پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره نوزدهم شماره ۷۱ مرداد و شهریور سال ۱۳۸۸ (۶۹-۶۰)

# تنوع ژنتیکی اکینوکوکوس گرانولوزوس جدا شده از کیست‌های هیداتید ایزوله بوفالو از شمال هند، گوسفند، گاو وشتر از شمال ایران

شیرزاد غلامی[1] مالک ارشاد الله[2] اسدالله خان[3]

## چکیده

**سابقه و هدف :** تنوع ژنتیکی گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس از لحاظ اپیدمیولوژی و کنترل بیماری در مناطق بومی دارای اهمیت است. بنابراین جهت تعیین استرین‌ها یا ژنوتیپ‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس، پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید کبدی و ریوی بوفالو از شمال هند و کیست‌های کبدی گوسفند، گاو وشتر از شمال ایران، با روش مولکولی مورد مطالعه و مقایسه قرارگرفتند.

**مواد و روش ها :** دراین مطالعه پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید بارور از کبد وریه‌های ایزوله‌های حیوانی بوفا لو از کشتارگاه شهر علیگر در شمال هند وکیست‌های کبد ایزوله‌های گوسفند، گاو وشتر از کشتارگاه شهر ساری و گرگان از شمال ایران جمع‌آوری شد. خصوصیات ملکولی rDNA -ITS1 انگل با روش PCR-FRLP بعد از استخراج و تکثیرDNA و هضم آنزیمی با ۵ آنزیم محدود الاثر تجزیه کننده‌اندو نوکلئازی (Alu1, Msp1, EcoR1,Hha1 and Taq1) و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز مورد مطالعه قرار گرفت.

**یافته ها :** در مطلعه حاضر بیش از یک قطعه rDNA -ITS1 در اندازهای مختلف و با الگوی متفاوت در ایزوله‌ها حیوانی مشاهده شد. از نظر اندازه و تعداد قطعه، اندازه قطعات DNA ریوی بوفالو الگوی متفاوتی نسبت به دیگر ایزوله‌ها نشان داد و اندازه و الگوی DNA قطعات کبدی با دو الگو، یکی مشابه الگوی ایزوله‌های ریوی ودیگر مشابه الگوی‌های گوسفند، گاو و شتر بوده است که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی دربین ایزوله‌ها یا وجود دو استرین متفاوت می‌باشد. باتوجه به تشابه و تفاوت باندها DNA از نظر اندازه، تعداد والگوی بدست آمده بعد هضم آنزیمی می‌توان نتیجه گرفت که الگوی DNA ایزوله‌های ریوی وکبدی بوفالو از هند و همچنین ایزوله‌های گوسفندی و شتری از ایران با آنزیم‌های Taq1 و Msp1 در حین تشابه دارای اختلافاتی با یکدیگردر الگوی بدست آمده هستند ولی از نظر تعداد و اندازه باندها با یک دیگر، بخصوص با آنزیم‌های EcoR1, Alu1 و Hha1 مشابه می‌باشند. از طرفی الگوی ITS1 ایزوله‌های ریوی بوفالو از هند کاملا متفاوت از ایزوله‌های کبدی بوفالو، گوسفند، گاو و شتر می‌باشد. بنابراین بر اساس الگوهای PCR-FRLP دو استرین گوسفندی (G1) و بوفالوی (G3) مشاهده شد، که از نظر ژنوتیپ متفاوت می‌باشند.

**استنتاج :** نتایج این مطالعه نشان داد، از نظرخصوصیات ژنتیکی، در کیست‌های هیداتید ایزوله شده کبد و ریه بوفالو شمال هند دو استرین متفاوت (استرین بوفالوی G3 و استرین مشابه گوسفندی G1) و در ایزوله‌های گوسفند، گاو و شتر شمال ایران تنها استرین گوسفندی وجود دارد که این تفاوت ژنوتیپی ایزوله‌ها باید در مطالعات بعدی بخصوص مطالعه ژن‌های میتوکندری و تعیین توالی اسیدهای آمینه مشخص گردد.

**واژه‌های کلیدی :** اکینوکوکوس گرانولوزوس، کیست هیداتید، تنوع ژنتیکی، PCR-RFLP of ITS1

## مقدمه

بیماری هیداتیدوزیس که عامل آن اکینوکوکوس گرانولوزوس می‌باشد، یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک یا زئونوزانگلی بوده که از لحاظ پزشکی، دامپزشکی و حتی از لحاظ اقتصادی در بسیاری از

**مولف مسئول: شیرزاد غلامی**- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد- دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی
E-mail: shirzad1384@yahoo.com , sgholami@mazums.ac.ir
۱. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. گروه زئولوژی، دانشگاه اسلامی علیگر، هند
۳. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه اسلامی علیگر، هند
تاریخ دریافت : ۸۸/۴/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۸/۵/۱۸ تاریخ تصویب : ۸۸/۶/۲۵


www.SID.ir

مناطق دنیا از جمله ایران و هند دارای اهمیت است(۴-۱). این بیماری در اغلب نقاط کشور ایران و هند بخصوص نواحی روستایی که معمولا دامها به صورت غیر بهداشتی کشتار می‌شود شایع است. به همین جهت دلایل آشکاری برای شرایط اضطراری بیماری کیست هیداتید در این دو کشور و بسیاری از نقاط دنیا وجود دارد(۵-۳). این بیماری از ایران و هند در دام‌های اهلی مانند گوسفند، بوفالو، شتر، بز، گاو و انسان به عنوان میزبانان واسط گزارش شده است(۳،۴،۶،۷). از بین دام‌های اهلی، بوفالو درهند و گوسفند در ایران به عنوان میزبانان واسط مناسب کیست هیداتید در این کشور ها محسوب می‌شوند ومیزان شیوع و باروری کیست دراین حیوانات بالا گزارش شده است(۴،۶،۸،۹). هر چند چهار گونه اکینوکوکوس در ایجاد بیماری اکینوکوکوزیس یا هیداتیدوزیس در انسان شناخته شده است، تحقیقات در مناطق مختلف نشان دهنده تنوع استرینی (strain variation) و تغییرات ژنتیکی (genetic variation) در بین گونه‌ها، بخصوص در اکینوکوکوس گرانولوزوس، برحسب میزبان و منطقه جغرافیایی انتشار انگل می‌باشد. با توجه به این تغییرات ژنتیکی و تنوع استرین‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس در مناطق مختلف اندمیک بیماری، وجود این استرین‌ها می‌تواند بر روی برنامه‌های کنترل بیماری بویژه در انسان تاثیر بسزایی داشته باشد(۱۰-۱۲،۲۲،۳۶). از طرفی این تنوع بر روی اپیدمیولوژی و پاتولوژی و همچنین بر تشخیص، درمان موثر دارویی، واکسیناسیون بر علیه انگل و کنترل وپیشگیری کیست هیداتید در انسان و حیوانات به عنوان میزبان واسط تاثیر دارد که در مطالعات باید مورد توجه و استفاده قرار گیرد(۱۵-۱۳).

اکینوکوکوس گرانولوزوس دارای درجات بالایی از تنوع ژنتیکی است. هر چند خصوصیات گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس و تنوع ژنتیکی آن در مناطق اندمیک در انسان و حیوانات با روش‌های مرفولوژی و زیستی مورد مطالعه قرارگرفته است(۱۰،۱۲،۱۳). در حال حاضر برای شناخت استرین‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس علاوه برخصوصیات مرفولوژی، بیوشیمایی و زیستی از روش‌های مولکولی بخصوص روش‌های برمبنای PCR-RFLP بویژه ناحیه rDNA-ITS1 و سکانس DNA استفاده می شود. این ناحیه(ITS1) از جمله مناطق ژنی مناسب موجود در rDNA می‌باشد که با کیفیت وکمیت مناسب برای تهیه محصولات PCR قوی وخالص برای مطالعات مولکولی دارای اهمیت می باشد(۱۱،۱۶،۱۷). این روش‌ها جهت تعیین ایزوله‌ها یا استرین‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس و همچنین الگوی انتقال انگل در میزبان‌های واسط در مناطق مختلف جغرافیایی توسط محققین مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۷،۱۸). تاکنون براساس مطالعات مولکولی ۱۰ ژنوتیپ یا استرین (G1-G10) از اکینوکوکوس گرانولوزوس شناسایی شده است(۲۲-۱۸).

هرچند خصوصیات اکینوکوکوس گرانولوزوس از شمال هند و شمال ایران در انسان و دامها (میزبانان واسط) با روش‌های مرفولوژی و بیوشیمیایی توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرارگرفته است(۳،۹،۲۳،۲۴) ولی استرین‌ها یا ژنوتیپ‌های انگل در دام‌ها، مانند بوفالو، گوسفند، گاو، شتر و انسان با روش‌های مولکولی بویژه PCR-RFLP مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین جهت تعیین استرین یا ژنوتیپ‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس، پروتواسکولکس‌های جمع آوری شده از کیست‌های هیداتید ایزوله‌های کبدی و ریوی بوفالو از شمال هند و ایزوله‌های کبدی گوسفند، گاو و شتر از شمال ایران با روش PCR-RFLP ناحیه rDNA-ITS-1 مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت.

## مواد و روش ها

در مطالعه حاضر پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید بارور ۱۱۶ ایزوله حیوانی شامل ۲۰ ایزوله‌های کبدی،۵۴ ایزوله ریوی بوفالو ازکشتارگاه شهر علیگر در شمال هند و ۱۶ ایزوله کبدی گوسفندی، ۱۳ ایزوله

Archive of SID


www.SID.ir

کبدی گاوی از کشتارگاه شهر ساری و۱۳ ایزوله کبدی شتری از کشتارگاه شهر گرگان از شمال ایران جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری کیست‌ها، محتویات هرکیست با سرنگ استریل آسپیره و پس از۳ بار شستشو با سرم فیزیولوژی در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شد. در این مرحله نمونه‌های پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید جمع‌آوری شده از هر حیوان بعنوان یک ایزوله در نظر گرفته شده و برای استخراج DNA نمونه‌های هر ایزوله مخلوط (pooled samples) و ۱۷ نمونه پروتواسکولکس از ایزوله‌ها برای استخراج DNA با بافر فسفات نمکی (PBS، Ph,7.2) شستشو و در الکل ۷۰ درصد در ۲۰- درجه سانتگراد نگهداری گردید.

*استخراج DNA*

برای استخراج DNA پروتواسکولکس‌های مخلوط کیست‌های هیداتید ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو (۵ و۷ نمونه) و کبدی گوسفندی ،گاوی و شتری (۵ نمونه) انتخاب شد. DNA ژنومی نمونه‌ها پس از شستشو با PBS (Ph,7.2) بر طبق روش سمبورگ و همکاران در سال ۱۹۸۹ (۲۵)، از روش هضم انگل درSDS و پروتئیناز K با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت‌های حیوانی KT82 ساخت کمپانی Genei از بنگلور هند (Mammalian Genomic DNA prep kit, KT82, Genei, Bangalore) استخراج گردید. در این مرحله 200ml از هر نمونه در 180 µl بافر لیز کننده و در ۲۰µl پروتئیناز K هضم و در دمای ۵۵ سانتی گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. DNA ژنومی پس از استخراج در بافر Tris-HCl شستشو و در دمای ۲۰- سانتی گراد نگهداری و غلظت DNA با روش اسپکترومتری (SOD) تعیین شد.

*تکثیرو هضم آنزیمی rDNA-ITS1 به روش PCR-RFLP*

تکثیر ناحیه ITS1-rDNA به روش PCR ، بر طبق روش باولز و مک مانوس(۱۰) و با استفاده از دستگاه ترموسیکلر مدل Te-Sساخت کمپانی نیولایف هند (New Life Company, India) با انجام تغییراتی انجام شد. برای واکنش های PCR پرایمرهای رفت BD1 با ردیف‌های {5′-) Forward BD1, GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3′)} و برگشت 4S با ردیف های { 5′-TCTAGATGC) Reverse 4S TTCGAA (G/A) TGTCGATG-3′)} طراحی شده توسط باولز و مک مانوس استفاده شد(۱۰). از پرایمرهای اختصاصی BD1 و 4S برای ازدیاد قطعه ITS1 (Internal transcribed spacer 1) که بر روی ژن‌های ۲ ساب یونیت S ۱۸ و S ۵/۸ DNA ریبوزومی (rDNA) قرار دارد استفاده شد. برای تکثیر قطعه فوق حجم ۵۰ میکرولیتری شامل 5 µl DNA template (200ng/µl)، 10 mM Tris- HCl buffer (pH , 9.0), 500 mM KCl, 2.5 mM $Mg\ Cl_2$، از هر 2.5 mM dNTP، از پرایمرهای BD1 و4S 24 pmol و 1.5 unit از Taq polymerase در محلول واکنش PCR آماده شد. شرایط PCR برای هر ایزوله شامل: دناتوره اولیه یک سیکل در 95°C به مدت ۵ دقیقه (initial denaturing 1 cycle 95°C for 5 min) و ۳۰ سیکل در 95°C دناتوره به مدت یک دقیقه (denaturation, 95°C for 1 min )، دمای اتصال 55°C سانتی گراد به‌مدت یک دقیقه (annealing,55°C for 1 min)، مرحله تکثیر 72°C به مدت یک دقیقه ( extension 72°C for 1 min,) و تکثیر نهایی 72°C به مدت پنج دقیقه (final extension, 72°C for 5 min) بوده است. محصول PCR بعد از تکثیر از طریق ژل اگاروز ۱/۵ درصد در بافر TAE (1.5% (w/v)Tris-acetate-EDTA) الکتروفورز گردید. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و باندهای DNA توسط دستگاه ژل داکت متصل به کامپیوتر (Gel Chemi Doc, BioRad) مشاهده گردید(۳۴،۳۵).

محصول PCR برای هر ایزوله بعد از تکثیر DNA جداگانه با ۵ آنزیم محدودالاثر تجزیه کننده اندو نوکلئازی Alu1,Msp1,EcoR1,Hha1 و Taq1 با

Archive of SID



www.SID.ir

مشخصات زیر و با غلظت های مشخص در 10x بافر تهیه شده توسط کارخانه Genei, Bangalore به مدت ۱۰-۶ ساعت در دمای 37°C هضم آنزیمی شد.

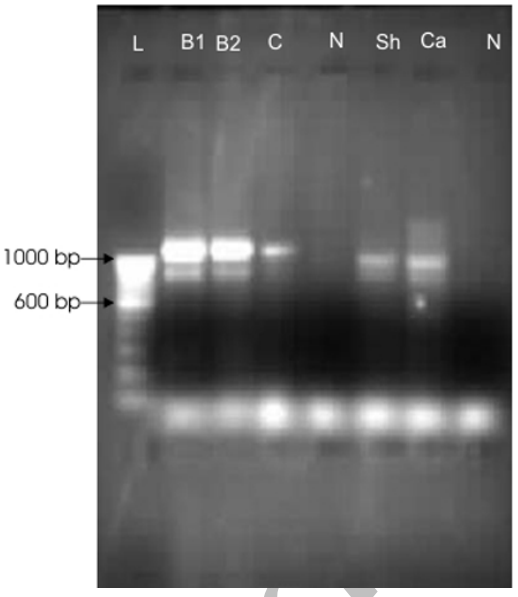
[AluI(5′ AG/CT 3′), HhaI (5′ GCG/C 3′), MSPI (5′ C/CGG 3′),Taq I (5′ T/CGA 3′), EcoRI ( 5′ G/AATTC 3′)]

(15-20µl, PCR product with 2 µl assay buffer, 2 µl BSA, 7 µl sterile distilled water and 1 µl restriction enzymes 8-10 U/ µl at 37°C)

پس از هضم آنزیمی محصول PCR-FRLP از طریق ژل اگاروز ۳ درصد در صد در بافر TAE با ولتاژ 50-100 mV الکتروفورز گردید. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و باندهای DNA توسط دستگاه ژل داکت متصل به کامپیوتر مشاهده و تصاویر تهیه گردید. اندازه قطعات محصولات PCR و هضم آنزیمی FRLP هر ایزوله بوسیله نرم‌افزار UVIdoc تعیین و الگوهای مختلف DNA با یکدیگر مقایسه شد.

## یافته ها

در این مطالعه DNA پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید جدا شده از ایزوله‌های مختلف دامی (بوفالو، گوسفند، گاو، شتر) با استفاده از روش مولکولی (PCR-RFLP of rDNA- ITS1) مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا ناحیه ITS1 از rDNA اکینوکوکوس گرانولوزوس به روش PCR تکثیر و سپس با الگوهای RFLP با استفاده از ۵ آنزیم اندونوکلئاز مقایسه گردید. محصول PCR بدست آمده از تکثیر rDNA-ITS1 الگوهای متفاوتی از باندهای DNA (دو و چهار قطعه) را در ایزوله‌های دامی از نظر تعداد و اندازه نشان داد (تصویر شماره ۱). ایزوله‌های کبدی و ریوی بوفالو از هند قطعات متفاوت و مشابه‌ای در اندازه‌های بیشتراز ۱ کیلوبیس پیر، ۱ کیلوبیس پیر و کمتر از ۱ کیلوبیس پیر با دو و چهار قطعه (1100bp and 1000bp) و ایزوله‌های کبدی بوفالو از هند، گوسفندی، گاوی و شتری از ایران تقریبا اندازه مشابه‌ای را با یک و دو قطعه با اندازه‌های ۱ کیلوبیس پیر و کمتر ازآن ۹۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز (1000bp and 900bp) نشان می‌دهد (تصویر شماره ۱). بنابراین دو الگوی حاصل از تکثیر DNA ایزوله‌های کبدی و ریوی اکینوکوکوس گرانولوزوس بوفالو از نظر ژنوتایپی ضمن تشابه با یکدیگر تفاوت دارند در صورتی که ایزوله‌های کبدی اکینوکوکوس گرانولوزوس بوفالو، گوسفندی، گاوی و شتری از نظر ژنوتایپی با یکدیگر شباهت دارند.




**تصویر شماره ۱:** مقایسه باندهای تولید شده و اندازه آن ها پس از تکثیر DNA با روش PCR از ایزوله های مختلف اکینوکوکوس:
**B1**: نمونه های ریوی بوفالو (1.1 kb and 0.9 kb)
**B2**: نمونه های کبد بوفالو (1.07 kb and 0.9 kb)
**C**: نمونه های کبد گاوی (1.05 kb)
**Sh:** نمونه های کبد گوسفند (1.0 kb and 0.9 kb)
**Ca**: نمونه های کبد شتر (1.0 kb and 0.85 kb)
**N**: کنترل منفی بدون DNA
**L:** DNA lader

*هضم اندونوکلئازی و بررسی PCR-RFLP*

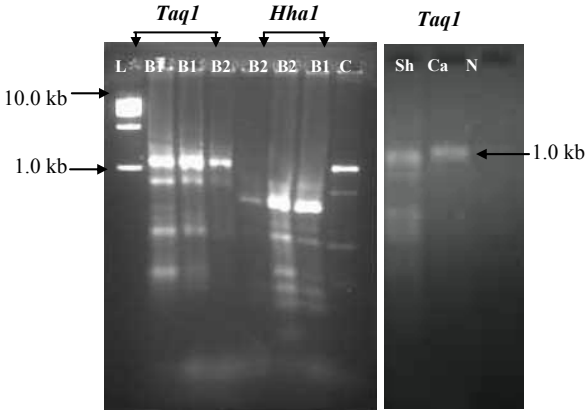
جهت هضم اندونوکلئازی DNA پروتواسکولکس‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس از ۵ آنزیم محدودالاثر تجزیه‌کننده اندو نوکلئازی Taq1،Alu1,Msp1, EcoR1,Hha1 با توالی متفاوت از

Archive of SID

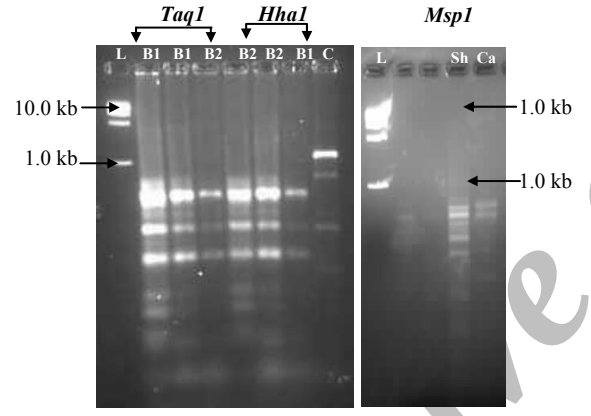

www.SID.ir

نوکلئوتیدی‌ها استفاده شد. محصولات تکثیر شده PCR پس از هضم آنزیمی، الگوهای متفاوتی ازقطعات DNA را نشان دادند(تصاویر شماره ۲ تا ۴). آنزیم Taq1 در ایزوله‌های ریوی بوفالو، ۴ قطعه، درایزوله‌های کبدی بوفالو و گوسفندی، ۲ قطعه و در ایزوله‌های شتری، یک قطعه DNA مشاهده شد در صورتی که هیچ قطعه ای در ایزوله‌های گاوی با این آنزیم مشاهده نگردید (تصویر شماره۲، جدول شماره ۱). با عمل هضم آنزیمی، آنزیم Hha1 الگوهای مشابه انزیم Taq1 با ایجاد ۴و ۲ قطعه با اندازه‌های متفاوت با آنزیم های دیگر در ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو را نشان داد (تصویر شماره۲، جدول شماره ۱). آنزیم Msp1 الگوی مشخصی در ایزوله‌های کبدی و ریوی بوفالو با ۳ قطعه ( ۰/۶، ۰/۸، ۰/۵ کیلوبیس پیر) و در ایزوله‌های گوسفندی و شتری ۴ قطعه با اندازه تقریبا یکسان ( ۰/۵ ، ۰/۶، ۰/۸، ۰/۹ کیلوبیس پیر) ایجاد نمود است(تصویر۳، جدول شماره۱). با آنزیم EcoR1 الگوی مشخصی از DNA در ایزوله‌های کبدی و ریوی بوفالو با ۳ قطعه (۰/۵ ، ۰/۶، ۰/۸ کیلوبیس پیر) و در ایزوله‌های گوسفندی و شتری هیچ قطعه‌ای ایجاد نگردید (تصویر شماره۳ ، جدول شماره ۱). انزیم Alu1 با هضم آنزیمی محصولات PCR در همه ایزوله‌ها ۶ قطعه مشخص در اندازه‌های یکسان ایجاد کرد که نشان دهنده الگوهای مشابه‌ای ژنوتایپی از توالی DNA (Homology ) از نظر اندازه و تعداد در همه ایزوله‌ها می‌باشد (تصویر شماره۴، جدول شماره۱).

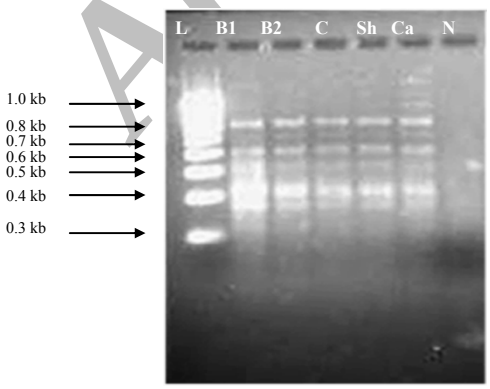
نتایج بدست آمده از تکثیر rDNA-ITS1 و عمل هضم آنزیمی محصولات PCR به روش RFLP نشان دهنده الگوهای متفاوت ژنوتایپی یا استرینی با آنزیم‌های Taq1و Hha1 در ایزوله‌های کبدی و ریوی بوفالو از شمال هند و الگوهای مشابه‌ای از DNA با آنزیم‌های Msp1، EcoR1 و Alu1 است. از طرفی تشابه در تعداد و اندازه قطعات DNA بین ایزوله‌های کبدی بوفالو، گوسفندی و شتری با آنزیم‌های Msp1 و Alu1 نشان دهنده تشابه زنوتایپی یا استرینی دراین ایزوله‌ها می‌باشد.




**تصویر شماره ۲ :** الگو های RFLP باندهای تولید شده و اندازه آن ها پس از تکثیر قطعات ITS1 با روش PCR از ایزوله های مختلف اکینوکوکوس که باآنزیم های Taq 1و Hha1 هضم آنزیمی شده‌اند.
نمونه های کبد گوسفند:Sh نمونه های کبد بوفالو :B2 نمونه های ریوی بوفالو:B1
نمونه های کبد شتر :Ca کنترل منفی بدون DNA :N L: DNA lader




**تصویر شماره ۳ :** الگو های RFLP باندهای تولید شده و اندازه آن ها پس از تکثیر قطعات ITS1 با روش PCR از ایزوله های مختلف اکینوکوکوس که با آنزیم های *Msp1* و *EcoR1* هضم آنزیمی شده اند.
نمونه های کبد گوسفند:Sh نمونه های کبد بوفالو :B2 نمونه های ریوی بوفالو:B1
نمونه های کبد شتر :Ca کنترل منفی بدون DNA :N L: DNA lader




**شکل شماره ٤ :** الگو های RFLP باندهای تولید شده و اندازه آن ها پس از تکثیر قطعات ITS1 با روش PCR از ایزوله های مختلف اکینوکوکوس که با آنزیم Alu1 هضم آنزیمی شده اند.
نمونه های کبد گوسفند:Sh نمونه های کبد بوفالو :B2 نمونه های ریوی بوفالو:B1
نمونه های کبدشتر :Ca نمونه های کبدی گاو:C کنترل منفی بدون DNA :N L: DNA lader

Archive of SID


www.SID.ir

**جدول شماره ۱ :** تعداد واندازه قطعات DNA بعد از هضم آنزیمی با آنزیم های متفاوت محدودالاثر تجزیه کننده اندو نوکلئازی

| پرتواسکولکس های کیست های هیداتید بارور ایزوله های حیوانی | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| آنزیم ها | نمونه ریوی بوفالو | نمونه کبدی بوفالو | نمونه کبدی گوسفند | نمونه کبدی گاو | نمونه کبدی شتر |
| Taq1 | ۴ باند با اندازه های ۱/۱۳، ۰/۹، ۰/۵، ۰/۴ کیلوبیس پیر* | ۲ باند با اندازه های ۱/۱، ۰/۵ کیلوبیس پیر | ۲ باند با اندازه های ۰/۸، ۰/۵ کیلوبیس پیر | ۱ باند با اندازه ۱/۰۵ کیلوبیس پیر | - |
| Hha1 | ۴ باند با اندازه های ۰/۷، ۰/۵، ۰/۴، ۰/۳ کیلوبیس پیر | ۲ باند با اندازه های ۰/۷، ۰/۵ کیلوبیس پیر | - | - | - |
| Msp1 | ۳ باند با اندازه های ۰/۸، ۰/۶، ۰/۵ کیلوبیس پیر | ۳ باند با اندازه های ۰/۸، ۰/۶، ۰/۵ کیلوبیس پیر | ۴ باند با اندازه های ۰/۹، ۰/۸، ۰/۶، ۰/۵ کیلوبیس پیر | ۲ باند با اندازه های ۰/۹، ۰/۸ کیلوبیس پیر | - |
| EcoR1 | ۳ باند با اندازه های ۰/۸، ۰/۶، ۰/۵ کیلوبیس پیر | ۳ باند با اندازه های ۰/۸، ۰/۶، ۰/۵ کیلوبیس پیر | - | - | - |
| Alu1 | ۶ باند با اندازه های ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵۲، ۰/۴۵، ۰/۳۷، ۰/۸ کیلوبیس پیر | ۶ باند با اندازه های ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵۲، ۰/۴۵، ۰/۳۷، ۰/۸ کیلوبیس پیر | ۶ باند با اندازه های ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵۲، ۰/۴۵، ۰/۳۷، ۰/۸ کیلوبیس پیر | ۶ باند با اندازه های ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵۲، ۰/۴۵، ۰/۳۷، ۰/۸ کیلوبیس پیر | ۶ باند با اندازه های ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵۲، ۰/۴۵، ۰/۳۷، ۰/۸ کیلوبیس پیر |

- هیچ باندی از DNA یافته نشد.
* کیلوبیس پیر (Kb) اندازه قطعات DNA.

## بحث

در مطالعه حاضر بیش از یک قطعه ITS1 از DNA *اکینوکوکوس گرانولوزوس* جدا شده از پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید در اندازه‌های متفاوت بعد از تکثیر محصول PCR در ایزوله‌های ریوی و کبدی بوفالو از هند و ایزوله های گوسفندی و گاوی از ایران مشاهده شد. براساس الگوهای حاصل از تکثیر DNA ایزوله‌های کبدی و ریوی اکینوکوکوس گرانولوزوس بوفالو از نظر ژنوتایپی متفاوت از یکدیگر هستند در صورتی که ایزوله‌های کبدی اکینوکوکوس گرانولوزوس بوفالو، گوسفندی، گاوی و شتری از نظر ژنوتایپی با یکدیگر شباهت دارند. اندازه قطعات DNA-ITS1 ایزوله‌های کبدی و ریوی بوفالو از هند در اندازه‌های بیشتراز ۱ کیلوبیس پیر و کمتر از ۱ کیلوبیس پیر با دو و چهار قطعه (1100bp and 1000bp) و ایزوله‌های کبدی بوفالو از هند، گوسفندی، گاوی و شتری از ایران تقریبا اندازه مشابه‌ای را با یک و دو قطعه با اندازه‌های ۱ کیلوبیس پیر و کمتر از آن (1000bp and 900bp) می‌باشد که بیانگر وجود دو ژنوتایپ متفاوت از انگل یعنی ژنوتایپ بوفالویای (یا استرین G3) و ژنوتایپ گوسفندی (یا استرین G1) است. مشابه نتایج بدست آمده در این مطالعه از اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله‌های حیوانی و انسانی در نواحی مختلف جغرافیایی در ایزوله‌های بوفالوی، گوسفندی، شتری ازجمله ایران و هند گزارش شده است(۳،۱۹،۱۳،۱۲،۱۰).

باولز و مک منوس در سال ۱۹۹۴، اسکات و همکاران در سال ۱۹۹۷ دو قطعه از ITS1 از ایزوله‌های گوسفندی و خوک و یک قطعه در ایزوله انسانی در هند و فصیحی و همکاران در سال ۲۰۰۲ و احمدی و دلیمی در سال ۲۰۰۶ در ایران در ایزوله‌های گوسفندی، شتری و انسانی با اندازه های قطعات DNA-ITS1 تقریبا مشابه (اندازه قطعات ۰/۹ تا ۱/۱ کیلوبیس پیر) گزارش کردند(۲۶،۱۰،۴،۳). از طرفی جمالی و همکاران در سال ۲۰۰۴ در ایزوله‌های انسانی، گاوی و گوسفندی از ایران اندازه قطعات DNA-ITS1 را با اندازه تقریبی ۱ کیلوبیس پیر گزارش کرده‌اند که مشابه اندازه قطعات

Archive of SID


www.SID.ir

DNA-ITS1 حاصل از ایزوله‌های گوسفندی، گاوی و شتری در این مطالعه از شمال ایران می‌باشد(۲۷). باتاچری و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ایزوله‌های بوفالوی هند اندازه متفاوت از DNA-ITS1 (۱۰۴۶بیس پیر) در مقایسه با ایزوله‌های گوسفندی و گاوی (۹۸۱ و ۹۸۰ جفت باز) گزارش کرده‌اند که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر تا حدودی در اندازه قطعه اول DNA (۱۱۰۰ جفت باز) اختلاف دارد(۲۸).

با توجه به نتایج حاصل از تکثیر rDNA-ITS1 به روش PCR استنباط می‌شود که طول واندازه ناحیه قطعه ITS1 در اکینوکوکوس گرانولوزوس بر حسب نوع میزبان و محل کیست هیداتید در بدن میزبان تغییراتی را نشان می‌دهد که بیانگر تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای (استرینی) در انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس است که از لحاظ علمی (ژنتیک و انگل شناسی)، اپیدمیولوژیکی و برنامه‌های کنترل این انگل در انسان و دام‌ها دارای اهمیت است(۱۲،۱۴،۱۸).

الگوهای محصول PCR-RFLP اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله‌های کبدی وریوی کیست‌های هیداتید بوفالو از شمال هند و گوسفندی، گاوی و شتری از شمال ایران با ۵ آنزیم محدودالاثر اندونوکلئازی بیانگر تشابه و تفاوت در الگوی RFLP قطعه ITS1 از نظر اندازه، تعداد و طول است به نحوی که آنزیم‌های EcoR1 و Msp1 الگوهای مشابه‌ای در ایزوله‌های کبدی و ریوی بوفالو و با آنزیم Msp1 در ایزوله‌های گوسفندی و شتری و همچنین با آنزیم Alu1 الگوهای مشابه در همه ایزوله‌ها نشان دادند در حالی که دو الگوی‌های مختلف توسط آنزیم‌های Taq1 و Hha1 از نظر تعداد و اندازه در ایزوله‌های بوفالوی، گوسفندی و شتری مشاهده شد. از طرفی اندازه و تعداد باندهای DNA در ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو با آنزیم‌های Taq1 و Hha1 متفاوت می‌باشد که نشان دهنده تفاوت در ژنوم ITS1 از نظر توالی ژنی در هر دو ایزوله می‌باشد.

تفاوت مرفولوژی وبیولوژی اکینوکوکوس گرانولوزوس ایزوله‌های بوفالو از هند در برخی از مطالعات قبلی نشان داده شده است که با ایزوله‌های گوسفندی متفاوت است(۲۹،۳۰،۳۱). تجزیه و تحلیل ترتیب و توالی ژن Cox1 توسط باول و همکاران در سال ۱۹۹۲ نشان داد که بوفالوی هندی استرین مجزا (G3) است که کاملا از گاو هلندی متمایز(G5) و فقط کمی متفاوت از استرین شایع گوسفندی(G1) است (۳۲) مطالعات دیگر انجام شده نشان دهنده تفاوت ژنتیکی یا استرینی ایزوله‌های بوفالو از گوسفندی و گاوی در هند و سایر نقاط از جمله استرالیا می‌باشد(۱۱،۱۲،۱۸،۲۸) از طرفی تکثیر و هضم آنزیمی قطعه ITS1 ایزوله‌های گوسفندی، گاوی و شتری از شمال ایران نشان می‌دهد که ایزوله‌های گوسفندی و شتری الگوی متفاوت DNA با آنزیم Taq1 و مشابه در الگوی بدست آمده با انزیم Msp1 از نظر اندازه و تعداد است (تصویر، جدول شماره ۱). در حالی که هیچ باندی در ایزوله‌های گوسفندی، گاوی و شتری با آنزیم‌های Hha1 و EcoR1 مشاهده نگردید. آنزیم Alu1 الگوی مشابه‌ای rDNA-ITS1 با باندهای یکسان (homogeneity) در ایزوله‌های بوفالویی، گوسفندی، گاوی و شتری نشان می‌دهد که بیانگر تشابه ژنتیکی اکینوکوکوس گرانولوزوس در میزبان‌های مختلف با این آنزیم است (تصویر شماره۴ ).

وجود استرین‌های متفاوت اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله‌های حیوانی و انسانی با روش‌های مرفولوژی و مولکولی در مطالعات مختلف گزارش گردید. باول و مک مونوس در سال ۱۹۹۳ الگوهای مشخص RFLP مشابه ویکسان بین ایزوله‌های اسب و گاو پس از هضم با آنزیم‌های Msp1 و Alu1 و الگوهای متمایز یا آنزیم دیگر (Rsa1، CFo و Taq1) گزارش کرده‌اند(۱۰) و فصیحی هرندی و همکاران در سال ۲۰۰۲ استرین‌های گوسفندی (G1) و شتری (G6) با الگوهای مشابه‌ای از RFLP بین ایزوله‌های گوسفندی و شتری با آنزیم‌های Alu1، Msp1 و Rsa با روش

Archive of SID



www.SID.ir

PCR-RFLP ناحیه ITS1 از نواحی جغرافیایی متفاوت ایران گزارش کردند(۳) همچنین وجود استرین‌های متفاوت اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایران روش مولکولی (PCR-RFLP) در مطالعه احمدی و دلیمی در سال ۲۰۰۶ ، زانگ و همکاران (۱۹۹۸) و تامپسون و مک مونوس (۲۰۰۱ و ۲۰۰۳) با روش‌های مرفولوژی و مولکولی در ایزوله‌های حیوانی و انسانی با دو چرخه‌های سگ- گوسفند و سگ- شتر به عنوان چرخه‌های فعال انگل مورد تائید قرار گرفته است(۳،۴،۱۲،۱۸،۳۳) که می‌تواند در انتقال عفونت به انسان و سایر میزبان‌های واسط تصادفی نقش داشته باشد(۳،۱۸) هر چند در شمال هند نقش میزبان‌های واسط به عنوان یک منبع عفونت برای انسان هنوز کاملا روشن نشده است ولی عفونت در انسان و حیوانات از نقاط مختلف کشورهند با چرخه متفاوت (بوفالو/ سگ و گوسفند/ سگ) توسط ارشاد الله و همکاران (۱۹۸۹) و بااتا چیریا (۲۰۰۶) گزارش شده است(۹،۲۸،۳۱).

بنابراین با توجه به تفاوت ژنتیکی اکینوکوکوس گرانولوزوس ایزوله‌های کبدی و ریوی بوفالو از شمال هند (استرین‌های G3وG1) و تشابه اکینوکوکوس گرانولوزوس ایزوله‌های کبدی بوفالویی، گوسفندی، گاوی و شتری از شمال هند و شمال ایران (استرین G1) مطالعات اپیدمیولوژی و مولکولی بیشتر در ایران و هند و سایر مناطق دنیا مورد نیاز است. علاوه بر این به دلیل تنوع نژادی اکینوکوکوس و یا تاثیر زیستگاه‌ها پیشنهاد شده است که در مطالعات آینده، مناطق جغرافیایی یا بوم نیز باید مورد توجه قرارگیرد(۲۱،۲۲). به منظور تأیید این فرضیه در آینده در ارگان‌های متفاوت در ایزوله‌های انسانی و حیوانی مطالعات مولکولی تکمیلی به ویژه ژن های میتوکندری (mitochondrial genes) و توالی اسید آمینه (amino acid sequencing) مورد نیاز هستند که می‌تواند اطلاعات بیشتری را برای درک بهتر در مورد تفاوت بین کیست‌های هیدا تید ایجاد شده توسط اکینوکوکوس گرانولوزوس در میزبان‌های واسط حیوانی و انسانی و همچنین میزبان اصلی جهت کنترل و پیشگیری ارائه کند.

## سپاسگزاری

از کلیه همکاران و افرادی که در انجام مراحل مختلف این مطالعه ما را در گروه زئولوژی و بیوتکنولوزی دانشگاه اسلامی علیگرهند و گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران یاری نموده‌اند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

## References

1. Scala A, Canu SL, Tanda B, Basciu M, Polinas L,Sanna Coccone GN,et al. An epidemiological and bio-molecular survey of cystic echinococcosis in cattle in Sardinia. Parasitologia 2004; 46: 443-444.
2. Jenkins DJ, Roming T, Thompson RCA. Emergence / re-emergence of Echinococcus SPP. Aglobal update. Int J Parasitol 2005; 35: 1205-1219.
3. Fasihi Harandi M, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RCA. Molecular and morphological characterization of Echinococcus granulosus of human and animal origin in Iran. Parasitology 2002; 125: 367-373.
4. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Genetic Evolution 2006; 6: 85-90.
5. McManus DP, Zhany W, Li J, Bartley PB. Echinococcousis. Lancet 2003; 362: 1295-1304.
6. Juyal PD, Singh NK, Kaur P. Hydatidosis in India: A Review on Veterinary perspective. J

Archive of SID


www.SID.ir

Parasitic Dis 2005; 29(2): 97-102.

7. Irshadullah M, Nizami WA. Development of protoscoleces of Echinococcus granulosus from buffalo liver and lung cyst in dogs parasite. Hung 1992; 25: 15-22.
8. Arbabi M, Hooshyar H. Survey of Echinococcosis and hydatidosis in kashan Region, Central Iran. Iran J Public Health 2006; 35(1): 75-81.
9. Irshadullah M, Nizami WA, Macpherson CNL. Observations on the suitability and importance of the domestic intermediate hosts of in Echinococcus granulosus, Uttar Pradesh. India J Helminthol 1989; 63: 39-45.
10. Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of Echinococcus species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. Mole Biochem Parasitol 1993; 57: 231-240.
11. Thompson RCA. Biology and systematics of Echinococcus. In Echinococcus and hydatid disease (Eds. R. C. A.Thompson and A. J. Lymbery), CAB International, Wallingford, UK 1995; P 1-50.
12. Thompson RCA, McManus DP. Ateiology: Parasite and life-cycles. In: WHO/OIE Manual on Echinococcsis in humans and animals: A Public Health Problem of Global concern. (Eds.J. Eckert, M.A. Gemmell, F.X. Meslin and Z.S. Pawlowski),. World Health Organization. Animal Health, Geneva 2001; P 1-17
13. McManus DP, Bryant C. Biochemistry, physiology and molecular biology of Echinococcus. In Echinococcus and Hydatid Disease (ed. Thompson, R.C.A. and Lymbery, A.J.). CAB International, Wallingford, Oxon, UK 1995; P 135-181.
14. Bowles J, McManus DP. Molecular variation in Echinococcus and the implications. Acta Trop 1993; 53: 291-305.
15. Bowles J, Blair D, McManus DP. Molecular genetic characterisation of the cervid strain (northern form) of Echinococcus granulosus. Parasitology 1994; 109: 215-221.
16. Thompson RCA, Lymbery AJ. The nature, extent and significance of variation within the genus Echinococcus. Adv Parasitol 1988; 27: 209-258.
17. Thompson RCA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus. Trends Parasitol 2002; 18: 452-457.
18. McManus DP, Thompson RCA. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. Parasitology 2003; 127 (Suppl.1): S37-S51.
19. Thompson RCA, Boxelli bJ, Raslston CC, Constantine CC, Hobbs RP, Shury T, et al. Molecular and morphological characterization of Echinococcus in cervids from North America. Parasitology 2006; 132: 439-447.
20. Lavikainen A, Lehtinen M.J, Laaksonen S, Agren E, Okasanen A, Meri S. Molecular characterization of Echinococcus isolates of cervid origin from Finland and Sweden. Parasitology 2006; 133: 565-570.
21. Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus Echinococcus inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitolog 2007; 134: 713-722.
22. Thompson RCA. The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. Minireview. Experimental Parasitology 2008; 119: 439-446.
23. Mobedi I, Madadi H, Arfaa F. Camel 'Camelus dromedarius' intermediate host of Echinococcus granulosus in Iran. J Parasitol 1970; 56: 1255.
24. Ahmadi N. Using morphometery of the larval rostellar hook to distinguish Iranian strains of

Archive of SID



www.SID.ir

Echinococcus granulosus. Ann Trop Med Parasitol 2004: 98: 1-10.

25. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning:A Laboratory Manual. (Second, edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA 1989.
26. Scott JC, Stafaniak J, Pawowski ZS, McManus DP. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of Echinococcus granulosus. Parasitology 1997; 114: 37-43.
27. Jamali R, Ghazanchaei A, Asgharzadeh M. Identification and characterization of Echinococcus granulosus by PCR-RFLP technique in Tabriz district. J Parasitic Dis 2004; 28(2): 69-72.
28. Bhattacharya D, Bera A.K, Bera BC, Maity A, Das, S.K. Genotypic characterization of India cattle, buffalo and sheep isolates of Echinococcus granulosus. Vet Parasitol 2007; 143: 371-374.
29. Gill HS, Rao B.V. On the biology and morphology of Echinococcus granulosus (Batsch, 1786) of buffalo-dog origin. Parasitology 1967; 57, 695-704.
30. Rao DG, Mohiyuddin S. Incidences of hydatid cyst in bovines and histopathologyical changes of pulmanery tissue in hydatidosis. Ind J Anim Sci 1968; 44: 437-440.
31. Irshadullah M, Nizami WA. Biochemical characterization of protoscoleces isolated from buffalo hepatic and pulmonary hydatid cyst. J Parasit Appl Anim Biol 1997; 6: 13-24.
32. Bowles J, Blai D, McManus DP. A molecular phylogeny of the genus Echinococcus. Parasitology 1995; 110: 317-328.
33. Zhang L, Eslami A, Hosseini SH, McManus DP. Indication of the Presence of two distinct strains of Echinococcus granulosus in Iran by mitochondrial DNA markers. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 171-174.
34. Fatahi M, Shokohi T, Hashemi Sooteh MB, Hedayaty MT, Okhavatian A, Tamaddoni A, et al. Molecular Identification of Candida Albicans Isolated from the Oncology Patients at Four University Hospitals in Mazandaran Province (2005-6). J Mazand Univ Med Sci 2008, 17(61): 1-11(Persian).
35. Shokohi T,Hajheidari Z, Barzgar A, Hashemi Sooteh MB, Hedayati MT, Aghili R, et al. Identification of Malassezia Species isolated from patients with pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis by PCR-RFLP. J Mazand Univ Med Sci 2008, 18: 51-62 (Persian).
36. Gholmi SH. ET: Intestinal helminthes parasites in Dog and Jackal in different areas Sari in the year 1992-1993. J Mazand Univ Med Sci 1999; 9: 5-12 (Persian).

Archive of SID


www.SID.ir