

تعیین گونه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس

جدا شده از کیست‌های هیداتید با ردیابی ژن میتوکندریای *atp6*

محمد رستمی نژاد^۱، احسان ناظم الحسینی مجرد^{۲*}، نیلوفر تقی پور^۳، زهرا نوجی^۴، کوروش چراغی پور^۵

دکتر حسین دبیری^۶، دکتر سیدرضا محبی^۷، دکتر بابک نوری نیر^۸، دکتر محمدرضا زالی^۹

۱- کارشناس علوم آزمایشگاهی دامپزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

۲- دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۳- کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی، بخش

انگل‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۴- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی

شهید بهشتی. ۵- کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی، بخش انگل‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان. ۶- استادیار گروه میکروب‌شناسی، مرکز

تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۷- استادیار گروه ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی

شهید بهشتی. ۸- استادیار گروه گوارش، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۹- استادیار گروه گوارش، مرکز تحقیقات بیماری‌های

گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

چکیده

زمینه و هدف: گونه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی، ویژگی میزبان واسط و یا بررسی ژنتیکی *DNA* میتوکندریال یا هسته‌ای آنها مشخص می‌شوند. این مطالعه به منظور تعیین گونه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس جدا شده از کیست‌های هیداتید با ردیابی ژن میتوکندریای *atp6* انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی ۶۰ کبد و ریه آلوده گاو، گوسفند و بز از کشتارگاه شهرستان ورامین در سال ۱۳۸۷ جمع‌آوری شدند. پروتواسکولکس‌ها از کیست‌های بارور جدا و *DNA* آنها استخراج گردید. دو جفت پرایمر جدید که به طور اختصاصی تمام ژن *atp6* میتوکندریال گونه‌های *G1* و *G6* (دو گونه موجود در ایران) اکتینوکوکوس گرانولوزوس را تکثیر می‌کرد؛ طراحی و آزمایش گردید.

یافته‌ها: پرایمرهای جدید، ژنوتایپ‌های *G1* و *G6* اکتینوکوکوس گرانولوزوس را تکثیر کرده و به ترتیب باندهای اختصاصی $708bp$ و $705bp$ حاصل گردید. ژنوتایپ *G1* در تمام نمونه‌های کیست بارور شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ژن *atp6* میتوکندریال گونه‌های *G1* و *G6* مارکر مولکولی مناسبی برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی در ایزوله‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس جدا شده در میزبانان موجود در ایران می‌باشد. همچنین نتایج نمونه‌های سکانس شده در این مطالعه نشان داد که توالی‌های حاصل مشابه توالی‌های گزارش شده قبلی برای این گونه‌ها می‌باشد.

کلید واژه‌ها: اکتینوکوکوس گرانولوزوس، *atp6*، ژنوتایپ *G1* و *G6*

* نویسنده مسؤول: احسان ناظم الحسینی مجرد، پست الکترونیکی ehsanmojarad@gmail.com

نشانی: تهران، ولنجک، خیابان پروانه، بیمارستان آیت اله طالقانی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دایره بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال‌های

مزمن، بخش انگل‌شناسی، تلفن ۲۲۴۳۲۵۱۸ - ۰۲۱، نمابر ۲۲۴۳۲۵۲۵

وصول مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۱۶، اصلاح نهایی: ۱۳۸۹/۹/۲۱، پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۱۲

مقدمه

بیماری کیست هیداتید (hydatid cyst) یک عفونت زئونوز مزمن است که توسط مرحله لاروی کرم نواری سگ به نام اکینوкокوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. با توجه به اهمیت و گسترش جهانی این بیماری از نظر پزشکی و اقتصادی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز به شمار می‌آید (۱-۳).

معمولاً گونه‌های متعددی از میزبانان واسط به واسطه اکینوкокوس گرانولوزوس آلوده می‌شوند. مطالعات مختلف نشان داده است که کیست هیداتید معمولاً در گوسفند، شتر، گاو، بز و انسان در سراسر ایران یافت می‌شود. گوسفند شایع‌ترین و مهم‌ترین میزبان واسط اکینوкокوس گرانولوزوس در ایران می‌باشد. گاو و بز در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار دارند (۴-۹).

بر پایه خصوصیات مرفولوژیکی، بیولوژیکی و بیوشیمیایی و به خصوص ویژگی‌های مولکولی، گونه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس به ۸ ژنوتایپ اصلی (G1-G8) تقسیم می‌شوند. این گونه‌ها شامل گونه مهم گوسفندی (G1)، ۲ گونه گاوی (G3, G5)، گونه اسبی (G4)، گونه شتری (G6)، گونه خوکی (G7) و گونه سروید یا گونه وحشی یا شمالی (G8) می‌باشد (۱۰ و ۱۱).

ژنوتایپ نهم (G9) از انسان و خوک در لهستان گزارش شده است (۱۲). گونه گوسفندی (G1) شایع‌ترین و مهم‌ترین ژنوتایپ زئونوز می‌باشد (۱۳).

تحقیقات نشان داده است که DNA میتوکندریال در بررسی رابطه پلی‌ژنیک بین گونه‌های نزدیک به هم، نسبت به DNA هسته‌ای از ارجحیت بیشتری برخوردار است. اطلاعات به دست آمده از این DNA، پتانسیل لازم را در حل مشکلات تاکسونومی انگل دارد (۱-۳). براین اساس، تحقیقات صورت گرفته در سال‌های اخیر در دنیا بیشتر روی DNA میتوکندریال (cox1, nad1, atp6) متمرکز شده است.

مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی محدودی بر روی ایزوله‌های ایرانی انجام گرفته است. در اولین مطالعه‌ای که در ایران انجام شد؛ ۱۶ ایزوله اکینوкокوس گرانولوزوس از کیست‌های انتنایی و حیوانی (شامل گاو، گوسفند، بز و شتر)

از کشتارگاه‌های تهران، مرکز و جنوب ایران جمع‌آوری گردید. این تحقیق که با روش PCR-RFLP و به منظور بررسی تفاوت‌های موجود در توالی اسیدهای نوکلئیک ژن‌های nad1 و cox1 انجام گرفت؛ به روشنی نشان داد که علاوه بر ژنوتایپ G1 (گونه گوسفندی)، ژنوتایپ G6 (گونه شتری) نیز در ایران یافت می‌شود. در ۴ ایزوله انسانی مورد آزمایش ژنوتایپ G1 جدا گردید و در حیوانات اهلی این ژنوتایپ شایع‌تر از ژنوتایپ G6 بود (۱۴).

در مطالعه‌ای دیگر ایزوله‌های اکینوкокوس گرانولوزوس انسانی و حیوانی از مناطق مختلفی از ایران جمع‌آوری و با استفاده از ویژگی DNA (PCR-RFLP ناحیه ITS1) و معیارهای مرفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت و مجدداً وجود گونه‌های G1 و G6 در ایران تایید گردید (۵).

این مطالعه به منظور تعیین گونه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس جدا شده از کیست‌های هیداتید با ردیابی ژن میتوکندریال atp6 انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ۶۰ کبد و ریه آلوده گاو، گوسفند و بز از کشتارگاه شهرستان ورامین در سال ۱۳۸۷ جمع‌آوری شدند. کارآیی و عملکرد پروتواسکولکس‌ها با بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر بدون رنگ‌آمیزی و با مشاهده حرکت سلول‌های شعله‌ای و با استفاده از رنگ حیاتی (اٹوزین ۱/۰ درصد) تایید گردید.

کیست‌ها جداگانه بررسی و پروتواسکولکس‌های هر کیست جداگانه جمع‌آوری شد. ۱۸ نمونه از ۲۰ کیست گاوی و ۶ نمونه از ۲۰ نمونه گوسفندی غیربارور بودند و از مطالعه خارج شدند. پروتواسکولکس‌ها از کیست‌ها آسپیره و پس از شستشو با سالین و فیکس در اتانول ۷۰ درصد؛ به آزمایشگاه بیماری‌های ناشی از غذا منتقل و تا زمان انجام استخراج در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد شدند.

پروتواسکولکس‌ها چندبار با PBS شستشو داده شدند تا اتانول قبل از استخراج DNA کاملاً از محیط خارج شد.

روش‌های استخراج DNA برای اکینوкокوس گرانولوزوس با چهار روش متفاوت شامل کیت استخراج بافت (کیاژن، آلمان)، کیت استخراج اصلاح شده سیناژن

ایزوآمیل الکل به آن اضافه و به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به لوله جدید منتقل شد و سپس هم حجم آن کلروفورم اضافه و مجدداً به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. یک دهم حجم محلول حاصله استات سدیم ۳ مولار (pH=۵/۲) و ۵۰۰ میکرولیتر اتانل به آن اضافه شد و تیوب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. قبل از شستشوی رسوب حاصله با اتانول ۷۰ درصد نمونه ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت به رسوب مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و تا زمان انجام PCR در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

کارآیی روش‌های استخراج DNA با درجه موفقیت آنها در PCR مشخص گردید.

طراحی پرایمر: با استفاده از شماره دستیابی (Accession number) اخذ شده برای ژنوتایپ‌های G1 و G6 موجود در بانک ژن (AF297617 و AB208063)، جفت پرایمرهای اختصاصی برای دو ژنوتایپ شناخته شده موجود در ایران طراحی گردید.

سکانس‌های ژن *atp6* دو ژنوتایپ ذکر شده به وسیله نرم‌افزار MegAlign مورد بررسی قرار گرفتند (DNASTAR.Inc) و پرایمرهای اختصاصی گونه با تکیه بر مناطق کاملاً محافظت شده (highly conserved) با کمک نرم‌افزار Gene Runner طراحی گردیدند. سپس اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار blast مورد تأیید قرار گرفت.

تکثیر ژنوتایپ‌های G1 و G6 اکتینوکوکوس گرانولوزوس
(G1 PCR و G6 PCR): واکنش PCR در غلظت کلی ۲۵ میکرولیتر با مقادیری که در جدول یک آمده است؛ آماده گردید. سپس برنامه حرارتی زمانی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون، ۳۰ ثانیه در ۵۹ درجه سانتی گراد برای آنیلینگ برای G1 (۶۰ درجه سانتی گراد برای G6)، ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای طولیل شدن نهایی و تکرار سیکل ۳۵ مرتبه برای تکثیر قطعات به کار برده شد.

(سیناژن، ایران)، روش فنل کلروفورم (۱۵) و روش فنل کلروفورم اصلاح شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

کیت استخراج از بافت: در این روش DNA بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (کیاژن، آلمان) استخراج گردید.

کیت اصلاح شده استخراج سیناژن: قبل از آغاز پروسه استخراج DNA، محلول DNG TM-PLUS (سیناژن، ایران) برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به آرامی مخلوط و گرم شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۶۰۰ میکرولیتر از DNG TM-PLUS مخلوط و برای مدت ۲۵-۲۰ ثانیه ورتکس گردید تا یک سوسپانسیون هموژن حاصل شود. ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به این سوسپانسیون اضافه گردید و مجدداً ورتکس شد.

برای تغلیظ میزان DNA نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی به آرامی دور ریخته شد. ۲ میلی لیتر از اتانول ۷۵ درصد به رسوب اضافه و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه ورتکس گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مجدداً مایع رویی به آرامی دور ریخته شد و رسوب در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد خشک گردید. به رسوب حاصله ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و در بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد تا رسوب کاملاً در آب حل گردد. سانتریفوژ نهایی به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به منظور جداسازی DNA خالص از سایر مواد انجام گرفت.

فنل - کلروفورم: بر طبق پروتکل استخراج DNA به روش فنل - کلروفورم (۱۵) اسیدنوکلئیک نمونه‌ها استخراج گردید.

فنل - کلروفورم اصلاح شده: پروتواسکولکس‌ها، ۳ بار با PBS شستشو داده شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز حاوی SDS (یک درصد) به ۳۰۰ میکرولیتر پروتواسکولکس اضافه گردید. در مرحله بعد ۲ میکرولیتر پروتیناز K به آن اضافه و ورتکس شد. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از طی این مرحله، ۶۵۰ میکرولیتر فنل کلروفورم

پرایمرهای (G1) کاملاً اختصاصی عمل کرده و با ژنوتایپ G6 واکنشی نشان ندادند و بالعکس. در این مطالعه ژنوتایپ G6 جدا نشد. تمام نمونه‌های حاصله تعیین توالی گشت. هیچ تفاوتی در سکانس‌های به دست آمده از بررسی حاضر در مقایسه با سکانس‌های ثبت شده در بانک ژن مشاهده نشد.

بحث

این مطالعه نشان داد که ژن *atp6* میتوکندریال گونه‌های G1 و G6 مارکر مولکولی مناسبی برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی در ایزوله‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس جدا شده در میزبانان موجود در ایران می‌باشد.

اگرچه روش‌های ملکولی مانند PCR و سایر روش‌های متکی به آن برای تاکسونومی در سطح جنس، گونه و زیرگونه مفید هستند؛ اما استفاده از این روش‌ها نیازمند دقت در طراحی پرایمر و تهیه DNA خالص در مقادیر مناسب است (۱۶ و ۱۷).

Beato و همکاران در کشور پرتغال طی سال ۲۰۱۰ با استفاده از ژن *atp6* وجود ژنوتایپ‌های G1 و G3 را در میان ۲۷ ایزوله جدا شده از گاو و گوسفند مورد تایید قرار دادند (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای در کشور ترکیه چهار ژن ریوزومال (*cox1*, *atp6*, *nad1*) برای بررسی وجود ژنوتایپ‌های این انگل مورد استفاده قرار گرفت و کارایی *atp6* نسبت به دیگر ژن‌ها مناسب لحاظ گردید (۱۹).

در مطالعه‌ای در کشور چین در سال ۲۰۰۵ بررسی مولکولی اکتینوکوکوس گرانولوزوس براساس ژن *atp6* انجام شد و کارایی و اهمیت این ژن در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی و کنترل بیماری مشخص گردید (۱۸).

آنالیز DNA هسته‌ای و میتوکندریال در مطالعات کیست هیداتید در ایران نتایج موفقیت آمیزی داشته است (۵ و ۱۷). در مطالعه اولیه‌ای که توسط Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۸ روی ایزوله‌های جدا شده از انسان و حیوانات اهلی از مناطق مختلف ایران انجام شد؛ تنوع توالی DNA درون ژن‌های میتوکندریایی *cox1* و *nad1* ۱۶ ایزوله اکتینوکوکوس گرانولوزوس بررسی شد و با استفاده از روش PCR-RFLP مشخص گردید که ژنوتایپ‌های غالب در منطقه دو ژنوتایپ G1 (سویه گوسفندی) و G6 (سویه شتری) می‌باشند (۱۴). در مطالعه فضیحی‌هرندی در سال ۲۰۰۲ که براساس مشخصات

مقدار ۷ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱/۲ درصد آگارز الکتروز و با استفاده از اتیديوم بروماید رنگ آمیزی گردید. نمونه‌های مثبت برای تایید، تعیین توالی شدند.

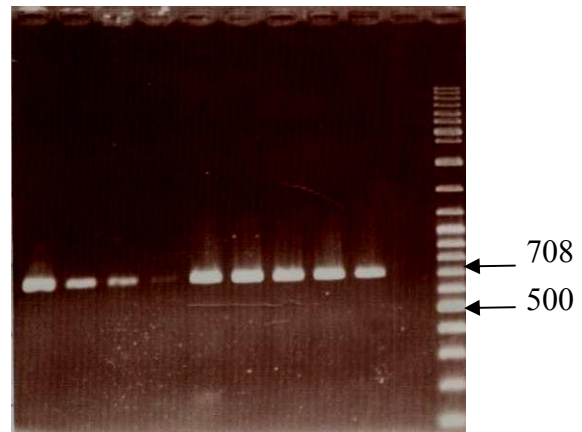
جدول ۱: تکثیر ژنوتایپ‌های G1 و G6 اکتینوکوکوس گرانولوزوس

مقدار	واکنش PCR
۱U/ul	Taq DNA Polymerase
۱۰۰ ng	DNA
۱۰ pMol	P Reverse
۱۰ pMol	P Forward
۰/۲ mM	dNTP
۰/۵ mM	MgCl2
۱۰ X	PCR buffer

یافته‌ها

در این مطالعه، کیفیت استخراج DNA با استفاده از کیت اصلاح شده سیناژن و روش فنل - کلروفرم اصلاح شده نتایج مشابه و برتری نسبت به سایر روش‌ها نشان داد.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژنوتایپ G1 اکتینوکوکوس گرانولوزوس بر روی ژل آگارز ۱ درصد. Lane 1-9: ایزوله‌های مثبت اکتینوکوکوس گرانولوزوس با پرایمر G1. Lane 10: کنترل منفی اکتینوکوکوس گرانولوزوس (Master Mix). Lane M: فاقد DNA. مارکر 100bp

با استفاده از جفت پرایمرهای طراحی شده برای ژن میتوکندریال *atp6*، انتظار باندهای اختصاصی ۷۰۸ bp برای ژنوتایپ G1 و ۷۰۵ bp برای ژنوتایپ G6 وجود داشت. همه ۳۶ کیست بارور (۱۴ نمونه گوسفندی، ۲ نمونه گاوی و ۲۰ نمونه مربوط به بز) باندهای اختصاصی ۷۰۸ bp را نشان دادند. همچنین PCR با پرایمرهای G6 بر روی این نمونه‌ها هم انجام گرفت که باندهای حاصل نشد (شکل یک). جفت

همانند دیگر مطالعات انجام شده در ایران (۱۴ و ۱۵) و سایر نقاط دنیا (۱۰ و ۱۳) وجود سویه G1 را به عنوان ژنوتایپ شایع در حیوانات اهلی ایران تایید می‌کند. براساس دانسته‌های ما این اولین مطالعه‌ای است که در ایران بر روی ژن *atp6* انجام شده است و از معدود مطالعاتی در جهان است که کل سکانس ژن *atp6* برای تشخیص تکثیر گردیده است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که ژن *atp6* میتوکندریال گونه‌های G1 و G6 مارکر مولکولی مناسبی برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی در ایزوله‌های اکینوкокوس گرانولوزس جدا شده در میزبانان موجود در ایران می‌باشد. همچنین نتایج نمونه‌های سکانس شده در این مطالعه نشان داد که توالی‌های حاصل مشابه توالی‌های گزارش شده قبلی برای این گونه‌ها می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب (شماره ۳۹۷) مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی بود. بدین وسیله از استاد ارجمند جناب آقای دکتر ناصر حقوقی راد به خاطر راهنمای‌های تأثیرگذارشان در طول انجام این مطالعه و همچنین از زحمات دکتر پدرام خرازیها قدردانی می‌شود.

References

1. Thompson RCA. Echinococcosis. In: Gillespie S, Pearson RD. Principles and practice of clinical parasitology. 1st. New York: Wiley. 2001; pp:585-612.
2. Schantz PM. Echinococcus species (agents of cystic, alveolar, and polycystic echinococcosis). In: Long SS, Pickering LK, Probeer CG, eds. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 2nd. New York: Churchill Livingstone. 2002; pp:1357-9.
3. Euzéby J. The epidemiology of hydatidosis with special reference to the Mediterranean area. *Parassitologia*. 1991 Apr; 33(1):25-39.
4. Dalimi A, Motamedi G, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, et al. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol*. 2002 Apr 30;105(2):161-71.
5. Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RC. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology*. 2002 Oct;125(Pt 4):367-73.
6. Mehrabani D, Oryan A, Sadjjadi SM. Prevalence of *Echinococcus granulosus* infection in stray dogs and herbivores in Shiraz, Iran. *Vet Parasitol*. 1999 Oct 1;86(3):217-20.
7. Moghadar N, Oryan A, Hanifepour MR. Helminths recovered

مرفولوژیکی و ویژگی‌های مولکولی ناحیه *ITS1*, *DNA*, ریپوزومی انجام گرفت؛ نتایج مشابهی به دست آمد (۵). در مطالعه دیگری که بر روی ناحیه *ITS1* ریپوزومال *DNA* و با استفاده از روش PCR-RFLP انجام گرفت؛ دو ژنوتایپ معمول G1 و G6 در ایزوله‌های انسان و گوسفند و شتر یافت شد (۲۰).

در مطالعه حاضر جفت پرایمرهای اختصاصی ژنوتایپ براساس توالی‌های موجود در ژن *atp6* اکینوкокوس گرانولوزوس طراحی گردید که در مقایسه با مطالعه Dinkel و همکاران (۲۱) از اختصاصیت بالاتری برخوردار است. در مطالعه ما دو جفت پرایمر جدید که به طور اختصاصی تمام ژن *atp6* میتوکندریال گونه‌های G1 و G6 اکینوкокوس گرانولوزوس را تکثیر می‌کرد؛ طراحی و آزمایش گردید و مشخص شد که این ژن مارکر مولکولی مناسبی برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی در ایزوله‌های اکینوкокوس گرانولوزس جدا شده در میزبانان موجود در ایران می‌باشد. با استفاده از این پرایمرهای اختصاصی، می‌توان ژنوتایپ‌های G1 و G6 اکینوкокوس گرانولوزوس را به آسانی و به سرعت تشخیص داد. این روش ساده‌تر و سریع‌تر از روش PCR-RFLP مورد استفاده در گذشته می‌باشد. نتایج حاصله در این تحقیق نیز

from, the liver and lungs of camel with special reference to their incidence and pathogenesis in Shiraz, Islamic republic of Iran. *Indian Journal of Animal Sciences*, (1992); 62: 1018-23.

8. Oryan A, Moghaddar N, Gaur SN. Metacestodes of sheep with special reference to their epidemiological status, pathogenesis and economic implications in Fars Province, Iran. *Vet Parasitol*. 1994 Feb;51(3-4):231-40.

9. Rostami Nejad M, Nazemalhosseini Mojarad E, Nochi Z, Fasihi Harandi M, Cheraghipour K, et al. *Echinococcus granulosus* strain differentiation in Iran based on sequence heterogeneity in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Helminthol*. 2008 Dec;82(4):343-7.

10. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Sep;54(2):165-73.

11. Pearson ML, Thanh H, Zhang LH, Blair D, Dai Thi HN, McManus DP. Molecular taxonomy and strain analysis in *Echinococcus*. In: *Cestode Zoonoses: echinococcosis and cysticercosis: an emergent and global problem*. NATO Science Series I: life and behavioural sciences, 341. Poland, Posnan: IOS Press. 2002; pp:205-19.

1.2. Article of SID

12. Scotto, Stefanias J, Pawlowski 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 Jan;114 (Pt 1):37-43.
13. Craig PS, Rogan MT, Allan JC. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv Parasitol*. 1996;38:169-250.
14. 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 Jul;59(1):171-4.
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning; a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; pp: 93-108.
16. McManus DP, Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*. 2003;127 Suppl:S37-51.
17. Rahimi HR, Kia EB, Mirhendi SH, Talebi A, Fasihi Harandi M, Jalali-zand N, et al. A New Primer Pair in ITS1 Region for Molecular Studies on *Echinococcus granulosus*. *Iranian Journal of Public Health* 2007;36(1):45-9.
18. Beato S, Parreira R, Calado M, Grácio MA. Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal. *Parasitol Int*. 2010 Dec;59(4):638-42.
19. Snábel V, Altintas N, D'Amelio S, Nakao M, Romig T, Yolasigmaz A, et al. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol Res*. 2009 Jul;105(1):145-54.
20. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. *Infect Genet Evol*. 2006 Mar;6(2):85-90.
21. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Wälz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, et al. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol*. 2004 Apr;34(5):645-53.

Molecular determination of *Echinococcus granulosus* isolated from hydatid cyst using mitochondrial *atp6* gene

Rostami Nejad M (BS)¹, Nazemalhosseini Mojarad E (MSc)^{*2}, Taghipour N (MSc)³
Nochi Z (MSc)⁴, Cheraghpour K (MSc)⁵, Dabiri H (PhD)⁶
Mohebbi SR (PhD)⁷, Noorinayer B (MD)⁸, Zali MR (MD)⁹

¹Researcher, BS in Veterinary Laboratory, The Research Center of Gastroenterology and Liver Disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ²Researcher, PhD Student in by Research, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ³Researcher, MSc in Parasitology, Department of Parasitology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁴Researcher, MSc in Microbiology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁵Researcher, MSc in Parasitology, Department of Parasitology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. ⁶Assistant Professor, Department of Microbiology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁷Assistant Professor, Department of Virology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁸Assistant Professor, Department of Gastroenterology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁹Professor, Department of Gastroenterology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Several strains of the *Echinococcus granulosus* have been described based on morphological characters, intermediate host specificity and/or genetic analysis of mitochondrial and nuclear DNA. The aim of this study was to characterize different *E. granulosus* isolates by using sequences of mitochondrial *atp6* gene.

Materials and Methods: In this study, Sixty infected liver and lungs of cattle, sheep and goats were collected from the abattoir of Varamin city-Iran during 2008. Protoscoleces were removed from each fertile cyst and DNA extracted. New and specific primers were designed for two existing genotypes (G1 and G6) of *E. granulosus* known to occur in Iran and applied in PCR reactions.

Results: The new primers selectively amplified the G1 and G6 genotypes of *E. granulosus* with specific bands of 708 and 705 bp respectively. The G1 genotype was identified in all fertile cyst samples.

Conclusion: This study showed that the new primer pairs which specifically amplify portions of the mitochondrial *atp6* gene of the G1 and G6 strains of *Echinococcus granulosus* are proper molecular marker for investigating genetic variation in a number of isolates of *E. granulosus* from a range of hosts (sheep, goats, cattle) in Iran. The result of sequenced samples showed that our sequences were the same as those reported previously for these strains.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, *atp6* gene, G1 genotypes, G6 genotypes

* **Corresponding Author:** Nazemalhosseini Mojarad E (MSc), E-mail: ehsanmojarad@gmail.com

Received 6 January 2010 Revised 12 December 2010 Accepted 2 January 2011

This paper should be cited as: Rostami Nejad M, Nazemalhosseini Mojarad E, Taghipour N, Nochi Z, Cheraghpour K, Dabiri H, Mohebbi SR, Noorinayer B, Zali MR. [Molecular determination of *Echinococcus granulosus* isolated from hydatid cyst using mitochondrial *atp6* gene]. J Gorgan Uni Med Sci. Summer 2010;13(2):61-67. [Article in Persian]