

## بررسی مورفولوژیکی و ملکولی کیست‌های هیداتید گوسفندان کشتاری شهرستان مشهد

• فرشته میرشکار

گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد

• غلامرضا هاشمی تبار

گروه پاتوبیولوژی، بخش بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد

• غلامرضا رزمی (نویسنده مسئول)

گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۱۰-۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۱۲-۲۷

Email: razmi@um.ac.ir



### چکیده

کیست هیداتید یکی از بیماری‌های مهم زئونوز در ایران است. کرم ائینوکوکوس گرانولوزوس عامل این بیماری واجد سویه‌های متعددی است. هر یک از سویه‌ها واجد بیولوژی متفاوتی بوده که شناسایی آنها در کنترل بیماری در هر منطقه از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف این مطالعه شناسایی سویه‌های ائینوکوکوس گرانولوزوس مولد کیست هیداتید گوسفندان کشتاری با استفاده از روش‌های میکروسکوپی و ملکولی بود. در این مطالعه، کبدها و ریه‌ها آلوده به کیست هیداتید گوسفندان جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل شناسی منتقل گردید. ابتدا پرتواسکولکس‌های کیست جدا سازی گردید و سپس شاخص‌های مورفولوژیک قلاب‌های روستوم پرتواسکولکس‌ها با استفاده با عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری شدند. همچنین DNA پرتواسکولکس هر نمونه استخراج شده و آزمایش PCR بر روی ژن ITS-1 انجام شد. سپس محصول PCR توسط آنزیم *Bsh1236I* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در این بررسی شاخص‌های مورفولوژیکی قلاب‌های پرتواسکولکس‌ها به ترتیب، طول کلی قلاب بزرگ  $24/48 \pm 1/13$  میکرون و طول تیغه‌ی قلاب بزرگ  $12/27 \pm 0/5$  میکرون و طول کلی قلاب کوچک  $19/4 \pm 0/8$  میکرون و طول تیغه‌ی قلاب کوچک  $9/07 \pm 1/1$  میکرون اندازه‌گیری شدند. همچنین الگوی بدست آمده در آزمایش RLFP-PCR امکان وجود هریک از سویه‌های  $G^3, G^2, G^1$  ائینوکوکوس گرانولوزوس را نشان داد. برای تمایز سه سویه از یکدیگر، محصول PCR واجد واکنش، تعیین توالی شدند. آنالیز هم‌ردیفی توالی‌های بدست آمده وجود سویه  $G^1$  را در این مطالعه را تایید نمود. بر اساس نتایج بدست آمده، وجود سویه گوسفندی  $G^1$  در گوسفندان کشتاری مشهد تایید گردید.

کلمات کلیدی: کیست هیداتید، مورفولوژی، بررسی ملکولی، سویه و گوسفند

• Veterinary Researches & Biological Products No 131 pp: 68-76

#### A morphological and molecular study of hydatid cyst in slaughtered sheep in Mashhad area

By: Mirshekar, F., Department of Pathobiology, Parasitology Section, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad. Hashemitabar, Gh., Department of Pathobiology, Parasitology Section, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad. and Razmi, Gh., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Parasitology Section, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad.

Received: 2020-01-01 Accepted: 2020-03-17

Emali: razmi@um.ac.ir

Hydatid cyst is an important zoonotic diseases the agent of disease is *Echinococcus granulosus* that have many strains. Each strain has different biology that identification of them is critical for control of hydatid cyst in every region. The aim of study was to identify *Echinococcus granulosus* strains in slaughtered sheep using morphological and molecular methods in Mashhad area. Many infected liver and lung with hydatid cysts were collected and transferred to laboratory. First, protoscolocies of hydatid fluid were isolated, then the morphological characters of rostellar hook protoscolocies were examined using light microscope. Thus, DNA of protoscolocies in each sample was extracted with commercial Kit. The ITS1 fragments of extracted DNA were amplified by PCR. The PCR product was digested with *Bsh1236I* enzyme. The size of total length large hooks, length blade of large hooks, total length small hooks and length blade of small hooks were measured  $24.47 \pm 1.13 \mu\text{m}$ ,  $12.27 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ,  $19.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$  and  $9.07 \pm 0.7 \mu\text{m}$ , respectively. Based on pattern of PCR-RLFP results, the existence of G1- G3 strains of *Echinococcus granulosus* were possible. Differentiation of three strains was done using sequencing analysis. The Blast analysis showed the presence of G1 strain in slaughtered sheep. The results was confirmed the presence of G1 strain of *Echinococcus* in the slaughtered sheep of Mashhad area.

**Key words:** Hydrated Cyst; Morphology; Molecular study; Strain; Sheep

است. که ۷ سویه آن می‌تواند انسان را آلوده کند (۵). شایع‌ترین سویه اکینوкокوس گرانولوزوس در اکثر کشورها سویه‌ی G1 بوده که علاوه بر انسان در گوسفند، گاو، بز، بوفالو، شتر و خوک نیز گزارش شده است. سویه G2 در گوسفند و انسان، سویه G3 در بوفالو، سویه G4 در اسب و الاغ، سویه G5 در گوسفند، بز، گاو، بوفالو، خوک و انسان، سویه G6 در شتر، گاو، انسان، گوسفند و بز، سویه G7 در خوک، گاو، بز و انسان، سویه G8 در گوزن و انسان، سویه G9 در انسان و سویه G10 در گوزن گزارش شده است (۲). طبق مطالعات انجام شده در ایران نیز شایع‌ترین سویه گزارش شده، همان سویه‌های G1 است (۳۲). تاکنون گزارش‌هایی مبنی بر وجود سویه‌های G3 و G6 در گوسفندان ایران داده شده است (۱۰ و ۹). شهر مشهد بعلاوه جاذبه‌های توریستی و زیارتی، هرساله میزبان جمعیت زیادی از زائرین نقاط مختلف ایران بوده و برای تامین گوشت، روزانه تعداد زیادی گوسفند با منشا جغرافیایی متفاوت در کشتارگاه صنعتی این شهر کشتار می‌شوند. بطوری‌که این شهر می‌تواند محل مناسبی بررسی تنوع سویه‌های کیست هیداتید در گوسفندان باشد. با توجه به مطالعات اندک انجام شده در این شهرستان، در این مطالعه سعی خواهد

#### مقدمه

کیست هیداتید بعنوان بیماری مشترک انسان و دام توسط مرحله نوزادی سستود سگ متعلق به جنس اکینوкокوس ایجاد می‌شود. هیداتیدوز بیماری بومی کشور بوده و حیوانات اهلی از جمله گوسفند، بز، شتر و گاو به عنوان میزبانان واسط آن می‌باشند (۶). این بیماری از ساکنین استان‌های مختلف کشور گزارش شده است (۶، ۸، ۲۳). اکثر موارد بیماری در اثر تماس مستقیم و غیرمستقیم با مدفوع سگ آلوده صورت می‌گیرد. اکینوкокوس گرانولوزوس واجد سویه‌های متفاوتی می‌باشد. این سویه‌ها از نظر ریخت‌شناسی، وزنتیکی با هم اختلاف دارند (۲۵). ویژگی این سویه‌ها بر روند انتقال آلودگی و حساسیت آنها نسبت به ترکیبات دارویی، طراحی و ساخت واکسن‌ها، تشخیص، پاسخ درمانی، همه‌گیری شناسی و کنترل تأثیر می‌گذارند (۲۵). برای نمونه زمان بلوغ کرم و دفع تخم در مدفوع برای سویه شتری اکینوкокوس گرانولوزوس در میزبان نهایی کمتر از سویه گوسفندی اکینوкокوس گرانولوزوس است (۲۵). این خصوصیت زمان درمان دارویی سگ را در یک برنامه پیشگیری تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۵). اکینوкокوس گرانولوزوس دارای ۱۰ سویه

ریخته و تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه نگهداری گردید.

### استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA با استفاده از کیت MBST (MBST, Tehran, Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. DNA استخراج شده مورد آزمایش PCR بر روی ژن ITS-1 با متد Moghadas و همکاران در سال ۲۰۱۵ با استفاده از پرایمرهای EgF (۵۰-ATGAGCACTTTTGTATGCA-۳۰) و EgR (۵۰-ATGGTTGTTATCGCTGCGA-۳۰) قرار گرفتند (۲۰). بعد از انجام PCR، محصول واکنش به همراه کنترل مثبت و منفی در چاهک های ژل ۱/۵ درصد قرار گرفتند و سپس الکتروفورز شدند. اندازه باند تشکیل شده ۵۹۰ bp بود. در هر PCR از آب دیونیزه استریل بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

### PCR-RFLP

در این آزمایش ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بدست آمده، ۱۸ میکرولیتر از آب فاقد نوکلئاز، ۲ میکرولیتر بافر R و دو میکرولیتر از آنزیم برش دهنده *Bsh1236I* (Bst UI) به میکروتیوب منتقل کرده و سپس نمونه ها را به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی Hot plate قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان، برای غیرفعال شدن آنزیم، نمونه ها به انکوباتور حاوی دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه منتقل شدند. جهت مشاهده ی چگونگی برش ها و وزن باندها، نمونه ها به همراه مارکر، در چاهک های بر روی ژل ۳٪ گرفته و پس از الکتروفورز، با استفاده از دستگاه UV-Eluminator، وزن باندهای DNA ایجاد شده در ژل بررسی و از آن ها عکس تهیه شد.

### تعیین توالی

تعداد ۱۰ نمونه از ۳۰ نمونه PCR شده برای تایید نتایج PCR-RFLP به منظور تعیین توالی به شرکت بیونیر کره فرستاده شد.

شد نسبت به شناسایی سوبه های اکینوкокوس در گوسفندان کشتارگاه مشهد با استفاده از روش های مورفولوژیکی و مولکولی اقدام شود.

### مواد و روش ها

#### نمونه گیری و بررسی مورفولوژیکی

در این بررسی از بین ۳۵۰ لاشه گوسفند کشتاری تعداد ۳۰ عضو آلوده شامل (کبد و ریه) گوسفندان کشتار شده، در طی روزهای مختلف سال ۱۳۹۵ از کشتارگاه مشهد جمع آوری شده و به آزمایشگاه برای انجام مطالعات مورفولوژیکی ملکولی منتقل شد. با استفاده از سرنگ استریل ۱۰ سی سی مایع درون کیست ها در شرایط آسپتیک کشیده شد و به ارلن استریل منتقل گردید. ابتدا حجم مایع کیست اندازه گیری شد. پس از به هم زدن مایع کیست، مقدار از آن را با پیپت پاستور برداشته و با لام مک ماستر دو خانه تعداد پرتواسکولکس در ۰/۳ سی سی شمارش گردید. همزمان، قطره کوچکی از مایع کیست هیداتید برداشته شده، روی لام ریخته و متیلن بلو به آن اضافه شد. پس از گذاشتن لامل بلافاصله رنگ پذیری پرتواسکولکس ها برای تعیین درصد زنده بودن آنها به کمک میکروسکوپ بررسی گردید. بدین منظور تعداد صد پرتواسکولکس را شمارش کرده و درصد پرتواسکولکس های رنگ نگرفته (زنده) را ثبت شد. لوله های حاوی مایع کیست هیداتید جمع آوری شده از هر عضو (کبد و ریه) را با دور ۸۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کرده، سپس مایع رویی را دور ریخته سپس از رسوب ته لوله با استفاده از پیپت پاستور استریل مقداری پرتواسکولکس برداشته و بر روی لام گذاشته، یک قطره لاکتوفنل اضافه و روی آن ها لامل قرار گرفت. آنگاه تعداد قلابها پرتواسکولکس ها شفاف شده زیر میکروسکوپ شمارش شده و با استفاده از عدسی چشمی میکرومتری شاخص های مورفولوژیکی قلاب های روستلوم شامل: طول و عرض قلابها، طول و عرض تیغه و طول و عرض دسته هر قلاب پرتواسکولکس های اندازه گیری شد (شکل ۱). باقیمانده پرتواسکولکس ها را پس از چند بار شستشو با آب مقطر استریل در میکروتیوب های ۱/۵ سی سی

جدول ۱- مقایسه مورفو متریک قلاب های کوچک و بزرگ پرتواسکولکس های کبد و ریه گوسفندان الوده به کیست هیداتید.

تعداد قلاب Mean±SD		مشخصات مورفومتریک قلاب بزرگ (میکرون) Mean±SD			مشخصات مورفومتریک قلاب کوچک (میکرون) Mean±SD			پارامتر کمی قلاب ها	
مجموع قلاب ها	قلاب بزرگ	قلاب کوچک	طول قلاب	طول دسته	طول تیغه	طول قلاب	طول دسته	طول تیغه	نوع بافت
۳۲/۸۰±۲/۲۷	۱۶/۶±۰/۹۲	۱۶/۲±۱/۸۰	۲۴/۶۷±۱/۱۳	۶/۴۷±۰/۶۴	۱۲/۲۷±۰/۰۷	۹/۰۷±۰/۰۷	۹/۰۷±۰/۰۷	۹/۰۷±۰/۰۷	کبد
۳۳/۳۳±۲/۳۲	۱۶/۳۳±۲/۷۷	۱۶/۳۳±۱/۲۹	۲۲/۹۳±۰/۲۶	۶/۹۳±۰/۴۶	۱۱/۸±۱/۰۸	۸/۶۰±۱/۵۳	۸/۶۰±۱/۵۳	۸/۶۰±۱/۵۳	ریه

و اندازه قلاب‌های کوچک و بزرگ پرتواسکولکس‌های ریه و کبد با آزمون T-test تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $p > 0/05$ ) (جدول ۱). نمونه‌های DNA استخراج شده از پرتواسکولکس‌های ریه و کبد با روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. محصول PCR تمام آنها واجد باند ۵۲۹ bp بودند (شکل ۲). پس از آن محصول PCR توسط آنزیم (*Bsh1236I* (BSTUI) طی واکنش RFLP مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. محل برش این آنزیم CGCG می‌باشد، بنابراین بر اساس تعداد بازهای CGCG در قطعه‌ی تکثیر شده در واکنش PCR، الگوی هضم آن بر روی محصول روی ژل مشاهده می‌گردد (شکل‌های ۳ و ۴). با توجه به الگوی بدست آمده وجود سو به‌های G۳-G۱ در گوسفندان کشتاری شهرستان مشهد تایید گردید. به منظور تفریق سویه‌ها، نمونه‌ها تعیین توالی شدند. آنالیز توالی‌های بدست آمده، نشان داد که همه آنها واجد یک الگو می‌باشند. بررسی هم‌ردیفی توالی‌های بدست آمده در این مطالعه با توالی‌های ژن ITS-1 سویه‌های مختلف کیست هیداتید ثبت شده در بانک ژنی، وجود سویه G۱ در این مطالعات را تایید نمود.

### بحث و نتیجه‌گیری

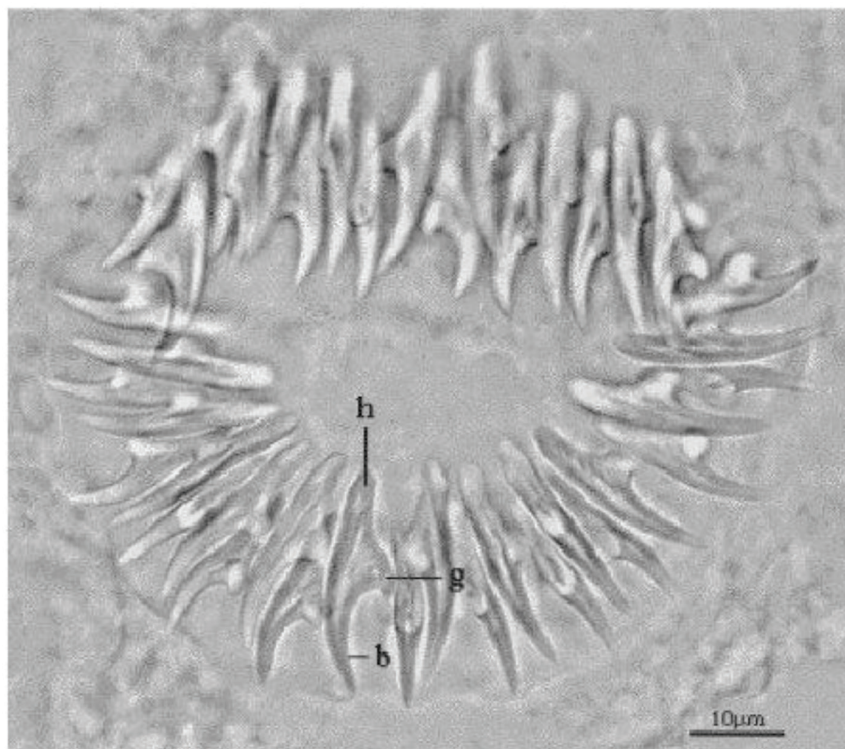
متوسط فراوانی هیداتیدوزیس گوسفندی در نقاط مختلف ایران ۸/۱٪

### آنالیز آماری

داده بدست آمده از اندازه‌گیری قلاب‌های پرتواسکولکس با نرم‌افزار SPSS با آزمون T-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمونه‌های تعیین توالی شده با نرم‌افزار Clc genomic workbench ۵ آنالیز گردید و با توالی‌های موجود در بانک ژنی مورد بلاست (هم‌ردیفی) قرار گرفت.

### نتایج

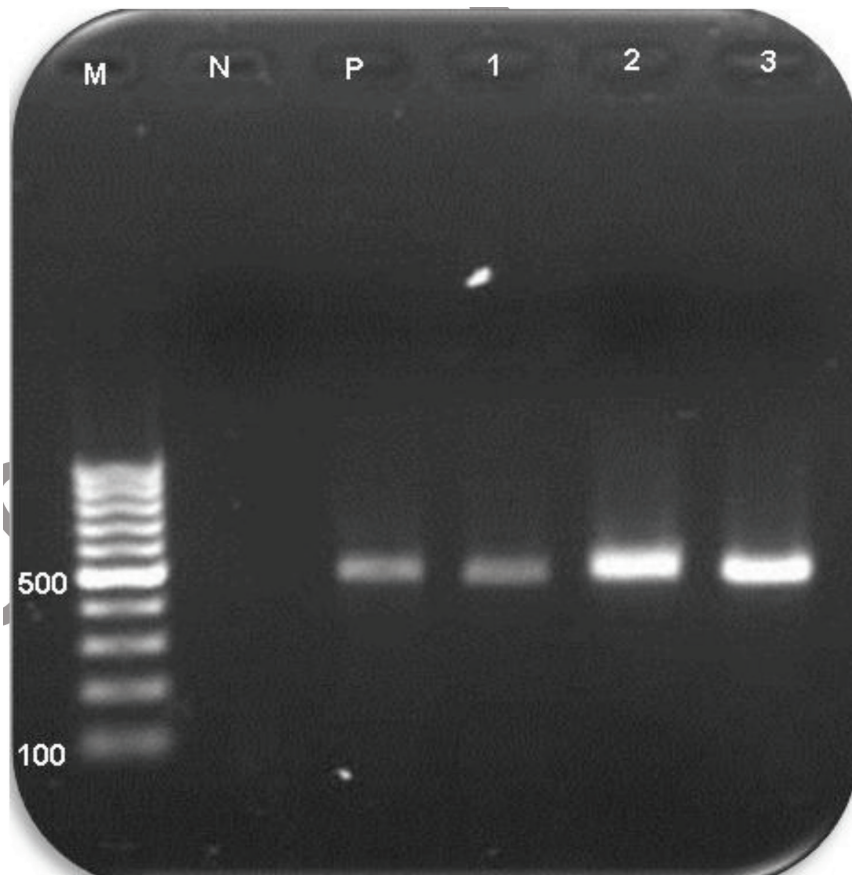
از ۳۵۰ گوسفند مورد بررسی (۸/۵۷٪) ۳۰٪ گوسفند آلوده به کیست هیداتید بودند. میزان باروری کیست‌ها در کبد و ریه به ترتیب ۷۰/۲٪ و ۵۹/۳٪ تعیین شدند. میانگین تعداد پرتواسکولکس در کیست‌های کبدی  $71/5 \pm 0/38$  و در کیست‌های ریوی  $21/5 \pm 0/37$  گزارش گردید. در بررسی‌های انجام شده، کمترین حجم مایع استخراج شده مربوط به کیست‌های ریوی بودند و بیشترین حجم را کیست‌های کبدی را به خود اختصاص دادند. به طور متوسط حجم مایع در کیست‌های کبدی  $21 \pm 0/8$  سی‌سی و در کیست‌های ریوی  $7/6 \pm 0/5$  سی‌سی بودند. قلاب‌های روستلوم پرتواسکولکس‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی و اندازه شاخص‌های مورفولوژیکی قلاب‌های بزرگ و کوچک به تفکیک اندام (کبد و ریه) در جدول ۱ آمده است. مقایسه نتایج تعداد



شکل ۱ - تصویر قلاب‌های کوچک و بزرگ روستلوم پرتواسکولکس.

شرایط اقلیمی، نوع پرورش دامها، جنسیت و سن گوسفندان می باشد. در این بررسی کیست ها بارور در کبد و ریه در این مطالعه به ترتیب ۵۵/۶٪ و ۴۴/۳٪ بود، که بیشتر از باروری گزارش شده توسط Dalimi و همکاران در سال ۲۰۰۲ به میزان ۳۶/۹٪ در کبد و ۲۵/۲٪ در ریه و Hazrati و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ارومیه به میزان ۳۷٪ در کبد و ۲۶٪ در ریه (۵،۱۱) می باشد. در مطالعه انجام شده در عربستان سعودی در سال ۲۰۱۰ کیست های هیداتید بارور به میزان ۳۸/۷۹٪ در کبد و ۲۵/۱۳٪ در ریه گزارش شد (۱۵). این مطالعات نیز نشان دادند که بیشترین کیست های بارور در کبد دیده می شود که با این مطالعه نیز هم خوانی دارد. فراوانی کیست های بارور توسط Hosseini و اسلامی در سال ۱۳۷۶ میزان باروری کیست هیداتید گوسفندی در تهران را به میزان ۸۸٪ (۱۳،۱۴) و Latif و همکاران در سال ۲۰۱۰ در پاکستان به میزان ۸۶/۴۰٪ گزارش نمودند (۱۹). طبق مطالعه انجام شده، بررسی ویژگی های مورفولوژیکی پرتواسکولکس کیست هیداتید به عنوان ابزاری

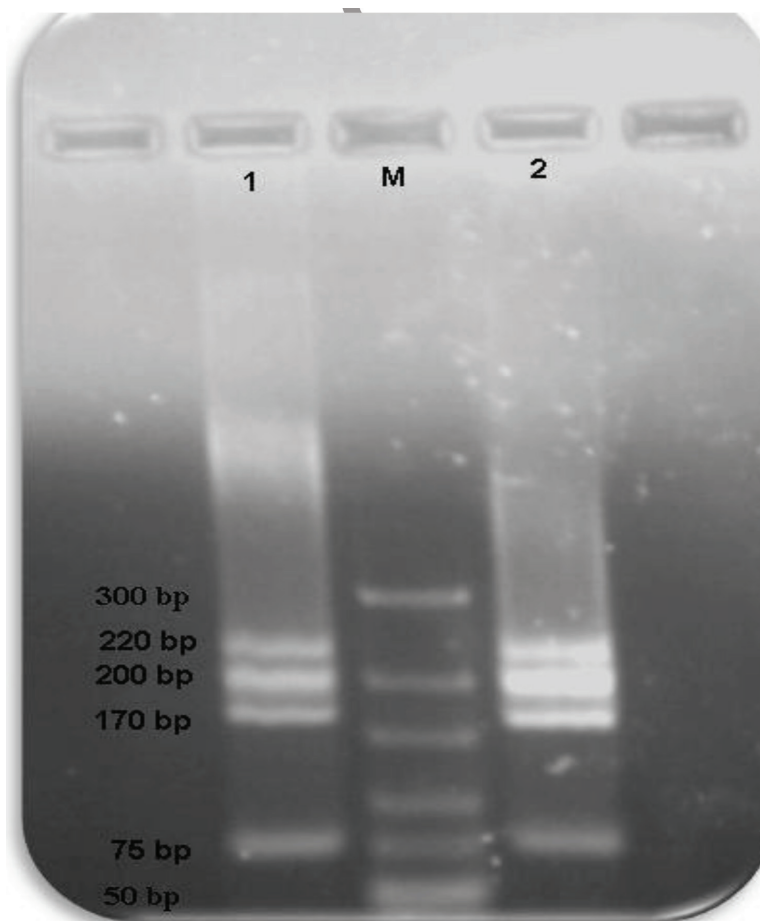
گزارش شده است، که دامنه ی آن از ۱ تا ۲۷/۵٪ متغیر است (۲۴). در این مطالعه میزان فراوانی هیداتیدوزیس در گوسفندان کشتاری شهرستان مشهد ۸/۵٪ تعیین گردید که با متوسط فراوانی هیداتیدوزیس در ایران و با مطالعه ی انجام شده توسط Dalimi و همکاران در سال ۱۳۸۵ در ارومیه به میزان ۸/۴۹٪ هم خوانی دارد (۴). همچنین نسبت به مطالعه Dalimi و همکاران در سال ۲۰۰۲ در شرق کشور به میزان ۱۱/۱٪ و Fakhar و همکاران در سال ۲۰۰۷ در قم به میزان ۹/۳٪ کمتر است (۵،۷). اما نسبت به مطالعه انجام شده توسط Borji و همکاران در سال ۲۰۱۱ در شهرستان مشهد به میزان ۳٪ و Hazrati و همکاران در سال ۲۰۱۰ در شهرستان ارومیه ۲/۷٪ بیشتر است (۳،۱۱). با توجه به اینکه محل پرورش گوسفندان کشتاری در این مطالعه بدرستی مشخص نبود بنابراین فراوانی هیداتیدوزیس در این گوسفندان نمی تواند موید آلودگی واقعی در شهرستان مشهد باشد. عوامل اصلی موثر در فراوانی هیداتیدوزیس در گوسفندان شامل میزان آلودگی سگ ها به اکینو کوکوس،



شکل ۲- محصول تکثیر ژن ITS ۱ (۵۹۰ bp) کیست هیداتید توسط PCR، M: مارکر DNA (100bp)، A، چاهک N: کنترل منفی، چاهک P: کنترل مثبت، چاهک های ۱-۳: نمونه هایی که مثبت شده اند. 100bp

به اطلاعات بدست آمده از شاخص‌های مورفولوژیکی جهت تمایز سویه و گونه، کافی نمی‌باشد. بنابراین تلفیق نتایج روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی می‌تواند اطلاعات قابل‌قبول‌تری را در رابطه با شناسایی تنوع در سویه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس فراهم کند. در این مطالعه، از روش PCR-RFLP روی قطعه ITS-1 با استفاده از آنزیم (*Bsh*۱۲۳۶I)، جهت تفریق سویه‌های کیست هیداتید استفاده شد (۲۰). نتیجه هضم آنزیمی نمونه‌ها در این مطالعه، الگوی ۴ باند مبنی بر وجود سویه‌های G۱، G۲، G۳ اکینوкокوس گرانولوزوس را نشان داد. برای تمایز این سه سویه از یکدیگر، نمونه‌ها تعیین توالی شدند و با توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی مورد آنالیز هم‌ردیفی قرار گرفتند. نتایج آنالیز وجود سویه‌ی G۱ را در تمام نمونه‌ها تایید نمود. Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۸ با استفاده از یک آنزیم با روش RFLP روی ژن‌های *cox1* و *nad1* سویه‌ی G۱ را در نمونه‌های کیست هیداتید از گوسفند، بز، گاو و انسان

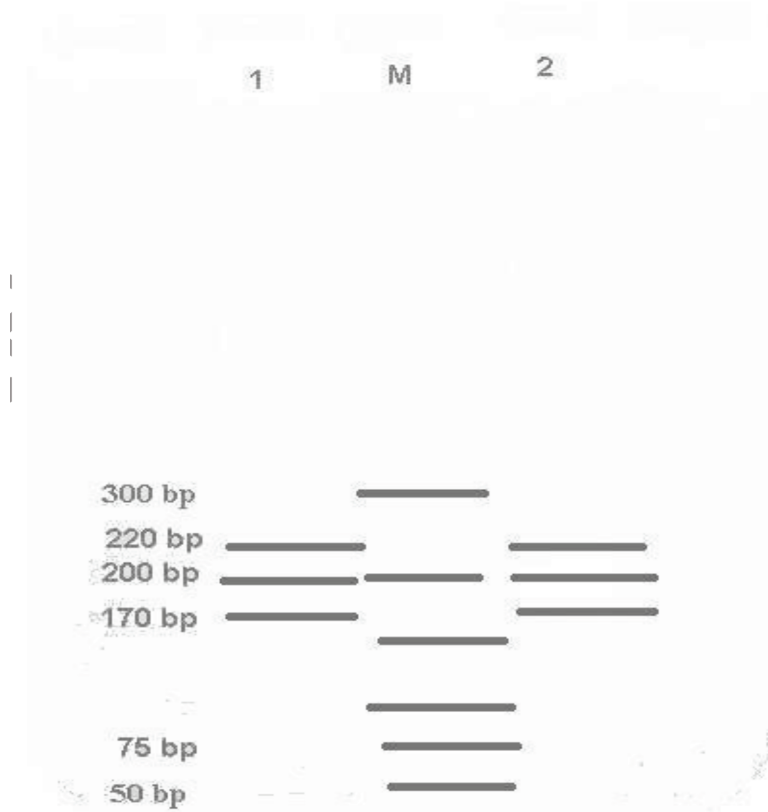
مهم در شناسایی و تاکسونومی انگل اکینوкокوس گرانولوزوس شناخته می‌شوند. (۱۴). در این مطالعه بعضی از شاخص‌های مهم مورفولوژیکی قلاب‌های پرتواسکولکس کیست هیداتید مورد بررسی قرار گرفتند. در میان شاخص‌های مورفولوژیک طول قلاب و تیغه قلاب بزرگ و کوچک از مهم‌ترین شاخص‌های تشخیصی هستند. در این بررسی اندازه‌های بدست آمده در مورد شاخص‌های مورفولوژیکی قلاب‌های کوچک و بزرگ روستلوم با اندازه گزارش شده توسط Ahmadi و Dalimi در سال ۲۰۰۲ و Molavi و همکاران در سال ۲۰۱۲ هم‌خوانی دارد (۱،۲۱). اندازه شاخص‌های طول تیغه قلاب‌های کوچک و بزرگ و تعداد قلاب‌ها در این مطالعه نیز مشابه با سویه گوسفندی، گزارش شده از کشورهای استرالیا و اسپانیا است (۱۲،۱۸،۲۲). اگر چه طول کلی قلاب بزرگ در این مطالعه کمی کوچکتر از سویه گوسفندی استرالیا و اسپانیا می‌باشد. با توجه به تنوع‌های درون گونه‌ای اکینوкокوس گرانولوزوس اکتفا نمودن



شکل ۳- الگوی بدست آمده در PCR-RFLP: M: مارکر DNA (۱۰۰-۳۰۰ bp) چاهک ۱، ۲: الگوی برش‌های ایجاد شده روی ژل.

همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز در ۸۶/۷٪ نمونه های گوسفندی، سویه G۱ و در بقیه سویه G۳ تشخیص داده شد (۹). Vurual و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ترکیه در ۹۸٪ نمونه های گوسفندی سویه G۱ و در ۲٪ باقیمانده سویه G۳ گزارش نمودند (۲۷). Varcasia و همکاران در یونان در سال ۲۰۰۷ در ۱۸ گوسفند سویه G۱ و در ۲ گوسفند سویه G۳ گزارش کردند (۲۹). اکینوکوکوس گراونولوزوس دارای ۱۰ سویه می باشد، که ۷ سویه آن قادر به آلودگی انسان می باشد. در اکثر کشورها شامل جنوب و شرق اروپا، شمال و شرق آفریقا، قسمت هایی از آسیا، استرالیا و آرژانتین سویه های G۱ به عنوان رایج ترین سویه زئونوز انسانی گزارش شده است (۲۵). این سویه علاوه بر انسان در گوسفند، گاو، بز، شتر، گاو میش و خوک نیز دیده شده است (۲۵). در ایران وجود هیداتیدوزیس ناشی از سویه G۱ در انسان تایید شده است (۱۷). در ایران در رابطه با هیداتیدوزیس سه سیکل شامل سیکل اهلی بین سگ ها و نشخوارکنندگان اهلی، سیکل بیابانی بین سگ ها و شتر و سیکل وحشی بین گوشتخواران وحشی و نشخوارکنندگان وحشی وجود دارد. مهم ترین میزبان واسط سیکل اهلی گوسفند می باشد (۶)، که در بین سایر دام ها، بیشترین درصد باروری کیست هیداتید را به خود اختصاص می دهد. این یافته ها نشان دهنده

در ایران تایید نمود (۳۲). Ahmadi و Dalimi در سال ۲۰۰۲ در روش PCR-RFLP روی قطعه ITS-1 با استفاده از ۴ آنزیم، دو سویه G۱ و ۶G را در نمونه های گوسفند و شتر گزارش کردند (۱). در مطالعه Yousefi و همکاران در سال ۱۳۸۶ با استفاده از تکنیک PCR-RFLP روی قطعه ITS-1 در استان چهارمحال و بختیاری (۳۱)، Yakhchali و Mardani در سال ۱۳۸۹ با همین روش در آذربایجان غربی (۳۰)، Jamali و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از همین روش و با دو آنزیم (RsaI, HpaII) در تبریز (۱۶)، Rostaminejad و همکاران در سال ۲۰۰۸ با همین روش در ایران (۲۴)، Karimi و Dianatpour در سال ۲۰۰۸ با همین روش روی قطعه Nad-۱ در ایران (۱۷)، Varcasia و همکاران از ایتالیا در سال ۲۰۰۶ با همین روش روی قطعه Nad ۱ (۲۸)، Utuk و همکاران از ترکیه در سال ۲۰۰۸ با همین روش روی قطعه ITS-1 (۲۶)، وجود سویه G۱ را در گوسفندان گزارش کردند. نتایج این مطالعات نشان داد که سویه G۱، سویه های غالب در نمونه های کیست هیداتید گوسفندی می باشد. اگرچه در مطالعه هرندی و همکاران در سال ۲۰۰۲ به روش PCR-RFLP روی قطعه ITS-1، ضمن گزارش سویه G۱ در بیشتر نمونه های گوسفندی، در تعداد اندکی سویه G۶ نیز پیدا کردند (۱۰). در مطالعه Hajjalilo و



شکل ۴- تصویر شماتیک محل برش آنزیم (Bsh1۲۳۶I(BST UI)).

origin in Iran. *Parasitology* .125: 367–373

11-Hazratitappae, Kh., Mousavi, S.J. Barazesh, A. 2011. Prevalence and fertility of hydatid cysts in Slaughtered livestock of Urmia area, Northwest Iran. *J. Med. Sci. Uni. Urima*. 3:30-32.

12-Hobbs, R.P., Lymbery, A.J., Thompson, R.C. 1990. Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts, and its implications for strain recognition. *Parasitol*. 2:273-81.

13-Hosseini, S.H. 1997 Relationship between the prevalence of hydatid cyst and age of sheep, cattle, and camel and the rate of fertility and viability of hydatid cyst. *J. Fac. Vet. Med. Teh. Uni* 52: 100-104

14-Hosseini, S.H. Eslami, A. 1998. Morphological and developmental characteristics of *Echinococcus granulosus* derived from sheep, cattle and camels in Iran, *J. Helminthol*. 72:337–341.

15-Ibrahim, M.M. 2010. Study of cystic Echinococcosis in slaughtered animal Albaha region Saudi Arabia. *Acta Tropica* 113: 26-33.

16-Jamali, R., Ghazanchaei, A., Asgharzadeh, M. 2004. Identification and characterization of *Echinococcus granulosus* by PCR-RFLP technique in Tabriz district. *J Parasit Dis*, 28: 69–72.

17--Karimi, A. Dianatpour, R. 2008. Genotypic and phenotypic characterization of *Echinococcus granulosus* of Iran. *Biotechnol*. 7: 757–762

18-Kumaratilake, L.M., Thompson, R.C.A. 1984. Morphological characterisation of Australian strains of *Echinococcus granulosus*, *Inter. J. Parasitol*. 14:467-477.

19-Latif, A.A., Tanveer, A., Riiazud-Din, S., Maqbool, A., Qureshi, A.W. 2009. Morphometry of protoscoleces rostellar of *Echinococcus granulosus* isolates from Punjab, Pakistan, *Pak. J. Sci*. 61:223-228.-

20-Moghaddas E, Borji, H., Naghibi, A., Shayan, P., Razmi, G.R. 2015. Molecular genotyping of *Echinococcus granulosus* from dromedaries (*Camelus dromedarius*) in eastern Iran. *J Helminthol*. 89:100-4.

21- Mowlavi, G., Salehi, M., Eshraghian, M., Rokni, M.B., Fasihi-Harandi, M., Mohajeran, E., Salahi-Moghaddam. A. 2012. Morphometric differentiation between camel and sheep strains of *Echinococcus granulosus* using computer image analysis system (CIAS). *Asian Pac J Trop Med*. 5:58-61.

22- Ponce Gordo, F., Cuesta Bandera C. 1997. Differentiation of Spanish strains of *Echinococcus granulosus* using larval rostellar hook morphometry. *Int J Parasitol*. 27:41-9.

23-Rokni, M. 2009. Echinococcosis/hydatidosis in Iran, Iranian. *J. Parasitol*. 4:1–16

24- Rostami Nejad, M., Nazemalhosseini Mojarad, E., No-

نقش مهم گوسفند در بقای چرخه انتقال هیداتیدوزیس بین انسان و دامها می‌باشد (۱۳). امروزه تشخیص به موقع و درمان کیست هیداتید در کشورهای در حال توسعه به عنوان یک مشکل مطرح است. با توجه به نتایج بدست آمده سویه G1 اکینو کوکوس گرانولوزوس به عنوان مهم‌ترین گونه آلوده‌کننده گوسفندان کشتاری مشهد شناخته شد.

### تشکر و قدردانی

از آقای عشرتی بدلیل همکاری در انجام پروژه تشکر می‌گردد. همچنین این پایان‌نامه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی انجام گرفت، از معاونت و همکاران ایشان قدردانی و تشکر می‌شود.

### منابع مورد استفاده

1-Ahmadi, N., Dalimi, A. 2006. Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran, *Infect. Gen. Evol*. 6:85–90.

2- Alvarez Rojas, C.O.A., Romig, T., Lightowlers, M.W. 2014. *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge. *Int. J. Parasitol*. 44:9-18.

3-Borji, H., Azizzadeh, M., Afsai, A. 2011. An abattoir-based study on the prevalence of hydatidosis in livestock in Mashhad, Iran, *J. Helminthol*. 10: 1-4.

4-Dalimi, A., Ghamari, Z., Ghebleh, F. 2006. Epidemiological feature of animal Echinococcosis / hydatidosis in Uromia of West Azarbaijan province, Iran, *Pajouhesh & Sazandegi* 71:76-81.

5-Dalimi, A., Motamedi, G., Hosseini, M., Mohammadian, B., Malaki, H., Ghamari, Z. 2002. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol*, 105:161-171.

6-Eslami, A. 2008. *Veterinary of helminthology*, Vol.2 Cestoda. Tehran University Press .

7- Fakhar, M. Sadjjadi, S.M. 2007. Prevalence of hydatidosis in slaughtered herbivores in Qom Province, central part of Iran. *Vet. Res. Communicat*. 31:993-997.

8- Gholami, S., Tanzifi, A., Sharif, M., Daryani, A., Rahimi, M.T., Mirshafiee, S., Sarvi, S. 2018. Demographic aspects of human hydatidosis in Iranian general population based on serology: A systematic review and meta-analysis. *Vet World*. 11:1385-1396.

9- Hajjalilo, E., Harandi, M.F., Sharbatkhori, M., Mirhendi, H., Rostami, S. 2011. Genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in camels, cattle and sheep from the south-east of Iran indicates the presence of the G3 genotype. *J Helminthol*. 86:263-70.

10- Harandi, M.F. Hobbs, R.P. Adams, P.J. Mobedi, I. Morgan-Ryan, U.M. Thompson, R.C.A. 2002. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal



- chi, Z., Fasihi Harandi, M., Cheraghipour, K., Mowlavi, G. R., Zali, M. R. 2008. *Echinococcus granulosus* strain differentiation in Iran based on sequence heterogeneity in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J. Helminthol.* 82: 343–347.
- 25-Thompson, R. C. A. 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol.* 119: 439–446.
- 26- Utuk, A. E. Simsek, S. Koroglu, E. P. McManus, D. 2008. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey, *Acta Tropica*, 107, 192-194
- 27- Vural, G., Baca, A. U., Gauci, C. G., Bagci, O., Gicik, Y., Lightowlers, M. W. 2008. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol.* 154: 347-50.
- 28-Varcasia, A., Canu, S., Lightowlers, W. M. Scala, A. Garippa. 2006. Cystic echinococcosis in slaughtered sheep in Sardinia (Italy), *Veterinary Parasitology.* 135, 33-38.
- 29- Varcasia, A., Canu, S., Kogkos, A., Pipia, P., Scala, A., Garippa, G., Seimenis, A. 2007. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece *Parasitol. Res.* 101: 1135–1139
- 30 Yakhchali, M.; Mardani, K. 2011. The domestic cycle of the parasite *Echinococcus granulosus* strain variation in the gene amplification nad1 PCR-RFLP method. *Iranian. J. Vet* 7: 63-68.
- 31-Yousofi, H.; Hashemzadeh, M.; Aliyari, Z.; Farokhi, E. 2007. Molecular analysis of strains productive sheep hydatid cyst in chaharmahalva Bakhtiary using restriction fragment length polymorphism, *J. Shahrekord Uni. Med.* 2: 28-33.
- 32-Zhang, L., Eslami, A., Hosseini, S. H., McManus, D. P. 1998. Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 171-4.

