

بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی کیست هیداتید گاو در خرم‌آباد

فاطمه کسائی^۱، حسن نایب زاده^۲، فاطمه جالوسیان^{۳*}، حمیدرضا شکرانی^۲

۱) دانش آموخته انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲) گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳) گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۰ مرداد ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۷ مهر ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: هیداتیدوز از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوانات است که ناشی از مرحله لاروی اکینو کوکوس گرانولوزوس بوده و یکی از عوامل مهم معضلات اقتصادی و بهداشتی در ایران است. **هدف:** این پژوهش به منظور تعیین سویه‌های اکینو کوکوس گرانولوزوس با مطالعه روی کیست‌های هیداتید گاو در منطقه خرم‌آباد در استان لرستان، واقع در غرب ایران انجام گرفت. **روش کار:** تعداد ۲۸ جدایه از گاو شامل ۲۶ جدایه از ریه و ۲ جدایه از کبد از کشتارگاه گلشن خرم‌آباد جمع‌آوری شد. تمام نمونه‌ها به منظور بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند. در بررسی‌های ریخت‌شناسی، طول قلاب‌های بزرگ و کوچک، طول تیغه قلاب بزرگ و کوچک و همچنین نسبت طول تیغه به طول کلی قلاب‌های بزرگ و کوچک اندازه‌گیری شدند. در بررسی مولکولی نیز، قطعه‌ای از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ (CO1) با طول ۴۴۰bp با استفاده از پرایمرهای J۳ و J۴/۵ تکثیر و به روش سانجر تعیین توالی شد. **نتایج:** یافته‌های ریخت‌شناسی نشان داد بین جدایه‌های کیست هیداتید گاو و سویه گوسفندی (G۱) sensu stricto اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p > 0.05$). نتایج مولکولی، یافته‌های ریخت‌شناسی را تأیید کرد. سویه جدا شده از گاوهای خرم‌آباد با سویه گوسفندی (G۱) sensu stricto ۱۰۰٪ همولوژی داشتند. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه نشان داد که سویه گوسفندی sensu stricto یا ژنوتایپ G۱ سویه غالبی است که عامل کیست هیداتید گاو در خرم‌آباد می‌باشد. به عبارت دیگر، گاو نقش مهمی در حفظ سیکل این انگل دارند. به منظور اجرای برنامه‌های کنترلی برای کاهش اثرات این بیماری، باید به گاوها به عنوان منبع آلوده کننده سگ‌ها توجه شود. نتایج این مطالعه می‌تواند در طراحی برنامه‌های کنترلی در منطقه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: هیداتیدوز، گاو، خرم‌آباد، ریخت‌شناسی، سیتوکروم اکسیداز ۱

مقدمه

خوکی (G۷) ۸- سویه گوزنی (G۸، G۱۰) و ۹- سویه شیری (G۹) (۱۱، ۲۹). لازم به ذکر است که در ایران تاکنون سویه گوسفندی (sensu stricto) یا ژنوتایپ G۱ و سویه شتری (Camel strain) یا ژنوتایپ G۶ و سویه گاو میش (buffalo strain) یا ژنوتایپ G۳ با پراکندگی محدود از گاو میش و شتر گزارش شده است (۱، ۲، ۶، ۸، ۹، ۳۲). در ایران با توجه به اهمیت گاوها بعنوان میزبان واسط این انگل دارند، تا کنون مطالعه جامعی در رابطه با تعیین سویه این انگل در این حیوان صورت نگرفته است. استان لرستان بدلیل شرایط اقلیمی ویژه، وجود شغل دامپروری در سطح گسترده و نگهداری سگ توسط دامداران و روستائیان، منطقه‌ای پر خطر از نظر ابتلا به کیست هیداتید می‌باشد (۱۲). برآیند با انتشار نتایج این پژوهش، نقش گاو در حفظ چرخه اهلی انگل در استان لرستان نشان داده شود و در برنامه‌های کنترل و پیشگیری این انگل مورد توجه قرار گیرد. لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی کیست هیداتید و تعیین سویه‌های اکینو کوکوس گرانولوزوس با مطالعه روی کیست‌های هیداتید جدایه گاو در منطقه خرم‌آباد در استان لرستان، واقع در غرب ایران بود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه: در مطالعه حاضر که از زمستان ۱۳۹۳ تا بهار ۱۳۹۴

اکینو کوکوس گرانولوزوس یکی از شایع‌ترین امراض دامی است که عامل هیداتیدوز در انسان و دامها می‌باشد که علاوه بر زیان‌های بهداشتی، خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت دامپروری وارد می‌سازد. این بیماری به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های عفونی انگلی انسان و حیوانات در سراسر جهان شناخته شده است (۲۷). کرم بالغ در روده گاو شترخواران زندگی می‌کند و مرحله متاسستود در ریه و کبد گوسفند، گاو، شتر، بز، خوک، گاو وحشی و اسب وجود دارد (۲۷). این بیماری در بدن میزبان واسط معمولاً بدون علامت است و تنها در بازرسی پس از کشتار در کشتارگاه شناسایی می‌شود و باعث کاهش فرآورده‌های دامی و زیان‌های اقتصادی فراوانی می‌گردد (۱۵). ایران یکی از مناطق اندمیک این انگل است (۱۸). اکینو کوکوس گرانولوزوس طیف گسترده‌ای از تنوع درون گونه‌ای را، با توجه به ریخت‌شناسی قلاب‌ها، ژنوتیپ، اختصاصی بودن میزبان و اپیدمیولوژی نشان می‌دهد، برخی از این گونه‌ها از لحاظ ریخت‌شناسی و زیست‌شناسی با دیگر گونه‌ها متفاوت هستند (۳، ۷). تاکنون بررسی ژنوم میتوکندریایی، وجود ۱۰ سویه یا ژنوتیپ مختلف را در گونه اکینو کوکوس گرانولوزوس نشان داده است: ۱- سویه گوسفند اهلی (G۱) (sensu stricto) ۲- سویه گوسفندی تاسمانیا (G۲) ۳- سویه گاو میش (G۳) ۴- سویه آسی (G۴) ۵- سویه گاو ۶- سویه شتری (G۶) ۷- سویه



۳ Forward-J3 (TTTTTTGGCCATCCTGAGGTTTAT) ۵' و
۴/۵ Reverse-J4 (AACGACATAACATAATGAAAATG) ۵'.

شرایط دمایی و زمانی ترموسایکلر جهت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز
شامل مراحل ذیل بود: واسرشت اولیه: 94°C به مدت ۵ دقیقه و ۳۸ سیکل شامل واسرشت: 94°C به مدت ۴۵ ثانیه اتصال: 55°C به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر: 73°C به مدت ۴۵ ثانیه و سیکل تکثیر نهایی: 73°C به مدت ۵ دقیقه. سپس محصول واکنش PCR در ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. در این طرح جهت خالص سازی نمونه‌ها از کیت تخلیص محصول (MBST، ایران) PCR استفاده شد. نمونه‌ها جهت تعیین توالی، به شرکت Bioneer در کشور کره ارسال شدند. برای ویرایش و بازسازی توالی‌های تعیین شده از نرم افزار CLC Free Workbench و برای مطالعه شجره‌شناسی و بررسی تکامل مولکولی از نرم افزار MEGA۵ استفاده از مدل Neighbor-Joining با آزمون ریشه‌ای Boot Strap ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. در مطالعه شجره‌شناسی از توالی جدایه‌های مرجع جدایه‌های کشورهای همسایه و همچنین جدایه‌های ایرانی که در بانک ژن در دسترس هستند استفاده شد. توالی‌های بدست آمده در بانک ژن ثبت گردید و شماره‌های دسترسی جهانی به آن‌ها اختصاص یافت.

نتایج

نتایج ریخت شناسی: از تعداد ۲۸ نمونه مورد بررسی، قلاب‌های پروتواسکولکس‌ها مشخصات شبیه به هم داشته و از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p > 0.05$) (جدول ۱، ۲). در مطالعه حاضر نحوه قرار گرفتن قلاب‌های بزرگ و کوچک به صورت یک در میان و سطح خارجی قلاب‌ها صاف و هموار بود.

نتایج بررسی مولکولی: به منظور مطالعه مولکولی از ژنوم میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز ۱ (CO1) برای شناسایی سویه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس در خرم‌آباد استفاده شد. طبق نتایج بدست آمده اندازه قطعه CO1 تکثیر یافته ۴۴۰ bp بود (تصویر ۱). در الگوهای الکتروفورز تفاوتی مشاهده نشد. تمام نمونه‌ها تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی نشان می‌دهد که تمامی نمونه‌ها سویه G1 (*sensu stricto*) بودند. نتایج مولکولی، یافته‌های ریخت شناسی را تأیید کردند و تقریباً ۱۰۰٪ با سویه G1 (*sensu stricto*) همولوژی داشتند. سه مورد از نتایج تعیین توالی مطالعه حاضر در بانک جهانی ژن با شماره دستیابی KT۲۱۶۲۶۲ و KT۲۱۶۲۶۳ و KT۲۱۶۲۶۴ در دسترس است.

مقایسه درخت فیلوژنی مطالعه حاضر با سایر مطالعات نشان می‌دهد که در مطالعه حاضر تمام سویه‌های G1 در یک کلاد قرار دارند. شباهت G1 با G3 در حدود ۹۱٪ است. این شباهت در بعضی از توالی‌های موجود در بانک ژن با شماره دستیابی DQ۸۵۶۴۶۶/۱ و JX۸۷۸۶۹۲/۱ به حدود بیش از ۹۱٪ نیز می‌رسد که باعث می‌شود در درخت شجره‌شناسی دو مورد

صورت گرفت، در بازرسی پس از کشتار تعداد ۲۶ نمونه ریه و ۲ نمونه کبد (۲۸ نمونه در مجموع) آلوده به کیست هیداتید بارور از کشتارگاه گلشن خرم‌آباد در استان لرستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سطح کیست با الکل ۷۰٪ استریل شد و مایع داخل هر کیست توسط سرنگ شماره ۱۴ اسپیره، و در استوانه‌های مدرج قیفی استریل جداگانه‌های جمع‌آوری گردید. لایه ژرمینال داخل کیست با پینس به آرامی جدا، و در سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. پروتواسکولکس‌های جدا شده بطور جداگانه در لوله‌های فالکون با شماره‌های مشخص ریخته و سانتریفیوژ شدند و پس از سه بار شستشو با فسفات بافر سالین (۷/۸ pH) PBS به منظور مطالعه ریخت شناسی و مولکولی در الکل اتانول ۷۰٪ (Merck، آلمان) و در دمای 4°C نگهداری شدند (۲۵).

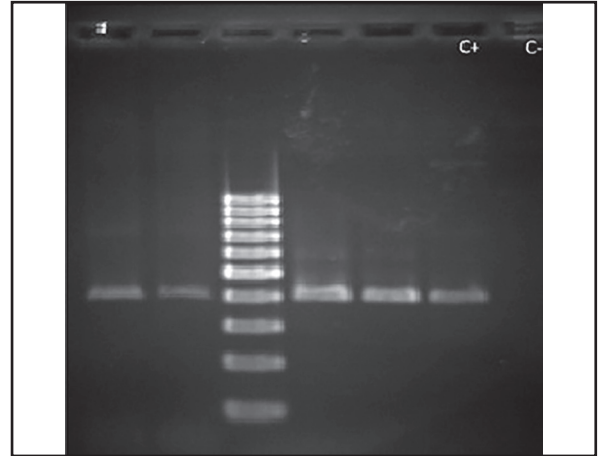
بررسی ریخت شناسی: از هر نمونه ۱۰۰ μl پروتواسکولکس برداشته، و در میکروتیوب‌های با حجم ۱/۵ μl ریخته، و پس از الکل‌گیری از نمونه‌ها، به آن‌ها ۱۰۰ μl آب اضافه کرده و هر نمونه به مدت ۱۵ دقیقه ورتکس شد. سپس با اضافه نمودن ۲-۳ قطره لاکتوفنل پلی ونیل به روی لام مقدار ۲۰ μl از پروتواسکولکس‌های ورتکس شده را به روی لام قرار داده و با استفاده از لبه لام دیگری و با حرکت دورانی، اقدام به جداسازی قلاب‌های پروتواسکولکس گردید (۱۷). سپس لام را با فشار به روی لام قرار داده و از هر نمونه به تعداد ۵ عدد لام تهیه شد. لام‌ها به مدت یک شب در دمای اتاق قرار داده شدند تا قلاب‌ها شفاف شوند. سپس هر کدام از لام‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی شده و در هر جدایه، قلاب‌های ۳۰ عدد پروتواسکولکس، شمارش و اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری به وسیله نرم‌افزار AXI vision (نسخه ۴) با واحد میکرو متر و با بزرگنمایی $100\times$ انجام گرفت. به منظور جمع‌آوری اندازه قلاب‌ها از هر نمونه، طول کامل قلاب (TL)، طول تیغه (BL)، طول دسته (HL) و نسبت طول تیغه به طول کلی BL/TL قلاب‌های بزرگ و کوچک اندازه‌گیری شدند (۱۷). نتایج اندازه‌گیری قلاب‌ها با نتایج سایر مطالعات با استفاده از آزمون t-test مقایسه شد.

بررسی مولکولی: در مطالعه حاضر قسمتی از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ از پروتواسکولکس مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور استخراج DNA، پروتواسکولکس‌ها با (۷/۸ pH) PBS شستشو شدند و مقدار ۱۰۰ μl از آن‌ها در میکروتیوب ریخته شد. استخراج DNA از پروتواسکولکس‌ها با استفاده از کیت استخراج (MBST، ایران) DNA و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد و DNA استخراج شده در دمای 20°C - نگهداری شد. به منظور مقایسه تفریقی سویه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس قطعه‌ای به طول ۴۴۰ bp از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ با استفاده از پرایمرهای J۳ و J۴/۵ (پرایمرهای یونیورسال) تکثیر شد. در این مطالعه از پرایمرهای یونیورسال (پرایمر بالا دست به نام J۳ و پرایمر پایین دست به نام J۴/۵) به منظور تعیین سویه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس، استفاده گردید (۱۷). توالی پرایمرها عبارتست از:



(۴). بنابراین به دلیل آلودگی قابل توجه در این استان به نظر می‌رسد این مسأله باید مورد توجه مسئولین دامپزشکی و پزشکی قرار گیرد. تحقیق حاضر اولین تحقیق در مورد شناسایی سویه‌های اکینو کوکوس گرانولوزوس با منشأ کیست هیداتید گاو در شهرستان خرم‌آباد در استان لرستان است.

بر اساس مطالعه‌ای که توسط Dalimi و همکاران در سال ۲۰۰۱ در رابطه با وضعیت آلودگی به کیست هیداتید در استان لرستان انجام شده، میزان آلودگی در این استان قابل توجه اعلام شد (۴). همچنین مطالعه Dalimi و همکاران در سال ۲۰۰۱ در این استان نشان داد که ۳۰/۹۰٪ از سگ‌های گله و ۶/۶۷٪ روباه قرمز به اکینو کوکوس گرانولوزوس آلوده‌اند و در کشتارگاه‌های خرم‌آباد، دلفان و سلسله در استان لرستان از مجموع ۱۹۶۸ رأس گاو ۵۵/۹۴٪ و از مجموع ۶۸۷۹ رأس گوسفند ۲۵/۲۹٪ به کیست هیداتید آلوده بودند (۴). بطوریکه بر اساس اطلاعات داده شده از سازمان دامپزشکی استان از مجموع ۱۶۷۶۷۱ رأس گوسفند ۵۲۷۳۸ رأس گاو کشتار شده در کشتارگاه خرم‌آباد در طی سال ۱۳۹۱ میزان آلودگی به کیست هیداتید در ریه و کبد گوسفندان به ترتیب ۱۱/۷٪ و ۵٪ و میزان آلودگی در ریه و کبد گاو و گوساله به ترتیب ۲۰٪ و ۹٪ گزارش شده است. و همچنین از مجموع ۱۶۰۵۸۱ رأس گوسفند و ۲۸۱۶۳ رأس گاو کشتار شده در کشتارگاه خرم‌آباد در طی سال ۱۳۹۲ میزان آلودگی به کیست هیداتید در ریه و کبد گوسفندان به ترتیب ۱۳/۳٪ و ۵/۷٪ و میزان آلودگی در ریه و کبد گاو و گوساله به ترتیب ۱۴/۷٪ و ۷/۸٪ می‌باشد. همچنین موارد آلودگی انسانی به کیست هیداتید، که در طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۹۰ در این استان بررسی شد، ۱۳۴ مورد کیست هیداتید تشخیص داده شد که ۷۷ نفر از این تعداد زن و ۵۷ نفر مرد بودند. بیش‌ترین اندام آلوده کبد بود (۶۹٪) که در ۷ مورد (۵/۱٪) کبد به همراه سایر اندام‌های دیگر درگیر بود (۱۲). مطالعه Rostami Nejad و همکاران در سال ۲۰۱۲ در شهرستان الشتر در استان لرستان نشان داد که از مجموع ۴۰۴۳۱ دام کشتار شده در مدت ۵ سال موارد آلودگی به کیست هیداتید، ۲۸۸۵ (۷/۱۳٪) ریه، ۲۸۸۵ (۷/۱۳٪) کبد و ۱۵۹۸ (۳/۹۷٪) صفاق بوده است. (۲۰). در مطالعه‌ای که توسط Venesa و همکاران از سال ۲۰۰۶-۲۰۰۳ در استان بوئنوس در آرژانتین صورت گرفت، ۴۲ جدایه از گاو و ۳۴ جدایه از گوسفند بر اساس مطالعه انجام شده بر اساس CO₁ و nad₁ ژنوتیپ G₁ (sensu stricto) شناسایی شد و فقط یک جدایه گوسفندی بعنوان ژنوتیپ G₂ و یک جدایه گاوی بعنوان ژنوتیپ G₅ گزارش گردید (۳۱). در مطالعه‌ای که توسط Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۳ برای شناسایی سویه‌های اکینو کوکوس گرانولوزوس در گوسفند، گاو و شتر در شمال هند صورت گرفت، منجر به شناسایی سویه‌های (sensu stricto) G₁، G₃، G₅ و G₆ در این منطقه شد (۲۴). در این مطالعه ۵۳/۱٪ از جدایه‌ها سویه G₃ و ۴۰/۶۲٪ از جدایه‌ها سویه G₁ (sensu stricto) بود و تنها یک جدایه گاوی بعنوان ژنوتیپ G₅ و یک جدایه هم بعنوان ژنوتیپ G₆ معرفی شدند



تصویر ۱. نتیجه الکتروفورز محصول PCR تخلیص شده به اندازه ۴۴۰ bp در کنار مارکر ۱۰۰ bp.

جدول ۱. نتایج بررسی اندازه طول قلاب‌های بزرگ و کوچک پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید جدا شده از گاو در خرم‌آباد.

مشخصات بررسی شده	قلاب‌های بزرگ	قلاب‌های کوچک
طول کلی قلاب (TL)	۲۵/۴ ± ۲/۹ μ (۲۳/۸-۲۷/۱)	۲۰/۶ ± ۲/۶ μ (۱۹/۷-۲۱/۵)
طول تیغه (BL)	۱۲/۳ ± ۲/۱ μ (۱۰/۴-۱۴/۵)	۸/۷ ± ۲/۱ μ (۷/۲-۹/۹)
طول دسته (HL)	۹ ± ۲/۷ μ (۸/۰-۱۰/۳)	۸/۲ ± ۲/۷ μ (۷/۱-۹/۴)
نسبت طول تیغه به طول کلی قلاب	۴۸/۹ ± ۲/۳ (۴۳/۷-۵۳/۵)	۴۰/۷ ± ۲/۱ (۳۳/۲-۴۷/۹)

از توالی‌های G₃ نیز در کلاد G₁ قرار گیرد.

بحث

بحث حاضر در ارتباط با یکی از انگل‌های کرمی است که باعث آلودگی نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ در ایران و دنیا می‌شود. هیداتیدوز ناشی از اکینو کوکوس گرانولوزوس از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوانات است که ناشی از مرحله لاروی اکینو کوکوس گرانولوزوس بوده که هنوز هم یکی از عوامل مهم ایجادکننده معضلات اقتصادی و بهداشتی در نواحی مختلف ایران و جهان است (۱۰). استان لرستان با مساحتی بالغ بر ۲۸۰۶۴ km² در غرب کشور واقع شده است. ۷۵٪ این استان را اراضی تپه‌ای و کوهستانی تشکیل می‌دهد و گله‌داری یکی از مشاغل مهم و رایج مردم این استان به خصوص در مناطق روستایی و عشایری به شمار می‌آید. این استان با داشتن ۶/۵ میلیون رأس از حیوانات اهلی رتبه ششم را در صنعت دامپروری و کشاورزی در کشور دارد. این استان با داشتن آب و هوای معتدل کوهستانی و همچنین چراگاه‌های غنی و سرسبز، جایگاه مناسبی برای کوچ عشایر از مناطق مختلف به این منطقه است. این مسئله باعث شده که شرایط جهت رشد اکینو کوکوس گرانولوزوس در این منطقه فراهم گردد، لذا آلودگی در این منطقه از شیوع نسبتاً بالایی برخوردار است



جدول ۲. مقایسه نتایج اندازه‌گیری فلاپ‌های بزرگ و کوچک پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید جدایه گاو در خرم‌آباد با جدایه گاو در سوئیس (۲۸) و جدایه‌های گوسفند در ایران (۸) و سوئیس (۲۸).

مشخصات	گاو (Thompson و همکاران ۱۹۸۴)	گاو (خرم‌آباد) (مطالعه حاضر)	گوسفند (Thompson و همکاران ۱۹۸۴)	گوسفند (اسلامی و حسینی ۱۹۹۸)
طول کلی فلاپ بزرگ (LTL)	$28/9 \pm 1/2 \mu$ (۲۶-۳۲)	$25/4 \pm 7/8 \mu$ (۲۳/۸-۲۷/۱)	$25/01 \pm 1/1 \mu$ (۲۲-۲۷/۵)	$23/28 \pm 2/86 \mu$ (۲۷/۴-۲۴/۸)
طول تیغه فلاپ بزرگ (LBL)	$14 \pm 0/6 \mu$ (۱۳-۱۵/۵)	$12/3 \pm 2/2 \mu$ (۱۰/۴-۱۴/۵)	$12/4 \pm 1/2 \mu$ (۹-۱۴)	$17/37 \pm 1/83 \mu$ (۱۰/۱-۱۳/۵)
LBL/LTL	$5 \pm 2/2 \mu$ (۴/۵-۵/۵/۵)	$48/9 \pm 6/6 \mu$ (۴۳/۷-۵۲/۵)	$49/4 \pm 4/5 \mu$ (۳۷-۵۸)	$5/5 \pm 2/3 \mu$ (۴۲/۱-۵۴/۵)
طول کلی فلاپ کوچک (STL)	$24/8 \pm 1/3 \mu$ (۲۲-۲۹)	$2/6 \pm 1/2 \mu$ (۱۹/۷-۲۷/۵)	$27/4 \pm 1/5 \mu$ (۱۹-۲۵/۶)	$18/1 \pm 1 \mu$ (۱۶/۹-۲۰/۳)
طول تیغه فلاپ کوچک (SBL)	$10/4 \pm 1/6 \mu$ (۸/۹-۱۱)	$8/7 \pm 2 \mu$ (۷/۲-۹/۹)	$8/5 \pm 1/9 \mu$ (۷-۱۰)	$7/44 \pm 1/78 \mu$ (۶/۷-۹)
SBL/STL	$47/8 \pm 2/2$ (۳۴/۱-۴۵/۸)	$40/7 \pm 1/2$ (۳۳/۲-۴۷/۹)	$40/6 \pm 3/5$ (۳۰-۴۸)	$40/64 \pm 3/3$ (۳۳/۳-۴۵/۲)

در مدت زمان بررسی نمونه‌ها نشان داد که از ۲۸ نمونه جدا شده از گاو تمامی کیست‌ها بارور بودند. لذا می‌بایست به این موضوع توجه کرد که احتمالاً منشأ آلودگی گاو در این منطقه با گوسفندان یکی است و گاو و گوسفند در منطقه خرم‌آباد از یک منشأ به آکینوکوک آلوده می‌شوند لذا به همین دلیل در گاوها هم سویه G1 (sensu stricto) شناسایی شده است. شاید اگر کیست‌ها به سویه گاوی (G5) آلوده بودند باروری کمتری داشتند. این مسئله با توجه به شرایط اکولوژی و اقلیمی منطقه لرستان که شرایط جهت رشد آکینوکوکوس گرانولوزوس فراهم است و همچنین شیوع دامپروری سنتی در این استان، توجیه‌پذیر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که آلودگی هیداتیدوز ناشی از مرحله لاروی آکینوکوکوس گرانولوزوس در استان لرستان شیوع بالایی داشته و با توجه به اهمیت بهداشتی و اقتصادی این بیماری لازم است اقدامات مؤثری در کنترل بیماری در استان صورت گیرد. نتایج مطالعات انجام شده در ایران نشان می‌دهد که سویه گوسفندی، شتری و اخیراً سویه دیگری به نام سویه گاومیش با پراکندگی محدود از گاومیش و شتر در استان اردبیل در ایران وجود دارد (۲). این نشان می‌دهد که سویه گوسفندی آکینوکوکوس گرانولوزوس بطور معمول باعث آلودگی شتر، انسان، گوسفند، گاو و بز می‌شود (۲۲، ۲۳). با توجه به نتایج بدست آمده بر اساس مطالعه ریخت شناسی و مولکولی در مطالعه حاضر می‌توان با قطعیت اعلام نمود که آکینوکوکوس گرانولوزوس سگ-گوسفندی در خرم‌آباد سویه مشخصی است و شبیه سویه گوسفندی متداول در ایران است بنابراین تکرار همان سویه در بخشی از ایران است. همچنین مقایسه شاخص‌های مختلف فلاپ (طول کلی- طول تیغه- نسبت طول تیغه به طول کلی) نشان داد که بین سویه گوسفندی در خرم‌آباد با سویه گوسفندی در ایران و استرالیا از نظر آماری با استفاده از آزمون t-test اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (۳۰) اما این سویه با سویه گوسفندی آکینوکوکوس گرانولوزوس در جزیره تاسمانیا متفاوت است، لازم به ذکر

(۲۴). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Parreira و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور پرتغال صورت گرفت برای اولین بار ژنوتیپ Gy از گاو گزارش شد که در این مطالعه از ۲۰۹ کیست جدا شده از کبد، ریه، کلیه و پانکراس گوسفند، گاو، بز و انسان، با بررسی ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ از الگوی بدست آمده از هضم آنزیمی محصولات واکنش زنجیره پلی‌مراز، در اکثر جدایه‌ها، سویه‌های G1 (sensu stricto) و G3 گزارش شد، اما در یکی از جدایه‌های گاوی سویه Gy شناسایی شد (۱۳). Parsa و همکاران در سال ۲۰۱۲ با جمع‌آوری ۷۱ کیست از گوسفند، گاو و گاومیش در غرب ایران با استفاده از ژن CO1 و nad1 موفق به شناسایی دو ژنوتیپ شدند بطوریکه ۷۵٪ نمونه‌ها G1 (sensu stricto) و ۱۵٪ G3 تعیین شدند (۱۴).

در مطالعه دیگری که توسط Rostami و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، با جمع‌آوری ۲۱۸ کیست از گوسفند، گاو و شتر از مناطق مختلف ایران و با استفاده از روش مولکولی و ریخت شناسی، سویه‌های (sensu stricto) G1، G3، و G6 در گوسفند، گاو و شتر شناسایی شدند (۱۹). در مطالعه Pestechnian و همکاران در سال ۲۰۱۳ تعداد ۷۱ نمونه کیست هیداتید از گوسفند، گاو و بز از کشتارگاه خمینی‌شهر و نجف‌آباد اصفهان جمع‌آوری شد که پس از استخراج DNA و انجام PCR، از ۶۶ نمونه تعیین توالی شده، ۷۴/۲۴٪ نمونه‌ها سویه G1 (sensu stricto) و ۲۲/۷۲٪ سویه G3 و ۳/۰۳٪ سویه G6 بودند (۱۶). Dousti و همکاران در سال ۲۰۱۳ در استان ایلام نشان دادند که از ۳۰ نمونه جدا شده از کشتارگاه و ۴ نمونه انسانی، با استفاده از ژن rDNA-ITS1 و با استخراج DNA و PCR، سویه گوسفندی G1 (sensu stricto) و سویه گاومیش G3 در این استان وجود دارد (۵). براساس مطالعات قبلی انجام شده در ایران، علیرغم میزان شیوع بالای کیست هیداتید در گاو، میزان باروری کیست در این حیوان پایین اعلام شده است و نتایج نشان داده که بیشتر کیست‌های گاوی استریل هستند که این پدیده به دلیل وجود ایمنی‌بالا در گاو و ایمنی ضعیف در گوسفند است (۲۸، ۹). این در حالی است که نتایج مطالعه حاضر،



References

- Ahmadi, N., Dalimi, A. (2006) Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. *Infect Genet Evol.* 6: 85-90.
- Amin Pour, A., Hosseini, S.H., Shayan, P. (2011) Comparative genotyping of *Echinococcus granulosus* infecting buffalo in Iran using *Cox1* gene. *Parasitol Res.* 108: 1229-1234.
- Bart, J.M., Morariu, S., Knapp, J., Ilie, M.S., Pitulescu, M., Anghel, A., Cosoroaba, I., Piarroux, R. (2006) Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res.* 98: 130-137.
- Dalimi, A., Hosseini, M., Motamedi, G.H. (2002) The potential role of stray dog and red foxe in *Echinococcosis/ Hydatidosis* life cycl in Lorestan Province. *Iran J Fac Vet Med Univ Tehran.* 57: 81-86.
- Dousti, M., Abdi, J., Bakhtiyari, S., Mohebbali, M., Mirhendi, Sh., Rokni, M. (2013) Genotyping of hydatid cyst isolated from human and domestic animals in Ilam Province, Western Iran using PCR-PFLP. *Iran J Parasitol.* 8: 47-52.
- 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: 367-37.
- Hobbs, R.P., Lymbery, A.J., Thompson, R.C.A. (1990) Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* from natural and Experimental Australian host and its implications for strain recognition. *Parasitol.* 101: 251-273.
- Hosseini, S.H., Eslami, A. (1998) Morphological and developmental characteristics of *Echinococcus granulosus* derived from sheep, cattle and camels in Iran. *J Helminthol.* 72: 35-41.
- Hosseini Safa, A., Pestechian, N., Tajadini, M. H., Mohamadi, F., Cheraghipour, K., Rostami Nejad, M. (2014) Evaluation the current status of hydatid cyst infection in slaughtered Livestock from Isfahan province. *Shahid Beheshti Univ Med Sci.* 23: 33-38.
- Kumaratilake, L.M., Thompson, R.C.A., Dun-

است که سویه اکینو کوکوس گرانولوزوس جدایه گوسفند تاسمانیا با سویه این انگل در سرزمین استرالیا و نقاط دیگر جهان نیز تفاوت دارد (۳۹). این مطالعه می تواند نتایج قبلی (۲۲) مبنی بر غالب بودن سویه گوسفندی را در ایران تأیید کند. با توجه به درصد بالای آلودگی گاوهای این منطقه به نظر می رسد که در منطقه خرم آباد گاوها بیشتر با سویه گوسفندی آلوده می شوند. وجود سویه گوسفندی در گاوها و گوسفندان خرم آباد نشان می دهد که احتمالاً گوسفندها و گاوها در این منطقه از یک منشأ به اکینو کوکوس گرانولوزوس آلوده می شوند و می تواند به دلیل رواج دامپروری سنتی در این منطقه باشد بطوریکه گاو و گوسفند از یک چراگاه آلوده می شوند. بنابراین با توجه به درصد بالای آلودگی گاوهای این منطقه باید به این حیوان بعنوان مخزن اکینو کوک توجه ویژه ای شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند تا مراتب قدردانی خود را خدمت استاد ارجمند جناب آقای دکتر سید حسین حسینی ابراز نمایند که در اجرای این تحقیق از دانش و تجربه های ارزشمند ایشان بهره بردند. هم چنین از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که انجام این مطالعه را یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایند. این پایان نامه با حمایت مالی دانشگاه لرستان انجام گرفت.

- smore, D.J. (1983) Comparative strobilar development of *Echinococcus granulosus* of sheep origin from different in vivo and vitro. *Int J Parasitol.* 13: 151-160.
- Nakao, M., Yangida, T., Okomoto, M., Knapp, J., Sako, Y., Ito, A. (2010) State of the art *Echinococcus* and *tenia*: phylogenic taxonomy of human pathogenic tapworms and its application to molecular diagnosis. *Infect Genet Evol.* 10: 444-452.
- Nayebzadeh, H., Tarrahi, M.J., Aryan, A., Nayebaghay, S.M. (2013) Epidemiology of human hydatid cyst surgery in the province Lorestan during the years 2004- 2011. *J Zoonoses Res.* 1: 48-55.
- Parreira, R., Roque, C., Gonçalves, M., Silva, L., Maurelli, M.P., Cringoli, G., Grácio, M.A. (2013) *Echinococcus granulosus* in Portugal: the first report of the G7 genotype in cattle. *Vet Parasitol.* 198: 235-9.
- Parsa, F., Fasihi Harandi, M., Rostami, S., Sharbatkhori, M. (2012) Genotyping *Echinococcus*



- granulosus from dogs from Western Iran. *Exp Parasitol.* 132: 308-12.
15. Pednekar, P., Gatne, M.L., Thompson, R.C.A., Trub, R.J.T. (2009) Molecular and morphological characteristics of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Vet Parasitol.* 165: 58-65.
 16. Pestechian, N., Hosseini Safa, A., Tajedini, M.H., Rostami Nejad, M., Mousavi, M., Yousofi, H.A. (2014) Genetic diversity of *Echinococcus granulosus* in Iran using Real-Time PCR. *Korean J Parasitol.* 52: 413-8.
 17. Rajablo, M., Hosseini, S.H., Jalousian, F., (2012) Morphological and Molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* from goat isolates in Iran. *Acta Tropica.* 123: 67-71.
 18. Rokni, M.B. (2009) *Echinococcosis/hydatidosis* in Iran. *Iranian J Parasitol.* 4: 1-16.
 19. Rostami, S., Talebi, S., Babaei, Z., Sharbatkhori, M., Ziaali, N., Rostami, H. (2013) High resolution melting technique for molecular epidemiological studies of cystic echinococcosis: differentiating G1, G3, and G6 genotypes of *Echinococcus granulosus sensulato*. *Parasitol Res.* 112: 3441-47.
 20. Rostami Nejad, M., Nazemalhosseini Mojarad, E., Jahani-sherafat, S., Cheraghipour, K., Taghipour, N. (2012) Hydatid cyst prevalence in slaughtered animals a neglected health problem. *J paramed sci.* 3: 25-29.
 21. Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406-425.
 22. Sharbatkhori, M., Mirhendi, H., FasihiHarandi, M., Rezaeian, M., Mohebal, M., Eshraghian, M., Rahimi, H., Beigomkia, E. (2010) *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. *Exp Parasitol.* 124: 373-379.
 23. 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.
 24. Sharma, M., Sehgal, R., Fomda, B.A., Malhotra, A. (2013) Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Cysts in North Indian Patients: Identification of G1, G3, G5 and G6 Genotypes. *Plos Negl Trop Dis.* 7: 2262-72.
 25. Smyth, J.D., Barrett, N.J. (1980) Procedure for testing the viability of human hydatidcyst following surgical removal, especially after chemotherapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 74: 649-652.
 26. Tamura, K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol Biol Evol.* 9: 678-687.
 27. Thompson, R.C.A. (2008) The taxonomy phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol.* 119: 439-446.
 28. Thompson, R.C.A., Kumaratilake, L.M., Eckert, J. (1984) Observation on *Echinococcus granulosus* of cattle origin in switzerland. *Int J Parasitol.* 14: 283-291.
 29. Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (1988) The nature extont and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Advin Parasit.* 27: 21-58.
 30. Thompson, R.C.A., Mcmanus, D.P. (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus granulosus*. *Trends Parasitol.* 18: 452-457.
 31. Venesa, A.M., Gordo, F.O., Saarma, M., Elisondo, M.C., Taraborelli, A., Casalongue, C., Dengery, G., Saarma, U. (2013) *Echinococcus granulosus* genotype G1 dominated in cattle and sheep during 2003-2006 in Buenos Aires Province, an endemic area for cystic echinococcosis in Argentina. *Acta Trop.* 127: 136-142.
 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: 171-174.



Morphological and molecular characterization of cattle hydatid cysts in Khorramabad, Iran

Kasaeiyan, F.¹, Nayebzadeh, H.², Jalousian, F.^{3*}, Shokrani, H.R.²

¹Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

²Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

³Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

(Received 10 August 2016, Accepted 28 September 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Hydatidosis is one of the zoonotic diseases which affect animals and human beings at the larval stage of *Echinococcus granulosus*, thereby playing a role in exacerbating the economic and health problems in Iran. **OBJECTIVES:** This study was conducted to investigate the strains of *Echinococcus granulosus* isolated from cattle hydatid cysts, in Khorramabad, in the Lorestan Province, in the west of Iran. **METHODS:** Twenty-six isolates of hydatid cyst of cattle from lung (24 samples) and liver (2 sample) organs were collected from Golshan Slaughterhouse, in Khorramabad. All of the samples were transferred to the laboratory for morphometric characterization and molecular study. In morphological characterization, blade length of large (LBL) and small (SBL) hooks and the ratio of blade length to total length in large (LBL/LTL) and small (SBL/STL) hooks and total length of large (LTL) and small (STL) hooks were measured. In molecular study, a partial sequence of cytochrome oxidase 1 (CO1) with 440 bp in length was amplified applying primers J3 and J4.5. Genomic DNA sequencing was performed by Sanger's method. **RESULTS:** The morphological results showed that there is no significant difference between isolated from cattle hydatid cyst and sensu stricto strain ($p < 0.05$). The results of molecular studies support the findings of morphological characterization. All sequences showed 100% identity with sensu stricto strain. **CONCLUSIONS:** The results from this study showed that sensu stricto strain (G1) is a causative agent of cattle hydatid cyst in Khorramabad. On the other hand, the cattle play a role in enabling the parasite to complete its cycle. Hence in order to execute a control program for minimizing the effects of this disease, the cattle should be considered as a source of infection for dogs. The results of this study could be helpful in designing such control program in the region.

Keyword: *Hydatidosis*, cattle, morphology, cytochrome oxidase 1

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The result of gel electrophoresis of PCR products after purification and 100bp ladder.

Table 1. The results of hydatid cyst protoscolex rostellar large and small hooks isolated from cattle in Khorramabad.

Table 2. Comparing the length of large and small hooks from hydatid cysts isolated from cattle in Khorramabad against cattle isolate from Swetzerland (28) and sheep isolates from Iran (8) and Swetzerland (28).



*Corresponding author's email: jalousian_f@ut.ac.ir, Tel: 021-61116171, Fax: 021-66933222

J. Vet. Res. 71, 4, 2016