

شناسایی ژنوتیپ ایزوله‌های کیست هیداتیک در استان زنجان با استفاده از روش PCR-RFLP

دکتر علی هانیلو^۱، مهدی فرهادی^۲، دکتر اصغر فضایی^۱، دکتر عباسعلی نوریان^۱

نویسنده‌ی مسوول: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده‌ی پزشکی m.farhadi01@yahoo.com

دریافت: ۹۱/۷/۳ پذیرش: ۹۱/۸/۸

چکیده

زمینه و هدف: بیماری کیست هیداتیک یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در بسیاری از نقاط دنیا است که توسط مرحله‌ی لاروی اکیونوکوکوس گرانولوزوس اتفاق می‌افتد. شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف ایزوله‌های انگل، میزبانان مرتبط و مسیرهای انتقال آن‌ها حایز اهمیت است. تاکنون تعداد ۱۰ ژنوتیپ مختلف (G1-G10) بر پایه‌ی آنالیز مارکرهای ژنتیکی هسته و میتوکندری در مناطقی از جهان و ایران توصیف شده است. این مطالعه با هدف تعیین ژنوتیپ ایزوله‌های حیوانی و انسانی کیست هیداتیک در استان زنجان انجام شد.

روش بررسی: تعداد ۸۶ نمونه شامل ۴۹ نمونه‌ی گوسفندی، ۲۸ نمونه‌ی گاوی از کشتارگاه و ۹ نمونه‌ی انسانی کیست هیداتیک از بیمارستان‌های استان زنجان جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA ژنومی، ناحیه rDNA-ITS1 توسط PCR تکثیر و محصول به‌دست آمده با روش PCR-RFLP آنالیز گردید.

یافته‌ها: اندازه‌ی قطعه‌ی ITS1 تکثیر یافته حدود ۱۰۰۰ bp به‌دست آمد. الگوهای قطعات به‌دست آمده از محصول PCR ناحیه rDNA-ITS1 بعد از برش با آنزیم‌های Taq1، Msp1، Rsa1، Alu1 و نشان داد که تمامی نمونه‌ها منطبق با استرین شایع گوسفندی هستند.

نتیجه‌گیری: در این منطقه، استرین غالب اکیونوکوکوس گرانولوزوس در دام‌ها و انسان همانند سایر مناطق مطالعه شده‌ی ایران، ژنوتیپ G1 یا همان استرین شایع گوسفندی است.

واژگان کلیدی: کیست هیداتیک، ژنوتیپ، PCR-RFLP، زنجان

مقدمه

درصد، شتر (۱۱/۴ تا ۷۰ درصد)، گاو (۳/۵ تا ۳۸ درصد) و بز (۱/۷ تا ۲۰ درصد) شایع می‌باشد (۵ و ۴). هم‌چنین عفونت‌های انسانی به‌طور مداوم از مناطق مختلف کشور گزارش می‌شود (۶ و ۵). اکیونوکوکوس گرانولوزوس متشکل از تعدادی ژنوتیپ یا استرین‌های داخل گونه‌ای است که در چرخه‌ی زندگی با میزبانان واسطی متفاوت سازگار شده‌اند

هیداتیدوزیس (بیماری کیست هیداتیک) که در اثر آلودگی به مرحله لاروی اکیونوکوکوس گرانولوزوس (*E. granulosus*) اتفاق می‌افتد (۱)، از نظر بهداشتی و اقتصادی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام در بسیاری از نقاط دنیا است (۳-۱). در ایران بررسی‌های متعدد نشان می‌دهد که کیست هیداتیک در گوسفند (۵ تا ۷۲

۱- دکترای تخصصی انگل شناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۲- کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

روش بررسی

از دام‌های ذبح شده در کشتارگاه زنجان ۴۹ مورد کیست هیداتیک گوسفندی و ۲۸ مورد کیست گاوی جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی منتقل شد. همچنین ۹ نمونه‌ی انسانی کیست هیداتیک از بیماران تحت جراحی در بیمارستان‌های زنجان در طول مطالعه جمع‌آوری شد. محتویات کیست‌ها با سرنگ استریل آسپیره و از نظر وجود پروتواسکولکس (Protoscolex) بررسی و نمونه‌هایی که فاقد پروتواسکولکس بودند، از لایه‌ی زایای (Germinal Layer) آنها جهت استخراج DNA استفاده شد. مواد جمع‌آوری شده چندین نوبت با سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو و سپس در اتانول ۷۰ درصد فیکس و در یخچال نگهداری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر کیست به تفکیک کیست‌های ریوی و کبدی و حیوان آلوده به‌طور جداگانه نگهداری و هر کدام به‌عنوان یک ایزوله در نظر گرفته شدند. جهت استخراج DNA ژنومی ابتدا پروتواسکولکس‌های فیکس شده در الکل، ۵ بار با آب مقطر استریل شست‌وشو و DNA ژنومی نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت (ROCH, Germany)، طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. سپس غلظت DNA توسط اسپکتروفتومتر تعیین و نمونه‌ها تا زمان استفاده در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. تکثیر قطعه ITS1 از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): ناحیه‌ی rDNA-ITS1 به روش PCR بر طبق روش باولز و مک مانوس (۲۲) با استفاده از پرایمرهای زیر تکثیر شد:

BD1 (forward primer): 5'-GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA-3'

4S (reverse primer): 5'-TCT AGA TGC GTT CGA A (G/A) TGT CGA TG-3'

مخلوط PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر حاوی 100 ng از DNA ژنومی، ۲۵۰ μM از هر یک از بازهای dNTPs، ۱۰ mM از Tris-HCL، ۳۰ mM از KCl، ۳۰ mM از MgCl₂، ۱۰۰ pmol از هر پرایمر و ۲/۵ واحد از DNA Taq پلیمرز

و از نظر ژنتیکی دارای تفاوت‌های قابل توجهی می‌باشند (۸ و ۷، ۲). طبق اطلاعات موجود ۱۰ ژنوتیپ مختلف (G1-G10) بر پایه‌ی آنالیز مارکرهای ژنتیکی هسته‌ای و میتوکندریایی برای *E. granulosus* توصیف شده است (۱۰ و ۹، ۲، ۱). در بازبینی مجدد که اساساً بر پایه‌ی اطلاعات ژنتیکی میتوکندریایی است، وضعیت تاکسونومیک *E. granulosus* در چهار گونه‌ی مجزا به شرح ذیل پیشنهاد شده است: *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3)، *E. equinus* (G4)، *E. ortleppi* (G5) و *E. canadensis* (G6-G10) (۱۱ و ۱۲). اکثریت ایزوله‌های انسانی، ژنوتیپ G1 (استرین گوسفندی) بوده است که ژنوتیپ شایع با بیشترین توزیع جغرافیایی در جهان می‌باشد (۱۵-۱۲، ۷) با این حال بررسی موارد جراحی شده کیست هیداتیک، بر امکان آلودگی انسان با دیگر ژنوتیپ‌ها نیز دلالت دارد (۱۶-۲۰). با توجه به تنوع ژنتیکی نسبتاً زیاد، ممکن است ژنوتیپ‌های مختلف اکینوкокوس گرانولوزوس با قدرت آنتی‌ژنیک، حساسیت به عوامل دارویی، اختصاصیت میزبان، چرخه‌ی زندگی، نحوه‌ی انتقال و شدت بیماریزایی در ارتباط باشد. تمامی جنبه‌های فوق می‌توانند در طراحی و توسعه واکسن‌ها، تست‌های تشخیصی و درمان‌های دارویی بیماری کیست هیداتیک دارای نقش تعیین کننده باشند (۲ و ۷). بنابراین به علت الزامات اپیدمیولوژیک و طراحی استراتژی‌های کنترل، تعیین دقیق ژنوتیپ‌های رایج اکینوкокوس گرانولوزوس در مناطق اندمیک ضروری است (۲۱ و ۷). در ایران علی‌رغم مطالعات انجام شده، اطلاعات محدودی در مورد چرخه‌ی انتقال و مخازن عفونت انسانی وجود دارد و در بسیاری از مناطق ایران منجمله در زنجان، تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با شناسایی ژنوتیپ‌های (استرین‌های) اکینوкокوس انجام نشده است. این مطالعه به منظور بررسی و شناسایی ژنوتیپ‌های ایزوله‌های حیوانی و انسانی کیست هیداتیک در زنجان طراحی شده است.

الکتروفورز و تصاویر باندهای DNA تهیه گردید و قطعات شکسته شده و الگوهای مختلف DNA بررسی شد.

یافته‌ها

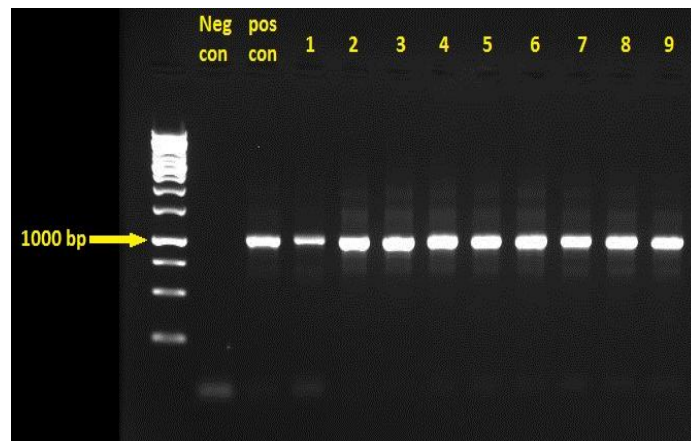
در این مطالعه ۸۶ نمونه کیست هیداتیک کبدی و ریوی حیوانی و انسانی با روش PCR-RFLP جهت تعیین ژنوتیپ مورد بررسی قرار گرفت که شامل ۴۹ نمونه گوسفندی و ۲۸ نمونه‌ی گاوی و ۹ نمونه‌ی انسانی بود. بیشتر نمونه‌های گاوی (۶۸ درصد) از ریه و بقیه کبدی بودند، اما در گوسفندان بیشتر نمونه‌ها (۷۸ درصد) کبدی بودند. ۹ نمونه‌ی انسانی شامل کیست کبدی (۵ نمونه)، ریه (۲ نمونه)، کلیه و لگن نیز می‌شد. از لحاظ جنسیت ۵ نفر از بیماران زن و ۴ نفر مرد بودند. مسن ترین بیمار یک زن ۸۰ ساله و جوان ترین بیمار یک زن ۲۰ ساله بود.

اندازه‌ی قطعه‌ی تکثیر شده ناحیه‌ی ITS1 به روش PCR با پرایمرهای BD1 و 4S در تمامی ایزوله‌ها ۱۰۰۰ bp شد. هیچ تکثیری در کنترل‌های منفی مشاهده نشد (شکل ۱).

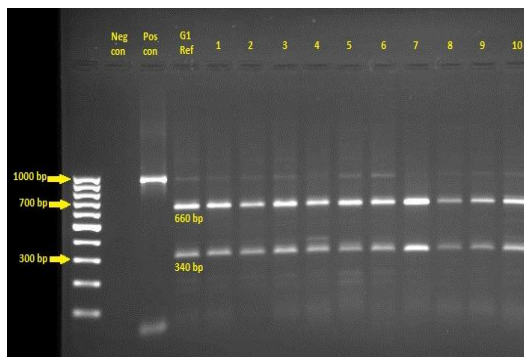
الگوهای قطعات به‌دست آمده از محصول PCR ناحیه rDNA-ITS1 بعد از برش با آنزیم‌های *Rsa1*, *Alu1*, *Msp1* و *Taq1* نشان داد که تمامی نمونه‌ها منطبق با استرین شایع گوسفندی هستند. به‌طوری‌که با آنزیم برش دهنده‌ی *Alu1* قطعاتی با اندازه‌های حدود ۲۲۰ و ۷۸۰ bp (شکل ۲-الف)، با آنزیم *Rsa1* قطعات ۳۴۰ و ۶۶۰ bp (شکل ۲-ب)، با آنزیم *Msp1* قطعات ۷۰۰، ۳۰۰ و ۲۰۰ bp (شکل ۲-ج) و با آنزیم *Taq1* هیچ برشی ایجاد نشد (شکل ۲-د). بنابراین بر اساس الگوی RFLP به‌دست آمده و با توجه به تقسیم‌بندی پیشنهادی اکینوکوکوس گرانولوزوس توسط Moks و Nakao (۱۱ و ۱۲)، تمامی نمونه‌های مورد مطالعه به‌عنوان *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3) شناسایی شدند.

تهیه گردید. چرخه‌ی حرارتی واکنش PCR با دستگاه ترموسیکلر (ASTEC مدل PC-818 Japan) ابتدا شامل یک دناتورهاسیون ابتدایی در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۶ سیکل هر یک در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و انکوباسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR بعد از تکثیر با پرایمرهای مذکور شامل قطعه ITS1 و قسمت اعظم زیرواحد 5/8S ژن ریپوزومی بود. محصول PCR، بر روی ژل آگارز در بافر Tris-boric-EDTA الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، تصاویر باندهای DNA توسط دستگاه UV Documentation ساخت UviTec انگلستان ثبت شد. در فرایند PCR یک نمونه به‌عنوان کنترل منفی (بدون استفاده از DNA) و یک نمونه به‌عنوان کنترل مثبت (با استفاده از DNA ایزوله استاندارد) مورد استفاده قرار گرفت.

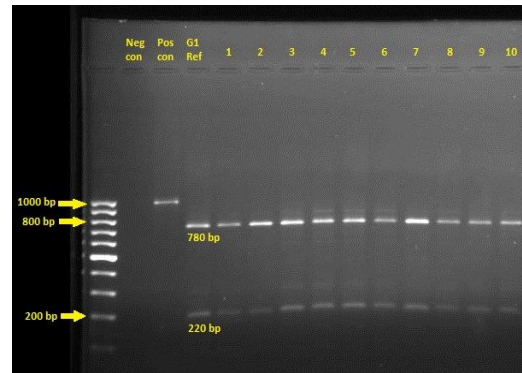
جهت هضم آنزیمی محصول PCR، برای هر ایزوله به‌طور جداگانه از ۴ آنزیم اندونوکلازای *Taq1*, *Rsa1*, *Alu1* و *Msp1* شرکت فرمتاز با غلظت ۱۰ واحد در میکرولیتر که به‌ترتیب توالی‌های *TC/GA*, *GT/AC*, *AG/CT* و *C/CGG* را شناسایی می‌کنند، طبق دستورالعمل شرکت سازنده‌ی داخل میکروتیوب‌های نیم‌میلی‌لیتری، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم مربوطه، ۱/۵ میکرولیتر آنزیم مورد نظر و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR ریخته، با سمپلر به آرامی مخلوط کرده و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای آنزیم‌های *Alu1*, *Rsa1* و *Msp1* و برای *Taq1* در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. پس از هضم آنزیمی، محصول PCR-RFLP از طریق ژل آگارز ۲ درصد در بافر Tris-boric-EDTA (TBE)



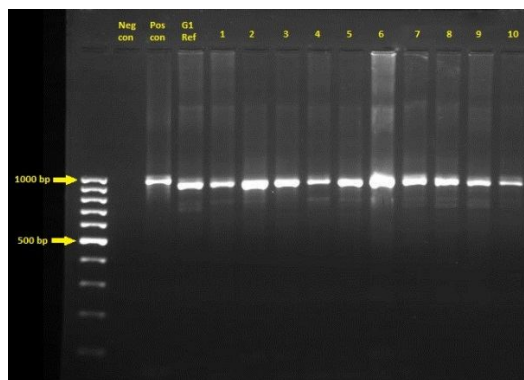
شکل ۱: نتایج PCR قطعه‌ی ITS1 تعدادی از ایزوله‌ها؛ از سمت چپ ستون اول DNA مارکر (فرمتناز) ستون دوم و سوم به ترتیب کنترل منفی و کنترل مثبت را نشان می‌دهد. شماره‌ی ۱ تا ۴ ایزوله‌های گوسفندی، ۵ تا ۷ گاوی و ۸ تا ۹ انسانی است.



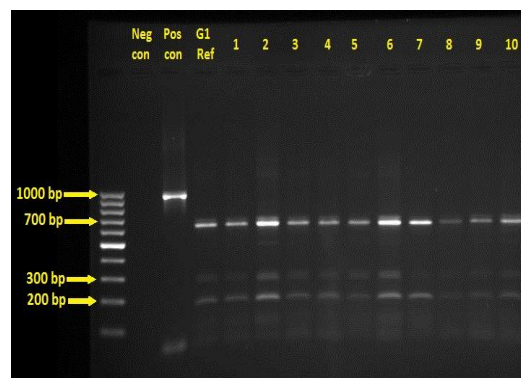
(ب)



(الف)



(د)



(ج)

شکل ۲: قطعات هضم شده با آنزیم‌های Alu1 (الف)، Rsa1 (ب)، Msp1 (ج) و Taq1 (د). در تمام تصاویر ستون اول DNA مارکر (فرمتناز 100bp)، Neg con، کنترل منفی، Pos con، محصول ITS1-PCR بدون آنزیم، G1 Ref، ژنوتیپ G1 به عنوان مرجع و شماره‌ی ۱ تا ۴ ایزوله‌های گوسفندی، ۵ تا ۷ گاوی و ۸ تا ۱۰ انسانی می‌باشد.

بحث

هیداتیدوزیس در بسیاری از کشورها یک مشکل عمده بهداشتی محسوب می شود (۱). مطالعات متعدد در دنیا نشان دهنده عفونت زایی تمامی ژنوتیپها بجز ژنوتیپهای G4 و G10 در انسان می باشد (۲۰-۱۶، ۱) و ژنوتیپ G1 شایع ترین عامل عفونت انسانی در دنیا است (۱۵-۱۲، ۷). در ایران بیماری در دام های اهلی شایع می باشد و عفونت انسانی از مناطق مختلف کشور گزارش شده است (۶-۴). در حال حاضر برای شناخت استرین های اکینوкокوس گرانولوزوس از روش های مولکولی به ویژه روش های مبتنی بر PCR-RFLP خصوصاً ناحیه ی rDNA-ITS1 و تعیین توالی DNA میتوکندریایی استفاده می گردد که از کیفیت و کمیت مناسبی برای تهیه ی محصولات PCR برخوردار است (۲۲ و ۲۱، ۱۸، ۴، ۲).

در سال ۱۹۹۳ بولس و مک ماوس اولین بار روش PCR-RFLP را برای شناسایی استرین های مختلف اکینوкокوس با استفاده از ناحیه ی rDNA-ITS1 و طراحی پرایمرهای BD1 و 4S استفاده کردند. در آن پژوهش تعداد ۱۴۹ ایزوله گوسفندی، اسبی، گاوی، شتری و خوک مورد مطالعه قرار گرفت. با وجود تنوع میزبانی و جغرافیایی، الگوی RFLP تمامی ایزوله ها یکسان و به عنوان استرین گوسفندی شناسایی شدند (۲۲). الگوی RFLP به دست آمده در مطالعه ی ما نیز مشابه الگوی استرین گوسفندی مطالعه ی فوق بود. در مطالعه ی اسکات و همکاران در لهستان در سال ۱۹۹۷ که بر روی ۱۰ نمونه ی انسانی کیست هیداتیک با روش PCR-RFLP و تعیین توالی ژن nad1 (NADH دهیدروژناز) میتوکندریال انجام شد، برای اولین بار یک ژنوتیپ مجزا (G9) از اکینوкокوس شناسایی شد. آنالیز نمونه های انسانی بیماران لهستانی به طور واضحی بیانگر عدم آلودگی با استرین گوسفندی معمول بود اما الگوی RFLP تشابهاتی با ژنوتیپ G7 نشان می داد. از این ایزوله ها یک قطعه ی منفرد از ITS1

با اندازه kb ۱/۰۴ توسط PCR به دست آمد (ژنوتیپ G7، ۲) باند متمایز ۱ و ۱/۱kb تولید می کند (۱۰). در مطالعه ی اردن و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ترکیه بر روی کیست های ۱۷۹ گوسفند، ۱۹ گاو، ۷ بز، ۱ شتر، ۱ سگ و ۱ انسان، توسط PCR-RFLP، در تمامی نمونه ها ژنوتیپ G1 شناسایی شد و ۱۷ ایزوله مختلف که شامل ایزوله های انسانی و شتری هم می شد، جهت تعیین توالی ژن CO1 انتخاب شدند که ژنوتیپ G1 به عنوان تنها ژنوتیپ شناسایی گردید (۲۱). مطالعات مختلفی با روش های مولکولی بر پایه PCR-RFLP ناحیه ی ITS1 از ژن rDNA در ایزوله هایی از گوسفند، گاو، بز، شتر و انسان در مناطقی از ایران صورت گرفته است که G1 غالب ترین و در مناطقی که شتر یافت نمی شود تنها ژنوتیپ بوده است (۱۴). در مطالعاتی که ایزوله شتری نیز داشتند، ۲ ژنوتیپ G1 و G6 شناسایی شده است که ژنوتیپ G1 به جز در شتر ژنوتیپ غالب بوده است اما ژنوتیپ G6 به جز یک مطالعه توسط شربت خوری که G1 را ژنوتیپ غالب در شتر معرفی نمود، تنها ژنوتیپ و یا ژنوتیپ غالب در شتر بوده است (۲۵ و ۲۳-۱۹، ۱۸، ۴) در این منطقه (زنجان) به دلیل عدم کشتار این حیوان در کشتارگاه زنجان ایزوله ای از شتر در دسترس نبود. این ژنوتیپ در سایر میزبان ها نیز شناسایی نشد و الگوی PCR-RFLP بیانگر حضور تنها استرین گوسفندی بود. در مطالعه ی جمالی در تبریز نیز که هم مرز با زنجان می باشد این استرین شناسایی نشد و تنها استرین گوسفندی یافت شد (۱۴).

طبق مطالعات صورت گرفته در ایران ژنوتیپ G1 شایع ترین ژنوتیپ در ایزوله های انسانی بوده است (۱۹ و ۱۸، ۱۵، ۱۴، ۴) با این حال آلودگی انسان با ژنوتیپ G6 نیز گزارش شده است (۱۹، ۱۸). در مطالعه ی فصیحی با روش PCR-RFLP بر روی ۱۵۱ ایزوله، ژنوتیپ G1 به جز در شتر غالب ترین ژنوتیپ در گاو، گوسفند، بز و انسان بود و ژنوتیپ G6 علاوه بر گوسفند، گاو و شتر در انسان نیز شناسایی شد (۱۸).

کنترل بیماری در این منطقه مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر ژنوتیپ G1 یا به پیشنهاد محققین (۱۲ و ۱) گونه‌ی کمپلکس اکینوкокوس گرانولوزوس سنسو استریکتو (G1-G3) از ایزوله‌های انسانی و حیوانی شناسایی شد و نشان داد که این استرین بین میزبانان واسطی گاو و گوسفند در گردش است و عامل عفونت‌های انسانی در این منطقه می‌باشد که برای کنترل و پیشگیری این بیماری دارای اهمیت می‌باشد. تعیین دقیق‌تر استرین‌های اکینوкокوس گرانولوزوس در میزبان نهایی که سگ می‌باشد و همچنین در انسان و دام‌ها با ایزوله‌های بیشتر و با استفاده از سایر مارکرهای ژنتیکی مانند تعیین توالی ژن‌های میتوکندریایی *cox1* و *nad1* پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

هزینه‌ی این مطالعه از محل اعتبارات معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زنجان در قالب طرح پایان‌نامه‌ی دانشجویی کارشناسی ارشد تأمین گردیده است. نویسندگان از همکاری صمیمانه مسوولین کشتارگاه زنجان در تهیه‌ی نمونه‌های کیست هیداتیک حیوانی، مسوولین محترم اتاق عمل و بخش جراحی بیمارستان‌های آیت‌اله موسوی و امام حسین (ع) به دلیل تهیه‌ی نمونه‌های انسانی کیست هیداتیک و جناب آقای دکتر فصیحی هرنندی به دلیل در اختیار گذاشتن کنترل مثبت و راهنمایی‌های ارزنده ایشان نهایت قدردانی و سپاس‌گزاری را می‌نمایند.

References

1- Thompson RCA, The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*. 2008; 119: 439-46.

شهنازی و همکاران در سال ۲۰۱۱ با روش PCR-RFLP تعیین توالی ژن‌های میتوکندریایی CO1 و ND1 روی ایزوله‌های انسانی و حیوانی در اصفهان نشان دادند که استرین گوسفندی (G1) غالب‌ترین ژنوتیپ بوده است که در ایزوله‌های انسان، گاو، گوسفند و تعداد کمی از ایزوله‌های شتری یافت شد، با این حال استرین شتری (G6) در انسان، شتر و گاو نیز یافت شد که نشان می‌دهد استرین شتری می‌تواند به عنوان یک منبع مهم عفونت برای انسان مطرح باشد که بین میزبانان واسطی شتر و گاو در گردش می‌باشد (۱۹). در مطالعه‌ی کیا و همکاران که در سال ۲۰۱۰ روی کیست‌های هیداتیک انسانی در اصفهان انجام شد در تمام ۳۰ ایزوله، ژنوتیپ G1 یافت شد که غالب بودن ژنوتیپ G1 را در کیست‌های انسانی اکینوкокوس در مرکز ایران نیز تایید کرد (۱۵).

در نهایت مهم است که بدانیم، افتراق ژنوتیپ‌های G1-G3 با روش PCR-RFLP ناحیه ITS1 با محدودیت همراه است. برای مثال شربت‌خوری و همکاران (۲۶) از طریق تعیین توالی دو ژن میتوکندریال (*cox1*, *nad1*) نشان دادند، ایزوله‌هایی از شتر که قبلاً با روش ITS1-RFLP ژنوتیپ G1 مشخص شده بودند (۲۵) در حقیقت شامل دو ژنوتیپ G1 و G3 می‌باشد. بنابراین تعدادی از ایزوله‌ها در سایر مطالعات مشابه (۲۴ و ۱۸) و همچنین در مطالعه‌ی ما که صرفاً بر اساس ITS1-RFLP ژنوتیپ G1 شناسایی شده‌اند، احتمال دارد ترکیبی از ژنوتیپ‌های G1 و G3 و حتی G2 باشد که نیازمند بررسی مجدد و تکمیلی از طریق تعیین توالی ژن‌های میتوکندریال می‌باشد. با این حال نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان اطلاعات پایه برای مطالعات ژنتیکی آینده و برنامه‌های

2- Thompson RCA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*. 2002; 18: 452-7.

- 3- Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, et al. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 645-53.
- 4- Ahmadi N. Hydatidosis in camels (*Camelus dromedarius*) and their potential role in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Iran. *J Helminthol.* 2005; 79: 119-125.
- 5- Rokni M. Echinococcosis/hydatidosis in Iran. *Iranian J Parasitol.* 2009; 4: 1-16.
- 6- Sadjjadi S. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitol Int.* 2005; 55 (Suppl.): S197-S202.
- 7- McManus DP, Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitol.* 2003; 127 (Suppl.): S37-S51.
- 8- Thompson RCA, McManus DP. Aetiology: parasites and life cycles. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS. (editors). WHO/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern, World Organisation for Animal Health, Paris; 2001. P: 1-16.
- 9- 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*. *Parasitol.* 2003; 127: 207-215.
- 10- 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*. *Parasitol.* 1997; 114: 37-43.
- 11- Moks E, Jogisalu I, Valdmann H, Saarma U. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitol.* 2008; 135: 645-54.
- 12- Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitol.* 2007; 134: 713-22.
- 13- Utuka AE, Simsekb S, Koroglub E, McManusc DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. *Acta Tropica.* 2008; 107: 192-194.
- 14- Jamali R, Ghazanchaei A, Asgharzadeh M. Identification and characterization of echinococcus granulosus by PCR-RFLP technique in Tabriz district. *J Parasitic Diseases.* 2004; 28: 69-72.
- 15- Kia EB, Rahimi H, Sharbatkhori M, Talebi A, Harandi MF, Mirhendi H. Genotype identification of human cystic echinococcosis in Isfahan, central Iran. *Parasitol Res.* 2010; 107: 757-60.
- 16- Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP. Genetic variation and epidemiology of

- Echinococcus granulosus in Argentina. *Parasitol.* 1999; 118: 523-30.
- 17- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, et al. Several strains of Echinococcus granulosus infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2002; 2: 129-36.
- 18- Harandi MF, 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. *Parasitol.* 2002; 125:367-73.
- 19- Shahnazi M, Hejazi H, Salehi M, Andalib AR. Molecular characterization of human and animal Echinococcus granulosus isolates in Isfahan, Iran. *Act Trop.* 2011; 117: 47-50.
- 20- De La Rue M, Takano K, Brochado JF. Infection of humans and animals with Echinococcus granulosus (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Vet Parasitol.* 2011; 177: 97-103.
- 21- McManus DP. The molecular epidemiology of Echinococcus granulosus and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96 (Suppl. 1): S151-S157.
- 22- Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of Echinococcus species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 57: 231-239.
- 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: 171-4.
- 24- Karimi A, Dianatpour R. Genotypic and phenotypic characterization of Echinococcus granulosus of Iran. *Biotechnol.* 2008; 7: 757-62.
- 25- Sharbatkhori M, Mirhendi H, Fasihi Harandi M, et al. Echinococcus granulosus genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. *Exp parasitolo.* 2010; 124: 373-9.
- 26- Sharbatkhori M, Fasihi Harandi M, Mirhendi H, et al. Sequence analysis of cox1 and nad1 gens in Echinococcus granulosus G3 genotype in camels (Camelus dromedarius) from central Iran. *Parasitol Res.* 2011; 108: 521-7.

Genotype Characterization of Hydatid Cysts Isolated from Zanjan Using PCR-RFLP Technique

Haniloo A¹, Farhadi M¹, Fazaeli A¹, Nourian A¹

¹Dep. of Medical Parasitology & Mycology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Farhadi M, Dep. of Medical Parasitology & Mycology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

E-mail: m.farhadi01@yahoo.com

Received: 24 Sep 2012 **Accepted:** 29 Oct 2012

Background and Objective: Hydatidosis is one of the most important zoonoses caused by larval stage of *Echinococcus granulosus* which is distributed worldwide. Determination of the parasite genotypes in relation to the host specificity and transmission routes is of great importance. So far, DNA based analysis of the isolates obtained from different host species has lead to identification of 10 different genotypes (G1-G10) in the world endemic areas. This work was designed to identify the genotypes of the hydatid cysts isolated from domestic animals and people in Zanjan.

Materials and Methods: A total of 86 isolates, including 49 sheep, 28 cattle isolates collected from the slaughter houses, and 9 human isolates collected from hospitals were subjected to genotype analysis using PCR-RFLP of the ribosomal DNA ITS1 region.

Results: A fragment of about 1000 bp was amplified from all samples using ITS1 PCR. The endonuclease digestion of the PCR products resulted in the RFLP pattern that were the same for all isolates as the pattern expected for the sheep strain. The restriction patterns of all 4 enzymes used (*Alu I*, *TaqI*, *RsaI*, and *Msp I*), consistently approved the same genotype.

Conclusion: The PCR RFLP pattern obtained from our samples were characterizes as *E. granulosus sensu stricto*, which is the same as what has been previously reported in Iran. It can be concluded that the hydatid cyst isolates in our study area, Zanjan, is basically similar to that of other endemic areas of Iran.

Keywords: Hydatid cyst, Genotype, PCR-RFLP, Zanjan