

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

شیرزاد غلامی^۱، مالک ارشاد الله^۲، اسدالله خان^۳

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 و شتر از شمال ایران، با روش مولکولی مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید بارور از کبد و ریه‌های ایزوله‌های حیوانی بوفالو از کشتارگاه شهر علیگر در شمال هند و کیست‌های کبد ایزوله‌های گوسفند، گاو و شتر از کشتارگاه شهر ساری و گرگان از شمال ایران جمع‌آوری شد. خصوصیات ملکولی ITS1-rDNA انگل با روش PCR-FRLP بعد از استخراج و تکثیر DNA و هضم آنزیمی با ۵ آنزیم محدود الاثر تجزیه‌کننده اندونوکلئازی (Alu1, Msp1, EcoR1, Hha1 and Taq1) و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر بیش از یک قطعه ITS1-rDNA در اندازه‌های مختلف و با الگوی متفاوت در ایزوله‌های 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 و دیگری مشابه الگوی گوسفند، گاو و شتر بوده است که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی در بین ایزوله‌ها یا وجود دو استرین متفاوت می‌باشد. با توجه به تشابه و تفاوت باندها DNA از نظر اندازه، تعداد و الگوی بدست آمده بعد هضم آنزیمی می‌توان نتیجه گرفت که الگوی DNA ایزوله‌های ریوی و کبدی بوفالو از هند و همچنین ایزوله‌های گوسفندی و شتری از ایران با آنزیم‌های Taq1 و Msp1 در حین تشابه دارای اختلافاتی با یکدیگر در الگوی بدست آمده هستند ولی از نظر تعداد و اندازه باندها با یکدیگر، بخصوص با آنزیم‌های Alu1, EcoR1, Hha1 مشابه می‌باشند. از طرفی الگوی ITS1 ایزوله‌های ریوی بوفالو از هند کاملاً 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 نظر خصوصیات 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

مشترک یا زئونوزانگی بوده که از لحاظ پزشکی، دامپزشکی و حتی از لحاظ اقتصادی در بسیاری از

بیماری هیداتیدوزیس که عامل آن اکینوکوکوس گرانولوزوس می‌باشد، یکی از مهمترین بیماری‌های

مؤلف مسئول: شیرزاد غلامی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد - دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

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 تصویب: ۸۸/۶/۲۵

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۸/۵/۱۸

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲۳

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 (۳-۵). این بیماری از ایران و هند در دام‌های اهلی مانند گوسفند، بوفالو، شتر، بز، گاو و انسان به عنوان میزبانان واسط گزارش شده است (۷، ۶، ۴، ۳). از بین دام‌های اهلی، بوفالو در هند و گوسفند در ایران به عنوان میزبانان واسط مناسب کیست هیداتید در این کشورها محسوب می‌شوند و میزان شیوع و باروری کیست در این حیوانات بالا گزارش شده است (۸، ۶، ۴، ۹). هر چند چهار گونه اکتینوکوکوس در ایجاد بیماری اکتینوکوکوزیس 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 اکتینوکوکوس گرانولوزوس، برحسب میزبان و منطقه جغرافیایی انتشار انگل می‌باشد. با توجه به این تغییرات ژنتیکی و تنوع استرین‌های اکتینوکوکوس 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 و پیشگیری کیست هیداتید در انسان و حیوانات به عنوان میزبان واسط تاثیر دارد که در مطالعات باید مورد توجه و استقاده قرار گیرد (۱۵-۱۳).

اکتینوکوکوس گرانولوزوس دارای درجات بالایی از تنوع ژنتیکی است. هر چند خصوصیات گونه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس و تنوع ژنتیکی آن در مناطق اندمیک در انسان و حیوانات با روش‌های مرفولوژی و زیستی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۳، ۱۲، ۱۰). در حال حاضر برای شناخت استرین‌های اکتینوکوکوس

گرانولوزوس علاوه بر خصوصیات مرفولوژی، بیوشیمیایی و زیستی از روش‌های مولکولی بخصوص روش‌های بر مبنای PCR-RFLP بویژه ناحیه rDNA-ITS1 و سکانس DNA استفاده می‌شود. این ناحیه (ITS1) 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، ۱۶، ۱۱). این روش‌ها جهت تعیین ایزوله‌ها یا استرین‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس و همچنین الگوی انتفال انگل در میزبان‌های واسط در مناطق مختلف جغرافیایی توسط محققین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۸، ۱۷). تاکنون براساس مطالعات مولکولی ۱۰ ژنوتیپ یا استرین (G1-G10) از اکتینوکوکوس گرانولوزوس شناسایی شده است (۲۲-۱۸).

هر چند خصوصیات اکتینوکوکوس گرانولوزوس از شمال هند و شمال ایران در دامها (میزبانان واسط) با روش‌های مرفولوژی و بیوشیمیایی توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۴، ۲۳، ۹، ۳) 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 اکتینوکوکوس گرانولوزوس، پروتواسکولکس‌های جمع‌آوری 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 روش‌ها

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

هند (New Life Company, India) با انجام تغییراتی انجام شد. برای واکنش های PCR پرایمرهای رفت BD1 با ردیف های {5'-GTCGTAACAAGGTTCCGTA-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 ژن های ۲ ساب یونیت ۱۸ S و ۵/۸ S DNA ریوزومی (rDNA) قرار دارد استفاده شد. برای تکثیر قطعه فوق حجم ۵۰ میکرولیتری شامل 5 μl DNA template 10 mM Tris- HCl buffer (pH , 9.0), 200ng/μl 2.5 mM KCl, 2.5 mM Mg Cl₂ از پرایمرهای BD1 و 4S و 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، سانی گراد به مدت 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 آگاروز ۱/۵ درصد در بافر TAE (1.5% (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 (۳۴،۳۵).

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

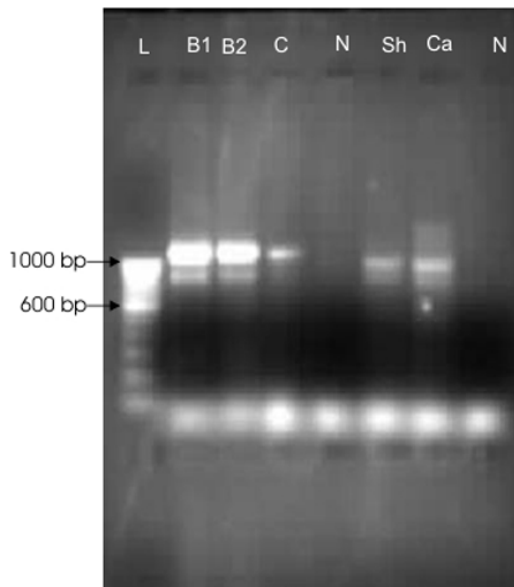
کبدی گاوی از کشتارگاه شهر ساری و ۱۳ ایزوله کبدی شتری از کشتارگاه شهر گرگان از شمال ایران جمع آوری شد. پس از جمع آوری کیست ها، محتویات هر کیست با سرنگ استریل آسپیره و پس از ۳ بار شستشو با سرم فیزیولوژی در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شد. در این مرحله نمونه های پروتواسکولکس های کیست های هیداتید جمع آوری شده از هر حیوان بعنوان یک ایزوله در نظر گرفته شده و برای استخراج DNA نمونه های هر ایزوله مخلوط (pooled samples) و ۱۷ نمونه پروتواسکولکس از ایزوله ها برای استخراج DNA با بافر فسفات نمکی (PBS, Ph, 7.2) شستشو و در الکل ۷۰ درصد در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

استخراج DNA

برای استخراج DNA پروتواسکولکس های مخلوط کیست های هیداتید ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو (۵ و ۷ نمونه) و کبدی گوسفندی، گاوی و شتری (۵ نمونه) انتخاب شد. DNA ژنومی نمونه ها پس از شستشو با PBS (Ph, 7.2) بر طبق روش سمبورگ و همکاران در سال ۱۹۸۹ (۲۵)، از روش هضم انگل در SDS و پروتیناز K با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت های 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 ۲۰ μl پروتیناز 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.

تکثیر و 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-S ساخت کمپانی نیولایف

شتری از ایران تقریباً اندازه مشابهی را با یک و دو قطعه با اندازه‌های ۱ کیلو بیس پیر و کمتر از آن ۹۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز (1000bp and 900bp) نشان می‌دهد (تصویر شماره ۱). بنابراین دو الگوی حاصل از تکثیر DNA ایزوله‌های کبدی و ریوی اکتینوکوکوس گرانولوزوس بوفالو از نظر ژنوتایپی ضمن تشابه با یکدیگر تفاوت دارند در صورتی که ایزوله‌های کبدی اکتینوکوکوس گرانولوزوس بوفالو، گوسفندی، گاو و شتری از نظر ژنوتایپی با یکدیگر شباهت دارند.



تصویر شماره ۱: مقایسه باندهای تولید شده و اندازه آن‌ها پس از تکثیر DNA با روش PCR از ایزوله‌های مختلف اکتینوکوکوس:

B1: نمونه‌های ریوی بوفالو (1.1 kb and 0.9 kb)

B2: نمونه‌های کبد بوفالو (1.07 kb and 0.9 kb)

C: نمونه‌های کبد گاو (1.05 kb)

Sh: نمونه‌های کبد گوسفند (1.0 kb and 0.9 kb)

Ca: نمونه‌های کبد شتر (1.0 kb and 0.85 kb)

N: DNA کنترل منفی بدون

L: DNA ladder

هضم اندونوکلئازی و بررسی PCR-RFLP

جهت هضم اندونوکلئازی DNA پروتواسکولکس‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس از ۵ آنزیم محدودالثر تجزیه‌کننده اندونوکلئازی Taq1, Alu1, Msp1, EcoR1, Hha1 با توالی متفاوت از

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

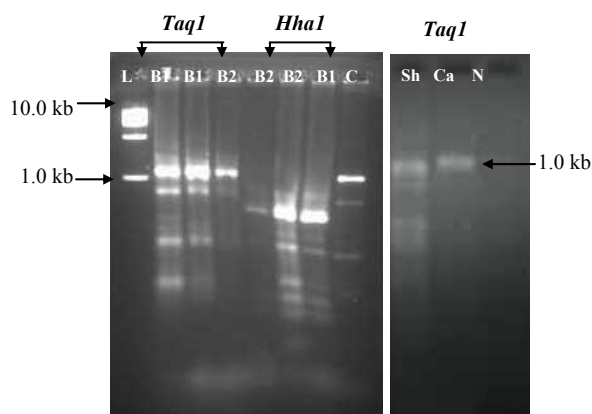
[AluI(5' AG/CT 3'), HhaI (5' GCG/C 3'), MSPI (5' C/CGG 3'), Taq I (5' T/CGA 3'), EcoRI (5' G/AATTC 3')]

(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)

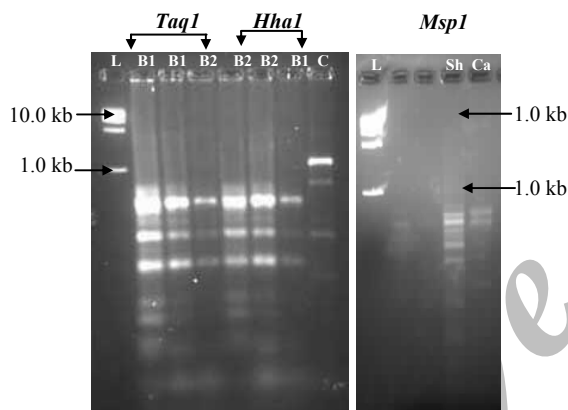
پس از هضم آنزیمی محصول PCR-FRLP از طریق ژل آگاروز ۳ درصد در بافر TAE با ولتاژ 50-100 mV الکتروفورز گردید. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و باندهای DNA توسط دستگاه ژل داکت متصل به کامپیوتر مشاهده و تصاویر تهیه گردید. اندازه قطعات محصولات PCR و هضم آنزیمی FRLP هر ایزوله بوسیله نرم افزار UVIDOC تعیین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

یافته‌ها

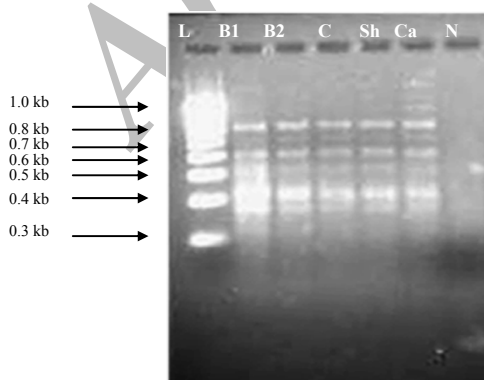
در این مطالعه DNA پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید جدا شده از ایزوله‌های مختلف دامی (بوفالو، گوسفند، گاو، شتر) با استفاده از روش مولکولی (PCR-RFLP of rDNA-ITS1) مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا ناحیه ITS1 از rDNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس به روش PCR تکثیر و سپس با الگوهای RFLP با استفاده از ۵ آنزیم اندونوکلئاز 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 مشابهی در اندازه‌های بیشتر از ۱ کیلو بیس پیر، ۱ کیلو بیس پیر و کمتر از ۱ کیلو بیس پیر با دو و چهار قطعه (1100bp and 1000bp) و ایزوله‌های کبدی بوفالو از هند، گوسفندی، گاو و



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 اکتینوکوکوس که با آنزیم های Taq1 و Hha1 هضم آنزیمی شده اند. نمونه های کبد گوسفند: Sh: نمونه های کبد بوفالو: B1: B2: نمونه های کبد شتر: Ca: N: DNA کنترل منفی بدون: L: DNA ladder



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 اکتینوکوکوس که با آنزیم های EcoR1 و Msp1 هضم آنزیمی شده اند. نمونه های کبد گوسفند: Sh: نمونه های کبد بوفالو: B1: B2: نمونه های کبد شتر: Ca: N: DNA کنترل منفی بدون: L: DNA ladder



شکل شماره ۴: الگو های RFLP باندهای تولید شده و اندازه آن ها پس از تکثیر قطعات ITS1 با روش PCR از ایزوله های مختلف اکتینوکوکوس که با آنزیم Alu1 هضم آنزیمی شده اند. نمونه های کبد بوفالو: B1: B2: نمونه های کبد گاوی: Ca: C: نمونه های کبد شتر: N: DNA کنترل منفی بدون: L: DNA ladder

نوکلئوتیدی ها استفاده شد. محصولات تکثیر شده PCR پس از هضم آنزیمی، الگوهای متفاوتی از قطعات DNA را نشان دادند (تصاویر شماره ۲ تا ۴). آنزیم Taq1 در ایزوله های ریوی بوفالو، ۴ قطعه، در ایزوله های کبدی بوفالو و گوسفندی، ۲ قطعه و در ایزوله های شتری، یک قطعه DNA مشاهده شد در صورتی که هیچ قطعه ای در ایزوله های گاوی با این آنزیم مشاهده نگردید (تصویر شماره ۲، جدول شماره ۱). با عمل هضم آنزیمی، آنزیم Hha1 الگوهای مشابه آنزیم Taq1 با ایجاد ۴ و ۲ قطعه با اندازه های متفاوت با آنزیم های دیگر در ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو را نشان داد (تصویر شماره ۲، جدول شماره ۱). آنزیم Msp1 الگوی مشخصی در ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو با ۳ قطعه (۰/۶، ۰/۸، ۰/۵ کیلو بیس پیر) و در ایزوله های گوسفندی و شتری ۴ قطعه با اندازه تقریباً یکسان (۰/۵، ۰/۶، ۰/۸، ۰/۹ کیلو بیس پیر) ایجاد نمود است (تصویر ۳، جدول شماره ۱). با آنزیم EcoR1 الگوی مشخصی از DNA در ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو با ۳ قطعه (۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ کیلو بیس پیر) و در ایزوله های گوسفندی و شتری هیچ قطعه ای ایجاد نگردید (تصویر شماره ۳، جدول شماره ۱). آنزیم Alu1 با هضم آنزیمی محصولات PCR در همه ایزوله ها ۶ قطعه مشخص در اندازه های یکسان ایجاد کرد که نشان دهنده الگوهای مشابهی از ژنوتایپی از توالی DNA (Homology) از نظر اندازه و تعداد در همه ایزوله ها می باشد (تصویر شماره ۴، جدول شماره ۱). نتایج بدست آمده از تکثیر rDNA-ITS1 و عمل هضم آنزیمی محصولات PCR به روش RFLP نشان دهنده الگوهای متفاوت ژنوتایپی یا استرینی با آنزیم های Taq1 و Hha1 در ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو از شمال هند و الگوهای مشابهی از DNA با آنزیم های Msp1، EcoR1 و Alu1 است. از طرفی تشابه در تعداد و اندازه قطعات DNA بین ایزوله های کبدی بوفالو، گوسفندی و شتری با آنزیم های Msp1 و Alu1 نشان دهنده تشابه ژنوتایپی یا استرینی در این ایزوله ها می باشد.

جدول شماره ۱: تعداد و اندازه قطعات DNA بعد از هضم آنزیمی با آنزیم های متفاوت محدودالایتر تجزیه کننده اندو نوکلئازی

| پروتواسکولکس های کیست های هیداتید پارور ایزوله های حیوانی | | | | | |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| آنزیم ها | نمونه ریوی بوفالو | نمونه کبدی بوفالو | نمونه کبدی گوسفند | نمونه کبدی گاو | نمونه کبدی شتر |
| TaqI | ۴ باندها با اندازه های ۰/۴، ۰/۵، ۰/۹، ۱/۱۳ | ۲ باندها با اندازه های ۰/۵، ۱/۱ | ۲ باندها با اندازه های ۰/۵، ۰/۸ | ۱ باندها با اندازه ۱/۰۵ | - |
| | کیلو بیس پیر* | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | - |
| HhaI | ۴ باندها با اندازه های ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۷ | ۲ باندها با اندازه های ۰/۵، ۰/۷ | - | - | - |
| | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | - | - | - |
| MspI | ۳ باندها با اندازه های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ | ۳ باندها با اندازه های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ | ۴ باندها با اندازه های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸، ۰/۹ | ۲ باندها با اندازه های ۰/۸، ۰/۹ | - |
| | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | - |
| EcoRI | ۳ باندها با اندازه های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ | ۳ باندها با اندازه های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ | - | - | - |
| | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | - | - | - |
| AluI | ۶ باندها با اندازه های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۳۷، ۰/۴۵، ۰/۵۲ | ۶ باندها با اندازه های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۳۷، ۰/۴۵، ۰/۵۲ | ۶ باندها با اندازه های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۳۷، ۰/۴۵، ۰/۵۲ | ۶ باندها با اندازه های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۳۷، ۰/۴۵، ۰/۵۲ | ۶ باندها با اندازه های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۳۷، ۰/۴۵، ۰/۵۲ |
| | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر | کیلو بیس پیر |

- هیچ باندهای از DNA یافته نشد.

* کیلو بیس پیر (Kb) اندازه قطعات DNA.

بحث

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 اکتینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله های حیوانی و انسانی در نواحی مختلف جغرافیایی در ایزوله های بوفالوی، گوسفندی، شتری از جمله ایران و هند گزارش شده است (۱۰، ۱۲، ۱۳، ۱۹، ۳).

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

در مطالعه حاضر بیش از یک قطعه ITS1 از DNA اکتینوکوکوس گرانولوزوس جدا شده از پروتواسکولکس های کیست های هیداتید در اندازه های متفاوت بعد از تکثیر محصول PCR در ایزوله های ریوی و کبدی بوفالو از هند و ایزوله های گوسفندی و گاوی از ایران مشاهده شد. بر اساس الگوهای حاصل از تکثیر DNA ایزوله های کبدی و ریوی اکتینوکوکوس گرانولوزوس بوفالو از نظر ژنوتایپی متفاوت از یکدیگر هستند در صورتی که ایزوله های کبدی اکتینوکوکوس گرانولوزوس بوفالو، گوسفندی، گاوی و شتری از نظر ژنوتایپی با یکدیگر شباهت دارند. اندازه قطعات DNA-ITS1 ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو از هند در اندازه های بیشتر از ۱ کیلو بیس پیر و کمتر از ۱ کیلو بیس پیر با دو و چهار قطعه (1100bp and 1000bp) و ایزوله های کبدی بوفالو از هند، گوسفندی، گاوی و شتری از ایران تقریباً اندازه مشابهی را با یک و دو قطعه با اندازه های ۱ کیلو بیس پیر و کمتر از آن (1000bp and 900bp) می باشد که بیانگر وجود دو

DNA-ITS1 حاصل از ایزوله های گوسفندی، گاوی و شتری در این مطالعه از شمال ایران می باشد (۲۷). باتاچری و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ایزوله های بوفالوی هند اندازه متفاوت از DNA-ITS1 (۱۰۴۶ بیس پیر) در مقایسه با ایزوله های گوسفندی و گاوی (۹۸۱ و ۹۸۰ جفت باز) گزارش کرده اند 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 می شود که طول و اندازه ناحیه قطعه ITS1 در اکتینوکوکوس گرانولوزوس بر حسب نوع میزبان و محل کیست هیداتید در بدن میزبان تغییراتی را نشان می دهد که بیانگر تنوع ژنتیکی درون گونه ای (استرینی) در انگل اکتینوکوکوس گرانولوزوس است که از لحاظ علمی (ژنتیک و انگل شناسی)، اپیدمیولوژیکی و برنامه های کنترل این انگل در انسان و دام ها دارای اهمیت است (۱۲،۱۴،۱۸).

الگوهای محصول PCR-RFLP اکتینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله های کبدی و ریوی کیست های هیداتید بوفالو از شمال هند و گوسفندی، گاوی و شتری از شمال ایران با ۵ آنزیم محدود الاثر اندونوکلئازی بیانگر تشابه و تفاوت در الگوی RFLP قطعه ITS1 از نظر اندازه، تعداد و طول است به نحوی که آنزیم های EcoR1 و Msp1 الگوهای مشابهی در ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو و با آنزیم Msp1 در ایزوله های گوسفندی و شتری و همچنین با آنزیم Alu1 الگوهای مشابه در همه ایزوله ها نشان دادند در حالی که دو الگوی های مختلف توسط آنزیم های Taq1 و Hha1 از نظر تعداد و اندازه در ایزوله های بوفالوی، گوسفندی و شتری مشاهده شد. از طرفی اندازه و تعداد باندهای DNA در ایزوله های کبدی و ریوی بوفالو با آنزیم های Taq1 و Hha1 متفاوت می باشد که نشان دهنده تفاوت در ژنوم ITS1 از نظر توالی ژنی در هر دو ایزوله می باشد.

تفاوت مرفولوژی و بیولوژی اکتینوکوکوس

گرانولوزوس ایزوله های بوفالو از هند در برخی از مطالعات قبلی نشان داده شده است که با ایزوله های گوسفندی متفاوت است (۳۱، ۳۰، ۲۹). 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 کاملاً 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 ایزوله های بوفالو از گوسفندی و گاوی در هند و سایر نقاط از جمله استرالیا می باشد (۱۸، ۱۲، ۱۱، ۲۸) از طرفی تکثیر و هضم آنزیمی قطعه ITS1 ایزوله های گوسفندی، گاوی و شتری از شمال ایران نشان می دهد که ایزوله های گوسفندی و شتری الگوی متفاوت DNA با آنزیم Taq1 و مشابه در الگوی بدست آمده با آنزیم Msp1 از نظر اندازه و تعداد است (تصویر، جدول شماره ۱). در حالی که هیچ باندهای ایزوله های گوسفندی، گاوی و شتری با آنزیم های Hha1 و EcoR1 مشاهده نگردید. آنزیم Alu1 الگوی مشابهی در rDNA-ITS1 با باندهای یکسان (homogeneity) در ایزوله های بوفالویی، گوسفندی، گاوی و شتری نشان می دهد که بیانگر تشابه ژنتیکی اکتینوکوکوس گرانولوزوس در میزبان های مختلف با این آنزیم است (تصویر شماره ۴).

وجود استرین های متفاوت اکتینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله های حیوانی و انسانی با روش های مرفولوژی و مولکولی در مطالعات مختلف گزارش گردید. باول و مک مونوس در سال ۱۹۹۳ الگوهای مشخص RFLP مشابه و یکسان بین ایزوله های اسب و گاو پس از هضم با آنزیم های Msp1 و Alu1 و الگوهای متمایز یا آنزیم دیگر (Rsa1، Cfo1 و Taq1) گزارش کرده اند (۱۰) و فصیحی هرنندی و همکاران در سال ۲۰۰۲ استرین های گوسفندی (G1) و شتری (G6) با الگوهای مشابهی از RFLP بین ایزوله های گوسفندی و شتری با آنزیم های Alu1، Msp1 و Rsa1 با روش

مطالعات اپیدمیولوژی و مولکولی بیشتر در ایران و هند و سایر مناطق دنیا مورد نیاز است. علاوه بر این به دلیل تنوع نژادی اکینوкокوس و یا تاثیر زیستگاه‌ها پیشنهاد شده است که در مطالعات آینده، مناطق جغرافیایی یا بوم نیز باید مورد توجه قرار گیرد (۲۱،۲۲). به منظور تأیید این فرضیه در آینده در ارگان‌های متفاوت در ایزوله‌های انسانی و حیوانی مطالعات مولکولی تکمیلی به ویژه ژن‌های 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 هیدراتید ایجاد شده توسط اکینوкокوس 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 ژئولوژی و بیوتکنولوژی دانشگاه اسلامی علیگر هند و گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران یاری نموده‌اند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

PCR-RFLP ناحیه ITS1 از نواحی جغرافیایی متفاوت ایران گزارش کردند (۳) همچنین وجود استرین‌های متفاوت اکینوкокوس 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 تأیید 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 کاملاً روشن نشده است ولی عفونت در انسان و حیوانات از نقاط مختلف کشور هند 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 اکینوкокوس گرانولوزوس ایزوله‌های کبیدی و ریوی بوفالو از شمال هند (استرین‌های G1 و G3) و تشابه اکینوкокوس گرانولوزوس ایزوله‌های کبیدی بوفالویی، گوسفندی، گاو و شتری از شمال هند و شمال ایران (استرین G1

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. Echinococcosis. *Lancet* 2003; 362: 1295-1304.
6. Juyal PD, Singh NK, Kaur P. Hydatidosis in India: A Review on Veterinary perspective. *J*

- 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. Aetiology: Parasite and life-cycles. In: WHO/OIE Manual on Echinococcosis in humans and animals: A Public Health Problem of Global concern. (Eds. J. Eckert, M.A. Gemmel, 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 morphometry of the larval rostellar hook to distinguish Iranian strains of

- 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 histopathological changes of pulmonary 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, Hedayaty 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).