Original Paper

Molecular determination of Echinococcus granulosus isolated from hydatid cyst using mitoconderial atp6 gene

Rostami Nejad M (BS)[1], Nazemalhosseini Mojarad E (MSc)*[2],Taghipour N (MSc)[3] Nochi Z (MSc)[4], Cheraghipour K (MSc)[5], Dabiri H (PhD)[6] Mohebbi SR (PhD)[7], Noorinayer B (MD)[8], Zali MR (MD)[9]

[1]Researcher, BS in Veterinary Laboratory, The Research Center of Gastroenterology and Liver Disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [2]Researcher, PhD Student in by Research, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Researcher, MSc in Parasitology, Department of Parasitology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [4]Researcher, MSc in Microbiology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [5]Researcher, MSc in Parasitology, Department of Parasitology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. [6]Assistant Professor, Department of Microbiology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [7]Assistant Professor, Department of Virology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [8]Assistant Professor, Department of Gastroenterology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [9]Professor, Department of Gastroenterology, The Research Center of Gastroenterology and Liver disease, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Several strains of the Echinococcus granulosus have been described based on morphological characters, intermediate host specificity and/or genetic analysis of mitochondrial and nuclear DNA. The aim of this study was to characterize different E.granulosus isolates by using sequences of mitochondrial atp6 gene.

Materials and Methods: In this study, Sixty infected liver and lungs of cattle, sheep and goats were collected from the abattoir of Varamin city-Iran during 2008. Protoscoleces were removed from each fertile cyst and DNA extracted. New and specific primers were designed for two existing genotypes (G1 and G6) of E. granulosus known to occur in Iran and applied in PCR reactions.

Results: The new primers selectively amplified the G1 and G6 genotypes of E. granulosus with specific bands of 708 and 705 bp respectively. The G1 genotype was identified in all fertile cyst samples.

Conclusion: This study showed that the new primer pairs which specifically amplify portions of the mitochondrial atp6 gene of the G1 and G6 strains of Echinococcus granulosus are proper molecular marker for investigating genetic variation in a number of isolates of E. granulosus from a range of hosts (sheep, goats, cattle) in Iran. The result of sequenced samples showed that our sequences were the same as those reported previously for these strains.

Keywords: Echinococcus granulosus, atp6 gene, G1 genotypes, G6 genotypes

*** Corresponding Author: Nazemalhosseini Mojarad E (MSc), E-mail: ehsanmojarad@gmail.com**

Received 6 January 2010 **Revised** 12 December 2010 **Accepted** 2 January 2011

This paper should be cited as: Rostami Nejad M, Nazemalhosseini Mojarad E,Taghipour N, Nochi Z, Cheraghipour K, Dabiri H, Mohebbi SR, Noorinayer B, Zali MR. [Molecular determination of Echinococcus granulosus isolated from hydatid cyst using mitoconderial atp6 gene]. J Gorgan Uni Med Sci. Summer 2010;13(2):61-67. [Article in Persian]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / تابستان ۱۳۹۰ / دوره ۱۳ / شماره ۲ (پی در پی ۳۸) / صفحات ۶۱ تا ۶۷

تحقیقی

تعیین گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس جدا شده از کیست‌های هیداتید با ردیابی ژن میتوکندریای atp6

محمد رستمی نژاد[۱]، احسان ناظم الحسینی مجرد*[۲]، نیلوفر تقی پور[۳]، زهرا نوچی[۴]، کوروش چراغی پور[۵]
دکتر حسین دبیری[۶]، دکتر سیدرضا محبی[۷]، دکتر بابک نوری نیر[۸]، دکتر محمدرضا زالی[۹]

۱- کارشناس علوم آزمایشگاهی دامپزشکی ، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.
۲- دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی ، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۳- کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی ، بخش انگل‌شناسی دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۴- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی ، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۵- کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی ، بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی همدان. ۶- استادیار گروه میکروب‌شناسی ، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۷- استادیار گروه ویروس‌شناسی ، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۸- استادیار گروه گوارش ، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۹- استاد گروه گوارش ، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

چکیده

زمینه و هدف : *گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس بر پایه خصوصیات مرفولوژیکی، ویژگی میزبان واسط و یا بررسی ژنتیکی DNA میتوکندریال یا هسته‌ای آنها مشخص می‌شوند. این مطالعه به منظور تعیین گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس جدا شده از کیست‌های هیداتید با ردیابی ژن میتوکندریای atp6 انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی ۶۰ کبد و ریه آلوده گاو، گوسفند و بز از کشتارگاه شهرستان ورامین در سال ۱۳۸۷ جمع‌آوری شدند. پروتواسکولکس‌ها از کیست‌های بارور جدا و DNA آنها استخراج گردید. دو جفت پرایمر جدید که به طور اختصاصی تمام ژن atp6 میتوکندریال گونه‌های G1 و G6 (دو گونه موجود در ایران) اکینوکوکوس گرانولوزوس را تکثیر می‌کرد؛ طراحی و آزمایش گردید.*

یافته‌ها : *پرایمرهای جدید، ژنوتایپ‌های G1 و G6 اکینوکوکوس گرانولوزوس را تکثیر کرده و به ترتیب باندهای اختصاصی ۷۰۸bp و ۷۰۵bp حاصل گردید. ژنوتایپ G1 در تمام نمونه‌های کیست بارور شناسایی شد.*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه نشان داد که ژن atp6 میتوکندریال گونه‌های G1 و G6 مارکر مولکولی مناسبی برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی در ایزوله‌های اکینوکوکوس گرانولوزس جدا شده در میزبانان موجود در ایران می‌باشد. همچنین نتایج نمونه‌های سکانس شده در این مطالعه نشان داد که توالی‌های حاصل مشابه توالی‌های گزارش شده قبلی برای این گونه‌ها می‌باشد.*

کلید واژه‌ها : *اکینوکوکوس گرانولوزوس ، atp6 ، ژنوتایپ G1 و G6*

---

* نویسنده مسؤول : احسان ناظم الحسینی مجرد ، پست الکترونیکی ehsanmojarad@gmail.com
نشانی : تهران، ولنجک، خیابان پروانه، بیمارستان آیت اله طالقانی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دایره بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال‌های مزمن ، بخش انگل شناسی ، تلفن ۲۲۴۳۲۵۱۸ -۰۲۱ ، نمابر ۲۲۴۳۲۵۲۵
وصول مقاله : ۱۳۸۸/۱۰/۱۶ ، اصلاح نهایی : ۱۳۸۹/۹/۲۱ ، پذیرش مقاله : ۱۳۸۹/۱۰/۱۲

مقدمه

بیماری کیست هیداتید (hydatid cyst) یک عفونت زئونوز مزمن است که توسط مرحله لاروی کرم نواری سگ به‌نام اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. با توجه به اهمیت و گسترش جهانی این بیماری از نظر پزشکی و اقتصادی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز به شمار می‌آید (۳-۱).

معمولاً گونه‌های متعددی از میزبانان واسط با اکینوکوکوس گرانولوزوس آلوده می‌شوند. مطالعات مختلف نشان داده است که کیست هیداتید معمولاً در گوسفند، شتر، گاو، بز و انسان در سراسر ایران یافت می‌شود. گوسفند شایع‌ترین و مهم‌ترین میزبان واسط اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایران می‌باشد. گاو و بز در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار دارند (۹-۴).

برپایه خصوصیات مرفولوژیکی، بیولوژیکی و بیوشیمیایی و به خصوص ویژگی‌های مولکولی، گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس به ۸ ژنوتایپ اصلی (G1-G8) تقسیم می‌شوند. این گونه‌ها شامل گونه مهم گوسفندی (G1)، ۲گونه گاوی (G3,G5)، گونه اسبی (G4)،گونه شتری (G6)، گونه خوکی (G7) و گونه سروید یا گونه وحشی یا شمالی (G8) می‌باشد (۱۰و۱۱).

ژنوتایپ نهم (G9) از انسان و خوک در لهستان گزارش شده است (۱۲). گونه گوسفندی (G1) شایع‌ترین و مهم‌ترین ژنوتایپ زئونوز می‌باشد (۱۳).

تحقیقات نشان داده است که DNA میتوکندریال در بررسی رابطه پلی‌ژنیک بین گونه‌های نزدیک به هم، نسبت به DNA هسته‌ای از ارجحیت بیشتری برخوردار است. اطلاعات به‌دست آمده از این DNA ، پتانسیل لازم را در حل مشکلات تاکسونمی انگل دارد (۳-۱). براین اساس، تحقیقات صورت گرفته در سال‌های اخیر در دنیا بیشتر روی DNA میتوکندریال (cox1, nad1, atp6) متمرکز شده است.

مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی محدودی بر روی ایزوله‌های ایرانی انجام گرفته است. در اولین مطالعه‌ای که در ایران انجام شد؛ ۱۶ ایزوله اکینوکوکوس گرانولوزوس از کیست‌های انسانی و حیوانی (شامل گاو، گوسفند، بز و شتر) از کشتارگاه‌های تهران، مرکز و جنوب ایران جمع‌آوری گردید. این تحقیق که با روش PCR-RFLP و به منظور بررسی تفاوت‌های موجود در توالی اسیدهای نوکلئیک ژن‌های cox1 و nad1 انجام گرفت؛ به روشنی نشان داد که علاوه بر ژنوتایپ G1 (گونه گوسفندی)، ژنوتایپ G6 (گونه شتری) نیز در ایران یافت می‌شود. در ۴ ایزوله انسانی مورد آزمایش ژنوتایپ G1 جدا گردید و در حیوانات اهلی این ژنوتایپ شایع‌تر از ژنوتایپ G6 بود (۱۴).

در مطالعه‌ای دیگر ایزوله‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس انسانی و حیوانی از مناطق مختلفی از ایران جمع‌آوری و با استفاده از ویژگی DNA (PCR-RFLP ناحیه ITS1) و معیارهای مرفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت و مجدداً وجود گونه‌های G1 و G6 در ایران تایید گردید (۵).

این مطالعه به منظور تعیین گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس جدا شده از کیست‌های هیداتید با ردیابی ژن میتوکندریای atp6 انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ۶۰ کبد و ریه آلوده گاو، گوسفند و بز از کشتارگاه شهرستان ورامین در سال ۱۳۸۷ جمع‌آوری شدند. کارآیی و عملکرد پروتواسکولکس‌ها با بزرگ‌نمایی ۱۰برابر بدون رنگ‌آمیزی و با مشاهده حرکت سلول‌های شعله‌ای و با استفاده از رنگ حیاتی (ائوزین ۰/۱درصد) تایید گردید.

کیست‌ها جداگانه بررسی و پروتواسکولکس‌های هر کیست جداگانه جمع‌آوری شد. ۱۸نمونه از ۲۰ کیست گاوی و ۶ نمونه از ۲۰ نمونه گوسفندی غیربارور بودند و از مطالعه خارج شدند. پروتواسکولکس‌ها از کیست‌ها آسپیره و پس از شستشو با سالین و فیکس در اتانول ۷۰درصد؛ به آزمایشگاه بیماری‌های ناشی از غذا منتقل و تا زمان انجام استخراج در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد شدند.

پروتواسکولکس‌ها چندبار با PBS شستشو داده شدند تا اتانول قبل از استخراج DNA کاملاً از محیط خارج شد.

روش‌های استخراج DNA برای اکینوکوکوس گرانولوزوس با چهار روش متفاوت شامل کیت استخراج از بافت (کیاژن ،آلمان)، کیت استخراج اصلاح شده سیناژن

(سیناژن،ایران)، روش فنل کلروفرم (۱۵) و روش فنل کلروفرم اصلاح شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

کیت استخراج از بافت: در این روش DNA بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (کیاژن ، آلمان) استخراج گردید.

کیت اصلاح شده استخراج سیناژن: قبل از آغاز پروسه استخراج DNA ، محلول DNG TM-PLUS (سیناژن ، ایران) برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آرامی مخلوط و گرم شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۶۰۰میکرولیتر از DNGTM-PLUS مخلوط و برای مدت ۲۵-۲۰ ثانیه ورتکس گردید تا یک سوسپانسیون هموژن حاصل شود. ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به این سوسپانسیون اضافه گردید ومجدداً ورتکس شد.

برای تغلیظ میزان DNA نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی به آرامی دور ریخته شد. ۲ میلی‌لیتر از اتانول ۷۵درصد به رسوب اضافه و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه ورتکس گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مجدداً مایع رویی به آرامی دور ریخته شد و رسوب در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. به رسوب حاصله ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد تا رسوب کاملاً درآب حل گردد. سانتریفوژ نهایی به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به منظور جداسازی DNA خالص از سایر مواد انجام گرفت.

فنل – کلروفرم : برطبق پروتکل استخراج DNA به روش فنل – کلروفرم (۱۵) اسیدنوکلئیک نمونه‌ها استخراج گردید.

فنل – کلروفرم اصلاح شده: پروتواسکولکس‌ها،۳ بار با PBS شستشو داده شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز حاوی SDS (یک درصد) به ۳۰۰میکرولیتر پروتواسکولکس اضافه گردید. در مرحله بعد ۲ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه و ورتکس شد. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از طی این مرحله، ۶۵۰ میکرولیتر فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل به آن اضافه و به مدت۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به لوله جدید منتقل شد و سپس هم حجم آن کلروفرم اضافه و مجدداً به مدت۲دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. یک دهم حجم محلول حاصله استات سدیم ۳مولار (pH=۵/۲) و ۵۰۰ میکرولیتر اتانل به آن اضافه شد و تیوب به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. قبل از شستشوی رسوب حاصله با اتانول ۷۰ درصد نمونه ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت به رسوب مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و تا زمان انجام PCR در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کارآیی روش‌های استخراج DNA با درجه موفقیت آنها در PCR مشخص گردید.

طراحی پرایمر : با استفاده از شماره دست‌یابی (Accession number) اخذشده برای ژنوتایپ‌های G1 و G6 موجود در بانک ژن (AF297617 و AB208063)، جفت پرایمرهای اختصاصی برای دو ژنوتایپ شناخته شده موجود در ایران طراحی گردید.

سکانس‌های ژن atp6 دو ژنوتایپ ذکر شده به وسیله نرم‌افزار MegAligne مورد بررسی قرار گرفتند (DNASTAR.Inc) و پرایمرهای اختصاصی گونه با تکیه بر مناطق کاملاً محافظت شده (highly conserved) با کمک نرم‌افزار Gene Runner طراحی گردیدند. سپس اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار blast مورد تأیید قرار گرفت.

تکثیر ژنوتایپ‌های G1 و G6 اکینوکوکوس گرانولوزوس (PCR G1 و PCR G6): واکنش PCR درغلظت کلی ۲۵میکرولیتر با مقادیری که در جدول یک آمده است؛ آماده گردید. سپس برنامه حرارتی زمانی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون ،۳۰ثانیه در ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای آنیلینگ برای G1 (۶۰ درجه سانتی‌گراد برای G6) ، ۴۰ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای طویل شدن نهایی و تکرار سیکل ۳۵ مرتبه برای تکثیر قطعات به‌کار برده شد.

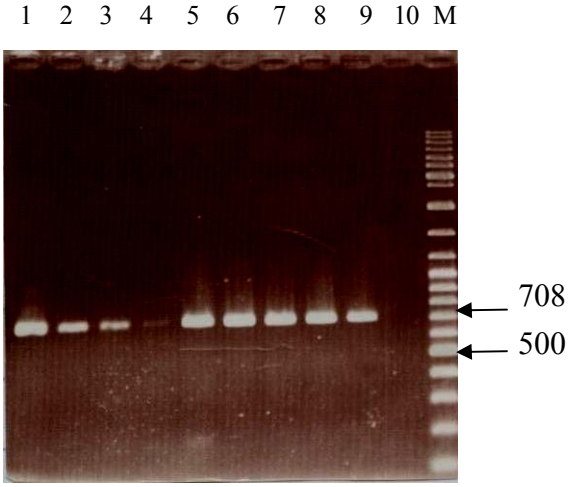
مقدار ۷ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱/۲ درصد آگارز الکتروز و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید. نمونه‌های مثبت برای تایید، تعیین توالی شدند.

جدول ۱ : تکثیر ژنوتایپ‌های G1 و G6 اکینوکوکوس گرانولوزوس

واکنش PCR	مقدار
Taq DNA Polymerase	۱U/µl
DNA	۱۰۰ ng
P Reverse	۱۰ pMol
P Forward	۱۰ pMol
dNTP	۰/۲ mM
MgCl2	۰/۵ mM
PCR buffer	۱۰ X

یافته‌ها

در این مطالعه، کیفیت استخراج DNA با استفاده از کیت اصلاح شده سیناژن و روش فنل - کلروفرم اصلاح شده نتایج مشابه و برتری نسبت به سایر روش‌ها نشان داد.



شکل ۱ : الکتروفورز محصول PCR ژنوتایپ G1 اکینوکوکوس گرانولوزوس بر روی ژل اگارز ۱درصد.
Lane 1-9: ایزوله‌های مثبت اکینوکوکوس گرانولوزوس با پرایمر G1. Lane 10: کنترل منفی اکینوکوکوس گرانولوزوس (Master Mix فاقد DNA). Lane M: مارکر 100bp

با استفاده از جفت پرایمرهای طراحی شده برای ژن میتوکندریال atp6 ، انتظار باندهای اختصاصی ۷۰۸ bp برای ژنوتایپ G1 و ۷۰۵ bp برای ژنوتایپ G6 وجود داشت. همه ۳۶ کیست بارور (۱۴ نمونه گوسفندی، ۲ نمونه گاوی و ۲۰نمونه مربوط به بز) باندهای اختصاصی ۷۰۸ bp را نشان دادند. همچنین PCR با پرایمرهای G6 بر روی این نمونه‌ها هم انجام گرفت که باندی حاصل نشد (شکل یک). جفت پرایمرهای (G1) کاملاً اختصاصی عمل کرده و با ژنوتایپ G6واکنشی نشان ندادند و بالعکس. در این مطالعه ژنوتایپ G6 جدا نشد. تمام نمونه‌های حاصله تعیین توالی گشت. هیچ تفاوتی در سکانس‌های به‌دست آمده از بررسی حاضر در مقایسه با سکانس‌های ثبت شده در بانک ژن مشاهده نشد.

بحث

این مطالعه نشان داد که ژن atp6 میتوکندریال گونه‌های G1وG6 مارکر مولکولی مناسبی برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی در ایزوله‌های اکینوکوکوس گرانولوزس جدا شده در میزبانان موجود در ایران می‌باشد.

اگرچه روش‌های ملکولی مانند PCR و سایر روش‌های متکی به آن برای تاکسونومی در سطح جنس، گونه و زیرگونه مفید هستند؛ اما استفاده از این روش‌ها نیازمند دقت در طراحی پرایمر و تهیه DNA خالص در مقادیر مناسب است (۱۶و۱۷).

Beato وهمکاران در کشور پرتغال طی سال ۲۰۱۰ بااستفاده از ژن atp6 وجود ژنوتایپ‌های G1وG3 را در میان ۲۷ ایزوله جدا شده از گاو و گوسفند مورد تایید قرار دادند (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای در کشور ترکیه چهار ژن ریبوزومال (cox1, atp6, nad1) برای بررسی وجود ژنوتایپ‌های این انگل مورد استفاده قرار گرفت و کارایی atp6 نسبت به دیگر ژن‌ها مناسب لحاظ گردید (۱۹).

در مطالعه‌ای در کشور چین در سال ۲۰۰۵ بررسی مولکولی اکینوکوکوس گرانولوزوس براساس ژن atp6 انجام شد و کارایی و اهمیت این ژن در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی و کنترل بیماری مشخص گردید (۱۸).

آنالیز DNA هسته‌ای و میتوکندریال در مطالعات کیست هیداتید در ایران نتایج موفقیت‌آمیزی داشته است (۵و۱۷). در مطالعه اولیه‌ای که توسط Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۸ روی ایزوله‌های جداشده از انسان و حیوانات اهلی از مناطق مختلف ایران انجام شد؛ تنوع توالی DNA درون ژن‌های میتوکندریایی cox1 و nad1 در۱۶ ایزوله اکینوکوکوس گرانولوزوس بررسی شد و با استفاده از روش PCR-RFLP مشخص گردید که ژنوتایپ‌های غالب در منطقه دو ژنوتایپ G1 (سویه گوسفندی) و G6 (سویه شتری) می‌باشند (۱۴). در مطالعه فصیحی‌هرندی در سال ۲۰۰۲ که براساس مشخصات

مرفولـوژیکی و ویژگـی‌هـای مولکـولی ناحیـه DNA, ITS1 ریبوزومی انجام گرفت؛ نتایج مشـابهی بـه دسـت آمـد (۵). در مطالعه دیگری که بر روی ناحیه ITS1 ریبوزومـال DNA و بـا اسـتفاده از روش PCR-RFLP انجـام گرفـت؛ دو ژنوتایـپ معمول G1 و G6 در ایزوله‌های انسان و گوسفند و شـتر یافـت شد (۲۰).

در مطالعـه حاضـر جفـت پرایمرهـای اختصاصـی ژنوتایـپ براسـاس تـوالی‌هـای موجـود در ژن atp6 اکینوکوکـوس گرانولوزوس طراحی گردید که در مقایسه با مطالعه Dinkel و همکـاران (۲۱) از اختصاصـیت بـالاتری برخـوردار اسـت. در مطالعه ما دو جفت پرایمر جدید که بـه طـور اختصاصـی تمـام ژن atp6 میتوکنـدریال گونـه‌هـای G1 و G6 اکینوکوکـوس گرانولوزوس را تکثیر می‌کـرد؛ طراحـی و آزمـایش گردیـد و مشخص شد که این ژن مارکر مولکولی مناسبی بـرای بررسـی تفاوت‌های ژنتیکی در ایزوله‌های اکینوکوکوس گرانولـوزس جدا شده در میزبانان موجود در ایران می‌باشد. با استفاده از این پرایمرهـای اختصاصـی، مـی‌تـوان ژنوتایـپ‌هـای G1 و G6 اکینوکوکوس گرانولوزوس را به آسانی و به سرعت تشـخیص داد. این روش ساده‌تر و سـریع‌تـر از روش PCR-RFLP مـورد استفاده در گذشته می‌باشـد. نتـایج حاصـله در ایـن تحقیـق نیـز همانند دیگر مطالعات انجام شده در ایران (۵و۱۴) و سایر نقاط دنیا (۱۰و۱۳) وجود سویه G1 را بـه عنـوان ژنوتایـپ شـایع در حیوانات اهلی ایران تایید می‌کند. براساس دانسـته‌هـای مـا ایـن اولین مطالعه‌ای است که در ایران بر روی ژن atp6 انجام شـده است و از معدود مطالعاتی در جهان است که کل سـکانس ژن atp6 برای تشخیص تکثیر گردیده است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که ژن atp6 میتوکنـدریال گونـه‌هـای G1وG6 مارکر مولکـولی مناسـبی بـرای بررسـی تفـاوت‌هـای ژنتیکی در ایزوله‌های اکینوکوکوس گرانولوزس جدا شـده در میزبانان موجود در ایران مـی‌باشـد. همچنـین نتـایج نمونـه‌هـای سکانس شده در این مطالعه نشـان داد کـه تـوالی‌هـای حاصـل مشابه توالی‌های گزارش شده قبلی برای این گونه‌ها می‌باشد.

تشکر و قدردانی

ایـن مقالـه حاصـل طـرح مصـوب (شـماره ۳۹۷) مرکـز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد وابسـته بـه دانشـگاه علـوم پزشکی شهیدبهشتی بود. بدین‌وسـیله از اسـتاد ارجمنـد جنـاب آقـای دکتـر ناصـرحقوقی راد بـه خـاطر راهنمـای‌هـای تأثیرگذارشان در طول انجام این مطالعه و همچنین از زحمـات دکتر پدرام خرازیها قدردانی می‌شود.

References

1. Thompson RCA. Echinococcosis. In: Gillespie S, Pearson RD. Principles and practice of clinical parasitology. 1st. New York: Wiley. 2001; pp:585–612.

2. Schantz PM. Echinococcus species (agents of cystic, alveolar, and polycystic echinococcosis). In: Long SS, Pickering LK, Probeer CG, eds. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 2nd. New York: Churchill Livingstone.2002;pp:1357-9.

3. Euzéby J. The epidemiology of hydatidosis with special reference to the Mediterranean area. Parassitologia. 1991Apr; 33(1):25-39.

4. Dalimi A, Motamedi G, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, et al. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. Vet Parasitol. 2002 Apr 30;105(2):161-71.

5. Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RC. Molecular and morphological characterization of Echinococcus granulosus of human and animal origin in Iran. Parasitology. 2002 Oct;125(Pt 4):367-73.

6. Mehrabani D, Oryan A, Sadjjadi SM. Prevalence of Echinococcus granulosus infection in stray dogs and herbivores in Shiraz, Iran. Vet Parasitol. 1999 Oct 1;86(3):217-20.

7. Moghadar N, Oryan A, Hanifepour MR. Helminths recovered from, the liver and lungs of camel with special reference to their incidence and pathogenesis in Shiraz, Islamic republic of Iran. Indian Journal of Animal Sciences, (1992); 62: 1018-23.

8. Oryan A, Moghaddar N, Gaur SN. Metacestodes of sheep with special reference to their epidemiological status, pathogenesis and economic implications in Fars Province, Iran. Vet Parasitol. 1994 Feb;51(3-4):231-40.

9. Rostami Nejad M, Nazemalhosseini Mojarad E, Nochi Z, Fasihi Harandi M, Cheraghipour K, et al. Echinococcus granulosus strain differentiation in Iran based on sequence heterogeneity in the mitochondrial 12S rRNA gene. J Helminthol. 2008 Dec;82(4):343-7.

10. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol. 1992 Sep;54(2):165-73.

11. Pearson ML, Thanh H, Zhang LH, Blair D, Dai Thi HN, McManus DP. Molecular taxonomy and strain analysis in Echinococcus. In: Cestode Zoonoses: echinococcosis and cysticercosis: an emergent and global problem. NATO Science Series I: life and behavioural sciences, 341. Poland, Posnan: IOS Press. 2002; pp:205-19.

12. 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. Parasitology. 1997 Jan;114 (Pt 1):37-43.

13. Craig PS, Rogan MT, Allan JC. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. Adv Parasitol. 1996;38:169-250.

14. 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 Jul;59(1):171-4.

15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning; a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; pp: 93-108.

16. McManus DP, Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. Parasitology. 2003;127 Suppl:S37-51.

17. Rahimi HR, Kia EB, Mirhendi SH, Talebi A, Fasihi Harandi M, Jalali-zand N, et al. A New Primer Pair in ITS1 Region for Molecular Studies on Echinococcus granulosus. Iranian Journal of Public Health 2007;36(1):45-9.

18. Beato S, Parreira R, Calado M, Grácio MA. Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of Echinococcus granulosus strains in the central inland region of Portugal. Parasitol Int. 2010 Dec;59(4):638-42.

19. Snábel V, Altintas N, D'Amelio S, Nakao M, Romig T, Yolasigmaz A, et al. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. Parasitol Res. 2009 Jul;105(1):145-54.

20. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Genet Evol. 2006 Mar;6(2):85-90.

21. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Wälz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, 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 Apr;34(5):645-53.