A-PDF OFFICE TO PDF DEMO: Purchase from www.A-PDF.com to remove the watermark

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری حرفه‌ای رشته‌ی دامپزشکی

شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس (Sarcocystis spp.) در گاوهای منطقه شهرکرد با استفاده از روش PCR-RFLP

استادان راهنما:
دکتر حمیدرضا عزیزی
دکتر بهروز شیران

استادان مشاور:
دکتر حمدالله مشتاقی
دکتر خداداد پیرعلی

پژوهشگر:
آرش برجیان بروجنی

آذر ماه ۱۳۹۰

دانشکده دامپزشکی

گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه **آقای آرش برجیان بروجنی** جهت اخذ درجه دکتری رشته دامپزشکی با **عنوان شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس (*Sarcocystis spp.*) در گاوهای منطقه شهرکرد با استفاده از روش PCR-RFLP** در تاریخ **۱۳۹۰/۹/۲۹** باحضور هیأت داوران زیر مورد بررسی و با رتبه/نمره

مورد تصویب نهایی قرار گرفت

۱- استادان راهنمای پایان نامه

دکتر حمیدرضا عزیزی با مرتبه علمی استادیار **امضا**

دکتر بهروز شیران با مرتبه علمی دانشیار **امضا**

۲- استادان مشاور پایان نامه

دکتر حمدالله مشتاقی با مرتبه علمی دانشیار **امضا**

دکتر خداداد پیرعلی با مرتبه علمی دانشیار **امضا**

۳- استادان داور پایان‌نامه

دکتر امین نعمت الهی با مرتبه علمی دانشیار **امضا**

دکتر عبدالکریم زمانی مقدم با مرتبه علمی دانشیار **امضا**

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ گونه مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی‌نماید.

دکتر سعید حبیبیان

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی

دکتر حسین نورانی

رئیس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

چکیده

جنس سارکوسیستیس و گونه های مختلف آن انگل های تک یاخته ای داخل سلولی می باشند که چرخه زندگی آنها به دو میزبان احتیاج دارد. تولیدمثل جنسی و اسپوروگونی در میزبان نهایی و تولیدمثل غیرجنسی و شیزوگونی و تشکیل کیست در فیبرهای عضلات اسکلتی و قلبی میزبان واسط اتفاق می افتد. سه گونه سارکوسیستیس در گاو شناسایی شده است که شامل: *سارکوسیستیس بوی کنیس یا کروزی*، *سارکوسیستیس بوی فلیس یا هیرسوتا* و *سارکویستیس بوی هومینیس یا هومینیس* می باشد که میزبانان نهایی آنان به ترتیب سگ سانان، گربه سانان و پریمات ها از جمله انسان می باشند. *سارکوسیستیس کروزی* در گاو بیماری زاست و *سارکوسیستیس هومینیس* هم در انسان موجب اختلالات گوارشی شامل تهوع، درد معده و اسهال می شود. با توجه به بالا بودن میزان آلودگی لاشه های گاوهای کشتاری در ایران به سارکوسیست و انجام نشدن مطالعه ای در مورد شناسایی گونه های سارکوسیستیس در ایران هدف از انجام این مطالعه، تعیین گونه های سارکوسیستیس بر اساس روش های مولکولی در گاوهای کشتار شده در منطقه شهرکرد بود تا اهمیت آنها در بهداشت عمومی و بیماری زایی گاو مشخص شود. در این بررسی با مراجعه به کشتارگاه جونقان شهرکرد، از عضلات قلب، مری، دیافراگم و زبان تعداد ۷۰ رأس گاو نمونه گیری به عمل آمد. با روش CTAB، DNA از نمونه ها استخراج شده و برای بررسی آلودگی، از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده (R)1H و S9L(F) ۱۸و ۱۸S استفاده شد. در ادامه با آنزیم های محدود کننده فرآورده های PCR هضم شده و الگوی شکسته شدن آنها مورد ارزیابی قرار گرفتند. روش RFLP تکنیکی با حساسیت و ویژگی بالا بوده و در تشخیص گونه بسیار حساس است. نتایج حاصل نشان داد که ۴۸ عدد از نمونه های دارای آلودگی با سارکوسیستیس بودند که بعد از هضم آنزیمی که بر روی محصولات اولیه PCR صورت گرفت آلودگی با گونه *S.cruzi*، ۸۷/۵٪ و آلودگی با گونه *S.hirsuta*، ۴۱/۶٪ و آلودگی با *S.hominis*، ۳۷/۵٪ نشان داده شد. با توجه به نتایج این مطالعه و تأیید حضور سارکوسیستیس هومینیس در منطقه و احتمال زئونوتیک، باید از خوردن گوشت گاو به صورت نیمه پخته اجتناب نمود.

کلمات کلیدی: گاو، سارکوسیستیس، *S.cruzi*، *S.hirsuta*، *S.hominis*، PCR-RFLP

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول – مقدمه ۱۰

فصل دوم- کلیات ۱۲

۲-۱-اتیولوژی ۱۲
۲-۲-اپیدمیولوژی ۱۲
۲-۳-چرخه زندگی سارکوسیستیس ۱۲
۲-۴- معیارهای طبقه بندی گونه های سارکوسیستیس ۱۷
۲-۴-۱- سارکوسیست ها ۱۷
۲-۴-۲- شیزونت ها ۱۸
۲-۴-۳- اوسیست ها و اسپوروسیست ها ۱۸
۲-۴-۴- اختصاصی بودن میزبان ۱۸
۲-۴-۵- شناسایی گونه بر مبنای واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۸
۲-۴-۵-۱ واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۸
۲-۴-۵-۲ کاربردهای PCR ۲۱
۲-۴-۵-۳ پروفایل حرارتی سیکل های PCR ۲۱
۲-۵- ساختمان سارکوسیست ها ۲۳
۲-۶- خسارات اقتصادی سارکوسیستوز ۲۴
۲-۷- سارکوسیستوز در میزبانان واسط ۲۴
۲-۷-۱- یافته های کلینیکی ۲۴
۲-۷-۲- یافته های کلینیکال پاتولوژی ۲۵
۲-۷-۳- ضایعات ماکروسکوپی ۲۵
۲-۷-۴- ضایعات میکروسکوپی ۲۵
۲-۸- سارکوسیستوز در میزبانان نهایی ۲۶
۲-۹- سارکوسیستوز در انسان ۲۶
۲-۹-۱- سارکوسیستوز روده ای ۲۶
۲-۹-۲- سارکوسیستوز عضلانی ۲۶
۲-۱۰- پاتوژنز گونه های مختلف سارکوسیستیس ۲۷
۲-۱۰-۱- نکروز بافتی ۲۷
۲-۱۰-۲- التهاب ۲۸
۲-۱۰-۳- ادم ۲۸
۲-۱۰-۴- تب ۲۸
۲-۱۰-۵- کم خونی ۲۸
۲-۱۰-۶- سقط جنین ۲۸

۲-۱۰-۷- میوزیت ائوزینوفیلیک ۲۹
۲-۱۰-۸- ایمنی ۲۹
۲-۱۱- انتقال گونه های سارکوسیستیس ۲۹
۲-۱۲- تشخیص سارکوسیتوز ۲۹
۲-۱۳- تشخیص سارکوسیست از طریق انتقال به میزبانان نهایی ۳۰
۲-۱۴- پیشگیری و درمان دارویی سارکوسیستوز ۳۱
۲-۱۵- کنترل سارکوسیستوز ۳۱

فصل سوم- مواد و روش کار ۳۲

۳-۱- جمع آوری نمونه ها ۳۲
۳-۲- تهیه محلول و بافرها ۳۲
۳-۲-۱- بافر استخراج (CTAB) ۳۲
۳-۲-۲- محلول ۲۴:۱ کلروفرم-ایزوآمیل ۳۳
۳-۲-۳- محلول ۰/۵ مولار [ETHYLENEDIAMINE TETRA ACETATE.2 H2O]EDTA (PH:۸) ۳۳
۳-۲-۴- محلول ۱ مولار TRIS-HCL (PH=7.5-8) ۳۳
۳-۲-۵- بافر TBE (TRIS-BORATE EDTA) ۳۳
۳-۲-۶- اتیلن دی آمین تترااستیک اسید ۰/۲۵ مولار (PH:۸) ۳۳
۳-۲-۷- اتانول ۷۰ درجه ۳۳
۳-۲-۸- محلول رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (ETBR: ETHIDIUM BROMIDE) ۱۰ MG/ML ۳۴
۳-۲-۹- محلول اتانول- استات آمونیوم ۳۴
۳-۲-۱۰- محلول هضم آنزیمی DRAI(AHAIII)، FOKI و AFII(BSLI) ۳۴
۳-۳- مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۳۴
۳-۳-۱- محلول بافری PCR با غلظت ۱۰X ۳۴
۳-۳-۱-۱- TRIS-HCL ۳۴
۳-۳-۱-۱- KCL ۳۵
۳-۳-۲- $MGCL_2$ ۳۵
۳-۳-۳- نوکلئوتیدها (DNTPS) ۳۵
۳-۳-۴- آنزیم TAQ پلیمراز ۳۵
۳-۳-۵- پرایمرها ۳۶
۳-۳-۵-۱- طراحی پرایمر ۳۶
۳-۴- سایز مارکر ۳۷
۳-۵- تیوب ها و تیپ ها و وسایل پلاستیکی ۳۷
۳-۶- دستگاه اتوماتیک حرارتی PCR ۳۷
۳-۷- سایر دستگاه های مورد استفاده ۳۸
۳-۸- استخراج DNA ژنومی از گوشت ۳۸
۳-۸-۱روش تغییر یافته ی CTAB (CETYL TRIMMETHYL AMMONIUM BROMIDE) ۳۸
۳-۹- تعیین غلظت وکیفیت نمونه های DNA ۴۰

۳-۹-۱- تعیین کیفیت و غلظت نمونه های DNA به روش اسپکتروفتومتری ۴۰
۳-۱۰- تعیین کیفیت DNA توسط ژل آگارز ۴۳
۳-۱۱- تنظیم غلظت نمونه های DNA ۴۳
۳-۱۲- انجام PCR، بر روی DNA های استخراج شده از گوشت با پرایمرهای S۱H ۱۸ و S۹ L ۱۸ ..... ۴۳
۳-۱۳- الکتروفورز ۴۴
۳-۱۳-۱- تهیه ژل آگارز ۴۶
۳-۱۳-۲- طریقه رنگ آمیزی ژل آگارز ۴۶
۳-۱۴- هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم های محدود الاثر (DRAI(AHAIII، FOKI و AFII(BSLI) ۴۸
۳-۱۴-۱- آنزیم محدود الاثر (DRAI(AHAIII ۴۸
۳-۱۴-۲- آنزیم محدود الاثر FOKI ۴۹
۳-۱۴-۳- آنزیم محدود الاثر AFII(BSLYI) ۴۹

فصل چهارم- نتایج ۵۱

فصل پنجم- بحث ۵۸

۵-۱- بحث و نتیجه گیری ۵۸
۵-۲- پیشنهادات ۶۰

منابع ۶۳

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل۲-۱- چرخه انتقال سارکوسیستیس ۱۶
شکل۲-۲- نحوه تکثیر DNA به روش PCR ۲۰
شکل۲-۳-پروفایل حرارتی تیپیک PCR ۲۲
شکل ۳-۱- آماده سازی ژل آگارز و مراحل الکتروفورز ۴۷
شکل ۳-۲- محدوده عمل آنزیم DRAI ۵۰
شکل ۳-۳- محدوده عمل آنزیم FOKI ۵۰
شکل ۳-۴- محدوده عمل آنزیم BSLI ۵۰
شکل ۴-۱- DNA های استخراج شده از نمونه های جمع آوری شده با غلظت ۵۰ نانوگرم ۵۲
شکل ۴-۲- الکتروفورز ژل اگارز فرآورده های حاصل از PCR بر روی DNA استخراج شده ۵۳
شکل ۴-۳- الکتروفورز ژل اگارز فرآورده های حاصل از PCR بر روی DNA استخراج شده ۵۳
شکل ۴-۴- الکتروفورز ژل اگارز فرآورده های حاصل از PCR بر روی DNA استخراج شده ۵۳
شکل ۴-۵- الکتروفورز ژل آگارز قطعات DNA حاصل از هضم فرآورده PCR با نتایج با آنزیم های محدود الاثر ۵۴
شکل ۴-۶- الکتروفورز ژل آگارز قطعات DNA حاصل از هضم فرآورده PCR با نتایج با آنزیم های محدود الاثر ۵۵

فهرست جدول ها

عنوان صفحه

جدول ۲-۱-گونه های سارکوسیستیس در حیوانات مزرعه ای ۱۵
جدول۲-۲- حضور انگل و بروز بیماری در انسانها ۲۷
جدول۳-۱-محلول های هضم آنزیمی مربوط به آنزیم های واکنش RFLP ۳۴
جدول۳-۲- توالی پرایمرها و مشخصات آنها ۳۷
جدول۳-۳- دستگاه های مورد استفاده در PCR ۳۸
جدول ۳-۴- غلظت های محاسبه شده DNA ۴۲
جدول ۳-۵- حجم واکنش های PCR ۴۴
جدول ۳-۶-برنامه های داده شده به دستگاه ترموسیکلر ۴۴
جدول ۳-۷- دامنه های مفید جداسازی ژل های آگارز و پلی اکریل آمیل ۴۵
جدول ۳-۸- اندازه قطعات شکسته شده در واکنش RFLP به وسیله آنزیم DRAI ۴۸
جدول ۳-۹- اندازه قطعات شکسته شده در واکنش RFLP به وسیله آنزیم FOKI ۴۹
جدول ۳-۱۰- اندازه قطعات شکسته شده در واکنش RFLP به وسیله آنزیم BSLI ۵۰
جدول ۴-۱- میزان آلودگی نمونه های آلوده و کل نمونه ها به گونه های سارکوسیست ۵۶
جدول ۴-۲- درصد کل آلودگی هر یک از ۳ گونه سارکوسیستیس در نمونه های آلوده ۵۶
جدول ۴-۳- میزان آلودگی نمونه های مورد مطالعه به گونه های سارکوسیست با توجه به محدوده سنی ۵۷
جدول ۴-۴- درصد کل آلودگی هر یک از ۳ گونه سارکوسیستیس در نمونه های آلوده با توجه به محدوده سنی ۵۷

فصل اول

مقدمه

سارکوسیستوزیس (Sarcocystosis) در انسان و گونه های زیادی از حیوانات، عفونت تک یاخته ای ناشی از گونه های مختلف سارکوسیستیس (Sarcocystis) با گسترش جهانی می باشد [۲۲].

در گذشته فکر می کردند که سارکوسیستوز از اهمیت چندانی برخوردار نمی باشد ولی با گذشت و مرور زمان به این نتیجه رسیده اند که می تواند منجر به انسفالیت، بیماری عمومی و حتی سقط بشود. در سال ۱۸۴۳ میلادی اولین بار شخصی به نام Miescher سارکوسیست را در موش شناسایی کرد و به همین خاطر آنها را کیسه، توبول و یا اجسام Miescher نامیدند. تا سال ۱۹۷۲ میلادی راز منشا ئ آلودگی و اهمیت سارکوسیست باقی ماند و در این سال Heydorn و Rommel و در سال ۱۹۷۴ نیز Fayer و Johnson و در سال ۱۹۷۶ میلادی Ruzi و Frenkel کیستهای انگلی در عضلات میزبانهای واسط و همچنین مراحل آنها را در داخل بدن میزبان نهایی نشان دادند و اعلام کردند که چرخه زندگی آنها شبیه چرخه زندگی توکسوپلاسما می باشد و از نظر طبقه بندی آنها را در کلاس sporozoasida و خانواده Sarcosystidae قرار داده اند و امروزه از نظر بازرسی گوشت جزو تک یاخته های آسیب رسان (pathogen) می باشد [۲۷]. گونه های مختلف سارکوسیستیس انگل اجباری داخل سلولی دو میزبانه هستند که معمولا به صورت متناوب بین میزبان واسط علف خوار و میزبان نهائی گوشت خوار انتقال می یابند. گونه های مختلف سارکوسیستیس انگل اجباری داخل سلولی دو میزبانه هستند که معمولا به صورت متناوب بین میزبان واسط علف خوار و میزبان نهائی گوشت خوار انتقال می یابند. تولید مثل جنسی و اسپوروگونی در میزبان نهایی اتفاق می افتد و اووسیست های هاگ دار شده اسپوروسیست ها از طریق مدفوع میزبان نهایی به محیط دفع می شود. این تک یاخته کوکسیدیائی در میزبان واسط و نهایی به ترتیب سارکوسیستوزیس عضلانی و روده ای ایجاد می نماید. تولید مثل غیرجنسی و شیزوگونی و تشکیل کیست سارکوسیست در فیبرهای عضلات اسکلتی و قلبی میزبان واسط اتفاق می افتد. به طور طبیعی میزبانان نهایی (گوشتخواران) با خوردن گوشت آلوده میزبانان واسط (علفخواران) آلوده می شوند و میزبانان واسط با خوردن اسپوروسیست های مدفوع میزبانان نهایی آلوده می شوند این تک یاخته کوکسیدیائی در میزبان واسط و نهایی به ترتیب سارکوسیستوزیس عضلانی و روده ای ایجاد می نماید. مصرف گوشت هایی که بصورت شدید با کیست انگل آلوده است، برای انسان مناسب

نمی باشد. خوردن گوشت حاوی کیست بالغ *سارکوسیستیس هومینیس* (*Sarcocystis hominis*) به صورت خام و نیم پز باعث ایجاد سارکوسیستوزیس روده ای در انسان می شود [۹،۶۴]. سارکوسیستیس یکی از شایع ترین انگل های آلوده کننده دام ها در سرتاسر جهان است. شیوع آن در دام هایی مانند گاو، گوسفند و بز در برخی نقاط ایران تا ۱۰۰٪ گزارش شده است [۵۵]. سارکوسیستیس در بدن میزبان واسط بصورت کیست های عضلانی دیده می شود. اندازه و شکل کیست در گونه های انگل متفاوت است. برخی از کیست ها میکروسکوپی و برخی دیگر ماکروسکوپی به اشکال رشته ای و یا شیبه به دانه برنج می باشند [۶۵]. گونه های مختلف سارکوسیستیس در گاو در سرتاسر دنیا می توانند ایجاد عفونت بدون نشانی بالینی نمایند. *سارکوسیستیس کروزی* (*Sarcocystis cruzi*)، *سارکوسیستیس هیرسوتا* (*Sarcocystis hirsuta*) و *سارکوسیستیس هومینیس* (*Sarcocystis hominis*) که میزبانان نهائی آنان بترتیب سگ سانان، گربه سانان و انسان بوده و درگاو به عنوان میزبان واسط ایجاد کیست های عضلانی می نمایند [۲۱]. برخی از گونه های سارکوسیستیس می توانند در میزبان های واسط مانند گاو، گوسفند، بز و خوک سبب کاهش وزن، کاهش بازده غذائی، بی اشتهائی، آنمی، کاهش تولید شیر، سقط جنین و مرگ شوند [۳۴]. سارکوسیستیس کروزی که بیشتر عضلات قلبی گاو را نسبت به سایر عضلات آلوده می نماید دارای بالاترین میزان شیوع در اغلب کشور ها (بیشتر از ۹۰٪) است [۵۲،۳۶،۳۴،۲۳،۹]. میزان شیوع گونه های *سارکوسیستیس هیرسوتا* و *سارکوسیستیس هومینیس* در نقاط مختلف دنیا متغیر بوده و این گونه ها مری و سایر عضلات به استثنائ قلب را آلوده می نمایند [۲۳]. سارکوسیستیس هومینیس در گاو میتواند به ندرت سبب ایجاد التهاب عضلانی ائوزینوفیلیک شده که در صورت مشاهده کیست ماکروسکوپی در کشتارگاه باعث ضبط لاشه می شود [۶۹]. عفونت *سارکوسیستیس هومینیس* در زمره ی بیماری های مشترک قرار دارد [۵۵]. گونه های آلوده کننده انسان سبب ایجاد ناراحتی های گوارشی از قبیل حالت تهوع، استفراغ و اسهال می شوند. سابقاً گونه های سارکوسیستیس را بر اساس خصوصیات ریخت شناسی کیست ها (شکل، اندازه و ضخامت دیواره) و میزبان واسط اختصاصی طبقه بندی می کردند. در سال ۱۹۷۲ طبقه بندی جدیدی بر اساس اختصاصی بودن میزبان نهائی ارائه گردید. ولی بعدها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ثابت شد که موضوع اختصاصی بودن برخی از گونه ها با میزبان خاص فاقد جامعیت لازم است [۶۹]. میزان آلودگی لاشه های گاوهای کشتارشده در ایران به سارکوسیست بسیار بالا است. در تشخیص گونه های سارکوسیست روش های معدودی وجود دارد که در این میان روش مولکولی با توجه به حساسیت و اختصاصیت بالای آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است [۳۱،۴۷،۷۱]. به علت عدم انجام پژوهشی در زمینه شناسائی گونه های سارکوسیستیس در گاو با استفاده از روش های مولکولی در استان و اهمیت آنها در بهداشت عمومی و بیماری زایی در گاو این مطالعه انجام شده است.

فصل دوم

کلیات

۲-۱- اتیولوژی

گونه های سارکوسیستیس انگل های دو میزبانه در شاخه ی Apicomplexa هستند. یک سیستم نامگذاری گونه ها مربوط به میزبان نهایی و واسط می شود و معمولاً در نوشته ها به کار می رود. اخیرا ارگانیسم ها از طریق نام های اصلی شان شناخته می شوند. جدول ۲-۱ نام های پذیرفته شده ی اخیر گونه های سارکوسیستیس مهم در حیوانات مزرعه ای و میزبان نهایی شان را نشان می دهد [۶۰].

۲-۲- اپیدمیولوژی

طبق تحقیقات صورت گرفته در نقاط مختلف جهان، شیوع عفونت در گاو، گوسفند و اسب ها حدود ۱۰۰٪ و در خوک ها به میزان کمتری گزارش شده است [۳۰] ولی وقوع بیماری کلینیکی کم می باشد [۶۰].

۲-۳- چرخه زندگی سارکوسیستیس

سارکوسیستیس دارای چرخه زندگی اجباری ۲ میزبانه است. مراحل غیرجنسی تنها در میزبان واسط تکامل یافته که غالبا یک حیوان شکاری در طبیعت است، انجام می شود.

مراحل جنسی در میزبان نهایی تکامل یافته که حیوان گوشتخوار است، انجام می شود. میزبانان واسط و نهایی برای هرگونه سارکوسیستیس متفاوت اند. میزبان نهایی از طریق بلع بافت عضلانی یا عصبی حاوی سارکوسیست های بالغ آلوده می شوند. با هضم سارکوسیست در معده و روده میزبان، برادی زوئیت ها آزاد می شوند. برادی زوئیت ها به طور فعال حرکت نموده، به مخاط روده کوچک نفوذ کرده و به گامونت های نر (میکروگامونت) و گامونت های ماده(ماکروگامونت) دگرگونی می یابند. در خلال ۶ ساعت پس از بلع بافت حاوی انگل، گامونت ها در درون حفره حاوی انگل (PV) در سلول های فنجانی شکل نزدیک پرزها یافت می شوند. میکروگامت های آزاد شده از میکروگامونت ها به طور فعال به قسمت محیطی ماکروگامونت حرکت می کنند.

بعد از عمل لقاح، دیواره ای در اطراف زیگوت توسعه یافته و اووسیست تشکیل می گردد. فرایند کامل گامتوگونی و لقاح ممکن است در طی ۲۴ ساعت تکمیل شده، اما در زمان های مختلف صورت می گیرد. از این رو ممکن است گامونت ها و اووسیست ها به طور همزمان یافت شوند. موضع گیری گامتوگونی و نوع سلول آلوده در ارتباط با گونه سارکوسیستیس و مرحله گامتوژنز متفاوت است. برای مثال گامونت های سارکوسیستیس هیرسوتا و کروزی در سلول های فنجانی شکل روده و نزدیک آن تکامل می یابد.

اووسیست در لایه پارین روده هاگ دار می شود. عموما اووسیست های هاگدار شده، بی رنگ بوده و دارای دیواره نازکی کمتر از یک میکرومتر هستند و حاوی ۲ اسپوروسیست درازند. هر اسپوروسیست حاوی ۴ اسپروزوئیت دراز و یک جسم باقیمانده می باشد [۲].

دیواره اووسیست نازک و غالبا شکننده است. اسپوروسیست های آزاد در مجرای روده وارد شده و بوسیله مدفوع دفع می شوند. گاهی اووسیست های هاگدار نشده و جزئی هاگدار شده در مدفوع یافت می گردند. دوره کمون و آشکار متغیر بوده، اما برای اکثر گونه های سارکوسیستیس اولین اووسیست ها بین ۷ تا ۱۴ روز بعد از بلع سارکوسیست ها بوسیله مدفوع دفع می شوند.

میزبان واسط از طریق بلع اسپوروسیست های موجود در مواد غذایی و آب آلوده می شود. در روده کوچک اسپوروزوئیت ها از کیست اسپوروسیست ها خارج می گردند. سرنوشت اسپوروزوئیت از زمان بلع اسپوروسیست ها تا تکامل اولیه در سرخرگ های غدد لنفاوی روده بند ناشناخته است. طی ۴ تا ۷ روز پس از آلودگی، اسپوروزوئیت های *سارکوسیستیس کروزی* در مجرای روده و در اندوتلیوم سرخرگ ها یافت می گردند. در همین زمان زوئیت های آزاد در سرخرگ های غدد لنفاوی روده بند دیده می شوند.

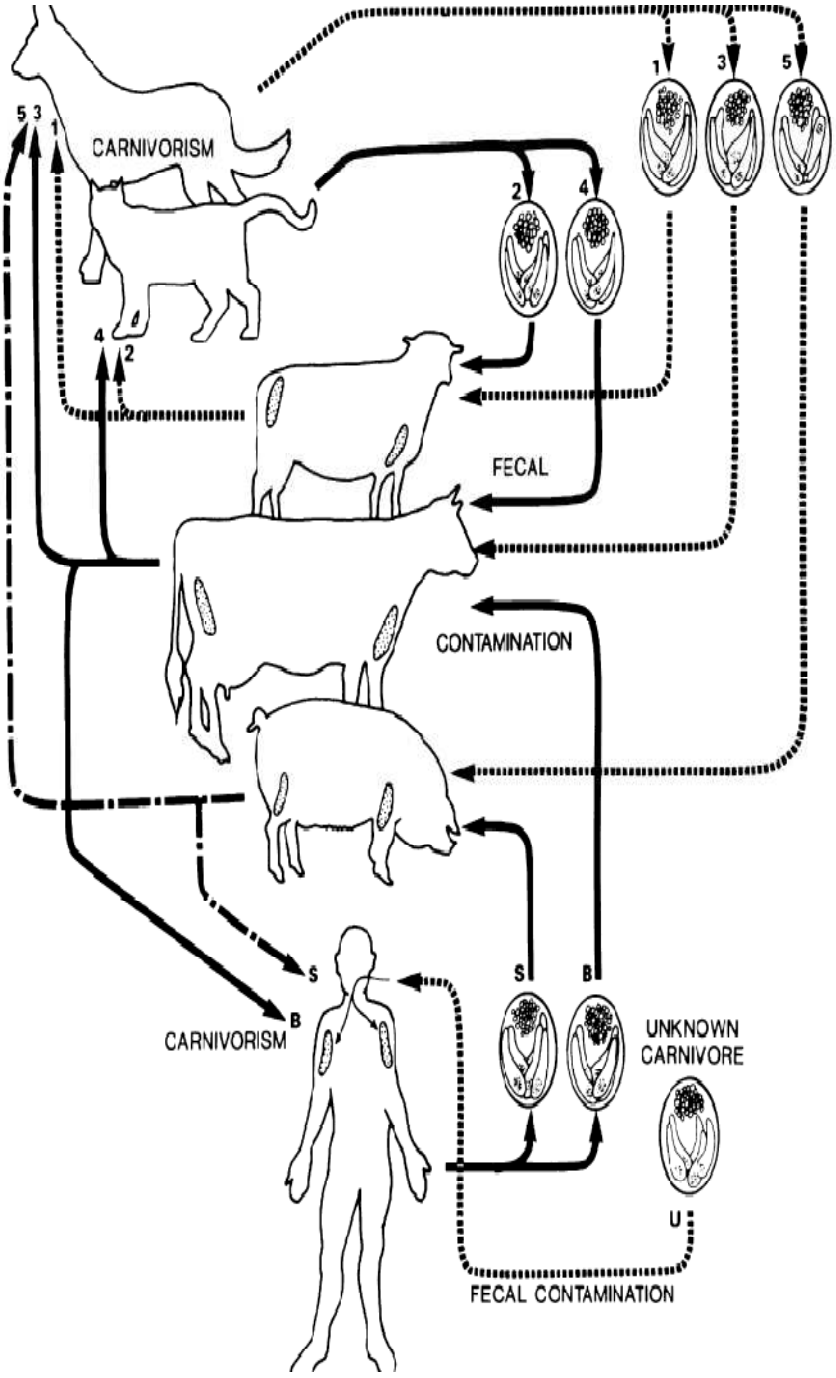
اولین نسل شیزوگونی یا مروگونی طی ۷ روز پس از آلودگی در سلول های اندوتلیال شروع شده و ممکن است در خلال ۱۵ روز پس از آلودگی تکمیل گردد. نسل دوم از شیزونت ها یا مرونت ها از ۱۹ تا ۴۶ روز بعد از آلودگی در اندوتلیوم مویرگ ها و همچنین سرخرگ های کوچک سرتاسر بدن یافت می شوند. نسل سوم شیزونت ها، شیزونت های چند هسته ای هستند که در مویرگ های سراسر بدن یافت می شود. بیشترین تعداد شیزونت ها در گلومرول های کلیه مشاهده می گردند. مروزوئیت های حاصل از این نسل به سلول های ماهیچه ای وارد می شوند و متروسیت ها را تشکیل می دهند و شکل گیری سارکوسیست را آغاز می نماید [۲۹]. در رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، شیزونت های نابالغ بازوفیلیک بوده و درخشان تر از بافت میزبان اند. نوکلئوپلاسم شیزونت ها منتشر بوده و شناسایی آن در مقاطع ۶ میکرومتری خالی از مشکل نیست، ولیکن در مقاطع ۱ تا ۳ میکرومتری وضوح بیشتری دارند. هسته قطعه قطعه شده و به چندین هستک (تا ۳۷ عدد) تقسیم می شوند. مروزوئیت ها در قسمت پیرامونی تشکیل می گردند. شکل و اندازه شیزونت ها به حد قابل ملاحظه ای متغیر است. شیزونت های موجود در عضلات بدن بلندتر از شیزونت های سایر بافت ها هستند. هر دو نسل اول و دوم شیزونت ها در داخل سیتوپلاسم سلول میزبان قرار گرفته و بوسیله حفره حاوی انگل احاطه نشده اند [۲].

طی ۲۴ تا ۴۶ روز بعد از آلودگی، مروزوئیت ها در خون محیطی یافت شده که با بلوغ شیزونت های نسل دوم منطبق است. مروزوئیت ها به طور خارج سلولی در خون وجود داشته و یا در داخل سلول های مونو نوکلئر قرار گرفته اند. مروزوئیت های داخل سلولی حاوی ۱ یا ۲ هسته بوده و برخی از آنها به ۲ انگل (ظاهرا از طریق آندودیوژنی) تقسیم شده اند.

معمولا شیزونت ها دارای مراحل محدود زمانی بوده و قبل از تشکیل سارکوسیست ها ناپدید می شوند. مروزوآیت های آزاد شده از نسل نهایی شیزوگونی شکل گیری سارکوسیست را آغاز می نمایند. مروزوآیت داخل سلولی احاطه شده بوسیله حفره حاوی انگل، گرد تا بیضوی (متروسیت) می شوند. بعد از تقسیمات مکرر، سارکوسیست با برادی زوئیت ها پر شده که مرحله عفونی برای میزبان قطعی است. عموما سارکوسیست ها حدود ۷۵ روز بعد از آلودگی عفونی شده، اما اختلاف قابل ملاحظه ای در بین گونه های سارکوسیستیس وجود دارد. شیزونت ها و سارکوسیست های نابالغ برای میزبان نهایی عفونی نیستند. سارکوسیست ها ممکن است برای تمامی دوره زندگی میزبان دوام یافته، اما بسیاری از آنها طی ۳ ماه بعد از آلودگی ناپدید می شوند (شکل۲-۱) [۲].

جدول ۲-۱: گونه های سارکوسیستیس در حیوانات مزرعه ای [۶۰]

میزبان واسط	گونه های سارکوسیستیس	مترادف ها	میزبان نهایی
گاو	*S.cruzi*	*S.bovicanis*	سگ، گرگ، روباه، راکون
	S.hirsuta	*S.bovifelis*	گربه
	S.hominis	*S.bovihominis*	انسان ها
گوسفند	*S.tenella*	*S.ovicanis*	سگ، روباه
	S.arieticanis	-	سگ
	S.gigantica	*S.ovifelis*	گربه
	S.medusiformis	-	گربه
بز	*S.capracanis*	-	سگ، روباه
	S.hericanis	-	سگ
	S.moulei	-	گربه
خوک	*S.miescheriana*	*S.suicanis*	سگ، راکون
	S.suihominis	-	انسان
	S.porcifelis	-	انسان
اسب	*S.bertrami*	*S.equicanis*	سگ
	-	*S.fayeri*	مشخص نشده
	S.neurona	-	مشخص نشده



شکل(۲-۱): چرخه انتقال سارکوسستیس.

S.bovihominis (B), S.suihominis(S), Unknown species (U), S.ovicanis (1), S.ovifelis (2) S.bovicanis (3), S.bovifelis (4), S.suicanis (5)

۲-۴- معیارهای طبقه بندی گونه های سارکوسیستیس

قبل از کشف چرخه زندگی ساکوسیستیس در سال ۱۹۷۲، دو معیار اصلی نامگذاری گونه های جدید سارکوسیستیس، ساختمان سارکوسیست ها و نوع میزبان بودند. معیارهای مختلفی که جهت طبقه بندی استفاده می شوند، شامل ساختمان سارکوسیست ها، شیزونت ها، اووسیست ها و اسپوروسیست ها و نوع میزبان های اختصاصی می باشد. امروزه جهت شناسایی گونه های انگل از روش های نوین ملکولی نیز استفاده می شود.

۲-۴-۱- سارکوسیست ها

شکل و اندازه سارکوسیست بر حسب سن سارکوسیست، نوع سلول میزبان و روش های مطالعه متفاوت است. به عنوان مثال سارکوسیست های گونه ای واحد در عضلات قلب و سیستم اعصاب مرکزی همیشه کوچکتر از آنها در عضلات بدن اند. همچنین اندازه و شکل سارکوسیست ها در ارتباط با پایدار کردن و احتمالاً نوع ماده پایدار کننده، متفاوت است. به علت موضع گیری متداول انگل ها در عضلات قابل انقباض اندازه، سارکوسیست بر حسب حالت انبساط یا انقباض سلول میزبان در زمان پایدار کردن متغیر خواهد بود. رشد برخی از گونه های سارکوسیستیس برای چندین سال بعد از رسیدن آنها به مرحله عفونی ادامه می یابد. به علاوه شکل سارکوسیست ها در ارتباط با محل قرار گرفتن آنها در ارگان های مختلف متفاوت است. ساختمان متروسیت ها معیار مفیدی نیست، زیرا غالباً شکل آنها نامنظم و اندازه آنها در ارتباط با مرحله تقسیم متغیر است. ساختمان برادی زوئیت ها نیز متغیر است، به علت آنکه برادی زوئیت ها در اکثر گونه های سارکوسیستیس موزی شکل بوده، اندازه گیری دقیق آنها مشکل است. در مجموع، جز در موارد اختلاف آشکار اندازه برادی زوئیت ها از این معیار نباید جهت شناسایی استفاده شود. ساختمان ارگانل ها چون میتوکندری ها معیارهای خوبی برای طبقه بندی نیستند.

ساختمان دیواره سارکوسیست معیار مفیدی برای شناسایی است. گزارش های متعدد نشان داده اند که ساختمان فرا ریزبینی دیواره سارکوسیست گونه های سارکوسیستیس، اختلاف قابل ملاحظه ای را از شکل نسبتاً ساده تا بسیار پیچیده دارند. با بررسی گزارش های منتشر شده به نظر می رسد که حداقل ۲۴ نوع متمایز دیواره سارکوسیست وجود دارد که احتمال کشف انواع دیگر آن نیز در آینده وجود دارد. دیواره اولیه سارکوسیست از غشاء انگلی (parasite membrane) و لایه ی متراکم الکترونی در زیر آن تشکیل یافته است.

یک لایه گرانوله بلافاصله در زیر دیواره ی اولیه ی سارکوسیست وجود دارد. تیغه های منشعب شده از لایه گرانوله سارکوسیست را به بخش هایی مجزا نموده که حاوی برادی زوئیت ها و متروسیت ها می باشد. لازم به ذکر است که در توصیف گونه سارکوسیستیس، ساختمان دیواره سارکوسیست باید با احتیاط مورد استفاده قرار گیرد،زیرا:

الف) ساختمان دیواره در ارتباط با ماده پایدار کننده و حالت دژنراتیو سلول میزبان متفاوت خواهد بود. به عنوان مثال دیواره صاف و نازک سارکوسیستیس کروزی در نتیجه پایدار شدن با مواد مختلف ممکن است ضخیم و ناصاف به نظر برسد.

ب) در برخی گونه ها زایده های پرز مانند دیواره سارکوسیست عمیقاً در سلول عضلانی احاطه کننده فرور فته و ممکن است آشکار ساختن آنها با میکروسکوپ نوری غیرممکن باشد. در این حالت ممکن است دیواره

ناصاف سارکوسیست صاف به نظر بیاید. بنابراین برای توصیف گونه جدید سارکوسیستیس بررسی دیواره سارکوسیست به وسیله میکروسکوپ الکترونی ضروری است.
ج) ساختمان دیواره سارکوسیست ممکن است در ارتباط با سن متفاوت باشد. بنابراین در بررسی نمونه های جدا شده از حیوانات با آلودگی طبیعی شرط احتیاط ضروری بوده، زیرا روش معتبری برای تعیین سن سارکوسیست وجود ندارد [۲].

۲-۴-۲- شیزونت ها

ساختمان شیزونت ها ارزش محدودی در طبقه بندی دارد، زیرا در ارتباط با چرخه تکاملی و سلول میزبان بسیار متغیر است.

۲-۴-۳- اووسیست ها و اسپوروسیست ها

ساختمان اووسیست ها و اسپوروسیست ها در طبقه بندی سارکوسیستیس ارزش کمی را دارا بوده یا فاقد ارزش اند، زیرا تمامی اووسیست ها و اسپوروسیست های سارکوسیستیس از نظر ساختمانی مشابه هستند.
دوره های کمون و آشکار بسیار متغیر بوده و در طبقه بندی سارکوسیستیس ارزشی ندارند. در مورد *سارکوسیستیس کروزی* اسپوروسیست ها برای ماه ها دفع می شوند.

۲-۴-۴- اختصاصی بودن میزبان

عموما گونه های سارکوسیتیس برای میزبانان واسط بیشتر از میزبانان نهایی اختصاصی هستند. برای مثال، برای *سارکوسیستیس کروزی*، گاو و بیزون (گاو کوهان دار وحشی) تنها میزبانان واسط بوده، در حالی که سگ، گرگ، راکون، شغال و روباه می توانند نقش میزبانان نهایی را ایفا کنند.

۲-۴-۵- شناسایی گونه بر مبنای واکنش زنجیره ای پلیمراز

امروزه جهت شناسایی گونه های انگل از روش های نوین ملکولی نظیر RFLP، Real time PCR و غیره استفاده می شود. از جمله مزایای روش های ملکولی می توان در نیاز به میزان کم از ماده وراثتی، عدم تاثیر شرایط مخدوش کننده محیط و میزبان و قابلیت بررسی تعداد زیادی نمونه در یک زمان کوتاه و حساسیت بالای تست اشاره نمود [۷۱]. هدف از این مطالعه استفاده از روش PCR استاندارد برای تشخیص گونه های سارکوسیست در منطقه شهرکرد و به دنبال آن روش RFLP جهت تعیین گونه های سارکوسیستیس در نمونه های آلوده بود.

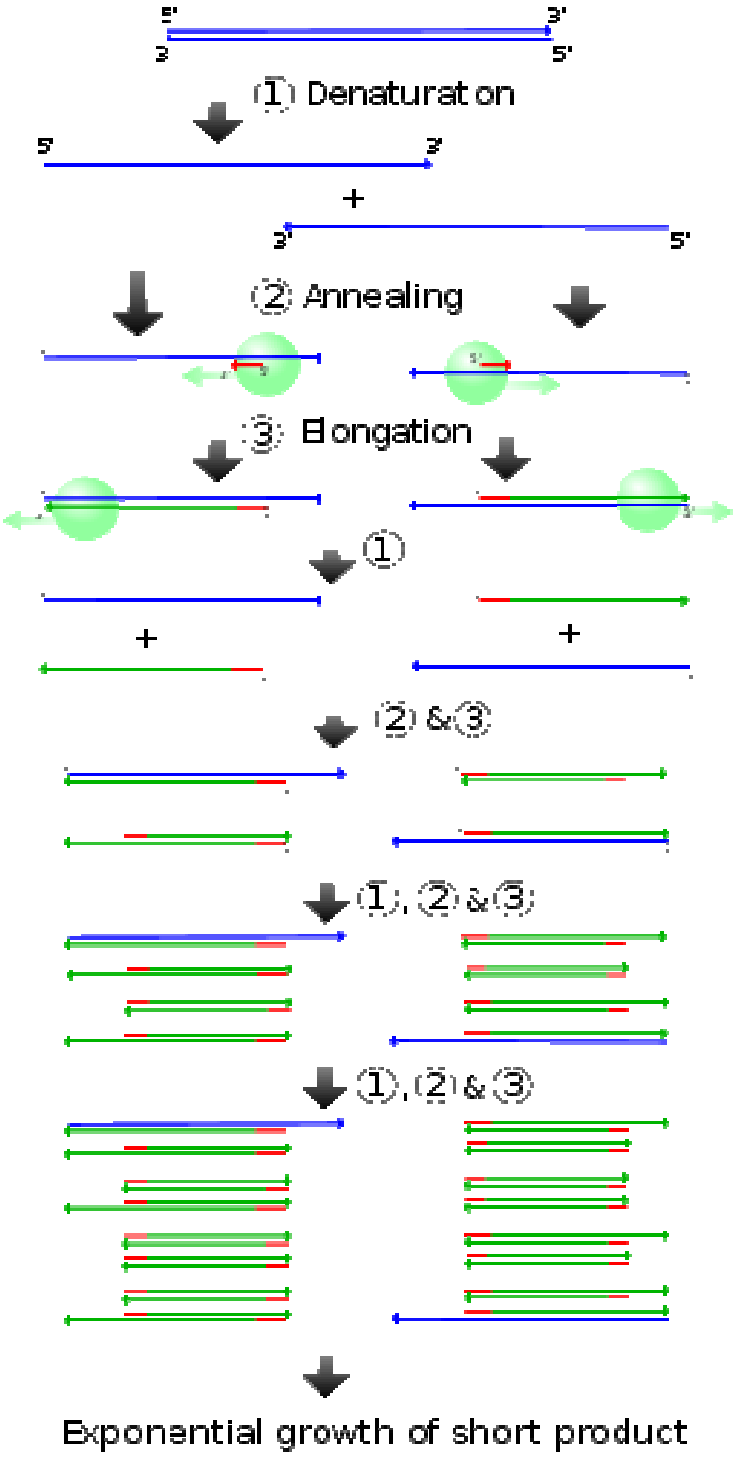
۲-۴-۵-۱- واکنش زنجیره ای پلیمراز

PCR، تکنیکی است برای تکثیر قطعات اختصاصی DNA و شامل سیکل های متعدد ۳ مرحله ای می باشد: باز شدن دو رشته الگو از یکدیگر، اتصال پرایمرها و تکثیر قطعات. با حرارت دادن بیش از ۹۰ درجه سانتی گراد دو رشته مکمل DNA از یکدیگر جدا می شوند و با سرد شدن مجدد ۲ قطعه پرایمر طراحی شده به طور اختصاصی، هریک به یکی از رشته های DNA هدف متصل می گردند. سپس دما تا حدود ۷۲ تا ۷۵ درجه سانتی گراد افزایش یافته تا آنزیم DNA پلیمراز با توسعه پرایمرها، تکثیر قطعات اختصاصی را انجام

دهد (شکل ۲-۲). اصول اولیه روشPCR توسط Khurana و همکاران در سال های ۱۹۷۴-۱۹۷۱ شرح داده شد و حدود ۱۰ سال بعد توسط Kary Mullis و همکارانش عملا به کار گرفته شد. امروزه این روش تقریبا در تمامی آزمایشگاه های ملکولی به طور متداول مورد استفاده می باشد [۱،۱۲،۱۳].

PCR، از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانند سازی DNA دارد و در واقع بر گرفته از آن است. برای انجام PCR، آنزیمDNA پلیمراز، نوکلئوتیدهای تری فسفات، یون منیزیم، DNA الگو وپرایمر لازم است.

از آنجایی که DNA معمولا دو رشته ای است، جهت تکثیر بخشی از آن یک جفت پرایمر مورد نیاز است که به طور اختصاصی بر اساس توالی های دو طرف DNA هدف طراحی و ساخته می شوند. پرایمرها محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص نموده و اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می کنند. هر ناحیه از ملکول DNA می تواند انتخاب شود به شرطی که توالی های دو طرف آن معلوم باشد. دو قطعه اولیگو نوکلئوتیدی کوتاه، هر یک باید با یک رشته از مارپیچ دوتایی DNA، هیبرید شوند. این اولیگونوکلئوتیدها که به عنوان پرایمر در واکنش های سنتز DNA عمل می کنند، منطقه ای را که باید تکثیر بشود، محدود می کنند (شکل۲-۲) [۱].



شکل ۲-۲- نحوه تکثیر DNA به روش PCR