ORIGINAL ARTICLE

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

Shirzad Gholami[1],
Masoud Sosarai[2],
Mahdi Fakhar[1],
Mahdi Sharif[1],
Ahmad Daryani[1]

[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 Taq1 restriction enzyme in human isolates. No change in the size of DNA bands were observed with Msp1 and Alu1 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم شماره ۸۵ آذر سال ۱۳۹۰ (۱۹-۱۰)

تعیین ژنوتایپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس از بافت‌های پارافینی کیست هیداتید انسانی به روش PCR-RFLP

شیرزاد غلامی[۱]
مسعود سوسرایی[۲]
مهدی فخار[۱]
مهدی شریف[۱]
احمد دریانی[۱]

چکیده

سابقه و هدف : شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف اکینوکوکوس گرانولوزوس به عنوان عامل کیست هیداتیک در مناطق اندمیک بیماری می‌تواند بر روی برنامه‌های کنترل بیماری به‌ویژه در انسان تاثیر به‌سزایی داشته باشد. این مطالعه جهت تعیین ژنوتایپ‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس از بافت‌های پارافینی کیست هیداتید انسانی به روش PCR-RFLP انجام شد.

مواد و روش ها : در این مطالعه تجربی برای تعیین خصوصیات مولکولی اکینوکوکوس گرانولوزوس، DNA ژنومی ۳۰ نمونه پارافینه انسانی کیست هیداتیک که از بیمارستان‌های سراسر استان گلستان جمع‌آوری شده بود پس از استخراج DNA با روش مولکولی PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از سه نوع آنزیم محدودالاثر تجزیه کننده اندونوکلئازی استفاده شد.

یافته ها : محصول PCR به‌دست آمده از تکثیر rDNA-ITS1 اکینوکوکوس گرانولوزوس کیست هیداتیک انسانی دو الگوی متفاوت از باندهای DNA را در ایزوله‌های انسانی نشان داد. از طرفی با وجود تفاوت بین ایزوله‌های انسانی در اندازه قطعه DNA (۱۰۰۰ جفت باز)، با استفاده از پرایمرهای BD1/4S و EGF1/EGR2 این ایزوله‌ها تا حدودی در اندازه قطعه (۳۹۱ جفت باز) با یکدیگر تشابه دارند. محصول PCR به روش RFLP نشان‌دهنده الگوی متفاوت با آنزیم Taq1 در ایزوله انسانی بود. از طرفی با آنزیم Alu1 و Msp1 تغییری در اندازه قطعات در ایزوله انسانی مشاهده نشد.

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

واژه‌های کلیدی: کیست هیداتیک انسانی، اکینوکوکوس گرانولوزوس، روش PCR-RFLP، ژنوتایپ

مقدمه

بیماری هیداتیدوزیس (اکینوکوکوزیس) از بیماری مشترک بین انسان و حیوانات (Zoonotic) است که در بسیاری از مناطق دنیا به خصوص درکشورهای منطقه مدیترانه شایع است. این بیماری تاثیر مهمی در سلامت انسان و حیوان دارد و همچنین از نظر ضررهای اقتصادی نیز بسیار با اهمیت است(۳-۱). این بیماری توسط مراحل لاروی ستودها (متاستود) از جنس اکینوکوکوس (Echinococcus) یعنی اکینوکوکوس گرانولوزوس

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

مولف مسئول: شیرزاد غلامی- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی E-mail: sgholami@mazums.ac.ir
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

ایجاد می‌شود. این بیماری در اغلب نقاط به خصوص نواحی روستایی که معمولاً در آن‌جا مواد زائد کشتار دام‌ها به صورت غیر بهداشتی و ناصحیح دفع می‌شود شایع است و نسبت به سایر گونه‌های اکینوکوکوس، گونه گرانولوزوس در ایران مهمتر است(۵،۴). شواهد نشان می‌دهند که در سالیان اخیر نه 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 (۶،۴،۷). معمولاً در مناطقی که بیماری اندمیک است، از نظر بیولوژی، ژنتیکی یا استرینی تنوع نسبتاً زیادی در گونه اکینوکوکوس گرانولوزوس وجود دارد(۱۱،۱۰). مطالعات متعدد ثابت نموده که در این گونه مناطق، اکینوکوکوس به صورت کمپلکسی از استرین‌های مختلف وجود دارد. که این تنوع ممکن است بر روی اپیدمیولوژی و بیماریزائی کیست هیداتیک اثر گذارد. علاوه بر این دلایلی وجود دارد که برخی استرین‌ها برای انسان نسبت به سایر استرین‌ها، بیماری‌زایی بیشتری دارند(۱۳،۱۲).

در حال حاضر برای شناخت استرین‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس علاوه بر خصوصیات مرفولوژی، بیوشیمایی 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 می باشد که با کیفیت وکمیت 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 ازروش‌های 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس از ایران در انسان و دام‌ها (میزبانان واسط) با روش‌های مرفولوژی و بیوشیمیایی و مولکولی در ایران مورد مطالعه قرارگرفته است(۲۴،۲۳،۱۴،۱۰) ولی مطالعه استرین‌ها یا ژنوتیپ‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس در انسان (افراد مبتلا که جراحی شده‌اند) و دام‌های مبتلا به کیست هیداتید کشتار شده (مانند گوسفند،گاو و شتر) با روش‌های مولکولی بویژه PCR-RFLP در نواحی شمالی به‌طور محدود مورد مطالعه قرارگرفته است(۲۵،۲۳،۹). از طرفی مطالعه خصوصیات مولکولی سویه‌ها و ژنوتیپ‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس عامل کیست هیداتیک انسانی فیکس شده با پارافین به روش PCR-RFLP از روش‌های جدید می‌باشد که در این مطالعه از این روش استفاده می‌شود. با توجه به اینکه روش استخراج DNA از پروتواسکولکس‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس تاثیر مهمی در نتایج PCR و PCR-RFLP دارد. برای استخراج DNA از نمونه‌های بافتی فیکس شده کیست‌های هیداتید انسانی در پارافین استفاده می‌شود(۲۸-۲۶). بنابراین این مطالعه با هدف شناسایی ژنوتیپ‌ها یا استرینی‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس از بافت‌های پارافینی کیست هیداتید انسانی جراحی شده در استان گلستان انجام شد.

مواد و روش ها

دراین 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، کلنیک دکتر موسوی، خاتم الانبیاء گنبد و شهداء گنبد) در سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

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 ۱ml گزیلل اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. سپس نمونه‌ها در دور g ۱۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی آن دور ریخته شد. بعد از مرحله پارافین‌زدایی جهت آبگیری، 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 پروتئیناز K با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) مراحل استخراج DNA انجام شد. دراین مرحله ۲۰۰ml 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 $-20^{o}C$ نگهداری شد. برای اطمینان از وجود DNA، غلظت DNA نمونه‌ها با روش اسپکترومتری (SOD) تعیین شد(۲۹،۲۸).

تکثیر و هضم آنزیمی rDNA-ITS1 به روش PCR-RFLP:

تکثیرناحیه 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′-TCTAGATGCGTTCGAA(G/A)TGTCGATG-3′
2- Forward, EGF1: 5′-CCAAACTTGATCATTTAGAGGAAG-3′,
Reverse, EGR2: 5′-TATGGGCCAAATTCACTCATTACC-3

برای تکثیر قطعه ITS1 حجم ۵۰ میکرولیتری شامل DNA template ۵ µl (۲۰۰ ng/µl)، (pH= ۹)، buffer Tris–HCl ۱۰ mM، KCL ۵۰۰ Mm، MgCL2 ۲/۵ Mm از هر dNTP ۲/۵ Mm، از هر پرایمر ۲۴pmol و ۱/۵unit از Taq polymerase در محلول واکنش PCR استفاده شد. شرایط PCR برای هر ایزوله شامل: دناتوره اولیه یک سیکل در ^{o}C ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل در ^{o}C ۹۵ دناتوره به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر ^{o}C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی ^{o}C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه بوده است. محصول PCRبعد از تکثیر از طریق ژل آگاروز ۱ درصد در بافر TBE (Tris-acetate-EDTA) (w/v) ۱ % الکتروفورز گردید. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی 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 اندونوکلئازی 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

[AluI (5′ AG/CT 3′), MSPI (5′ C/CGG 3′), Taq I (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 37oC)

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 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 نرم افزار UVIdoc تعیین و الگوهای مختلف DNA با یکدیگر مقایسه شد.

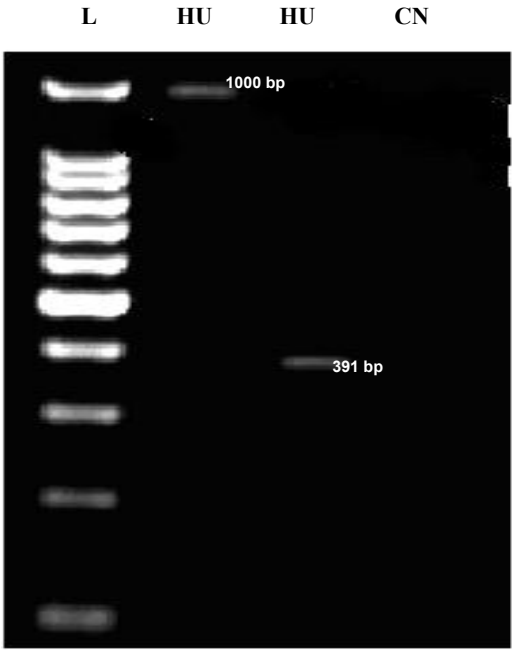
یافته ها

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 اکینوکوکوس گرانولوزوس به روش PCR تکثیر و سپس با الگوهای RFLP با استفاده از ۳ 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 باندی 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس با پرایمر BDI و 4S یک باند با اندازه ۳۹۱ جفت باز و با پرایمر EGF1 و EGR2 یک باندی با دو اندازه متفاوت ۱۰۰۰ و ۳۹۱ جفت باز مشاهده شد که نشان دهنده تفاوت ژنوتایپی در الگوی قطعات DNA تکثیر شده کیست هیداتید است (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱).

جدول شماره ۱ : تعداد و اندازه تقریبی قطعات DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس بعد از تکثیر با PCR با پرایمرهای BD1/4S و EGF1/EGF2 در ایزوله انسانی

پرایمر / ایزوله	اندازه قطعه DNA ایزوله انسانی
BD1 / 4S	۳۹۱Bp
EGF1/ EGF2	۱۰۰ Bp و ۳۹۱



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

هضم آنزیمی DNA نمونه های پارافینه کیست هیداتید انسانی با آنزیم های Msp1, Taq1 و Alu1:

جهت هضم اندونوکلئازی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR نمونه‌های پارافینه کیست هیداتید انسانی از ۳ آنزیم محدودالاثر تجزیه کننده‌اند و نوکلئازی Msp1 ، Alu1 و Taq1 با توالی متفاوت از نوکلئوتیدی‌ها استفاده شد. هضم آنزیمی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

ایزوله‌های انسانی بر روی ژل اگاروز با غلظت ۳ درصد و الگوی حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم‌های فوق به شرح زیر می‌باشد:

آنزیم Alu1:

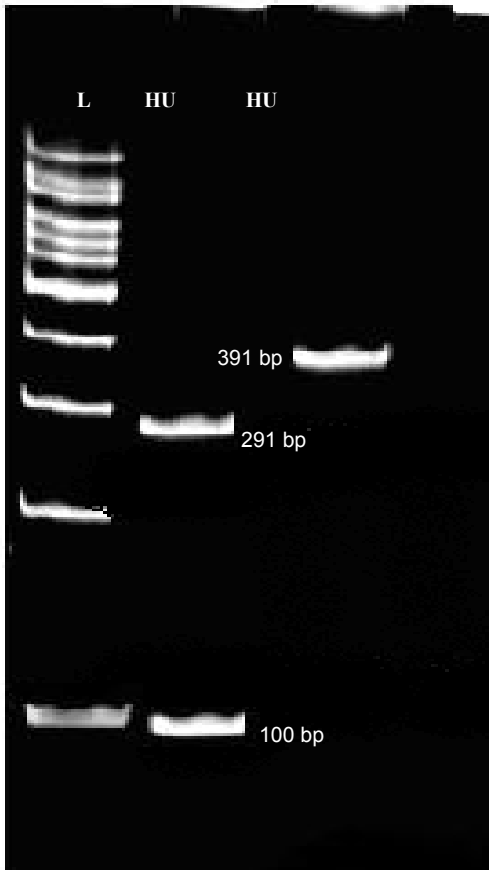
با عمل هضم آنزیمی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR (با پرایمر BD1/4S) ایزوله‌های انسانی با آنزیم ALU1، یک الگویی از DNA تک باندی در اندازه ۳۹۱ جفت باز مشاهده شد (جدول شماره ۲). یعنی عمل هضم آنزیمی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR با پرایمر GF1/EGR2 ایزوله‌های انسانی با آنزیم ALU1 انجام نشده است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

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

باندهای DNA / آنزیم	اندازه قطعات باندهای DNA با پرایمرEGF1/EGF2	اندازه قطعات باندهای DNA با پرایمر BD1/4S
ALU1	-	۳۹۱bp
MSP1	۱۰۰bp و ۲۹۱	۳۹۱bp
Taq1	۱۱۰bp و ۲۸۱ ۱۵۰bp و ۲۵۰ و ۶۰۰	۱۴۱bp و ۲۵۰

آنزیم Msp1:

با هضم آنزیمی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR (با پرایمر GF1/EGR2) ایزوله‌های انسانی با آنزیم Msp1، یک الگوی یک باندی با اندازه‌های ۲۹۱ و ۱۰۰ جفت باز مشاهده شد و در هضم آنزیمی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس محصول PCR با پرایمر BD1/4S ایزوله‌های انسانی با این آنزیم یک باند DNA با اندازه ۳۹۱ جفت با اندازه ۳۹۱ جفت باز بدون تغییری در اندازه قطعات مشاهده شد (جدول شماره ۲ و تصویر شماره ۲).



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

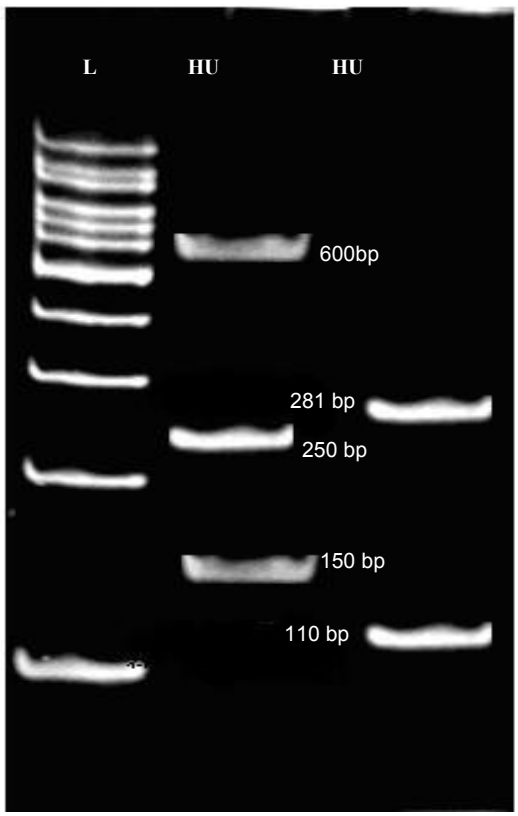
آنزیم Taq1:

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

الگوهای متفاوتی از DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس از نظر ژنتیکی با دو و سه باند DNA با اندازه‌های متفاوت مشاهده شد که نشان‌دهنده تفاوت در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

آلل‌های DNA می‌باشد، ازطرفی 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله‌های انسانی در استان گلستان است.



تصویر شماره ۳: الگوی باندهای DNA اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس ایزوله های انسانی با روش RFLP از سه آنزیم محدودالاثر Alu1, Msp1 و Taq1 با توالی متفاوت از نوکلئوتیدها استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده دو الگوی متفاوت از قطعات DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس بود یعنی الگوی تا حدودی متفاوت ژنوتایپی یا استرینی با آنزیم‌های Taq1 در ایزوله انسانی مشاهده شد. از طرفی در این مطالعه با آنزیم Alu1 و Msp1 تغییری در اندازه قطعات در ایزوله انسانی مشاهده نشد. تشابه اندازه و تعداد باندهای DNA با آنزیم Alu1 پس از هضم آنزیمی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس، در بین ایزوله‌های انسانی مشاهده شد (جدول شماره ۲).

الگوی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس پس از هضم آنزیمی با آنزیم Msp1 با قطعات دو باندی DNA در ایزوله انسانی ۲۹۱ و ۱۱۰ جفت باز و قطعات تک باندی DNA در اندازه ۳۹۱ جفت باز مشاهده شد. الگوی DNA اکینوکوکوس گرانولوزوس پس از هضم آنزیمی با آنزیم Taq1 با قطعات دو باندی DNA در اندازه‌های ۲۸۱و۱۱۰ جفت باز و اندازه‌های ۲۵۰، ۶۰۰ و ۱۵۰ جفت باز مشاهده شد، که بیانگر وجود آلل‌های متفاوت (هتروزیگوت) در DNA پس ازعمل هضم آنزیمی با روش RFLP است. علاوه بر این، الگوی RFLP اکینوکوکوس گرانولوزوس با آنزیم Alu1 و Msp1 ، قطعات تک باندی DNA در اندازه‌های ۳۹۱ جفت باز است که نشان‌دهنده الگوی مشابه ژنوتیپی از توالی DNA (Homolog) اکینوکوکوس 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 هرندی 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 ، Rsa1 و Msp1 با روش PCR-RFLP ناحیه ITS1 از نواحی جغرافیایی متفاوت در ایران گزارش کردند(۹). همچنین وجود استرین‌های متفاوت اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایران با روش مولکولی (PCR-RFLP)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

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 تائید 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 اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس 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 تقریبا ۱ کیلو جفت باز (۱۰۰۰ جفت باز) گزارش شد(۳۳). در مطالعه غلامی و همکاران در سال ۲۰۰۹ اندازه قطعات DNA-ITS1 ایزوله‌های کبدی و ایزوله‌های گوسفندی، گاوی و شتری از ایران اندازه مشابه‌ای را با یک و دو قعطه با اندازه‌های ۱ کیلوجفت باز و کمتر از آن (۹۰۰ و ۱۰۰۰جفت باز) گزارش شد(۳۲). با مقایسه نتایج مطالعات مختلف با مطالعه حاضر در ایزوله انسانی تشابه در باند با اندازه ۱۰۰۰جفت 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) اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس ایزوله‌های انسانی محصول PCR با پرایمر EGF1/EGR2 در اندازه ۱۰۰۰ و ۳۹۱ جفت باز و با پرایمر BD1/4S 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

ITS1 از ایزوله‌های گوسفندی و خوک و یک قطعه در ایزوله انسانی و فصیحی 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 ۹ /۰، ۱ تا ۱/۱ کیلوجفت 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 مشابه‌ای (Homolog) از DNA با آنزیم Alu1 و Msp1 در ایزوله انسانی مشاهده شد. تشابه ژنوتیپی یا استرین در اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس بین ایزوله‌ها با روش PCR-RFLP در استان گلستان بیانگر وجود دو ژنوتایپ متفاوت اکینوکوکوس گرانولوزوس یا استرینی در مناطق مختلف استان گلستان است، که نیاز به مطالعات تکمیلی به روش مولکولی در ایزوله‌های انسانی و حیوانی دارد.

سپاسگزاری

ازکلیه همکاران آقای دکترعلیرضا رفیعی، سرکارخانم 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 سوسرایی می‌باشد.

References

1. 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.
2. Sarıozkan S, Yalçın C. Estimating the production losses due to cystic echinococcosis in ruminants in Turkey. Vet Parasitol 2009; 163(4): 330-334.
3. 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.
4. 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).
5. Dalimi A, Mobedi I. Helminth parasites of carnivores in northern Iran. Ann Trop Med Parasitol 1992; 86(4): 395-397.
6. 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.
7. 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.
8. Yousofi Darani H, Avijgan M, Karimi K, Manouchehri K, Masood J. Seroepidemiology

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

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 mitochonderial 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

2006; 35(1): 75-81.

26. Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF, Rezaeian M, Mohebali 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]