



شناسایی گونه‌های سارکوسیست در محصولات گوشتی به روش‌های مختلف PCR

فاطمه زارع بیدی^۱

چکیده

سارکوسیستیس از تک‌یاخته‌های کوکسیدیایی بوده و مولد کیست‌های درون سلولی است. چهار گونه سارکوسیستیس در گوسفند شناسایی شده است. سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آرتی کانیس مولد کیست‌های میکروسکوپی بوده توسط سگ‌سانان منتشر می‌شوند و بیماری‌زا هستند. سارکوسیستیس ژیگانتیه آ و سارکوسیستیس مدوزیفورمیس مولد کیست‌های میکروسکوپی بوده به وسیله گربه‌سانان منتشر می‌شوند و غیر بیماری‌زا هستند. برای تشخیص گونه‌های سارکوسیستیس روش‌های مختلفی وجود دارد. روش‌های سنتی معمولاً تنها جهت تشخیص جنس انگل کاربرد دارد و با استفاده از این روش‌ها نمی‌توان گونه را تشخیص داد. نتایج نشان داد که ۱۰۰٪ نمونه‌های گوشت آزمایش شده (۴۰/۴۰) آلوده به سارکوسیستیس آرتی کانیس بودند. همچنین ۱۰۰٪ نمونه‌های ماکروسکوپی (۲۰/۲۰) به سارکوسیستیس ژیگانتیه آ آلوده بودند. روش‌های PCR-RFLP و SSCP جدید توصیف شد در این مطالعه روشی حساس و مناسب جهت شناسایی گونه‌های مختلف سارکوسیستیس در گوسفند می‌باشد. به نظر می‌رسد این روش اختصاصی گونه می‌تواند به منظور انجام مطالعات اپیدمیولوژیک در سایر مناطق کشور مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سارکوسیست، محصولات گوشتی، روش‌های مختلف PCR

۱- دانشجوی دکترای، گروه مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران parisa.zaare@gmail.com

پروتئین حیوانی به علت داشتن اسیدهای آمینه ضروری و عوامل محرک رشد، اثر مهمی در ترمیم بافت‌ها و به‌طور کلی رشد بدن دارد به‌طوری‌که اکنون ثابت شده است بدون استفاده از پروتئین حیوانی اگر چه زندگی امکان‌پذیر است ولی کامل نیست (Arshad et al, 2012). امروزه توسعه‌ی بخش دامپروری به‌منظور تأمین نیاز بشر به مواد پروتئینی و سایر تولیدات دامی ضروری است با این حال بیماری‌های دامی به‌ویژه بیماری‌های انگلی یکی از مهم‌ترین مسائلی است که همواره گریبان‌گیر دامپروران بوده است. خسارات حاصل شامل هزینه‌های بررسی جهت پیشگیری، جمع‌آوری و انهدام موارد مشکوک و ضیطی، دارو و درمان و همچنین خسارات ناشی از کاهش تولید و اتلاف منابع است. کشور ایران با داشتن ۳/۵۷ میلیون رأس گوسفند و بز یکی از قطب‌های مهم پرورش نشخوارکنندگان کوچک در جهان به‌شمار می‌رود (شکر فروش و همکاران، ۱۳۹۲). استان لرستان از استان‌های غربی کشور با ۲۸۲۹۴ کیلومتر مربع مساحت، به لحاظ اقلیمی و هواشناسی استانی چهار فصل است. لرستان سرزمینی کوهستانی است و غیر از چند دشت محدود، سراسر آن از رشته کوه‌های زاگرس پوشانده شده است. مراتع فراوان و بارندگی‌های مناسب امکان پرورش دام و کشاورزی را در این منطقه فراهم نموده است. بر اساس آمار ارائه شده از سوی مدیریت امور دام سازمان جهاد کشاورزی لرستان، تعداد یک میلیون و نهصد و پنجاه و چهار هزار و ششصد و بیست واحد دامی سنگین و چهار میلیون و چهارصد و یازده هزار و هشتصد و سی و پنج واحد دامی سبک، در استان وجود دارد (شکر فروش و همکاران، ۱۳۹۲).

از جمله بیماری‌های مهم انگلی در گوسفند سارکوسیتوزیس می‌باشد که انتشار جهانی دارد و بوسیله گونه‌های مختلف تک‌یاخته‌ی سارکوسیتیس ایجاد می‌شود. سارکوسیتیس دارای چرخه‌ی زندگی اجباری دومی‌زبان است. گوشت خواران میزبان‌های نهایی گونه‌های سارکوسیتیس می‌باشند و گونه‌های مختلف پستانداران، خزندگان و پرندگان به عنوان میزبان واسط این انگل می‌باشند (Bahari et al., 2014). این تک‌یاخته یکی از انگل‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد و آلودگی به آن از سراسر دنیا گزارش شده است (Beyazit, et al., 2007). آلودگی به سارکوسیتیس سالیانه خسارات قابل توجهی به اقتصاد کشور وارد می‌کند.

در گذشته سارکوسیتیس را غیر بیماری‌زا می‌دانستند، اما دانش امروز نشان داده است برخی گونه‌های سارکوسیتیس ایجاد بیماری می‌کنند. در گاو بدن‌بال آلودگی مزمن، لاغری مفرط، ادم و آماس زیر فکی و بیرون زدگی چشم مشاهده می‌شود. آلودگی شدید گاو با علائمی چون تب، کاهش اشتها، ضعف عمومی، کاهش تولید شیر، اسپاسم عضلانی، اسهال، تحریک بیش از حد (حساسیت)، ضعف، کم‌خونی و گاهی مرگ همراه است. سقط جنین نیز بر اثر آلودگی به برخی گونه‌های سارکوسیتیس مشاهده می‌شود. سایر میزبان‌های آلوده نیز علائمی مشابه نشان می‌دهند. سارکوسیتوزیس در گوسفند ممکن است با آنسفالومیلیت (آماس مغز و طناب نخاعی)، ضعف، عدم تعادل، حساسیت بیش از حد، سقط و فلجی همراه باشد. این موارد نشان دهنده اهمیت این انگل و تاثیر به‌سزای آن در ایجاد خسارات اقتصادی است (Dafedar et al., 2008). بعلاوه در کشتارگاه و به هنگام بازرسی لاشه، در آلودگی شدید حذف موضعی یا کلی لاشه از جمله خسارات مهم اقتصادی انگل محسوب می‌شود.

در انسان اکثر افراد آلوده به سارکوسیتیس نشانه‌های بالینی ندارند. در بعضی از افراد مبتلا، نشانه‌های موضعی نظیر حساسیت در عضله، تب، برونکواسپاسم، راش‌های خارشدار گذرا، لنفادنوپاتی، ندول‌های زیر جلدی و ائوزینوفیلی مشاهده شده است (Dubey et al., 2003).

دامنه میزبانی گونه‌های سارکوسیتیس معمولاً محدود است. برای هر گونه چرخه‌ی زندگی غیرمستقیم و به شکل اجباری و رابطه شکار و شکارچی مطرح است. گونه‌های سارکوسیتیس در روده میزبان نهایی یا شکارچی اوویست‌های اسپوردار تولید می‌کنند. دیواره‌ی اوویست شکننده است و معمولاً در داخل روده میزبان نهایی پاره شده و اسپوروسیست‌ها با مدفوع از بدن خارج می‌شوند. آب یا غذا با مدفوع میزبان نهایی آلوده می‌شوند و بدین ترتیب اسپوروسیست‌های عفونت‌زا میزبان واسط (شکار) را آلوده می‌کنند و پس از گذراندن ادامه سیر تکاملی در بدن میزبان واسط بر اساس گونه انگل تبدیل به ماکروکیست و یا میکروکیست می‌شوند (Bahari et al., 2014).

در ایران گوسفند به عنوان یکی از منابع پروتئینی مهم در تغذیه انسان محسوب می‌شود. با توجه به سقط جنین ناشی از برخی گونه‌های سارکوسیتیس و حذف موضعی یا کلی لاشه‌های مبتلا، این انگل از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. شیوع سارکوسیتیس وابسته به وجود میزبان‌های نهایی است. با توجه به فراوانی میزبان‌های نهایی (سگ و گربه) آلودگی از سراسر ایران به میزان قابل توجهی گزارش شده است. بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که سالیانه ۱۲ درصد از جنین‌های گوسفندان در اثر سارکوسیتیس سقط می‌شود که این مورد می‌تواند حدود ۱۲ میلیارد تومان به دامداران ضرر وارد کند (شکر فروش و همکاران، ۱۳۹۲).

تشخیص سارکوسیتوزیس از طریق آزمایش‌های انگلی، سرولوژیک و مولکولی امکان‌پذیر است. با این حال تشخیص گونه‌انگل صرفاً از طریق تهیه مقاطع پاتولوژی و با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک کیست و یا با استفاده از روش‌های مولکولی

نظیر PCR امکان‌پذیر است. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) روشی است بر پایه شناسایی DNA انگل و از حساسیت بالایی برخوردار است. یك PCR-RFLP روش مناسب جهت تشخیص گونه‌های سارکوسیستیس در عضلات گاو و گوسفند است (Durate et al., 2004). بنابراین در تحقیق حاضر تلاش می‌شود تا به صورت مروری شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس در محصولات گوشتی به روش‌های مختلف PCR بررسی شود.

۲- سارکوسیستیس

۲-۱- تاریخچه

در سال ۱۸۴۳ میلادی اولین بار شخصی بنام میشر، سارکوسیستیس را در موش شناسایی کرد و به همین خاطر آنها را کیسه، توبول و یا اجسام میشر نامیدند. تا سال ۱۹۷۲ میلادی منشأ آلودگی و اهمیت سارکوسیستیس ناشناخته باقی ماند. در این سال، هیدرن و رومل و در سال ۱۹۷۴ نیز، فایر و جانسون و در سال ۱۹۷۶ رزی و فرنکل کیست‌های انگلی در عضلات میزبان‌های واسط و همچنین مراحل آنها را در داخل بدن میزبان نهایی شرح دادند و اعلام کردند که چرخه زندگی انگل شبیه به چرخه زندگی توکسوپلاسما می‌باشد. در گذشته تصور بر این بود که سارکوسیستوزیس از اهمیت چندانی برخوردار نیست ولی امروزه به این نتیجه رسیده‌اند که انگل می‌تواند منجر به انسفالیت، بیماری عمومی و حتی سقط شود لذا امروزه سارکوسیستیس از نظر بازرسی گوشت جزو تک‌یاخته‌های آسیب‌رسان (پاتوژن) محسوب می‌گردد (Elsheikha et al., 2006).

سارکوسیستیس لیندمانی اولین بار در سال ۱۸۶۸ میلادی توسط لیندمان در انسان گزارش گردید. در موارد زیادی در گزارش‌های پزشکی از این ارگانیزم به عنوان ایزوسپورا هومینیس (بر اساس شکل اووسیست یا اسپوروسیست آن) نام برده شده است (Frank et al., 2005).

۲-۲- طبقه بندی

گونه‌های سارکوسیستیس متعلق به شاخه اپی کمپلکسا می‌باشند. گوشتخواران میزبان‌های نهایی و گونه‌های مختلف پستانداران، خزندگان و پرندگان به عنوان میزبان واسط تحت تاثیر قرار می‌گیرند. بر اساس طبقه بندی ارائه شده از سوی کمیته تاکسونومی انجمن تک‌یاخته‌شناسان، سارکوسیستیس بدین ترتیب طبقه بندی می‌گردد (Frank et al., 2005):

Kingdom	Protista
Sub- kingdom	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Class	Sporozoa
Order	Eucoccidia
Family	Sarcocystidae
Genus	Sarcocystis

قبلا گونه‌های سارکوسیستیس را بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی کیست (اندازه کیست و ضخامت دیواره آن) و همچنین میزبان واسط اختصاصی آن طبقه بندی می‌کردند. در سال ۱۹۷۲ طبقه بندی جدیدی بر اساس اختصاصی بودن میزبان نهایی انگل ارائه گردید ولی بعدها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ثابت شد که موضوع اختصاصی بودن میزبان در برخی از گونه‌ها فاقد جامعیت کامل است (Elsheikha et al., 2006). تعداد گونه‌های سارکوسیستیس که تاکنون تشخیص داده شده است بالغ بر ۲۲۰ گونه است (Hamidinejat et al., 2013).

جدول ۲-۱- گونه‌های سارکوسیستیس در برخی از دام‌های اهلی (Hamidinejat et al., 2013).

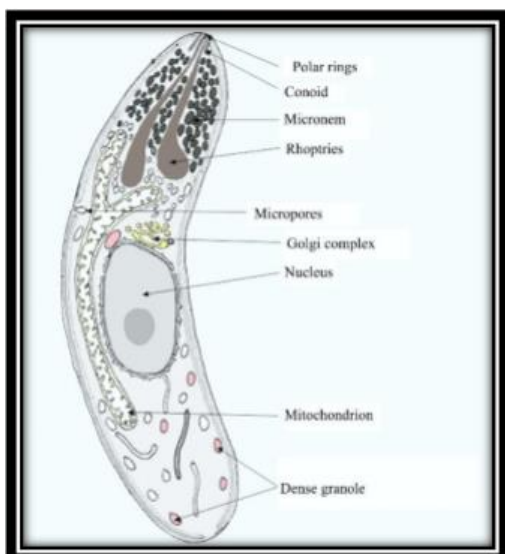
ردیف	جنس و گونه	نام مترادف	میزبان واسط	میزبان نهایی
۱	<i>S. cruzi</i>	<i>S. bovicanis</i>	گاو	سگ، گربه، روباه
۲	<i>S. hirsuta</i>	<i>S. bovifelis</i>	گاو	گربه
۳	<i>S. hominis</i>	<i>S. bovi hominis</i>	گاو	انسان
۴	<i>S. tenella</i>	<i>S. ovicanis</i>	گوسفند	سگ، کاپوت، روباه
۵	<i>S. arieticanis</i>	---	گوسفند	سگ
۶	<i>S. gigantea</i>	<i>S. ovifelis</i>	گوسفند	گربه
۷	<i>S. medusiformis</i>	---	گوسفند	سگ
۸	<i>S. capracanis</i>	---	بز	کاپوت، روباه
۹	<i>S. hircicanis</i>	---	بز	سگ
۱۰	<i>S. moule</i>	---	بز	گربه
۱۱	<i>S. neuron</i>	<i>S. faveri</i>	اسب	اوپوسوم
۱۲	<i>S. bertrami</i>	<i>S. equicanis</i>	اسب	سگ

۳-۲- ریخت شناسی

۳-۳-۱- برادی زوئیت و تروفوزوئیت

انگل توسط یک غشاء نازک پوشیده شده است و در شکل کامل خود هلالی شکل یا موزی شکل است، ظاهری شفاف دارد و از ارگانل‌های درونی شامل: ناحیه قطبی، کونوئید، میکرونم، راپتری‌ها، میکروپورها، دستگاه گلژی، هسته، میتوکندری و ... تشکیل شده است (Hamidinejat et al., 2010).

اندازه هر برادی‌زوئیت ۱۵-۱۰ × ۷-۴ میکرون است. یک قطب آن بزرگ تر و یک قطب آن نازک تر است. هسته در خلف قرار دارد و در اطراف هسته پس از رنگ آمیزی با گیمسا دانه‌های گلیکوژنی دیده می‌شود. در انتهای فوقانی برادی‌زوئیت ناحیه‌ای است که خیلی کم رنگ می‌گیرد و به آن سارکونم گفته می‌شود (Hosseini et al., 2012).



شکل ۱- برادی‌زوئیت سارکوسیستیس

۳-۳-۲- کیست عضلانی

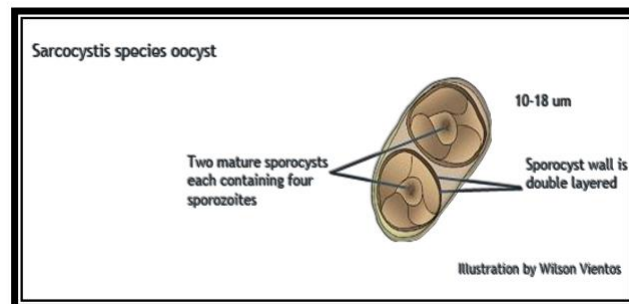
کیست‌های سارکوسیستیس بسته به گونه ممکن است کوچک و میکروسکوپی باشند و گاهی نیز بزرگ می‌شوند و به یک تا چند سانتی‌متر نیز می‌رسند. اطراف این کیست‌ها را غشایی از بافت همبندی فرا می‌گیرد که به وسیله میزبان ساخته می‌شود. کیست از سلول‌هایی به نام سیستوزوئیت یا برادی‌زوئیت انباشته شده است. هر چه به مرکز کیست نزدیکتر می‌شویم این برادی‌زوئیت‌ها پیرتر و دژنره تر می‌شوند (Mirzaei Dehaghi et al., 2011).



شکل ۲- مقطع بافتی از عضله آلوده به کیست سارکوسیستیس (Hosseini et al., 2012).

۲-۳-۳- اورسیست

در روده میزبان نهایی (سگ و گربه) اووسیست حاوی دو اسپوروسیست به وجود می‌آید. هر اسپوروسیست واجد چهار اسپوروزوئیت می‌باشد (Hamidinejat et al., 2014). اووسیست‌های سارکوسیستیس اغلب کاملاً تکامل یافته اند و در مدفوع معمولاً اسپوروسیست انگل مشاهده می‌شود. در گسترش مدفوع اسپوروسیست‌ها ممکن است به صورت منفرد یا به صورت جفت‌هایی که به وسیله ماده چسبناک به یکدیگر پیوسته اند مشاهده شوند و معمولاً اثری از دیواره اووسیستی ملاحظه نمی‌گردد (Motamedi et al., 2010).



شکل ۳- اووسیست سارکوسیستیس (Motamedi et al., 2010).

۳- شناسایی گونه بر مبنای واکنش زنجیره ای پلیمرز

امروزه جهت شناسایی گونه‌های انگل از روش‌های نوین ملکولی نظیر RFLP، Real time PCR و غیره استفاده می‌شود. از جمله مزایای روش‌های ملکولی می‌توان 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 (Oryan et al., 2011). هدف از این مطالعه استفاده از روش PCR استاندارد برای تشخیص گونه‌های سارکوسیست در منطقه شهرکرد و به دنبال آن روش RFLP جهت تعیین گونه‌های سارکوسیستیس در نمونه‌های آلوده بود.

۳-۱- واکنش زنجیره پلیمرز

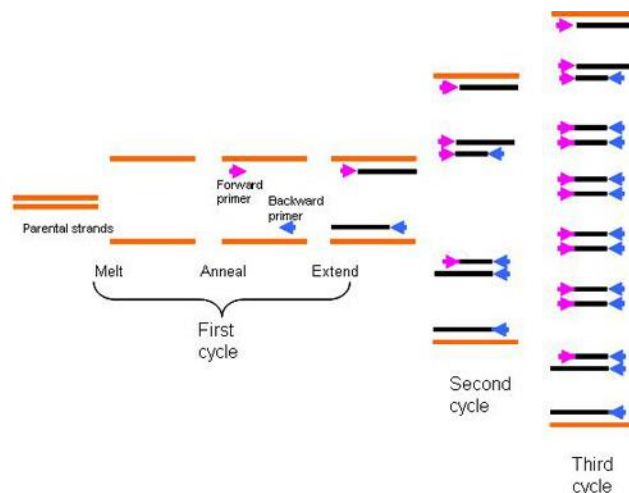
PCR، تکنیکی است برای تکثیر قطعات اختصاصی DNA و شامل سیکل‌های متعدد ۳ مرحله ای می‌باشد: باز شدن دو رشته الگو از یکدیگر، اتصال پرایمرها و تکثیر قطعات. با حرارت دادن بیش از ۹۰ درجه سانتی‌گراد دو رشته مکمل DNA از یکدیگر جدا می‌شوند و با سرد شدن مجدد ۲ قطعه پرایمر طراحی شده به‌طور اختصاصی، هریک به یکی از رشته‌های DNA هدف متصل می‌گردند. سپس دما تا حدود ۷۲ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته تا آنزیم DNA پلیمرز با توسعه پرایمرها، تکثیر قطعات اختصاصی را انجام دهد (شکل ۴). اصول اولیه روش PCR توسط Khurana و همکاران در سال‌های ۱۹۷۴-۱۹۷۱ شرح داده شد و حدود ۱۰ سال بعد توسط Kary Mullis و همکارانش عملاً به کار گرفته شد. امروزه این روش تقریباً در تمامی آزمایشگاه‌های ملکولی به‌طور متداول مورد استفاده می‌باشد (Prakas et al., 2002).

PCR، از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانند سازی DNA دارد و در واقع بر گرفته از آن است. برای انجام PCR، آنزیم DNA پلیمرز، نوکلئوتیدهای تری فسفات، یون منیزیم، DNA الگو و پرایمر لازم است. از آنجایی که DNA معمولاً دو رشته ای است، جهت تکثیر بخشی از آن یک جفت پرایمر مورد نیاز است که به‌طور اختصاصی بر اساس توالی‌های دو طرف DNA هدف طراحی و ساخته می‌شوند. پرایمرها محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص نموده و اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می‌کنند. هر ناحیه از ملکول DNA می‌تواند انتخاب شود به شرطی که توالی‌های دو طرف آن معلوم باشد. دو قطعه اولیگو نوکلئوتیدی کوتاه، هر یک باید با یک رشته از ماریچ دوتایی DNA، هیبرید شوند. این اولیگونوکلئوتیدها که به عنوان پرایمر در واکنش‌های سنتز DNA عمل می‌کنند، منطقه ای را که باید تکثیر بشود، محدود می‌کنند (شکل ۴) (Rosenthal et al., 2008).

۲-۴-۵- کاربردهای PCR

PCR، کاربردهای زیادی در عرصه‌های مختلف بیولوژی، بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک، جرم‌شناسی و... دارد. علت اصلی این امر این است که DNA الگوی به کار رفته در PCR را می‌توان از منابع مختلف، تأمین و تکثیر نمود. به‌طور کلی

PCR به دو منظور اصلی به کار می‌رود: الف) تهیه نسخه‌های متعدد از یک ژن و ب) بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در مجموعه ژنی



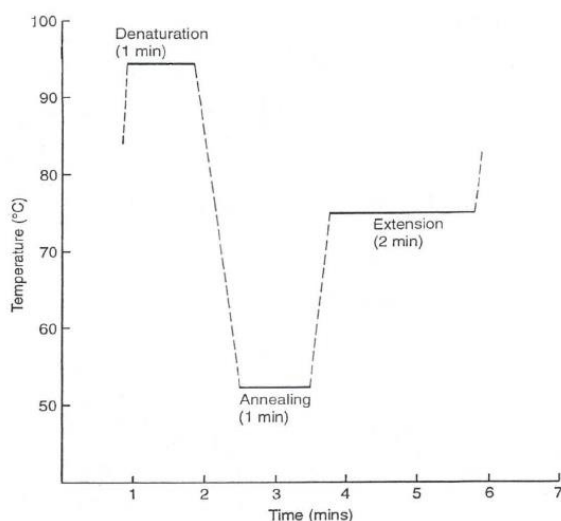
شکل ۴- نحوه تکثیر DNA به روش PCR

۲-۴-۵-۳- پروفایل حرارتی سیکل‌های PCR

به‌طور کلی در طی هر چرخه PCR، مخلوط واکنش در سه دمای مختلف قرار می‌گیرند (شکل ۵): الف) درجه حرارت جدا کردن دو رشته (Denaturation temperature) که معمولاً حدود ۹۵-۹۳ درجه سانتی‌گراد است. در این دما، اتصالات بین جفت بازها شکسته می‌شود و DNA تک رشته‌ای ایجاد می‌شود. در مواردی که رشته‌های DNA هدف از نظر بازهای G+C غنی باشد، باید درجه حرارت‌های بالاتر استفاده شود. اگر تک رشته‌ای شدن به‌طور کامل صورت نگیرد، رشته‌های DNA سریعاً دو رشته‌ای می‌شوند. البته باید توجه داشت که طول این مرحله نمی‌تواند زیاد طولانی باشد زیرا منجر به کاهش فعالیت آنزیم Taq پلی‌مرز به میزان زیادی خواهد شد.

ب) درجه حرارت هیبرید شدن یا اتصال (Annealing temperature) که در طی آن پرایمرها، به الگو اتصال می‌یابند که این دما وابسته به T_m پرایمرهای طراحی شده در واکنش می‌باشد. در این مرحله پرایمرهای اضافه شده، با DNA الگوی تک رشته‌ای، جفت یا هیبرید می‌شوند تا محل شروعی برای فعالیت آنزیم Taq پلی‌مرز در انتهای ۳' پرایمر ایجاد نمایند.

ج) درجه حرارت پیشروی (extension temperature) که در طی آن سنتز DNA رخ می‌دهد. این مرحله، معمولاً ۷۲ درجه سانتی‌گراد، معادل حرارت مناسب برای فعالیت آنزیم Taq پلی‌مرز است.



شکل ۵- پروفایل حرارتی تیپیک PCR (۱۷).

سرعت الحاق نوکلئوتیدها برای ساخت زنجیره مکمل با کمک آنزیم Taq پلی‌مرز بین ۱۰۰-۳۵ نوکلئوتید در هر ثانیه می‌باشد که تغییر آن بستگی به نوع بافر pH غلظت نمک و DNA الگو دارد و در مدت زمان یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد محصولاتی با طول بیش از ۲۰۰۰ جفت باز ایجاد می‌شوند.

در بسیاری از پروتکل‌ها، علاوه بر ۳ دمای فوق، قبل از شروع سیکل اصلی، یک مرحله دناتوراسیون اولیه استفاده می‌شود که این مرحله، به جداسازی بهتر DNA هدف کمک می‌کند. همچنین بعد از اتمام آخرین مرحله پیشروی، مرحله پیشروی انتهایی طراحی می‌شود که به اتمام طویل‌سازی محصولات PCR، که در طی آخرین سیکل آغاز به سنتز شده‌اند، کمک می‌کند (شکل ۵) (Rosenthal et al., 2008).

۴- انواع تکنیک PCR برای شناسایی سارکوسیست

۴-۱- برش آنزیمی (PCR-RFLP)

محصول PCR اول (970^{bp}) نمونه‌های ماکروکیست و همچنین نمونه‌های میکروکیستی که در واکنش دوم باند نداده بودند، تحت تاثیر آنزیم آندونوکلئاز محدود کننده SspI قرار داده شدند. این آنزیم قادر است توالی (AAT/ATT) را شناسایی کرده و آن را برش دهد، لذا تنها نمونه‌های سارکوسیستیس *تریگانه* آ در موقعیت نوکلئوتیدی ۷۸۷-۷۸۲ ژن 18S rRNA توسط این آنزیم برش خورده به دو قطعه (546^{bp} و 439^{bp}) تقسیم می‌شوند و سایر گونه‌ها برش نمی‌خورند (Stojacki et al., 2012).

۴-۱-۱- مواد مورد نیاز جهت برش آنزیمی

۱. بافر G؛ ۱ میکرولیتر.
 ۲. آنزیم آندونوکلئاز محدود کننده SspI؛ ۱ میکرولیتر.
 ۳. محصول PCR اول؛ ۵ میکرولیتر.
 ۴. آب مقطر؛ ۹ میکرولیتر.
- نمونه‌ها پس از اضافه کردن بافر و آنزیم مورد نظر به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (Tenter et al., 1994).

۴-۱-۲- برش محصول برش آنزیمی

برای بررسی محصول برش آنزیمی از ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE $0.5 \times$ استفاده شد و به منظور رنگ آمیزی و مشاهده باندها از DNA safe staine (شرکت سیناژن) استفاده شد. به کمک اشعه ماورای بنفش، ژل از نظر وجود یا عدم وجود قطعه یا قطعات مورد نظر بررسی گردید. در نهایت نمونه‌های ماکروسکوپی که برش خورده و به دو قطعه تقسیم شده اند به عنوان سارکوسیستیس *تریگانه* شناخته می‌شوند. همچنین نمونه‌های میکروسکوپی که در واکنش Semi-nested PCR باند نداده اند و در این واکنش نیز برش نخورده‌اند به عنوان سارکوسیستیس *تتلا* معرفی می‌گردند (Yang et al., 2002).

۴-۲- تکنیک SSCP

وسایل و مواد مورد نیاز برای انجام تکنیک SSCP

- بیس اکریل آمید ۳۰٪: ۱۴/۵ گرم اکریل آمید را با
 - ۰/۵ گرم بیس اکریل آمید در لوله فالكون به حجم
 - ۵۰ میلی لیتر می‌رسانیم.
 - آب مقطر
 - آمونیوم پرسولفات ۰/۱٪
 - محلول بافر TBE10x
 - TEMED
 - Glycerol
 - نیترات نقره
 - اسید استیک گلاسیال
- NAOH
- الکل مطلق
- فرم آلدئید ۱۷٪
- سدیم هیدروژن کربنات
- تانک
- شیشه های ساخت ژل
- شانه های مخصوص برای ایجاد چاهک هایی در ژل
- گیره برای نگهداری شیشه های ژل
- اسپیسر

نکته: برای الکتروفورز معمولاً از بافرهای ۱X استفاده می‌شود. از رقیق کردن بافرهای ۱۰X تهیه می‌شود.
نکته: این بافر ها را در تانکهای الکتروفورز ریخته و بسته به شرایط کار هر چند مدت عوض می‌شود.

نحوه انجام تکنیک SSCP: ژل پلی اکریل آمید تهیه گردید، ولی قبل از لود کردن نمونه ها ۶ میکرولیتر از محصول PCR را با ۴ میکرولیتر محلول سمپل بافر که قبلاً آماده کرده ایم درون میکروتیوب مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه قرار می‌دهیم و بلافاصله نمونه ها را بر روی یخ منتقل می‌کنیم و سپس شروع به لود کردن نمونه ها می‌کنیم (Yang et al., 2001).

طرز تهیه Sample buffer: ۵۰ میکرولیتر ۶X day و ۹۴۰ میکرولیتر فرم آمید با ۱۰ میکرولیتر NAOH به حجم ۱ میلی لیتر می‌رسانیم.

رنگ آمیزی با نیترات نقره: نمایان سازی باندها با روشی موسوم به روش سریع رنگ آمیزی نیترات نقره انجام شد. روش رنگ آمیزی نیترات نقره در مقایسه با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید بسیار حساس تر است. مراحل روش استفاده شده به شرح زیر است:

- ستون شیشه ای الکتروفورز را درون محلول تثبیت کننده (اتانول ۹۶٪ و اسید استیک ۵٪) قرار داده و به آرامی شیشه ها را از ژل جدا می کنیم. در این حالت به مدت ۱۰ دقیقه ژل را داخل محلول تکان داده می شود و سپس محلول را دور ریخته و دوباره برای ۵ دقیقه در محلول تثبیت کننده قرار داده و تکان می دهیم. برای تهیه این محلول ۶ سی سی اسید استیک را در ۵۰ سی سی الکل و ۴۵۰ سی سی آب مقطر مخلوط می کنیم. ۲۵۰ سی سی از محلول را در ۱۰ دقیقه اول روی ژل می ریزیم و ۲۵۰ سی سی باقیمانده را در ۵ دقیقه دوم روی ژل می ریزیم.
- سپس ژل در محلول رنگ آمیزی (نیترات نقره ۰/۱٪) قرار داده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در داخل این محلول تکان داده می شود. این مرحله باید در تاریکی انجام شود.
- در این مرحله ژل به مدت ۲۰ ثانیه در آب مقطر شستشو داده می شود.
- ژل در محلول ظهور (NaOH ۱۵ گرم) و ۱ سی سی فرمالین ۴۰٪، ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر) قرار داده شده و تا ظاهر شدن باندها تقریباً به مدت ۲۰ دقیقه تکان داده می شود.
- ژل در محلول متوقف کننده (۳٪ اسید استیک) قرار داده شده و به مدت ۱۵ دقیقه داخل این محلول که به عنوان خاتمه دهنده قرار می گیرد.
- ژل پس از خشک شدن نسبی با لایه نایلونی نازک پوشانده می شود. در این حالت می توان ژل در دمای اتاق تا چند هفته نگهداری کرد.
- مشاهده باندهای ژنی و عکس برداری از آنها (Yang et al., 2001).

۵- نتایج تحقیقات

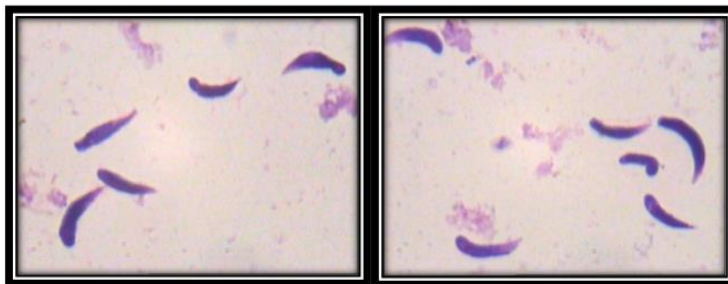
۵-۱- نتایج برش آنزیمی RFLP

۵-۱-۱- آزمایش هضمی عضلات



شکل ۶- هضم کردن نمونه های عضلانی به روش اسید- پپسین

بدین منظور از روش هضمی اسید- پپسین استفاده شد و مایع صاف شده سانتریفوژ گردید. از رسوب حاصل تعدادی گسترش نازک تهیه شد و لام های حاصل پس از خشک شدن با متانول تثبیت گشته به مدت ۲۰ دقیقه با گیمسا رنگ آمیزی شدند. در نهایت نمونه ها به کمک میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ از نظر وجود برادیزوئیت های سارکوسیستیس بررسی شدند (Hamidinejat et al., 2014).



شکل ۷- گسترش های رنگ آمیزی شده با گیمسا (برادیزوئیت های موزی شکل سارکوسیستیس)

۵-۱-۲- استخراج DNA

در این مرحله مقداری از نمونه های عضلانی که آزمایش هضمی آنها مثبت شده بود با استفاده از هاون چینی و نیتروژن مایع به صورت پودر درآمده و تا زمان استخراج DNA در منفی ۲۰ درجه نگهداری گردید (Hamidinejat et al., 2014).

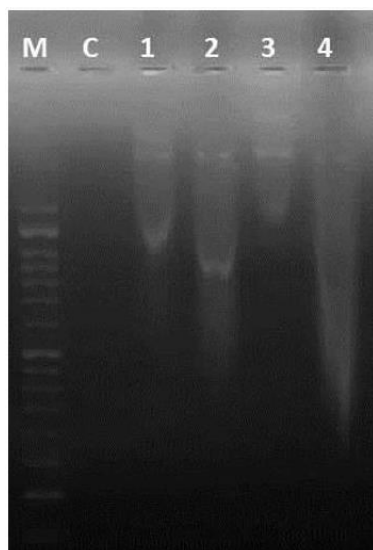


شکل ۸- پودر کردن نمونه عضلانی آلوده به میکروکیست با استفاده از نیتروژن مایع

جهت استخراج DNA از کیت تجاری شرکت MBST ایران استفاده شد. بدین منظور به تیوپ های حاوی نمونه، بافر تجزیه کننده و پروتئیناز K اضافه گردید. سپس محتویات تیوپ ورتکس گشته و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت یک شب نگهداری گردید تا بافت به طور کامل هضم گردد. پس از انجام سایر مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، محلول جمع آوری شده در تیوپ ۱/۵ میلی لیتری که حاوی بیش از ۸۵ درصد از DNA انگل است جهت انجام آزمایشات مولکولی در منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (Hamidinejat et al., 2014).

۵-۱-۳- تکثیر ژن 18S rRNA سارکوسیستیس

در سال های اخیر مطالعات مولکولی به منظور شناسایی گونه های سارکوسیستیس در حیوانات مختلف بر مبنای مطالعه بخشی از ژن RNA ریوزومی بوده است. در این مطالعه نیز به منظور تشخیص گونه های ایجاد کننده ماکروکیست و میکروکیست در گوسفند، در مرحله اول قطعه ای از ژن 18S rRNA به طول حدوداً ۹۷۰bp تکثیر گردید. این قطعه اختصاصی سارکوسیستیس بوده و در بین هر سه گونه مشترک است. این واکنش به طور مجزا روی DNA استخراج شده از تمامی نمونه ها (ماکروکیست و میکروکیست) انجام گردید (تصاویر ۱۰ الی ۱۲). چنانچه در طی واکنش PCR تعدادی از نمونه ها اعم از ماکروسکوپی یا میکروسکوپی باند اختصاصی جنس حدوداً (۹۷۰bp) را نشان ندهند این نمونه ها با نمونه های جدید جایگزین می شدند (Hamidinejat et al., 2014).

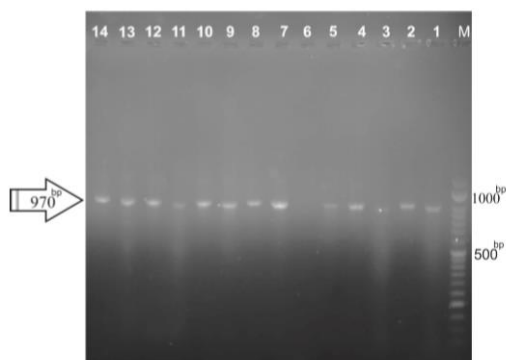


شکل ۹- DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد

-C؛ کنترل منفی (آب مقطر).

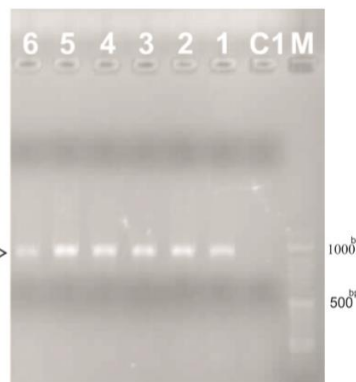
چاهک های 1-4؛ DNA استخراج شده از نمونه های .

M؛ مارکر ۵۰bp (شرکت سیناژن).



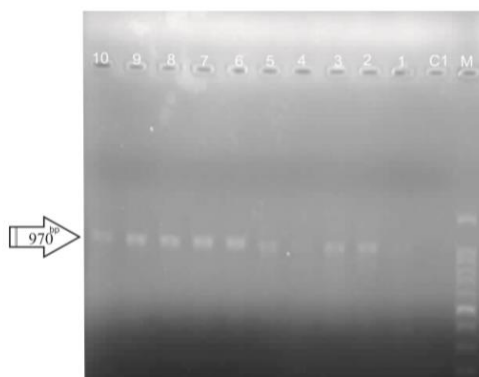
شکل ۱۱- الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

چاهک های 1-14؛ محصول واکنش PCR روی DNA استخراج شده از نمونه های ماکروسکوپی (شماره های ۲۰-۷)؛ بجز چاهک های 3 و 6 در سایر چاهک ها باند ۹۷۰bp مشخص است.
C1: کنترل منفی (آب مقطر).
M: مارکر ۵۰bp (شرکت سیناژن).



شکل ۱۰- الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

چاهک های 1-6؛ محصول واکنش PCR روی DNA استخراج شده از نمونه های ماکروسکوپی (شماره های ۶-۱)؛ در تمامی چاهک ها باند ۹۷۰bp مشخص است.
C1: کنترل منفی (آب مقطر).
M: مارکر ۵۰bp (شرکت سیناژن).

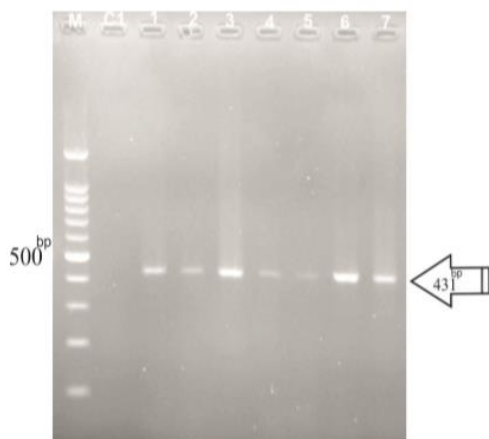


تصویر ۱۲- الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

چاهک های 1-10؛ محصول واکنش PCR روی DNA استخراج شده از نمونه های میکروسکوپی (شماره های ۱۰-۱)؛ بجز چاهک 1 در سایر چاهک ها باند ۹۷۰bp مشخص است.
C1: کنترل منفی (آب مقطر).
M: مارکر ۵۰bp (شرکت سیناژن).

۵-۱-۴- تعیین گونه کیست های میکروسکوپی

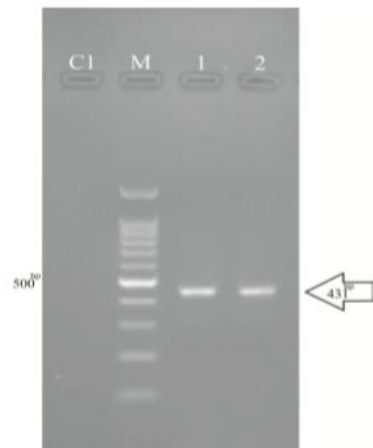
به منظور تشخیص تفریقی بین گونه های ایجاد کننده کیست های میکروسکوپی، محصول PCR اول نمونه های میکروسکوپی با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه (new-SA1) مجدداً تکثیر گردیدند. محصول این واکنش در گونه سارکوسیستیس آریتی کانیس قطعه ای به طول ۴۳۱bp می باشد در حالیکه نمونه های آلوده به سایر گونه ها در این واکنش باندی نمی دهند. نمونه هایی که در واکنش دوم باند نداده بودند مجدداً یک بار دیگر واکنش Semi-nested PCR روی آنها تکرار گردید. نتایج این مطالعه نشان داد تمامی ۴۰ نمونه میکروسکوپی مورد بررسی در این تحقیق سارکوسیستیس آریتی کانیس بوده اند. در تمامی واکنش ها در کنار نمونه ها از کنترل منفی استفاده شده است (اشکال ۱۳ تا ۱۵) (Hajimohammadi et al., 2014).



شکل ۱۴- الکتروفورز محصولات Semi-nested PCR

روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

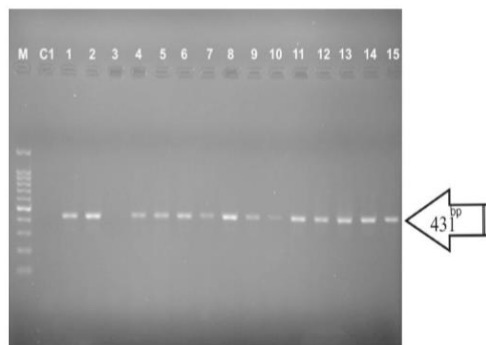
چاهک های 1-7؛ محصول واکنش Semi-nested PCR نمونه‌های میکروسکوپی (شماره های ۳-۹)؛ همه نمونه ها باند ۴۳۱bp داده است. C1: کنترل منفی (آب مقطر). M: مارکر ۱۰۰bp (شرکت سیناژن).



شکل ۱۳- الکتروفورز محصولات Semi-nested PCR

روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

چاهک های 1,2؛ محصول واکنش Semi-nested PCR نمونه‌های میکروسکوپی (شماره های ۱و۲)؛ باند ۴۳۱bp مشخص است. C1: کنترل منفی (آب مقطر). M: مارکر ۱۰۰bp (شرکت سیناژن).

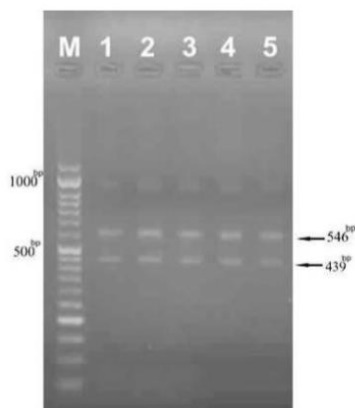


شکل ۱۵- الکتروفورز محصولات Semi-nested PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

چاهک های 1-15؛ محصول واکنش Semi-nested PCR نمونه‌های میکروسکوپی (شماره های ۲۵-۱۱)؛ بجز چاهک 3 در سایر چاهک ها باند ۴۳۱bp مشخص است. C1: کنترل منفی (آب مقطر). M: مارکر ۱۰۰bp (شرکت سیناژن).

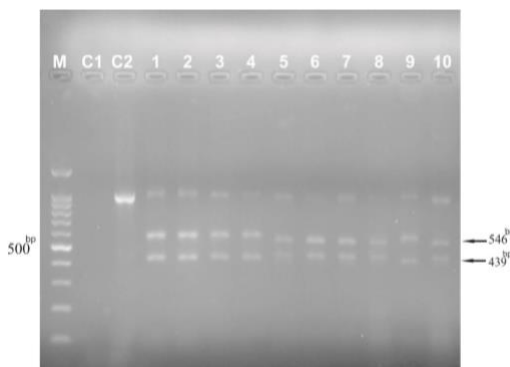
۵-۱-۵- تعیین گونه کیست‌های ماکروسکوپی

محصول واکنش PCR کیست‌های ماکروسکوپی تحت تاثیر آنزیم آندونوکلاز محدود کننده SspI قرار داده شد. این آنزیم قادر است توالی (AAT/ATT) را در موقعیت نوکلئوتیدی ۷۸۷-۷۸۲ ژن 18SrRNA سارکوسیستیس *تریگاتنه* شناسایی کرده، آن را به دو قطعه (۵۴۶bp و ۴۳۹ bp) برش دهد. تمامی ۲۰ نمونه ماکروسکوپی مورد بررسی در این تحقیق توسط این آنزیم برش خورده و سارکوسیستیس *تریگاتنه* تشخیص داده شدند (تصاویر ۱۶ و ۱۷) (Hajimohammadi et al., 2014).



شکل ۱۷- الکتروفورز محصولات برش آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد

چاهک های 1-5: نتایج برش آنزیمی محصولات PCR نمونه‌های ماکروسکوپی (شماره های ۱۱-۱۵): تمامی نمونه‌ها برش خورده باندهای ۵۴۶bp و ۴۳۹bp را نشان داده است. M: مارکر ۵۰bp (شرکت سیناژن).

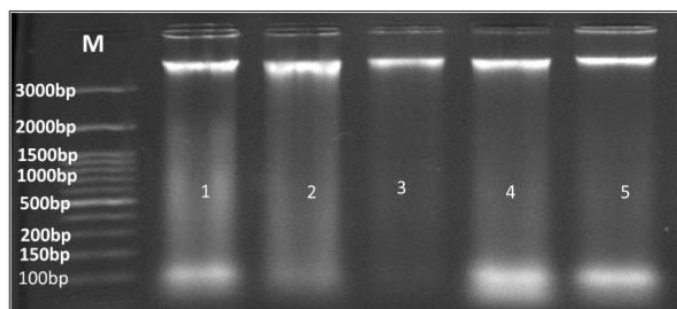


تصویر ۱۶- الکتروفورز محصولات برش آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد

چاهک های 1-10: نتایج برش آنزیمی محصولات PCR نمونه‌های ماکروسکوپی (شماره های ۱-۱۰): تمامی نمونه‌ها برش خورده باندهای ۵۴۶bp و ۴۳۹bp را نشان داده است. C1: کنترل منفی (آب مقطر). C2: محصول PCR اول قبل از برش (۹۷۰bp). M: مارکر ۱۰۰bp (شرکت سیناژن).

۲-۵- نتایج تکنیک SSCP [۲۴]

استخراج DNA بر اساس تکنیک ارائه‌شده توسط Campos و Gilbert (۲۰۱۲) می‌باشد، به‌طور موفقیت آمیزی صورت گرفت و DNA های حاصل بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند. نتایج حاصل از نمونه‌ها در شکل ۱۸ آورده شده است.

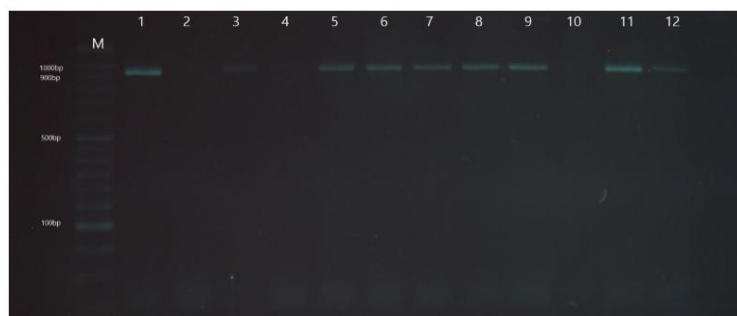


شکل ۱۸- الکتروفورز نمونه‌های DND استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪. M: DNA Ladder از شرکت Jena bioscience Germany با دامنه‌ی متوسط (1500-50bp)، ستون‌های ۱ تا ۵: DNA های استخراج شده می‌باشند.

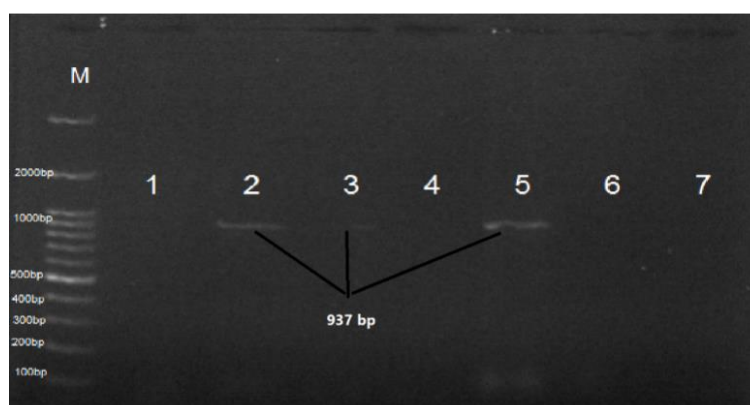
۱-۲-۵- نتایج حاصل از تکثیر قطعه ژن مورد نظر در گونه‌های سارکوسیستیس کروزوی و هومینیس

به‌منظور بررسی وجود گونه‌های سارکوسیستیس کروزوی و هومینیس در DNA های استخراج شده، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 18s rRNA انجام شد و قطعاتی حدود 937bp و 926bp جفت بازی از ژن 18s rRNA گونه‌های سارکوسیستیس کروزوی و هومینیس در ۱۲ نمونه از ۳۰ نمونه مورد بررسی، تکثیر شد و در ۱۸ نمونه که از نظر این دو گونه عاری از آلودگی بودند هیچ گونه تکثیری صورت نگرفت.

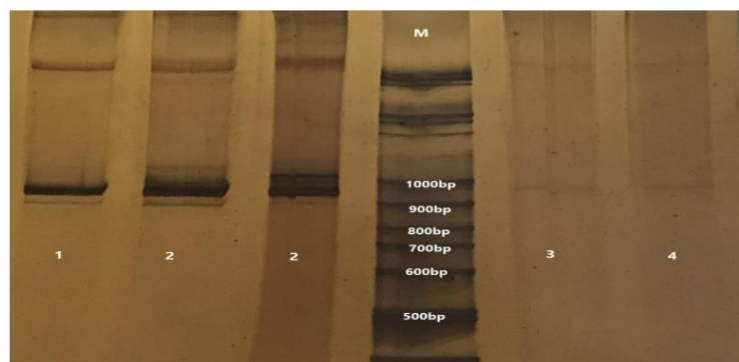
بعد از انجام PCR ۷-۸ میکرولیتر از محصولات PCR هم بر روی ژل آگارز ۱ درصد و هم برای اطمینان و دقت بروی ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد منتقل شدند و الکتروفورز گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد که ۱۲ نمونه از ۳۰ نمونه‌ی مورد بررسی مثبت به وجود گونه‌های سارکوسیستیس کروزوی و هومینیس گردیدند. نتایج حاصل از ژل آگارز و ژل پلی‌اکریلامید در شکل‌های ۱۹ و ۲۰ و ۲۱ آورده شده است (Hajimohammadi et al., 2014).



شکل ۱۹- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪. M: DNA Ladder از شرکت Jena bioscience Germany، با میزان متوسط (100-2000bp) می باشد. ستون های ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۲ با پرایمرهای تخصصی، ژن 18S rRNA را تکثیر نمودند بنابراین نسبت به انگل سارکوسیست مثبت شدند. ستون های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ با پرایمرهای تخصصی ژن 18S rRNA تکثیر نگردیدند.



شکل ۲۰- الکتروفورز نمونه های دیگر حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪. M: DNA Ladder از شرکت Jena bioscience Germany، با میزان متوسط (100-2000bp) می باشد. ستون های ۲، ۳، ۵ با پرایمرهای تخصصی، ژن 18S rRNA را تکثیر نمودند بنابراین نسبت به انگل سارکوسیست مثبت شدند. ستون های ۱، ۴، ۶، ۷ با پرایمرهای تخصصی ژن 18S rRNA تکثیر نگردیدند.



شکل ۲۱- ۴ نمونه ی حاصل از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪، ستون های ۲ و ۲: نمونه ی شماره ی ۲ تکرار شده است که باندهای حاصل از آلودگی همزمان به دو گونه ی سارکوسیستیس کروزی (۹۳۷bp) و سارکوسیستیس هومینیس (۹۲۶bp) را نشان می دهد. ستون های ۳ و ۴: باندهای حاصل از آلودگی به سارکوسیستیس کروزی. ستون M: DNA ladder از شرکت سینازن با دامنه ی متوسط ۵۰-۱۵۰۰bp.

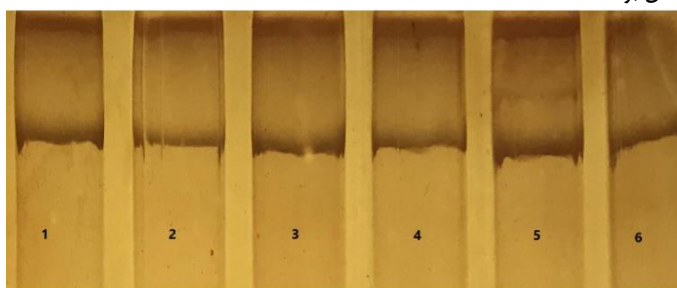
۵-۲-۲- نتایج حاصل از ژل آکریل آمید و تکنیک SSCP

نمونه‌های حاصل از RCR را برای تفکیک بهتر گونه‌ها یعنی تشخیص باندهای حاصل از سارکوسیتیس هومینیس [۹۲۶bp] و سارکوسیتیس کروزی (۹۳۷bp) و بررسی آلودگی چند گونه‌ای ابتدا بر روی ژل آگارز و سپس بر روی ژل پلی آکریل آمید بردیم. برای تایید آلودگی همزمان به دو گونه‌انگلی SSCP برای یک نمونه تکرار شده است. نتایج حاصل از ژل آکریل آمید و SSCP در تصویر ۲۲ و ۲۳ آورده شده است.

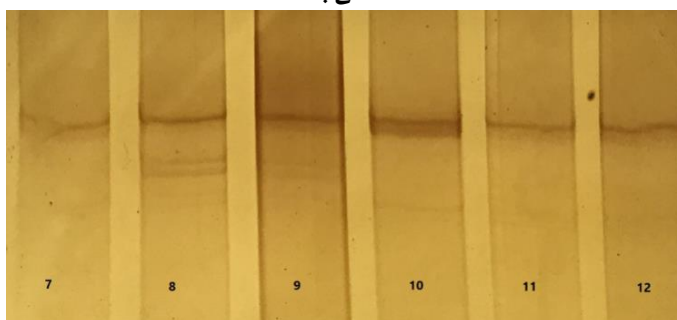
این بررسی نشان داد که از ۱۲ نمونه مثبت، در ۲ نمونه آلودگی همزمان به دو گونه‌ی انگل سارکوسیتیس کروزی و سارکوسیتیس هومینیس وجود دارد. ۱۰ نمونه‌ی باقی فقط به گونه‌ی سارکوسیتیس کروزی آلوده بودند. با این حساب فراوانی آلودگی به سارکوسیتیس کروزی برابر ۳۳/۳٪ می‌باشد و فراوانی آلودگی همزمان برابر ۱۶/۶٪ می‌باشد.

۴-۳- نتایج SSCP

بقیه‌ی نمونه‌های سارکوسیتیس کروزی با تکنیک SSCP بررسی شد و در SSCP الگوهای یکسان مشاهده شد. یعنی همه مونومورف و یک شکل بودند.



شکل ۲۲- نمونه‌های ۱-۶ الگوهای یکسان حاصل از محصولات PCR گونه سارکوسیتیس کروزی با استفاده از تکنیک SSCP می‌باشد.



شکل ۲۳- نمونه‌های ۷، ۱۰، ۱۱ الگوهای یکسان حاصل از محصولات PCR گونه سارکوسیتیس کروزی با استفاده از تکنیک SSCP می‌باشد. نمونه‌های ۸ و ۹، آلودگی همزمان به دو گونه‌ی سارکوسیتیس کروزی و سارکوسیتیس هومینیس را نشان می‌دهند.

۶- نتیجه‌گیری

سارکوسیتیس انگل عضلات قلبی و اسکلتی بسیاری از دام‌های اهلی و وحشی است. این انگل انتشار جهانی دارد و عامل ایجاد بیماری‌های بالینی، تحت‌بالینی و همچنین زیان‌های اقتصادی در انسان و حیوان می‌باشد. انسان تنها در صورت خوردن گوشت آلوده گاو و یا خوک به صورت خام، به عنوان میزبان نهایی دو گونه از سارکوسیتیس قرار گرفته و اسپوروسیست انگل را دفع می‌نماید. با این حال مصرف گوشت‌های آلوده به صورت خام و یا نیم‌پز ممکن است علائمی چون بی‌اشتهایی، درد شکم، نفخ، اسهال، استفراغ، اشکالات تنفسی و افزایش ضربان قلب را به همراه داشته باشد. در همین راستا در تحقیق حاضر روش‌های PCR در شناسایی این انگل بیان و به صورت مروری مورد بررسی قرار گرفته است.

۱. شکر فروش، شهرام؛ رضوی، مصطفی؛ عباس والی، م. (۱۳۹۲). اولین گزارش تشخیص سارکوسیستیس هیرسوتا در گاو در ایران، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز)، ۱۴ (۲): ۱۵۷-۱۵۵.
2. Arshad, M.; Dalimi, A.; Ghaffarifar, F. (2007). Comparative study on Sarcocystis diagnosis in meat of slaughtered sheep in Tabriz. Pajouhesh & Sazandegi, 75: 68-72.
3. Bahari, P.; Salehi, M.; Seyedabadi, M.; Mohammadi, A. (2014). Molecular identification of macroscopic and microscopic cysts of Sarcocystis in sheep in North Khorasan province. Iran, Vol, 3 (9): 51-56.
4. Beyazit, A.; Yaziciog˘lu, O.; Karaer, Z. (2007). The prevalence of ovine Sarcocystis species in Izmir province. Ankara, Univ, Vet. Fak. Derg, 54: 111-116.
5. Dafedar, AM.; Dsouza, PE.; Ananda, KJ.; Puttalakshamma, GG. (2008). Prevalence of Sarcocystis in goats slaughtered at an abattoir in Bangalore, Kavnavata staste. Veterinary world, Vol, 1 (11): 335-337.
36. Dalimi, A.; Khodashenas, M.; Noori, A.; Morovati, M. (1989) Ultrastructural study of Sarcocystis isolated from water buffalo (Bubalus bubalis) in Khozestan province, in Iran. Pajouhesh va Sazandagi, 43: 9-47.
6. Dubey, JP.; Mitchell, SM.; Merrow, JK.; Rhyan, JC.; Stewart, LM.; Granstrom, DM.; Romand, S.; Saville, WJ.; Lindsay, DS. (2003). Prevalence of antibodies to neospora caninum, sarcocystis neurona, and toxoplasma gondii in wild horses from central Wyoming. J. Parasitol, 89 (4): 716-720.
7. Durate, PD.; Daft, BM.; Conrad, PA.; Pakham, AE.; Saville, WJ.; Mackay, RJ.; Barr, BC.; Wilson, WD.; Ng, T.; Reed, SM.; Gardner, IM. (2004). Evaluation and comparison of and indirect flurescent antibody test for detection of antibodies to Sarcocystis neurona, using serum and cerebrospinal fluid of naturally and experimentally infected and vaccinated horses. J. Parasitol, 90 (2): 379-386.
8. Elsheikha, HM.; Schot, HC.; Mansfield, LS. (2006). Genetic variation among isolates of Sarcocystis neurona, the agent of protozoal myeloencephalitis, as revealed by amplified fragment length polymorphism markers. Infect Immun, 74: 3448-3454.
9. Frank, J.; Griffin, T.; Evelyn, S.; Christie, R.; Simon, L and mark, C. (2005). Immunoglobulin G1 Enzyme-linked Immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in red deer (Cervus elaphus). Clin diagn. Lab. Immunol, 12: 1401-1409.
10. Hamidinejat, H.; Alborzi, A.; Moetamedi, H.; Hatami, A. (2013). Molecular detection of Sarcocystis species in slaughtered sheep by PCR-RFLP from south-western of Iran. J. Parasit Dis.
11. Hamidnejat, H.; Razijalali, MH.; Nabavi, L. (2010). Survey on Sarcocystis infection in slaughtered cattle in south-west of Iran, emphasized on evaluation of muscle squash in comparison with digestion method Med well. J, 9 (12): 1724-1726.
12. Hosseini, SR.; Shakerian, A.; Tahamtan, N. (2012). Survey of Sarcocystis infection in slaughtered sheep in Isfahan. J of animal and veterinary advencees, 11 (15): 2683-2686.
13. Mirzaei Dehaghi, M.; Fathi, S.; Norouzi Asl, A. (2011). Survey of Sarcocystis infection in slaughtered goats in Kerman Abattoir, southeast of Iran. J of animal and veterinary advencees, 10 (9): 1205-1208.
14. Motamedi, GHR.; Dalimi, A.; Aghaeepour, K.; Nouri, A. (2010). Ultrastructvral and molecular studies on fat and thin macrocysts of Sarcocystis spp. Isolated from naturally infected goats. Archives of Razi Institute, Vol, 65 (2): 91-97.
15. Oryan, A.; Sharifiyazdi, H.; Khordadmehr, M.; Larki, S. (2011). Characterization of Sarcocystis fusiformis based on sequencing and PCR-RFLP in water buffalo (Bubalus bubalis) in Iran. Parasitol Res, 109: 1563-1570.
16. Prakas, P. and Butkauskas, D. (2002). Protozoan parasites from genus Sarcocystis and their inrestigations in Lithuania. Vol, 58 (1): 45-58.
17. Rosenthal, BM.; Dunams, DB.; Pritt, B. (2008). Restricted genetic diversity in the ubiquitous cattle pavasite, Sarcocystis cruzi. Infect Genet Evol, 8: 588-592.
18. Stojcecki, K.; Karamon, J.; Sroka, J.; Cencek, T. (2012). Molecular diagnostics of Sarcocystis spp. infection. J. of veterinary sciences, Vol 15 (3): 589-596.
19. Tenter, AM.; luton, K.; Johnson, AM. (1994). Species-specific identification of Sarcocystis and Toxoplasma by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. J. Parasitol, 35 (3): 88-173.

20. Yang, ZQ.; Li, QQ.; Zuo, YX.; .; Chen, XW.; Chen, YJ.; Nie, L.; Wei, CG.; Zen, JS.; Attwood, SW.; Zhang, XZ.; Zhang, YP. (2002). Characterization of Sarcocystis species in domestic animals using a PCR-RFLP. Analysis of variation in the 18SrRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. *Exp Parasitol*, 102: 212-217.
21. Yang, ZQ.; Zuo, YX.; Yao, YG.; Chen, XW.; Yang, GG.; Zhang, YP. (2001). Analysis of the 18SrRNA genes of Sarcocystis species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Mol Biochem Parasitol*, 115: 283-288.
22. Hamidinejat, H., Moetamedi, H., Alborzi, A., & Hatami, A. (2014). Molecular detection of Sarcocystis species in slaughtered sheep by PCR-RFLP from south-western of Iran. *Journal of parasitic diseases*, 38(2), 233-237.
23. Hajimohammadi, B., Dehghani, A., Ahmadi, M. M., Eslami, G., Oryan, A., & Khamesipour, A. (2014). Prevalence and species identification of Sarcocystis in raw hamburgers distributed in Yazd, Iran using PCR-RFLP. *Journal of food quality and hazards control*, 1(1), 15-20.