکیست و میکروکیست جدا مناسب شدند، کیست‌ها از بافت بیرون آورده شد و در ظرف حاوی ده میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی جمع آوری و شسته شدند (۴ و ۹).

بررسی با میکروسکپ نوری

برای تائید نمونه مثبت، قسمتی از نمونه بین لام و لامل له و بدون رنگ آمیزی با بزرگنمائی ۴۰۰× میکروسکوپ نوری جهت مشاهده میکروکیست و برادی زوئیت‌های سارکوسیستیس بررسی شد.

بررسی با میکروسکپ الکترونی

نمونه‌های مثبت جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی در سرم فیزیولوژی شستشو داده، به قطعات کوچک تقسیم و در بافر گلوتارآلدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس با تهیه گسترش بررسی ریخت‌شناسی فراریزبینی آن‌ها با میکروسکوپ الکترونی انجام شد (۸ و ۲).

بررسی مولکولی

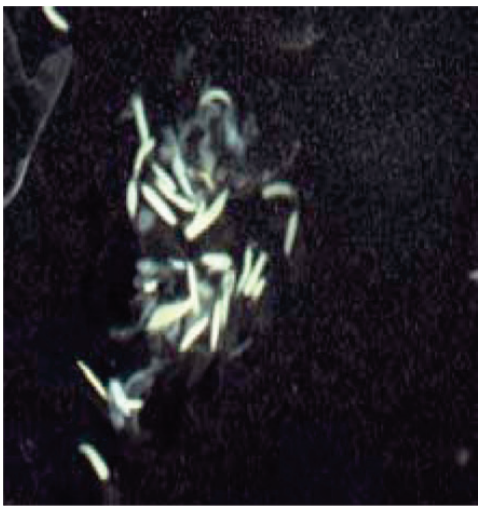
جهت استخراج DNA از کیت استخراج(High Yield DNA Purification Kit DNPTM Kit) شرکت سینا ژن استفاده شد. بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده نمونه‌ها بصورت تازه یا فریز شده(۲۰-c-) استفاده شدند. غلظت DNA با کمک نانو اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. تکثیر قطعه ژن ۱۸ Sr RNA به کمک جفت پرایمر طراحی شده: GCA CTT GAT '۵-F CAC CAC CCA TAG AAT CAA G '۵-R و GAA TTC TGG CA '۳ انجام گرفت. تعداد چرخه‌های PCR حدود ۳۵ مرتبه در نظر گرفته شد. نمونه‌های مثبت(محصول PCR) بر روی ژل برده و تخلیص DNA تکثیر یافته به وسیله کیت(Roche High (Pure PCR Product انجام و باندها را بریده و (OD) آن‌ها با دستگاه نانو دراپ ۱۰۰۰ خوانده شد. جهت تهیه محصولات خالص Plasmid DNA، از کیت AccuPrepR Plasmid Mini Extractin Kit مربوط به شرکت Bioneer, Republic of Korea استفاده شد. محصول بدست آمده در پلاسمید pTZ۵۷R/T پس از اتصال و کلون شدن، تعیین سکانس گردید. عملیات کلونینگ برای نمونه‌های مورد نظر با کیت(Fermentas InsT/AcloneTM PCRCloning Kit) با روش‌های Ligation و Transformation و Screening انجام شد. برای شناسایی گونه‌ها در آزمایش RFLP از آنزیم‌های محدود کننده((Mbo۱ -AvaII -Ecor۱– XbaI استفاده شده که شکست آنزیمی در شتر MboI واجد یک سایت برش درمحل ۲۶۸ است که ایجاد دو قطعه ۲۶۸ و ۲۷۱ جفت بازی را می‌نماید. XbaI نیز واجد یک سایت برش در محل ۱۱۰ است که ایجاد دو قطعه ۱۱۰ و ۴۲۹ جفت بازی را می‌کند. در مورد آنزیم EcorI فاقد سایت برش است. آنزیم AvaII نیز روی *سارکسیستیس کملی* یک سایت برش ۴۸۰ است و لذا ایجاد دو قطعه ۴۸۰ و ۵۹ جفت بازی را می‌نماید. می‌توان به وسیله پرایمرهای طراحی شده جهت تشخیص جنس سارکوسیستس و برای تعیین گونه نیز ازآنزیم XbaI برای تایید یا عدم تایید *سارکوسیستیس کملی* استفاده کرد. برای بزها نیز از آنزیم‌های محدودکننده -(EcorI MboI -AvaII- TaqI). استفاده نموده که TaqI دارای یک سایت برش در محل ۳۵۵ است و AvaII در محل‌های ۵۳۳ و ۵۷۷ می‌باشد. MboI نیز واجد یک سایت برش در محل ۳۶۲ است و EcorI دارای یک سایت برش در محل ۵۰۸ است و اثر آن‌ها بر روی قطعات تکثیر یافته بررسی گردید(۹و۲۹). مقایسه توالی‌های بدست آمده با اطلاعات موجود در بانک ژن به کمک برنامه بلاست و نرم افزار DNAMAN انجام گرفت.

نتایج

نتایج سلولی و مولکولی در شتر

از شتر فقط میکروکیست‌هائی با اندازه تقریبی۷۵ × ۲۶۰ میکرومتر جدا شد. سارکوسیست‌های جداشده سفید رنگ، دوکی شکل و محدب بودند (شکل ۱-۳). در لام‌های تهیه شده با روش مهری، اشکال برادی زوئیت‌ها موزی شکل و اندازه آن‌ها بطور متوسط ۷ × ۳ میکرومتر دیده شدند. ساختار دیواره در نمای میکروسکوپ الکترونی نازک با زایده‌های پرز مانند و میکروتوبول‌های فرورفته و نامنظم مخروطی شکل، مورب تا مستقیم، دیده شد. با توجه به خصوصیات فراریزبینی دیواره کیست‌ها و اینکه تاکنون در شتر یک گونه سارکوسیستیس شناسایی شده است، لذا گونه شناسایی

شده (*S. cameli*) *سارکوسیستیس کملی* (شکل۲-۳) می‌باشد. قطعه ژنومی ۱۸SrRNA تکثیر شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR، قطعه ای با ۵۳۹ جفت باز را نشان داد (شکل۳- ۳). توالی و نقشه RFLP که از میکروکیست عضله شتر اخذ شده یک نوع کیست تشخیص داده شده و *سارکوسیستیس کملی* نام‌گذاری شـــد. الگوی الکترومورف با آنزیم Xba۱ بعنوان شـــاخصی برای شناسایی کیست انگل انتخاب شد(شکل ۴– ۳). اطلاعات بدست آمده از سارکوسیســـتیس در شتر اولین گزارش بررسی ملکولی این انگل در این حیوان می‌باشد، و در بانک ژن با شـــماره (Accession No.GU۰۷۴۰۱۱) ثبت گردیده اســـت. توالی آن در بلاست تا ۹۴ درصد با بعضی از توالی‌های مربوط به انگل‌های موجود در بانک ژن همولوژی دارد. شکســـت آنزیمی در شـــتر MboI واجد یک ســـایت برش در محل ۲۶۸ است که ایجاد دو قطعه ۲۶۸ و ۲۷۱ جفـــت بازی را می‌نماید. XbaI نیز واجد یک ســـایت برش در محل ۱۱۰ اســـت که ایجاد دو قطعه ۱۱۰ و ۴۲۹ جفت بازی را می‌کند. در مورد آنزیم EcorI فاقد سایت برش است و لذا قطعه مورد نظر هیچ تغییری از نظر اندازه روی ژل قبل و بعد از افزودن آنزیم ندارد. آنزیم AvaII نیز روی *سارکوسیســـتیس کملی* یک سایت برش ۴۸۰ اســـت و لذا ایجاد دو قطعه ۴۸۰ و ۵۹ جفت بازی را می‌نماید. می‌توان به وســـیله پرایمرهای طراحی شده جهت تشخیص جنس سارکوسیستس و برای تعیین گونه نیز از آنزیم



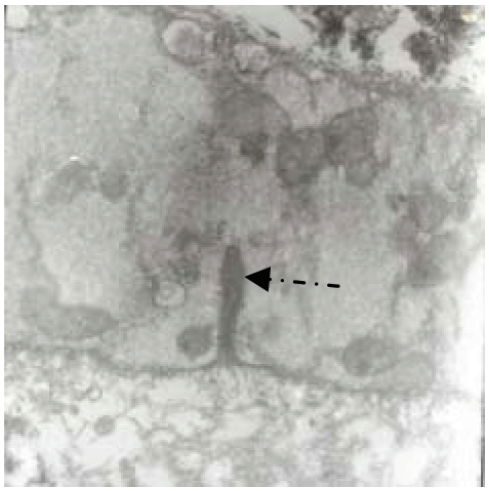
شکل ۱- ۳. میکروکیست ها در عضله شتر

XbaI برای تایید یا عدم تایید *سارکوسیستیس کملی* استفاده کرد.

نتایج سلولی و مولکولی در بز

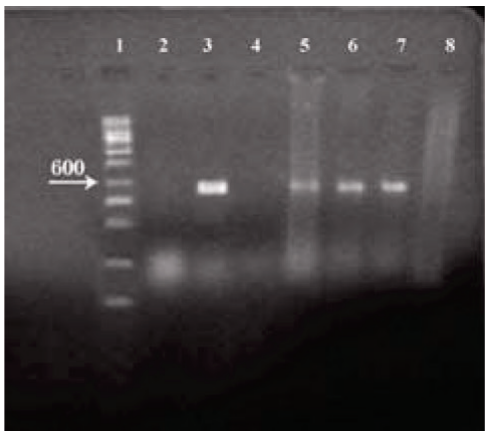
در نمونه‌های بز دو نوع ماکروکیست به شرح ذیل وجود داشت:

الف - کیســـت‌های کوچک و باریک، اســـتوانه ای، به رنگ شیری و با ابعاد تقریبی ۳×۱ میلی متر دیده شـــدند. این نوع کیســـت‌ها درون و روی



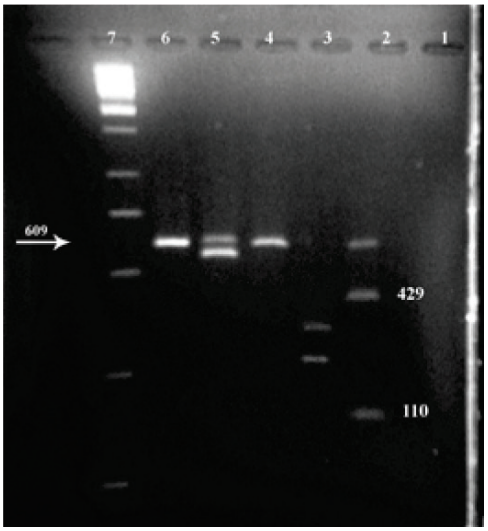
پیکان : زائده انگشتی حاوی رشته نازک

شکل۲ - ۳. ساختاردیواره میکروکیست شتر، (بزرگنمائی: × ۰۲۲۱۱)



۱- مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ ۲- کنترل منفی؛ ۳- کنترل مثبت؛ ۴- کنترل منفی؛ ۷-۵ : محصول PCR نمونه های شتر

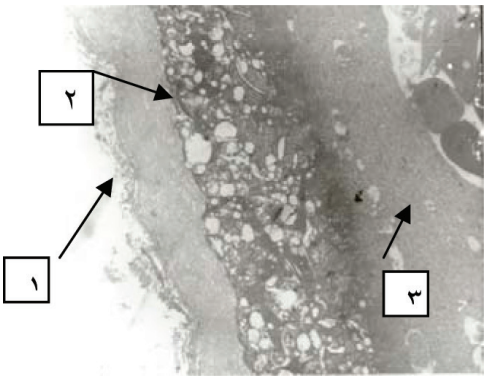
شکل۳- ۳- محصول PCR، قطعه ای تقریبا با ۶۰۰ جفت باز در شتر



۱- کنترل منفی، ۲- هضم محصول PCR با آنزیم XbaI؛ ۳- هضم محصول PCR با آنزیم MboI ۴- هضم محصول PCR با آنزیم EcorI، ۵- هضم محصول PCR با آنزیم AvaII ، ۶-کنترل مثبت (نمونه هضم نشده)؛ ۷ - مارکر ۱۰۰ جفت باز

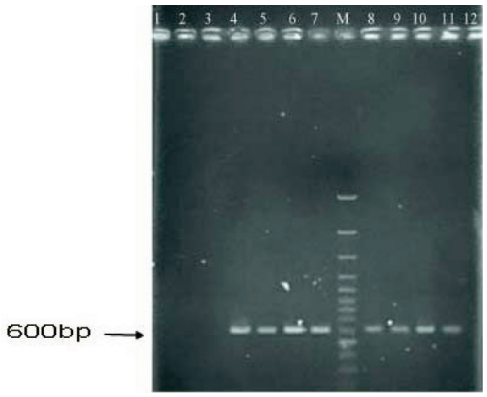
شکل۴- ۳- الگوی RFLP محصول PCR نمونه های شتر

شکل۵ - ۳- برادی زوئیت ها موزی شکل در میکروکیست بز

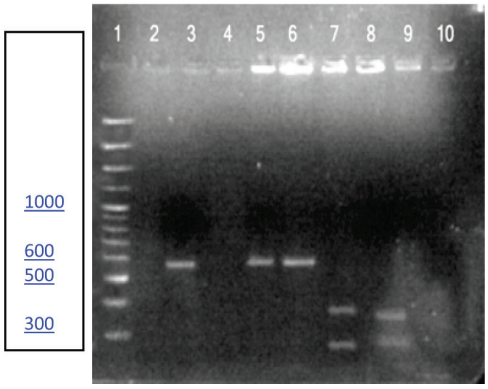


۱ - دیواره اولیه ۲- دیواره ثانویه ۳- مواد زمینه (بزرگنمائی : × ۸۴۰۰)

شکل ۶- ۳- کیست در عضله بز



شکل ۷-۳: ۲،۱ و ۳ کنترل منفی- ۴ کنترل مثبت؛ ۵ و ۶ و ۷- نمونه مثبت کیست ضخیم ؛ M- مارکر ۸ و ۹ و ۱۰- نمونه مثبت کیست نازک؛ ۱۱- کنترل مثبت



۱- مارکر ۰۰۱ جفت باز؛ ۲- کنترل منفی؛ ۳- کنترل مثبت (نمونه هضم نشده)؛ ۴- کنترل منفی
۵- هضم محصول PCR با آنزیم AVII ؛ ۶ - هضم محصول PCR با آنزیم EcoRI
۷ - هضم محصول PCR با آنزیم MboI ؛ ۸- هضم محصول PCR با آنزیم TaqI

شکل ۸- ۳. نقشه RFLP ماکروکیست های بزرگ و کوچک در بز

بافت قرار داشتند. در لام‌های تهیه شده با روش مهری، اشکال برادی زوئیت‌ها موزی شکل و اندازه آن‌ها بطور متوسط۴ ×۱۲میکرومتر مشاهده شد(شکل۵- ۳).

ب- کیست‌های ضخیم، بزرگ و بیضی تا گرد به رنگ سفید شیری، احاطه شده در بافت عضلانی و با ابعاد 12x ۶ میلی متر مشاهده شد.

در مطالعه دیواره کیست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، دیواره کیست متشکل از دو بخش کاملا مجزا مشاهده شد. در بخش بیرونی دیواره نازک با زائده‌های مشخص شبیه تکمه قابل رویت است (شکل ۶- ۳). با توجه به ساختار فراریزبینی دیواره کیست‌ها هر دو از یک گونه بنظر آمدند و شباهت زیاد آن‌ها به گونه مولی بنام *سارکوسیستیس مولی* تشخیص داده شدند. در بز نیز قطعه ژنومی ۱۸SrRNA تکثیر شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR نیز قطعه ای تقریبا با ۶۰۰ جفت باز را نشان داد (شکل ۷- ۳). محصول بدست آمده کلون و تعیین سکانس گردید. سکانس به دست آمده نوکلئوتید یکسان و مشابهی را نشان دادند. در مورد سارکسیستیس در بز از نقشه شکنندگی با آنزیم‌های MboI TaqI AvaII- (EcorI-) استفاده شد. اما به علت مشابه بودن سکانس‌ها بعد از افزودن آنزیم اندازه روی ژل در قطعات مورد نظر یکسان بودند. سکانس‌های بدست آمده، درکیست‌های کوچک و بزرگ با سکانس‌های بانک ژن بلاست شدند. همچنین نقشه RFLP با آنزیم مورد نظر الگوی الکترومورف یکسانی نشان داد (شکل۸-۳). توالی و نقشه RFLP که از کیست‌های ماکروسکوپی سارکوسیستیس در بز اخذ شده یک نوع کیست تشخیص داده شده و تا ۹۷ درصد با توالی‌های استاندارد بانک ژن در گونه *سارکوسیستیس مولی* همولوژی دارد. لذا گونه شناسایی شده می‌تواند *سارکوسیستیس مولی* (*S. moulei*) باشند. اگرچه اختلاف ساختاری و ملکولی آن‌ها نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

بحث

قبل از سال ۱۹۷۲، ساختمان کیست و نوع میزبان واسط دو معیار اصلی طبقه‌بندی سارکوسیستیس بوده است. ولی بررسی‌های چرخه‌های زندگی گونه‌های مختلف نشان داد که برخی سارکوسیست‌ها با ساختمانی مشابه دارای میزبان‌های واسط متفاوت و برخی گونه‌های دیگر قادر هستند که انواع متعددی از میزبان‌های واسط را آلوده نمایند(۱۲و۷و۲۵). از طرفی شکل و اندازه کیست بر حسب نوع سارکوسیستیس، نوع بافت سلول میزبان، و روش ثابت کردن نمونه‌ها و عوامل دیگر تغییر می‌کند. بنابراین تکیه بر شکل و اندازه ماکروسکوپی کیست‌ها برای طبقه‌بندی گونه‌ها کافی به نظر نمی‌اید(۱۰). با استفاده ازمیکروسکوپ الکترونی تاکنون حداقل ۲۴ نوع دیواره کیست مختلف از سارکوسیست شناسائی شده است. زوائد دیواره کیست به اشکال مختلف از قبیل برآمدگی‌های انگشتی، قارچی، گنبدی، گل کلمی، دیسکی، چماقی، ذوزنقه‌ای، استوانه‌ای و ..... دیده می‌شود. مطالعات اولیه گزارش کرده‌اند که میزبان‌های متفاوت نسبت به گونه‌های انگل اختصاصی هستند. اما این نظریه در مطالعات اخیر مردود شده است. ناحیه متنوع در ژن ۱۸S rRNA نشان داده‌اند که می‌توانند نشانه‌های ژنتیکی خوبی برای تشخیص گونه‌های سارکوسیستیس باشند. اگرچه امکان مطالعه این ژن از طریق توالی‌یابی DNA وجود دارد اما روشی گران و غیر عملی در آزمایشگاه معمولی به ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. قبل از سال ۲۰۰۰ فقط یک گزارش در استفاده از روش PCR-RFLP در تشخیص گونه‌های سارکوسیستیس وجود دارد و آن هم در مورد *S. gigantea* می‌باشد (۱۶و۱۴و۳). اگرچه در مورد سارکوسیست‌های شتر گزارش‌هایی وجود دارد (۵ و۱۵و۱۷و۱۹و۲۰و۱۲) ولی تاکنون در مورد مراحل تکوین، دوره زندگی، دوره ماندگاری و شکل کیست‌های سارکوسیست و جزئیات دیواره کیست و نیز در مورد ساختار فراریزبینی دیواره کیست اطلاعات بسیار اندکی ارائه شده است زیرا سارکوسیست‌هایی که شتر را آلوده می‌کنند به صورت میکروکیست در عضلات پنهان شده و فقط با چشم مسلح (میکروسکوپ نوری و الکترونی) قابل دیدن می‌باشند. در هیچ‌کدام از گزارش‌ها اشکالی از کیست‌های موجود در عضلات شتر ارائه نشده است. گزارشات قبلی فقط ارائه شیوع بیماری از طریق مشاهده زوئیت‌ها بوده است. ضمنا از خصوصیات مولکولی *سارکوسیستیس کملی* تاکنون گزارشی وجود ندارد. نتایج این مطالعه در شتر مانند گزارش‌های قبل نشان می‌دهد که شتر فقط به میکروکیست آلوده می‌شود و همگی یک نوع کیست می‌باشند. این میکروکیست‌ها دارای یک دیواره ضخیم اولیه هستند که به صورت لایه‌ای فشرده می‌باشد. این لایه تا خورده و برجستگی‌هائی انگشتی شکل با انتهای گرد دارند ولی منشعب نیستند. درون آن‌ها میکروفیبریل‌های طولی دیده می‌شود و ساختار دکمه مانند در دیواره این برجستگی‌ها به طور منظم قرار دارند. این برجستگی‌ها از مواد زمینه‌ای دیواره کیست‌ها منشا می‌گیرند. ساختمان‌های منشعب در پایه آن‌ها که به نظر ریشه برجستگی‌ها می‌باشد و از مشخصات سارکوسیستیس کملی است مشاهده می‌شوند. این مشاهدات با گزارش‌های Abdel-Ghaffar ۲۰۰۹ و Al-Ghoraishi ۲۰۰۴ همخوانی دارد (۴و۲۸و۳). اما

با نتایج Entzeroth ۱۹۸۱ تا حدودی متفاوت است زیرا او تنها قسمت منشعب را شرح داده است و از برجستگی‌های طولی صحبتی نکرده است. توالی‌هایی از میکروکیست‌ها اخذ شد و نقشه RFLP به صورت اطلاعات منحصر به فرد همراه با اشکال کیست در این مطالعه ارائه شد. تجزیه و تحلیل دیواره کیست در بررسی فراریز بینی و سکان‌های بدست آمده نشان می‌دهد که اولا شتر فقط به میکروکیست آلوده می‌شود و همگی از یک گونه می‌باشند. ثانیا PCR-RFLP بعنوان روشی مناسب برای تفکیک گونه‌های سارکوسیستیس در میزبان‌های متفاوت می‌باشد. همچنین از بین آنزیم‌های هضم کننده آنزیم XbaI بعنوان شاخصی برای شناسایی کیست انگل در شتر انتخاب شد. بخاطر ساختار میکروسکوپی و جایگاه این انگل ضروری است مطالعه و توجه بیشتری در بازرسی کشتارگاهی و چرخه زندگی آن بعمل آید(۱۳).

با توجه به این‌که ماکرو کیست‌ها در بز به خوبی توصیف نشده‌اند و در باره متفاوت بودن آن‌ها ختلاف نظر وجود دارد لذا در بزها دقت بر روی بررسی ماکروکیست‌های این حیوان معطوف شد. تاکنون در بز چهار نوع ماکروکیست تعریف شده است. Barham و همکاران در ۲۰۰۵ در بزهای اهلی عراق دو گونه ماکروکیست گزارش کردند. کیست‌های چاق که بزرگ، مدور در اندازه‌های ۷ × ۱۴ میلی متر و بیشتر در مری دیده شدند و کیست‌های نازک، کوچک و استوانه‌ای که در سایر اندام‌ها دیده شدند و در اندازه ۳/۶ × ۱/۱ میلی متر گزارش کردند. آن‌ها معتقدند که این کیست‌ها با یکدیگر متفاوت هستند(۵). اولین توصیف اندازه‌گیری ماکروکیست‌های بزهای اهلی با ۷ × ۱۴ میلی متر در سوئیس انجام گرفت(۳). اولین گونه نیز در سال ۱۸۸۸ توسط مولی در فرانسه گزارش شد (۲۳) اما این توصیف‌ها برای طبقه‌بندی مبهم بودند. سارکوسیست‌های ماکروسکوپی در بز کوهی در روسیه به نام *سارکوسیستیس اورینتالیس* به عنوان دومین گونه نامگذاری شد. این کیست‌ها در بزهای وحشی کوهی سیبری دیده شد. اما در بزهای اهلی آن منطقه این گونه سارکوسیست‌ها گزارش نشد. این کیست‌ها اندازه ۷/۵ × ۲/۵ میلی‌متر داشتند که از کیست‌های ۱۲×۳ میلی‌متر که در بزهای اهلی دیده شده کوچکتر هستند (۱۲). سومین گونه *سارکوسیستیس اووی فلیس* که در بزهای مو بلند ترکیه دیده شده و اندازه آن‌ها ۴ × ۲ میلی‌متر بودند. در مصر ماکروکیست‌هائی توسط رافائی در سال ۱۹۸۰ از بزهای اهلی جدا شد. این سارکوسیست‌ها دارای دیواره نازک همراه بافیبریل‌های واضح فراوان در نوک آن‌ها و قابل انتقال به گربه به نام گونه کاپری فلیس شناخته شده اند(۳). بطور کلی تمام کیست‌هائی که به وسیله میزبان اصلی گربه در سایر میزبان‌های واسط تولید می‌شوند ماکروکیست هستند. برای مثال در بوفالو *سارکوسیستیس فوزی فورمیس* (۳۲ میلی متر)، در گاو *سارکوسیستیس هیرسوتا* (۸ میلی متر)، در گوسفند *سارکوسیستیس ژیگانته آ* (۱۰ میلی متر) و ماکروکیست‌ها در بزهای اهلی نیز به وسیله گربه انتقال می‌یابند. به همین دلیل اختلاف‌نظر بین محققین در مورد ماکروکیست‌های موجود در عضلات بز وجود دارد. این گونه کیست‌ها در بعضی از کشورها از جمله آلمان، سوئیس، شوروی، مصر، هند و عراق و ایران (۱۲و۲۶و۱۰و۱۳و۲۰) گزارش کرده‌اند. در مطالعه حاضر دو گونه، کیست‌های چاق و سفید و بیضی تا مدورا با اندازه متوسط ۵/۷ × ۱۲ میلی متر و نازک و سفید و استوانه‌ای با ۳ × ۱/۳ میلی‌متر مشاهده شده است. این کیست‌ها با کیست‌های جدا شده در بزهای اهلی با ۷ × ۱۴ میلی متر در سوئیس و بزهای مو بلند ترکیه دیده شده مطابقت دارند. توالی‌هایی که از ماکروکیست‌ها اخذ شد و نقشه RFLP و تجزیه و تحلیل سکانس‌های بدست آمده نشان می‌دهد که این کیست‌ها اگرچه از نظر شکلی و اندازه با یکدیگر اختلاف دارند اما به علت یکسان بودن ساختار دیواره کیست در فراریزبینی و ساختار مولکولی (باند محصول PCR، توالی آن‌ها و الگوی الکترومورف RFLP) می‌توانند یک نوع کیست باشند. البته علت اختلافات در دو نوع کیست زمان رشد آن‌ها در نظر گرفته شده است. با توجه به مقایسه انجام گرفته با سکانس‌های موجود در بانک ژن نمونه‌های دیده شده در این مطالعه قرابت زیاد (۹۸ درصد) با *سارکوسیستیس مولی* دارند. در نقشه دندروگرام قرابت با *S. gigantea* نیز دیده می‌شود. این قرابت را در نیاکان و میزبان اصلی گونه‌های ماکروکیست ارتباط داد. شاید بعضی نمونه‌هائی که از بز جدا می‌شود می‌تواند گونه *S. gigantea* هم باشد. اما به دلیل مبهم بودن جایگاه طبقه‌بندی این ماکروکیست‌ها بررسی بیشتر در این مورد بسیار ضروری می‌باشد. ولی تاکید می‌شود که روش RFLP-PCR می‌تواند فرضیه آلوده شدن میزبان‌های واسط متفاوت را با یک گونه ثابت کند، در نتیجه اختصاصی بودن میزبان واسط در آلودگی به انگل نمی‌تواند به صورت یک فرضیه مطرح باشد. و این روشی مناسب و مقرون به صرفه نسبت به توالی یابی DNA که روشی گران است، می‌تواند برای تشخیص و طبقه‌بندی انگل استفاده شود. نتایج این مطالعه برای تفکیک گونه‌های مختلف سارکوسیستیس در میزبان‌های مختلف مفید خواهد بود. نتایج ملکولی گونه سارکوسیستیس موجود در شترهای ایران منحصر بفرد است و تا کنون از کشور دیگری گزارش نشده است. ساختار فراریزبینی گونه سارکوسیستیس موجود در شترهای ایران با سایر سارکوسیستیس موجود در شترهای جهان مطابقت دارد. در بز این کیست‌ها اگرچه از نظر شکلی و اندازه با یکدیگر اختلاف دارند اما به علت یکسان بودن ساختار دیواره کیست در فراریزبینی و ساختار مولکولی(باند محصول PCR، توالی آن‌ها و نقشه RFLP) می‌توانند یک نوع کیست باشند. ماکروکیست‌های موجود در بزهای ایران از لحاظ ملکولی با سایر سارکوسیستیس موجود در بزهای جهان مطابقت دارد. ساختار فراریزبینی ماکروکیست‌های موجود در بزهای ایران با سایر سارکوسیستیس موجود در بزهای جهان مطابقت دارد. روش RFLP می‌تواند فرضیه آلوده شدن میزبان‌های واسط متفاوت را با یک گونه ثابت کند. در نتیجه اختصاصی بودن میزبان واسط در آلودگی به انگل نمی‌تواند به صورت یک فرضیه مطرح باشد.

منابع مورد استفاده

1- Abdel- Ghaffar F, Heydron AO, Mehlborn H. The fine structure of cysts of Sarcocystis moulei from goats. *Parasitol Res* 1989; 75: 416-418.

2- Abdel-Ghaffar F, Entzeroth R, Chobotar B, Scholtyseck E. Ultrastructure studies of Sarcocystis sp. from the camel (*Camelus dromedaries*) in Egypt. *Trop Med Parasitol* 1979; 30: 434-438.

3- Abdel- Ghaffar F, Mehlborn H, Bashtar A, Al-rashid K, Sakran T, El-Fayoumi H. Life cycle of *Sarcocystis camelicanis* infecting the camel (*Camelus dromedaries*) and the dog (Canis familiaris) , light and electron microscopic study. Spring, published online:

2009; 10: 17.

4- Al-Ghoraishi SAR, Bashtar AR, Al-Rasheid KAS, Abdel-Ghaffar FA. Prevalence and ultratructure of sarcocystis species infecting camels (*Camelus dromedaries*) slaughtered in Riyath city Saudi Arabia Saudi. *J Biol Sci* 2004; 11(2): 135-141.

5- Barham M, Stutzer H, Karanis P, Latif BM, Neiss WF. Seasonal variation in Sarcocystis species infections in goats in northern Iraq. *Parasitol* 2005; 130(2): 151-156.

6- Beaver PC, Gadgil K, Morera P. Sarcocystis in man: a review and report of five cases. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 819-844.

7- Boid R, Jones TW, Luckin AG. The camel in health and disease, Protozoal diseases of camels, *Bri Vet J* 1985; 141: 87-105.

8- Dalimi A, Khodashenas M, Nouri A, Morovati M. Ultrastructural study of Sarcocystis isolated from water buffalo *(Bubalus bubalis*) in khozestan province in Iran. *Pajouhesh & Sazandegi* 1999; 43: 47-49.

9- Dalimi A, Payekari H, Valizadeh M, Karimi Gh, Motamedi Gh, Abdi Ghodarzi M, Esmaeilzad M, Meshkat M, Najar A. (). Detection of Sarcocystis spp. of slaughtered sheep in Gazvin Ziaran slaughterhouse by molecular assay. *Modares J Med Sci* 2008; 13(1&2): 65-72.

10- Dubey JP. A review of Sarcocystis of domestic animals and other coccidian of cats and dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169: 1061-1078.

11- Dubey JP. Coyote as a final host for Sarcocystis species of goats, sheep, cattle, elk, bison and moose in Montana. *Amer J Vet Res* 1980; 41: 1227-1229.

12- Dubey JP, Speer CA, Fayer R. Sarcocystosis of animals and man. CRC Press Boca Raton Florida USA (Translated by ESMAEIL ZOGHI in persian) 1989; 1-161.

13- Entzeroth R, Abdel-Ghaffar F, Chobotar B, Scholtyseck E. Fine structure study of Sarcocystis sp. from Egyptian camels (*Camelus dromedaries*). Acta Vet. Acad. Sci. Hung 1981; 29:335-339.

14- Entzeroth R, Goerlich R. Monoclonal antibodies against cystozoites of *Sarcocystis muris* (Protozoa, Apicomplexa). *Parasitol Res* 1987; 73: 568-570.

15- Fatani A, Hilali M, Al-Atiya S, Al-Shami S. Prevalence of Sarcocystis in camels (*Camelus dromedarius*) from Al-Ahsa, Saudi Arabia. *Vet Parasitol* 1996; 62: 241-145.

16 - Gharagozlou MJ, Sadjadi SM, Bokaie S. A survey on the prevalence of serum antibody against bradizoites 0f ovine *Sarcocystis protozoan* (Sarcocystis spp.) in human subjects using immunofluorescence method. *Iranian J Vet Res University of Shiraz* ser9 2004; 5(1): 150-156.

17- Hagi BA, Mohammed Hassan A, Di Sacco B. Sarcocystis in Somali. *Camel Parassitologia* 1989; 31: 133-136.

18- Hussein HS, Warrag H. Prevalence of Sarcocystis in food animals in Sudan. *Trop Anim Health Prod* 1985; 17: 100-101.

19- Kirmse P, Mohanbabu B. Sarcocystis spp. in the one humped camel (*Camelus dromedarius*) from Afghanistan. *Bri Vet J* 1986; 142: 73-74.

20- Kuraev GT. Sarcocystosis of camels, Sarcosystis Kazakhstan. *SSR Vet Moscow*, 1981; 7: 41-42.

21- Mason FP. Sarcocystis in the camel in Egypt. *J Comp Pathol Therap* 1910; 23: 168-176.

22-Mehlhorn H, Heydorn AO. The sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): Life cycle and fine structure. *Adv Parasitol* 1978; 16: 43-91.

23- Moule L. Des Sarcosporidies et leurs frequence principalement chez les animaux de boucherie Societedes. *Sciences et Arts de Vitry-le-Francois* 1888; 14: 3- 41.

24 Odoning K. The present state of species-systematics in Sarcocystis Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia) *Syst Parasitol.* 1998; 41: 209-233.

25- Ouhelli H, Dakkak A. Protozoal diseases of dromedaries. *Scien and Techn Rev* 1987; 6: 417-422.

26- Shekarforoush SS, Razavi SM, Dehghan SA, Sarihi K. Prevalence of Sarcocystis species in slaughtered goats in Shiraz, Iran. *Vet Rec* 2005; 156: 418-420.

27-Shekarforoush SS, Shakerian A, Hassanpoor MM. Prevalence of Sarcocystis in slaughtered one-humped camels (*Camelus dromedarius*) in Iran. Trop Anim Health Prod 2006; 38: 301-303.

28- Woldemeskel M, Gumi B. Prevalence of sarcocysts in one-humped camel (*Camelus dromedarius*) from Southern Ethiopia. *J Vet Med* Ser B 2001; 48: 223-226.

29- 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 animal using a PCR-RLFP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost effective and simple technique for routine species identification. *Experi Parasitol* 2002; 102: 212-217.