The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Detection of sarcocystis infection by molecular methods using COX 1 and 18srRNA genes in cattle and buffaloes of Urmia

Shima Abdolrahmani[1], Farnaz Malekifard[2]✉, Bijan Esmaeilnejad[3], Mousa Tavassoli[4]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: sh.abdolrahmani@urmia.ac.ir
2. Corresponding author, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: f.malekifard@urmia.ac.ir
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: b.esmaeilnejad@urmia.ac.ir
4. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: m.tavassoli@urmia.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 18 September 2022

Received: 12 December 2022

Accepted: 18 December 2022

Published online: 22 June 2023

Keywords:

Sarcocystis; Cow,

Buffalo,

18srRNA,

COX1.

ABSTRACT

Due to the importance of Sarcocystis as a common zoonotic disease in public health, in this study, the infection rate of Sarcocystis infection and molecular identification of its species by using COX1 and 18srRNA genes in slaughtered cattle and buffaloes of the abattoir of Urmia was investigated. For this purpose, samples were taken from the intercostal muscles, diaphragm, esophagus, and thighs of 100 cows and 100 buffaloes slaughtered in the slaughterhouse of Urmia city in 2021. At first, macroscopic and microscopic evaluation were performed on samples. Then, DNA was extracted from homogenized tissues and molecular investigations were done using COX1 and 18srRNA genes. In the macroscopic examination, none of the samples obtained from cows were infected with sarcocystis, while this protozoan was isolated from 11 (%11) samples obtained from buffaloes. The infection rate in the impression smear method in cow and buffaloes samples were 27 (%27) and 16 (%16) and in peptic digestion method was 37 (%37) and 23 (%23), respectively. In parallel, molecular evaluation confirmed the presence of sarcocystis infection in 39 cases (39%) out of 100 cow carcasses and 26 cases (26%) out of 100 studied buffalo carcasses. The findings of this study indicate relatively high infection rate in cattle and buffalo populations of the province. The findings of this study indicate relatively high infection rate in cattle and buffalo populations of the province. So, it is suggested to avoid eating raw and undercooked meat.

Cite this article: Abdolrahmani, Sh., Malekifard, F., Esaeilnejad, B., & Tavassoli, M. (2023). Detection of sarcocystis infection by molecular methods using COX 1 and 18srRNA genes in cattle and buffaloes of Urmia. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (2), 187-202. DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.348362.653905

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.348362.653905

Extended Abstract

Introduction

Sarcocytosis is a common disease in humans and domestic animals caused by Sarcocytis species. The evolutionary cycle of this parasite includes the carnivorous host as the definitive host and the herbivorous or omnivorous host as the intermediate host. Cattle are considered intermediate hosts for three Sarcocystis species, including *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis homonis*. Dogs, cats and primates are definitive hosts of cattle's Sarcocytis. These three species cause severe symptoms and disease in cattle, symptoms of which include jaundice, myocardial hemorrhage, hair loss, anorexia, weight loss, anemia, decreased milk production, abortion, neurological disorders and death. Five species reported from the buffalo including *Sarcocystis fusiformis*, *Sarcocystis buffalonis*, *Sarcocystis levini*, *Sarcocystis dubeyi* and *Sarcocystis sciensis*. Due to the importance of Sarcocystis as a common zoonotic disease in public health, in this study, the

infection rate of Sarcocystis infection and molecular identification of its species by using *COX1* and *18srRNA* genes in slaughtered cattle and buffaloes of the abattoir of Urmia was investigated.

Materials and Methods

For this purpose, samples were taken from the intercostal muscles, diaphragm, esophagus, and thighs of 100 cows and 100 buffaloes slaughtered in the slaughterhouse of Urmia city in 2021. Approximately 50 grams of each of muscles were collected separately in nylon bags and, transferred to Urmia Veterinary University Parasitology Laboratory. Of the 100 buffalo carcasses examined, 49 carcasses belonged to male buffalo and 51 carcasses to female buffalo. Of a total of 100 carcasses examined, 55 carcasses were from buffalo aged three or less than three years (<3) and 45 carcasses were from buffalo aged three or older (>3). In addition, out of a total of 100 cow carcasses examined in this study, 66 carcasses belonged to male cows and 34 carcasses to female cows. Of the total of 100 carcasses examined, 49 carcasses were from cows less than two years old (>2) and 51 carcasses were from cows more than two years old. At first, macroscopic and microscopic evaluation were performed on samples. Then, DNA was extracted from homogenized tissues and molecular investigations were done using *COX1* and *18srRNA* genes.

Discussion

In the macroscopic examination, none of the samples obtained from cows were infected with sarcocystis, while this protozoan was isolated from 11 (11%) samples obtained from buffaloes. The infection rate in the impression smear method in cow and buffaloes samples were 27 (27%) and 16 (16%) and in peptic digestion method was 37 (37%) and 23 (23%), respectively. In parallel, molecular evaluation confirmed the presence of sarcocystis infection in 39 cases (39%) out of 100 cow carcasses and 26 cases (26%) out of 100 studied buffalo carcasses. The results of this study indicate a relatively high rate of infection in the province's cattle and buffalo populations. Therefore, it is recommended to provide control and prevention programs to prevent access to contaminated viscera of dogs and cats in the region and to avoid eating raw and undercooked meat.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۴، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

شناسایی میزان آلودگی به سارکوسیستیس به روش مولکولی و با استفاده از ژن های COX1 و 18srRNA در گاو و گاومیش های شهرستان ارومیه

شیما عبدالرحمانی [۱] | فرناز ملکی فرد [۲]✉ | بیژن اسمعیل نژاد [۳] | موسی توسلی [۴]

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: sh.abdolrahmani@urmia.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: f.malekifard@urmia.ac.ir

۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: b.esmaeilnejad@urmia.ac.ir

۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: m.tavassoli@urmia.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

کلیدواژه‌ها:

سارکوسیستس، گاو، گاومیش، 18srRNA، COX1.

چکیده

با توجه به اهمیت سارکوسیتوزیس به عنوان بیماری مشترک در بهداشت عمومی جامعه، در این مطالعه میزان فراونی گونه‌های سارکوسیستیس با استفاده از ژن‌های Cox1 و 18srRNA در گاوها و گاومیش‌های کشتارشده در گشتارگاه ارومیه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، نمونه‌برداری از عضلات بین دنده‌ای، دیافراگم، مری و ران ۱۰۰ راس گاو و ۱۰۰ راس گاومیش کشتار شده در کشتارگاه شهرستان ارومیه در سال ۱۴۰۰ صورت گرفت. نمونه‌ها از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی با استفاده از روش گسترش مهری و هضم بافتی مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه استخراج DNA از بافت های مورد مطالعه صورت گرفت و سپس بررسی‌های مولکولی با استفاده از ژن‌های COX1 و 18srRNA انجام گرفت. در بررسی ماکروسکوپی، هیچکدام از نمونه‌های بدست آمده از گاو آلوده به سارکوسیستیس نبودند، در حالی که تک یاخته از ۱۱ (۱۱درصد) نمونه بدست آمده از گاومیش جداسازی شد. همچنین در بررسی‌های میکروسکوپی با استفاده از روش گسترش مهری میزان آلودگی در گاو وگاومیش به ترتیب ۲۷ (۲۷ درصد) و ۱۶ (۱۶درصد) و در روش هضم بافتی به ترتیب برابر با ۳۷ (۳۷ درصد) و ۲۳ (۲۳ درصد) بود. همچنین بررسی‌های مولکولی با استفاده از ژن‌های COX1 و 18srRNA، حاکی از تایید آلودگی به سارکوسیتیس در ۳۹مورد (۳۹درصد) از ۱۰۰ لاشه گاو و ۲۶ مورد (۲۶درصد) از ۱۰۰ لاشه گاومیش مورد مطالعه بود. یافته‌های این مطالعه، بیانگر آلودگی نسبتاً بالا در جمعیت‌های گاو وگاومیش استان دارد. به همین دلیل اقدامات و توصیه‌های لازم باید در جهت جلوگیری از مصرف گوشت خام و کم پخته در نظر گرفته شود.

استناد: عبدالرحمانی، شیما؛ ملکی فرد، فرناز؛ اسمعیل نژاد، بیژن؛ و توسلی، موسی (۱۴۰۲). شناسایی میزان آلودگی به سارکوسیستیس به روش مولکولی و با استفاده از ژن‌های COX1 و 18srRNA در گاو و گاومیش های شهرستان ارومیه. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۲)، ۲۰۲-۱۸۷.

DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.348362.653905

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.348362.653905

مقدمه

سارکوسیتوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و حیوانات اهلی است که توسط گونه‌های سارکوسیتیس ایجاد می‌شود. چرخه تکاملی این انگل شامل میزبان گوشتخوار به عنوان میزبان نهایی و میزبان گیاهخوار یا همه‌چیزخوار به عنوان میزبان واسط است. هر یک از میزبان‌های واسط و نهایی می‌توانند میزبان بیش از یک گونه سارکوسیستیس باشند .Dubey et al (1989). سارکوسیتوزیس اولین بار در سال ۱۸۴۳ به صورت کیست‌های نخی شکل در عضلات مخطط موش خانگی توسط میشر گزارش شد. در سال ۱۸۶۵، ساختارهای مشابهی در عضلات خوک شناسایی شد و در نهایت در سال ۱۸۹۹، *سارکوسیستیس میشریانا* برای شناسایی این ساختارها پیشنهاد شد(Fayer, 2004).

گاو به عنوان میزبان واسط برای سه گونه سارکوسیستیس شامل *سارکوسیستیس کروزی*، *سارکوسیستیس هیرسوتا* و *سارکوسیستیس هومونیس* شناخته می‌شود که به ترتیب از سگ‌سانان، گربه سانان و پریمات‌ها به عنوان میزبان نهایی استفاده می‌کنند. در بین این سه گونه، *سارکوسیستیس کروزی* منجر به علایم و بیماری شدید در گاو می‌شود که علایم آن شامل زردی، خونریزی در میوکارد، ریزش مو، بی اشتهایی، کاهش وزن، کم خونی، کاهش تولید شیر، سقط جنین و اختلالات عصبی و مرگ می‌شود. پنج گونه گزارش شده از گاومیش شامل *سارکوسیستیس فوزی‌فورمیس*، *سارکوسیستیس بوفالونیس*، *سارکوسیستیس لوینی و سارکوسیستیس دوبئی* و *سارکوسیستیس ساینسیس* معرفی شده است(Daptardar *et al*., 2016). انسان به عنوان میزبان نهایی دو گونه *سارکوسیستیس هومونیس و سارکوسیستیس سوئی هومونیس* شناخته می‌شود (Dubey *et al*., 1989). آلودگی در میزبان نهایی با مصرف گوشت آلوده به سارکوسیستیس به صورت خام یا کم پخته صورت می‌گیرد. علایم بیماری در انسان به صورت درد شکم، تهوع، اسهال، ائوزینوفیلی، التهاب روده و کاهش اشتها مشاهده می‌شود Shariat (Panah, 2003). اگرچه عفونت در میزبان‌های واسط معمولاً بدون علامت است، ولی آلودگی‌های شدید منجر به ضبط و حذف لاشه و خسارت اقتصادی جدی در حوزه دامپروری می‌شود. به منظور شناسایی آلودگی در میزبان‌های واسط از روش‌های مختلفی نظیر معاینه لاشه با چشم غیرمسلح، روش تهیه گسترش تماسی، رنگ‌آمیزی بافت، روش هضمی، روش‌های مولکولی نظیر ایمونوفلورسنس و IFAT، الایزا، وسترن بالات، PCR و تست‌های حساس سرولوژیکی استفاده می‌شود (Tenter, 1991 ;Dubey, 2015).

بررسی‌های متعددی در سرتاسر جهان حاکی از آلودگی بالا در حیوانات از جمله حیوانات کشتارگاهی دارد. در بررسی صورت گرفته در آرژانتین بر روی ۳۸۰ گاو کشتار شده، میزان آلودگی عضلات ۷۳/۱ تا ۹۹/۵ درصد گزارش شد ,.Moré *et al* (2011). همچنین بررسی صورت گرفته در مالزی حاکی از آلودگی ۳۶/۲ درصد گاوها و ۶۶/۷ درصد از گاومیش‌های کشتار شده داشت (Latif *et al*., 2013). در یک مطالعه، ۶۷/۷ درصد از گوشت‌های گاو عرضه شده در فروشگاه‌های زنجیره‌ای آلمان نیز آلوده به سارکوسیستیس بودند (Moré *et al*., 2011).

مطالعات صورت گرفته در ایران نیز حاکی از آلودگی بالا این انگل در بین حیوانات کشتار شده داشت. به عنوان مثال در سال ۲۰۰۸ در کشتارگاه شهرستان شهریار با استفاده از روش تماسی مستقیم و روش هضمی میزان آلودگی را در گاوهای کشتارشده در این شهرستان را به ترتیب برابر با ۹۲/۹درصد و ۹۹درصد گزارش کردند (Najafian *et al*., 2008). در بررسی صورت گرفته بر روی ۲۹۰ گاو کشتار شده در شمال غرب ایران، کیست سارکوسیستیس از ۹۲درصد نمونه‌ها به روش هضمی و بررسی میکروسکوپی جداسازی شد. همچنین بر اساس مطالعات PCR-RFLP و PCR اختصاصی ۸۷/۹ درصد و ۱/۰۳ درصد از جدایه‌ها به ترتیب به عنوان *سارکوسیستیس کروزی* و *سارکوسیستیس هومونیس* شناسایی شدند ,.Sarafraz *et al* (2020). در بررسی دیگر صورت گرفته در تبریز، میزان آلودگی در ۶۷۰ گاو کشتار شده در کشتارگاه صنعتی تبریز، میزان آلودگی به کیست انگل با استفاده از روش‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی به ترتیب برابر با ۱۰۰ درصد و ۸/۲ درصد بود (Mirzaei & Rezaei 2016). در بررسی صورت گرفته در کرمان، میزان آلودگی در بررسی میکروسکوپی برابر با ۱۰۰ درصد

بود (NourollahiFard *et al*., 2009). در مطالعه صورت گرفته به منظور شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس در گاو و گاومیش‌های استان خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP، سه گونه سارکوسیستیس از نمونه‌های گاوی و پنج گونه سارکوسیستیس از نمونه‌های گاومیش جداسازی و شناسایی شد (Hamidinejat *et al*., 2015).

به طور کلی تاکنون مطالعات مختلفی در مورد آلودگی نشخوارکنندگان ایران به این انگل صورت گرفته است و اکثر مطالعات نیز بر اساس مشاهده مستقیم کیست های میکروسکوپی انگل در کشتارگاه بوده است که میزان آلودگی به دست آمده با این روش به مراتب کمتراز آلودگی واقعی نشخوارکنندگان به این انگل می باشد. بنابراین با توجه به اینکه اطلاعاتی از گونه های آلوده کننده سارکوسیتیس در گاوان و گاومیش های کشتار شده در شهرستان ارومیه موجود نیست، این مطالعه برای اولین بار به منظور شناسایی مولکولی گونه‌های سارکوسیستیس با استفاده از ژن های*COX1* و *18srRNA* در گاو و گاومیش های شهرستان ارومیه صورت گرفت.

مواد و روش ها

منطقه مورد مطالعه: ارومیه در شمال غربی ایران در ناحیه ای کوهستانی و مرتفع بین ارتفاعات نامنظم رشته کوه های زاگرس واقع شده و دارای آب وهوایی نسبتا سرد و زمستان های طولانی و گاهی یخبندان و تابستان های معتدل است.

روش جمع آوری و نمونه گیری: به منظور انجام این تحقیق، نمونه‌برداری بصورت تصادفی ساده، از عضلات بین دنده‌ای، دیافراگم، مری و ران ۱۰۰ راس گاو و ۱۰۰ راس گاومیش کشتار شده در کشتارگاه شهرستان ارومیه در سال۱۴۰۰ صورت گرفت.

روش نمونه برداری: در طی هر بار مراجعه به کشتارگاه، از ۱۰ لاشه پس از تعیین سن دام بر اساس فرمول دندانی و تعیین جنس دام و پس از عضلات مختلف بویژه عضلات جوشی، مری، عضلات بین دنده ای، دیافراگم، عضلات شکمی ، قلب و زبان ، در حدود ۵۰ گرم از هریک از عضلات اشاره شده، به صورت جداگانه در کیسه‌های نایلونی جمع‌آوری شده و پس از کدگذاری در مجاورت یخ به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انتقال داده شد. از مجموع ۱۰۰ لاشه ی گاومیش مورد بررسی، ۴۹ لاشه متعلق به گاومیش نر و ۵۱ لاشه مربوط به گاومیش ماده بود. از مجموع ۱۰۰ لاشه ی مورد بررسی، ۵۵ لاشه مربوط به گاومیش های سه یا کمتر از سه سال (۳>) و ۴۵ لاشه مربوط به گاومیش های سه یا بیشتر از سه سال (۳<) بود. همچنین در طی این مطالعه، از مجموع۱۰۰ لاشه گاو مورد بررسی، ۶۶ لاشه متعلق به گاو نر و ۳۴ لاشه مربوط به گاو ماده بود. از مجموع ۱۰۰ لاشه مورد بررسی، ۴۹ لاشه مربوط به گاوهای کمتر از دو سال(۲ >) و ۵۱ لاشه مربوط به گاوهای بیشتر و مساوی دو سال(۲ ≤) بود.

روش بررسی کشتارگاهی: در کشتارگاه عضلات مختلف به ویژه عضلات جوشی، مری، عضلات بین دنده ای، دیافراگم، عضلات شکمی، قلب و زبان از نظر وجود ماکروکیستهای دانه برنجی شکل انگل مورد بررسی قرار گرفت.

روش آزمایشگاهی

روش تهیه گسترش مهری از بافت: به منظور بررسی نمونه‌ها با استفاده از روش گسترش مهری، با استفاده از قیچی برش‌های متعددی روی نمونه‌های بافتی صورت گرفته و در ادامه شیرابه بدست آمده به صورت یک لایه نازک روی لام قرار گرفته و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا، گسترش‌ها از نظر وجود برادی زوئیت‌های انگل مورد بررسی قرار گرفت . (Razmi & Rahbari, 2000)

روش هضم بافتی: در این روش از محلول هضمی اسید پپسین شامل بافر فسفات(pH=۷/۲) که یک لیتر آن حاوی ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۳۷ درصد و ۲/۵ گرم پپسین استفاده شد. بدین ترتیب که ۲۰ گرم از عضلات جمع آوری شده در ۵۰ میلی لیتر محلول هضمی اسید پپسین در دمای ۴۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس محلول هضم شده از

الک ریز مشبک فیلتر شده و داخل لوله آزمایش ریخته شد و در ۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب بدست آمده در نیم میلی لیتر اب مقطر حل گردید. محلول بدست آمده از نظر وجود برادی زوایت زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از محلول مورد نظر روی لام گسترش تهیه شده و با رنگ گیمسا رنگ آمیزی گردید. سپس برادی زوایت سارکوسیتیس توسط میکرومتر زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰× و ۱۰۰۰× اندازه گیری شد (Farhang-Pajuh *et al*., 2014).

ارزیابی آماری: در این مطالعه جهت انجام آنالیز آماری، از برنامه SPSS، نسخه ۱۷ استفاده گردید و برای بررسی ارتباط بین وجود آلودگی به سارکوسیتیس و متغیّرهای جنس و سن حیوانات از آزمون Fisher exact test استفاده شد. سطح معنی دار $p< ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

بررسی‌های مولکولی

به منظور استخراج DNA برای بررسی‌های مولکولی از کیت MBST (ساخت شرکت انتقال سامانه‌های زیست مولکولی؛ تهران–ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. نمونه‌های DNA استخراج شده تا انجام مراحل بعدی در میکروتیوب‌های استریل و در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور ارزیابی تفاوت ژنتیکی بر اساس نشانگر سیتوکروم اکسیداز *I* از دو جفت پرایمر مشتق از ژن *COX1* (Sarc cox1 SF1: "ATGGCG TACAACAATCATAAAGAA" و Sarc cox1 SR9: "ATATCCATACCRCCATTGCCCAT") استفاده شد (Gjerde, 2016). پس از الکتروفورز در مورد ژن *COX1* باندهایی به اندازه ۱۱۰۰bp مشاهده شد. در ادامه به منظور بررسی تفاوت ژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری شده از دام‌ها و اماکن مختلف بر اساس ژن *18SrRNA*، پس از استخراج DNA از پرایمرهای اختصاصی (شامل Sarc 18S Fext:" GGTGAT TCATAGTAACCGAACG" و Sarc 18S Rext: "GATTTCTCATAAGGTGCAGGAG") استفاده شد (Moré *et al*., 2013). در مورد ژن *18SrRNA* نیز پس از الکتروفورز باندهایی با اندازه ۹۰۰bp مشاهده شد. در این مطالعه، در هر مرحله کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده گردید که آب مقطر بعنوان کنترل منفی استفاده شد و کنترل مثبت از دانشکده دامپزشکی تبریز تهیه گردید.

به منظور اجرای فرایند PCR از روش شرح داده شده توسط Hoeve-Bakker *et al* (2019) استفاده شد. به طور خلاصه فرایند اجرای PCR در میکروتیوب‌هایی با حجم ۵۰ µL و تحت شرایط زیر بود: مرحله دناتوره شدن اولیه به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، در ادامه دناتوره شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس مرحله اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و مرحله نهایی شامل نگهداری به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به تعداد ۳۵ سیکل بود(Hoeve-Bakker *et al*., 2019).

تعیین توالی(Sequencing)

در نهایت به منظور تعیین تفاوت ژنتیکی در گونه‌های مختلف شناسایی شده، تعدادی از نمونه‌ها به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) ارسال شد. نتایج توالی با استفاده از نرم افزار MEGA 6 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با توالی مرجع و سایر توالی ها در بانک اطلاعاتی GenBank با استفاده از ابزار جستجوی Basic Local Alignment (BLAST) مقایسه شد (www.ncbi.nlm.nih.gov).

نتایج

آلودگی گاومیش به سارکوسیستیس

فراوانی آلودگی: در این مطالعه، از مجموع ۱۰۰ لاشه گاومیش مورد بررسی در کشتارگاه صنعتی شهرستان ارومیه،۱۱ لاشه (۱۱ درصد) آلوده به ماکروکیست بودند. توزیع آلودگی به کیستهای ماکروسکوپی در گاومیش ها بر حسب سن و جنس در جدول ۴–۱ آورده شده است. بررسی داده‌های مربوط به جنس حیوانات تحت مطالعه، بیانگر وجود تفاوت معنی‌داری در

فراوانی آلودگی در جنسهای مختلف دام بود (p <0.05) (جدول ۱). همچنین، آلودگی به کیست های ماکروسکوپی در لاشه گاومیش های سه سال و بیشتر از سه سال بیشتر دیده شد که نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در فراوانی آلودگی به انگل در سنین مختلف دام بود (p <0.05) (جدول ۴-۱).

جدول ۱- نتایج آلودگی به ماکروکیست درلاشه های گاومیش آلوده

لاشه دام	سن (سال، درصد)		جنس(درصد)		جمع کل
	≥۳	<۳	نر	ماده	۱۰۰
تعداد دام مطالعه	۵۵ (۵۵)	۴۵(۴۵)	۴۹(۴۹)	۵۱ (۵۱)	
تعداد دام الوده	۱۰(۱۸/۱)	۱ (۲/۲)	۱۱(۲۲/۴)	صفر	۱۱ (۱۱)
P*	P=۰/۰۱۳		P=۰/۰۳۴		-

* P =تست فیشر

نتایج توزیع فراوانی ماکروکیستها در اندام‌های مختلف گاومیش های آلوده

در بازرسی پس از کشتار در لاشه‌های گاو و گاومیش های کشتار شده، ماهیچه‌های عضلات بین دنده ای، دیافراگم ، مری، ران بررسی گردیدند. دیافراگم و مری به عنوان اعضای اصلی و عضلات جوشی، اسکلتی، عضلات اندام‌های حرکتی قدامی و خلفی به عنوان سایر عضلات در نظر گرفته شد. در دام‌های نر، آلودگی مری در ۷ لاشه (۶۳/۶ درصد)، آلودگی دیافراگم در ۱ لاشه (۹/۰۹ درصد) و آلودگی سایر عضلات در۳ لاشه (۲۷/۲ درصد) دیده شد. در این بررسی، ماکروکیستهای جدا شده از اندام‌های آلوده به ماکروکیست گاومیش های کشتاری، عمدتاً از مری بودند. توزیع آلودگی در اندام‌های آلوده اختلاف معنی‌دار داشت (p <0.05).

نتایج مطالعه ریخت‌شناسی ماکروکیستهای سارکوسیستیس در گاومیش های آلوده

از لاشه‌های مورد مطالعه پس از بررسی ماکروسکوپی، تعداد ۹۸ ماکروکیست سارکوسیستیس جدا گردیدند. در بررسی ریخت‌شناسی کیستهای سارکوسیستیس بر اساس شکل و اندازه اولیه در سه گروه اصلی دسته‌بندی شدند (جدول ۲).

جدول ۲ - تنوع ریخت‌شناسی ماکروکیست‌های سارکوسیستیس جدا شده از لاشه گاومیش های آلوده براساس اندازه ماکروکیست

نوع کیست	اندازه (میلی متر) (درصد)			جمع کل
	>۵	۵-۱۰	>۱۰	
ماکروکیست	۵۶ (۵۷/۱)	۳۵ (۳۵/۷)	۷ (۷/۱)	۹۸ (۱۰۰)

نتایج ریخت‌شناسی و مورفومتریک ماکروکیستهای سارکوسیستیس در گاومیش

ارزیابی میکروسکوپی، مورفومتریک و ریخت شناسی، نشان داد که تعداد ۱۱ (۱۱ درصد) لاشه دارای کیستهای بزرگ بیضی شکل با دیواره ضخیم از گونه *S. fusiformis* بودند.

نتایج گسترش مهری و هضم بافتی

در گسترشهای مهری تهیه شده از ۱۰۰ لاشه گاومیش تحت مطالعه، ۱۶ لاشه (۱۶ درصد) به برادی‌زوئیت سارکوسیستیس آلوده بودند. نتایج گسترش مهری در گاومیش بر حسب سن و جنس در جدول ۳ آورده شده است.

در مطالعه میکروسکوپی نمونه‌های هضم بافتی تهیه شده از اندام‌های مختلف لاشه گاومیش تحت مطالعه، برادی‌زوئیت‌های انگل در ۲۳ لاشه (۲۳ درصد) در رسوب لوله حاوی بافت هضمی مشاهده گردید. نتایج هضم بافتی در گاو و گاومیش بر حسب سن و جنس در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- نتایج آلودگی لاشه گاومیش کشتار شده آلوده به سارکوسیستیس به روش‌های گسترش مهری و هضم بافتی

روش	تعداد لاشه آلوده (درصد)	سن (سال ، درصد)		جنس (درصد)	
		≥۳	<۳	نر	ماده
گسترش مهری	۱۶ (۱۶)	۱۰ (۱۸/۱)	۶ (۱۳/۳)	۱۳ (۲۶/۵)	۳ (۵/۸)
P*		P= ۰/۰۰۱		P=۰/۰۰۴	
هضم بافتی	۲۳ (۲۳)	۲۱ (۳۸/۱)	۲ (۴/۴)	۲۱ (۴۸/۲)	۲ (۳/۹)
P*		P=۰/۰۰۰		P=۰/۰۲۲	

* **P** =تست فیشر

در این مطالعه، بررسی داده های مربوط به جنس حیوانات بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در فراوانی آلودگی به ماکروکیست در جنس های مختلف دام بود ($p < 0.05$) (جدول ۳). همچنین، آلودگی به کیستهای میکروسکوپی در لاشه گاومیش سه سال و بیشتر از سه سال بیشتر دیده شد که نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در فراوانی آلودگی به انگل در سنین مختلف دام بود ($p < 0.05$) (جدول ۳).

آلودگی گاوهای مورد بررسی به سارکوسیستیس

فراوانی آلودگی به ماکروکیست

در این مطالعه، از ۱۰۰ لاشه گاو مورد بررسی در کشتارگاه صنعتی شهرستان ارومیه، آلودگی به ماکروکیست در لاشه های مورد بررسی دیده نشد.

نتایج گسترش مهری و هضم بافتی

در گسترش های مهری تهیه شده از ۱۰۰ لاشه گاوهای تحت مطالعه، ۲۷ لاشه (۲۷ درصد) به برادی‌زوئیت سارکوسیستیس آلوده بودند (جدول ۴).

در مطالعه میکروسکوپی نمونه‌های هضم بافتی تهیه شده از اندام‌های مختلف لاشه گاوهای تحت مطالعه، برادی‌زوئیت‌های انگل در ۳۷ لاشه (۳۷ درصد) در رسوب لوله حاوی بافت هضمی مشاهده گردید. نتایج هضم بافتی در گاوهای مورد بررسی بر حسب سن و جنس در جدول ۴ آورده شده است.

در این مطالعه، بررسی داده های مربوط به جنس حیوانات بیانگر وجود تفاوت معنی دار در فراوانی آلودگی به کیستهای میکروسکوپی در جنس های مختلف دام بود ($p < 0.05$) (جدول ۴). همچنین، آلودگی به کیستهای میکروسکوپی در لاشه گاوهای دو سال و بیشتر از دو سال بیشتر بود. اختلاف معنی داری بین فراوانی آلودگی در سنین مختلف دام‌ها بود ($p < 0.05$) (جدول ۴).

جدول۴- نتایج آلودگی لاشه گاوهای کشتار شده آلوده به سارکوسیستیس به روش‌های گسترش مهری و هضم بافتی

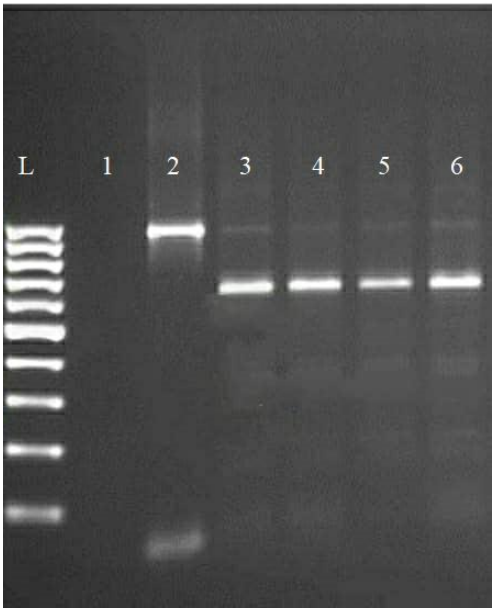
روش	تعداد لاشه آلوده (درصد)	سن (سال، درصد)		جنس (درصد)	
		≤۲	>۲	نر	ماده
گسترش مهری					
	(۲۷) ۲۷	(۳۷/۲) ۱۹	(۱۶/۳) ۸	(۳۷/۸) ۲۵	(۵/۸) ۲
P*		P=۰/۰۳۳		P=۰/۰۲۴	
هضم بافتی	(۳۷) ۳۷	(۵۰/۹) ۲۶	(۲۲/۴) ۱۱	(۵۴/۵) ۳۶	(۲/۹) ۱
P*		P=۰/۰۱۲		P=۰/۰۰۰	

* P =تست فیشر

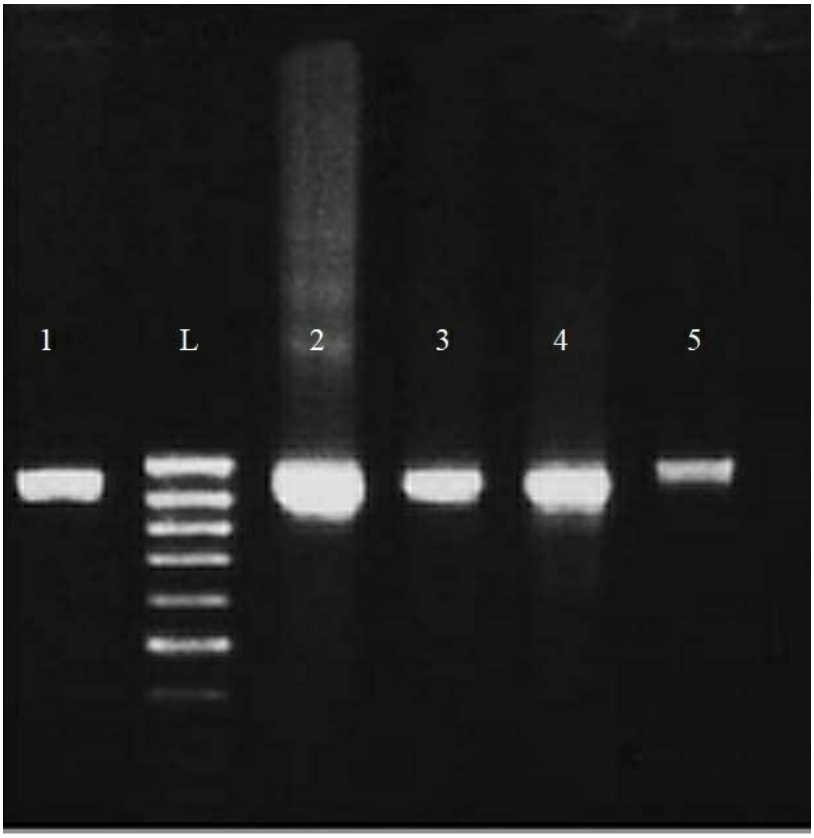
نتایج بررسی‌های مولکولی

نتایج بررسی مولکولی بر اساس دو ژن *18srRNA* و COX1 نشان داد که آلودگی به سارکوسیتیس در ۳۹ مورد (۳۹درصد) از ۱۰۰ لاشه گاو و ۲۶ مورد (۲۶درصد) از ۱۰۰ لاشه گاومیش مورد مطالعه وجود داشت. برای تایید نتایج PCR مثبت بدست آمده، ۴ نمونه PCR مثبت از گاو و ۴ نمونهPCR مثبت از گاومیش تعیین توالی شدند.

نتایج حاصل از ارزیابی تفاوت ژنتیکی بر اساس نشانگر سیتوکروم اکسیداز I حاکی از مشاهده باندهایی با اندازه ۱۱۰۰bpدر گاومیش (شکل ۱) و ۸۸۰bp در گاو (شکل ۲) بود.

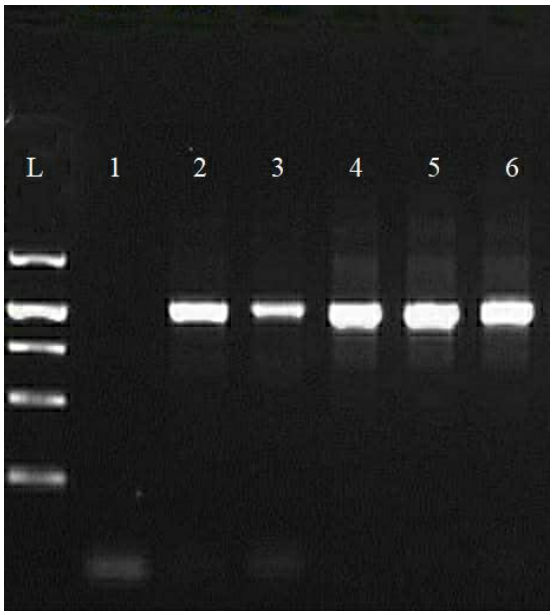


شکل ۱- ارزیابی تفاوت ژنتیکی براساس نشانگر ***COX1*** در گاومیش.**L :** مارکر صد جفت باز، ۱. کنترل منفی، ۲. کنترل مثبت، ۶-۳: نمونه مثبت **bp** ۱۱۰۰ در گاومیش

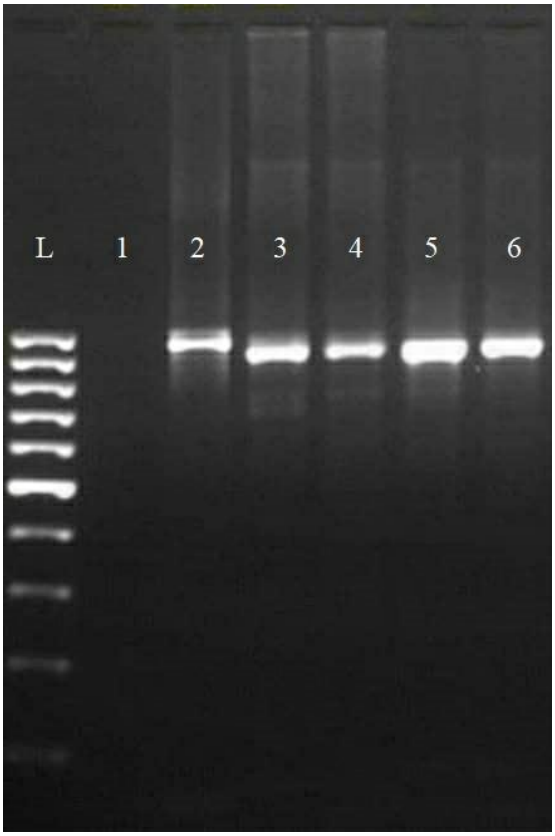


شکل ۲- ارزیابی تفاوت ژنتیکی براساس نشانگر ***COX1*** در گاو.**L :** مارکر صد جفت باز، ۴-۱: کنترل مثبت، ۵-۲: نمونه مثبت **۸۸۰bp** در گاو.

علاوه براین، بررسی تفاوت ژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری شده از دام‌ها و اماکن مختلف بر اساس ژن *18srRNA*، نیز حاکی از حضور باندهای bp ۹۰۰ در نمونه‌های بدست آمده از گاومیش (شکل ۳) و bp ۱۱۲۰ در نمونه‌های بدست آمده از گاو بود (شکل ۴).



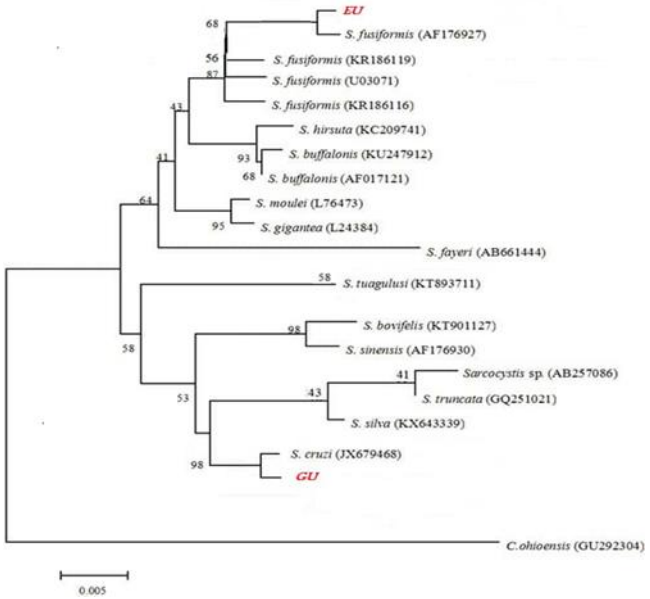
شکل ۳- بررسی نمونه‌های گاومیش بر اساس ژن ***18srRNA*** و ژل الکتروفورز بدست آمده.**L :** مارکر صد جفت باز ، ۱: کنترل منفی، ۲: کنترل مثبت، ۶-۳ نمونه بدست آمده از گاومیش(**bp** ۹۰۰)



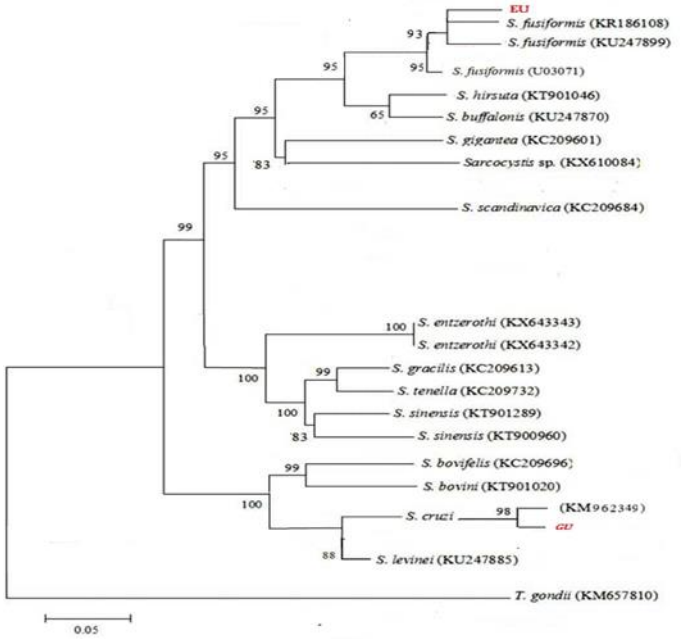
شکل ۴- بررسی نمونه‌های گاو بر اساس ژن ***18srRNA*** و ژل الکتروفورز بدست آمده. **L**: مارکر ۱۰۰ جفت باز، ۱: کنترل منفی، ۲: کنترل مثبت، ۶-۳: نمونه بدست آمده از گاو(**۱۱۲۰bp**)

نتایج آنالیز فیلوژنتیکی

درخت فیلوژنتیکی بر اساس ژن *18srRNA* و COX1 در نمونه های بافتی جدا شده از گاو و گاومیش های شهرستان ارومیه با استفاده از روش تجزیه(Maximum-likelihood (ML ایجاد شد. درخت فیلوژنیکی حاکی از ارتباط و تشابه ژنتیکی نزدیک نمونه‌ها با *S.fusiformis* و *S.cruzi* در ژن‌های *COX1* و *18srRNA* دارد (شکل ۵ و ۶).



شکل ۵– آنالیز فیلوژنیکی ژن ***18srRNA*** جدا شده از نمونه های شهرستان ارومیه با سایر سارکوسیستیس های موجود در بانک ژن. این آنالیز در برنامه **MEGA6** صورت گرفته و *سیستوایزوسپورا اوهیونسیس* به عنوان خارج گروه انتخاب شد.



شکل ۶– آنالیز فیلوژنیکی ژن **cox1** جدا شده از نمونه های شهرستان ارومیه با سایرسارکوسیستیس های موجود در بانک ژن. این آنالیز در برنامه **MEGA6**صورت گرفته و *توکسوپلاسما گوندی* به عنوان خارج گروه انتخاب شد.

بحث و نتیجه گیری

سارکوسیتوزیس یکی از بیماری‌های انگلی شایع در حیوانات اهلی به حساب می‌آید که می‌تواند منجر به بروز سقط جنین، کاهش وزن، کاهش تولید شیر، کم خونی و حتی مرگ در آلودگی‌های شدید شود (Dubey *et al*., 1989). در چرخه تکاملی

سارکوسیتیس، گوشتخواران به ویژه سگ و گربه از اهمیت بالایی در گسترش و انتقال آلودگی به میزبان‌های واسط علفخوار برخوردار هستند (Fayer *et al*., 2015). در گاو و گاومیش، آلودگی می‌تواند به صورت کاهش وزن، بی اشتهایی، تب، کمخونی، ضعف عضلانی، کاهش تولید شیر، سقط جنین و مرگ حیوان مشاهده شود (Herenda *et al*., 1994).

به منظور شناسایی آلودگی در نشخوارکنندگان، روش‌های مختلفی نظیر بازرسی لاشه در کشتارگاه، تهیه گسترش مهری، رنگ‌آمیزی نمونه‌های بافتی از حیوانات مشکوک، روش هضمی و نیز روش‌های مولکولی، الایزا و وسترن بلات ارائه شده است (Najafian *et al*., 2008). تا کنون آلودگی با *سارکوسیستیس کروزی، سارکوسیستیس هیرسوتا و سارکوسیستیس هومونیس* از گاو گزارش شده است. اولین گزارش آلودگی سارکوسیستیس در ایران در سال ۱۹۷۴ گزارش شد و پس از آن گزارش‌های متعددی در دام‌های علفخوار و به ویژه نشخوارکنندگان ارائه شده است (Farhang-Pajuh *et al*., 2014).

در این مطالعه میزان آلودگی ماکروسکوپی و میکروسکوپی گاو و گاومیش‌هاش کشتار شده در کشتارگاه ارومیه به گونه‌های سارکوسیستیس مورد بررسی قرار گرفت. میزان آلودگی بر اساس مشاهده ماکروسکوپی در گاومیش برابر با ۱۱٪ بود ولی آلودگی به صورت ماکروسکوپی در نمونه‌های بدست آمده از گاو تشخیص داده نشد. یکی از دلایل عدم مشاهده کیست ماکروسکوپی در نمونه‌های بدست آمده از گاو، شرایط نگهداری مناسب‌تر گله‌های گاو و تماس کمتر گله‌های گاو با گربه و نیز دفع کمتر انگل توسط گربه بود (Najafian *et al*., 2008). همسو با نتایج مطالعه حاضر، Najafian *et al*. (2008) در بررسی خود بر روی گاوهای کشتار شده در شهرستان شهریار و Shekarforosh & Ahmadi (2004) در مطالعه خود بر روی گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اصفهان، میزان آلودگی به کیست‌های ماکروسکوپی را صفر گزارش کردند. با این حال، مشاهده کیست‌های ماکروسکوپی در نمونه‌های بدست آمده از گاومیش، می‌تواند به شرایط نگهداری و دسترسی حیوان به میزبان‌های واسط و تفاوت گونه‌ای نسبت داده شود.

در گسترش های مهری تهیه شده از ۱۰۰ لاشه گاو و ۱۰۰ لاشه گاومیش تحت مطالعه، ۱۶ لاشه گاومیش (۱۶٪) و ۲۷ لاشه گاو (۲۷٪) به برادی‌زوئیت سارکوسیستیس آلوده بودند. در بررسی صورت گرفته در مالزی، میزان آلودگی در گاو و گاومیش به ترتیب برابر با ۳۶/۲٪ و ۶۶/۷٪ گزارش شد (Latif *et al*., 2013). همچنین میزان آلودگی میکروسکوپی در ۱۳۰ نمونه بدست آمده از گاو ۴۰٪ از نظر حضور کیست‌های سارکوسیستیس مثبت تشخیص داده شدند (Moré, 2014). در بررسی صورت گرفته بر روی ۴۸۰ گاو کشتار شده در کرمان، تمامی نمونه‌ها از نظر میکروسکوپی مثبت تشخیص داده شدند (NourollahiFard *et al*., 2009). میزان آلودگی در گاوهای کشتار شده در اصفهان، با استفاده از روش‌های میکروسکوپی برابر با ۹۴/۸٪ بود (Shekarforosh & Ahmadi, 2004). در بررسی صورت گرفته توسط Najafian *et al*. (2008) نیز میزان آلودگی با استفاده از روش گسترش تماسی و هضم بافتی به ترتیب برابر با ۹۲/۲٪ و ۹۹/۹٪ بود. در این مطالعه نیز بررسی نمونه‌های هضم بافتی تهیه شده از اندام‌های مختلف لاشه گاومیش و گاوهای تحت مطالعه، حاکی از میزان آلودگی برابر با ۲۳ لاشه گاومیش (۲۳٪) و در ۳۷ لاشه گاو (۳۷٪) بود. در حالت کلی می‌توان بیان کرد که روش‌های میکروسکوپی در جهت تشخیص و تایید بیماری، نسبت به روش‌های ماکروسکوپی ارجح‌تر هستند. نتایج این مطالعه حاکی از ارجح بودن روش‌های میکروسکوپی به ماکروسکوپی در جهت تشخیص آلودگی به سارکوسیستیس دارد.

نتایج حاصل از ارزیابی مولکولی، حاکی از تایید آلودگی به سارکوسیستیس در ۳۹مورد (۳۹درصد) از ۱۰۰لاشه گاو و در ۲۶ مورد (۲۶درصد) از ۱۰۰ لاشه گاومیش مورد مطالعه بر اساس نشانگر سیتوکروم اکسیداز I و نیز ژن*18srRNA* بود. همچنین بررسی‌های مولکولی صورت گرفته در این مطالعه حاکی از شناسایی گونه‌های *سارکوسیستیس فوزی‌فورمیس* و *سارکوسیستیس کروزی* در گاوها و گاومیش‌های کشتار شده در کشتارگاه شهرستان ارومیه بود. در مطالعه‌ای که بر روی شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس در گاو و گاومیش های استان خوزستان با استفاده از روش *PCR-RFLP* انجام شد، از ۱۲۴ گاو و ۱۴۷ گاومیش با استفاده از روش *PCR-RFLP* و توالی های ژن *18srRNA* گونه های سارکوسیست گاو *سارکوسیستیس هیرسوتا، سارکوسیستیس کروزی و سارکوسیستیس هومینیس* و گونه‌های سارکوسیست گاومیش شامل *سارکوسیستیس لوینی،*

سارکوسیستیس فوزی‌فورمیس، *سارکوسیستیس سینسین*، *سارکوسیستیس بوفالوئنسیس* و *سارکوسیستیس دوبئی* شناسایی شد (Hamidinejat *et al*., 2015). همچنین، Kalantari *et al*. (2016) نیز در بررسی خود بر روی ۳۰ نمونه با استفاده از توالی ژن *18srRNA* ، ۲۰ نمونه (۶۶/۷ ٪) به *سارکوسیستیس جیجانتئا* و ۶ نمونه (۲۰٪) *سارکوسیستیس مولئوی* و ۴ نمونه (۱۳/۲درصد) به سایر گونه های سارکوسیست آلوده بودند. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳، با هدف تعیین فراوانی و تفاوت مولکولی گونه‌های *سارکوسیستیس جیجانتئا* و *سارکوسیستیس مودزی فورمیس* در گوسفندان ارومیه انجام شد، مشخص شد که از ۶۳۸ گوسفند ذبح شده پس از استخراج DNA و توالی ژن *18srRNA* شیوع گونه های سارکوسیستیس ۲۳۵ مورد (۳۶/۸۳ درصد) بود که در نرها ۷/۶۳ درصد و در ماده ها ۳۵درصد و در گوسفندان بیش از ۴ سال سن دیده شد. بین شیوع ماکروکیستهای سارکوسیستیس و جنس تفاوت معنی داری مشاهده نشد. دو فرم ماکروکیست درشت ۲۷/۹۰ درصد (۶۳۸/۱۷۸) و ماکروکیست باریک۸/۹۳ درصد (۶۳۸/۵۳) در عضلات اسکلتی مشاهده شدند. آلودگی توأم لاشه به ماکروکیست های درشت و باریک در ۱۱/۱۳ درصد (۶۳۸/۷۱) گوسفندان آلوده یافت شد. بین فراوانی ماکروکیست ها با توزیع بدنی ارتباط معنی دار بود. توالی های PCR-RFLP نشان دادند که ماکروکیست های درشت مربوط به *سارکوسیستیس جیجانتئا* (۲۹/۳۱ درصد، ۶۳۸/۱۸۷) و ماکروکیستهای باریک مربوط به *سارکوسیستیس مودزی فورمیس* (۷/۵۲ درصد، ۶۳۸/۴۸) بودند (Farhang-Pajuh *et al*., 2014).

نتیجه گیری

با توجه به شیوع نسبتاً بالای گونه‌های سارکوسیست در گاوها و گاومیش‌های کشتار شده در ارومیه، به نظر می‌رسد که نیاز به بازنگری در برنامه‌های کنترل و پیشگیری باید در نظر گرفته شود. همچنین بایستی آموزش‌های لازم در جهت رعایت نکات و ملاحظات بهداشتی در کشتارگاه‌ها و ارایه برنامه های کنترل و پیشگیری در جهت ممانعت از دسترس قرار گرفتن احشا الوده در بین سگ ها و گربه های منطقه و نیز پخت کامل گوشت در زمان تهیه غذا در دستور کار قرار گیرد.

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی امکان انجام مطالعه را فراهم نمودند.

REFERENCES

Dubey, J. P., Speer, C. & Fayer. R. (1989). *Sarcocystosis of Animals and Man*. CRC Press, Inc.Boca Raton, 105–145.

Dubey, J. P. & Lindsay, D. S. (2006) Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice*. 22, 645-671.

Dubey, J. (2015). Foodborne and Waterborne Zoonotic Sarcocystosis. *Journal of Food and Waterborne Parasitology*. 1, 2-11.

Daptardar, M., Singh, B. B., Aulakh, R. S. & Gill, J. P. (2016). Prevalence and first molecular identification of Sarcocystis species in cattle and water buffaloes in India. *Journal of Acta parasitological*, 61(3), 523-528.

Farhang-Pajuh, F., Yakhchali, M. & Mardani, K. (2014). Molecular determination of abundance of infection with Sarcocystis species in slaughtered sheep of Urmia, Iran. *Veterinary Research Forum*, 5(3), 181-186.

Fayer, R. (2004). *Sarcocystis* Spp. In Human Infections. *Journal of Clinical microbiology reviews*, 17, 894-902.

Fayer, R., Esposito, D. H. & Dubey, J. P. (2015). Human Infections with Sarcocystis Species. *Journal of Clinical Microbiology Reviews*, 28, 295-311.

Gjerde, B. (2016). Molecular characterisation of Sarcocystisbovifelis, Sarcocystisbovini n. sp., *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis cruzi* from cattle (Bos taurus) and *Sarcocystis sinensis* from water buffaloes (Bubalus bubalis). *Journal of Parasitology research*, 115(4), 1473-1492.

Hamidinejat, H., Jalali, M. H. R., Gharibi, D. & Molayan, P. H. (2015). Detection of *Sarcocystis* spp. in cattle *(Bos taurus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Iran by PCR–RFLP. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(4), 658-662.

Herenda, D. C., P. Chambers & Ettriqui, A. (1994). *Manual on Meat Inspection for Developing Countries*. Food & Agriculture Org.

Hoeve-Bakker, B., van der Giessen, J. & Franssen, F. (2019). Molecular identification targeting *cox1* and 18S genes confirms the high prevalence of *Sarcocystis* spp. in cattle in the Netherlands. *International journal for parasitology*, 49(11), 859-866.

Kalantari, N., Khaksar, M., Ghaffari, S. & Hamidekish, S. M. (2016). Molecular analysis of *Sarcocystis* spp. isolated from sheep (Ovis aries) in Babol area, Mazandaran province, Northern Iran. *Iranian journal of parasitology*, 11(1),73.

Latif, B., S. Vellayan, C. Heo, M. Kannan Kutty, E. Omar, Abdullah S. & Tappe, D. (2013). High Prevalence of Muscular Sarcocystosis in Cattle and Water Buffaloes from Selangor, Malaysia. *Journal of Tropical biomedicine*, 30, 699-705.

Mirzaei, M. & Rezaei, H. (2016). A survey on Sarcocystis spp. infection in cattle of Tabriz city, Iran. *Journal of parasitic diseases: Journal of official organ of the Indian Society for Parasitology* ,40(3), 648-651. (In Persian)

Moré, G., P. Abrahamovich, S. Jurado, D. Bacigalupe, J. Marin, M. Rambeaud, Venturini, L. & Venturini, M. (2011). Prevalence of *Sarcocystis* Spp. In Argentinean Cattle. *Journal of Veterinary parasitology*, 177, 162-165.

Moré, G., Schares, S., Maksimov, A., Conraths, F. J., Venturini, M. C. & Schares, G. (2013). Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. *Journal of Veterinary parasitology*, 197(1-2), 85-94.

Moré, G., A. Pantchev, J. Skuballa, M. Langenmayer, P. Maksimov, F. Conraths, Venturini M. C. & Schares, G. (2014). *Sarcocystis Sinensis* Is the Most Prevalent Thick-Walled Sarcocystis Species in Beef on Sale for Consumers in Germany. *Journal of Parasitology Research*, 113, 2223-2230.

Najafiyan, H.R., Mohebali, M. & Keshavarz, H. (2008). Study on frequency of sarcocystis spp. by macroscopic and microscopic methods in slaughtered cattle in Shahriar district and their public health importance. *Journal of Pajouhesh & Sazandegi*, 21(1), 15-19.

NourollahiFard, S. R., M. Asghari & Nouri, F. (2009). Survey of Sarcocystis infection in slaughtered cattle in Kerman, Iran. *Journal of Tropical animal health and production*, 41(8),1633-1636. (In Persian)

Razmi, Gh. & Rahbari, S. (2000). Review of Sarcocystis of domestic ruminants in Tehran and Golestan provinces. *Scientific Journal of the School of Veterinary Medicine*, 3(4), 39-46.

Sarafraz, N., Spotin, A., Haniloo, A. & Fazaeli, A. (2020). Prevalence and molecular analysis of Sarcocystis infections in cattle in Northwest Iran and the first global report of *S. gigantea* in cattle. Comparative immunology, *Journal of microbiology and infectious diseases*, 73,101-566. (In Persian)

Shariat Panah, K. (2003). *Evaluation of contamination Sarcocysits slaughterhouse in domestic ruminants and tinsel Urmia and its economic importance*. Doctor Veterinary Medicine thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Urmia branch.

Shekarforosh, S. & Ahmadi, B. (2004). Sarcocytosis Infection in Slaughtered Cattle in Isfahan and Health Care. *IBM Journal of Research and Development*, 64, 102-4. (In Persian)

Tappe, D., S. Abdullah, C. Heo, Kannan Kutty, M. & Latif, B. (2013). Review Paper Human and Animal Invasive Muscular Sarcocystosis in Malaysia–Recent Cases, Review and Hypotheses. *Journal of Tropical biomedicine*, 30, 355-366.

Tenter, A. M., Zimmerman, G. L. & Johnson, A. M. (1991). Separation of Antigens from Sarcocystis Species Using Chromatofocusing. *The Journal of parasitology*, 727-736.