مقاله پژوهشی

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

دکتر محمد یخچالی*[1]، دکتر کریم مردانی[2]

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

چکیده

پیش زمینه و هدف: شناسایی تنوع ژنوتیپی گونه‌های اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس 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 گاومیش 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 پروتواسکولکس ها سانتریفوژ گردیدند. از تعداد ۱۱۴ کبد و ریه آلوده به کیست هیداتید بارور، دی ان آ استخراج شد. تنوع سویه‌ای سستود، با تکثیر قطعهbp 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 پروتواسکولکس های جمع آوری شده از کبد و ریه نشخوارکنندگان اهلی دارای اندازه یکسان بودند. الگوی هضم آنزیمی جدایه های گوسفند، بز و گاو مشابه بودند ولی الگوی هضم آنزیمی برای گاومیش متفاوت بود.

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

کلید واژه‌ها: اکینوکوکوس گرانولوزوس، سویه، co-1، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز-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 ۵۷۱۵۳-۱۱۷۷ تلفن: ۰۹۱۴۴۴۶۳۹۵۹

Email: m.yakhchali@urmia.ac.ir

مقدمه

اکینوکوکوزیس کیستیک یکی از بیماری‌های مشترک با گسترشی جهانی در مناطق مختلف دنیا است. چرخه زندگی اکینوکوکوس 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). اکینوکوکوس گرانولوزوس نظیر سایر سستودها هرمافرودیت بوده و به روش خود گشنیدگی عمل لقاح را انجام می‌دهد که این عمل منجر به بروز هموزیگوزی می‌شود. در صورت بروز جهش در ژنوم انگل، با ورود انکوسفر به بدن میزبان مهره دار و تکثیر غیر جنسی انگل پروتواسکولکس هایی 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 واکسن واحدی بر ضد انگل را با مشکل روبرو نموده است زیرا واکسن تولید شده برضد یک سویه احتمال دارد بر سویه دیگر اثر نکند (۱، ۱۱).

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

[2] دانشیار، بخش اپیدمیولوژی مولکولی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

اکینوکوکوس گرانولوزوس دارای درجات بالایی از تنوع ژنتیکی است . هر چند خصوصیات گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس و تنوع ژتیتکی آن در مناطق اندمیک در انسان و حیوانات با روش‌های ریخت شناسی و زیستی مورد مطالعه قرارگرفته است (۱۶، ۱۰). در حال حاضر برای شناسایی سویه‌های های اکینوکوکوس گرانولوزوس علاوه برخصوصیات ریخت شناسی، بیوشیمایی و زیستی از روش‌های مولکولی به ویژه روشPCR-RFLP استفاده می‌شود. به طوری که این روش‌ها برای تعیین جدایه ها و یا سویه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس و همچنین الگوی انتقال 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 (ژن‌هایnda-1 وco-1) انجام می‌شود. طبقه بندی این واریانت ها بر اساس ژنوتیپ آن‌ها شامل توالی ژنی، RFLP قطعه rDNA- ITS1 و آنالیز مقایسه‌ای توالی همولوگوس های DNA می‌باشد (۱۵). تا کنون در جهان بر اساس اختلافات زیست شناختی و ریخت شناسی حداقل ۱۰ سویه ژنتیکی از اکینوکوکوس گرانولوزوس شناسایی شده‌اند (شامل ژنوتیپ های G1-G10) (۲۵، ۱۷،۱۸). سه ژنوتیپ G1-G3 گونه اکینوکوکوس گرانولوزوس نزدیک به هم بوده و فاقد اختصاصیت میزبانی می‌باشند (۲۵). ژنوتیپ هایG6-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 بیماری زایی 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 (ژنوتیپG1) و سگ-شتر (ژنوتیپ G6) گزارش گردیده است (۳۱). به طوری که سویه سگ-گوسفند برای انسان بیماری زا بوده ولی سویه سگ-شتر قابلیت تولید عفونت را در انسان ندارد (۱). اخیرا سویه گاومیش نیز گزارش گردیده است (۲۲، ۶).

تنوع ژنیتکی گونه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس از نظر همه گیری شناسی و کنترل بیماری در مناطق بومی دارای اهمیت است (۸). تحقیقات در مناطق مختلف و اختلاف در سویه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس نشانگر وجود تنوع سویه‌ای در بین گونه‌ها، به خصوص تغییرات ژنتیکی در اکینوکوکوس گرانولوزوس برحسب میزبان و منطقه جغرافیایی انتشار آن می‌باشد. با توجه به این تغییرات ژنیتکی و تنوع سویه‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس در مناطق مختلف اندمیک بیماری، وجود آن‌ها می‌تواند در برنامه‌های کنترل بیماری تاثیر گذار باشد (۲۵). براین اساس تحقیق حاضر به منظور بررسی تنوع ژنوتیپی اکینوکوکوس گرانولوزوس بر اساس مطالعه ژن co-1 و با استفاده از روش PCR-RFLP در گاو، گاومیش، 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 ۲۰درصد با سطح اعتماد ۹۵درصد 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 گاومیش 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، پروتواسکولکس ها با سانتریفیوژ مایع کیست هیداتید (۵۰۰۰دور به مدت ۵ دقیقه) جمع آوری شدند. زنده و فعال بودن پروتواسکولکس ها با استفاده از رنگ حیاتی ائوزین (۰/۱درصد) در مشاهده میکروسکوپی مطالعه گردید (۲). پروتواسکولکس ها در اتانول ۷۰درصد و تا هنگام استخراج دی ان آ در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج دی ان آ:

برای استخراج دی ان آ از مخلوط پروتواسکولکس های 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) در۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه شستشو گردیدند. هر نمونه جداگانه با افزودن لایزز بافر و پروتئیناز کا به مدت چهار ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد در ترمومیکسر هضم گردیدند (۱۳). استخراج دی ان آ با استفاده از کیت استخراج دی ان آ (دی ان جی، ساخت شرکت سیناژن) انجام شد. دانسیته دی ان 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 مراز:

برای هر نمونه از دی ان 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 ان آ استخراج شده (۵ میکرولیتر حاوی۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) به مخلوط اضافه گردید. حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود و در هر واکنش از یک کنترل منفی (فاقد دی ان آ الگو) استفاده

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 ژنco-1 از الگوی دمایی جدول ۲ استفاده گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز هر ایزوله جداگانه در ژل آگاروز ۱/۵درصد 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 (تصویر۱).

هضم آنزیمی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز:

محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به روش Utuk و همکاران (۳۰) و با استفاده از آنزیم اندونوکلئاز 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 مراز توسط آگاروز ۲/۵ درصد الکتروفورز گردید. ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و تصویر باندهای DNA توسط دستگاه ثبت باند روی ژل تهیه و الگوهای مختلف دی ان آ مقایسه گردیدند.

یافته‌ها

شیوع آلودگی به کیست هیداتید بارور در نواحی تحت مطالعه در استان آذربایجان غربی، به ترتیب، در گاو ۱۶/۱درصد، گاومیش ۵/۹ درصد، گوسفند ۵۷/۴درصد 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).

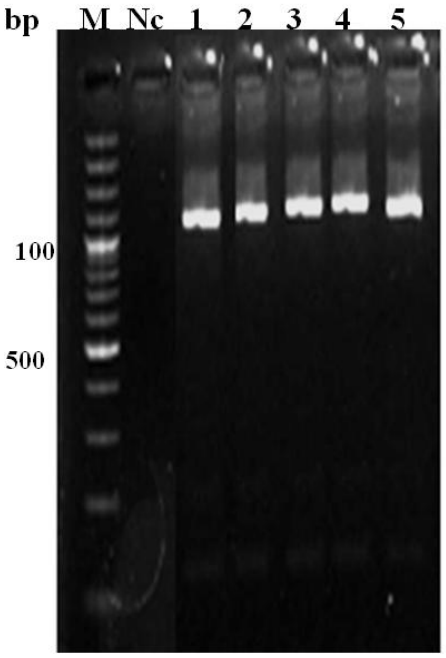
هضم آنزیمی محصول‌های واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، در جدایه های گوسفند، بز و گاو دارای الگوی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز-آر اف ال پی مشابهی بود. به طوری که سه قطعه یکسان ۴۷۸، ۴۲۴ و ۳۱۰ جفت بازی برای گاو، گوسفند و بز در تمامی نمونه‌های هضم شده مشاهده گردید. در حالی که الگوی هضم آنزیمی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز-آر اف ال پی برای جدایه های گاومیش متفاوت بود (تصویر۲).

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

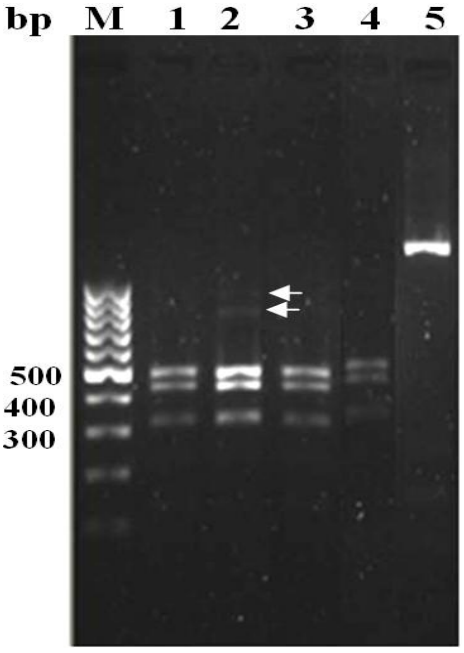
پرایمر	توالی نوکلوئوتیدی	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	طول قطعه تکثیری (جفت باز)
Eg Co1-F	5'-GCG-TTT-GAA-TGC-TTT-GAG-TG-3'	۵۳	۱۲۱۳
Eg Co1-R	5'-ACA-AGC-CAC-AGG-ACT-CAT-C-3'		

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

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



تصویر شماره(۱): محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز حاصل از تکثیر قطعه ۱۲۱۳bp ژن co-1اکینوکوکوس گرانولوزوس بدست آمده از ریه گاو (1)، کبد گوسفند (2)، کبد بز (3)، ریه گاومیش (4)، کبد گاو (5)، کنترل منفی (Nc) و نشانگر ۱۰۰ جفت باز(M).



تصویر شماره (۲): محصول هضمی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ژن co-1 اکینوکوکوس گرانولوزوس از کبد گوسفند (1)، کبد گاومیش(2)، کبد بز (3)، ریه گاو (4)، محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (5)، نشانگر ۱۰۰ جفت باز(M).

بحث و نتیجه گیری

مطالعه در خصوص تغییرات ژنتیکی داخل گونه‌ای و بین گونه‌ای جمعیت‌های اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوزیس 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 توجیه پذیرتر می‌گردد.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی مراز 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 گاومیش بیانگر وجود دو سویه گوسفندی (G1) و گاومیش (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 گرو هپای G1α، G1β، G1γ وG1δ و ژنوتیپ گاومیش (G3) بود. در صورتی که تحقیق یخچالی و مردانی (۱۳۹۰) در خصوص تنوع ژنوتیپی اکینوکوکوس گرانولوزوس در نشخوارکنندگان در چرخه اهلی با تکثیر ژن nda-1 فقط بیانگر حضور سویه سگ-گوسفند (G1) در منطقه بود (۵). Sharbatkhori و همکاران (2011) حضور ژنوتیپ گاومیش (G3) را در کنار ژنوتیپ های گوسفند (G1) و شتر (G6) از شترهای بخش مرکزی ایران گزارش نمودند (۲۲). مطالعه Zhang و همکاران (1998) بر روی جدایه های اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس گرانولوزوس است، درست می‌باشد. Ahmadi وDalimi (2006) در مطالعه جدایه های بدست آمده از انسان، شتر و گوسفند، سویه شتری (G6) را از ایران گزارش کردند (۷). Gholami و همکاران (۱۳۸۸) نیز از نظر خصوصیات ژنیتکی، در جدایه های گوسفند، گاو و شتر شمال ایران سویه گوسفندی (G1) را گزارش نمودند (۲). Rostaminejad و همکاران در مطالعه بر روی هتروژنیسیتی ژن 12S rRNA به منظور

تمایز سویه‌های اکینوکوکوس 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 اکینوکوکوس 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 مراز-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 (G1) را به عنوان سویه شایع در پرو معرفی کردند (۲۱). Capuano و همکاران (2006) در مطالعه کیستیک اکینوکوکوزیس 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 اکینوکوکوس 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.

References

1. Eslami A. Veterinary helminthology: Cestoda. 2nd Ed. Tehran: Tehran University Publisher; 2006. P. 132-5. (Persian)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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.
7. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Genet Evol 2006; 6: 85-90.
8. Baba H, Messedi A, Masmodi 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.
9. 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.
10. 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, Hajialilo 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, Yolasigmaz 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 in Iran by mitochondrial DNA markers. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(1): 171-4.

Echinococcus granulosus strains in Sardinia. Vet Parasitol 2006; 98: 273-7.

29. Zhang L, Eslami A, Hosseini SH, McManus DP. Indication of the precence of two distinct strains of