

مطالعه مولکولی سویه های کیست هیداتید جدا شده از نشخوار کنندگان اهلی استان اصفهان، ایران

سید رضا حسینی*^۱، میلاد حمزه علی طهرانی^۲

۱- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۰۱

چکیده

اکینو کوکوزیس یکی از بیماری های انگلی مشترک بین انسان و حیوانات بوده که علائم آن با رشد طولانی مدت نوزاد های این سستود در بدن میزبان واسط عموماً "نشخوار کنندگان ظاهر می شود و انسان میزبان تصادفی و نهایی برای این انگل شناخته می شود. اگرچه این بیماری در برخی کشورها گزارش نشده ولی واجد پراکندگی جهانی می باشد و با توجه به اهمیت ژئوتیک این بیماری، شناخت سویه ها و تعیین میزان آلودگی به این انگل در میزبان های واسط ضروری می باشد به دلیل آنکه قطع چرخه تکاملی انگل در میزبان های واسط و میزبان نهایی واجد اهمیت بسیاری می باشد و همچنین این انگل دارای تعدادی گونه ها یا سویه های درون گونه ای بوده که این تنوع ژنتیکی می تواند در اپیدمیولوژی و کنترل بیماری و ساخت واکسن ها واجد اهمیت بالقوه ای بوده و لذا مطالعه توالی DNA میتوکندریایی و مطالعات فیلوژنتیکی مبتنی بر DNA این سستود واجد اهمیت بسیاری می باشد. ۲۴۴ نمونه از نشخوار کنندگان (گوسفند، گاو، شتر و بز) ذبح شده در کشتارگاه های صنعتی استان اصفهان (۶۱ نمونه کبد آلوده، شامل دو گروه ۳۱ جنس نر و ۳۰ جنس ماده در طی فاصله زمانی فروردین تا شهریور سال ۱۴۰۱ جمع آوری شد و پس از تهیه پروتواسکولکس های انگل از داخل کیست های هیداتید موجود، نسبت به استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA اقدام شد، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای (BD1 (Forward و S (Reverse که توانایی تکثیر ژنوم ریبوزومی ناحیه rDNA-ITS1 را دارد و منجر به تولید محصول PCR به طول ۱۰۰۰ bp استفاده شد و با استفاده از آنزیم های اندونوکلاز HpaII, RsaI, AluI و TaqI تحت هضم آنزیمی (PCR-RFLP) قرار گرفت و در نهایت نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و با کمک آزمون مربع کای (X²) مورد تجزیه و تحلیل آماری و سطح معنی دار بودن تحقیق ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. نتایج نشان دهنده آلودگی قطعی به E. granulosus و سویه گوسفندی (G1) ناشی از چرخه گوسفندی - سگی در تمامی نمونه های حاصل شده از کبد نشخوار کنندگان بوده که در مقایسه و آنالیز آماری انجام شده تفاوت معنی داری بین نوع آلودگی به سویه های مختلف بین جنس نر و ماده وجود نداشته است. این مطالعه میتواند نتایج قبلی مبنی بر غالب بودن سویه گوسفندی در ایران را تایید نماید لذا توجه ویژه به این موضوع جهت کنترل و پیشگیری از انتقال این انگل در چرخه گوسفندی - سگی توصیه می شود.

کلمات کلیدی: اکینو کوکوس، گرانولوزوس، کیست هیداتید، تعیین سویه، اصفهان، ایران

* نویسنده مسئول: سید رضا حسینی

آدرس: استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

پست الکترونیک: dr.s.reza@gmail.com

مقدمه

اکنون کوکوزیس یکی از بیماری های انگلی مشترک بین انسان و حیوانات بوده که متعلق به خانواده Taeniidae و جنس Echinococcus می باشد. علائم این بیماری با رشد طولانی مدت نوزاد های این سستود در بدن میزبان واسط عموماً "نشخوارکنندگان ظاهر می شود و انسان میزبان تصادفی و نهایی برای این انگل شناخته شده است (Hua et al., 2022). این بیماری واجد پراکندگی جهانی بوده و تعداد بسیار کمی از کشورها را می توان به عنوان عاری از آلودگی به این انگل در نظر گرفت، کشورهایی که عمده تولیدات دامی آن ها مربوط به پرورش گوسفند می باشد، دارای بیشترین میزان آلودگی بوده و این موضوع خود نشان دهنده اهمیت سلامت عمومی و سویه گوسفندی (چرخه گوسفند - سگ) در انتقال به انسان ها است. کیست های تشکیل شده از مرحله نوزادی E.granulosus عمدتاً در کبد و ریه های انسان و سایر میزبان های واسط به صورت کیست های تک حفره و پر از مایع دیده می شود در صورتی که کیست های ناشی از مرحله نوزادی E.multilocularis دارای ساختار تومور مانند و پیشرونده بوده که از وزیکول های کوچک متعددی در استرومای بافت همبند جاسازی شده و توده های ناشی از آن معمولاً در لوب راست کبد دیده شده ولیکن در اثر متاستاز به ریه، طحال و مغز و حفرات صفاقی نیز گسترش می یابد (Hajimohammadi et al., 2022). با توجه به مطالعات ژنتیکی انجام شده، این انگل دارای تعدادی سویه های درون گونه ای بوده که این تنوع ژنتیکی می تواند در اپیدمیولوژی و کنترل بیماری و ساخت واکسن ها واجد اهمیت بالقوه ای باشد لذا مطالعه توالی DNA میتوکندریایی و مطالعات فیلوژنتیکی مبتنی بر DNA این سستود واجد اهمیت بسیاری می باشد. بر اساس تحقیقات

انجام شده سویه های Echinococcus شامل E.equinus، E.granulosus sensu stricto (G1-G3) (G4)، E.ortleppi (G5) و E.canadensis (G6-G10) است که ژنوتیپ G1 در واقع سویه گوسفندی، ژنوتیپ G4 سویه اسبی و سویه G5 سویه گاوی شناخته شده اند (Mirshekar et al., 2021). از همین رو این مطالعه با هدف تحقیق در مورد سویه های کیست هیداتید جدا شده از نشخوارکنندگان اهلی کشتار شده در استان اصفهان، ایران انجام گرفت تا شناخت سویه های احتمالی ابتلا به این بیماری در این استان مشخص و موانع موجود در راه کنترل و پیشگیری از این بیماری و همچنین ساخت واکسن بر طرف گردد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

این مطالعه از فروردین تا شهریور ماه سال ۱۴۰۱ بر روی نشخوارکنندگان ذبح شده در کشتارگاه های صنعتی استان اصفهان انجام شد. کیست های هیداتید جدا شده از کبد نشخوارکنندگان شامل گاو، گوسفند، شتر و بز بوده اند که پس از بازبینی اولیه توسط کارشناسان بهداشتی کشتارگاه ها به عنوان کبد آلوده به کیست هیداتید شناخته شدند و سپس از هر نوع حیوان ۶۱ نمونه کبد آلوده، شامل دو گروه ۳۱ جنس نر و ۳۰ جنس ماده (در مجموع ۲۴۴ نمونه) جداسازی شده و با قید مشخصات و حفظ زنجیره سرمایی به آزمایشگاه مولکولی ارسال شده اند. در آزمایشگاه پس از ارزیابی نوع کیست ها (تک و یا چند حفره) و درج اطلاعات لازم، نسبت به تهیه نمونه اقدام شد، نمونه ها با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتری استریل و با سوزن گیج ۱۴ در شرایط استریل از داخل کیست ها آسپیره شد سپس محتویات هر سرنگ به صورت جداگانه داخل لوله فالکن ۱۵ میلی لیتری استریل تخلیه و با دور ۳۵۰۰ دور



در دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع رویی خارج شده و عمل شستشو با سرم فیزیولوژی سه نوبت تکرار شد و در نهایت با تهیه یک لام مرطوب از رسوبات باقی مانده و بررسی میکروسکوپی، حضور پروتواسکولکس های کرم Echinococcus اثبات شد، سپس رسوب های حاصله به صورت جداگانه در الکل ۹۶ درجه و در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایشات مولکولی نگهداری شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA، نمونه های خون اخذ شده ابتدا از فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد خارج شده و برای استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت MBST (ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تمام DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای BD1 (Forward) با شماره دسترسی AY185188.1 و S ۴ (Reverse) با شماره دسترسی KJ363926.1 ثبت شده در بانک جهانی ژن که توانایی تکثیر ژنوم ریوزومی (۱۸ S rRNA Gene) را دارد و منجر به تولید محصول PCR به طول ۱۰۰۰ جفت باز می شود استفاده شد. (جدول شماره ۱).

حجم کلی محصول PCR برابر با ۲۰ μl بوده که شامل:

4 μL genomic DNA، One Time PCR Buffer، 1.5 U Taq polymerase (Ampliqon, Denmark) 100, 30 pmol of each primer (Metabion, Korea) μM of each dATP, dTTP, dCTP, and dGTP (Ampliqon, Denmark), 1 μL PCR Buffer (MgCl₂), 1 μL Genomic DNA, 1 U Taq polymerase (Ampliqon, Denmark), 2 μL of each primer (Metabion, Korea), 1 μL dNTP and 13.5 μL Distilled Water

می باشد. جهت PCR نمونه ها از دستگاه ترموسایکلر اتوماتیک (SimpliAmp, USA) استفاده شد. برنامه PCR جهت تکثیر ژن واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. از نمونه های بدون DNA ژنومی به عنوان کنترل منفی استفاده شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر ۱X TBE آنالیز و یا استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در دستگاه UV illuminator مشاهده شد.

واکنش هضم آنزیمی (RFLP)

برای انجام واکنش هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم های اندونوکلاز TaqI و HpaII، RsaI، AluI به ترتیب توالی های AG/CT، GT/AC، C/CGG و T/CGA را شناسایی می کنند، استفاده شد. حجم کلی محلول آزمایش برابر با ۲۰ میکرولیتر بوده که شامل ۲ میکرولیتر بافر، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و یک میکرولیتر (۱۰ واحد) از هر آنزیم و افزایش حجم با آب مقطر استریل تا ۲۰ میکرولیتر انجام و سپس محصول نهایی جهت هضم آنزیمی طبق دستورالعمل شرکت سازنده برای آنزیم های Hpa2، Alu1 و Rsa1 به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و برای آنزیم Taq1 ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد و در نهایت محصولات PCR پس از هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر TBE آنالیز و یا استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در دستگاه UV illuminator مشاهده شد.



جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای تکثیر ناحیه 18 S rRNA Gene

Reactions	Name of primer	Nucleotide sequence (5'–3')	PCR product
PCR for all samples	BD1	GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	1000 bp
	4S	TAGCGTTTCGAAGTGTCG	

نتایج آنالیز آماری

نتایج آزمایش نشان دهنده آلودگی قطعی به کیست هیداتید تک حفره ناشی از E.granulosus و سویه گوسفندی (G1) ناشی از چرخه گوسفندی - سگی در تمامی نمونه های حاصل شده از کبد نشخوارکنندگان بوده که در مقایسه و آنالیز آماری انجام شده تفاوت معنی داری بین نوع آلودگی به سویه های مختلف بین میزبان واسط جنس نر و ماده وجود نداشت.

بحث

با توجه به وجود ۱۰ ژنوتیپ مختلف از انگل E.granulosus با میزبان های واسط و نهایی مختلف و اثر گذاری این ژنوتیپ ها در چرخه زندگی انگل و انتقال آن به انسان، هدف این مطالعه بررسی سویه های کیست هیداتید جدا شده از نشخوارکنندگان اهلی استان اصفهان بود.

در مورد مطالعاتی که سایر کشورها انجام شده است، در تحقیق Gorkem Cengiz و همکاران در سال ۲۰۲۰، تحت عنوان مقایسه خصوصیات مولکولی و مورفولوژیکی و تجزیه هاپلوتیپی جدایه های گاو و گوسفند کیست های Echinococcus، با مطالعه ۱۱۹ نمونه کیست اخذ شده از ۴۸ گاو و ۷۱ گوسفند مورد مطالعه تهیه شده از شهر های مختلف کشور ترکیه و بررسی ژن های mt-cox1، mt-nad5 سویه غالب به ترتیب G1 و G3 اعلام شده است (Görkem & Bahadır, 2020). در مطالعه دیگری که در همان سال توسط Sarfraz Mehmood و همکاران، با هدف بررسی مولکولی هیداتیدوز گاو و گوسفند و اولین تشخیص

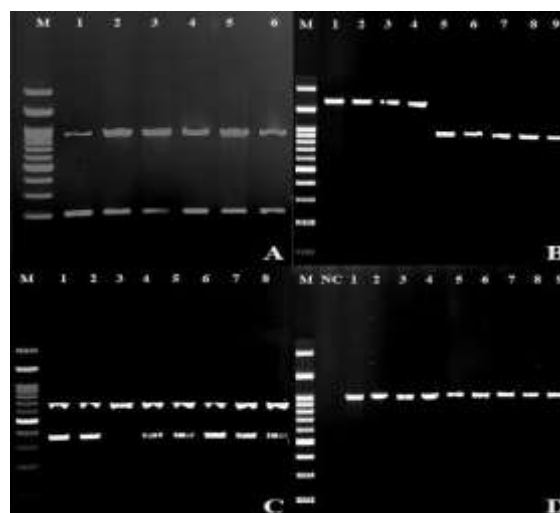
داده های آماری

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و با کمک آزمون مربع کای (X^2) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و سطح معنی دار بودن تحقیق ($P<0.05$) بود که نشان از معنی دار بودن نتایج مطالعه حاضر داشت.

نتایج

نتایج مولکولی

اندازه قطعه تکثیر شده (۱۸ S rRNA Gene) بعد از انجام واکنش PCR با پرایمرهای ذکر شده، ۱۰۰۰ جفت باز بوده و از یک نمونه تعیین توالی شده به عنوان کنترل مثبت آزمایش و همچنین از یک نمونه فاقد DNA ژنومی به عنوان کنترل منفی آزمایش استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۱. نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از هضم با آنزیم اندونوکلاز (تصویر A. آنزیم Alu1، تصویر B. آنزیم Hpa2، تصویر C. آنزیم Rsa1 و تصویر D. آنزیم Taq1 طول مارکر استفاده شده برابر با 100bp می باشد).

درصد آلودگی به سویه گاومیش - سگ (G3) و ۳۳/۰۶ درصد آلودگی به سویه گوسفند - سگ (G1) گزارش شده بود که در این تحقیق بر اهمیت انتقال این بیماری از گاومیش به انسان تاکید بسیاری شده است (Mehmood N. et al., 2020).

در مطالعه Akeel Beigh و همکاران در سال ۲۰۲۱، با موضوع مشخصات اپیدمیولوژیک و مولکولی *E. granulosus* جدا شده از نشخوارکنندگان کوچک دره کشمیر در کشور هند، با بررسی کیست های جدا شده از ۲۰۵۲ گوسفند و ۴۸ بز و مطالعه ناحیه ITS-1 سویه G1 به عنوان سویه غالب در آن منطقه گزارش شده است (Beigh et al., 2021) و همچنین در مطالعه دیگری که توسط Moudgil و همکاران در سال ۲۰۱۹، با عنوان هیداتیدوز در گوسفند و بز ذبح شده در هند: شیوع، خصوصیات ژنوتیپی و مطالعات پاتولوژیک انجام شده بود با بررسی کیست های حاصل شده از ۲۳۰ گوسفند و ۱۹۷ بز و ژن *cox-1* سویه G7 به عنوان سویه غالب گزارش شده است (Moudgil et al., 2019).

در مطالعه Rui-Qi Hua و همکاران در سال ۲۰۲۲، با عنوان بررسی تنوع ژنتیکی *E. granulosus sensu lato* در چین (مطالعات اپیدمیولوژیک و بررسی سیستماتیک)، بر اساس مطالعات مروری انجام شده از سال های ۱۹۹۲ تا ۲۰۲۰ در آن کشور آلودگی به *E. granulosus* (G1, G3) با ۹۸/۳ درصد بالاترین میزان و آلودگی به *E. intermedius* (G6, G7) با ۱/۴ درصد، *E. ortleppi* (G5) با ۰/۱ درصد و همچنین *E. canadensis* (G8, G10) با ۰/۲ درصد کمترین میزان شیوع را داشته است (Hua et al., 2022).

در مورد مطالعاتی که در کشور ایران انجام شده است، در تحقیق حاجی محمدی و همکاران در سال ۲۰۲۲، تحت عنوان پیدایش و شناسایی ژنتیکی *E. granulosus*

گوسفند *E. canadensis* (G6/G7) در ترکیه، با مطالعه مولکولی ژن ناحیه *cox1* از ۸۵ نمونه (۱۹ گوسفند و ۶۶ گاو) سویه G6 و G7 برای اولین بار در ترکیه شناسایی شده است (Mehmood S. et al., 2020). همچنین در مطالعه Aylin Oral Babaoglu و همکاران در سال ۲۰۱۸، با موضوع تعیین ژنوتیپ جدایه های *E. granulosus* با تعیین توالی ژن *cox1* در منطقه آیدین کشور ترکیه انجام شده بود، با بررسی ۲۰ نمونه از مایع کیست های انسانی استخراج شده تحت عمل جراحی در مجموع ۷۵ درصد سویه سگی گوسفندی (G1) و ۲۵ درصد نمونه ها مربوط به سویه شتری و خوکی (G6, G7) گزارش شده است که در این مطالعه محققین علاوه بر غالب بودن سویه گوسفندی، آلودگی به سویه های شتری و خوکی را در انتقال *E. granulosus* به انسان گزارش نموده اند (Oral Babaoğlu et al., 2018) و در مطالعه Emrah Erdogan و همکاران در سال ۲۰۱۷، تحت عنوان بررسی مشخصات مولکولی جدایه های *E. granulosus* به دست آمده از میزبان های مختلف مناطق مختلف کشور ترکیه انجام شده بود، با بررسی ۲۵ نمونه اخذ شده از انسان، ۸ نمونه از گاو، ۶ نمونه از گوسفند و ۲ نمونه از بزها و بررسی ژن *cox1* نمونه های مورد مطالعه، سویه سگی - گوسفندی (G1) به عنوان سویه اصلی آلودگی به کیست هیداتید گزارش شده است (Erdogan et al., 2017).

در مطالعه دیگری که توسط Naunain Mehmood و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور پاکستان و با موضوع مطالعه جامع بر اساس اثر ژن *mtDNA* (*nad1*) بر ژنوتیپ های *E. granulosus* و بررسی نقش بالقوه چرخه سگ - گاومیش در آن کشور، با مطالعه چهار استان مختلف و اخذ ۳۵ نمونه از گوسفند، ۲۶ نمونه از بز، ۳۰ نمونه از گاو و ۳۰ نمونه از گاومیش در مجموع ۶۶/۹۴



sensu lato از حیوانات اهلی مرکز ایران، با بررسی ۹۷ حیوان آلوده از جمله گوسفند، بز، گاو و شتر کشتار شده در کشتارگاه های شهر یزد، ۱۳۵ مورد آلودگی به سویه های G1, G3 و ۱۹ مورد آلودگی به سویه G5 ثبت شده است که در این بین سویه G5 تنها در گاو، بز، و شتر گزارش شده است (Hajimohammadi et al., 2022). در مطالعه نعمت دوست و همکاران در سال ۲۰۲۱، تحت عنوان بررسی خصوصیات ژنتیکی *E. granulosus* sensu lato در جدایه های دام و انسانی شمال ایران، با بررسی ۵۷ نمونه جدا شده از ۴۵ گاو، ۹ گوسفند و ۳ بز از منطقه استان گیلان و ژن *cox1*, *nad1* در مجموع ۹۲/۷ درصد جدایه *E. granulosus* و ۷/۳ درصد جدایه *E. ortleppi* با سویه های (G1, G3) گزارش شد که در تحقیق ذکر شده در حقیقت اولین گزارش از وجود *E. ortleppi* در ایران بوده است (Nematdoost et al., 2021). همچنین در مطالعه رئیسی و همکاران که در همان سال با موضوع بررسی خصوصیات مولکولی و فیلوژنی *Taenia hydatigena* و *E. granulosus* از گوسفند و گاو ایرانی بر اساس ژن *COX1* از نمونه های کسب شده از شهر چابهار انجام شده بود، با استفاده از تعیین توالی ژن ناحیه *cox-1* سویه G1 به عنوان سویه غالب اعلام شده است (Raissi et al., 2021).

در مطالعه شهنازی و همکاران در سال ۲۰۲۱، با موضوع خصوصیات مولکولی *E. granulosus sensu Stricto* جدا شده از دام های قزوین، ایران، با مطالعه ناحیه *cox-1* از ۱۲۰ نمونه (۳۰ بز، ۴۰ گاو و ۵۰ گوسفند) و همچنین توالی یابی ۳۰ نمونه، تمامی سویه ها مربوط به کمپلکس G1-G3 و غالب سویه شناسایی شده مربوط به سویه G1 بوده است (Shahnazi et al., 2021) و در مطالعه میر شکار و همکاران با عنوان بررسی مورفولوژیکی و مولکولی کیست های هیداتید

گوسفندان کشتاری شهرستان مشهد، با مطالعه مولکولی ناحیه ITS-1 و تعیین توالی، سویه G1 به عنوان سویه غالب در گوسفندان کشتار شده در شهر مشهد گزارش شده است (Mirshekar et al., 2021).

در مطالعه شهبازی و همکاران در سال ۲۰۲۰، با موضوع ژنوتیپ کیست های هیداتید تازه و پارافینیزه شده انسانی با استفاده از ژن های *nad1* و *cox1* در استان همدان، غرب ایران، با مطالعه ۷۲ نمونه در مجموع آلودگی به سویه G1 برابر با ۹۸/۶۱ درصد و سویه G3 39/1 درصد گزارش شده است (Shahbazi et al., 2020).

در مطالعه گرگانی فیروزجانی و همکاران در سال ۲۰۱۸، با موضوع شناسایی ژنوتیپ کیست های *Echinococcus* دام و انسان در استان مازندران، ایران؛ با مطالعه ژن *ITS-1*, *cox1* کیست های جدا شده از ۴۰ گوسفند، ۱۷ گاو و ۶ انسان با کمک تعیین توالی ژن های مذکور به ترتیب سویه G1 (۸۰/۷ درصد)، سویه G2 (۱۶/۱ درصد) و سویه G3 (۳/۲ درصد) تعیین شده است که در آن سویه سگی - گوسفندی (G1) به عنوان سویه غالب گزارش شده است (Gorgani-Firouzjaee et al., 2019). همچنین در مطالعه خیراندیش و همکاران که در همان سال با عنوان خصوصیات ژنتیکی کیست های هیداتید جدا شده از اهلی حیوانات در استان لرستان، غرب ایران انجام شده بود با بررسی ۳۶ نمونه (۱۸ نمونه از گوسفند و ۱۸ نمونه از گاو) و بررسی ژن *cox1* در مجموع ۸۸/۹ درصد آلودگی به سویه G1 و ۱۱/۱ درصد آلودگی به سویه G3 گزارش شده است (Kheirandish et al., 2018).

در مطالعه اربابی و همکاران در سال ۲۰۱۷، با موضوع شناسایی مولکولی و ژنوتیپی *E. granulosus* جدایه های شتر و سگ در اصفهان (۱۳۹۴-۱۳۹۵)، با بررسی ۵۱ نمونه از کیست های هیداتید جمع آوری شده از شهر



سال ۲۰۱۸، با موضوع خصوصیات مولکولی *E. granulosus sensu lato* از دام ها در استان خراسان شمالی، ایران، با بررسی ۱۲۲ نمونه (۴۳ گوسفند و ۷۹ گاو) و ژن ناحیه *cox-1* گونه غالب *G1* گزارش گردیده است (Salehi et al., 2018).

در مطالعه فرهادی و همکاران در سال ۲۰۱۵، با موضوع بررسی خصوصیات ژنتیکی جدایه های دام و کیست هیداتید انسانی شمال غرب ایران با استفاده از توالی ژن *cox1* میتوکندریایی که در شهر زنجان انجام شده بود، از مجموع ۸۶ نمونه کیست هیداتید اخذ شده از ۴۹ گوسفند، ۲۸ گاو و ۹ انسان، سویه *G1* با ۹۵/۳۵ درصد بالاترین و سویه *G3* با ۴/۶۵ درصد کمترین شیوع را داشته است (Farhadi et al., 2015) و در مطالعه شمسی و همکاران در سال ۲۰۱۵، با هدف تعیین ژنوتیپ ایزوله های گوسفندی و انسانی کیست هیداتید در ایلام، با مطالعه ژن ناحیه *nad1* 20 نمونه از کیست های هیداتید گوسفندی و ۱۰ نمونه انسانی با روش PCR-RFLP ژنوتیپ کمپلکس (*G1-G3*) به عنوان سویه موجود شناسایی شده است (Shamsi et al., 2015).

در مطالعه واحدی و همکاران در سال ۲۰۱۴، تحت عنوان بررسی ویژگی های ژنوتیپی کیست های هیداتید جدا شده از انسان در استان آذربایجان شرقی در سال های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۳، با مطالعه ۵۵ نمونه کیست جدا شده از انسان و مطالعه ناحیه *ITS-1* به روش PCR-RFLP سویه گوسفندی - سگی (*G1*) به عنوان سویه غالب در نواحی مذکور گزارش شده است (Vahedi et al., 2014).

در مطالعه دوستی و همکاران در سال ۲۰۱۳، تحت عنوان تعیین ژنوتیپ کیست هیداتید جدا شده از انسان و اهلی حیوانات در استان ایلام، غرب ایران با استفاده از PCR-RFLP، با بررسی ۳۰ نمونه حیوانی و ۴ نمونه اخذ شده از انسان، سویه *G1* به عنوان سویه غالب در استان ایلام با

های نجف آباد و زرین شهر و مطالعه بر روی ناحیه *cox1 nad1* سویه گوسفندی (*G1*) به عنوان سویه غالب شناسایی شده است (Arbabi et al., 2017) و در مطالعه دیگری که در همان سال توسط ابراهیمی پور و همکاران با موضوع مطالعه مولکولی بر روی *Echinococcus* شتر (*Camelus dromedarius*) و گزارش *E. ortleppi* در ایران انجام شده بود، با مطالعه ۲ نمونه کیست اخذ شده از ۵۶ شتر کشتار شده در منطقه مرکزی ایران و با بررسی ژن های ناحیه *cox-1* و *nad1* آلودگی به سویه *G6* برابر با ۳۵/۷ درصد و سویه های *G1*, *G3* برابر با ۲۸/۶ درصد گزارش شده است (Ebrahimipour et al., 2017).

در مطالعه کسائی و همکاران در سال ۲۰۱۶، با عنوان بررسی خصوصیات ریخت شناسی و مولکولی کیست هیداتید جدایه گاو در خرم آباد، با بررسی ژن ناحیه *cox-1* 1 نمونه های کیست اخذ شده از ۲۸ گاو، سویه گوسفندی - سگی (*G1*) به عنوان سویه غالب گزارش شده است (Kasaeiyan et al., 2016) و در مطالعه دیگری که توسط غلامی و همکاران در سال ۲۰۱۶ تحت عنوان بررسی *E. granulosus* در سگ و شغال های منطقه دریای خزر، شمال ایران، با مطالعه ۴۲ سگ ولگرد و ۱۶ شغال و بررسی ژن *cox1* در مجموع ۶۶/۷ درصد سویه *G1* و ۳۳/۳ درصد سویه *G3* گزارش شده است (Gholami et al., 2016).

در مطالعه کاملی و همکاران در سال ۲۰۱۶، تحت عنوان شناسایی ژنتیکی جدایه های کیست هیداتید گاو از شمال شرق و جنوب غرب ایران، با بررسی ۱۲۰ نمونه (۷۰ نمونه از مشهد و ۵۰ نمونه از اهواز) و بررسی ناحیه *ITS-1* به روش PCR-RFLP سویه گوسفندی (*G1*) به عنوان سویه غالب آن مناطق گزارش شده است (Kamelli et al., 2016) و همچنین در مطالعه صالحی و همکاران در



استفاده از ژن ITS-1 گزارش شده است (Dousti et al., 2013) و همچنین در همان سال خادم وطن و همکاران مطالعه دیگری را تحت عنوان بررسی خصوصیات مولکولی دام و جدایه های انسانی *E. granulosus* جنوب غرب ایران انجام داده اند که با بررسی ۳۴۴ نمونه (۱۰۴ گاو، ۱۴۱ گوسفند، ۸۴ بز و ۵ انسان) اخذ شده از استان خوزستان و مطالعه ژن ناحیه ITS-1 به روش PCR-RFLP سویه G1 غالب بوده و سویه G6 (شتری) یافت نشده است (Khademvatan et al., 2013).

در مطالعه غلامی و همکاران در سال ۲۰۱۲، با هدف بررسی خصوصیات مولکولی *E. granulosus* از کیست های هیداتید جدا شده از انسان و حیوانات در استان گلستان، شمال ایران. با مطالعه ۶۰ نمونه تهیه شده از گوسفند، گوساله و شتر و ژن ناحیه ITS-1 سویه های G1 و G6 به عنوان سویه های موجود در نمونه ها گزارش شده است (Gholami et al., 2012) و در مطالعه دیگری که توسط صدری و همکاران در سال ۲۰۱۲، با عنوان تعیین مشخصات کیست های هیداتید جدا شده از دام های کشتار شده در کشتارگاه های صنعتی شهر یاسوج به روش PCR-RFLP انجام شده بود با مطالعه ۹۳ کیست (۳۱ نمونه گوسفندی، ۵۶ نمونه بز و ۶ نمونه گاو) از روی ناحیه ITS-1 تمامی نمونه های مورد آزمایش سویه گوسفندی *E. granulosus* (G1) را از خود نشان داده اند (Sadri et al., 2012).

در این مطالعه پس از الکتروفورز محصول واکنش PCR، طول قطعه تکثیر شده در تمام نمونه ها یکسان و برابر با ۱۰۰۰ جفت باز بود که نشان از مشابه بودن نتیجه واکنش PCR با سایر یافته های گزارش شده در مطالعات سایر محققین دارد. در بررسی ژنوتیپ های موجود در ۲۴۴ نمونه اخذ شده از نشخوارکنندگان مورد مطالعه، نتایج نشانگر حضور فعال ژنوتیپ سویه گوسفندی (G1) در

نشخوارکنندگان ذبح شده در استان اصفهان بوده که این نتایج نشان دهنده آلودگی قطعی تمامی نمونه های مورد آزمایش به سویه سگی - گوسفندی بوده و هیچ یک از نمونه های مورد بررسی (حتی نمونه های اخذ شده از شترها) به سویه سگی - شتری آلودگی نداشته اند که با مطالعه خادم وطن و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مطابقت دارد. در نتیجه، فراوانی سویه های سگی - گوسفندی از بقیه بیشتر بوده و سویه اصلی آلوده کننده میزبان های نهایی و حتی واسط بوده است که با مطالعات سایر محققین در ایران و همچنین در مطالعات انجام شده در سایر کشورها مثل: ترکیه، پاکستان، هند و چین مطابقت داشته و فقط در یک مطالعه انجام شده در کشور پاکستان با توجه به شیوع بالا (۶۶/۹۴٪) آلودگی به سویه G3 در گاومیش ها مغایرت داشته است (Mehmood N. et al., 2020). در مورد مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر نتایج تحقیقات صورت گرفته در کشور ایران، نتایج به دست آمده مبنی بر غالب بودن سویه G1 در مناطق مختلف کشور ایران با سایر محققین مطابقت دارد و همچنین از نظر وجود سویه های دیگر این انگل در سایر مناطق ایران، سویه G3 بیشتر در مناطق شمالی و مرکزی ایران حضور فعال داشته است و همچنین بر اساس تاریخچه مطالعات گذشته سویه G2 در نمونه های حاصل از استان مازندران (Gorgani-Firouzjaee et al., 2019) و سویه G6 از نمونه های حاصل از بخش مرکزی ایران گزارش شده است (Kheirandish et al., 2018).

از نظر آماری هیچگونه شواهدی مبنی بر تاثیر جنسیت میزبان واسط بر تنوع سویه های بیماری زای این انگل وجود نداشته و لذا تمامی موارد درمان، تشخیص و پیشگیری باید بطور کامل و حتم در مورد این سویه مورد استفاده و مورد توجه قرار گیرند و آنچه که در این مطالعه اهمیت دارد این است که سویه اصلی یعنی سویه سگی -



3. Dousti, M., Abdi, J., Bakhtiyari, S., Mohebbali, M., Mirhendi, Sh., Rokni, M. (2013), Genotyping of Hydatid Cyst Isolated from Human and Domestic Animals in Ilam Province, Western Iran Using PCR-RFLP, Iran J Parasitol, 8:47-52.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655239/>
4. Ebrahimipour, M., Sadjjadi, SM., Yousofi Darani, H., Najjari, M. (2017), Molecular Studies on Cystic Echinococcosis of Camel (*Camelus dromedarius*) and Report of *Echinococcus ortleppi* in Iran, Iran J Parasitol, 12:323-31.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28979341/>
5. Erdoğan, E., Özkan, B., Mutlu, F., Karaca, S., Şahin, İ. (2017), Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* isolates obtained from different hosts, Mikrobiyol Bul, 51:79-86. <https://doi.org/10.5578/mb.45452>
6. Farhadi, M., Fazaeli, A., Haniloo, A. (2015), Genetic characterization of livestock and human hydatid cyst isolates from northwest Iran, using the mitochondrial *cox1* gene sequence, Parasitol Res, 114:4363-70. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4673-y>
7. Gholami, S., Jahandar, H., Abastabar, M., Pagheh, A., Mobedi, I., Sharbatkhori, M. (2016), *Echinococcus granulosus* Sensu Stricto in Dogs and Jackals from Caspian Sea Region, Northern Iran, Iran J Parasitol, 11:186-94.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5236095/>
8. Gholami, Sh., Sosari, M., Fakhar, M., Sharif, M., Daryani, A., Hashemi, M., Vahadi, M. (2012), Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* from Hydatid Cysts Isolated from Human and Animals in Golestan Province, North of Iran, Iran J Parasitol, 7:8-16.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23323086/>
9. Gorgani-Firouzjaee, T., Kalantrai, N., Ghaffari, S., Alipour, J., Siadati, S.

گوسفندی میزبان های مختلف را مورد حمله قرار داده و در بدن آنها تکثیر یافته و چرخه زندگی خود را تکمیل می کند.

نتیجه گیری

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که آلودگی به هیداتیدوز ناشی از مرحله نوزادی *E. granulosus* در استان اصفهان شیوع بالایی داشته است و نتایج مطالعات انجام شده در ایران نشان می دهد که سویه گوسفندی، گاوی، شتری و اخیراً سویه دیگری به نام سویه گاومیش با پراکندگی محدود از گاومیش و شتر در استان اردبیل در ایران وجود دارد ولیکن عمده سویه های یافت شده مربوط به سویه گوسفندی *E. granulosus* بوده است و بطور معمول باعث آلودگی انسان و سایر نشخوارکنندگان اهلی شده است و این مطالعه نتایج قبلی مبنی بر غالب بودن سویه گوسفندی در اکثر مناطق مختلف کشور ایران را تایید می نماید.

تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

منابع

1. Arbabi, M., Pestechian, N., Tavasol Khamseh, H., Hooshyar, H., Delavari, M. (2017), Molecular and genotyping identification of *Echinococcus granulosus* from camel and dog isolates in Isfahan, Iran (2015-2016), Feyz, 21:134-41.
<http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-3347-en.html>
2. Beigh, A., Darzi, M., Bashir, S., Dar, P., Ganai, N., Malik, S., Bhat, B. (2021), Epidemiological and Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Isolated from Small Ruminants in Kashmir Valley, India, Iran J Parasitol, 16:357-65. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v16i3.7088>



- granulosus from south-west Iran, J Helminthol, **87**:240-44. <https://doi.org/10.1017/s0022149x12000296>
16. Kheirandish, F., Badparva, E., Mahmmoudvand, H., Beiranvand, E., Babaei, S., Nasiri, B. (2018), Genetic Characterization of Hydatid Cysts Isolated from Domestic Animals in Lorestan Province, Western Iran, Iran J Parasitol, **13**:120-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6019594/>
17. Mehlhorn H. (2012). Animal Parasites: Diagnosis, Treatment, Prevention. New York: Springer Spektrum: 323-33.
18. Mehmood, N., Muqaddas, H., Arshad, M., Ullah, MI., Khan, ZI. (2020), Comprehensive study based on mtDNA signature (nad1) providing insights on Echinococcus granulosus s.s. genotypes from Pakistan and potential role of buffalo-dog cycle, Infect Genet Evol, **81**:104271. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104271>
19. Mehmood, S., Simsek, S., Celik, F., Kesik, HK., Kilinc, SG., Ahmed, H. (2020), Molecular survey on cattle and sheep hydatidosis and first detection of Echinococcus canadensis (G6/G7) in sheep in Turkey, Parasitology, **147**:1055-62. <https://doi.org/10.1017/s0031182020000785>
20. Mirshekar, F., Hashemitabar, G., Razmi, G.A. (2021), morphological and molecular study of hydatid cyst in slaughtered sheep in Mashhad area, Veterinary Research & Biological Products, **34**:68-76. <https://doi.org/10.22092/vj.2020.341360.1678>
21. Moudgil, AD., Moudgil, P., Asrani, RK., Agnihotri, RK. (2019), Hydatidosis in slaughtered sheep and goats in India: prevalence, genotypic characterization and pathological studies, J Helminthol, **94**:27. <https://doi.org/10.1017/s0022149x18001219>
22. Nematdoost, K., Ashrafi, K., Majidi-Shad, B., Kia, E.B., Zeinali, A., (2019), Genotype characterization of livestock and human cystic echinococcosis in Mazandaran province, Iran, J Helminthol, **93**:255-59. <https://doi.org/10.1017/s0022149x1800010x>
10. Gökem, C., Bahadır, G. (2020), Comparison of Molecular and Morphological Characterization and Haplotype Analysis of Cattle and Sheep Isolates of Cystic Echinococcosis, Veterinary Parasitology, **282**:109132. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109132>
11. Hajimohammadi, B., Dalimi, A., Eslami, G., Ahmadian, S., Zandi, S., Baghbani, A., Hosseini, SS., Askari, V., Sheykhzadegan, M., Ardekani, MN., Boozhmehrani, MJ., Ranjbar, MJ., Ghoshouni, H., Vakili M. (2022), Occurrence and genetic characterization of Echinococcus granulosus sensu lato from domestic animals in Central Iran, BMC Vet Res, **18**:22. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03131-1>
12. Hua, RQ., Du, XD., He, X., Gu, XB., Xie, Y., He, R., Xu, J., Peng, XR., Yang, GY. (2022), Genetic diversity of Echinococcus granulosus sensu lato in China: Epidemiological studies and systematic review, Transbound Emerg Dis, **69**:1382-92. <https://doi.org/10.1111/tbed.14469>
13. Kamelli, M., Borji, H., Naghibi, A. (2016), Genetic identification of cattle hydatid cyst isolates from northeast and southwest of Iran, Ann Parasitol, **62**:301-05. <https://doi.org/10.17420/ap6204.65>
14. Kasaeiyan, F., Nayeibzadeh, H., Jalousian, F., Shokrani, H.R. (2016), Morphological and molecular characterization of cattle hydatid cysts in Khorramabad, Iran, Journal of Veterinary Research, **71**:381-87. <https://doi.org/10.22059/jvr.2016.59993>
15. Khademvatan, S., Yousefi, E., Rafiei, A., Rahdar, M., Saki, J. (2013), Molecular characterization of livestock and human isolates of Echinococcus



- Province, Iran, Iran J Parasitol, **13**:577-86.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348223/>
27. Shahbazi, AE., Saidijam, M., Maghsood, AH., Matini, M., Haghi, MM., Fallah, M. (2020), Genotyping of Fresh and Parafinized Human Hydatid Cysts Using nad1 and cox1 Genes in Hamadan Province, West of Iran, Iran J Parasitol, **15**:259-65.
<https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i2.3309>
28. Shahnazi, M., Habibvand, M., Johkool, M.G., Hajialilo, E., Sharifdini, M., Javadi, A., Saraei, M. (2021), Molecular Characterization of Echinococcus granulosus Sensu Stricto Isolated from the Livestock of Qazvin, Iran, Infect Disord Drug Targets, **21**:270421187365.
<https://doi.org/10.2174/1871526520666201029130248>
29. Shamsi, M., Dalimi, A., Khosravi, A., Ghafarifar, F. (2015), Determination of Genotype Isolates of Human and Sheep Hydatid Cyst in Ilam, Journal of Ilam University of Medical Sciences, **23**:111-19.
<http://sjimu.medilam.ac.ir/article-1-2949-fa.html>
30. Vahedi, A., Mahdavi, M., Ghazanchaei, A., hokouhi, B. (2014), Genotypic characteristics of hydatid cysts isolated from humans in East Azerbaijan Province (2011-2013), J Anal Res Clin Med, **2**:152-57.
<https://doi.org/10.5681/jarcm.2014.025>
- Sharifdini, M. (2021), Genetic Characterization of Echinococcus granulosus Sensu Lato in Livestock and Human Isolates from North of Iran Indicates the Presence of E. orteppi in Cattle, Acta Parasitol, **66**:446-54.
<https://doi.org/10.1007/s11686-020-00293-0>
23. Oral Babaoğlu, A., Soyder, A., Malatyali, E., Ertuğ, S., Ertabaklar, H. (2018), Genotyping of Echinococcus granulosus isolates by sequencing of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 (cox1) gene in Aydin, Mikrobiyol Bul, **52**:198-205.
<https://doi.org/10.5578/mb.66711>
24. Raissi, V., Etemadi, S., Sohrabi, N., Raiesi, O., Shahraki, M., Salimi-Khorashad, A., Ibrahim, A. (2021), Molecular Characterization and Phylogeny of Taenia hydatigena and Echinococcus granulosus from Iranian Sheep and Cattle Based on COX1 Gene, Curr Microbiol, **78**:1202-07.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02377-0>
25. Sadri, A., Moshfe, A., Doosti, A., Ansari, H., Abidi, H., Ghorbani Dalini, S. (2012), Characterization of Isolated Hydatid Cyst from Slaughtered Livestock in Yasuj Industrial Slaughterhouse by PCR-RFLP, Armaghanej, **17**:243-52.
<http://armaghanej.yums.ac.ir/article-1-260-en.html>
26. Salehi, M., Yaghfoori, S., Bahari, P., Seyedabadi, M., Parande Shirvan, S. (2018), Molecular Characterization of Echinococcus granulosus Sensu Lato from Livestock in North Khorasan



Molecular study of hydatid cyst strains isolated from domestic ruminants in Isfahan province, Iran

Seyed Reza Hosseini^{*1} Milad Hamzehali Tehrani²

¹ Seyed Reza Hosseini, Ph.D of Veterinary Parasitology, Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

² Milad Hamzehali Tehrani, Ph.D of Veterinary Parasitology, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 05 June 2023 Accepted: 23 August 2025

Abstract

Echinococcosis is one of the common parasitic diseases between humans and animals, whose symptoms appear with the long-term growth of the babies of this cestode in the body of the intermediate host, generally ruminants, and humans are known as the accidental and final host for this parasite. Although this disease in It is not reported in some countries, it has a global distribution, and considering the zoonotic importance of this disease, it is necessary to know the strains and determine the level of infection with this parasite in the intermediate hosts, because the interruption of the developmental cycle of the parasite in the intermediate hosts and the final host is very important and also this parasite has a number of species or strains within the species that this genetic diversity can be potentially important in epidemiology and disease control and making vaccines and therefore the study of mitochondrial DNA sequence and phylogenetic studies based on The DNA of this cestode is very important. 244 samples from ruminants (sheep, cows, camels, and goats) slaughtered in the industrial slaughterhouses of Isfahan province (61 infected liver samples, including two groups of 31 males and 30 females) were collected during the period from April to September of 2022 and After preparing protoscoleces from the existing hydatid cysts, DNA was extracted using a DNA extraction kit, PCR reaction using primers BD1 (Forward) and 4S (Reverse) which can amplify the ribosomal genome of the rDNA-ITS1 region. and led to the production of a PCR product with a length of 1000bp was used and subjected to enzymatic digestion (PCR-RFLP) using endonuclease enzymes AluI, RsaI, HpaII, and TaqI and finally the results were obtained using SPSS version 24 software and with Chi-square test (X^2) was used for statistical analysis and the significance level of the research ($P < 0.05$) was considered. The results show definite contamination with *E. granulosus* and sheep strain (G1) caused by the sheep-dog cycle in all the samples obtained from the liver of ruminants, and in the comparison and statistical analysis, there is a significant difference between the type of contamination with different strains between There was no male or female sex. This study can confirm the previous results about the predominance of the sheep strain in Iran, so it is recommended to pay special attention to this issue in order to control and prevent the transmission of this parasite in the sheep-dog cycle.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, hydatid cyst, strain determination, Isfahan, Iran

* Corresponding Author: Seyed Reza Hosseini

Address: Seyed Reza Hosseini, Ph.D of Veterinary Parasitology, Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Email: dr.s.reza@gmail.com

