مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۴، ۳۸۷-۳۸۱
Journal of Veterinary Research. 71,4:381-387, 2016
Original Article

بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی کیست هیداتید جدایه گاو در خرم‌آباد

فاطمه کسائیان[۱] حسن نایب زاده[۲] فاطمه جالوسیان[۳*] حمیدرضا شکرانی[۲]

۱) دانش آموخته انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۳) گروه انگل شناسی، 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس بوده و یکی از عوامل مهم معضلات اقتصادی و بهداشتی در ایران است. **هدف:** این پژوهش به منظور تعیین سویه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس با مطالعه روی کیست‌های هیداتید جدایه 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 ریخت شناسی، 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 (CO۱) به 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 گاوی و سویه گوسفندی (G۱) sensu stricto اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p>۰/۰۵). نتایج مولکولی، یافته‌های ریخت شناسی 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 گاوها در خرم‌آباد می‌باشد. به عبارت دیگر، گاوها 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، ریخت شناسی، سیتوکروم اکسیداز۱

مقدمه

اکینوکوکوس 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 گوشتخواران 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 فراورده‌های دامی و زیان‌های اقتصادی فراوانی می‌گردد (۱۵). ایران یکی از مناطق اندمیک این انگل است (۱۸). اکینوکوکوس 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 اکینوکوس گرانولوزوس نشان داده است: ۱- سویه گوسفند اهلی (G۱) (sensu stricto) ۲- سویه گوسفندی تاسمانیا (G۲) ۳- سویه گاومیش (G۳) ۴- سویه اسبی (G۴) ۵- سویه گاوی (G۵) ۶- سویه شتری (G۶) ۷- سویه 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 گاومیش (buffalo strain) یا ژنوتایپ G۳ با پراکندگی محدود از گاومیش و شتر گزارش شده است (۱،۲،۶،۸،۹،۳۲). در ایران با توجه به اهمیتی که 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). برآنیم با انتشار نتایج این پژوهش، نقش گاو درحفظ 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس با مطالعه روی کیست‌های هیداتید جدایه گاو در منطقه خرم‌آباد در استان لرستان، واقع در غرب ایران بود.

مواد و روش کار

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

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۶۱۷۱ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: jalousian_f@ut.ac.ir

صورت گرفت، در بازرسی پس از کشتار تعداد ۲۶ نمونه ریه و ۲ نمونه کبد (۲۸ نمونه در مجموع) آلوده به کیســت هیداتید بارور از کشــتارگاه گلشن خرم‌آباد در اســتان لرستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سطح کیســت با الکل ۷۰٪ استریل شــد و مایع داخل هر کیست توسط سرنگ شــماره ۱۴ آسپیره، و در استوانه‌های مدرج قیفی استریل جداگانهای جمع آوری گردید. لایه ژرمینال داخل کیســت با پنس به آرامی جدا، و در ســرم فیزیولوژی شستشو داده شد. پروتواسکولکس‌های جدا شده بطور جداگانه در لوله‌های فالکون با شماره‌های مشخص ریخته و سانتریفیوژ شدند و پس از ســه بار شستشو با فسفات بافر سالین (PBS (۷/۲ pH به منظور مطالعه ریخت شناســی و مولکولــی در الکل اتانــول ۷۰٪ (Merck، آلمان) و در دمای ۴°C نگهداری شدند (۲۵).

بررسی ریخت شناسی: از هر نمونه ۱۰۰ µl پروتواسکولکس برداشته، و در میکروتیوب‌هــای بــا حجــم ۱/۵ µl ریخته، و پــس از الکل گیری از نمونه‌هــا، به آن‌هــا ۱۰۰ µl آب اضافه کرده و هر نمونه به مدت ۱۵ دقیقه ورتکس شد. سپس با اضافه نمودن ۳-۲ قطره لاکتوفنل پلی ونیل به روی لام مقدار ۲۰ µl از پروتواســکولکس‌های ورتکس شده را به روی لام قرار داده و با اســتفاده از لبه لام دیگری و با حرکت دورانی، اقدام به جداســازی قلاب‌های پروتواسکولکس گردید (۱۷). سپس لامل را با فشار به روی لام قــرار داده و از هر نمونه به تعداد ۵ عدد لام تهیه شــد. 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 (نســخه ۴) با واحد میکرو متر و با بزرگنمایی ۱۰۰۰X انجام گرفــت. به منظور جمع‌آوری اندازه قلاب‌ها از هر نمونه، طول کامل قلاب (TL) ، طــول تیغه (BL)، طول دســته (HL) و نســبت طــول تیغه به طول کلــی BL/TL قلاب‌های بــزرگ و کوچک اندازه‌گیری شــدند (۱۷). نتایج اندازه‌گیــری قلاب‌ها با نتایج ســایر مطالعات با اســتفاده از آزمون t-test مقایسه شد.

بررسی مولکولی: در مطالعه حاضر قسمتی از ژن سیتوکروم اکسیداز۱ از پروتواســکولکس مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور اســتخراج DNA، پروتواسکولکس‌ها با (PBS (۷/۲ pH شستشو شدند و مقدار ۱۰۰µl از آن‌ها در میکروتیوب ریخته شد. استخراج DNA از پروتواسکولکس‌ها با استفاده از کیت اســتخراج (MBST، ایران) DNA و طبق دســتورالعمل شــرکت ســازنده، انجام شد و DNA استخراج شده در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. به منظور مقایسه تفریقی سویه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس قطعه‌ای به طول ۴۴۰bp از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ با استفاده از پرایمرهای J۳و J۴/۵ (پرایمرهای یونیورسال) تکثیر شد. در این مطالعه از پرایمرهای یونیورسال (پرایمر بالا دست به نام J۳و پرایمر پایین دست به نام J۴/۵) به منظور تعیین سویه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس، استفاده گردید (۱۷). توالی پرایمرها عبارتست از:

Forward-J۳ ۳' (TTTTTTGGCCATCCTGAGGTTTAT) ۵' و Reverse-J۴/۵ ۳' (AACGACATAACATAATGAAAATG) ۵'.

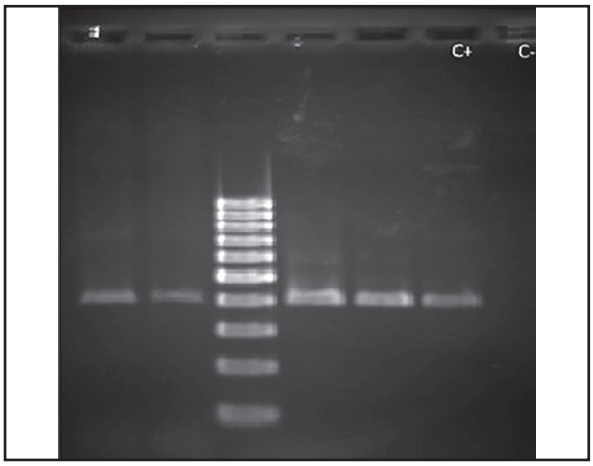
شرایط دمایی و زمانی ترموسایکلر جهت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شــامل مراحــل ذیل بود: واسرشــت اولیه : ۹۴°C به مــدت ۵ دقیقه و ۳۸ سیکل شامل واسرشــت : ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه اتصال: ۵۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر: ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و ســیکل تکثیر نهایی: ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. سپس محصول واکنش PCR در ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قــرار گرفت. در ایــن طرح جهت خالص ســازی 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 بازســازی توالی‌های تعیین شــده از نرم افــزار CLC Free W orkbench و برای مطالعه شجره‌شناســی و بررسی تکامل مولکولی از نرم افزار MEGA۵ با استفاده از مدل Neighbor-Joining با آزمون ریشــه‌ای Boot Strap ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. در مطالعه شجره شناسی از توالی جدایه‌های مرجع جدایه‌های کشورهای همسایه و همچنین جدایه‌های ایرانی که دربانک ژن در دسترس هستند استفاده شــد. توالی‌های بدست آمده در بانک ژن ثبت گردید و شماره‌های دسترسی جهانی به آن‌ها اختصاص یافت.

نتایج

نتایــج ریخت شناســی: از تعداد ۲۸ نمونه مورد بررســی، قلاب‌های پروتواســکولکس‌ها مشخصات شبیه به هم داشــته و از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (p>۰/۰۵) (جدول ۱،۲). در مطالعه حاضر نحوه قــرار گرفتــن قلاب‌های بزرگ و کوچک به صورت یک در میان و ســطح خارجی قلاب‌ها صاف و هموار بود.

نتایج بررسی مولکولی: به منظور مطالعه مولکولی از ژنوم میتوکندریایی ســیتوکروم اکســیداز ۱ (CO۱) برای شناسایی ســویه‌های اکینوکوکوس گرانولــوزوس در خرم‌آباد اســتفاده شــد. طبق نتایج بدســت آمــده اندازه قطعــه CO۱ تکثیر یافته ۴۴۰bp بود (تصویــر۱). در الگوهای الکتروفورز تفاوتی مشاهده نشــد. تمام نمونه‌ها تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی نشــان می‌دهد که تمامی نمونه‌هــا ســویه G۱ (sensu stricto) بودند. نتایج مولکولی، یافته‌های ریخت شناســی را تأیید کردند و تقریباً ۱۰۰٪ با ســویه G۱ (sensu stricto) همولوژی داشــتند. سه مورد از نتایج تعیین توالی مطالعه حاضر در بانک جهانی ژن با شــماره دستیابی KT۲۱۶۲۶۲ و KT۲۱۶۲۶۳ و KT۲۱۶۲۶۴ در دسترس است.

مقایســه درخت فیلوژنی مطالعه حاضر با سایر مطالعات نشان می‌دهد که در مطالعه حاضرتمام ســویه‌های G۱ در یک کلاد قرار دارند. شــباهت G۱ با G۳ در حدود ۹۱ ٪ است. این شباهت در بعضی از توالی‌های موجود در بانک ژن با شــماره دستیابی DQ۸۵۶۴۶۶/۱ و JX۸۷۸۶۹۲/۱ به حدود بیش از ۹۱٪ نیز می‌رسد که باعث می‌شود در درخت شجره شناسی دو مورد



تصویر ۱. نتیجه الکتروفورز محصول PCR تخلیص شده به اندازه ۴۴۰bp 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 (۸/۰۲-۱۰/۳)	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)

ازتوالی‌های G۳ نیز در کلاد G۱ 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوانات است که ناشی از مرحله لاروی اکینوکوکوس گرانولوزوس بوده که هنوز هم یکی از عوامل مهم ایجاد کننده معضلات اقتصادی و بهداشتی در نواحی مختلف ایران و جهان است (۱۰). استان لرستان با مساحتی بالغ بر ۲۸۰۶۴ km^2 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس در این منطقه فراهم گردد، لذا آلودگی در این منطقه از شیوع نسبتاً بالایی برخوردار است (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 اکینوکوکوس گرانولوزوس با منشأ کیست هیداتید گاو در شهرستان خرم‌آباد در استان لرستان است.

براساس 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٪ ازسگ‌های گله و ۶/۶۷٪ روباه قرمز به اکینوکوکوس گرانولوزوس آلوده‌اند و در کشتارگاه‌های خرم‌آباد، دلفان و سلسله در استان لرستان ازمجموع ۱۹۶۸ رأس گاو ۵۵/۹۴٪ و از مجموع ۶۸۷۹ رأس گوسفند ۲۵/۲۹٪ به کیست هیداتید آلوده بودند (۴). بطوریکه براساس اطلاعات داده شده از سازمان دامپزشکی استان از مجموع ۱۶۷۶۷۱ رأس گوسفند و ۵۲۷۳۸ رأس گاو کشتار شده در کشتارگاه خرم‌آباد در طی سال۱۳۹۱ میزان آلودگی به کیست هیداتید در ریه و کبد گوسفندان به ترتیب۱۱/۷٪ و ۵٪ و میزان آلودگی در ریه و کبد گاو و گوساله به ترتیب ۲۰٪ و ۹٪ گزارش شده است. و همچنین از مجموع۱۶۰۵۸۱ 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 براساس مطالعه انجام شده براساس CO۱ و nad۱ ژنوتیپ G۱ (sensu stricto) شناسایی شد و فقط یک جدایه گوسفندی بعنوان ژنوتیپ G۲ و یک جدایه گاوی بعنوان ژنوتیپ G۵ گزارش گردید (۳۱). در مطالعه‌ای که توسط Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۳ برای شناسایی سویه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس در گوسفند، گاو و شتر در شمال هند صورت گرفت، منجر به شناسایی سویه‌های G۱ (sensu stricto)، G۳،G۵ و G۶ در این منطقه شد (۲۴). در این مطالعه ۵۳/۱٪ از جدایه‌ها سویه G۳ و ۴۰/۶۲٪ از جدایه‌ها سویه G۱ (sensu stricto) بود و تنها یک جدایه گاوی بعنوان ژنوتیپ G۵ و یک جدایه هم بعنوان ژنوتیپ G۶ معرفی شدند

جدول ۲. مقایسه نتایج اندازه‌گیری قلاب‌های 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 همکاران۱۹۸۴)	گاو (خرم‌آباد) (مطالعه حاضر)	گوسفند (Thompson و همکاران۱۹۸۴)	گوسفند (اسلامی وحسینی ۱۹۹۸)
طول کلی قلاب بزرگ (LTL)	۲۸/۹ ±۱/۲ µ (۲۶-۳۲)	۲۵/۴±۱/۸ µ (۲۳/۸-۲۷/۱)	۲۵/۰۱ ± ۱/۱ µ (۲۲-۲۷/۵)	۲۳/۲۸ ± ۲/۸۶ µ (۲۱/۴-۲۴/۸)
طول تیغه قلاب بزرگ (LBL)	۱۴±۰/۶ µ (۱۳-۱۵/۵)	۱۲/۳± ۲/۲ µ (۱۰/۴-۱۴/۵)	۱۲/۴±۱/۲ µ (۹-۱۴)	۱۱/۳۷±۰/۸۳ µ (۱۰/۱-۱۳/۵)
LBL/LTL	۵۰±۲/۲ µ (۴۵/۵-۵۵/۵)	۴۸/۹± ۶/۶ µ (۴۳/۷-۵۳/۵)	۴۹/۴± ۴/۵ µ (۳۷-۵۸)	۵۰/۵±۲/۳ µ (۴۲/۱-۵۴/۵)
طول کلی قلاب کوچک (STL)	۲۴ /۸ ± ۱/۳ µ (۲۲-۲۹)	۲۰/۶ ±۱/۲ µ (۱۹/۷-۲۱/۵)	۲۱/۴±۱/۵ µ (۱۹-۲۵/۶)	۱۸/۱ ±۱ µ (۱۶/۹-۲۰/۳)
طول تیغه قلاب کوچک (SBL)	۱۰/۴ ±۰/۶ µ (۸/۹-۱۱)	۸/۷±۲ µ (۷/۲-۹/۹)	۸/۵±۰/۹ µ (۷-۱۰)	۷/۴۴ ±۰/۷۸ µ (۶/۷-۹)
SBL/STL	۴۱/۸ ± ۲/۲ (۳۴/۱-۴۵/۸)	۴۰/۷ ±۰/۲ (۳۳/۲-۴۷/۹)	۴۰/۶ ± ۳/۵ (۳۰-۴۸)	۴۰/۶۴ ±۳/۳ (۳۳/۳-۴۵/۲)

(۲۴). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Parreira و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور پرتغال صورت گرفت برای اولین بار ژنوتیپ G۷ 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 اکسیداز۱ از الگوی بدست آمده از هضم آنزیمی محصولات واکنش زنجیره پلی‌مراز، در اکثر جدایه‌ها، سویه‌های G۱ (sensu stricto) وG۳ گزارش شد، اما در یکی از جدایه‌های گاوی سویه G۷ شناسایی شد (۱۳). Parsa و همکاران در سال ۲۰۱۲ با جمع آوری ۷۱ کیست از گوسفند، گاو و گاومیش در غرب ایران با استفاده از ژن CO۱ و nad۱ موفق به شناسایی دو ژنوتیپ شدند بطوریکه ۷۵ ٪ نمونه‌ها G۱ (sensu stricto) و ۱۵٪G۳ 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) G۱، G۳، وG۶ در گوسفند، گاو و شتر شناسایی شدند (۱۹). در مطالعه Pestechian و همکاران در سال ۲۰۱۳ تعداد ۷۱ نمونه کیست هیداتید از گوسفند، گاو و بز ازکشتارگاه خمینی‌شهر و نجف‌آباد اصفهان جمع‌آوری شد که پس از استخراج DNA و انجام PCR، از ۶۶ نمونه تعیین توالی شده، ۷۴/۲۴٪ نمونه‌ها سویه G۱ (sensu stricto) و ۲۲/۷۲٪ سویه G۳ و ۳/۰۳٪ سویه G۶ 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 ار ژن rDNA-ITS۱ و با استخراج DNA و PCR، سویه گوسفندی G۱ (sensu stricto) و سویه گاومیشG۳ 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 ایمنی بالا در گاو و ایمنی ضعیف درگوسفند است (۹،۲۸). این در حالی است که نتایج مطالعه حاضر، 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 اکینوکوک آلوده می‌شوند لذا به همین دلیل در گاوها هم سویه G۱ (sensu stricto) شناسایی شده است. شاید اگر کیست‌ها به سویه گاوی (G۵) آلوده بودند باروری کمتری داشتند. این مسئله با توجه به شرایط اکولوژی و اقلیمی منطقه لرستان که شرایط جهت رشد اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس 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 قاطعیت اعلام نمود که اکینوکوکوس گرانولوزوس سگ- گوسفندی در خرم آباد سویه مشخصی است و شبیه سویه گوسفندی متداول در ایران است بنابراین تکرار همان سویه در بخشی از ایران است. همچنین مقایسه شاخص‌های مختلف قلاب (طول کلی- طول تیغه- نسبت طول تیغه به طول کلی) نشان داد که بین سویه گوسفندی در خرم آباد 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس در جزیره تاسمانیا متفاوت است، لازم به ذکر

است که سویه اکینوکوکوس گرانولوزوس جدایه گوسفند تاسمانیا با سویه این انگل در سرزمین استرالیا و نقاط دیگر جهان نیز تفاوت دارد (۲۹). این مطالعه می‌تواند نتایج قبلی (۲۲) مبنی بر غالب بودن سـویه گوسـفندی را در ایـران تأیید کند. با توجه به درصد بالای آلودگی گاوهای این منطقه به نظر می‌رسـد که در منطقه خرم‌آباد گاوها بیشـتر با سویه گوسفندی آلوده می‌شوند. وجود سویه گوسفندی در گاوها و گوسفندان خرم‌آباد نشان می‌دهد که احتمالاً گوسفندها و گاوها در این منطقه از یک منشأ به اکینوکوکوس گرانولوزوس آلوده می‌شوند و می‌تواند به دلیل رواج دامپروری سنتی در این منطقه باشد بطوریکه گاو و گوسفند از یک چراگاه آلوده می‌شوند. بنابراین با توجه به درصد بالای آلودگی گاوهای این منطقه باید به این حیوان بعنوان مخزن اکینوکوک توجه ویژه‌ای شود.

تشکر وقدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند تا مراتب قدردانی خود را خدمت استاد ارجمند جناب آقای دکتر سـید حسین حسـینی ابراز نمایند که در اجرای این تحقیق از دانش و تجربه‌های ارزشـمند ایشـان بهره بردند. هم چنین ازمعاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که انجام این مطالعه را یاری نمودند تشـکر وقدردانی می‌نمایند. این پایان نامه با حمایت مالی دانشگاه لرستان انجام گرفت.

References

1. Ahmadi, N., Dalimi, A. (2006) Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Genet Evol. 6: 85-90.
2. 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.
3. Bart, J.M., Morariu, S., Knapp, J., Ilie, M.S., Pitulescu, M., Anghel, A., Cosoroaba, I., Piar- roux, R. (2006) Genetic typing of Echinococcus granulosusin Romania. Parasitol Res. 98: 130-137.
4. 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.
5. Dousti, M., Abdi, J., Bakhtiyari, S., Mohebali, 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.
6. Fasihi Harandi, M., Hobbs, R.P., Adams, P.J., Mobedi, I., Morgan-Ryan, U.M., Thomp- son, R.C.A. (2002) Molecular and morphological characterization of Echinococcus granulosus of human and animal origin in Iran. Parasitol. 125: 367-37.
7. Hobbs, R.P., Lymbery, A.J., Thompson, R.C.A. (1990) Rostellar hook morphology of Echinococcus grnulosus from nutural and Experimental Australian host and its implicationsfor strain recognition. Parasitol. 101: 251-273.
8. 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.
9. 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.
10. Kumaratilake, L.M., Thompson, R.C.A., Dunsmore, D.J. (1983) Comparative strobilar development of Echinococcus granulosus of sheep origin from different in vivo and vitro. Int J Parasitol. 13: 151-160.
11. 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.
12. Nayebzadeh, H., Tarrahi, M.J., Aryan, A., Nayebaghayi, S.M. (2013) Epidemiology of human hydatid cyst surgery in the province Lorestan during the years 2004- 2011. J Zoonozes Res. 1: 48-55.
13. Parreira, R., Roque,C., Gonçalves, M., Silva, L., Maurelli, M.P., Cringoli, G., Grácio, M.A. (2013) *Echinococcusgranulosus* in Portugal: the first report of the G7 genotype in cattle. Vet Parasitol. 198: 235-9.
14. 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 producting 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., Hosseine, 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 negleted 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., Mohebali, 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 *Echinococcusgranulosus* 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 hydatidcyct 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 Echinococcos 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., Elissondo, 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 granulosusin 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]

[1]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran*
[2]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran*
[3]*Department 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 *Echinococcusgranulosus*, thereby playing a role in exacerbating the economic and health problems in Iran. **OBJECTIVES:** This study was conducted to investigate the strains of *Echinococcusgranulosus* 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

Figure1. 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**