مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۱، ۴۶-۴۳

شناسایی گونه سارکوسیستیس ژیگانتیه‌آ با روش PCR-RFLP

عبدالحسین دلیمی اصل* فاطمه جالوسیان فرید تحویلدار بیدرونی فاطمه غفاری فر

گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ مهرماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۱۳ مهرماه ۱۳۸۸)

چکیده

انگل سارکوسیست، یکی از مهمترین تک یاخته های متعلق به شاخه اپی کمپلسا (Apicomplexa) می باشد که در بین حیوانات خون‌گرم در کلیه نقاط جهان شایع است. در مطالعه حاضر با استفاده از تکثیر قطعه ژن 18S rRNA و برش آنزیمی، گونه سارکوسیستیس ژیگانتیه‌آ مورد شناسایی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا کیست‌های ماکروسکوپی سارکوسیستیس از عضلات مری و عضلات بین دنده‌ای گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه شهریار جمع‌آوری شدند. سپس DNA انگل با روش فنل - کلروفرم استخراج شد و قطعه ژن 18S rRNA با استفاده از پرایمر طراحی شده به روش PCR تکثیر شد. در نهایت این قطعه با آنزیم‌های MspI و MboI برش داده شد. با توجه به مشخصات باندهای برش شده با آنزیم، تمامی نمونه‌ها سارکوسیستیس ژیگانتیه‌آ تعیین شدند. این اولین گزارش تشخیص مولکولی سارکوسیستیس ژیگانتیه‌آ در ایران است.

واژه‌های کلیدی: سارکوسیستیس ژیگانتیا، گوسفند، PCR-RFLP.، ایران.

مقدمه

سارکوسیستیس یکی از شایع ترین انگل های آلوده کننده دام‌ها در سرتاسر جهان است (۴) شیوع آن در دام‌هایی مانند گاو، گوسفند و بز در برخی نقاط ایران تا ۱۰۰درصد گزارش شده است (۱). گوسفند میزبان واسط چهارگونه سارکوسیستس است: سارکوسیستیس تنلا (مترادف سارکوسیستیس اوی کنیس)، سارکوسیستیس ژیگانته آ (مترادف سارکوسیستیس اوی فلیس) و سارکوسیستیس آریتی کنیس که همگی انتشار جهانی دارند و همچنین آلودگی با سارکوسیستیس مدوزی فورمیس که تنها از استرالیا و نیوزیلند و ایران گزارش شده است (۲،۱۱). سارکوسیستیس ژیگانته آو سارکوسیستیس مدوزی فورمیس توسط گربه سانان انتقال می یابند و بیماریزا نیستند. ولی سارکوسیستیس تنلاو سارکوسیستیس آریتی کنیس که توسط سگ سانان منتقل می‌شوند بیماریزا هستند (۴،۱۶).

سارکوسیستیس در بدن میزبان واسط بصورت کیست‌های عضلانی ظاهر می‌شود. اندازه و شکل کیست در ارتباط با گونه انگل متفاوت است. برخی از کیست‌ها میکروسکوپی و برخی دیگر ماکروسکوپی و به اشکال رشته‌ای یا شبیه دانه برنج یا کروی می‌باشند. سابقاً گونه‌های سارکوسیست را براساس خصوصیات مرفولوژی کیست‌ها (تصویر، اندازه و ضخامت دیواره) و میزبان واسط اختصاصی طبقه بندی می‌کردند. در سال ۱۹۷۲ طبقه بندی جدیدی براساس اختصاصی بودن میزبان نهایی انگل ارائه گردید (۳) ولی بعدها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ثابت شد که موضوع اختصاصی بودن برخی از گونه‌ها با میزبانان خاص فاقد جامعیت لازم است (۳)

دراواخر دهه ۱۹۸۰ از روش ایزوآنزیم برای آزمایش ارتباط ژنتیکی تعدادی از گونه‌های بیماری زا یا غیر بیماریزا سارکوسیستیس گوسفند و بز، گاو و موش استفاده شد. در سال ۱۹۸۶ Donghue & Ford "O ارتباط ویژگی‌های بیوشیمیایی و ریخت شناسی را برای تشخیص گونه‌های سارکوسیستیس مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری کردند که الگوی ایزوآنزیمی روش مناسب و قوی برای تشخیص گونه‌های مختلف سارکوسیستیس است و دریافتند که این روش می‌تواند تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه را بطور غیر مستقیم نشان دهد زیرا که تفاوت الگوی الکتروفورز ایزو آنزیم‌ها ناشی از تفاوت در ترادف بازهاست و باعث تفاوت در ترادف اسیدهای آمینه و نهایتا در پروتئین‌ها می‌شود این تفاوت باعث تغییر در شارژ ملکول‌ها شده و در نتیجه در حرکت الکتروفورزی تغییر نشان می‌دهد و بدین ترتیب تغییرات گونه‌ها مشاهده می‌شود (۱۰).

برخلاف روش ایزو آنزیمی، امروزه با استفاده از روش‌های ملکولی می‌توان مستقیماً تفاوت‌های ژنتیکی را شناخت و براساس این تفاوت، گونه‌ها را از یکدیگر متمایز نمود. مطالعات برخی از محققان در نقاط مختلف جهان نشان داد که مقایسه ترادف ژن small subunit (ssu) rRNA که بخشی از ژن 18S rRNA است برای بررسی رابطه فیلوژنتیک گونه‌های سارکوسیستیس با یکدیگر و با سایر کوکسیدیاهای کیست زا مانند توکسوپلاسما گوندی و نئوسپورا کنینوم بسیار نتیجه بخش است. در این رابطه می‌توان به مطالعات Tenter و همکاران در سال ۱۹۹۲، Holmdahl و همکاران در سال ۱۹۹۳، Tenter و همکاران در سال ۱۹۹۴، Tenter در سال ۱۹۹۵، Jeffries و همکاران در سال ۱۹۹۶، Joachim و همکاران در سال ۱۹۹۶، ماگریج و همکاران در سال ۱۹۹۹ و Heckeroth و Tenter در سال ۱۹۹۹ و Yang و همکاران در سال ۲۰۰۲ اشاره کرد (۵،۸،۹،۱۳،۱۵،۱۷).

در ایران علیرغم شیوع سارکوسیستیس در دام‌های مختلف، تاکنون گزارشی در مورد شناسایی گونه‌های انگل با روش مولکولی ارائه نشده است. در مطالعه حاضر با استفاده از تکثیر قطعه ژن 18S rRNA و برش آنزیمی، گونه سارکوسیستیس ژیگانتیه آ گوسفندان مورد شناسایی قرار گرفت.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۳۱۱۹۷۰۸-۰۲۱، نمابر: ۸۸۰۱۳۰۳۰-۰۲۱

Email: dalimi_a@modares.ac.ir

مواد و روش کار

جداکردن و آماده سازی کیست‌ها: با مراجعه به یکی از کشتارگاه‌های شهرستان شهریار کرج عضلات بین دنده‌ای و مری آلوده به سارکوسیستیس از لاشه گوسفندان کشتارگاه جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. سارکوسیست‌ها که با چشم براحتی مشاهده می‌شدند با اسکالپر بدقت از عضله خارج شده و در ظروف جداگانه جمع آوری شدند سپس سارکوسیست‌ها ابتدا یکبار با نرمال سالین استریل و دو بار با بافر TE (10mMTris-HCL, 1mMEDTA) (pH 8) شستشوداده شدند. مجموعا تعداد یکصد کیست بزرگ از بیست راس گوسفند مورد مطالعه قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی: برای استخراج DNA، ابتدا انگل را سه بار با روش ذوب و انجماد سریع له کرده، پس از سانتروفیوژ کردن آن، رسوب حاصل را به بافر لیز (15 mM sodium citrate, 0.2% sodium dodecyl sulfate, 450mMNaCl) حاوی پروتئیناز K مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. سپس با استفاده از روش فنل کلروفرم DNA انگل استخراج و در اتانل رسوب داده شد و در بافر TE نگهداری شد (۱۲).

طراحی و انتقال پرایمرهای :PCR: توالی نوکلئوتیدی کامل ژن rRNA 18S سارکوسیستیس تنلا (Accession no. L24383) و سارکوسیستیس آریتی کنیس (Accession no. L24382) و سارکوسیستیس ژیگاتنیه آ (Accession no. L24384) از انتخاب شد. سپس با استفاده از این توالی‌های نوکلئوتیدی، به کمک نرم افزار Gene Runner یک جفت پرایمر طراحی شد. طول بهینه بازها در پرایمرها حدود ۲۱ باز می‌باشد و دمای ذوب مطلوب ۶۰-۵۸ درجه سانتیگراد و نسبت GC تقریبا ۶۰ درصد بوده است.

توالی پرایمرها:

Sarco F 5´- GCT TTCGAC GGT AGTGTA TTG-3´

Sarco R 5´-TCA AGA AAG AGCTAT CAAT CTG-3´

شرایط PCR:

۱- یک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۵ دقیقه

۲- ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه

۳- ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه

۴- نگهداری در ۴ درجه سانتیگراد

بهینه سازی پارامترهای PCR - برای تهیه محلول واکنش (PCR Mixed) بروش زیر عمل شد- در ۳۰ میکرولیتر محلول واکنش: بافر X ۱۰ (Tris-HCl, 50 mM potassium chloride, 0.1% Triton X-100 10mM)، 1.75mM کلرید منیزیم و 0.1 mM برای هریک از بازهای dNTP و 100pmol از هر پرایمر و ۱۰ میکرولیتر از DNA و ۱/۵ واحد آنزیم تک پلی مراز استفاده شد.

پس از پایان تکثیر، ۵ میکرولیتر از محصول PCR بروی ژل آگارز ۰/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. باندهای حاصل به وسیله ترانس لامیناتور قرائت، عکس برداری و مورد بررسی قرار گرفتند.

افزودن آنزیم‌های برش دهنده برای :RFLP: طبق بروشور شرکت سازنده آنزیم، مقادیر ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR و ۲ میکرولیتر از بافر X ۱۰ آنزیم و مقادیر ۵ الی ۱۰ واحد آنزیم‌های MboI و MspI و مانده آب مقطر استریل اضافه شد تا حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس به مدت ۴، ۱۰ و ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

الکتروفورز نمونه‌های RFLP شده برروی ژل آگاروز: ابتدا ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید تهیه شد. محصول PCR نمونه‌ها، بدون آنزیم و پس از افزودن آنزیم در چاهک‌ها کنار هم در سمت کاتد لود شدند و به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت در دمای اتاق الکتروفورز شدند. سپس از باندها عکس برداری شد و باندها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

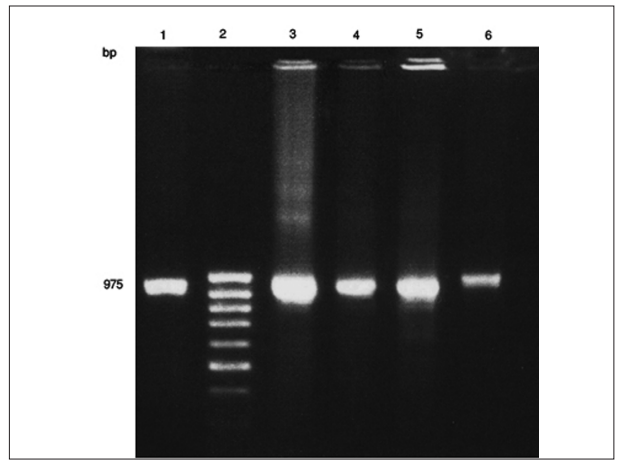
طبق نتایج بدست آمده همه یکصد نمونه مورد آزمایش دارای باند مشابه بوده‌اند. تصویر ۱، نتایج الکتروفورز محصول PCR قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA سارکوسیستیس را نشان می دهد. اندازه همه باندها ۹۷۵ جفت بازی است.

در گونه ژیگانته آ، آنزیم MboI جایگاه ۷۱۵ و آنزیم MspI جایگاه ۶۶ قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA سارکوسیستیس را برش میزنند پس انتظار می‌رود در مورد اول باندهای ۲۵۹ و ۷۱۵ جفت بازی و در مورد دوم باندهای ۶۶ و ۹۰۸ جفت باز مشاهد شود.

با توجه به تصویر (۲) و پس از برش با آنزیم MboI باندهایی واضح در نواحی ۲۵۹ و ۷۱۵ جفت بازی و پس از برش با آنزیم MspI یک باند واضح در ناحیه ۹۰۸ جفت بازی مشاهده شد که این حالت مطابق با الگوی سارکوسیستیس ژیگانته آ است. همه نمونه‌ها الگوی واحدی را نشان دادند.

بحث

امروزه برای تشخیص گونه‌های سارکوسیستیس از روش‌های مولکولی استفاده می‌شود از این روش حتی برای تشخیص آلودگی در دام زنده هم می‌توان استفاده کرد (۵). هدف از مطالعه حاضر معرفی یک روش حساس و اختصاصی برای شناسایی گونه‌های سارکوسیستیس مربوط به کیست‌های بزرگ در گوسفندان از طریق تکثیر ژن ssu rRNA انگل مورد مطالعه بوده است. این ژن برای تشخیص گونه‌های مختلف انگل کاملا اختصاصی است (۱۴). بر همین اساس آزمایش PCR مبتنی بر تکثیر این ژن از کارآمدی خوبی برای تشخیص گونه‌های انگل برخوردار است. و چون اختلاف کمی بین گونه‌های مختلف انگل وجود دارد (۱۳) لذا با انتخاب آنزیم مناسب و انجام RFLP می‌توان گونه‌های مختلف انگل را شناسایی کرد. محققین متعددی از این شیوه برای شناسایی گونه‌ها استفاده کرده‌اند (۱۳-۱۵ و ۵- ۸،



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن 18S rRNA که در آن قطعه ۹۷۵ جفت بازی تکثیر شده است. باندهای ۵،۴،۳،۱۶مربوط به نمونه و باند ۲ مارکر است.

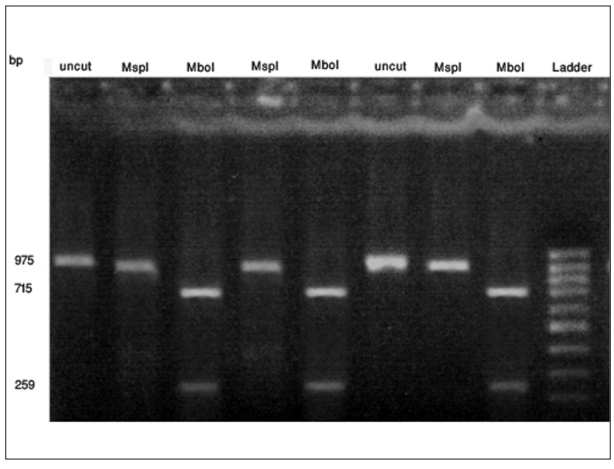
۹ و ۱۷). علاوه بر این محققین با مقایسه ترادف ssu rRNA نشان دادند که گونه‌های جنس سارکوسیستیس و توکسوپلاسما اصل مشترکی دارند (۱۶). همچنین براساس مطالعه ssu rRNA انگل، برای گونه‌های سارکوسیستیس بیماریزا و غیربیماریزا طبقه بندی درختی ترسیم گردیده است بدین ترتیب که گونه‌های سارکوسیستیس بیماریزای منتقله از سگ سانان به عنوان یک گروه مجزا و متفاوت از گونه‌های سارکوسیستیس غیر بیماریزای منتقله از گربه سانان معرفی شده‌اند (۱۴).

از آن جایی که این مطالعات همگی براساس مطالعه ssu rRNA بود به همین دلیل در این مطالعه نیز قطعه ژن 18S rRNA برای تعیین گونه‌های سارکوسیستیس گوسفندی انتخاب شد. طول این قطعه در گونه‌های تنلا، ژیگانتهآ و آریتی کنیس به ترتیب ۹۷۵،۹۳۳ و ۹۶۶ جفت باز است. آنزیم‌ها پس از برش قطعه، برای هر گونه، الگوی الکتروفورزی و یا باندهایی با اندازه متفاوت ایجاد می‌کنند.

آنزیم MboI در گونه تنلا جایگاه‌های ۴۷۰ و ۶۷۴ قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA را برش میزند و باندهای ۲۰۴، ۲۵۹ و ۴۷۰ جفت بازی را بوجود می‌آورد. این آنزیم در گونه ژیگانتهآ جایگاه ۷۱۵ و در گونه آریتی کنیس جایگاه‌های ۴۳۴ و ۷۰۸ را برش میزند و در حالت اول باندهای ۲۵۹ و ۷۱۵ جفت بازی و در حالت دوم باندهای ۲۵۸، ۲۷۴ و ۴۳۴ جفت بازی را تولید می‌کند.

آنزیم MspI در گونه تنلا جایگاه‌های ۶۶ و ۳۹۴ قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA را برش میزند و باندهای ۶۶، ۳۲۸ و ۵۳۹ جفت بازی را بوجود می‌آورد. این آنزیم در گونه ژیگانته آ جایگاه ۶۶ و در گونه آریتی کنیس جایگاه‌های ۶۶ و ۸۷۶ را برش میزند و در مورد اول باندهای ۶۶ و ۹۰۸ جفت بازی و در مورد دوم باندهای ۶۶، ۹۰ و ۸۱۰ جفت بازی را ایجاد می‌کند.

گرچه آنزیم MspI قطعه ژن تکثیرشده 18S rRNA گونه ژیگانته آ را بدو قطعه ۶۶ و ۹۰۸ جفت بازی تقسیم می‌کند ولی چون باند ۶۶ در ناحیه‌ای قرار می‌گیرد که پرایمر دایمرها باند می‌دهند لذا بروی ژل تنها باند ۹۰۸ جفت بازی مشاهده می‌شود که وجه تشخیص این گونه است. الگوی آنزیمی همه



تصویر ۲- الکتروفورز محصول ژن 18S rRNA که در آن قطعه ۹۷۵ جفت بازی با آنزیم‌های MspI و MboI برش داده شده است. (از چپ به راست) ردیف‌های ۱ و ۶ (uncut) محصول قبل از برش، ردیف‌های ۲، ۴ و ۷ ـ برش قطعه با MspI، ردیف‌های ۳، ۵ و ۸ برش قطعه با MboI و ردیف ۹ مارکر را نشان می‌دهد.

کیست‌های مطالعه شده در این تحقیق (به جز سه مورد) گواه بر گونه ژیگانته آ است. این اولین گزارش تشخیص مولکولی سارکوسیستیس ژیگانته آ در ایران است.

سارکوسیستیس ژیگانته آ یا سارکوسیستیس اووی فلیس علاوه بر ایران دارای انتشار جهانی است. میزبان قطعی آن گربه اهلی گزارش شده است. کیست‌های سارکوسیستیس ژیگانته آ در عضلات مری، حنجره، زبان و تا حد کمتری در دیافراگم و سایر عضلات گوسفندان یافت می‌شوند. سارکوسیست‌ها در عضلات قلب و سیستم اعصاب مرکزی وجود ندارند. معمولا کیست‌های ماکروسکپی درگوسفندان مسن دیده می‌شود. این کیستها تا یک سانتیمتر طول داشته به رنگ سفید کدر با شکل کروی بیضوی یا گلابی شکل بوده و گاهی به دانه‌های برنج شباهت دارند. سارکوسیستیس ژیگانته آ بیماریزایی خفیفی برای گوسفند دارد (۴). ولی از لحاظ بازرسی گوشت دارای اهمیت فراوانی است و در آلودگی شدید ممکن است به ضبط لاشه منتهی شود. اکثر گزارش‌های کشتارگاهی آلودگی سارکوسیستیس دامی احتمالاً مربوط به این انگل است زیرا که فقط این گونه و گونه مدوزی فورمیس در گوسفدان کیست‌های بزرگ ایجاد می‌کنند و کیست‌های آن‌ها قابل روئیت هستند. سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی کنیس به‌عنوان دو گونه بیماریزا و خطرناک، در عضلات گوسفندان کیست‌های کوچک و میکروسکوپی تولید می‌کنند. این کیست‌ها با چشم غیرمسلح قابل روئیت نیستند.

به‌طورکلی با توجه به سرعت و دقت نتایج PCR-RFLP، پیشنهاد می‌شود محققین با استفاده از پرایمرها و روش بکار گرفته شده در این مطالعه، نسبت به شناسایی سایر گونه‌های سارکوسیستیس دامی در سراسر کشور اقدام نمایند.

References

1. Arshad, M., Dalimi, A., Ghaffarifar F. (2007) Comparative study on Sarcocystis diagnosis in meat of slaughtered sheep in Tabriz. Pajouhesh va Sazandagi 75:68-72.
2. Collins, G.H., Atkinson, E., Charleston, W.A.G. (1979) Studies on Sarcocystis species III: the macrocystic species of sheep. New Zealand Vet. J. 27:204- 6.
3. 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 43:47-9.
4. Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (1989) Sarcocystosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press. Florida, USA. pp. 166-170.
5. Heckeroth, A. R., Tenter, A. M. (1999) Development and validation of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystiosis in sheep. Int. J. Parasitol. 29:1331-1349.
6. Holmdahl, O. J. M., Mattsson, J. G., Uggla, A. Johansson, K. E. (1993) Oligonucleotide probes complementary to variable regions of 18S rRNA from Sarcocystis species. Mol. Cell. Probes. 7:481-486.
7. Jeffries, A. C., Amaro, N., Tenter, A. M., Johnson, A.M. (1996) Genetic diversity in Sarcocystis gigantea assessed by RFLP analysis of the ITS1 region. Appl. Parasitol. 37:275-283.
8. Joachim, A., Tenter, A. M., Jeffries, A. C., Johnson, A. M. (1996) A RAPD-PCR derived marker can differentiate between pathogenic and non-pathogenic Sarcocystis species of sheep. Mol. Cell. Probes. 10:165-172.
9. Mugridge, N. B., Morrison, D. A., Johnson, A. M., Luton, K., Dubey, J. P., Votypka, J., Tenter, A. M. (1999) Phylogenetic relationships of the genus Frenkelia: a review of its history and new knowledge gained from comparison of large subunit ribosomal ribonucleic acid gene sequences. Int. J. Parasitol. 29:957-972.
10. Munday, B. L., Barker, I. K., Rickard, M. D. (1975) The developmental cycle of a species of Sarcocystis occuring in dogs and sheep, with observations on the pathogenicity in the intermediate host. Z. Parasitenkd. 46:111-23.
11. O'Donoghue, P. J., Ford, G. E. (1986) The prevalence and intensity of Sarcocystis spp. infections in sheep. Aust. Vet. J. 63:273-8.
12. Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. (3rded.) Cold Spring Harbor, New York, USA.
13. Tenter, A. M., Luton, K., Johnson, A. M. (1994) Species-specific identification of Sarcocystis and Toxoplasma by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. Appl. Parasitol. 35:173-88.
14. Tenter, A. M. (1995) Current research on Sarcocystis species of domestic animals. Int. J. Parasitol. 25:1311-30.
15. Tenter, A. M., Johnson, A. M. (1997) Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. Adv. Parasitol. 39:69-139.
16. Uggla, A., Buxton, D. (1990) Immune responses against Toxoplasma and Sarcocystis infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 9:441-62.
17. Yang, Z., Li, Q., Zuo, Y., Chen, X., Chen, Y., Nie, L., Wei, C., Zen, J. S., Attwood, S. W., Zhang, X. Z., Zhang, Y. P. (2002) Characterization of Sarcocystis species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. Exp. Parasitol. 102:212-217.

J. Vet. Res. 65, 1:43-46, 2010

IDENTIFICATION OF *SARCOCYSTIS GIGANTEA* BY PCR- RFLP

Dalimi, A.*, Jalosian, F., Tahvildar Biderouni, F., Ghaffarifar, F.

Department of Parasitology, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran.

(Received 5 October 2007 , Accepted 5 October 2008)

Abstract:

Sarcocyst is one of the most important protozoa belonged to apicomplexa. This parasite is prevalent among warm blooded animals throughout the world. In the present work, *Sarcocystis gigantea* was identified by amplification of 18S rRNA gene using PCR- RFLP. In this regard macroscopic cysts of sarcocystis were collected from esophagus and intra costal muscles of sheep in Shahriar slaughterhouse. Then genomic DNA of the parasites was extracted from specimens using phenol-chloroform method. 18S rRNA gene was amplified with specific primers. For RFLP two restricted enzymes of MspI and MobI were used and the patterns were analyzed accordingly. According to the resulted band, all the specimens were identified as *Sarcocystis gigantea*. This is the first report of molecular identification of *Sacrocystis gigantea* in Iran.

Key words: *Sarcocystis gigantea*, sheep, PCR-RFLP, Iran.

***Corresponding author's email: dalimi_a@modares.ac.ir, Tel: 021-33119708, Fax: 021-88013030**