

مطالعه تنوع سویه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس با تکثیر ژن co-1 به روش PCR-RFLP در استان آذربایجان غربی

دکتر محمد یخچالی^{۱*}، دکتر کریم مردانی^۲

تاریخ دریافت: 1391/07/12 تاریخ پذیرش: 1391/10/01

چکیده

پیش زمینه و هدف: شناسایی تنوع ژنوتیپی گونه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس از نظر همه گیری شناسی و کنترل عفونت‌های ناشی از نوزاد این سستود در مناطق بومی اهمیت زیادی دارد. تحقیق حاضر نیز به منظور شناسایی و تعیین سویه‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس در نشخوارکنندگان استان آذربایجان غربی انجام شد.

مواد و روش کار: اندام‌های نشخوارکنندگان دارای کیست‌های هیداتید شامل ۱۱۵ کبد و ۱۵۵ ریه گوسفند، ۵۹ کبد و ۱۲۶ ریه بز، ۱۱۹ کبد و ۷۸ ریه گاو و ۱۲۹ کبد گاو میش از کشتارگاه‌های شهرستان‌های خوی در شمال، ارومیه در مرکز و مهاباد در جنوب استان آذربایجان غربی جمع آوری گردیدند. پس از ضدعفونی نمودن سطح هر کیست، مایع داخل کیست‌ها جمع آوری و جهت جداسازی پروتواسکولکس‌ها سانتریفوژ گردیدند. از تعداد ۱۱۴ کبد و ریه آلوده به کیست هیداتید بارور، دی آن استخراج شد. تنوع سویه‌ای سستود، با تکثیر قطعه bp ۱۲۱۳ ژن سیتوکروم اکسیداز تحت واحد ۱ انجام شد و الگوی آر اف ال پی آن‌ها توسط آنزیم HaeIII ارزیابی گردید.

یافته‌ها: یافته‌های مولکولی نشان داد که قطعه تکثیر شده ژن سیتوکروم اکسیداز پروتواسکولکس‌های جمع آوری شده از کبد و ریه نشخوارکنندگان اهلی دارای اندازه یکسان بودند. الگوی هضم آنزیمی جدایه‌های گوسفند، بز و گاو مشابه بودند ولی الگوی هضم آنزیمی برای گاو میش متفاوت بود.

بحث و نتیجه گیری: الگوی بدست آمده از هضم آنزیمی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مرز ژن مورد مطالعه نشان داد که دو سویه گوسفندی (G1) و گاو میش (G3) اکتینوکوکوس گرانولوزوس همزمان در شمال غرب ایران حضور دارند.

کلید واژه‌ها: اکتینوکوکوس گرانولوزوس، سویه، co-1، واکنش زنجیره‌ای پلی مرز - آر اف ال پی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره هفتم، ص ۷۹۸-۷۹۲، ویژه‌نامه اسفند ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: بخش انگل شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه، پردیس نازلو، کیلومتر ۱۲ جاده سرو، صندوق پستی ۱۱۷۷-۵۷۱۵۳ تلفن: ۰۹۱۴۴۶۳۹۵۹

Email: m.yakhchali@urmia.ac.ir

مقدمه

صورت بروز جهش در ژنوم انگل، با ورود انکوسفر به بدن میزبان مهره دار و تکثیر غیر جنسی انگل پروتواسکولکس‌هایی با مشخصات جدید تولید می‌شوند و شرایط برای ایجاد سویه جدید فراهم می‌شود. اختلافات پادگنی در بین سویه‌ها مشکلاتی در تشخیص آلودگی از طریق روش‌های مشخص ایمنی شناسی و سرم شناسی به وجود آورده و تولید واکنس واحدی بر ضد انگل را با مشکل روبرو نموده است زیرا واکنس تولید شده برضد یک سویه احتمال دارد بر سویه دیگر اثر نکند (۱، ۱۱).

اکتینوکوکوس کیستیک یکی از بیماری‌های مشترک با گسترشی جهانی در مناطق مختلف دنیا است. چرخه زندگی اکتینوکوکوس گرانولوزوس میان میزبان نهایی گوشتخوار نظیر سگ و سگ سانان وحشی و میزبان واسط علفخوار که نوزاد کیست هیداتید در بدن آن‌ها رشد می‌نماید، در جریان است (۲۸). اکتینوکوکوس گرانولوزوس نظیر سایر سستودها هم‌افروdit بوده و به روش خود گشندگی عمل لقاح را انجام می‌دهد که این عمل منجر به بروز هموزیگوزی می‌شود.

^۱ دانشیار، بخش انگل شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ دانشیار، بخش اپیدمیولوژی مولکولی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تنوع ژنوتیپی اکینوкокوس گرانولوزوس بر اساس مطالعه ژن CO-1 و با استفاده از روش PCR-RFLP در گاو، گاو میش، گوسفند و بز در استان آذربایجان غربی انجام شد.

مواد و روش کار

جمع آوری پروتواسکولکس:

با در نظر گرفتن شیوع احتمالی هیداتیدوزیس نشخوارکنندگان به میزان ۲۰ درصد با سطح اعتماد ۹۵ درصد و دقت ۵ درصد (۲۶)، کیست‌های هیداتید شامل ۱۱۵ کبد و ۱۵۵ ریه گوسفند، ۵۹ کبد و ۱۲۶ ریه بز، ۱۱۹ کبد و ۷۸ ریه گاو و ۱۲۹ کبد گاو میش جمع آوری شدند. ۱۹۷ عدد از نمونه‌ها از کشتارگاه شهرستان خوی در شمال، ۳۷۸ عدد از نمونه‌ها از کشتارگاه شهرستان ارومیه در مرکز و ۲۰۶ عدد از نمونه‌ها از کشتارگاه مهاباد در جنوب استان آذربایجان غربی بودند که به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انتقال یافتند. پس از ضدعفونی سطح کیست هیداتید با لوگل، پروتواسکولکس‌ها با سانتریفیوژ مایع کیست هیداتید (۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) جمع آوری شدند. زنده و فعال بودن پروتواسکولکس‌ها با استفاده از رنگ حیاتی ائوزین (۱/۰ درصد) در مشاهده میکروسکوپی مطالعه گردید (۲). پروتواسکولکس‌ها در اتانول ۷۰ درصد و تا هنگام استخراج دی آن در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج دی آن آ:

برای استخراج دی آن آ از مخلوط پروتواسکولکس‌های هر جدایه دامی به تفکیک ۲۰ نمونه از هر جدایه (در حدود ۲۵۰ پروتواسکولکس) تهیه شد و سه بار توسط محلول بافری فسفر (pH=۷/۱) در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه شستشو گردیدند. هر نمونه جداگانه با افزودن لایز بافر و پروتئیناز کا به مدت چهار ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد در ترمومیکسر هضم گردیدند (۱۳). استخراج دی آن آ با استفاده از کیت استخراج دی آن آ (دی آن جی، ساخت شرکت سیناژن) انجام شد. دانسیته دی آن آ استخراج شده از هر نمونه با استفاده از بیوفتومتر (با طول موج ۲۶۰ نانومتر) اندازه گیری شد و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرارز:

برای هر نمونه از دی آن آ، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (ساخت شرکت سیناژن)، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر Eg Co1-F و Eg (Co1-R) و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه در میکروتیوب ریخته و به آن از دی آن آ استخراج شده (۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) به مخلوط اضافه گردید. حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود و در هر واکنش از یک کنترل منفی (فاقد دی آن آ الگو) استفاده

اکینوкокوس گرانولوزوس دارای درجات بالایی از تنوع ژنتیکی است. هر چند خصوصیات گونه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس و تنوع ژنتیکی آن در مناطق اندمیک در انسان و حیوانات با روش‌های ریخت شناسی و زیستی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶، ۱۰). در حال حاضر برای شناسایی سویه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس علاوه بر خصوصیات ریخت شناسی، بیوشیمیایی و زیستی از روش‌های مولکولی به ویژه روش PCR-RFLP استفاده می‌شود. به طوری که این روش‌ها برای تعیین جدایه‌ها و یا سویه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس و همچنین الگوی انتفال انگل در میزبان‌های واسط در مناطق مختلف جغرافیایی توسط محققین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۴). جداسازی سویه‌ها بر اساس قرابت ژنی ژن‌های موجود در توالی DNA هسته، RNA ریبوزومی و DNA میتوکندریایی (ژن‌های co-1 و nda-1) انجام می‌شود. طبقه بندی این واریانت‌ها بر اساس ژنوتیپ آن‌ها شامل توالی ژنی، RFLP قطعه ITS1-rDNA و آنالیز مقایسه‌ای توالی همولوگوس‌های DNA می‌باشد (۱۵). تا کنون در جهان بر اساس اختلافات زیست شناختی و ریخت شناسی حداقل ۱۰ سویه ژنتیکی از اکینوкокوس گرانولوزوس شناسایی شده‌اند (شامل ژنوتیپ‌های G1-G10) (۲۵، ۱۷، ۱۸). سه ژنوتیپ G1-G3 گونه اکینوкокوس گرانولوزوس نزدیک به هم بوده و فاقد اختصاصیت میزبانی می‌باشند (۲۵). ژنوتیپ‌های G6-G10 نیز در حیات وحش نیمکره شمالی حضور دارند هر چند سویه شتر (G6) از خاورمیانه و آفریقای شمالی و نیز سویه خوک (G7) از اروپای مرکزی شرقی و جنوبی گزارش شده‌اند. از میان سویه‌های ده گانه گزارش شده فوق، سویه گوسفندی (G1) بیشترین بیماری‌زایی را برای انسان دارد و از طیف گسترده‌ای از گونه‌های جانوری میزبان واسط، کیست‌های بارور از آن گزارش شده است (۲۸). در ایران دو سویه سگ-گوسفند (ژنوتیپ G1) و سگ-شتر (ژنوتیپ G6) گزارش گردیده است (۳۱). به طوری که سویه سگ-گوسفند برای انسان بیماری‌زا بوده ولی سویه سگ-شتر قابلیت تولید عفونت را در انسان ندارد (۱). اخیراً سویه گاو میش نیز گزارش گردیده است (۲۲، ۶).

تنوع ژنتیکی گونه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس از نظر همه گیری شناسی و کنترل بیماری در مناطق بومی دارای اهمیت است (۸). تحقیقات در مناطق مختلف و اختلاف در سویه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس نشانگر وجود تنوع سویه‌ای در بین گونه‌ها، به خصوص تغییرات ژنتیکی در اکینوкокوس گرانولوزوس برحسب میزبان و منطقه جغرافیایی انتشار آن می‌باشد. با توجه به این تغییرات ژنتیکی و تنوع سویه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس در مناطق مختلف اندمیک بیماری، وجود آن‌ها می‌تواند در برنامه‌های کنترل بیماری تاثیر گذار باشد (۲۵). براین اساس تحقیق حاضر به منظور بررسی

تصویر باندهای DNA توسط دستگاه ثبت باند روی ژل تهیه و الگوهای مختلف دی ان ا مقایسه گردیدند.

یافته‌ها

شیوع آلودگی به کیست هیداتید بارور در نواحی تحت مطالعه در استان آذربایجان غربی، به ترتیب، در گاو ۱۶/۱ درصد، گاو میش ۵/۹ درصد، گوسفند ۵۷/۴ درصد و بز ۲/۱ درصد بود.

پس از تکثیر ژن CO-1، الگوهای مشابهی از باندهای DNA در جدایه های دامی از نظر تعداد و اندازه مشاهده شد. به طوری که از تکثیر این ژن در هر ایزوله باند ۱۲۱۳bp بدست آمد (تصویر ۱).

هضم آنزیمی محصول‌های واکنش زنجیره‌ای پلی مرز، در جدایه های گوسفند، بز و گاو دارای الگوی واکنش زنجیره‌ای پلی مرز-آر اف ال پی مشابهی بود. به طوری که سه قطعه یکسان ۴۷۸، ۴۲۴ و ۳۱۰ جفت بازی برای گاو، گوسفند و بز در تمامی نمونه‌های هضم شده مشاهده گردید. در حالی که الگوی هضم آنزیمی واکنش زنجیره‌ای پلی مرز-آر اف ال پی برای جدایه های گاو میش متفاوت بود (تصویر ۲).

شد. پرایمرها براساس توالی ژن CO-1 مورد مطالعه اکینو‌کوکویس گرانولوزوس در بانک ژن و با استفاده از نرم افزار آمپلی اف ایکس-۵ طراحی گردیدند (جدول ۱).

تکثیر ژن CO-1

در تکثیر ژن CO-1 از الگوی دمایی جدول ۲ استفاده گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مرز هر ایزوله جداگانه در ژل آگاروز ۱/۵ درصد و به مدت ۷۰ دقیقه با ولتاژ ۷۰ میلی ولت الکتروفورز شدند. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، اندازه قطعه تکثیر یافته در مقایسه با نشانگر مشخص گردید (تصویر ۱).

هضم آنزیمی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مرز:

محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مرز به روش Utuk و همکاران (۳۰) و با استفاده از آنزیم اندونوکلاز HaeIII (5' GG/CC 3') هضم گردید. حجم کلی واکنش ۱۵ میکرولیتر بود که به مدت ۱۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد هضم محصول انجام شد (جدول ۳). پس از هضم آنزیمی، محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مرز توسط آگاروز ۲/۵ درصد الکتروفورز گردید. ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و

جدول شماره (۱): توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای شناسایی سویه‌های اکینو‌کوکوس گرانولوزوس.

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	طول قطعه تکثیری (جفت باز)
Eg Co1-F	5'-GCG-TTT-GAA-TGC-TTT-GAG-TG-3'	۵۳	۱۲۱۳
Eg Co1-R	5'-ACA-AGC-CAC-AGG-ACT-CAT-C-3'		

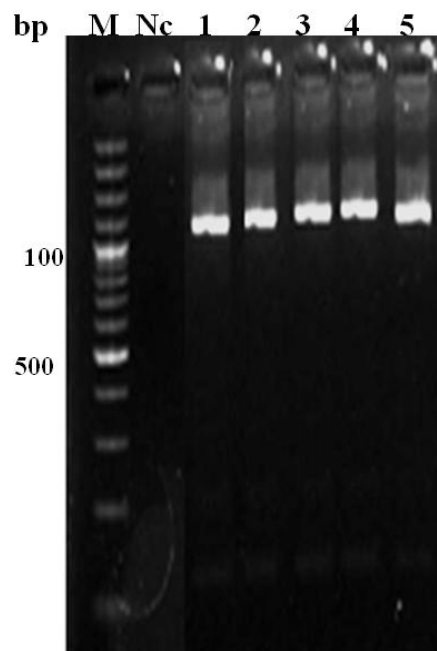
جدول شماره (۲): الگوی دمایی برای تکثیر ژن CO-1.

زمان	دما (درجه سانتی گراد)	مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی مرز
۲ دقیقه	۹۴	واسرشت اولیه
۴۵ ثانیه	۹۴	واسرشت
۴۵ ثانیه	۵۳	اتصال
۸۰ ثانیه	۷۲	امتداد
۲ دقیقه	۷۲	امتداد نهایی

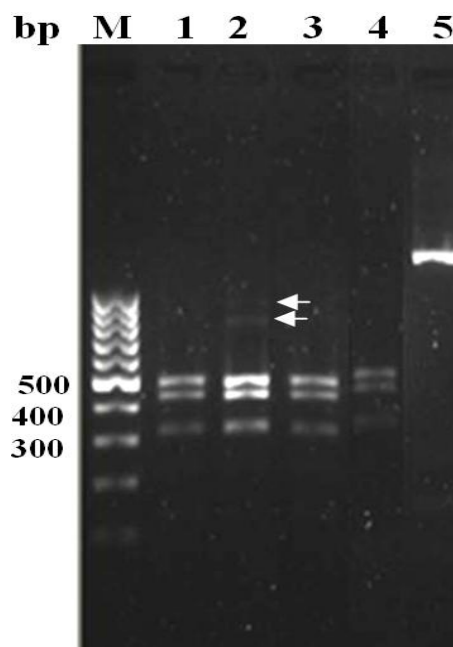
بحث و نتیجه گیری

مطالعه در خصوص تغییرات ژنتیکی داخل گونه‌ای و بین گونه‌ای جمعیت‌های اکینوкокوس گرانولوزوس از نقطه نظر برنامه‌های کنترلی و همه گیری شناسی هیداتیدوزیس اهمیت قابل توجهی دارد (۱۹). زیرا بر اساس گزارشات موجود این نوع از اختلافات ژنوتیپی انگل نه تنها در اسید نوکلئیک بلکه بر ویژگی‌های فنوتیپی نیز موثرند و الگوی چرخه زندگی، اختصاصیت برای میزبان، بیماری زایی، حساسیت نسبت به درمان دارویی، روند انتقال آلودگی و کنترل اکینوкокوس گرانولوزوس را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲۴). با توجه به اینکه ژنوتیپ انگلی عمده در بروز آلودگی‌های انسانی، ژنوتیپ گوسفندی (G1) می‌باشد (۲۵) و نیز با توجه به فراوانی گونه گوسفندی در منطقه آذربایجان غربی (۴، ۳) و بالا بودن میزان باروری کیست‌های با منشا گوسفندی (۱)، نقش این دام در انتقال آلودگی به انسان از طریق سگ نیز توجه پذیرتر می‌گردد.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی مرز نمونه‌های دی ان آ در این تحقیق با یافته‌های گزارش شده در سایر مطالعات مشابه بود (۲۷)، ۲۲، ۱۰، ۶. الگوی هضم آنزیمی محصول دی ان آ ژن co-1 در مورد نمونه‌های گاو، گوسفند، بز و گاو میش بیانگر وجود دو سویه گوسفندی (G1) و گاو میش (G3) در این منطقه از ایران بود. نتایج مطالعه Amin Pour و همکاران (۶) در ۲۵ ایزوله از ۵ استان مختلف در ایران بیانگر حضور دو ژنوتیپ شامل ژنوتیپ گوسفندی (G1) با تحت گروه‌های G1 α ، G1 β ، G1 γ و G1 δ و ژنوتیپ گاو میش (G3) بود. در صورتی که تحقیق یخچالی و مردانی (۱۳۹۰) در خصوص تنوع ژنوتیپی اکینوкокوس گرانولوزوس در نشخوارکنندگان در چرخه اهلی با تکثیر ژن nda-1 فقط بیانگر حضور سویه سگ-گوسفند (G1) در منطقه بود (۵). Sharbatkhorji و همکاران (2011) حضور ژنوتیپ گاو میش (G3) را در کنار ژنوتیپ‌های گوسفند (G1) و شتر (G6) از شترهای بخش مرکزی ایران گزارش نمودند (۲۲). مطالعه Zhang و همکاران (1998) بر روی جدایه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس بیانگر آن بود که نقش ژنوتیپ گوسفندی (G1) در دام‌های اهلی نسبت به ژنوتیپ شتر (G6) شناسایی شده در گاو، گوسفند و بز قابل توجه تر است (۲۹). البته این یافته در مورد ایران که از نواحی فوق اندمیک آلودگی با اکینوкокوس گرانولوزوس است، درست می‌باشد. Dalimi و Ahmadi (2006) در مطالعه جدایه‌های بدست آمده از انسان، شتر و گوسفند، سویه شتری (G6) را از ایران گزارش کردند (۷). Gholami و همکاران (۱۳۸۸) نیز از نظر خصوصیات ژنتیکی، در جدایه‌های گوسفند، گاو و شتر شمال ایران سویه گوسفندی (G1) را گزارش نمودند (۲). Rostaminejad و همکاران در مطالعه بر روی هتروژنوسیتی ژن 12S rRNA به منظور



تصویر شماره (۱): محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مرز حاصل از تکثیر قطعه ۱۲۱۳bp ژن co-1 اکینوкокوس گرانولوزوس بدست آمده از ریه گاو (۱)، کبد گوسفند (۲)، کبد بز (۳)، ریه گاو میش (۴)، کبد گاو (۵)، کنترل منفی (Nc) و نشانگر ۱۰۰ جفت باز (M).



تصویر شماره (۲): محصول هضمی واکنش زنجیره‌ای پلی مرز ژن co-1 اکینوкокوس گرانولوزوس از کبد گوسفند (۱)، کبد گاو میش (۲)، کبد بز (۳)، ریه گاو (۴)، محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (۵)، نشانگر ۱۰۰ جفت باز (M).

(G1) را به عنوان سویه شایع در پرو معرفی کردند (۲۱). Capuano و همکاران (2006) در مطالعه کیستیک اکیینوکوکوزیس در گاومیش علاوه بر معرفی سویه گاومیش (G3) سویه گوسفندی را نیز از این جدایه حیوانی در هندوستان گزارش کردند (۱۲). بنابراین هم خوانی یافته‌های مطالعه حاضر با این گزارشات علی رغم این واقعیت که توزیع جغرافیایی سویه‌های اکیینوکوکوس گرانولوزوس در مناطق مختلف می‌تواند متفاوت باشد (۱۴)، حضور سویه گوسفندی (G1) و گاومیش (G3) در این بخش از ایران تایید گردید. اهمیت این یافته از آن نظر می‌باشد که در مناطقی که گوسفندان به همراه سایر دام‌های اهلی نگهداری می‌شوند، انسان هم در معرض خطر آلودگی با سویه گوسفندی به دلیل تماس با میزبان نهایی گوشتخوار به ویژه سگ می‌باشد (۲۹). بنابراین نقش ژنوتیپ گوسفندی و گاومیش در بروز هیداتیدوزیس انسان نیاز به مطالعات تکمیلی در این بخش از کشور دارد تا اقدامات پیشگیری، کنترل و تهیه واکسن‌های مناسب برای انسان و دام موفق تر باشد.

تمایز سویه‌های اکیینوکوکوس گرانولوزوس در ایران، سویه گوسفندی را به عنوان سویه شایع در بین دام‌های اهلی ایران گزارش نمودند (۲۰). Utuk و همکاران در مطالعه خود بر روی جدایه های اکیینوکوکوس گرانولوزوس در نواحی شرق و جنوب شرقی ترکیه که هم مرز با منطقه تحقیق حاضر است، با هضم آنزیمی محصول ژن‌های CO-1 و ITS-1 عنوان نمودند که سویه شایع در این مناطق نیز سویه گوسفندی (G1) است (۲۷). Varcasia و همکاران هم در مطالعه واکنش زنجیره‌ای پلی مرز-آر اف ال پی کیست هیداتید کبد، ریه و طحال گاو، گوسفند و خوک در جزیره ساردینی ایتالیا، سویه شایع را متعلق به ژنوتیپ گوسفندی (G1) گزارش کردند (۲۸). Bardonnet و همکاران در مطالعه دو ژن CO-1 و nda-1 گاو به عنوان یکی از مخزن‌های سویه گوسفندی در الجزایر گزارش کردند که امکان دارد در آلودگی انسان به کیستیک هیداتیدوزیس نقش داشته باشد (۹). Sánchez و همکاران در مطالعه جدایه های حیوانی (گاو و گوسفند) و انسانی با استفاده از ژن CO-1، سویه گوسفندی

References

- Eslami A. Veterinary helminthology: Cestoda. 2nd Ed. Tehran: Tehran University Publisher; 2006. P. 132-5. (Persian)
- Gholami S, Irshadullah M, Khan A. Genetic variation of Echinococcus granulosus isolates from Indian buffalo and Iranian sheep, cattle and camel. J Mazandaran Univ Med Sci 2009; 19 (71): 60-9. (Persian)
- Yakhchali M, Ghobadi K. Survey of liver helminthes infection rate and economic loss in sheep in Urmia Slaughterhouse. J Sch Vet Med Shahid Chamran Ahvaz Univ 2005; 11: 60-5. (Persian)
- Yakhchali M, Lotfi K. A survey on lung worm infection in Buffalo and sheep in Urmia Slaughterhouse. Pajouhesh Sazandegi J 2003; 58(1): 101-2. (Persian)
- Yakhchali M, Mardani K. Study on Echinococcus granulosus genotype diversity in domestic cycle using nucleotide sequence of nda-1 gene. Iran Vet J 2011; 7(1): 63-9. (Persian)
- Amin Pour A, Hosseini SH, Shayan P. Comparative genotyping of Echinococcus granulosus infecting buffalo in Iran using cox1 gene. Parasitol Res 2011; 108: 1229-34.
- Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Genet Evol 2006; 6: 85-90.
- Baba H, Messedi A, Masmoudi S, Zribi M, Sahnoun Y. Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. Am J Trop Med Hyg 1994; 50: 64-8.
- Bardonnet K, Benchikh-Elfegoun MC, Bart JM, Harraga S, Hannache N. Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. Vet Parasitol 2003; 116: 35-44.
- Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of Echinococcus species and strains using a polymerase chain reaction based RFLP method. Mol Biochem Parasitol 1993; 57: 231-9.

11. Bowles J, Blair D, McManus DP. Molecular genetics characterization of the cervid strain (northern form) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol* 1994; 109: 215-21.
12. Capuano F, Rinaldi L, Maurelli MP, Perugini AG, Veneziano V. Cystic echinococcosis in water buffaloes: Epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. *Vet Parasitol* 2006; 137: 262-8.
13. Dyachenko V, Pantchev N, Gawlowska S, Globokar MV, Bauer Ch. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Vet Parasitol* 2008; 151: 97-109.
14. Eckert J, Thompson RCA. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop* 1997; 64: 19-34.
15. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol* 2003; 127: 207-15.
16. McManus DP, Bryant C. Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus*. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, Editors. *Echinococcus and hydatid disease*. UK: CAB; 1995. P. 135-81.
17. Moks E, Jõgisalu I, Valdmann H, Saarma U. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitol* 2008; 135: 647-54.
18. Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitol* 2007; 134: 1-10.
19. Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitol* 1999; 88: 523-30.
20. Rostaminejad M, Nazemalhosseini Mojarad E, Nochi Z, Fasihi Harandi M, Cheraghipour K, et al. *Echinococcus granulosus* strain differentiation in Iran based on sequence heterogeneity in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Helminthol* 2008; 82: 343-7.
21. Sánchez E, Cáceres O, Náquira C, Garcia D, Patiño G, Silvia H, et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 2010; 105(6): 806-10.
22. Sharbatkhori M, Fasihi Harandi M, Mirhendi H, Hajjalilo E, Kia EB. Sequence analysis of *cox1* and *nad1* genes in *Echinococcus granulosus* G3 genotype in camels (*Camelus dromedarius*) from central Iran. *Parasitol Res* 2011; 108: 521-7.
23. Šnábel V, Altintas N, D'Amelio S, Nakao M, Romig T, Yolasisgimaz A, et al. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Vet Parasitol* 2009; 105: 145-54.
24. Thompson RCA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 2002; 18: 452-57.
25. Thompson RCA. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol* 2008; 119: 439-46.
26. Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology*. 2nd Ed., London, UK: Blackwell Science; 1995.
27. Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and south east regions of Turkey. *Acta Trop* 2008; 107: 192-4.
28. Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A, Garippa G. Molecular characterization of

-
- Echinococcus granulosus strains in Sardinia. Vet Parasitol 2006; 98: 273-7.
29. Zhang L, Eslami A, Hosseini SH, McManus DP. Indication of the presence of two distinct strains of Echinococcus granulosus in Iran by mitochondrial DNA markers. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(1): 171-4.