

دانشگاه تبریز

دانشکده دامپزشکی

گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

عنوان

بررسی سرولوژیک منیران شیوع توکسوپلاسموزیس در کوسفندان شهر تبریز به روش

وسرن بلات و دات بلات

اساتید راهنما

دکتر احمد نعمت‌الهی

دکتر پریسا شهبازی

پژوهشگر

حامد بهنیافر

بهمن ۱۳۹۲

الرحمن الرحيم

فهرست مطالب

۱	کلیات و بررسی منابع
۲	۱- تاریخچه
۲	۲- رده‌بندی انگل
۳	۳- چرخه زندگی و اشکال انگل
۵	۳-۱ تاکی‌زوآیت
۷	۳-۲ برادی‌زوآیت و کیست بافتی
۱۰	۳-۳ چرخه زندگی در میزبان نهایی (گره)
۱۰	۳-۳-۱ سیکل ناشی از برادی‌زوآیت در گره
۱۲	۳-۳-۲ چرخه ناشی از اووسیست در گره
۱۳	۳-۳-۳ چرخه ناشی از تاکی‌زوآیت در گره
۱۳	۳-۴ چرخه زندگی در میزبان واسط
۱۴	۴- پاتوژنز در گوسفند
۱۵	۵- علائم بالینی
۱۵	۵-۱ علائم در گوسفند
۱۵	۵-۲ علائم در انسان
۱۷	۶- تشخیص
۱۸	۶-۱ پاسخ‌های ایمنی و تشخیص ایمنی در گوسفند
۱۸	۶-۲ تشخیص سقط ناشی از توکسوپلازما در میش
۲۱	۷- پیشگیری و درمان
۲۱	۷-۱ پیشگیری
۲۱	۷-۱-۱ کنترل و پیشگیری در انسان
۲۳	۷-۱-۲ واکسیناسیون
۲۳	۷-۲ درمان
۲۴	۷-۲-۱ درمان پروفیلاکسی
۲۴	۷-۲-۲ درمان توکسوپلاسموز در انسان

۲۵.....	۸- اپیدمیولوژی
۲۷.....	۹- انتقال
۳۰.....	مواد و روش کار
۳۱.....	۱- منطقه مورد بررسی و روش نمونه برداری
۳۱.....	۲- استخراج آنتی ژن توکسوپلازما گوندی
۳۱.....	۲-۱ مواد مورد نیاز
۳۲.....	۲-۲ روش استخراج آنتی ژن
۳۳.....	۳- آماده سازی آنتی ژن جهت تزریق به گوسفند با ادجوانت کامل
۳۳.....	۴- آماده سازی آنتی ژن جهت تزریق به گوسفند با ادجوانت ناقص
۳۳.....	۵- تزریق به گوسفند و تهیه سرم کنترل مثبت
۳۴.....	۶- روش انجام دات بلات
۳۴.....	۶-۱ مواد مورد نیاز
۳۵.....	۶-۲ روش انجام دات بلات
۳۵.....	۶-۳ تعیین تیتر مناسب سرم کنترل مثبت به وسیله دات بلات
۳۶.....	۷- SDS-PAGE و وسترن بلات
۳۶.....	۷-۱ مواد مورد نیاز
۳۹.....	۷-۲ روش انجام SDS-PAGE و وسترن بلات
۴۰.....	۸- آنالیز آماری
۴۱.....	نتایج
۴۲.....	۱- گوسفندان آلوده به توکسوپلازما
۴۶.....	بحث و نتیجه گیری
۵۴.....	منابع

فهرست تصاویر و جداول

- شکل ۱-۱: چرخه زندگی توکسوپلازما گوندی ۵
- شکل ۱-۲: قسمت‌های مختلف تاکی‌زوآیت توکسوپلازما گوندی ۹
- شکل ۱-۳: میزبانان واسط و نهایی توکسوپلازما گوندی ۲۷
- شکل ۱-۴: چرخه انتقال توکسوپلازما گوندی به انسان و حیوانات ۲۹
- جدول ۲-۱: موارد مثبت توکسوپلازماز در ۱۹۲ گوسفند نر و ماده مورد مطالعه ۴۲
- شکل ۳-۱: دات بلات انجام شده بر روی سرم کنترل مثبت جهت تعیین رقت مناسب ۴۳
- شکل ۳-۲: نتایج نهایی دات بلات های انجام شده بین آنتی ژن توکسوپلازما و سرم‌های گوسفندان نر مورد آزمایش با رقت ۱:۱۰۰ ۴۳
- شکل ۳-۳: نتایج نهایی دات بلات های انجام شده بین آنتی ژن توکسوپلازما و سرم های گوسفندان ماده مورد آزمایش با رقت ۱:۱۰۰ ... ۴۳
- شکل ۳-۴: SDS-PAGE انجام شده بر روی تعدادی از سرم‌های مثبت ۴۴
- شکل ۳-۵: وسترن بلات انجام شده بر روی تعدادی از سرم‌های مثبت ۴۴
- نمودار ۳-۱: موارد مثبت توکسوپلازماز در ۱۹۲ گوسفند نر و ماده مورد مطالعه ۴۵

فصل اول:

کلیات و بررسی منابع

۱- تاریخچه

توکسوپلازما گوندی^۱ به دلیل اهمیت پزشکی و دامپزشکی خود، یکی از انگل‌هایی است که به خوبی مطالعه شده است. این انگل به صورت گسترده به عنوان مدل سلولی برای ارگانیزم‌های آپیکمپلکس^۲ استفاده می‌شود. برخی از مزایای استفاده از توکسوپلازما گوندی جهت مطالعات بیولوژیک شامل اندازه کافی جهت مطالعه آسان با میکروسکوپ الکترونی، رشد در همه رده‌های سلولی حیوانات خونگرم، حفظ و نگهداری نامحدود در موش و کشت سلول و وجود یک گونه عفونی برای همه میزبان‌ها است.

این انگل در سال ۱۹۰۸ توسط نیکول و مانسو کشف شد. نیکول و مانسو یک تک‌یاخته در بافت جونده‌ای شبیه همستر به نام کتنوداکتیلوس گوندی^۳ مشاهده نمودند. این جونده جهت مطالعه درباره لیشمانیوزیس در آزمایشگاه چارلز نیکول در انیستیتو پاستور تونس استفاده می‌شود. در ابتدا نیکول به پیروپیلایسم و سپس به لیشمانیا مشکوک شد کرد، اما به زودی دریافت که یک ارگانیزم جدید کشف نموده است و آن را بر اساس شکلش توکسوپلازما (توکسو: کمان یا قوس؛ پلازما: زندگی) و براساس میزبانش گوندی نامید. با توجه به گذشته باید اسم صحیح انگل توکسوپلازما گاندی‌ای می‌شد؛ نیکول و مانسو به اشتباه میزبان را کتنوداکتیلوس گوندی شناسایی کردند (۱۱). اسپلندور همان انگل را در یک خرگوش در برزیل کشف کرد و گذشته از این که آن را لیشمانیا شناسایی نمود، اسم گذاری نیز نکرد.

۲- رده‌بندی انگل

توکسوپلازما گوندی یک انگل کوکسیدیایی است که گربه‌سانان میزبان نهایی و حیوانات خونگرم میزبان واسط آن هستند و رده‌بندی آن به صورت زیر می‌باشد:

Phylum: Apicomplexa; Levine, 1970

^۱ *Toxoplasma gondii*

^۲ Apicomplexa

^۳ *Ctenodactylus gondii*

Class: Sporozoasida; Leukart, 1879

Subclass: Coccidiasina; Leukart, 1879

Order: Eimeriorina; Leger, 1911

Family: Toxoplasmatidae, Biocca, 1956

Genus: Toxoplasma Nicolle and Manceaux, 1909

فقط یک گونه توکسوپلازما به نام توکسوپلازما گوندای وجود دارد.

کوکسیدیاها یکی از مهم‌ترین انگل‌های حیوانی هستند و اولین تک‌یاخته کشف شده می‌باشند. در کوکسیدیاها اووسیست یک مرحله کلیدی و اساسی طبقه‌بندی آنهاست. اووسیست حاوی چهار اسپوروسیت که هر کدام دو اسپوروزوایت دارد را به عنوان آیمریا طبقه‌بندی می‌کنند و اووسیست حاوی دو اسپوروسیت دارای چهار اسپوروزوایت به طور تاریخی ایزوسپورا طبقه‌بندی شده است. کوکسیدیوز ناشی از گونه‌های آیمریا از بیماری‌های با اهمیت بالای اقتصادی در طیور، گاو، گوسفند، بز و اکثر علفخواران است و با افزایش میزان حیوانات عاری از کوکسیدیاها مشکل است.

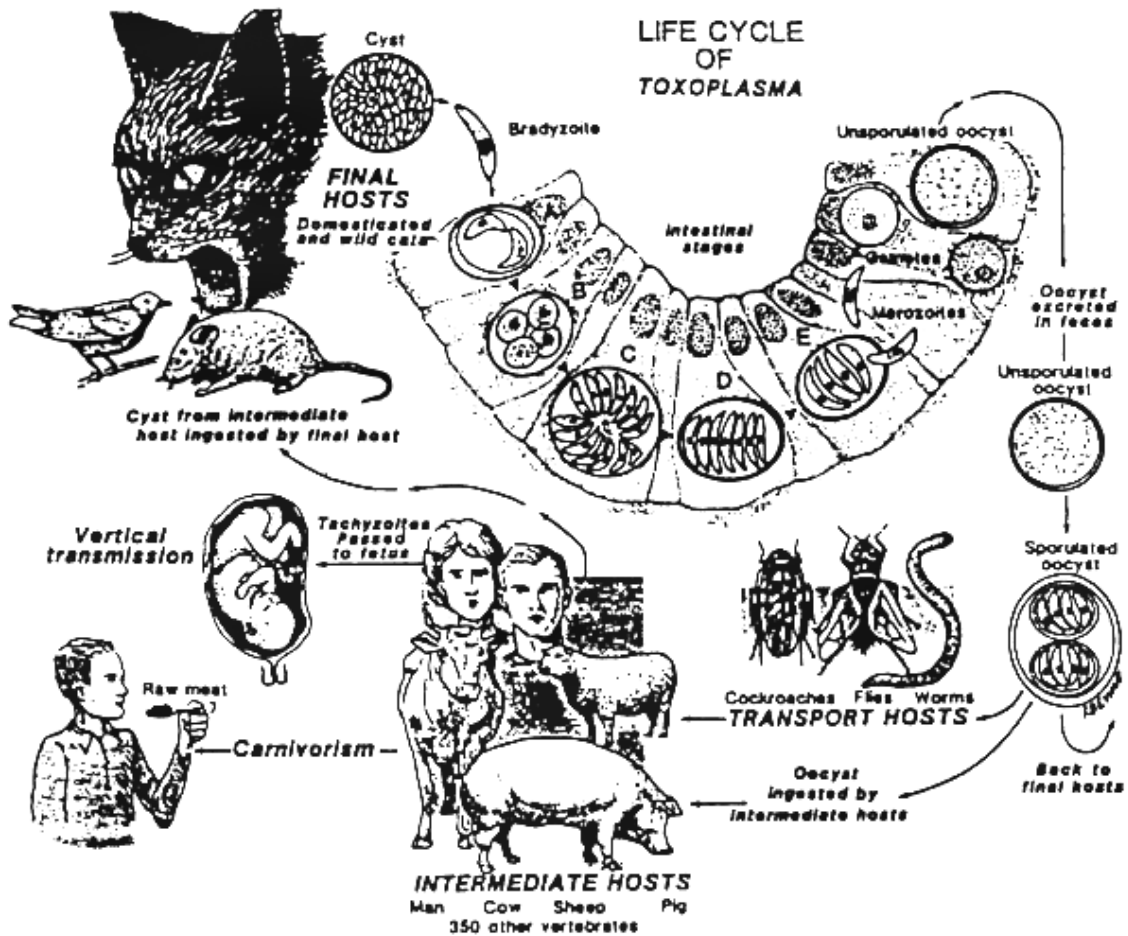
۳- چرخه زندگی و اشکال انگل

قبل از کشف چرخه زندگی توکسوپلازما گوندی کوکسیدیاها را به عنوان یک انگل یک میزبان با چرخه زندگی تک میزبان ساده قلمداد می‌کردند. عفونت در روده و معمولاً انتروسیست به اثبات رسیده است. میزبان با بلع اووسیست اسپوروله شده آیمریا عفونی می‌شود و بعد از خروج از کیست اسپوروزوایت‌ها سلول‌های اپیتلیالی روده را سوراخ می‌کنند و قبل از تولید گامونت‌های نر و ماده تکثیر جنسی انجام می‌دهند. پس از بارور شدن تخم اووسیست تشکیل می‌شود و به صورت نارس و غیراسپوروله با مدفوع دفع می‌شود. اسپوروله شدن در محیط بیرون رخ می‌دهد. بر خلاف آیمریا سال‌های زیادی چرخه زندگی ایزوسپورا به میزان کمی شناخته شده بود تا اینکه در سال ۱۹۷۰ چرخه توکسوپلازما گوندی کشف شد. گونه‌های

ایزوسپورا به عنوان انگل‌های گوشتخواران (سگ‌سانان و گربه‌سانان) و پرندگان شناخته می‌شدند و آنها را انگل‌هایی با میزبان اختصاصی قلمداد نمی‌کردند (۱۲).

در سال ۱۹۷۰ کشف شد که توکسوپلازما گوندی کوکسیدیای روده گربه‌سانان است و یک اووسیست شبه ایزوسپورایی دارد. البته از قبل این انگل تقریباً در میزبانان خونگرمش در بافت‌های خارج روده‌ای شناخته شده بود. این یافته یک نقطه مهم در علوم پزشکی و دامپزشکی بود که منجر به یافتن چندین گونه شبه توکسوپلازما مهم از نظر اقتصادی (مثل نئوسپورا، سارکوسیست) و کشف چرخه زندگی آنها شد.

توکسوپلازما می‌تواند از طریق مدفوعی دهانی، گوشتخواری و جفت منتقل شود. سه مرحله عفونی توکسوپلازما گوندی شامل تاکی‌زوآیت، برادی‌زوآیت و اووسیست وجود دارد. این مراحل با یک چرخه زندگی پیچیده به هم مرتبط می‌شوند.



شکل ۱-۱: چرخه زندگی توکسوپلازما گوندی

(برگرفته از: Herenda, D.; Manual on meat inspection for developing countries; 1994)

۳-۱ تاکی‌زوآیت

تاکی‌زوآیت (تاکوس = سرعت در یونانی) مرحله تکثیر سریع است. تاکی‌زوآیت هلالی شکل، تقریباً به اندازه 6×2 میکرومتر، با یک انتهای قدامی نوک تیز (مخروطی شکل) و انتهای خلفی گرد است. به صورت فراساختاری این انگل یک ساختار پیچیده با چندین ارگانل دارد. تاکی‌زوآیت شامل ارگانل‌ها و گنجیدگی‌های متعددی شامل یک پیکل (پوشش خارجی)، سیتواسکلتون (کمپلکس غشای داخلی، میکروتوبول‌های ساب‌پلیکولار، حلقه آپیکال، حلقه‌های قطبی، یک کونوئید)، میکروپور ترش‌چی (راپتری‌ها، میکرونم‌ها، گرانول‌های متراکم)، یک میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی، یک کمپلکس گلژی، ریبوزوم‌ها، شبکه‌های آندوپلاسمی زبر و صاف (ER)، میکروپور، هسته، گرانول‌های آمیلوپکتین، دستگاه گلژی و یک

آپیلوپلاست است. هرچند تاکی‌زوآیت می‌تواند به وسیله سر خوردن، خم شدن، تموج داشتن و چرخیدن حرکت کند، ولی هیچ وسیله قابل رویت حرکت همچون مژه، تاژک یا پای کاذب ندارد. در عوض نیروی تحرک تاکی‌زوآیت به وسیله کمپلکس موتور اکتین میوزین چسبیده به کمپلکس غشاء داخلی تامین می‌شود. توکسوپلازما گوندی در دمای اتاق بی‌حرکت است.

عملکردهای کونوئید، راپتری، میکروپورها و میکرونم‌ها به طور کامل شناخته شده نیست، ولی شاید در سوراخ کردن سلول میزبان . ایجاد محیطی مناسب برای رشد و نمو و بقاء در سلول میزبان دخیل باشند. وقایع مکانیکی دخیل در چسبیدن و سوراخ کردن زوآیت شامل (۱) سر خوردن زوآیت، (۲) جستجوی سلول میزبان به وسیله نوک کونوئیدی زوآیت، (۳) شناسایی پلاسمای سلول میزبان، (۴) ایجاد اتصال متحرک که همراه با نفوذ زوآیت به داخل سلول میزبان به عقب حرکت می‌کند و (۵) اگزوسیتوز ناقص میکرونم‌ها، راپتری‌ها و گرانول‌های متراکم.

توکسوپلازما گوندی می‌تواند به سلول‌های متنوعی از طیف وسیعی از میزبانان نفوذ کند که این نشان می‌دهد که گیرنده‌های بیوشیمیایی مرتبط با چسبیدن و نفوذ احتمالاً برای بیشتر سلول‌های حیوانی مشترک است. تاکی‌زوآیت هنگام نفوذ و ورود به سلول به طور موقت دفرمه می‌شود. بلافاصله تاکی‌زوآیت به وسیله غشایی احاطه می‌گردد که از پلاسمای سلول میزبان منهای پروتئین‌های میزبان مشتق می‌شود. این غشاء بعداً تبدیل به غشاء واکوئل پارازیتوفوروس می‌شود. دقایقی پس از نفوذ تاکی‌زوآیت واکوئل پارازیتوفوروس و غشاء آن را به وسیله پروتئین‌های خود به فرم جدیدی در می‌آورد و یک شبکه غشایی توبولار در واکوئل پارازیتوفوروس شکل می‌دهد که از لحاظ ساختاری و آنتی‌ژنی با PVM (غشاء واکوئل پارازیتوفوروس) متفاوت بوده ولی اتصالاتی با آن دارد. در PVM سوراخ‌هایی ایجاد می‌شود که اجازه جابجایی دوطرفه ملکول‌های تا ۱۲۰۰ کیلو دالتون را بین PV و سیتوپلاسم میزبان می‌دهد. پروتئین‌های مربوط به گرانول متراکم به داخل PVM ترشح می‌شوند. این تغییرات محیط مناسبی جهت تکثیر انگل درون سیتوپلاسم میزبان فراهم می‌کند و شاید PVM تا ۲۴ ساعت تشکیل‌اش به رشد ادامه دهد.

تاکی‌زوآیت‌ها داخل سلول میزبان به وسیله جوانه زدن داخلی مکرراً تکثیر می‌یابند. جوانه زدن داخلی شکل خامی از تولیدمثل است که دو سلول دختر از انگل والد حاصل می‌شوند. در این نوع تقسیم ابتدا هسته و سپس کونوئید، غشاء و میکروتوبول‌های ساب‌پلیکولار تقسیم می‌شوند.

میزان تهاجم و رشد تاکی‌زوآیت بسته به سویه‌های مختلف توکسوپلازما گوندی و سلول میزبان فرق می‌کند. بعد از ورود تاکی‌زوآیت به سلول میزبان یک دوره فاز تاخیری تا تقسیم انگل وجود دارد و این فاز دوره تاخیری نسبتاً وابسته به انگل است. سویه ویرولان‌ت موش نسبت به سویه ویرولان‌ت پرندگان در محیط کشت رشد سریع‌تری دارد و برخی سویه‌های توکسوپلازما گوندی روزهای بیشتری تشکیل می‌دهند.

کیست کاذب^۱ توکسوپلازما گوندی به مجموعه سلول هسته دار میزبان مانند ماکروفاژ یا مونوسیت و تاکی‌زوآیت‌های توکسوپلاسمای درون آن گفته می‌شود. علت نامگذاری کیست کاذب ماهیت غشاء اطراف آن است که به سلول ماکروفاژ یا مونوسیت تعلق دارد و از انگل ترشح نشده است. تعداد تاکی‌زوآیت‌های درون کیست کاذب ۲۰ تا ۴۰ عدد است (۱).

۲-۳ برادی‌زوآیت و کیست بافتی

برادی‌زوآیت مرحله کیستی شده انگل در بافت‌ها است. برادی‌زوآیت را سیتوزوآیت نیز می‌نامند. برای اجتناب از اشتباه گرفتن اصطلاحات کیست (کیست کاذب هم گفته می‌شود) درون بافتی و اووسیست داخل مدفوع، دابی^۲ و بتی^۳ (۱۹۸۸) اصطلاح کیست بافتی را برای مرحله کیستی شده انگل پیشنهاد کردند (۱۳). کیست بافتی تا تقسیم برادی‌زوآیت به وسیله جوانه زدن داخلی رشد می‌کند و داخل سلول باقی می‌ماند. کیست‌های بافتی اندازه‌های متنوعی دارند؛ کیست‌های بافتی جوان می‌توانند تا قطر ۵ میکرومتر کوچک و تنها حاوی دو برادی‌زوآیت باشند، در حالی که مسن‌ترها می‌توانند حاوی هزاران ارگانسیم باشند

^۱ Pseudocyst

^۲ Dubey

^۳ Beattie

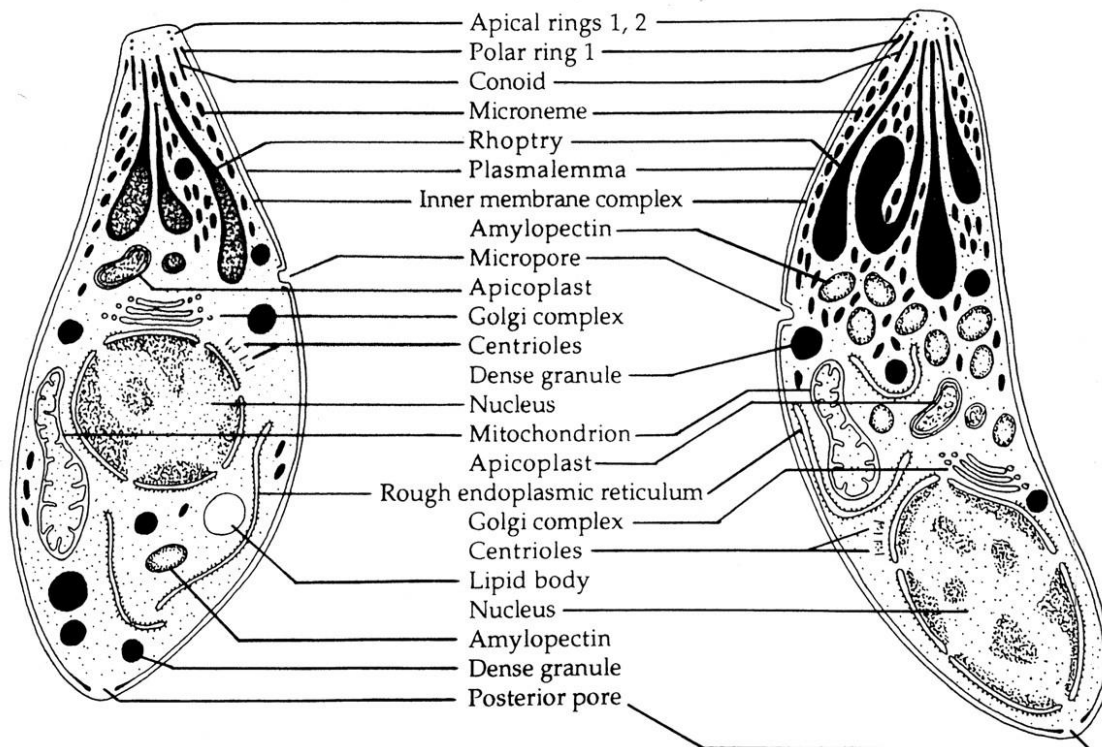
(اشکال F و E، ۱-۲، ۱-۱۲ و ۱-۱۵). وجود تعداد فرد برادی‌زوآیت در کیست‌های بافتی نشانگر تقسیم ناهمگام است. در مقاطع بافتی اغلب کیست‌های بافتی در مغز کروی هستند و ندرتا قطرشان به ۷۰ میکرومتر هم می‌رسد؛ در حالی که کیست‌های داخل عضلانی طویل هستند و طول آنها می‌تواند تا ۱۰ میکرومتر هم برسد. هرچند کیست‌های بافتی می‌توانند در ارگان‌های احشایی شامل ریه‌ها، کبد و کلیه‌ها هم وجود داشته باشند ولی آنها تمایل بیشتری به بافت‌های عصبی و عضلانی شامل مغز، چشم‌ها و عضلات اسکلتی و قلبی دارند.

دیواره کیست بافتی الاستیک و آرژوپروفیلیک است و ضخامتی کمتر از ۰/۵ میکرومتر دارد و صدها برادی‌زوآیت هلالی شکل را با اندازه ۳-۱×۵/۸-۵ میکرومتر در بر گرفته است. دیواره کیست بافتی در قیاس با برادی‌زوآیت‌هایی که درونش است، پرئودیک اسید شیف^۱ ضعیف‌تری است. کیست‌های بافتی درون واکوئل پارازیتوفوروسی که خود داخل سیتوپلاسم سلول میزبان است رشد می‌کنند. البته در کیست‌های مسن‌تر واکوئل پارازیتوفوروس به ندرت قابل مشاهده است. شاید ضخامت و ویژگی‌های دیواره کیست با توجه به سن انگل و سلول میزبان انگلی شده متفاوت باشد. دیواره کیست بافتی در همه نقاط آن یکسان و برابر نیست و خشن به نظر می‌رسد. شاید دیواره محدود کننده خارجی از هر دوی میزبان و انگل مشتق شود. بعضی برادی‌زوآیت‌ها به ویژه در کیست‌های بافتی مسن‌تر دژنره می‌شوند. در کیست‌های بافتی جوان‌تر برادی‌زوآیت‌ها اغلب کلفت‌تر هستند و نسبت به کیست‌های بافتی مسن‌تر ارگانل‌های کمتری دارند. ماتریکس بین برادی‌زوآیت‌ها حاوی وزیکل‌ها، اجسام شبه لیپید و ساختارهای توبولی است. کیست بافتی ممکن است به وسیله میتوکندری میزبان احاطه شود یا نشود که این وابسته به سلول میزبان انگلی شده یا عوامل ناشناخته است.

ساختار برادی‌زوآیت تفاوت‌های کمی با تاکی‌زوآیت دارد. هسته برادی‌زوآیت برخلاف تاکی‌زوآیت که متمایل به مرکز است، در قسمت عقبی واقع شده است. محتوای راپتری‌ها در برادی‌زوآیت الکترون‌دانس

^۱ Periodic Acid Schiff (PAS)

است، در حالی که در تاکی‌زوآیت پیچ و خم دار است. البته محتوای راپتری‌ها در برادی‌زوآیت‌ها با توجه به سن متفاوت است؛ یعنی در کیست‌ای بافتی جوان‌تر پیچ و خم دار ولی در مسن‌ترها الکترون‌دانس است. همچنین اکثر برادی‌زوآیت‌ها یک تا سه راپتری دارند که به طرف پشت خودشان خمیده شده‌اند. برادی‌زوآیت‌ها حاوی چندین گرانول آمیلوپکتین هستند که با معرف PAS قرمز رنگ می‌شوند. برادی‌زوآیت‌ها باریک‌تر از تاکی‌زوآیت‌ها هستند. برادی‌زوآیت‌ها میکرونم‌های بیشتری دارند که تا پشت هسته می‌رسند. حتی در کیست‌های جوان که فقط دو برادی‌زوآیت دارند هسته می‌تواند انتهایی باشد. کیست‌های بافتی قسمتی از چرخه زندگی توکسوپلازما گوندی هستند و تا ۳ روز پس از تلقیح ایجاد می‌شوند. در موش کیست‌های بافتی بازای وزن بافت بیشتر از میزبانان دیگر است.



شکل ۱-۲: قسمت‌های مختلف تاکی‌زوآیت توکسوپلازما گوندی

(برگرفته از: Dubey, J. P.; Toxoplasmosis of Animals and Humans; 2010)

۳-۳ چرخه زندگی در میزبان نهایی (گربه)

گربه‌ها (البته نه فقط گربه‌های خانگی، بلکه همه گربه‌سانان) می‌توانند اووسیست توکسوپلازما گوندی را دفع کنند. گربه اووسیست‌ها را بعد از بلع هر مرحله از سه مرحله عفونی توکسوپلازما گوندی یعنی تاکی‌زوآیت، برادی‌زوآیت و کیست دفع می‌کند؛ ولی بر حسب مرحله بلع شده دوره پره‌پتنت^۱ (مدت زمان آغاز عفونت تا دفع اووسیست) و فراوانی دفع اووسیست فرق می‌کند. صرفنظر از دز بلع شده دوره پره‌پتنت پس از بلع تاکی‌زوآیت می‌تواند متفاوت باشد. کمتر از ۵۰٪ گربه‌هایی که اووسیست یا تاکی‌زوآیت بلع کرده‌اند اووسیست دفع می‌کنند؛ در حالی که تقریباً همه گربه‌هایی که کیست بافتی بلع کرده‌اند اووسیست دفع می‌نمایند.

۱-۳-۳ سیکل ناشی از برادی‌زوآیت در گربه

پس از بلع کیست بافتی توسط گربه‌ها، دیواره کیست به وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک در معده و روده کوچک هضم می‌شود. برادی‌زوآیت‌های آزاد شده سلول‌های اپیتلیال روده کوچک را سوراخ می‌کنند و ایجاد نسل‌های مختلفی از توکسوپلازما گوندی را شروع می‌کنند. قبل از آغاز گامتوگونی ۵ مورفولوژی متفاوت از توکسوپلازما گوندی در سلول‌های اپیتلیال روده ایجاد می‌شود که اینها تیپ‌های A، B، C، D و E هستند و نسل‌های مختلف نیستند که هر کدام از این تیپ‌ها نسل‌های مختلفی را ایجاد می‌کنند. این مراحل غیرجنسی در روده گربه‌سانان ساختار متفاوتی نسبت به تاکی‌زوآیت‌هایی دارند که در لامینا پروپریا ایجاد می‌شوند. مراحل انتروآپیتلیال (تیپ‌های A-E، گامونت‌ها) در اپیتلیوم روده تشکیل می‌شوند و ایجاد شیزونت‌های تیپ‌های B-E با میکروسکوپ الکترونی اثبات شده است. هر شیزونت حاوی ۵ تا ۴۰ مرزوآیت می‌باشد (۲). تاکی‌زوآیت به طور خاص در لامینا پروپریا ایجاد می‌شود. شیزونت و گامونت به طور اختصاصی در انتروسیت‌ها ایجاد می‌شوند. تیپ‌های C، D و E به وسیله شیزوگونی تکثیر می‌یابند. در شیزوگونی هسته

^۱ Prepatent

۲ بار یا بیشتر بدون تقسیم سیتوپلاسم تقسیم می‌شود و ارگانیس‌های دختر (مروزوآیت) بعد از ایجاد ۴ هسته یا بیشتر ایجاد می‌شوند. قبل یا همزمان با آخرین تقسیم هسته در حوالی مرکز شیزونت تشکیل مروزوآیت شروع می‌شود. در نهایت مروزوآیت‌ها به سمت پیرامون شیزونت حرکت می‌کنند و پلاسمای شیزونت دور هر مروزوآیت نفوذ می‌کند و پلاسمای مروزوآیت را ایجاد می‌کند. مروزوآیت در انتهای خلفی خود از شیزونت جدا می‌شود. شیزونت‌ها و مروزوآیت‌های توکسوپلاسمای گوندی برای موش‌ها عفونی نیستند (۱۴ و ۱۵).

چرخه جنسی دو روز بعد از بلع کیست‌های بافتی به وسیله گربه آغاز می‌شود. منشا گامونت‌ها مشخص نشده‌اند، اما احتمالاً مروزوآیت‌های رها شده از شیزونت‌های تیپ D و E گامونت را ایجاد می‌کنند. گامونت‌ها در روده کوچک و بخصوص در ایلئوم ایجاد می‌شوند که این عمل ۳ تا ۱۵ روز پس از تلقیح انگل رخ می‌دهد. گامونت‌ها در بالای هسته سلول‌های اپیتلیال میزبان نزدیک نوک ویلی‌های روده کوچک ایجاد می‌شوند. گامونت‌های ماده (ماکروگامونت) تحت کروی^۱ بوده و هر کدام حاوی یک هسته مرکزی و چندین گرانول پاس مثبت هستند. گامونت‌های نر (میکروگامونت) بالغ بیضوی تا تخم‌مرغی هستند. در طی میکروگامتوزن هسته میکروگامونت ۲۱ تا ۳۰ قسمت می‌شود. میکروگامونت‌ها دو تاژک دارند و حاوی یک پرفوراتوم هستند که تاژک‌ها از بازال بادی بلافاصله پشت پرفوراتوم منشا می‌گیرند.

میکروگامونت با استفاده از تاژک‌ها شنا می‌کنند و ماکروگامونت‌های بالغ را سوراخ و بارور می‌کنند که نتیجه این عمل تشکیل زیگوت است. بعد از بارورسازی یک دیواره اووسیستی دور انگل تشکیل می‌شود. سلول‌های اپیتلیال پاره می‌شوند و اووسیست‌ها را داخل لومن روده خالی می‌کنند.

در دید میکروسکوپی اووسیست‌های غیر اسپوروله تحت کروی تا کروی و به اندازه 12×10 میکرومتر هستند. دیواره اووسیست شامل دو لایه بی‌رنگ است. اسپورولاسیون در طی ۱ الی ۵ روز و در بیرون از بدن گربه رخ می‌دهد که این مدت زمان وابسته به دما و میزان اکسیژن است. اووسیست‌های اسپوروله

^۱ Subsppherical

نیمه‌بیضی تا بیضوی و با اندازه 11×13 میکرومتر هستند. هر اووسیست اسپوروله حاوی دو اسپوروسیست بیضوی با اندازه 6×8 میکرومتر است و هر اسپوروسیست حاوی چهار اسپوروزوآیت است که این اسپوروزوآیت‌ها از طریق جوانه‌زنی داخلی ایجاد می‌شوند.

دیواره اووسیست‌های اسپوروله شامل سه لایه یعنی لایه الکترون‌دنس خارجی، لایه میانی الکترون‌لوسنت و یک لایه داخلی نسبتاً الکترون‌دنس است. قرار دادن اووسیست در معرض هیپوکلریت سدیم $1/3\%$ (کلروکسی) لایه بیرونی را حذف می‌کند. دیواره اووسیست حاوی یک میکروپیل است که نسبتاً کوچک بوده و به صورت تصادفی ممکن است در هر نقطه دیواره قرار داشته باشد (۱۶). هرچند عملکرد میکروپیل شناخته شده نیست ولی شاید یک محل نشت پایه در دیواره اووسیست ایجاد می‌کند که نسبت به CO_2 و آنزیم‌ها حساس است و به نمک‌های صفراوی و تریپسین که خروج اسپوروزوآیت‌ها از اسپوروسیست‌ها را القاء می‌کنند اجازه ورود می‌دهد.

دیواره اسپوروسیست شامل دو لایه جدا است لایه داخلی شامل چهار صفحه خمیده است. در طی خروج از کیست در حضور نمک‌های صفراوی و تریپسین، اسپوروسیست ناگهان پاره می‌شود (این پاره شدن مشخصاً در محل سر به سر شدن صفحات است) که باعث رهایی اسپوروزوآیت‌ها می‌گردد.

اسپوروزوآیت شبیه تاکی‌زوآیت است، فقط میکرونم، راپتری و گرانول‌های آمیلوپکتین کمتری دارد. اسپوروزوآیت‌ها اندازه $2 \times 6 - 8$ میکرومتر و هسته ساب‌ترمینال دارند. اووسیست‌های توکسوپلازما گوندی اتوفلوروسنت هستند (۱۷، ۱۸) و شارژ منفی دارند (۱۹، ۲۰).

۲-۳-۳ چرخه ناشی از اووسیست در گربه

همانگونه که قبلاً اشاره شد دفع اووسیست به وسیله گربه‌ها بدون توجه به میزان خورده شده حداقل ۱۸ روز پس از بلع اووسیست اسپوروله شروع می‌شود (۲۱، ۲۲، ۲۳) و همه گربه‌های آلوده شده اووسیست دفع نمی‌کنند. بر اساس یک نظریه اسپوروزوآیت‌ها ابتدا به تاکی‌زوآیت تبدیل می‌شوند و تاکی‌زوآیت‌ها به

برادی زوآیت تبدیل می‌گردند و وقتی کیست‌های بافتی پاره می‌شوند تعدادی از برادی زوآیت‌ها به اپیتلیوم روده برمی‌گردند تا سیکل داخل روده‌ای را آغاز کنند. این اتفاق غیر قابل پیش‌بینی است.

۳-۳-۳ چرخه ناشی از تاکی زوآیت در گربه

مدت زمان تا آغاز دفع اووسیست در این چرخه نیز همانند چرخه ناشی از اووسیست حداقل ۱۸ روز است. هرچند در برخی گربه‌هایی که تاکی زوآیت بلع کرده‌اند دوره پیش‌آشکاری انگل ۱۷-۱۱ روز گزارش شده است (۲۴). که احتمالاً به دلیل بلع توکسوپلازما گوندی بوده که در دوره انتقال بین تاکی زوآیت و برادی زوآیت قرار داشته است. دوره انتقالی تبدیل برادی زوآیت به تاکی زوآیت و تاکی زوآیت به برادی زوآیت به صورت مورفولوژیکی و بیولوژیکی توصیف نشده است. هرچند تاکی زوآیت‌ها به اندازه برادی زوآیت‌ها مقاوم به اسید معده نیستند، این احتمال وجود دارد که شاید تعدادی از تاکی زوآیت‌ها بعد از ورود به دهان گربه موکوس حلقی - دهانی را سوراخ کنند (۲۴، ۲۵). ۱۷ گربه از ۳۱ گربه‌ای که به وسیله لوله معدی به آنها تاکی زوآیت خورنده شده بود هم آلوده شدند که این نشانگر این است که تاکی زوآیت‌ها در برابر هضم اسیدی - پپسینی معده زنده مانده‌اند (۲۴، ۲۶). احتمالاً برادی زوآیت در بیشتر حیوانات آلوده حتی در طی عفونت حاد هم حضور دارد چون برادی زوآیت‌ها در موش‌هایی که فقط ۳ روز از آلودگی آنها می‌گذشت یافت شده‌اند (۲۷). این نتایج نشان می‌دهد که انسان می‌تواند در صورت بلع تصادفی تاکی زوآیت توکسوپلازما گوندی در آزمایشگاه آلوده شود.

۳-۴ چرخه زندگی در میزبانان واسط

پس از بلع اووسیست‌های اسپوروله، اسپوروزوآیت‌ها خارج می‌شوند و به انتروسیت‌ها و سلول‌های جامی اپیتلیوم روده نفوذ می‌کنند و به وسیله مکانیسم ناشناخته‌ای به لامینا پروپریا منتقل می‌شوند. اسپوروزوآیت‌ها ۲ ساعت بعد از انکوباسیون پس از بلع در واکوئل‌های پارازیتوفوروس انتروسیت‌های و سلول‌های جامی دیده شده‌اند. برخی اسپوروزوآیت‌ها می‌توانند ۴ ساعت بعد از انکوباسیون پس از بلع در

گردش خون محیطی دیده شوند. اما بیشتر آنها در لایمینا پروپریا می‌مانند؛ جایی که آنها در سلول‌های متنوعی شامل آندوتلیوم عروق، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های تک‌هسته‌ای و لکوسیت‌های تقسیم شده تکثیر می‌کنند؛ اما در اریتروسیت‌ها تکثیر نمی‌کنند. این احتمال وجود دارد که اسپوروزوآیت‌ها قبل از رسیدن به لایمینا پروپریا واکوئل پارازیتوفوروس را پاره کنند.

۱۲ ساعت پس از انکوباسیون اسپوروزوآیت به دو تاکی‌زوآیت تقسیم شده است. تا ۶ ساعت بعد از انکوباسیون تاکی‌زوآیت‌ها و کیست‌های بافتی تشکیل شده‌اند. کیست‌های بافتی در بیشتر ارگان‌ها تا طی دوره عفونت مزمن می‌مانند.

چرخه ناشی از برادی‌زوآیت در میزبان واسط مشابه چرخه ناشی از اووسیست است، اما برادی‌زوآیت‌ها کمتر عفونی هستند. پس از بلع، برادی‌زوآیت‌ها در انتروسیت‌ها دیده می‌شوند و ۱ ساعت پس از انکوباسیون در لایمینا پروپریا مشاهده می‌گردند. تا ۲ روز پس از انکوباسیون تاکی‌زوآیت و کیست‌های بافتی تا ۶ روز پس از انکوباسیون ایجاد شده‌اند. کیست‌های بافتی در چند ارگان باقی می‌مانند.

۴- پاتوژنز در گوسفند

توکسوپلازما گوندی باعث مرگ رویانی زودرس و جذب، مرگ جنینی و مومیایی شدن، سقط، مرده‌زایی و مرگ نوزادان می‌شود که رخ دادن هر یک از اینها به میزان زیادی بستگی به مرحله‌ای از آبستنی دارد که میش در آن آلوده شده است. بعد از بلع اووسیست، توکسوپلازما گوندی در لایه زیرمخاط روده و عقده‌های لنفاوی مربوطه تکثیر می‌یابند و به سرعت از طریق خون به ارگان‌های دیگر گسترش می‌یابد. میش ممکن است اسهال، دیسترس تنفسی و ترشحات بینی داشته باشد؛ اما معمولاً تا ۱۴ روز پس از انکوباسیون بهبود می‌یابد. هرچند اطلاعات محکمی در دسترس نیست، ولی احتمال این کم است که میش آلوده شده در زمان جفت‌گیری یا مدتی پس از جفت‌گیری سقط کند. در میش‌های آبستن تاکی‌زوآیت‌ها در طی دو هفته اول پس از بلع اووسیست در خون گردش می‌کنند و آلودگی جنین در پایان دوره پارازیتی