

Genotype Identification of Echinococcus Granulosus from Paraffin-Embedded Tissues of Hydatid cysts Isolated from Human by PCR-RFLP

Shirzad Gholami¹,
Masoud Sosarai²,
Mahdi Fakhar¹,
Mahdi Sharif¹,
Ahmad Daryani¹

¹ Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 28, 2011; Accepted August 10, 2011)

Abstract

Background and purpose: Identifying the various genotypes of *Echinococcus granulosus* as the agent of hydatid cysts in endemic areas can influence the disease control programs, particularly in humans. Therefore, this study was conducted to identify the different genotypes of *Echinococcus granulosus* from paraffin-embedded tissues of hydatid cysts isolated from human by PCR-RFLP.

Materials and methods: To identify the molecular characteristics of *Echinococcus granulosus*, tissue samples from 30 human patients infected with hydatid cysts were collected from hospitals across the province of Golestan. DNA was extracted and characterized by PCR-RFLP method. In this study, 3 restriction endonuclease enzymes were used.

Results: PCR product obtained from amplification of *Echinococcus granulosus* rDNA-ITS1 from human hydatid cysts showed two different patterns of DNA bands in human isolates. In spite of the difference between human isolates in the size of DNA bands (1000 base pairs), the use of BD1/4S and EGF1/EGR2 primers showed that these isolates are to some extent similar in the size of band (391 base pairs). PCR products by RFLP method showed a different pattern of genotype or strain with TaqI restriction enzyme in human isolates. No change in the size of DNA bands were observed with MspI and AluI restriction enzyme in human isolates.

Conclusion: Therefore, genotypic differences and similarities between the size of DNA bands of *Echinococcus granulosus* from human isolates with PCR-RFLP method indicated the occurrence of different genotypes of *Echinococcus granulosus* in different parts of Golestan Province.

Key words: Human hydatid cyst; *E. granulosus*; PCR-RFLP; Genotype

J Mazand Univ Med Sci 2011; 21(85): 10-19 (Persian).

تعیین ژنوتایپ های اکینو کوکوس گرانولوزوس از بافت های پارافینی کیست هیداتید انسانی به روش PCR-RFLP

شیرزاد غلامی^۱مسعود سوسرایي^۲مهدی فخار^۱مهدی شریف^۱احمد دریانی^۱

چکیده

سابقه و هدف: شناسایی ژنوتایپ های مختلف اکینو کوکوس گرانولوزوس به عنوان عامل کیست هیداتیک در مناطق اندمیک بیماری می تواند بر روی برنامه های کنترل بیماری به ویژه در انسان تاثیر به سزایی داشته باشد. این مطالعه جهت تعیین ژنوتایپ های اکینو کوکوس گرانولوزوس از بافت های پارافینی کیست هیداتید انسانی به روش PCR-RFLP انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی برای تعیین خصوصیات مولکولی اکینو کوکوس گرانولوزوس، DNA ژنومی ۳۰ نمونه پارافینه انسانی کیست هیداتیک که از بیمارستان های سراسر استان گلستان جمع آوری شده بود پس از استخراج DNA با روش مولکولی PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از سه نوع آنزیم محدود الاثر تجزیه کننده اندونوکلئازی استفاده شد. **یافته ها:** محصول PCR به دست آمده از تکثیر rDNA-ITS1 اکینو کوکوس گرانولوزوس کیست هیداتیک انسانی دو الگوی متفاوت از باندهای DNA را در ایزوله های انسانی نشان داد. از طرفی با وجود تفاوت بین ایزوله های انسانی در اندازه قطعه DNA (۱۰۰۰ جفت باز)، با استفاده از پرایمرهای BD1/4S و EGF1/EGR2 این ایزوله ها تا حدودی در اندازه قطعه (۳۹۱ جفت باز) با یکدیگر تشابه دارند. محصول PCR به روش RFLP نشان دهنده الگوی متفاوت با آنزیم TaqI در ایزوله انسانی بود. از طرفی با آنزیم MspI و AluI تغییری در اندازه قطعات در ایزوله انسانی مشاهده نشد.

استنتاج: تفاوت و تشابه ژنوتایپی بین اندازه قطعات باندهای DNA اکینو کوکوس گرانولوزوس ایزوله انسانی با روش PCR-RFLP بیانگر وجود ژنوتایپ های متفاوت انگل در مناطق مختلف استان گلستان است.

واژه های کلیدی: کیست هیداتیک انسانی، اکینو کوکوس گرانولوزوس، روش PCR-RFLP، ژنوتایپ

مقدمه

انسان و حیوان دارد و همچنین از نظر ضررهای اقتصادی نیز بسیار با اهمیت است (۱-۳). این بیماری توسط مراحل لاری سستودها (متاسستود) از جنس اکینو کوکوس (Echinococcus) یعنی اکینو کوکوس گرانولوزوس

بیماری هیداتیدوزیس (اکینو کوکوزیس) از بیماری مشترک بین انسان و حیوانات (Zoonotic) است که در بسیاری از مناطق دنیا به خصوص در کشورهای منطقه مدیترانه شایع است. این بیماری تاثیر مهمی در سلامت

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۲۳-۸۸ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

E-mail: sgholami@mazums.ac.ir

مؤلف مسئول: شیرزاد غلامی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

۱. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. دانشجوی کارشناس ارشد انگل شناسی دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۳/۸ تاریخ تصویب: ۹۰/۵/۱۹

مختلف از جمله استرالیا، چین، آرژانتین، کنیا، هند و لهستان گزارش شده‌اند (۲۲-۲۰).

هرچند خصوصیات گونه‌های اکینو کوکوس گرانولوزوس از ایران در انسان و دام‌ها (میزبانان واسط) با روش‌های مرفولوژی و بیوشیمیایی و مولکولی در ایران مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۴،۲۳،۱۴،۱۰) ولی مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهند که در سال‌های اخیر تنها از شیوع بیماری در دنیا کاسته نشده بلکه در بسیاری از کشورها شیوع و شدت بیماری در انسان و حیوانات در حال گسترش است (۳،۲). در ایران آلودگی انسان به این بیماری از نقاط مختلف کشور گزارش گردیده است (۸-۶) این بیماری در دام‌هایی نظیر گوسفند، بز، گاو و شتر به میزان نسبتاً بالایی مشاهده می‌شود (۹). از طرفی آلودگی سگ‌ها به خصوص سگ‌های ولگرد و گله به کرم بالغ در تمام نقاط کشور مشاهده شده است (۷،۴،۶). معمولاً در مناطقی که بیماری اندمیک است، از نظر بیولوژی، ژنتیکی یا استرینی تنوع نسبتاً زیادی در گونه اکینو کوکوس گرانولوزوس وجود دارد (۱۰،۱۱). مطالعات متعدد ثابت نموده که در این گونه مناطق، اکینو کوکوس به صورت کمپلکسی از استرین‌های مختلف وجود دارد. که این تنوع ممکن است بر روی اپیدمیولوژی و بیماری‌زایی کیست هیداتیک اثر گذارد. علاوه بر این دلایلی وجود دارد که برخی استرین‌ها برای انسان نسبت به سایر استرین‌ها، بیماری‌زایی بیشتری دارند (۱۲،۱۳).

در حال حاضر برای شناخت استرین‌های اکینو کوکوس گرانولوزوس علاوه بر خصوصیات مرفولوژی، بیوشیمیایی و زیستی از روش‌های مولکولی به خصوص روش‌هایی بر مبنای PCR-RFLP به ویژه ناحیه ITS1 و سکانس rDNA استفاده می‌شود این ناحیه (ITS-1) از جمله مناطق ژنی مناسب موجود در rDNA می‌باشد که با کیفیت و کمیت مناسب برای تهیه محصولات PCR قوی و خالص برای مطالعات مولکولی دارای اهمیت می‌باشد (۱۷-۱۴). تاکنون ۱۰ ژنوتیپ مجزا (G1-G10) از این انگل با استفاده از روش‌های مولکولی شناسائی شده است (۲۰-۱۸). این استرین‌ها از مناطق

مختلف از جمله استرالیا، چین، آرژانتین، کنیا، هند و لهستان گزارش شده‌اند (۲۲-۲۰).

هرچند خصوصیات گونه‌های اکینو کوکوس گرانولوزوس از ایران در انسان و دام‌ها (میزبانان واسط) با روش‌های مرفولوژی و بیوشیمیایی و مولکولی در ایران مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۴،۲۳،۱۴،۱۰) ولی مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهند که در سال‌های اخیر تنها از شیوع بیماری در دنیا کاسته نشده بلکه در بسیاری از کشورها شیوع و شدت بیماری در انسان و حیوانات در حال گسترش است (۳،۲). در ایران آلودگی انسان به این بیماری از نقاط مختلف کشور گزارش گردیده است (۸-۶) این بیماری در دام‌هایی نظیر گوسفند، بز، گاو و شتر به میزان نسبتاً بالایی مشاهده می‌شود (۹). از طرفی آلودگی سگ‌ها به خصوص سگ‌های ولگرد و گله به کرم بالغ در تمام نقاط کشور مشاهده شده است (۷،۴،۶). معمولاً در مناطقی که بیماری اندمیک است، از نظر بیولوژی، ژنتیکی یا استرینی تنوع نسبتاً زیادی در گونه اکینو کوکوس گرانولوزوس وجود دارد (۱۰،۱۱). مطالعات متعدد ثابت نموده که در این گونه مناطق، اکینو کوکوس به صورت کمپلکسی از استرین‌های مختلف وجود دارد. که این تنوع ممکن است بر روی اپیدمیولوژی و بیماری‌زایی کیست هیداتیک اثر گذارد. علاوه بر این دلایلی وجود دارد که برخی استرین‌ها برای انسان نسبت به سایر استرین‌ها، بیماری‌زایی بیشتری دارند (۱۲،۱۳).

در حال حاضر برای شناخت استرین‌های اکینو کوکوس گرانولوزوس علاوه بر خصوصیات مرفولوژی، بیوشیمیایی و زیستی از روش‌های مولکولی به خصوص روش‌هایی بر مبنای PCR-RFLP به ویژه ناحیه ITS1 و سکانس rDNA استفاده می‌شود این ناحیه (ITS-1) از جمله مناطق ژنی مناسب موجود در rDNA می‌باشد که با کیفیت و کمیت مناسب برای تهیه محصولات PCR قوی و خالص برای مطالعات مولکولی دارای اهمیت می‌باشد (۱۷-۱۴). تاکنون ۱۰ ژنوتیپ مجزا (G1-G10) از این انگل با استفاده از روش‌های مولکولی شناسائی شده است (۲۰-۱۸). این استرین‌ها از مناطق

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۳۰ مورد از نمونه‌های بافتی کیست هیداتید انسانی فیکس شده در فرمالین و قرار گرفته شده در پارافین FFPT (Formalin fixed paraffin embedded) بین سال‌های ۸۳ تا ۸۸ از سراسر استان گلستان (بیمارستان‌های حکیم جرجانی گرگان، ۵ آذر، کلینیک دکتر موسوی، خاتم الانبیاء گنبد و شهداء گنبد) در سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری

شد. سپس نمونه‌ها به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی مازندران انتقال داده شد. همه نمونه‌ها دارای کدهایی بودند که براساس آن مشخصات کامل هر نمونه یادداشت گردید.

دپارافینه کردن نمونه های پارافینی:

در آزمایشگاه پاتولوژی برش‌های ۶ تا ۱۰ میکرونی بلوک‌های پارافینی هر بیمار در تیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری قرار داده شد. طبق روش Schneider و همکاران برای استخراج DNA به هر نمونه ۱ ml گزریل اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. سپس نمونه‌ها در دور ۱۵۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی آن دور ریخته شد. بعد از مرحله پارافین‌زدایی جهت آنگیری، نمونه‌ها به ترتیب در اتانول ۱۰۰، ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درصد قرار داده شدند. در پایان این مرحله نمونه‌ها دپارافینه شده و به هر نمونه ۱ سی سی الکل ۷۰ درجه اضافه شد (۲۸).

برای استخراج DNA، نمونه‌های کیست هیداتیک نگهداری شده در الکل ۷۰ درصد با PBS با pH برابر ۷/۲ شستشو شد. سپس بر طبق روش Sambrook و همکاران (۲۹) و شربت خواری و همکاران (۳۰) از روش هضم انگل در SDS و پروتیناز K با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) مراحل استخراج DNA انجام شد. در این مرحله ۲۰۰ ml از هر نمونه در ۱۰۰ µl بافر لیزکننده و در ۵µl پروتیناز K هضم و در دمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. DNA ژنومی انگل طی مراحل مختلف استخراج و پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE به آن در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. برای اطمینان از وجود DNA، غلظت DNA نمونه‌ها با روش اسپکترومتری (SOD) تعیین شد (۲۸، ۲۹).

تکثیر و هضم آنزیمی *ITS1-rDNA* به روش *PCR-RFLP*: تکثیر ناحیه *ITS1* (Internal Transcribed Spacer 1) به روش PCR با تغییراتی و بر اساس پرایمرهای طراحی شده بر طبق روش، فصیحی و همکاران، Bowles و

McManns و شربت خواری و همکاران با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف ساخت کشور آلمان انجام شد (۲۶، ۱۴، ۹). برای تکثیر ناحیه *ITS1* از *rDNA* به روش PCR از پرایمرهای اختصاصی که روی ژن‌های ۲ ساب یونیت ۱۸S و ۵/۸S DNA ریبوزومی (*rDNA*) متصل می‌شوند، استفاده شد. در این مطالعه از ۲ جفت پرایمر *BD1/4S* و *EGF1/EGR2* (تهیه شده توسط شرکت تکاپوزیست) استفاده شد. این پرایمرها باعث ازدیاد قطعه *ITS1* می‌شود.

- 1- Forward, BD1: 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3'
Reverse, 4S: 5'-TCTAGATGCGTTTCGAA(G/A)TGTCGATG-3'
2- Forward, EGF1: 5'-CCAAACTTGATCATTTAGAGGAAG-3',
Reverse, EGR2: 5'-TATGGGCCAAATTCATCATTACC-3'

برای تکثیر قطعه *ITS1* حجم ۵۰ میکرولیتری شامل DNA template ۵ µl (۲۰۰ ng/µl)، (pH=۹)، ۵۰۰ Mm KCL، ۱۰ mM Tris-HCl buffer، ۲/۵ Mm MgCL2 از هر ۲/۵ Mm از هر ۲/۵ Mm dNTP، از هر پرایمر ۲۴pmol و ۱/۵ unit از Taq polymerase در محلول واکنش PCR استفاده شد. شرایط PCR برای هر ایزوله شامل: دناتوره اولیه یک سیکل در ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل در ۹۵°C دناتوره به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بوده است. محصول PCR بعد از تکثیر از طریق ژل آگاروز ۱ درصد در بافر TBE (۱% (w/v) Tris-acetate-EDTA) الکتروفورز گردید. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و باندهای DNA توسط دستگاه ژل داکت متصل به کامپیوتر (Gel Chemi Doc, BioRad) مشاهده گردید. جهت هضم آنزیمی محصول PCR، برای هر ایزوله جداگانه از ۳ آنزیم محدود الاثر تجزیه کننده اندونوکلازی *Alu1*، *Msp1* و *Taq1* با مشخصات زیر و با غلظت‌های مشخص در ۱۰X بافر تهیه شده توسط شرکت فرمنتاس به مدت ۶ تا ۱۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه استفاده شد.

تکثیر شده کیست هیداتید است (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱).

جدول شماره ۱: تعداد و اندازه تقریبی قطعات DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس بعد از تکثیر با PCR با پرایمرهای BDI/4S و EGF1/EGF2 در ایزوله انسانی

اندازه قطعه DNA ایزوله انسانی	ایزوله	پرایمر
۳۹۱ Bp		BDI / 4S
۳۹۱ و ۱۰۰ Bp		EGF1/ EGF2



تصویر شماره ۱: باندهای DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس پس از تکثیر قطعه ITS1 از DNA ریپوزومی ایزوله‌های انسانی با روش PCR با استفاده از پرایمر EGF1/EGR2 (تعداد و اندازه باند).

هضم آنزیمی DNA نمونه‌های پارافینه کیست هیداتید انسانی با آنزیم‌های *Alu1* و *Msp1*, *Taq1*:

جهت هضم اندونوکلئازی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR نمونه‌های پارافینه کیست هیداتید انسانی از آنزیم محدودالایر تجزیه کننده‌اند و نوکلئازی *Msp1*، *Alu1* و *Taq1* با توالی متفاوت از نوکلئوتیدی‌ها استفاده شد. هضم آنزیمی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس

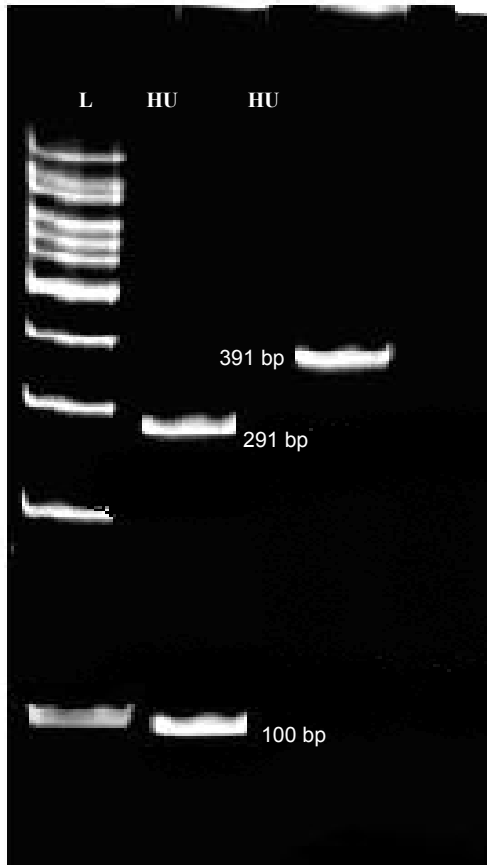
[*AluI* (5' AG/CT 3'), *MspI* (5' C/CGG 3'), *TaqI* (5' T/CGA 3')] (15-20µl, PCR product with 2 µl assay buffer, 2 µl BSA, 7 µl sterile distilled water and 1 µl restriction enzymes 8-10 U/µl at 37°C)

پس از هضم آنزیمی محصول PCR-RFLP از طریق ژل آگاروز ۳ درصد در بافر TBE با ولتاژ ۵۰ تا ۱۰۰ میلی ولت الکتروفورز گردید. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و باندهای DNA توسط دستگاه ژل داکت متصل به کامپیوتر مشاهده و تصاویر تهیه گردید. اندازه قطعات محصولات PCR و هضم آنزیمی RFLP هر ایزوله بوسیله نرم افزار UVIDOC تعیین و الگوهای مختلف DNA با یکدیگر مقایسه شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر DNA نمونه‌های بافتی کیست هیداتید انسانی فیکس شده در فرمالین و قرار گرفته شده در پارافین (FFPT) از بیمارستان‌های سراسر استان گلستان با استفاده از روش مولکولی (PCR-RFLP) مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا ناحیه ITS1 از rDNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس به روش PCR تکثیر و سپس با الگوهای RFLP با استفاده از آنزیم اندونوکلئاز مقایسه گردید. نمونه‌ها از کیست‌های کبد (۹۲ درصد)، طحال (۴ درصد) و ریه (۴ درصد) بیماران جراحی شده بودند. میانگین سنی بیماران ۳۹ سال بود که مسن ترین فرد مبتلا مرد ۷۲ ساله و جوانترین افراد ۲ زن ۱۸ ساله بودند. درصد بیماران زن و مرد به ترتیب ۵۱/۸ درصد و ۴۸/۲ درصد بودند.

محصول PCR به دست آمده از تکثیر rDNA-ITS1، الگوی قطعه تک باندهای DNA را در ایزوله انسانی از نظر تعداد و اندازه نشان داد الگوی باندهای محصول PCR از نظر اندازه باندها بر حسب نوع پرایمر متفاوت مشاهده شد. اندازه باندهای DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس با پرایمر BDI و ۴S یک باند با اندازه ۳۹۱ جفت باز و با پرایمر EGF1 و EGR2 یک باندهای با دو اندازه متفاوت ۱۰۰۰ و ۳۹۱ جفت باز مشاهده شد که نشان دهنده تفاوت ژنوتایپی در الگوی قطعات DNA



تصویر شماره ۲: الگوی باندهای DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله های انسانی پس از هضم آنزیمی قطعات ITS-1 با روش RFLP با آنزیم Msp1 (تعداد و اندازه باند)

آنزیم Taq1

با هضم آنزیمی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR (با پرایمر GF1/EGR2) ایزوله های انسانی با آنزیم Taq1 یک الگوی دو باندهی هتروزیگوتی با اندازه های ۲۸۱ و ۱۱۰ جفت باز و الگوی سه باندهی ۲۵۰، ۶۰۰ و ۱۵۰ جفت باز مشاهده شد (جدول شماره ۲) و در هضم آنزیمی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR با پرایمر BD1/4S ایزوله های انسانی با این آنزیم الگوی دو باندهی در اندازه ۲۵۰ و ۱۴۱ جفت باز مشاهده شد (جدول شماره ۲ و تصویر شماره ۳).

الگوهای متفاوتی از DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس از نظر ژنتیکی با دو و سه باند DNA با اندازه های متفاوت مشاهده شد که نشان دهنده تفاوت در

ایزوله های انسانی بر روی ژل آگاروز با غلظت ۳ درصد و الگوی حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم های فوق به شرح زیر می باشد:

آنزیم Alu1

با عمل هضم آنزیمی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR (با پرایمر BD1/4S) ایزوله های انسانی با آنزیم ALU1، یک الگوی از DNA تک باندهی در اندازه ۳۹۱ جفت باز مشاهده شد (جدول شماره ۲). یعنی عمل هضم آنزیمی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR با پرایمر GF1/EGR2 ایزوله های انسانی با آنزیم ALU1 انجام نشده است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: تعداد و اندازه تقریبی قطعات باندهای DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR تکثیر شده با دو پرایمر بعد از هضم آنزیمی با آنزیم های متفاوت محدودالانر تجزیه کننده اندونوکلئازی در ایزوله انسانی

اندازه قطعات باندهای DNA با پرایمر BD1/4S	اندازه قطعات باندهای DNA EGF1/EGF2 با پرایمر	باندهای آنزیم / DNA
۳۹۱bp	-	ALU1
۳۹۱bp	۲۹۱ و ۱۰۰bp	MSP1
۲۵۰ و ۱۴۱bp	۲۸۱ و ۱۱۰bp ۶۰۰ و ۲۵۰ و ۱۵۰bp	Taq1

آنزیم Msp1

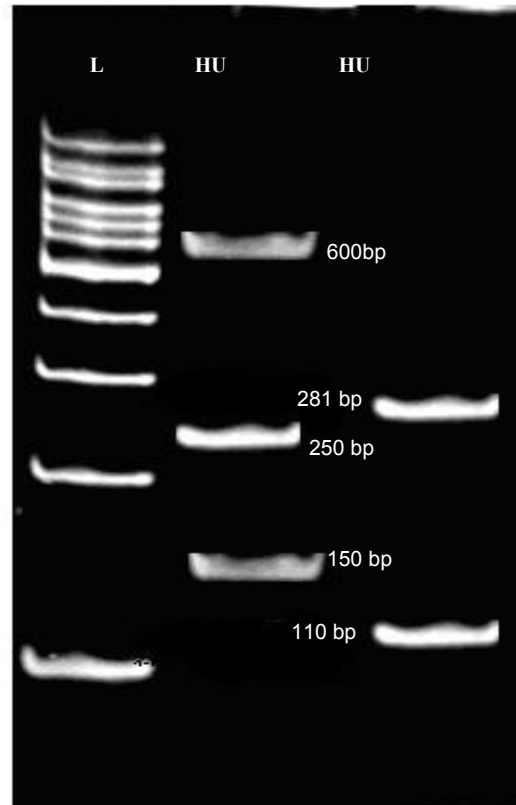
با هضم آنزیمی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR (با پرایمر GF1/EGR2) ایزوله های انسانی با آنزیم Msp1، یک الگوی یک باندهی با اندازه های ۲۹۱ و ۱۰۰ جفت باز مشاهده شد و در هضم آنزیمی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR با پرایمر BD1/4S ایزوله های انسانی با این آنزیم یک باند DNA با اندازه ۳۹۱ جفت باز مشاهده شد (جدول شماره ۲ و تصویر شماره ۲).

متفاوت ژنوتایپی یا استرینی با آنزیم‌های Taq1 در ایزوله انسانی مشاهده شد. از طرفی در این مطالعه با آنزیم Msp1 و Alu1 تغییری در اندازه قطعات در ایزوله انسانی مشاهده نشد. تشابه اندازه و تعداد باندهای DNA با آنزیم Alu1 پس از هضم آنزیمی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس، در بین ایزوله‌های انسانی مشاهده شد (جدول شماره ۲).

الگوی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس پس از هضم آنزیمی با آنزیم Msp1 با قطعات دو باندهی DNA در ایزوله انسانی ۲۹۱ و ۱۱۰ جفت باز و قطعات تک باندهی DNA در اندازه ۳۹۱ جفت باز مشاهده شد. الگوی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس پس از هضم آنزیمی با آنزیم Taq1 با قطعات دو باندهی DNA در اندازه‌های ۲۸۱ و ۱۱۰ جفت باز و اندازه‌های ۲۵۰، ۶۰۰ و ۱۵۰ جفت باز مشاهده شد، که بیانگر وجود آلل‌های متفاوت (هتروزیگوت) در DNA پس از عمل هضم آنزیمی با روش RFLP است. علاوه بر این، الگوی RFLP اکتینوکوکوس گرانولوزوس با آنزیم Msp1 و Alu1، قطعات تک باندهی DNA در اندازه‌های ۳۹۱ جفت باز است که نشان‌دهنده الگوی مشابه ژنوتیپی از توالی DNA (Homolog) اکتینوکوکوس گرانولوزوس یا تشابه درون گونه‌ای انگل در ایزوله انسانی است.

در مطالعه شربت خوری و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مناطق مختلف ایران از میزبان‌های واسط مانند گاو، گوسفند، بز، شتر و انسان، از ۶ ایزوله، ژنوتیپ G6 و از ۲۳ ایزوله، ژنوتیپ G1 را گزارش نمودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۷). فصیحی هرنندی و همکاران در سال ۲۰۰۲ استرین‌های گوسفندی (G6) و شتری (G6) با الگوهای مشابه‌ای از RFLP بین ایزوله‌های گوسفندی و شتری را با آنزیم‌های Alu1، Msp1 و Rsa1 با روش PCR-RFLP ناحیه ITS1 از نواحی جغرافیایی متفاوت در ایران گزارش کردند (۹). همچنین وجود استرین‌های متفاوت اکتینوکوکوس گرانولوزوس در ایران با روش مولکولی (PCR-RFLP)

آلل‌های DNA می‌باشد، از طرفی تک باندهایی از DNA با اندازه متفاوت نیز بعد از هضم آنزیمی وجود دارد که بیانگر تشابه در آلل‌های DNA (Homolog) با DNA محصول PCR قبل از هضم آنزیمی است. بنابراین نتایج بیانگر وجود ژنوتایپ‌های متفاوت اکتینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله‌های انسانی در استان گلستان است.



تصویر شماره ۳: الگوی باندهای DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله‌های انسانی پس از هضم آنزیمی قطعات ITS-1 با روش RFLP با آنزیم Taq1 (تعداد و اندازه باند)

بحث

در مطالعه حاضر جهت هضم اندونوکلئازی DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس ایزوله‌های انسانی با روش RFLP از سه آنزیم محدود الاثر Msp1, Alu1 و Taq1 با توالی متفاوت از نوکلئوتیدها استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده دو الگوی متفاوت از قطعات DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس بود یعنی الگوی تا حدودی

در مطالعه Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۸، احمدی و دلیمی در سال ۲۰۰۶ و غلامی و همکاران در سال ۲۰۰۹ با روش‌های مرفولوژی و مولکولی در ایزوله‌های حیوانی و انسانی با چرخه‌های سگ-گوسفند و سگ-شتر به عنوان چرخه‌های فعال انگل مورد تأیید قرار گرفته است (۳۲،۳۱،۲۳) که می‌تواند در انتقال عفونت به انسان و سایر میزبان‌های واسط تصادفی بر طبق مطالعات محققین نقش داشته باشد (۳۴).

در مطالعات سال‌های اخیر روش تعیین ژنوتایپ‌های یا استرین‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس از بافت‌های پارافینه کیست‌های هیداتید انسانی ثابت شده در فرمالین (FFPTs) به لحاظ اهمیت مورد استفاده قرار گرفت (۲۸). لذا در مطالعه مولکولی حاضر DNA نمونه‌های کیست هیداتید انسانی از استان گلستان برای اولین بار با استفاده از روش مولکولی (PCR-RFLP of rDNA-ITS1) مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه بیش از یک قطعه ITS1 از DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس در اندازه‌های متفاوت بعد از تکثیر محصول PCR نمونه‌های کیست هیداتید پارافینه انسانی از این استان در شمال شرق ایران مشاهده شد. بررسی محصول PCR ناحیه rDNA-ITS1 مربوط به ایزوله‌های انسانی نشان‌دهنده تشابه زیادی بین ایزوله‌های گوسفندی و گاوی و تا حدودی تفاوت با ایزوله‌های انسانی و شتری است. همچنین مقایسه تعداد و اندازه قطعات rDNA-ITS1 مربوط به ایزوله‌های انسانی با یکدیگر نشان‌دهنده اختلاف در اندازه قطعات به ویژه در استفاده از پرایمرهای EGF1/EGR2 و BD1/4S می‌باشد.

شهنازی و همکاران از اصفهان در سال ۲۰۱۰ در کیست‌های هیداتید انسانی با پرایمر BD1/4S، اندازه DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس را ۱۰۰۰ و ۱۱۰۰ جفت باز گزارش کردند (۲۴). همچنین در مطالعه عشرت بیگم کیا و همکاران در سال ۲۰۱۰ ژنوتیپ‌های ۳۰ نمونه کیست هیداتید انسانی را با روش PCR و روش

RFLP با پرایمرهای EGF1/EGR2 تعیین نمودند. در این مطالعه پس از تکثیر DNA اندازه باندهای DNA تقریباً ۱ کیلو جفت باز (۱۰۰۰ جفت باز) گزارش شد (۳۳). در مطالعه غلامی و همکاران در سال ۲۰۰۹ اندازه قطعات DNA-ITS1 ایزوله‌های کبیدی و ایزوله‌های گوسفندی، گاوی و شتری از ایران اندازه مشابهی را با یک و دو قطعه با اندازه‌های ۱ کیلو جفت باز و کمتر از آن (۹۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز) گزارش شد (۳۲). با مقایسه نتایج مطالعات مختلف با مطالعه حاضر در ایزوله انسانی تشابه در باند با اندازه ۱۰۰۰ جفت باز و تفاوت در باند با اندازه ۳۹۱ جفت باز مشاهده می‌شود. از طرفی در مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۸ در ایران بر روی ۴ ایزوله انسانی و ۱۶ ایزوله حیوانی (از حیوانات اهلی شامل گوسفند، گاو، بز و شتر) اکتینوکوکوس گرانولوزوس به روش مولکولی (Mitochondrial DNA) از ژن COI صورت گرفت استرین‌های گوسفندی (G1) با چرخه گوسفند-سگ و استرین شتری (G6) با چرخه شتر-سگ و ژنوتیپ G1 در ۴ ایزوله انسانی (استرین گوسفندی) با قطعاتی در حدود ۳۶۶ و ۳۹۰ جفت باز از مناطق متفاوت در ایران گزارش گردید. در این مطالعه اندازه تقریبی قطعه DNA با اندازه‌ای در حدود ۳۵۰ تا ۴۰۰ جفت باز در نمونه‌های انسانی و حیوانی مشاهده شد که با نتایج مطالعه حاضر تا حدودی مطابقت دارد (۲۳).

در مطالعه حاضر DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس نمونه‌های پارافینه کیست هیداتید انسانی در الگوی باندهای محصول PCR ایزوله‌های انسانی از نظر تعداد یک باند و اندازه باندها بر حسب نوع پرایمر متفاوت بود. الگوی باندهای نمونه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس ایزوله‌های انسانی محصول PCR با پرایمر EGF1/EGR2 در اندازه ۱۰۰۰ و ۳۹۱ جفت باز و با پرایمر BD1/4S در اندازه ۳۹۱ جفت باز مشاهده شد (جدول شماره ۱). در سایر بررسی‌ها Bowles و McManus در سال ۱۹۹۴ (۱۴)، Scott و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۱۴) دو قطعه از

بیانگر وجود دو ژنوتایپ متفاوت اکینو کوسوس گرانولوزوس یا استرینی در مناطق مختلف استان گلستان است، که نیاز به مطالعات تکمیلی به روش مولکولی در ایزوله‌های انسانی و حیوانی دارد.

سپاسگزاری

از کلیه همکاران آقای دکتر علیرضا رفیعی، سرکار خانم زهرا حسینی خواه در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و آقای گوهردهی و باستانی در بخش انگل‌شناسی دانشکده پزشکی و پرسنل بخش‌های پاتولوژی بیمارستان‌های حکیم جرجانی، ۵ آذر گرگان و خاتم الانبیا و شهید مطهری گنبد و کارکنان کشتارگاه‌های استان گلستان که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. همچنین از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه برای مساعدت و همکاری شان کمال تشکر را داریم. این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد مسعود سوسرای می‌باشد.

ITS1 از ایزوله‌های گوسفندی و خوک و یک قطعه در ایزوله انسانی و فسیحی و همکاران در سال ۲۰۰۲ و احمدی و دلیمی در سال ۲۰۰۶ در ایران در ایزوله‌های گوسفندی، شتری و انسانی را با اندازه‌های قطعات DNA-ITS1 تقریباً مشابه (اندازه قطعات ۰/۹، ۱ تا ۱/۱ کیلو جفت باز) گزارش کردند (۳۱،۹)، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر در اندازه قطعه اول ۳۹۱ جفت باز اختلاف دارد. این اختلاف وجود ژنوتیپ‌ها متفاوت در منطقه و تاثیر آن‌ها در ایجاد بیماری کیست هیداتیک در انسان را نشان می‌دهد. در نتیجه الگوی مشابهی (Homolog) از DNA با آنزیم MspI و AluI در ایزوله انسانی مشاهده شد. تشابه ژنوتیپی یا استرینی در اکینو کوسوس گرانولوزوس ایزوله انسانی بیانگر الگوی مشابه ژنوتیپی از توالی DNA از نظر تعداد و اندازه باندها پس از عمل هضم آنزیمی است. بنابراین تفاوت و تشابه ژنتیکی درون گونه‌ای اکینو کوسوس گرانولوزوس بین ایزوله‌ها با روش PCR-RFLP در استان گلستان

References

- Eckert J, Schantz PM, Gasser RB, Torgerson PR, Bessonov AS, Movsessian SO. Geographic distribution and prevalence. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS (eds) WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Human and animals: A public health problem of global concern. Paris: World Organisation for Animal Health. 2001; pp. 100-142.
- Sariozkan S, Yalçın C. Estimating the production losses due to cystic echinococcosis in ruminants in Turkey. *Vet Parasitol* 2009; 163(4): 330-334.
- 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; 105(1): 145-154.
- Gholami Sh, Mobedi E, Ziaee H, Sharif M. Intestinal helminth parasites in dog and jackal in inferent areas Sari in the year 1992-1993. *J Mazand Univ Med Sci* 1999; 9(22,23): 5-12 (Persian).
- Dalimi A, Mobedi I. Helminth parasites of carnivores in northern Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86(4): 395-397.
- Ansari-Lari M. A retrospective survey of hydatidosis in livestock in Shiraz, Iran, based on abattoir data during 1999-2004. *Vet Parasitol* 2005; 133(1): 119-123.
- Dalimi A, Motamedi G, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, et al. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol* 2002; 105(2): 161-171.
- Yousofi Darani H, Avijgan M, Karimi K, Manouchehri K, Masood J. Seroepidemiology

- of Hydatid Cyst in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Iran. *Iranian J Publ Health* 2003; 23(2): 31-33.
9. 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; 125(Pt 4): 367-373.
 10. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 54(2): 156-173.
 11. McManus DP, Rishi AK. Genetic heterogeneity within *Echinococcus granulosus*: isolates from different hosts and geographical areas characterized with DNA probes. *Parasitology* 1989; 99(Pt 1): 17-29.
 12. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2003; 127(Pt 3): 207-215.
 13. Bowles J, McManus DP. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop*. 1993; 53(3-4): 291-305.
 14. Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mole Biochem Parasitol* 1993; 57(2): 231-240.
 15. Thompson RCA. Biology and systematics of *Echinococcus*. In *Echinococcus and Hydatid Disease* (ed. Thompson RCA, Lymbery AJ). Wallingford: CAB International; 1995. pp. 1-50.
 16. Thompson RC, Lymbery AJ. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 1988; 27: 209-258.
 17. Thompson RC, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 2002; 18(10): 452-457.
 18. Scott JC, Stefaniak 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*. *Parsitology* 1997; 114(Pt 1): 37-43.
 19. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2003; 127(Pt 3): 207-215.
 20. McManus DP, Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 2003; 127(Suppl): S37-S51.
 21. Bowles J, Blair D, McManus DP. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 1995; 110(Pt 3): 317-328.
 22. Lymbery AJ, Thompson RC, Hobbs RP. Genetic diversity and genetic differentiation in *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from domestic and sylvatic hosts on the mainland of Australia. *Parasitology* 1990; 101(Pt 2): 283-289.
 23. 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(1): 171-174.
 24. Shahnazi M, Hejazi H, Salehi M, Andalib AR. Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran. *Acta Trop* 2011; 117(1): 47-50.
 25. Arbabi M, Hooshyar H. Survey of *Echinococcosis* and *Hydatidosis* in Kashan Region, Central Iran. *Iranian J Pub Health*

- 2006; 35(1): 75-81.
26. Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF, Rezaeian M, Mohebbali M, Eshraghian M, et al. *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. *Exp Parasitol* 2010; 124(4): 373-379.
27. Sharbatkhori M, Mirhendi H, Jex AR, Pangasa A, Campbell BE, Kia E, Eshraghian M, Fasihi Harandi M, Gasser RB. Genetic categorization of *Echinococcus granulosus* from humans and herbivorous hosts in Iran using an integrated mutation scanning-phylogenetic approach. *Electrophoresis* 2009; 30: 2648-2655.
28. Schneider R, Gollackner B, Edel B, Schmid K, Wrba F, Tucek G, et al. Development of a new PCR protocol for the detection of species and genotypes (strains) of *Echinococcus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Int J Parasitol* 2008; 38(8,9): 1065-1071.
29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
30. Sharbatkhori M, Kia E, Fasihi Harandi M, Jalalizand N, Zahabiun F, Mirhendi H. Comparison of five simple methods for DNA extraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces for PCR amplification of ribosomal DNA. *Iranian J Parasitol* 2009; 4(2): 54-60.
31. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. *Infect Genet Evol* 2006; 6(2): 85-90.
32. Gholami Sh, Irshadullah M, Khan A. Genetic variation of *Echinococcus granulosus* isolates from Indian buffalo and Iranian sheep, cattle and camel. *J Mazand Univ Med Sci* 2009; 19(71): 60-69 (Persian).
33. Kia EB, Rahimi H, Sharbakhori M, Talebi A, Fasihi Harandi M, Mirhendi H, et al. Genotype identification of human cystic echinococcosis in Isfahan, central Iran. *Parasitol Res* 2010; 107(3): 757-760.