١٤٩٧٥٥

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی پزشکی

عنوان :

شناسایی ژنوتایپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس درگوسفند ، بز، گاو و شتر درشهرستان کرمان

توسط : الهام حاجی علیلو

استاد راهنما : دکتر مجید فصیحی هرندی

استاد مشاور : دکتر ناصر ضیاءعلی

۱۳۸۹/۱۰/۱۲

سال تحصیلی ۸۹-۱۳۸۸

۱۴۹۷۵۵

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
IRANDOC
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

بسمه تعالی

تاریخ:.....

شماره:.....

پیوست:.....

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی کارشناسی ارشد خانم الهام حاجی علیلو دانشجوی رشته انگل شناسی تحت عنوان:

بررسی ژنوتایپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس درگوسفند ،بز،گاو وشتر در شهرستان کرمان در ساعت۹روز شنبه مورخ

۸۹/۴/۱۲ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از :

سمت	نام و نام خانوادگی	امضاء
الف: استاد راهنما :	جناب آقای دکتر مجید فصیحی هرندی	
ب: استاد مشاور:	جناب آقای دکتر ناصر ضیاء علی	
ج : عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر ایرج شریفی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر غلامعباس محمدی	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	خانم فاطمه میرزایی	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه .....عالی.....و نمره.....نوزده.....مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی افضلی پور

PG12

تقدیر و سپاس

سپاس خداوند منان را که توفیق داد تا این مرحله از تحصیل را با موفقیت پشت سر بگذارم

دنیا چیزهای زیادی برای ارائه کردن دارد. هر زمان که کار جدیدی را آزمایش می کنید خودتان را بیشتر می شناسید.

تقدیم به

پدر و مادر عزیز و دلسوزم که حامی من در تمام مراحل زندگی بوده اند

به همسر عزیزم که مایه دلگرمی من در طول این دوره بود و تحمل مشکلات را برایم آسان کرد

تقدیم به خواهران خوبم که همیشه دوست و همراه من بوده اند و مادر بزرگ عزیزم که دعایش همیشه بدرقه راهم بود

باسپاس فراوان از

استادار جمند جناب آقای دکتر فصیحی هرندی که همواره مشوق من بوده وبار اهنمایی بی دریغشان مرایاری نمودند

باتشکر ازمدیر محترم گروه انگل شناسی جناب آقای دکتر شریفی و استادمشاور محترم جناب آقای دکتر ضیاء علی

باتشکر از اساتید محترم گروه: آقایان دکتر امین آیت اللهی موسوی، دکتر محمد احمدی نژاد، دکتر ناصر عرب، دکتر احمد خسروی

باتشکر از همکلاسیانم و دانشجویان محترم گروه

با تشکر از پرسنل محترم گروه انگل شناسی و مرکز تحقیقات لیشمانیوز

آقایان : ، حسین کامیابی، حسین آقاسی کرمانی، مهدی زارعان

خانم ها: حکیمی، احمدی نژاد، خالقی، کمالی، حصیبی

چکیده :

مقدمه و هدف: اکینوکوکوس گرانولوزوس کوچکترین کرم نواری با اهمیت درپزشکی است. اکینوکوکوزیس کیستی دارای بار اقتصادی و پزشکی قابل توجهی است که مهم ترین آن هزینه بیماری ، درمان وجراحی افراد آلوده است. بعلاوه آلودگی دام ها از نظر اقتصادی و بهداشتی حائز اهمیت بسیار است. اکینوکوکوس گرانولوزوس گونه ای با تنوع ژنتیکی قابل توجه است وجود تنوع ژنتیکی درانگل اپیدمیولوژی وکنترل ودرمان کیست هیداتید را تحت تاثیر قرار می دهد. بر اساس انالیز DNA برای انگل ۱۰ استرین یا ژنوتیپ (G1-G10) تعریف شده است که هرکدام با یک میزبان خاص سازگاری بیشتر پیدا کرده اند و به درجات متفاوت انسان را نیز آلوده می کنند. هدف از این مطالعه بررسی ژنوتایپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس در دام های جنوب شرق ایران با استفاده از توالی دو ناحیه ژنی میتوکندری *cox1* و *nad1* است.

مواد وروش‌ها: ۵۹ ایزوله از کیست هیداتید شامل ۳۵ ایزوله گوسفندی، ۳ بزی، ۱۱ گاوی ، ۹ شتری و یک ایزوله انسانی جمع آوری شد. بررسی مرفومتری با اندازه‌گیری طول قلاب های بزرگ و کوچک پروتواسکالکسها انجام گرفت. نواحی ژنوم میتوکندری *cox1* و *nad1* با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفته و۳۸ ایزوله نیز در این دو ناحیه ژنی توالی یابی شدند. با استفاده از روش Bayesian Inference و نرم افزار MrBayes v.3.1.2 آنالیز فیلوژنی انجام و میزان تشابه ژنوتایپ های حاصله از توالی یابی در مقایسه با ژنوتایپ های مرجع انگل در درخت فیلوژنتیک رسم گردید.

یافته‌ها: در دندروگرام حاصل ، ایزوله های مورد بررسی در سه کلاستر مجزای G1,G3,G6 در کنار ژنوتایپ های رفرنس قرار گرفتند. نتایج توالی یابی نشان داد ژنوتایپ های G1 (۷۳/۷٪) و G3 (۱۳/۲٪) و G6 (۱۳/۱٪) در بین ایزوله ها وجود دارد. G1 در ۸۶/۷٪ از ایزوله‌های گوسفندی، ۹۰٪ گاوی، ۴۴/۴٪ شتری و در تمامی ایزوله های بزی و G3 در ۶/۷٪ از ایزوله‌های گوسفندی، ۲۰٪گاوی و ۲۲/۲٪ ایزله‌های شتری و G6 نیز در ۶/۷٪ از ایزوله گوسفندی و ۳۳/۳٪ از ایزوله شتری یافت شد . تنها ایزوله انسانی این پژوهش به عنوان استرین شتری (*G6*) شناسایی گردید.

نتیجه گیری: این پژوهش نشان داد G1 ژنوتایپ غالب در نمونه های جنوب شرق کشور است و وجود سه ژنوتایپ G1,G3,G6 را در منطقه نشان داد همچنین این پژوهش برای اولین بار وجود ژنوتایپ G3 را در میزبان های گوسفند و گاو در ایران نشان داد.

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

چکیده ..... الف

فهرست جداول ..... ج

فهرست تصاویر و نمودارها ..... ح

فصل اول : مقدمه و اهداف

۱-۱- مقدمه بیان مسئله و ضرورت‌موضوع ۲

۱-۲- هداف اصلی ۵

۱-۳- اهداف فرعی ۵

۱-۴- اهداف کاربردی ۵

۱-۵- فرضیات و سئوالات تحقیق ۵

فصل دوم : بررسی متون

۲-۱- اکینوکوکوس ۷

۲-۲- گونه‌های اکینوکوکوس ۸

۲-۳- اکینوکوکوس گرانولوزوس ۹

۲-۴- چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس ۱۰

۲-۵- طرق انتقال ۱۲

۲-۶- بیماری هیداتید ۱۲

۲-۷- تنوع درون گونه ای وژنوتایپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس ۱۵

۲-۸- نواحی ژنی مورد مطالعه اکینوکوکوس گرانولوزوس ۱۸

۲-۹- روش های شناسایی ژنوتایپ‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس ۱۸
۲-۱۰- انواع PCR ۱۸
۲-۱۱- اپیدمیولوژی ۲۱
۲-۱۲- تشخیص ۲۳
۲-۱۳- درمان ۲۴
۲-۱۴- پیشگیری وکنترل ۲۵
۲-۱۵- مطالعات مولکولی انجام شده در دنیا جهت شناسایی ژنوتایپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس به تفکیک روش، نواحی ژنی مورد استفاده و ژنوتایپ های یافت شده در شش سال اخیر ۲۷

فصل سوم : مواد و روش ها

۳-۱- جمع آوری نمونه ها ۳۱
۳-۲- جمع آوری پروتواسکولکس ها ۳۱
۳-۳- بررسی مورفولوژی ۳۱
۳-۴- بررسی مولکولی ۳۲
۳-۴-۱- استخراج DNA ۳۲
۳-۴-۲- طریقه محاسبه نسبت ها وحجم مورد نیاز PCR ۳۴
۳-۴-۳- پرایمر ۳۵
۳-۴-۴- آماده سازی پرایمر ها برای ناحیه ژنی *cox1* ۳۵
۳-۴-۵- آماده سازی پرایمر ها برای ناحیه ژنی *nad1* ۳۷
۳-۴-۷- الکتروفورز محصول PCR ۳۹
۳-۵- انجام توالی یابی و آنالیزسکانس DNA ۳۹
۳-۶- ردیف سازی توالی ها ۴۰

۳-۷- آنالیز فیلوژنتیک ۴۰

۳-۸- آنالیز آماری ۴۰

۳-۹- مشکلات حین انجام کار ۴۰

فصل چهارم :یافته ها

۴-۱- نتایج تعداد نمونه های جمع آوری شده..... ۴۲

۴-۲- نتایج بررسی مورفومتری..... ۴۳

۴-۲-۱- نتایج اندازه گیری و محاسبه قلاب های رستلومی پروتواسکالکس‌ها در کیست های بارور..... ۴۳

۴-۳- نتایج بررسی مولکولی..... ۴۵

۴-۳-۱- نتایج PCR ۴۵

۴-۳-۲- نتایج تعیین توالی ۴۷

۴-۴- مقایسه نتایج تعیین توالی با بررسی مورفومتری ایزوله ها ۴۷

۴-۵- آنالیز فیلوژنی ایزوله ها ۵۶

۴-۶- نتایج الاین دوتائی سکانس ایزوله های G3 با ژنوتایپ های رفرنس مرجع در بانک ژنی ۶۳

۴-۷- نتایج الاین دوتائی با ژنوتایپ G1 رفرنس در بانک ژنی ۶۳

۴-۸- نتایج الاین دوتائی با ژنوتایپ G3 رفرنس در بانک ژنی ۶۶

فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

۵-۱- بحث و نتیجه گیری ۷۱

۵-۲- پیشنهادات..... ۷۹

فهرست منابع..... ۸۰

چکیده انگلیسی ۹۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۲: ژنوتایپ های شناخته شده در اکینوکوکوس گرانولوزوس به تفکیک میزبان و نام گونه های پیشنهادی..... ۱۵

جدول ۲- ۲ : مطالعات مولکولی انجام شده در دنیا..... ۲۷

جدول ۳ - ۲ : فهرست مطالعات مولکولی انجام شده در ایران جهت شناسایی ژنوتایپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس به تفکیک روش، نواحی ژنی مورد استفاده و ژنوتایپ های یافت شده..... ۲۸

جدول ۱-۳: تهیه PCR Master Mix برای ناحیه ژنی *cox1*..... ۳۶

جدول ۲-۳: تهیه PCR Master Mix برای ناحیه ژنی *nad1*..... ۳۸

جدول ۱- ۴ : فراوانی نمونه های کیست هیداتید جمع آوری شده در این بررسی به تفکیک میزبان..... ۴۲

جدول ۲- ۴ : نتایج اندازه گیری طول قلاب های بزرگ و کوچک پروتواسکولکس های ایزوله های انسانی و حیوانی به تفکیک میزبان ۴۳

جدول ۳-۴- نتایج آزمون آماری (Kruskal-Wallis)و مقایسه طول کل قلاب های کوچک و بزرگ بر حسب ژنوتایپ انگل ۴۴

جدول ۴-۴ : توزیع ژنوتایپ های ایزوله های مختلف اکینوکوکوس گرانولوزوس در نواحی ژنی *cox1* و *nad1* بر حسب میزبان به روش توالی یابی..... ۴۷

جدول ۵-۴: شماره ثبت ژن *cox1* ژنوتایپ های مرجع اکینوکوکوس گرانولوزوس(s.l) ۶۰

جدول ۶-۴: شماره ثبت ژن *nad1* ژنوتایپ های مرجع اکینوکوکوس گرانولوزوس(s.l) ۶۰

جدول ۷-۴: شماره های ثبت ژنی نواحی ژنی *cox1* و *nad1* در بانک ژن NCBI..... ۶۱

فهرست تصاویر و نمودارها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۲: کیست هیداتید و لایه های آن ۸

شکل ۲-۲: کرم بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس ۹

شکل ۳-۲: چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس ۱۱

شکل ۴-۲: درخت فیلوژنی ناحیه ژنی هسته و میتوکندری ۱۷

شکل ۵-۲: انتشار جغرافیایی اکینوکوکوس گرانولوزوس ۲۳

شکل ۱-۳: قلاب های پروتواسکولکس ۳۱

شکل ۱-۴: تصویر کبد گوسفند آلوده به کیست هیداتید جمع اوری شده از کشتارگاه کرمان ۴۲

شکل ۲-۴: پروتواسکولکس های اکینوکوکوس گرانولوزوس ۴۳

شکل ۳-۴ : نمای ژل الکتروفورز محصول PCR ناحیه ژنی *cox1* (حدود ۴۰۰ bp) ایزوله های اکینوکوکوس گرانولوزوس حیوانی ۴۵

شکل ۴-۴ : نمای ژل الکتروفورز محصول PCR ناحیه ژنی *nad1* (حدود ۵۰۰ bp) ایزوله های اکینوکوکوس گرانولوزوس حیوانی ۴۶

شکل ۵-۴ : نمای ردیف‌سازی سکانس نواحی ژنی *cox1* و *nad1* از ایزوله‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس کرمان با توجه به توالی ژنوتایپ‌های رفرنس در بانک ژن NCBI (از ژنوتایپ G1-G3 و G6-G7) ۵۵

نمودار ۱-۴: توزیع ژنوتایپ ها بر حسب اندازه طول قلاب های بزرگ و کوچک ۵۶

شکل ۶-۴ : درخت فیلوژنی (دندروگرام) حاصل از آنالیز سکانس های ناحیه ژنی *cox1* ایزوله های حیوانی اکینوکوکوس گرانولوزوس در مقایسه با سکانس های رفرنس در بانک ژنی ۵۷

شکل ۷-۴ : درخت فیلوژنی (دندروگرام) حاصل از آنالیز سکانس های ناحیه ژنی *nad1* ایزوله های حیوانی اکینوکوکوس گرانولوزوس در مقایسه با سکانس های رفرنس در بانک ژنی ۵۸

شکل ۸-۴ : درخت فیلوژنی (دندروگرام) حاصل از آنالیز ترکیب سکانس های ناحیه ژنی *cox1* و *nad1* ایزوله های حیوانی اکینوکوکوس گرانولوزوس در مقایسه با سکانس های رفرنس در بانک ژنی..... ۵۹

شکل ۸-۴: نمونه ای از کروماتوگرام سکانس های ناحیه ژنی *cox1* ایزوله های اکینوکوکوس گرانولوزوس در شهرستان کرمان..... ۶۲

شکل ۹-۴: نمونه ای از کروماتوگرام سکانس های ناحیه ژنی *nad1* ایزوله های اکینوکوکوس گرانولوزوس در شهرستان کرمان..... ۶۲

فهرست علائم اختصاری

Abbreviations	
DNA	Deoxyribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
Cox1	Cytochrome C Oxidase subunit 1
Nad1	NADH dehydrogenase
WHO	World Health Organization
bp	Base Pair
Taq	*Thermus aquaticus*
rDNA	ribosomal DNA
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1
EF-la	Elongation Factor 1 Alfa
hbx2	homebox gene ribosomal
acII	actinII ribosomal
mdh	malate dehydrogenase
Cob	cytochrome b
dNTP	deoxyriboNucleotide Triphosphate
EDTA	Ethylen Diamine Tetra Acetic acid
Pmol	Picomole
mM	milliMolar
T_M	melting Temperature
gr	gram
mg/ml	Milligram/milliliter
ml	milliliter
F	Forward
R	Reverse

فصل اول

مقدمه و اهداف

۱-۱- مقدمه، بیان مسئله وضرورت موضوع :

اکینوکوکوزیس یک بیماری زئونوز انسان و علفخواران اهلی و وحشی باانتشارجهانی است که بوسیله مرحله لاروی سستودهای متعلق به جنس اکینوکوکوس ایجادمی شود. از چهار گونه موجود دوگونه مهم آن ازنظرپزشکی اکینوکوکوس گرانولوزوس(*Echinococcus granulosus*) واکینوکوکوس مولتی لکولاریس(*Echinococcus multilocularis*) است. اکینوکوکوس گرانولوزوس باعث اکینوکوکوزیس کیستی (Cystic Echinococcosis) یا کیست (بیماری) هیداتید می شود(Eckert *et al.*, 2001).

میزبان نهائی این انگل سگ وسگ سانان ومیزبان واسط شامل طیف وسیعی ازپستانداران ازجمله گوسفند ، بز ، گاو ، شتر ، خوک ، تک سمی‌ها و سایر علفخواران وحشی می باشد. انسان نیز یک میزبان واسط اتفاقی برای انگل محسوب میگردد(Garcia *et al.*, 2007) اکینوکوکوزیس کیستی دارای اثرات اقتصادی و پزشکی قابل توجهی است که مهمترین آن هزینه بیماری ، درمان وجراحی افراد آلوده است. بعلاوه آلودگی دام ها از نظر اقتصادی و بهداشتی حائز اهمیت بسیار است. از این رو سازمان جهانی بهداشت از برنامه‌های کنترل وپیشگیری بیماری هیداتید حمایت و پشتیبانی می نماید(Torgerson, 2003; Craig *et al.*, 2007).

اکینوکوکوزیس کیستی شیوع بالایی درکشورهای خاورمیانه و منطقه مدیترانه دارد(Sadjjadi, 2006). شیوع انگل درایران دربین سگ های گله ۳/۳ تا ۶۳/۳٪ گزارش شده است(Eslami & Hosseini, 1998). بررسی های مختلف حاکی ازوجوداکینوکوکوزیس کیستی در گوسفند ،شتر ،گاو و بز درسراسرکشوراست(Dalimi *et al.*, 2002). ایران ازنظربیماری کیست هیداتید اندمیک بوده وموارداانسانی همواره ازمراکزدرمانی در مناطق مختلف کشورگزارش می شود و لذا این بیماری یک مشکل بزرگ بهداشتی واقتصادی در کشور می باشد(Sadjjadi *et al.*, 2001).

اکینوکوکوس گرانولوزوس گونه ای با تنوع ژنتیکی قابل توجه است وشناسائی وسعت واهمیت این تنوع از نظر طراحی و تولید واکسن وتاثیر داروها برانگل وشناسائی جهش هابطوردقیق وترسیم دقیق میزبان و محدوده جغرافیائی آن اهمیت قابل ملاحظه ای دارد. همچنین وجود تنوع ژنتیکی درانگل اپیدمیولوژی وکنترل ودرمان کیست هیداتید راتحت تاثیر قرار می دهد(McManus & Thompson, 2004; Thompson, 2008).

مطالعات مولکولی یک تصویرکلی از استرین ها را مشخص نموده است. بر اساس آنالیز DNA برای انگل ۱۰ استرین یا ژنوتیپ (G1-G10)تعریف شده است که هرکدام با یک میزبان خاص سازگاری بیشتر پیدا کرده اند و به درجات متفاوت انسان را نیز آلوده می کنند.استرین های گوسفندی G1 , گوسفند تاسمانی G2 , بوفالو G3 , اسبیG4 , گاویG5 , شتریG6 , خوکیG7 , گوزنیG8,G10 و شیرG9 تاکنون شناسائی وتعریف شده اند(Thompson, 2008). مطالعات مولکولی مشخص کرده که استرین های مختلف بیماری زائی ودوره پیش آشکاری متفاوت دارند لذا شناسائی ژنوتایپ های انگل دربرنامه ریزی های کنترل هیداتید ودرمان

داروی میزبان نهائی حائز اهمیت فراوان است(Thompson & McManus, 2002). ژنوتیپ های اکینوکوکوس با بررسی ژن های مختلف هسته ومیتوکندری شناسائی می شوند. یک واحد تکرارشونده از DNA ریبوزومی بنام توالی ITS1 برای طبقه بندی و تعیین ژنوتیپ ها مکررا بکاربرده شده است. DNA میتوکندری نیز به همین منظور استفاده شده است (توالی ژنی CO1 سیتوکرم اکسیدازو NADH: NAD1 دهیدروژناز). mtDNA بصورت هاپلوئید وجودداشته والل های هاپلوئیدآن بخوبی شناخته شده اندودرآن نوترکیبی کمتری اتفاق افتاده است ازاینرو انالیزآن اسان می باشد(McManus, 2002).

مطالعات مختلف در سالهای اخیر در این زمینه دردنیا انجام شده است. درجنوب شیلی در سال۲۰۰۸ شناسائی ژنوتیپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس بااستفاده از روش PCR وبررسی ژنوم CO1 انجام شد. که درآن ازکیست های انسانی استفاده شدواسترین های G1و G6وG7 انسان را آلوده کرده بودند(Manterola *et al.*, 2008). انگل در کشورهای افریقای وفوربالائی دارد واخیرادرقبایل ترکانادرسودان بررسی انجام شده نشان داده که حداقل پنج ژنوتیپ انسان را آلوده می کند که بیشترین موارد انسانی بوسیله استرین G1,G6 می باشد واسترین های G4,G5,G9 نیز در افریقا مشخص شده است(Magambo *et al.*, 2006). درشرق ترکیه سال۲۰۰۸ برروی ۲۰۰ نمونه دامی بررسی انجام شدبااستفاده ازروش PCR-RFLP که ازقطعه ITS1 وتوالی CO1 انجام شد که نشان داد ژنوتیپ غالب G1 گوسفندی است که انسان وبزوگاووشتر را آلوده می کند(**Utuk *et al.*, 2008**). درآرژانتین ، الجزایر ، رومانی و برزیل سال۲۰۰۸ بااستفاده ازتعیین ژن میتوکندری وویژگی های بیولوژکی ومارکرهای هسته وبه روش SSCP -PCR بررسی انجام شدکه چهارتوالی میتوکندری ازاسترین های /G1/G2/G5/G6/ G7 تعیین شد که انسان با استرین های G1,G2,G6 آلوده بود(Badaraco *et al.*, 2008) . دراسترالیا سال ۲۰۰۸ بااستفاده ازPCR وتعیین توالی ND1 برروی ۷۶ بیمارمبتلا به کیست بررسی شد که ۳۸ بیمار مبتلا به استرین G1 بودندوبیماران با استرین G6 نیزآلوده بودند(Schneider *et al.*, 2008). درآرژانتین سال ۲۰۰۶بررسی مولکولی روش PCR -RFLP برروی توالی CO1 میتوکندری وتوالیITS1 ریبوزومی انجام شد که بیش از همه استرین G1 در بین کیست های بدست آمده از گوسفند مشاهده شد(Zanini *et al.*, 2006). سال ۲۰۰۳ درالجزایردر شمال افریقا مطالعه ای بااستفاده از توالی ND1,CD1 انجام گردیدکه استرین G1 درانسان وگاووگوسفندشناسائی گردید ودرجنوب منطقه G6 وG1 درشتروگوسفند مشخص شد(Bardonnet *et al.*, 2003)وبررسی درسال ۲۰۰۶ در ایتالیا بااستفاده ازروش PCR برروی ژنوم میتوکندری CO1 مطالعه ای انجام شد که از ۴۸ کیست بدست آمده ازبوفالو ۱۵نمونه مبتلا به G1 بودند وG3 در همه نمونه ها مشاهده گردید(Capuano *et al.*, 2006). ودر قرقیزستان سال۲۰۰۸ روی کرم بالغ وتخم آ ن در سگ ها بررسی شدبااستفاده از PCR که ژنوتیپ G1,G4 وترکیب G6/G7 در سگ وجودداشت(Ziadino, 2008). بررسی درسال ۲۰۰۹ در پروبااستفاده ازروش PCR برروی ژنوم میتوکندری CO1 وتوالی هسته ef1a (elongation factor1) انجام شد که ازجمع ۸۰ ایزوله انگل جمع آوری شده ازایزوله های گوسفندی، گاوی ، خوکی ، بزی وانسانی ۷۱ ایزوله sequence شد که ژنوتیپ G7 اولین بار در خوک در شهر Lima مشخص شد وG1 دربین ایزوله های گوسفندی وگاوی وانسانی وG6 در ایزوله بزی وانسانی مشاهده گردید(Moro *et al.*, 2009). مطالعات ذکر شده نشان دهنده بررسی های مختلف در بیشترنقاط دنیا می باشد که اهمیت بررسی مولکولی انگل را در هر منطقه نشان می دهد.

ازتکنولوژی DNA استفاده زیادی دربررسی انگل ها شده وروشهای مبتنی بر واکنش زنجیره پلیمراز(PCR) به علت دقت بالا کاربرد گسترده ای پیدا کرده است از جمله این روش ها : PCR-RFLP می باشد که برخی استرین های انگل را مجزا می کند و RAPD -PCR که بطورگسترده برای تعیین سریع ارتباطات ژنتیکی بین استرین ها بکار برده می شود وSSCP-PCR که موتا سیون ها رادرتوالی اسید نوکلئیک نشان می دهدودرنهایت تعیین توالی(Sequencing) که برپایه تعیین توالی های ژنتیکی در انگل بوده وابزاری قوی درتعیین واریانتهای انگل می باشد(Gasser, 1999, , 2006).

به دلیل اینکه ایران کانون اندمیک برای اکینوکوکوس گرانولوزوس می باشد و کیست هیداتیداز بیشتر نقاط کشور گزارش شده است.لزوم بررسی ژنوتیپ های انگل به روش های مولکولی منجر به انجام چند بررسی درکشور شده است. بررسی اولیه مولکولی در سال۱۹۹۸ انجام شد که بااستفاده ازمارکرهای میتوکندری ۱۶ ایزوله جمع شده ازمناطق مختلف ازگوسفندوشترو...بررسی و G1 ازتمام کیست های انسانی و گوسفندی گزارش شدوG6 درایزوله شتری تشخیص داده شد(Zhang *et al.*, 1998). دربررسی که توسط فصیحی هرندی وهمکاران سال ۲۰۰۲ در ایران انجام شد با استفاده از PCR-RFLP روی ناحیه ITS1 درDNA ریبوزومی وبررسی مورفولوژی قلابهای پروتواسکولکس های اکینوکوکوس گرانولوزوس نشان داد که G1 شایع ترین ژنوتیپ در گاو وبزوگوسفنداست و۳تاز۳۳ مورد انسانی آلوده به G6 شناسائی شدند.این اولین بار بود که ژنوتیپ G6 درانسان درمنطقه ای که سیکل انتقال انگل بین شتروسگ برقراراست تشخیص داده شد(Fasihi Harandi *et al.*, 2002). بررسی دیگری توسط جمالی درتبریزسال ۲۰۰۴ انجام شد بااستفاده از PCR-RFLPدرناحیه ITS1 نشان دادکه ایزوله های انسانی وگوسفندی وگاوی به استرین G1 آلوده بودند(Jamali *et al.*, 2004). سال ۲۰۰۷ بررسی توسط رحیمی وهمکاران بااستفاده از nested-PCR انجام گردید.که درآن از ده کیست انسانی جمع شده از بیمارستان الزهرای اصفهان بررسی شد که نتیجه آ ن طراحی یک پرایمر جدید درناحیه ITS1(rDNA) بود(Rahimi *et al.*, 2007). درسال ۲۰۰۶ بررسی توسط دلیمی انجام شد بااستفاده از PCR-RFLPوITS1 که نتیجه آن شناسائی آ لودگی ایزوله انسانی وگوسفندی به G1 ومشخص کردن G6 در شتر بود(Ahmadi & Dalimi, 2006). درشمال(مازندران) و غرب ایران سال۲۰۰۸ بررسی توسط رستمی بااستفاده از PCR و سکانس 12SrRNA انجام شد که استرین G1رادرایزوله گوسفندی وگاوی وبزی نشان داد و برای استرین G6 محصولی مشاهده نشد(Rostami Nejad *et al.*, 2008). که مطالعه فوق پس از (Zhang *et al.*, 1998) دومین بررسی ژنوتایپینگ انجام شده برروی DNA میتوکندری در ایران می باشد.

کرمان واقع در جنوب شرق ایران ومنطقه اندمیک برای اکینوکوکوس گرانولوزوس می باشد. در بررسی که توسط شریفی وضیاء علی انجام شد میزان آ لودگی در سگ های منطقه را ۷/۴٪ گزارش کردند ومیزان آ لودگی در دام های ذبح شده در طی چهار فصل در گوسفندوبزوگاو به ترتیب ۹.۲٪و۶.۸٪و۷.۲٪ گزارش گردید(Sharifi, 1996). و سالانه موارد بیمارانی که تحت عمل جراحی قرار می گیرند متعدد است در همین راستا افتخاری موارد ۱۰ ساله بیماری هیداتید را که در بیمارستانهای کرمان تحت عمل جراحی قرارگرفته بودند مورد بررسی قرار داده است(Eftekhari, 2005). دربررسی سرواپیدمیولوژی وسونوگرافی که در سال ۶- ۱۳۸۵ درشهداد وچترود انجام شدوفور سونوگرافیک بیماری ۰.۴٪ گزارش شد و۷.۸٪ نیزبه تست الایزا پا سخ مثبت دادند(Moazezi & Harandi, 2009). موارد ذکرشده نشان دهنده اهمیت کیست هیداتید در کرمان می باشد. بجز مطالعات اپیدمیولوژی در انسان ودام درکرمان مطالعه ای ازنظرتعیین ژنوتیپ درجنوب شرق کشور صورت نگرفته است. وبا توجه به اینکه ایران منطقه اندمیک برای اکینوکوکوس گرانولوزوس است . لزوم انجام

یک بررسی مولکولی برای تعیین استرین های انگل در این منطقه کشور احساس می شود. وبیشتر مطالعاتی که در ایران انجام گرفته برروی نواحی ژنومی (ITS1(rRNA می باشد. و با استفاده از RFCP در این مطالعه هدف بررسی ایزوله های گوسفند ، بز، گاو و شتر برپایه روش دقیقتر تعیین توالی های DNA میتوکندری در دو ناحیه ژنی *cox1*و *nad1* درکرمان می باشد.

۲-۱- هدف اصلی طرح : تعیین ژنوتیپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس درگوسفند وبزوگاووشتر درشهرستان کرمان

۳-۱- اهداف فرعی طرح :

۱ـ تعیین ژنوتیپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس جداشده ازگوسفند در شهرستان کرمان.

۲ـ تعیین ژنوتیپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس جداشده ازبز در شهرستان کرمان.

۳ـ تعیین ژنوتیپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس جداشده از گاو در شهرستان کرمان.

۴ـ تعیین ژنوتیپ های اکینوکوکوس گرانولوزوس جداشده از شتر در شهرستان کرمان.

٤-۱- اهداف کاربردی طرح :

نتایج بدست آمده درمورد ژنوتیپ انگل باتوجه به نقشی که دراپیدمیولوژی وکنترل بیماری دارد می تواند در برنامه های کنترل هیداتید درانسان ودام مورد استفاده قرار گیرد.

۵-۱- فرضیات یا سؤالات پژوهش (با توجه به اهداف طرح) :

۱- چه ژنوتیپی از اکینوکوکوس گرانولوزوس درایزوله های گوسفندی درکرمان وجوددارد؟

۲- چه ژنوتیپی از اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایزوله های بزی در کرمان وجوددارد؟

۳- چه ژنوتیپی از اکینوکوکوس گرانولوزوس درایزوله های گاوی در کرمان وجوددارد؟

۴- چه ژنوتیپی از اکینوکوکوس گرانولوزوس درایزوله های شتری در کرمان وجوددارد؟