



تعیین سویه کیست‌های هیداتید گوسفندان و بزهای کشتار شده در کشتارگاه بیرجند با روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از ژن *ITS1*

سوسن انصاری^۱، حسن برجی^۲، ابوالقاسم نقیبه^۲

^۱ دانش آموخته علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
^۲ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱ بهمن ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۲۱ فروردین ماه ۱۴۰۰

doi: 10.22059/jvr.2020.299752.3037 <https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.2.1.1>

چکیده

زمینه مطالعه: اکینوкокوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در نواحی مختلف ایران است. درحالی‌که این بیماری یک معضل بهداشتی مهم در انسان می‌باشد اطلاعات محدودی در مورد چرخه انتقال و سویه‌های این انگل در مناطق شرق ایران وجود دارد.

هدف: در مطالعه حاضر تعیین هدف اصلی سویه‌های کیست هیداتید گوسفندان و بزهای کشتار شده در کشتارگاه بیرجند با روش مورفولوژی و مولکولی است.
روش کار: تعداد ۳۰ عدد کیست هیداتید از گوسفند و تعداد ۳۰ عدد کیست هیداتید از بزهای کشتار شده در کشتارگاه بیرجند جمع‌آوری گردید و با استفاده از روش مورفولوژی (شمارش تعداد و اندازه‌گیری طول قلاب‌ها) و روش مولکولی (PCR-RFLP of ITS1) اقدام به تعیین سویه کیست هیداتید گردید. همچنین قطعاتی از ژن ITS تعیین توالی گردید.

نتایج: در بین دوسویه مشخص و متفاوت گوسفندی و شتری، سویه گوسفندی شایع‌ترین سویه در بین کیست‌های هیداتید گوسفند و بز بود. کل کیست‌های جدا شده از گوسفندان و تعداد ۲۰ کیست جدا شده از بزها آلوده به سویه گوسفندی (G1-G3) بودند. درحالی‌که سویه شتری فقط از بز جدا شد و تعداد ۱۰ کیست از مجموع ۳۰ کیست آلوده به سویه شتری (G6/G7) بود. سویه شتری الگوی برش آنزیمی متفاوت با سویه گوسفندی نشان داد.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سویه گوسفندی (G1) شایع‌ترین سویه در گوسفندان و بزهای کشتار شده در این منطقه باشد. علاوه بر این، حضور سویه شتری (G6) در بزهای کشتار شده در بیرجند مورد تأیید قرار می‌گیرد.

کلمات کلیدی: کیست هیداتید، سویه، گوسفند، بز، مولکولی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: حسن برجی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
پست الکترونیکی: hborji@um.ac.ir

مقدمه

زیان‌های اقتصادی فراوان می‌شود. سگ، میزبان اصلی بیماری، با دفع تخم انگل همراه با مدفوع در مزارع، سبب آلودگی آب، گیاهان و سبزی‌ها می‌شود. انسان در اثر تماس نزدیک با سگ و مصرف سبزی‌ها و آب آلوده و نشخوارکنندگان با تغذیه از علوفه آلوده به تخم، به بیماری مبتلا می‌گردند. کیست هیداتید یک مشکل اقتصادی و بهداشتی برای کشورهای است که بیماری به صورت بومی در آنجا وجود دارد. کیست هیداتید در بسیاری از

کیست هیداتید بیماری زئونوزی است که توسط مرحله نوزادی سستود سگ متعلق به جنس اکینوкокوس (خانواده تنیده) ایجاد می‌شود. هیداتیدوز از بیماری‌های بومی کشور هست و حیوانات اهلی زیادی از جمله گوسفند، بز، شتر و گاو میزبانان واسط آن می‌باشند (۵،۱۲،۱۴). بیماری در انسان موجب ضایعات و آسیب‌های بافتی شده و گاهی منجر به مرگ می‌گردد. هیداتیدوزیس همچنین در حیوانات به خصوص دام‌ها موجب

تکنیک‌های PCR-RFLP و PCR-RAPD و SSCP هست (۱۹).

گوسفند و بز نقش مهمی در چرخه انتقال هیداتیدوزیس دارند. مطالعات انجام شده در نواحی مختلف ایران بیانگر این است که سویه G1 شایع‌ترین سویه در دام‌های ایران می‌باشد (۶،۷،۸،۱۲). در مطالعات انجام شده اخیر در بزهای نواحی مرکزی و شمال شرق کشور بیانگر حضور سویه G6, G7 در این دام می‌باشد (۶،۱۴). اما در خصوص پراکندگی سویه‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در گوسفندان و بزهای استان خراسان جنوبی تنها یک مطالعه روی تعداد معدودی کیست هیداتید جدا شده از گوسفندان این منطقه انجام شده است ولی روی بز مطالعه‌ای انجام نشده است (۹). لذا هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی سویه‌های کیست هیداتید جدا شده از گوسفندان و بزهای کشتار شده در کشتارگاه بیرجند واقع در استان خراسان جنوبی با دو روش ریخت‌شناسی و بررسی شاخص‌های مورفومتریک قلاب‌های پروتواسکولکس و روش مولکولی با روش PCR-RFLP ناحیه *rDNA-ITS1* هست.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: منطقه مورد مطالعه شهرستان بیرجند مرکز استان خراسان جنوبی در ارتفاع ۱۴۷۰ متری از سطح دریا قرار گرفته است و جمعیت آن ۱۷۸/۰۲۰ نفر می‌باشد. بیرجند، شهرستانی کوهستانی است و در آن کوه‌ها و دره‌های عمیق و حاصل‌خیزی وجود دارد. آب و هوای این شهرستان بیابانی و نیمه بیابانی است و در این شهرستان رودخانه عمده‌ای وجود ندارد و متوسط بارندگی سالانه به ۱۵۰ میلی‌متر می‌رسد. این استان از نظر جمعیت دامی دارای ۱ میلیون و ۷۵۰ هزار رأس گوسفند و بز است.

جهت انجام مطالعه حاضر طی دوره زمانی بهمن ۹۴ تا تیر ۹۶، تعداد ۳۰ عدد کبد و ریه گوسفند و تعداد ۳۰ عدد کبد و ریه بز آلوده به کیست هیداتید از کشتارگاه بیرجند جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال یافت.

بررسی‌های مورفولوژیکی: در شرایط آسپتیک با استفاده از سرنگ استریل ۱۰ میلی لیتر مایع درون کیست‌ها را کشیده و در لوله‌های آزمایشگاهی خالی گردید. لوله‌های حاوی کیست

مناطق آسیا، اروپا، آمریکای جنوبی، خاورمیانه، استرالیا و نیوزلند به‌صورت بومی وجود دارد (۲۱).

اکینوکوکوس گرانولوزوس واجد سویه‌های فراوانی است. این سویه‌ها از نظر ریخت‌شناسی، همه‌گیری‌شناسی، درمان و کنترل باهم اختلاف دارند به‌طوری‌که این سویه‌ها ویژگی‌های آسیب‌شناسی، اختصاصات میزبانی، بیولوژی تکامل، فیزیولوژی، ژنتیک، بیماری‌زایی انگل برای میزبان، الگوی چرخه زندگی انگل، آنتی ژنیستی، روند انتقال آلودگی و حساسیت آن‌ها نسبت به عوامل دارویی را در مواردی تحت تأثیر قرار می‌دهند. تمامی موارد فوق در تهیه واکسن‌ها، تشخیص، پاسخ درمانی، همه‌گیری‌شناسی و کنترل بیماری تأثیر گذارند (۲۰). *اکینوکوکوس گرانولوزوس* دارای ۱۰ وارسته (G1-10) است. رایج‌ترین سویه زئونوز انسانی در اکثر کشورها شامل جنوب و شرق آفریقا، قسمت‌هایی از آسیا، استرالیا و جنوب آمریکا (آرژانتین) سویه G1 (Sheep strain) است. این سویه علاوه بر انسان در گوسفند، گاو، بز، بوفالو، شتر و خوک نیز گزارش شده است. سویه G2 (Tasmanian sheep strain) در گوسفند و انسان، سویه G3 (buffalo strain) در بوفالو، سویه‌ی (horse) انسان، سویه G4 (strain = *Echinococcus equinus*) در اسب و الاغ، سویه G5 (*E. ortolepi*) در گوسفند، بز، گاو، بوفالو، خوک و انسان، سویه G6 (*E. intermedius*) در شتر، گاو، انسان، گوسفند و بز، سویه G7 (*E. intermedius*) در خوک، گاو، بز و انسان، سویه G8 (cervid strain) در گوزن و انسان، سویه G9 در انسان و سویه G10 (fennoscandian strain) در گوزن گزارش شده است (۱۹،۲۱).

امروزه از تکنیک‌های مختلفی از جمله روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی به‌منظور تشخیص سویه‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* استفاده می‌شود. در روش ریخت‌شناسی، سویه‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* بر اساس اندازه و تعداد قلاب‌های روستلوم پروتواسکولکس‌ها مشخص می‌شوند. پروتواسکولکس‌های داخل هر کیست حاوی ۲ ردیف قلاب و هر قلاب دارای یک تیغه و یک دسته و گارد است که تعداد و طول و عرض قلاب‌ها در شناسایی سویه‌های انگل اهمیت دارد (۴). از جمله تکنیک‌های مولکولی استفاده شده برای تعیین سویه شامل: تعیین ترادف ژن‌های میتوکندریال *cox-1* و *nad-1* و آنالیز مناطق DNA ریبوزومال شامل *ITS1* و *ITS2* با

دقیقه بود. بعد از انجام PCR، محصول واکنش بر روی ژل ۱/۷ درصد آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

PCR- RFLP بر روی ژن ITS1: برای تعیین سویه‌های

کیست هیداتید از روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم Bsh 1236I استفاده گردید (۱۳). لازم به ذکر است که آنزیم برش دهنده Bsh 1236I (BST UI) توالی CGCG را شناسایی کرده و محل بین GC را در توالی '3...CG/CG...5' برش می‌دهد.

مواد تشکیل‌دهنده واکنش PCR- RFLP بر روی ژن ITS1 در حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر محصول واکنش PCR، ۲ میکرولیتر آنزیم Bsh 1236I، ۲ میکرولیتر بافر 10x Buffer و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه است. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۱۶ ساعت برای غیرفعال شدن آنزیم نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس جهت مشاهده چگونگی برش‌ها و وزن باندها و تشخیص سویه‌ها بر اساس آن، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۳ درصد قرار داده شد. سپس با استفاده از دستگاه UV-Eluminator باندهای DNA (محصولات PCR) بر روی ژل بررسی و از آن‌ها عکس گرفته شد.

تعیین توالی: تعداد ۵ نمونه از ۶۰ نمونه PCR شده برای تأیید نتایج PCR-RFLP به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره فرستاده شد. آنالیز توالی‌های سکانس شده توسط نرم‌افزار CLC Main Workbench صورت گرفت.

نتایج

نتایج بررسی ریخت‌شناسی کیست هیداتید: نتایج

بررسی شاخص‌های ریخت‌شناسی و مورفومتریکی قلاب‌های روستلوم پروتواسکولکس‌ها بیانگر حضور یک سویه در گوسفندان بود و مشابه با شاخص‌های مورفولوژی سویه گوسفندی بود. ولی در بزهای کشتار شده دو نوع شاخص قلاب شناسایی گردید که از لحاظ شاخص‌های مورفولوژی و مورفومتریکی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند (جدول ۱). شاخص‌های مورفولوژی در قلاب‌های نوع اول مشابه سویه گوسفندی بود در حالی که شاخص‌های مورفولوژی قلاب‌های نوع دوم مشابه سویه شتری بود.

هیداتید جمع‌آوری شده از هر عضو (کبد و ریه) با دور ۸۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی خارج گردید و پروتواسکولکس‌های موجود در ته لوله‌ها جمع‌آوری شد و با استفاده از پیپت پاستوراستریل تعدادی از پروتواسکولکس‌ها روی لام قرار داده شد و پس از اضافه نمودن لاکتوفنل لامل قرار داده شد. با استفاده از عدسی چشمی حاوی لام میکرومتری شاخص‌های ریخت‌شناسی قلاب‌های روستلوم هر پروتواسکولکس شفاف شده شامل: طول و عرض قلاب‌ها، طول و عرض تیغه و طول و عرض دسته هر قلاب اندازه‌گیری گردید. پروتواسکولکس‌های باقی‌مانده در ته لوله پس از چند بار شستشو با آب مقطر استریل در میکرو تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به همراه مقداری اتانول ۷۰ درصد تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه نگهداری شد (تصویر ۱).

استخراج DNA: برای استخراج DNA از مخلوط پروتواسکولکس‌های جدا شده از هر کیست (در حدود ۳۰۰ پروتواسکولکس) استفاده گردید.

برای استخراج DNA با استفاده از کیت MBST (ساخت کشور ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. پس از استخراج DNA غلظت DNA تخلیص شده توسط نانو دراپ تعیین شد که غلظت آن ۱۰۰ نانوگرم در لیتر بود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR: بعد از انجام استخراج DNA، واکنش PCR بر روی ژن ITS1 انجام شد. برای انجام واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به میزان ۵ میکرولیتر از الگوی DNA استخراج‌شده، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (شرکت سینا ژن)، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه گردید. در هر واکنش از یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی (فاقد الگوی DNA) استفاده شد. پرایمر مورد استفاده از ژن ITS1 بر اساس مطالعه انجام شده توسط Moghaddas و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۱۳) استفاده گردید.

برنامه PCR جهت تکثیر ژن ITS1 شامل واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و سیکل تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص سویه‌های کیست هیداتید بر اساس ژن ITS1.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	جایگاه طراحی پرایمر
F پرایمر	5'ATGGTTGTTATCGCTGCGA3'	جفت باز ۱۴۷-۱۲۸
R پرایمر	5'CAGAGCACTTTTGTATGCA3'	جفت باز ۷۲۱-۷۰۲

جدول ۲. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مورفومتریک قلاب‌های پروتواسکولکس‌های جمع‌آوری شده از کیست‌های هیداتید گوسفند و بزهای کشتار شده در کشتارگاه بیرجند.

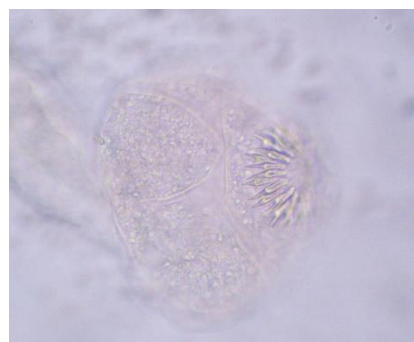
میانگین تعداد کلی قلاب	میانگین تعداد قلاب بزرگ	میانگین تعداد قلاب کوچک	میانگین طول کلی قلاب بزرگ (میکرون)	میانگین طول قلاب بزرگ (میکرون)	میانگین طول دسته قلاب بزرگ (میکرون)	میانگین طول تیغه قلاب بزرگ (میکرون)	میانگین عرض کلی قلاب بزرگ (میکرون)
۲±۳۶	۲±۱۸	۱±۱۶	۲۲/۱±۱/۷	۱۱/۰±۲/۶	۸/۰±۲/۷	۶/۰±۷/۵	۶/۰±۷/۵
۲±۳۶	۱±۱۸	۱±۱۶	۲۴/۱±۹/۸	۱۲/۰±۶/۴	۱۲/۱±۴/۸	۷/۰±۶/۳	۷/۰±۶/۳
۲±۳۸	۲±۲۰	۲±۱۹	۲۵/۱±۵/۵	۱۳/۰±۴/۷	۱۳/۰±۴/۷	۸/۰±۶/۴	۸/۰±۶/۴

نتایج مولکولی (نتایج بررسی مولکولی پروتواسکولکس‌های استخراج شده از کیست‌های هیداتید): اندازه قطعه تکثیر شده بعد از انجام واکنش PCR به وسیله پرایمرهای اختصاصی (Eg-F, Eg-R) و پس از الکتروفورز ۴۶۲ جفت باز است (تصویر ۲).

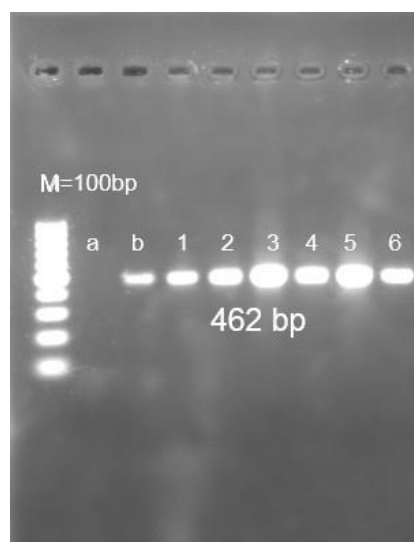
نتیجه واکنش PCR-RFLP: در ۳۰ نمونه بررسی شده از کیست‌های هیداتید گوسفندان در مطالعه حاضر بر اساس الگوی برشی با آنزیم BSH1236I، الگوی ۴ باند مشاهده گردید. با توجه به مطالعات قبلی در این زمینه سویه تعیین شده (بر اساس تعداد و وزن باندها) سویه G1-G3 است (تصویر ۳).

در ۲۰ نمونه بررسی شده از کیست‌های هیداتید بزهای کشتار شده در مطالعه حاضر بر اساس الگوی برشی با آنزیم BSH1236I، الگوی ۴ باند مشاهده گردید که بر اساس تعداد و وزن باندها سویه G1-G3 است. در ۱۰ نمونه از کیست‌های هیداتید بز الگوی ۳ باند مشاهده گردید که بر اساس تعداد و وزن باندها سویه G6/G7 است (تصویر ۳).

نتیجه تعیین توالی: پس از اصلاح کردن توالی‌ها در مرحله بعد توالی‌ها در NCBI بلاست گردید. مقایسه‌ی توالی‌ها با توالی‌های ژن ITS1 نشان‌دهنده وجود سویه G1 در کل نمونه‌های جدا شده از کیست‌های هیداتید گوسفندان و ۲۰ عدد از بزهای کشتار شده و سویه G6 در تعداد ۱۰ عدد از بزهای کشتارگاه بیرجند است.



تصویر ۱. تصویر قلاب‌های پروتواسکولکس جدا شده از کیست‌های هیداتید گوسفندان و بزهای کشتارگاه بیرجند.



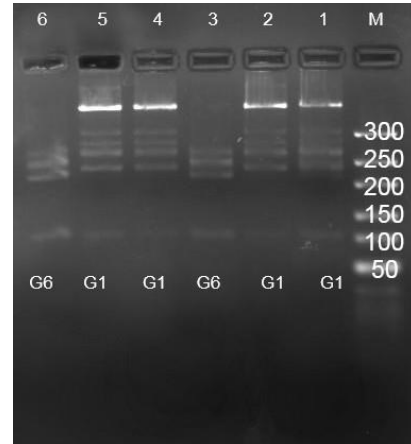
تصویر ۲. محصول واکنش PCR حاصل از تکثیر با پرایمر ITS1 به دست آمده از کبد و ریه گوسفند (ستون‌های ۱-۳) و بز (ستون‌های ۴-۶)، کشتار شده در کشتارگاه بیرجند - کنترل منفی (a) و کنترل مثبت (b) - نشانگر ۱۰۰ جفت باز (M).

و بیانگر سویه مشابه با گوسفندان بودند ولی تعداد ۱۰ کیست باقی مانده الگوی متفاوتی با بقیه داشتند که بیانگر حضور سویه متفاوت با قبلی‌ها بود. بر اساس نتایج ریخت‌شناسی می‌توان به این نتیجه رسید که در گوسفندان کشتار شده در ناحیه مورد مطالعه یک سویه ولی در بزهای این منطقه دو سویه حضور دارد.

نتایج روش مولکولی مورد استفاده در این مطالعه با روش PCR-RFLP روی قطعه ITS1 و با استفاده از آنزیم Bsh1236I با نتایج مورفولوژی هم‌خوانی داشتند و الگوی هضم آنزیمی در کل گوسفندان این منطقه یکسان بود و بیانگر حضور سویه G1-G3 بود. از طرف دیگر در کیست‌های هیداتید جدا شده از بزهای این منطقه دو نوع الگوی برش مشاهده گردید. الگوی برش تعداد ۲۰ کیست جدا شده از بزها با الگوی برش در کیست‌های هیداتید گوسفندان یکسان بود که با توجه به الگوی وزن باندها سویه G1-G3 بود. در حالی که الگوی برش در تعداد ۱۰ کیست هیداتید جدا شده از بزها با بقیه کیست‌های جدا شده از گوسفندان و بزها یکسان نبودند که بر اساس الگوی وزن باندها سویه G6/G7 تشخیص داده شد. بر اساس تعیین توالی انجام شده از این الگوها در کل کیست‌های هیداتید جدا شده از گوسفندان و تعداد ۲۰ عدد از کیست‌های هیداتید جدا شده از بزهای این ناحیه سویه G1 و در تعداد ۱۰ کیست هیداتید جدا شده از بزها سویه G6 مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر با مطالعه انجام شده قبلی در این منطقه که روی تعداد ۳ کیست هیداتید جدا شده از گوسفندان انجام شده بود مشابهت دارد که بیانگر حضور سویه G1 در گوسفند است (۹) ولی روی کیست‌های هیداتید جدا شده از بز در این منطقه، مطالعه حاضر اولین مطالعه است. البته در مطالعه قبلی سویه G6 از تعداد ۵ شتر و ۸ انسان گزارش شده است که بیانگر حضور چرخه آلودگی با سویه G6 در انسان و دام‌های این منطقه است و با توجه به حضور سویه G6 در انسان‌های این منطقه نقش بزها در انتقال آلودگی توجیه پذیر است.

بیشترین مطالعات انجام شده در ایران روی کیست‌های هیداتید جدا شده از گوسفندان انجام شده است و همه این مطالعات بیانگر این است که گوسفند مهم‌ترین میزبان واسط برای سویه G1 است. از جمله در مطالعه Fadakar و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۶) به روش ITS1-RFLP در ۳۰ نمونه گوسفند در استان خراسان رضوی و شمالی، مطالعه Khademvatan و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۱۱) بر روی ۱۴۱



تصویر ۳. محصول هضم آنزیمی واکنش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم Bsh1236I روی محصول به دست آمده از کبد و ریه گوسفندان و بزهای کشتارگاه بیرجند. M نشانگر ۵۰ جفت باز. شماره ۳ و ۶ الگوی برش بیانگر سویه‌های G1-G3 است. شماره ۱ و ۲ و ۴ و ۵ الگوی برش بیانگر سویه‌های G6/G7 است.

بحث

با توجه به تنوع‌های درون‌گونه‌ای اکینوкокوس گرانولوزوس اکتفا نمودن به اطلاعات به دست آمده از شاخص‌های ریخت‌شناسی جهت تمیز سویه و گونه، قابل اعتماد نیست. بنابراین تلفیقی از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی با هم می‌تواند اطلاعات مقبول‌تری را در رابطه با شناسایی تنوع در سویه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس فراهم کند.

ویژگی‌های ریخت‌شناسی اگر چه دارای محدودیت هستند، اما هنوز هم به‌عنوان ابزاری مهم در شناسایی و تاکسونومی انگل اکینوкокوس گرانولوزوس شناخته می‌شوند. بررسی‌های ریخت‌شناسی یک روش سریع و آسان برای شناسایی سویه‌ها در زمینه مطالعات اپیدمیولوژیکی می‌باشند. در مطالعه حاضر ۶ شاخص ریختی قلاب‌های روستلوم از قبیل تعداد کلی قلاب‌های کوچک و بزرگ، طول قلاب کوچک و بزرگ، طول تیغه قلاب کوچک و بزرگ، طول دسته قلاب کوچک و بزرگ و عرض کلی قلاب کوچک و بزرگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مورفولوژی و مورفومتریک در کل کیست‌های هیداتید جدا شده از گوسفندان دارای الگوی مشابهی بودند و بیانگر این بود که همه این کیست‌ها از نظر سویه یکسان هستند. از طرف دیگر در کیست‌های هیداتید جدا شده از بزها پارامترهای ریخت‌شناسی یکسان نبودند و تعداد ۲۰ کیست دارای الگوی مشابه بودند که از نظر این پارامترها با کیست‌های هیداتید گوسفندان تفاوت معنی‌داری نداشتند

اکینوکوکوس گرانولوزوس دارای ۱۰ سویه هست، که ۷ سویه انسان را درگیر می‌کند. رایج‌ترین سویه‌ی زئونوز انسانی در اکثر کشورها شامل جنوب و شرق اروپا، شمال و شرق آفریقا، قسمت‌هایی از آسیا، استرالیا و جنوب آمریکا (آرژانتین) سویه G1 هست (۵). مهم‌ترین میزبان این سویه گوسفند است ولی این سویه در گاو، بز، شتر، گاو میش و خوک نیز گزارش شده است. در ایران هم مطالعاتی مبنی بر وجود هیداتیدوز در سه سیکل مجزا وجود دارد: ۱- سیکل اهلی بین سگ‌ها و چهارپایان ۲- سیکل بیابانی بین سگ‌ها و شتر ۳- سیکل وحشی بین گوشت‌خواران وحشی و نشخوارکنندگان وحشی. در سیکل اهلی مهم‌ترین میزبان واسط گوسفند هست، که در بین سایر دام‌ها نیز از نظر میزان باروری کیست‌ها بیشترین درصد باروری کیست (۸۸ درصد) را به خود اختصاص می‌دهد (۴). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، گوسفند نقش مهمی در بقای چرخه انتقال هیداتیدوز بین انسان و دام دارد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد که سویه G1/اکینوکوکوس گرانولوزوس موجود در گوسفندان استان به عنوان مهم‌ترین سویه آلوده‌کننده انسان مطرح است. از طرف دیگر با توجه به مطالعه آلودگی انسان به سویه G6 از منطقه بیرجند و حضور این سویه در بزهای منطقه، نقش این دام در انتقال آلودگی و تداوم چرخه آلودگی زندگی انگل در این منطقه قابل توجه است (۹). با در نظر داشتن چرخه زندگی و دوره کوتاه‌تر بلوغ سویه G6 در مقایسه با سویه G1 در میزبان نهایی لازم است در اقدامات بهداشتی جهت کنترل و پیشگیری بیماری در انسان به این نکته توجه گردد.

سپاسگزاری

این پایان‌نامه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت و نویسندگان مطالعه حاضر از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل حمایت مالی این پایان‌نامه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

نمونه گوسفند در استان خوزستان با تکنیک ITS1-RFLP، Shahnazi و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۱۷) در منطقه اصفهان، Rostami Nejad و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۱۶) در گوسفندان نواحی شمالی و غرب کشور Karimi and Dianatpour در سال ۲۰۰۸ (۱۰) با روش nad1-RFLP در گوسفندان منطقه استان فارس و در مطالعه Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۸ (۲۲) از مناطق مختلف ایران، سویه G1 را گزارش کردند. اما در بعضی مطالعات از جمله، مطالعه Hajialilo و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۸) در منطقه جنوب شرقی ایران و مطالعه Abedi و همکاران در سال ۲۰۱۹ (۱) در استان مرکزی در ۸۶-۶۱ درصد گوسفندان سویه G1 و در بقیه گوسفندان سویه G3 (۳۷ درصد) گزارش شده است. البته در مطالعه Fasihi Harandi و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۷) در استان کرمان به روش ITS1-RFLP در ۴۰ نمونه گوسفند سویه G1 و در ۳ نمونه گوسفند سویه G6 پیدا کردند. در مطالعه دیگر انجام شده توسط Ahmadi and Dalimi در سال ۲۰۰۶ (۲) با استفاده از ۴ آنزیم به روش ITS1-RFLP دوسویه G1 و G6 را در نمونه‌های گوسفند و شتر گزارش کردند.

از طرف دیگر مطالعات کمتری روی کیست‌های هیداتید بز در نواحی مختلف ایران انجام شده است و اگرچه مشابه گوسفند سویه G1 بیشترین فراوانی را در بزها دارد ولی نکته قابل توجه در این مطالعات گزارش وجود سویه G6 و G7 از بزها می‌باشد. از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه Fadakar و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۶) که در ۲۴ نمونه بز در استان خراسان رضوی و شمالی سویه G1 و در ۴ نمونه بز از خراسان شمالی سویه G7 پیدا کردند. Rajablo و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۱۴) در مطالعه روی سویه‌های کیست هیداتید در بزهای نواحی مختلف ایران تعداد ۱۷ کیست از نوع سویه G1 و تعداد ۳ کیست سویه G6 بودند که با نتایج حاصل از این طرح هم‌خوانی دارد. با توجه به اینکه شتر میزبان اصلی سویه G6 است این سویه در مناطق مرکزی و نواحی مرزی و بیابانی که عمدتاً محل پرورش و نگهداری از شتر است دیده می‌شود. نظر به پرورش شتر در منطقه استان خراسان جنوبی حضور این سویه در بزهای منطقه قابل توجیه است و لذا امکان دارد که بزها در سیر تکاملی و پراکندگی این سویه هم نقش داشته باشند.

References

1. Abedi, B., Maghsood, A.H., Khansarinejad, B., Fallah, M., Matini, M., Gholami, S., Pagheh, A.S., Ghasemikhah, R. (2019). Genotyping of *Echinococcus granulosus* isolates from livestock

based on mitochondrial cox1 gene, in the Markazi province, Iran. *J Parasit Dis*, 43(4), 592-596. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01132-4> PMID: 31749529

2. Ahmadi, N., Dalimi, A. (2006). Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. *Infect Genet Evol*, 6, 85-90. <https://doi.org/10.1177/1747493018778713> PMID: 16503509
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. <https://doi.org/10.1017/S0022149X11000228>
4. Eslami, A. (2008). *Veterinary Helminthology*. Vol 2, Cestoda. (2nd ed.). Tehran. University of Tehran Press, Iran. p. 80-110.
5. Cardona, G.A., Carmena, D. (2013). A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol*, 192 (1-3), 10-32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.027> PMID: 23084536
6. Fadakar, B., Tabatabaei, N., Borji, H., Naghibi, A. (2015). Genotyping of *Echinococcus granulosus* from goats and sheep indicating G7 genotype in goats in the Northeast of Iran. *Vet Parasitol*, 214 (1-2), 204-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.029> PMID: 26483165
7. Fasihi Harandi, M., 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 origin in Iran. *Parasitol*, 125, 367-378. <https://doi.org/10.1017/s0031182002002172> PMID: 12403325
8. Hajjalilo, E., Harandi, M.F., Sharbatkhori, M., Mirhendi, H., Rostami, S. (2012). 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(3), 263-70. <https://doi.org/10.1017/S0022149X11000320> PMID: 21749740
9. Karamian, M., Haghghi, F., Hemmati, M., Taylor, W.R., Salehabadi, A., Ghatee, M.A. (2017). Heterogeneity of *Echinococcus canadensis* genotype 6 - the main causative agent of cystic echinococcosis in Birjand, Eastern Iran. *Vet Parasitol*, 245, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.018>
10. Karimi, A., Dianatpour, R. (2008). Genotypic and phenotypic characterization of *Echinococcus granulosus* of Iran. *Biotechnol*, 7, 757-62.
11. Khademvatan, S., Yousefi, E., Rafiei, A., Rahdar, M., Saki, J. (2013). Molecular characterization of livestock and human isolates of *Echinococcus granulosus* from south-west Iran. *J Helminthol*, 87(2), 240-4. <https://doi.org/10.1017/s0022149x12000296> PMID: 22691442
12. Mahmoudi, S., Mamishi, S., Banar, M., Pourakbari, B., Keshavarz, H. (2019). Epidemiology of echinococcosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, 19(1), 929. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4458-5> PMID: 31684882
13. Moghaddas, E., Borji, H., Naghibi, A., Shayan, P., Razmi, G.R. (2014). Molecular genotyping of *Echinococcus granulosus* from dromedaries (*Camelus dromedarius*) in eastern Iran. *J Helminthol*, 89(1), 100-4. <https://doi.org/10.1017/S0022149X13000631> PMID: 24018210
14. Rajablo, M., Hosseini, S.H., Jalousian, F. (2012). Morphological and Molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* from goat isolates in Iran. *Acta Trop*, 123, 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.03.006> PMID: 22484229
15. Rokni, M. (2009). Echinococcosis/Hydatidosis in Iran. *Iranian J Parasitol*, 4, 1-16.
16. Rostami Nejad, M., Nazemalhosseini Mojarad, E., Nochi, Z., Fasihi Harandi, M., Cheraghipour, K., Mowlavi, G.R. (2008). *Echinococcus granulosus* strain differentiation in Iran based on sequence heterogeneity in the mitochondrial 12SrRNA gene. *J Helminthol*, 82, 343-47. <https://doi.org/10.1017/S0022149X0804594X>
17. Shahnazi, M., Hejazi, H., Salehi, M., Andali, A.R. (2011). Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran. *Acta Trop*, 117, 47-50. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.002> PMID: 20858453
18. Sharafi, S.M., Rostami-Nejad, M., Moazeni M., Yousefi, M., Saneie, B., Hosseini-Safa, A., Yousofi-Darani, H. (2014). *Echinococcus granulosus* genotypes in Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 7(2), 82-8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.002> PMID: 24834298
19. Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (1990). Intra specific variation in parasites— what is a strain? *Parasitol Today*, 6(11), 345-8. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90410-6](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90410-6) PMID: 15463264
20. Thompson, R.C.A. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*, 119, 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016> PMID: 18539274
21. Wen, H., Vuitton, L., Tuxun, T. L. J., Vuitton, D.A., Zhang, W., McManus, D.P. (2019). Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev*, 13, 1-38. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-18>
22. 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(1), 171-4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.171> PMID: 9684648



Strain Detection of Hydatid Cysts in Slaughtered Sheep and Goats in Birjand Area using Morphological and Molecular characteristics with ITS1Gene

Susan Ansari¹, Hassan Borji², Abolghasem Naghibi²

¹ Graduated from the Clinical Sciences, Department of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

doi [10.22059/jvr.2020.299752.3037](https://doi.org/10.22059/jvr.2020.299752.3037)

Received: 20 January 2021, Accepted: 10 April 2021

Abstract

BACKGROUND: Cystic echinococcosis (CE) is known to be one of the most important zoonotic diseases in different parts of Iran. Even though it causes major health problems, there is limited information regarding its transmission cycles and strain of this infection in eastern Iran.

OBJECTIVES: The present study aimed to characterize the strain of *Echinococcus granulosus* cysts in the slaughtered sheep and goats in Birjand area using morphological and molecular criteria.

METHODS: Isolates of *E. granulosus* were collected from sheep (30) and goats (30) from Birjand slaughterhouse and characterized employing both DNA (PCR-RFLP of ITS1) and morphological criteria (metacestode rostellar hook dimensions). In addition, the fragments of the genes coding for ITS-1 were sequenced.

RESULTS: Among the two different identified strains/genotypes (sheep and camel), the sheep strain appeared to be the most common genotype of *E. granulosus* affecting sheep and goats. All of the 30 sheep samples and 20 out of 30 goat samples were infected with sheep strain. However, the camel genotype was only observed in the goats and 10 out of 30 goat isolates were infected with the camel genotype. The camel genotypes had RFLP patterns, which were different from the RFLP patterns of the rest of isolates (sheep strain).

CONCLUSIONS: The results of this study revealed that the ‘sheep’ strain was the most prevalent strain in sheep and goats in this area. Moreover, the camel genotype (G6) was confirmed to trigger infection in the slaughtered goats of Birjand area.

Keywords: Hydatid cyst, Strain, Sheep, Goat, Molecular

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author’s email: hborji@um.ac.ir Tel/Fax: 051-38805605/051-38763852

How to cite this article:

Ansari, S., Borji, H., Naghibi, A. (2021). Strain Detection of Hydatid Cysts in Slaughtered Sheep and Goats in Birjand Area using Morphological and Molecular characteristics with ITS1Gene. J Vet Res, 76(2), 146-153. <https://doi.org/10.22059/jvr.2020.299752.3037>

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primer sequence used for strain detection of hydatid cysts based on ITS1 gene.

Table 2. Rostellar hook characteristics of protoscoleces of *Echinococcus granulosus* collected from hydatid cysts in the slaughtered sheep and goats in Birjand area.

Figure 1. Rostellar hook picture of protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in the slaughtered sheep and goats in Birjand area.

Figure 2. Electrophoresis of PCR amplification of ITS1 primer provided from liver and lung of the sheep samples (lane 1-3) and goat (lane 4-6) slaughtered sheep and goats in Birjand area -Lane a: negative control- Lane b positive control- Ladder 100 bp.

Figure 3. PCR-RFLP products of *E. granulosus* isolates using the restriction enzyme Bsh1236I from the liver and lungs of the slaughtered sheep and goats in Birjand area. M: ladder 50bp. Lanes 3 and 6 are G1-G3 genotype. Lane 1,2,4, and 5 are G6/G7 genotype.