تعیین ژنوتیپ ایزوله‌های گوسفندی و انسانی کیست هیداتید در ایلام

مرتضی شمسی[۱]، عبدالحسین دلیمی[۱*]، افرا خسروی[۲]، فاطمه غفاری فر[۱]

۱) گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲) گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۱

چکیده

مقدمه: بیماری اکینوکوکوزیس یکی از مهم ترین بیماری های مشترک بین انسان و حیوان در بسیاری از مناطق دنیا از جمله ایران است که توسط مرحله لاروی کرم اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می گردد. این انگل از تنوع ژنتیکی بسیار بالایی برخوردار است و شامل کمپلکسی از ژنوتیپ (استرین) های مختلف است. معمولاً در مناطقی که بیماری آندمیک است، تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی در انگل از لحاظ بیولوژی وجود دارد. تحقیقات انجام شده در مناطق مختلف دنیا نشان می دهد که تنوع ژنوتیپی و ماهیت کمپلکس اکینوکوکوس گرانولوزوس، بر چرخه زندگی انگل، مسیرهای انتقال، بیماریزایی، آنتی ژنیسیتی، ایمنی زایی، پاسخ به داروها، همه گیر شناسی و کنترل این بیماری تاثیرگذار است. این مطالعه برای اولین بار با هدف تعیین ژنوتیپ ایزوله های گوسفندی و انسانی کیست هیداتید در استان ایلام انجام شد.

مواد و روش ها: تعداد ۲۰ نمونه کیست هیداتید گوسفندی از کشتارگاه صنعتی ایلام و ۱۰ نمونه انسانی از بیمارستان های شهرستان ایلام جمع آوری شد. پس از استخراج DNA ژنومی پروتواسکولکس ها، نواحی mitDNA NADH dehydrogenase subunit 1 *(nad1)* توسط PCR تکثیر و محصولات PCR با استفاده از روش PCR-RFLP آنالیز شدند.

یافته های پژوهش: بر اساس نتایج به دست آمده، اندازه قطعات *nad-1* تکثیر یافته، ۵۵۰ bp بود. الگوهای قطعات به دست آمده از محصول PCR بعد از برش با آنزیم های Alu1 و Rsa1 نشان داد که تمامی نمونه ها، الگوی RFLP مشابه داشتند اما با آنزیم HpaII هیچ گونه برشی ایجاد نگردید.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد در این منطقه حداقل یک ژنوتیپ از انگل حضور دارد که متعلق به کمپلکس(G1-G3) می باشد.

واژه های کلیدی: اکینوکوکوس گرانولوزوس، ژنوتیپ، PCR-RFLP، ایلام

***نویسنده مسئول:** گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Email: *dalimi_a@modares.ac.ir*

مقدمه

هیداتیدوزیس(Hydatidosis) بیماری انگلی ناشی از نوزاد انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس(Echinococcus Granolusus) است. کرم بالغ در روده سگ و سگ - سانان(میزبان نهایی) زندگی می کند و مرحله لاروی آن یا کیست هیداتید در بدن علف خواران(میزبان واسط) تشکیل می شود. انسان نیز با مصرف سبزیجات آلوده، تماس با سگ و خاک خواری به طور تصادفی به کیست هیداتید مبتلا می شود. اهمیت بیماری در انسان به دلیل ابتلای اعضای حساس و حیاتی بدن مانند کبد، ریه و در حیوانات علف خوار به دلیل تحمل خسارت قابل توجه به اقتصاد دام پروری می باشد(۱). کرم بالغ این انگل در ایران از سگ، شغال و گرگ جدا شده است(۲،۳). نتایج مطالعات مختلف کشتارگاهی در ایران و جهان حاکی از تنوع آلودگی به کیست هیداتید با فراوانی بین ۱/۵ تا ۷۰ درصد بوده است(۴،۵). هم چنین موارد انسانی نیز به طور مداوم از نقاط مختلف کشور گزارش می شود(۳،۶،۷). معمولاً در مناطقی که بیماری آندمیک است، از نظر بیولوژی، تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی در اکینوکوکوس گرانولوزوس وجود دارد که این تنوع داخل گونه ای بسیار، دارای سویه های ژنتیکی متعددی می باشند که در سیر تکاملی با میزبان های واسط مختلفی سازگاری یافته اند(۸،۹). این تنوع ژنتیکی ممکن است بر خصوصیات ریخت شناسی، همه گیر شناسی، درمان و کنترل سویه ها تاثیرگذار باشد(۱۰،۱۱). تا کنون ۱۰ ژنوتیپ مجزا(G1-G10) از این انگل با استفاده از روش های مولکولی بر اساس آنالیز مارکرهای ژنتیکی هسته ای و میتوکندریایی توصیف شده است(۸،۱۲-۱۵). غالب ایزوله های انسانی، ژنوتیپ G1(سویه گوسفندی) بوده که ژنوتیپ شایع در جهان است(۱۶-۱۸). اما نتایج برخی از مطالعات حاکی از بیماریزاتر بودن برخی از سویه ها برای انسان نسبت به سایر سویه ها می باشد(۱۹). بنا بر این به علت انجام اقدامات پیشگیرانه و کنترلی بیماری، تعیین دقیق ژنوتیپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس در مناطق آندمیک ضروری به نظر می رسد(۱۶،۲۰). با توجه به اهمیتی که ژن های میتوکندریال nad-1 و cox-1 در تعیین ژنوتیپ سویه های مولد بیماری کیست هیداتید دارند، لذا برای شناخت اولیه ژنوتیپ های انگل به روش RFLP از ژن های مذکور برای شناسایی بهره گرفته شده است(۱۷). در حال حاضر برای شناسایی استرین های اکینوکوکوس گرانولوزوس علاوه بر خصوصیات مورفولوژی، بیوشیمیایی و زیستی از روش های مولکولی به خصوص روش هایی بر مبنای PCR-RFLP استفاده می شود. به طوری که این روش ها برای تعیین سویه های اکینوکوکوس گرانولوزوس و هم چنین الگوی انتقال انگل در میزبان های واسط در مناطق مختلف جغرافیایی توسط محققین مورد استفاده قرار می گیرد. جداسازی سویه ها بر اساس قرابت ژنی ژن های موجود در توالی DNA هسته، RNA ریبوزومی و DNA میتوکندریایی(ژن های nad-1 و cox-1) انجام می شود. طبقه بندی این واریانت ها بر اساس ژنوتیپ آن ها شامل توالی ژنی، RFLP قطعه rDNA ITS1 و آنالیز مقایسه‌ای توالی هموگوس های DNA می باشد(۱۴). مطالعه و شناسایی ژنوتیپ های ایزوله های انسانی و گوسفندی کیست هیداتید با استفاده از ژن میتوکندریال nad-1 برای اولین بار در استان ایلام توسط این تحقیق انجام شد. استان ایلام به خاطر شرایط خاص اقلیمی، جمعیت زیاد عشایری و کوچ رو، دام پروری به عنوان یکی از مشاغل مهم و رایج مردم منطقه و نگهداری سگ توسط دام داران و روستاییان، از مناطق پر خطر ابتلای به بیماری کیست هیداتید می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها : با مراجعه به کشتارگاه صنعتی ایلام تعداد ۲۰ نمونه کیست هیداتید گوسفندی جمع آوری و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پیرا دام پزشکی دانشگاه ایلام منتقل می شد. هم چنین تعداد ۱۰ نمونه کیست هیداتید انسانی از بیماران تحت جراحی در بیمارستان های شهرستان ایلام در طول مطالعه جمع آوری شد. در آزمایشگاه پس از ضد عفونی کردن سطح کیست با لوگل، محتویات کیست ها با سرنگ استریل آسپیره شدند. برای تعیین باروری کیست، ۵ میلی لیتر از مایع کیست هیداتید سانتریفوژ گردید(۴۰۰۰ دور ۵ دقیقه). سپس زنده بودن پروتواسکولکس ها با استفاده از رنگ حیاتی ائورین(۰/۱ درصد) یا مشاهده میکروسکوپی حرکات سلول های شعله مطالعه گردید(۲۱). پروتواسکولکس های جدا شده از کیست هیداتید بارور کبد و ریه در اتانول ۸۰ درصد تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA : پروتواسکولکس ها سه بار با آب مقطر استریل در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. سپس عمل ذوب و انجماد مکرر به همراه سایش و خردکردن نمونه ها در هاون چینی انجام شد. هضم اولیه پروتواسکولکس ها با افزودن بافر لیزکننده و پروتئیناز K به

مدت ۴ ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد انجام شد(۲۲). برای استخراج DNA ژنومی نمونه ها از کیت استخراج DNA از بافت(Geen all, Korea) استفاده گردید. غلظت DNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر تعیین و نمونه ها تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

روش PCR : توالی هایی به طول bp ۵۵۰ از قطعه mitDNA-nad1 با استفاده از پرایمرهای زیر ساخت شرکت(Geen all, Korea) تکثیر شدند(۲۳،۲۴)(جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱. الیگونوکلؤتیدهای پرایمر مورد استفاده برای شناسایی سویه های اکینوکوکوس گرانولوزوس

طول قطعه تکثیری(bp)	دمای اتصال(°C)	توالی نوکلؤتیدی	پرایمر
550	52	5'-AGATTCGTAAGGGGCCTAATA-3' 5'-ACCACTAACTAATTCACTTTC-3'	Nad1-F (JB11) Nad1-R (JB12)

مخلوط PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر 10X ، ۰/۲ میکرولیتر dNTPs، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۲۵ پیکو مول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلی مراز و ۲ میکرولیتر DNA الگو تهیه گردید. سپس با آب مقطر حجم نهایی واکنش گرها به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از تهیه مخلوط PCR، با تنظیم برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای ۳۰ سیکل، عمل تکثیر DNA انجام شد(جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲. الگوی دمایی مورد استفاده برای تکثیر ژن nad-1

مراحل PCR	دما(°C)	زمان
واسرشت اولیه	۹۴	۵ دقیقه
واسرشت	۹۴	۱ دقیقه
اتصال	۵۰	۱ دقیقه
امتداد	۷۲	۱ دقیقه
امتداد نهایی	۷۲	۱۰

بعد از اتمام تکثیر قطعه ژن مورد نظر، محصول PCR به دست آمده روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر Tris-boric-EDTA (TBE) الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، تصاویر باندهای DNA توسط دستگاه UV Documentation ساخت شرکت Bio Rad آلمان ثبت گردید. در فرآیند PCR یک نمونه به عنوان کنترل منفی(بدون استفاده از DNA) مورد استفاده قرار گرفت.

جهت هضم آنریمی محصول(PCR-RFLP)، برای هر ایزوله به طور جداگانه از سه آنزیم آندونوکلئازی Rsa1،Alu1 و HpaII ساخت شرکت سیناژن(فرمنتاز) با غلظت ۱۰ واحد در میکرولیتر که به ترتیب توالی های AG/CT و GT/AC را شناسایی می کنند طبق دستورالعمل شرکت سازنده، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر مناسب آنزیم، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۲ میکرولیتر(۲۰ واحد) آنزیم مربوطه که با سمپلر به آرامی با هم مخلوط کرده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند. پس از هضم آنزیمی محصول PCR-RFLP از طریق ژل آگاروز ۲ درصد در بافر Tris-boric-EDTA (TBE) الکتروفورز شد و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید، باندهای حاصل ظهور و بررسی شدند(۲۵)(جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳. مشخصات نمونه های مورد استفاده در PCR-RFLP ژن nad-1 انسان و گوسفند

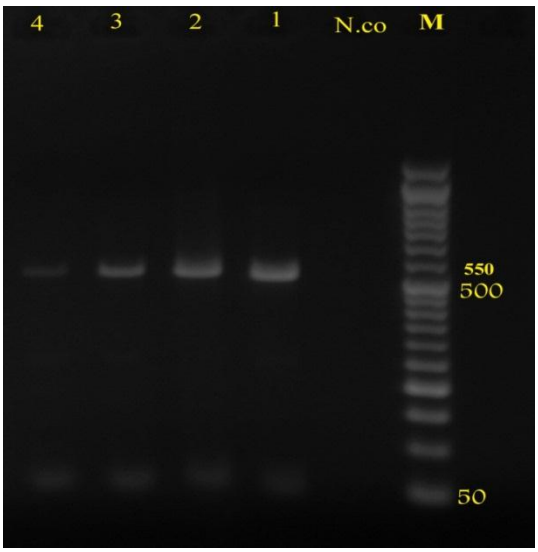
طول قطعه(bp)	آنزیم	بافر	دمای هضم(°C)	طول قطعات حاصل از هضم(bp)
۵۵۰	Alu1	R	۳۷	۳۰۰ ،۲۵۰
۵۵۰	Rsa1	R	۳۷	۳۰۰ ،۲۵۰
۵۵۰	HpaII	R	۳۷	-

یافته های پژوهش

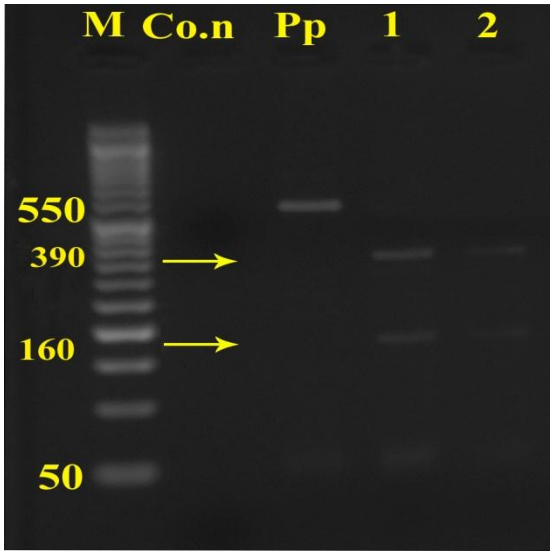
در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه کیست هیداتید شامل؛ ۲۰ نمونه گوسفند از کشتارگاه صنعتی ایلام و ۱۰ نمونه انسان از بیمارستان های شهرستان ایلام تهیه و فرآوری شدند.

DNA پروتواسکولکس های این کیست ها با استفاده از روش PCR-RFLP، قطعه میتوکندریال *nad-1* مورد بررسی قرار گرفتند. قطعه *nad-1*، DNA میتوکندریال *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با روش PCR تکثیر گردید. با

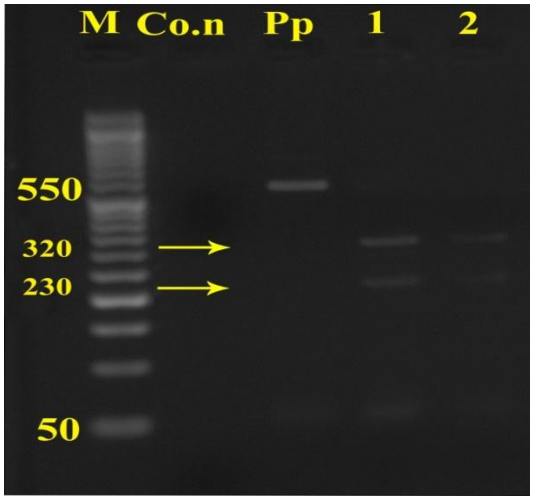
هضم آنزیم های Alu1، Rsa1 و HpaII الگوهای حاصل بررسی شدند. محصول واکنش PCR، در تمامی نمونه‌ها باندهایی به اندازه ۵۵۰bp بود و هیچ تکثیری در کنترل منفی مشاهده نگردید(شکل شماره ۱). پس از انجام روش RFLP باندهای ایجاد شده بر اثر برش آنزیم های مورد استفاده بر روی محصول PCR بر اساس الگوی برشی این آنزیم ها، کمپلکس G1-G3 را برای تمامی ایزوله های مورد بررسی مطرح می نماید. الگوی RFLP محصول PCR تمام ایزوله ها با دو آنزیم هایAlu1 و Rsa1 یکسان بود. به طوری که با آنزیم Alu1 قطعات ۱۶۰bp و ۳۹۰ bp (شکل شماره ۲) وبا آنزیم Rsa1 قطعات ۲۳۰bp و۳۲۰ bp به دست آمد (شکل شماره ۳). اما با آنزیم HpaII هیچ گونه برشی ایجاد نشد و اندازه قطعات حاصل در همان ۵۵۰bp باقی ماند(شکل شماره ۴).



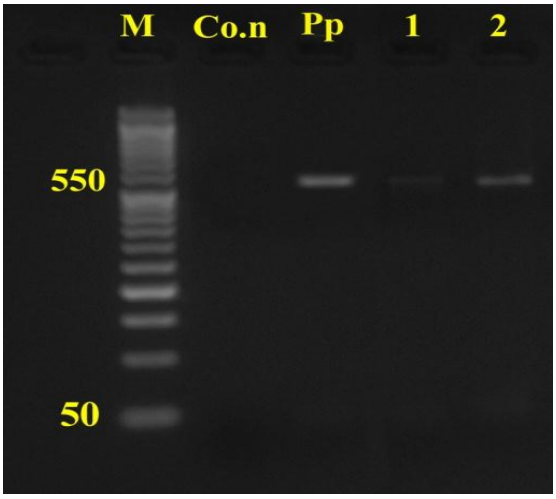
شکل شماره ۱. نتایج PCR قطعه *nad-1*: از سمت راست ستون اول: DNA مارکر(۵۰ bp)، N.co: ستون دوم کنترل منفی را نشان می دهد. ایزوله‌ها به ترتیب شماره: ۲-۱) انسان، ۴-۳) گوسفند



شکل شماره ۲. قطعات هضم شده با آنزیم Alu1. از چپ به راست: DNA مارکر(۵۰ bp)، Co.n: کنترل منفی، Pp: محصول PCR تکثیری با ژن *nad-1* بدون آنزیم، شماره ها به ترتیب ایزوله‌ها: ۱) گوسفند، ۲) انسان



شکل شماره ۳. قطعات هضم شده با آنزیم Ras1. از چپ به راست: DNA مارکر(۵۰ bp)، Co.n: کنترل منفی، Pp: محصول PCR تکثیری با ژن *nad-1* بدون آنزیم، شماره ها به ترتیب ایزوله ها: ۱) گوسفند، ۲) انسان



شکل شماره ۴. قطعات هضم شده با آنزیم HpaII. از چپ به راست: DNA مارکر(۵۰ bp)، Co.n: کنترل منفی، Pp: محصول PCR تکثیری با ژن *nad-1* بدون آنزیم، شماره ها به ترتیب ایزوله ها: ۱-۲) گوسفند، ۳-۴) انسان

بحث و نتیجه گیری

بررسی مطالعات انجام شده نشان می دهد که، ژنوتیپG1 شایع ترین علت هیداتیدوزیس انسانی در دنیا محسوب می شود(۲۸-۲۶، ۱۸-۱۶). در ایران بیماری در دام های اهلی شایع است و عفونت انسانی از مناطق مختلف کشور گزارش شده است(۶،۵،۲۹). در حال حاضر برای مطالعه سویه های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* از روش های مولکولی به ویژه روش های مبتنی بر PCR-RFLP مانند ناحیه *nad-1* و تعیین توالی DNA میتوکندریایی استفاده می گردد که از کیفیت و کمیت مناسبی برای تهیه محصولات PCR برخوردار است(۵،۱۳،۲۰،۲۵،۲۹). در مطالعه حاضر، نتایج PCR نمونه های تهیه شده مشابه با یافته های گزارش شده در سایر مطالعات بود(۲۴،۲۶). هم چنین الگوی PCR-RFLP ژن *nad-1* در خصوص نمونه های تهیه شده از گوسفند و انسان، نشانگر حضور فعال کمپلکس (G1-G3) در ایلام بود. در مطالعه Utuka و همکاران در ترکیه بر روی ایزوله های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با هضم آنزیمی محصول ژن های *cox-1* و *ITS1*، سویه شایع در منطقه را سویه گوسفندی(G1) گزارش نمودند(۲۶). در بررسی ۱۰ نمونه کیست هیداتید انسانی به روش PCR-RFLP و تعیین توالی ژن *nad-1* میتوکندریال که توسط Scott و همکاران در لهستان در سال ۱۹۹۷ انجام شد، برای اولین بار یک ژنوتیپ مجزا(G9) از *اکینوکوکوس* شناسایی گردید(۱۵). در مطالعه احمدی و دلیمی، Zahng و همکاران و Thompson و همکاران با روش های مورفولوژی و مولکولی

در ایزوله های انسانی و حیوانی با دو سیکل زندگی سگ–گوسفند و سگ–شتر به عنوان چرخه های فعال انگل تایید شده است(۳۱-۲۹،۱۶). در مطالعه یخچالی و همکاران به روش PCR-RFLP یافته های مولکولی بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن *nad-1* نشان داد تمامی نمونه های با منشاء نشخوارکنندگان و سگ، الگوی RFLP مشابه داشتند که متعلق به ژنوتیپ سویه گوسفندی(G1) بودند(۳۲). بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه پزشکی و همکاران، با سکانس مستقیم محصولات PCR برای ژن *cox-1* و ژن *nad-1* استرین گوسفندی(ژنوتیپ G1) استرین غالب در گوسفند، گاو، بز و انسان بود و استرین بوفالویی(ژنوتیپ G3) نه تنها در ۱ ایزوله گوسفندی و ۱ ایزوله گاوی بلکه برای اولین بار در ایران در ۲ ایزوله انسانی گزارش شد(۳۳). بر اساس مطالعات انجام شده در ایران ژنوتیپ G1 شایع ترین ژنوتیپ در ایزوله های انسانی بوده است(۵،۱۸،۲۷،۲۹،۳۴). مطالعه شهنازی و همکاران در اصفهان نشان داد که استرین گوسفندی(G1) غالب ترین ژنوتیپ بوده که در ایزوله های انسان، گاو، گوسفند و تعداد کمی از ایزوله های شتری یافت شد که استرین شتری(G۶) در انسان، شتر و گاو نیز مشاهده شده بود که خود نشان می دهد استرین شتری می تواند به عنوان یک منبع مهم عفونت برای انسان مطرح باشد(۳۴). هانیلو و همکاران در سال ۲۰۱۲ با روش PCR-RFLP با استفاده از ژن *ITS1* روی ایزوله های انسانی و حیوانی در زنجان نشان دادند که استرین غالب *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در دام ها و انسان، ژنوتیپ(G1) یا همان استرین شایع گوسفندی می باشد(۳۵). شربت خوری و همکاران در سال ۲۰۱۰ از طریق تعیین توالی ژن های میتوکندریایی(*nad-1* و *cox-1*)، ایزوله های شتری را متعلق به دو ژنوتیپ(G1 و G3) گزارش نمودند(۳۶). در بررسی قطعه ژنی *ITS1* روی ایزوله های دامی با PCR-RFLP در یاسوج، سویه G1، سویه غالب ایجادکننده بیماری کیست هیداتید گزارش گردید(۳۷). در مطالعه دوستی و همکاران در ایلام که با استفاده از ژن *ITS1* روی ایزوله های انسانی و دامی انجام شد، ژنوتیپ های(G1 و G3) در منطقه شناسایی شدند که با نتایج تحقیق حاضر هم خوانی دارد(۳۸). در مطالعه PCR-RFLP مقدس و همکاران که در پنج ناحیه مختلف جغرافیایی شرق ایران با استفاده از دو ژن *ITS1* و *cox-1* روی ۵۰ نمونه کیست هیداتید شتری انجام شد، ۵۴ درصد از نمونه ها به عنوان ژنوتیپ G1 و ۴۶ درصد نیز ژنوتیپ G6 گزارش کردند(۳۹).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، که سویه غالب انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایلام همانند سایر نقاط کشور استرین گوسفندی می باشد که در چرخه آن سگ میزبان اصلی و دام ها میزبان واسطه هستند. در ادامه مطالعه حاضر مطالعات جامع تری با تعیین توالی ژنوتیپ های شناسایی شده در منطقه انجام شد و نقش ژنوتیپ G1 (استرین شایع گوسفندی) به عنوان استرین شایع عامل عفونت های انسانی در ایلام تایید گردید که نتایج آن متعاقباً انتشار می یابد. لذا پیشنهاد می شود در خصوص نکات مطرح در پیشگیری، کنترل و در مواردی تهیه واکسن های نوترکیب متناسب برای سیستیک اکینوکوکوزیس انسان و دام اقدامات موثری انجام داد و در جهت مبارزه و قطع کامل چرخه زندگی انگل در بین انسان، نشخوارکنندگان و گوشت خواران منطقه گام های عملی مفیدی برداشت.

سپاسگزاری

هزینه تحقیق از محل اعتبارات معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه تربیت مدرس در قالب پایان‌نامه دانشجویی دوره دکتری تخصصی رشته انگل شناسی پزشکی تأمین گردید.. ضمن تشکر از کارکنان محترم آن حوزه، از همکاری صمیمانه کارکنان کشتارگاه صنعتی ایلام برای تهیه نمونه کیست‌های هیداتید گوسفندی و همکاران محترم بخش جراحی و اتاق عمل بیمارستان های شهرستان ایلام برای تهیه نمونه کیست‌های انسانی تقدیر به عمل می‌آید.

Reafrence

1.Roberts L, Janovy J, Nadler S. Foundation of parasitology. 9th ed. Mcgraw Hill Science; 2012.

2.Maleky F, Moradkhan M. Echinococcosis in the stray dogs of Tehran Iran. Ann Trop Med Parasitol 2000;94:329-31.

3. Eslami A, Hosseini SH. *Echinococcus granolosous* infection of farm dogs of Iran. Parasitol Res 1998;84: 205-7.

4. Rajabloo M, Hosseini H, Jalousian F. Morphological and molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* from goat isolates in Iran. Acta Tropica 2012; 123:67– 71.

5.Rostaminejad M, Jahani S, Cheraghipour K, NazemallhoseiniMojarad E, Taghipour N, Zali MR. Hydatic cyst prevalence in slaughtered animals, A neglected health problem. Paramed Sci J 2012; 3:25-9.

6. Rokni MB. Echinococcosis /hydatidosis in Iran. Iran J Parasitol, 2009; 4: 1-16.
7. Bastani b, Dehdashti F. Hpatic hydatid disease in Iran, with review of the literature. Mt Sinai J Med 1995;62:62-9.
8. Bowels J, Blair D, McManus DP. Gentic variants within the genus *Echinococcus* identified
by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol 1992;54:156-73.
9. Khosravi A, Shamsi M, Sadeghifard N, Ghafourian S. Evaluation of mice, sheep and human IgG and IgE antibody responses against the mice Crude Hydatid Cyst Fluid (HCF) antigens. J Cell Ani Biol2012; 6:66-72.
10. RostamiNejad M, Nazemalhosseini Mojarad E, FasihiHarandi M. Echinococcosis: based on molecular studies in Iran. Gastroenterol Hepatol Bed Bench2010; 3:169–176.
11.Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi Sh, Nakao M,Sadjjadi M, Hijjawi N. et.al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus* sensu stricto in the Middle East. Parasitol Int 2012; 61:599–603.
12.Thompson RCA, The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. Exp Parasitol 2008;119:439-46.
13.Thompson RCA, McManus DP. towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. Trends Parasitol 2002;18:452-57.
14.Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelakoski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcous granolosous*. Parasitol 2003;127:207-15.
15. 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.
16.McManus DP, Thompson RCA. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis . Parasitol 2003;127:37-51.
17.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.
18.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.
19. McManus DP, Smyth JD. Hydatidosis: changing cocepts in epidemiology and speciation.
Parasitol Today 1986;2:163-8.
20.McManus DP. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease.Trans R Soc Trop Med Hyg 2002;1:51-7.
21.Baba H, Messedi A, Masmodi S, Zribi M, Sahnoun Y. Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. Am J Trop Med Hyg 1994;50: 64-8.
22. Dyachenko V, Pantchev N, Gawlowska S, Globokar MV, Bauer Ch. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. Vet Parasitol 2008;151:97-109.
23.Bowles J, McManus DP.NADHdehydrogenase1gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. Int J Parasitol 1993;23:969–72.
24.Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants with in the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Bioche Parasitol 1992;54:165–73.
25.Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. Mol Biochem Parasitol 1993;57: 231-9.
26.Utuka AE, Simsekb S, Koroglub E, McManus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turky. Acta Tropica 2008;107:192-4.
27.Jamali R, Ghzanchaei A, Asgharzadeh M. Identification and characterization of *Echinococcus granulosus* by PCR- RFLP techniquein Tabriz district. J Parasitic Diseases 2004;28:69-72.
28.Sharbatkhori M, Mirhendi H, Fasihi Harandi M, 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; 124:373–9.

29. Khosravi A, Ghafourian S, Shamsi M, Sadeghifard N, Maleki A, Babaahmadi E. Cross-Reaction between the Crude Hydatid Cyst Fluid Antigens of Human and Animals Origin in Response to Human IgG Class and Subclasses. J Parasitol Res2012; 947948:1-8.

30. Ahmadi N, Dalimi A. Charactrization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and caml in Iran. Infect Genetic Evolution 2006;6:85-90.

31.McManus DP. Molecular technology: improving strategies for controlling hydatid disease and cysticercosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1990;21:161-73.

32.Yakhchali M, Mardani K. [Study on *Echinococcus granulosus* genotype diversity in domestic cycle using nucleotide sequence of nda-1 gene]. Iran Vet J 2011;7:63-9.(Persian)

33.Pezeshki A, Akhlaghi L, Sharbatkhori M, Razmjou E, Oormazdi H, Mohebali M. Genotyping of *Echinococcus granulosus* fr om domestic animals and humans from Ardabil Province, northwest I ran. J Helminthol 2013;87:387-91.

34.Shahnazi M, Hejazi H, Salehi M, Andalibi AR. Molecular chaeacterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolare in Isfahan,Iran.Acta Trop 2011;117:47-50.

35.Haniloo A, Farhadi M, Farzali A, Nourian A. [Genotype characterization of hydatid cysts isolated from Zanjan using PCR-RFLP technique]. Zanjan Univ Med Sci J 2012;84:57-65.(Persian)

36.Sharbatkhori M, Fasihi Harandi M. Sequence analysis of *cox-1* and *nad-1* genes in *Echinococcus granulosus* G 3 genotype in camels (*Camelus dromedarius*) from central Iran. Parasitol Res 2011; 3:521–7.

37. Sadri A, Moshfe A, Doosti A, Ansari H, Abidi H, Ghorbani Dalini S. [Characterization of isolated hydatid cyst from slaughtered livestock in Yasuj industrial slaughterhouse by PCR-RFLP]. Yasuj Uni Med Sci J 2012;3:243-52.(Persian)

38.Dousti M, Abdi J, Bakhtiyari S, Mohebali M, Mirhendi SH, Rokni MB. Genotyping of hydatid cyst isolated from human and domestic animals in Ilam province, western Iran using PCR-RFLP. Iran J Parasitol 2013;1:47–52.

39.Moghaddas E, Borji H, Naghibi A, Shayan P, Razmi GR. Molecular genotyping of *Echinococcus granulosus* from dromedaries (*Camelus dromedarius*) in eastern Iran.J Helminthol 2013; 10:1-5.

Determination of Genotype Isolates of Human and Sheep Hydatid Cyst in Ilam

Shamsi M[1], Dalimi A[1], Khosravi A[2], Ghafarifar F[1]*

(Received: February 7, 2015 Accepted: May 11, 2015)

Abstract

Introduction: Echinococcosis disease is one of the most common diseases of human and animals in many parts of the world, including Iran, which is caused by larval stage of *Echinococcus granulosus*. This parasite has a high genetic diversity and including a complex of different genotypes (strains). Usually in areas where disease is endemic, there is a relatively high genetic diversity in parasite biologically. Studies in different parts of the world demonstrate that genotype variation and the nature of Echinococcus granulosus influenced on the life cycle of parasite, transmission routes, pathogenesis, and antigenicity, immunogenicity, response to medication, epidemiology and control of the disease. The aim of present study was to determination of genotype isolates of human and sheep hydatid in Ilam province for the first time.

Materials & methods: 20 hydatid cyst samples were collected from sheep Ilam Industrial slaughterhouses and 10 human samples from Ilam hospitals. After DNA extraction of protoscoleces, mitDNA NADH dehydrogenase subunit 1 (nad-1) areas was amplified by PCR and the PCR products were analyzed by PCR-RFLP.

Findings: Based on the results which obtained, the size of proliferative nad-1 products was 550 base pairs. Patterns of parts which obtained from PCR products after cutting by Alu1 and Rsa1 enzymes showed that all samples had a similar RFLP pattern but HpaII enzyme did not cut any region and had no change in fragment size.

Discussion & Conclusions: The results of this study indicated that there is at least one genotype of parasite in this region which belongs to (G1-G3) complex.

Keywords: Echinococcus granulosus, Genotypes, PCR-RFLP, Ilam

1. Dept of Parasitology, faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Dept of Immunology , faculty of Medicien, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.
** Correspondin author Email:dalimi_a@modares.ac.ir*