کاربرد روش‌های زیست مولکولی در تشخیص کرم‌ها و آلودگی‌های کرمی ایران

جالوسیان، ف.[۱]، مشگی، ب.[۱*]، اسلامی، ع.[۲]، سلیمی بجستانی، م. ر.[۳]

دریافت: ۱۳۹۰/۰۹/۰۷ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۰

خلاصه

به دنبال جهانی شدن علم و علمی شدن جهان شاهد هستیم که علوم مختلف در عرصهٔ ظهور با یکدیگر ارتباطی تنگاتنگ پیدا کرده‌اند. ریاضیات به یاری پزشکی مدرن و فیزیک به کمک نجوم آمده‌اند، علوم زیست مولکولی به همراه ریاضیات محض و رایانه، پایه‌گذار تحقیقات نوین شده‌اند. در ایران مطالعات نسبتاً جامعی در زمینهٔ تشخیص اجرام عفونت‌زا از جمله انگل‌ها بر اساس ریخت‌شناسی آنها صورت گرفته است؛ ولی استفاده از بیولوژی مولکولی دورهٔ نو جوانی‌اش را می‌گذراند، شاید به همین جهت در نوشتار حاضر برای توجه دادن علاقه‌مندان بویژه محققان جوان، نتایج مطالعات انجام گرفته در زمینهٔ تشخیص آلودگی‌های انگلی کرمی در ایران معرفی شده است و برای آگاهی بیشتر از این رشته، مختصری هم در رابطه با چگونگی دستیابی به بانک ژن و دیگر پایگاه‌های مرتبط توضیحاتی ارائه شده است. یکی از نتایج این مطالعات، معرفی چندین سویه برای *اکینوکوکوس گرانولوزوس* بوده است. از دیگر کاربردهای روش‌های مولکولی در ایران باید به بیان پروتئین‌های نوترکیب بعنوان آنتی‌ژن و واکسن اشاره کرد؛ همچنین مشخص شده است که علی‌رغم وجودگونه‌هایی از *فاسیولا* با ریخت‌شناسی متفاوت با دو گونهٔ *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا*، همهٔ آنها ساختار ژنی مشابهی دارند. مقایسهٔ وضعیت ژنومی *گونژیلونما پولکروم* گاو در ایران و ژاپن که برای اولین بار در دنیا صورت گرفت، نشان داد در دو نمونه ترادف نوکلئوتیدی rDNA جز ناحیه ITS۱ با یکدیگر یکسان هستند. مطالعات انجام گرفته در مورد *دیکروسلیوم* نشخوارکنندگان حاکی از وجود تنو ع ژنی در این انگل است. بررسی‌های زیست مولکولی نشان داده است که ژن بتا توبولین *همونکوس کونتورتوس* دستخوش پلی‌مورفیسم شده است و این نماتود در برخی از گوسفندان شوشتر از استان خوزستان نسبت به بنزیمیدازول ها مقاوم است، اگرچه مطالعات بعدی با استفاده از روش هضم آنزیمی (PCR-RFLP) حاکی از عدم وجود چنین مقاومتی بوده است. لذا هدف از مطالعهٔ پیش رو آشنایی اولیهٔ پژوهشگران جوان در مورد دسترسی به پایگاه‌های داده‌ها و معرفی مطالعات انجام شده در ایران در زمینه شناسایی کرم‌ها و مقاومت دارویی آنها در برابر داروهای ضد کرمی با استفاده از روش‌های زیست مولکولی بوده است.

واژه‌های کلیدی: تشخیص، کرم‌ها، بیولوژی مولکولی.

۱. گروه انگل شناسی دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. گروه انگل شناسی، دانشکدهٔ علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسؤول: Bmeshgi@ut.ac.ir

مقدمه

چنانچه قبول کنیم که جهان امروز یک دنیای علم محور است و یا حداقل در این مسیر گام بر می‌دارد، پس باید دو موضوع علمی شدن (در جزئی‌ترین موضوعات مورد بحث) و از سویی جهانی شدن این علم را باور داشته باشیم. تا چندی پیش و نیز هم‌اکنون شاخص‌های ریخت‌شناسی و معیارهای مرتبط با آن از ابزارهای اصلی برای رده‌بندی و شناسایی گونه و زیرگونه در موجودات در نظر گرفته می‌شد؛ بعنوان نمونه بیش از ۶۰ گونه نماتود در لولهٔ گوارش نشخوارکنندگان ایران زندگی می‌کنند (Eslami و Fakhrzadegan، ۱۹۷۲; Eslami و Nabavi، ۱۹۷۶; Eslami و Farsad Hamdi، ۱۹۹۲; اسلامی و فیضی، ۱۳۵۴)؛ ولی بررسی‌های بعدی در همین زمینه حاکی از وجود پلی‌مورفیسم در یک گونه انگل خاص ولی در حیوانات مختلف بوده است (علیایی و همکاران، ۱۳۸۷). همین روند (پلی‌مورفیسم) در مورد *دیکروسلیوم دندریتیکوم* نشخوارکنندگان ایران گزارش گردید (طائفی و همکاران، ۱۳۸۷). در این موارد که در صورت انجام مطالعات بعدی ممکن است تعداد آنها بیش از این باشد، داوری نهایی چگونه باید انجام گیرد؟ مسلماً بروز تغییر در ساختار ژنی انگل‌ها تبعاتی به‌دنبال دارد که عدم اطلاع از آنها ممکن است با خسارت اقتصادی و بهداشتی زیادی همراه باشد؛ برای مثال نشان داده شده است که *اکینوکوکوس گرانولوزوس* دارای سویه‌های مختلف بوده که از حیث اختصاصی بودن میزبان، همه‌گیری‌شناسی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی، فیزیولوژی و ژنتیک با هم اختلاف دارند (Thompson و McManus، ۲۰۰۲). علی‌الاصول در این گونه موارد روش‌های زیست مولکولی حرف نهایی را می‌زند. در اینجا لازم است که نکته‌ای مورد توجه محققان قرار گیرد. روزگاری دانشمندان غربی براحتی به بسیاری از کشورهای دنیا رفت و آمد می‌کردند و به دلیل نفوذ کشورهای خود در آن مناطق برای انجام تحقیقات مورد نظر آزادی عمل داشتند؛ موضوعی که به نظر می‌رسد در سال‌های اخیر با محدودیت‌های جدی روبه رو شده است، لذا این دانشمندان و محققان که بسیاری از مسایل مربوط به همه‌گیری‌شناسی بیماری‌های عفونی را در کشورهای خود حل کرده‌اند، توجه خود را معطوف به ابداع روش‌های جدید در زمینه‌های مختلف از جمله بیولوژی مولکولی کرده و از نتایج آن در ساخت و ارائه کیت‌های تشخیص، واکسن و تولید دیگر مواد گران‌قیمت استفاده کرده‌اند که علاوه بر مصرف داخلی به دنیا هم صادر می شود و اقتصاد ملی خود را شکوفاتر می‌سازند، با وجود این، در کشورهای در حال توسعه هنوز در زمینهٔ مطالعات میدانی خلاء زیادی وجود دارد و نباید محققان همهٔ فعالیت‌های پژوهشی خود را به شناسایی مولکولی اجرام مختلف معطوف نمایند و از بررسی‌های میدانی که اهمیت زیادی در برنامه‌ریزی‌های ملی دارند، غافل شوند. با توجه به آنچه بعنوان مقدمه ذکر شد و با حفظ اعتبار و اهمیت روش‌های قدیمی‌تر همچون روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی، در مقالهٔ حاضر چگونگی و اساس استفاده از روش‌های نوین زیستی و موارد استفاده از آن در ایران در زمینهٔ آلودگی‌های کرمی مورد بحث قرار گرفته است. با توجه به این که ورود به این عرصه با شناخت نسبی از داده‌های زیستی انجام می‌گیرد، لذا در ابتدا مروری گذرا بر بانک‌های اطلاعاتی خواهیم داشت.

بانک ژن و پایگاه‌های داده‌ها

در شرایط کنونی، جهانی شدن علم یکی از محورهای اصلی و مورد نظر صاحبان فن به شمار می‌آید و در این راستا استفاده از اطلاعات ساماندهی شده در اینترنت را باید بعنوان شروعی بر این مهم پذیرفت. در واقع به طور روزافزون بر سرعت ورود داده‌های زیستی که توسط محققان مختلف در سراسر دنیا انجام می‌پذیرد، افزوده می‌شود که ماحصل آن حجم بسیار زیاد اطلاعات زیستی است که در پایگاه‌های جهانی به ثبت می‌رسند. به طوری که در حال حاضر تولید اطلاعات ژنتیکی بالغ بر ۱۰۰۰ جفت باز در ثانیه رسیده و حجم داده‌ها در بانک جهانی ژن هر ۱۰ ماه دو برابر می‌شود. اطلاعات ژنومی، نحوهٔ بیان ژن‌ها، توالی DNA و پروتئین، عوامل رونویسی، ساختار سه بعدی RNA و پروتئین، جهش‌ها، مسیرهای متابولیکی و ... همگی از جمله این اطلاعات هستند. پایگاه‌های داده‌های زیستی به دو گروه اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند، نوع اول شامل توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه و نوع دوم حاوی اطلاعات به‌دست آمده از پایگاه‌های اولیه‌اند. بانک جهانی ژن بعنوان اولین پایگاه اطلاعات در سال ۱۹۸۳ با پنج توالی شروع به کار کرد و در حال حاضر بیش از ۸۰ میلیون رکورد را در خود جای می‌دهد، این پایگاه در آمریکای شمالی توسط مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی

(NCBI)[1] سرپرستی می‌شود. دو پایگاه دیگر یکی آزمایشگاه زیست مولکولی اروپا[2](EMBL) در اروپا و دیگری بانک اطلاعاتی DNA ژاپن[3](DDBJ) در آسیاست. این سه پایگاه، که از مهمترین منابع اولیه اطلاعات زیستی در جهان محسوب می‌شوند، به طور مداوم و روزانه در حال تبادل داده‌های خود با یکدیگر هستند. به طور حتم محقق باید بداند چه موضوعی را جستجو می‌کند. وقتی کاربر به بانک اطلاعاتی می‌رسد باید بداند آیا بانک داده، اطلاعات مورد نیاز را دارد و چطور می‌توان این اطلاعات به دست آمده را به شکلی سودمند در کنار یکدیگر قرار داد و در کدام بانک اطلاعات مورد نظر ذخیره شده است.

بیشترین موارد کاربرد داده‌ها، توالی‌های نوکلئوتیدی است. نمونه‌ای از این پایگاه، بانک ژن [4] است که در بردارندهٔ ترادف‌های نوکلئوتیدی (توالی‌های اسیدهای آمینه، اطلاعات ژنوم و...) است و در واقع ائتلافی است بین سه پایگاه اطلاعاتی ذکر شده، در NCBI برای مقایسه توالی‌ها[5] از بلاست استفاده می‌شود. این اطلاعات بسته به هدف محقق برای تعیین ژن‌های منتخب بسیار مفید هستند.

پس در یک نگاه، باید باور داشت که فن‌آوری زیستی با سرعتی بسیار زیاد در حال طی مسیر بوده و پر واضح است که آشنایی با داده‌پردازی‌های زیستی مبنای ورود در این عرصه از علم می‌باشد.

۱. بیولوژی مولکولی در تشخیص کرم‌ها و آلودگی‌های کرمی

۱-۱) *اکینوکوکوس گرانولوزوس*

اکینوکوکوز- هیداتیدوز در زمرهٔ آلودگی‌های انگلی بسیار مهم نشخوارکنندگان است که به دلیل ضبط اندام‌های آلوده باعث خسران اقتصادی شدیدی می‌شود؛ اضافه بر آنکه تبعات بهداشتی آن نیز قابل تأمل است. از مدت‌ها قبل ۱۰ سویه برای این انگل تعیین شده بود ولی اخیراً بر اساس تبار ژنتیکی سویه‌ها، تقسیم‌بندی دیگری به صورت *E. granulosus sensustricto* (G۱-G۳), *E. equines* (G۴), *E. Canadensis* (G۶-G۱۰), *E. Ortleppi* (G۵)، گزارش شد (Nako و همکاران، ۲۰۰۲). سویه‌ها از نظر ویژگی‌های متعدد با یکدیگر اختلافات اساسی دارند (Thompson و McManus، ۲۰۰۲) که به‌حتم می‌تواند بر بیماری‌زایی، تشخیص و درمان بیماری تأثیرگذار باشد. اولین بار در ایران بر اساس ریخت‌شناسی پروتواسکولکس و رشد کرم بالغ در میزبان اصلی (Hosseini و Eslami ، ۱۹۹۸)، همچنین ساختار ژنی انگل با استفاده از ژنوم میتوکندریایی (Zhang و همکاران، ۱۹۹۸)، دو سویه سگ-گوسفند (مشترک بین گوسفند، بز و گاو) و سویهٔ سگ-شتر (مخصوص شتر) تشخیص داده شد. در مطالعات بعدی که با استفاده از روش‌های مختلف مولکولی در ایران انجام گرفت، وجود دو سویه تأیید گردید، ولی نشان داده شد که در ایران سویهٔ سگ- شتر برای انسان آلوده کننده است (Harandi و همکاران، ۲۰۰۲). در بررسی‌های اخیر بر اساس ژن سیتوکرم اکسیداز، سویه گاومیش از آذربایجان غربی گزارش شده است (Aminpour و همکاران، ۲۰۱۱).

۲-۱) *فاسیولا*

فاسیولا، یکی از انگل‌های شایع نشخوارکنندگان و به میزان کمتری تک‌سمیان در ایران است که از گراز هم گزارش شده است (اسلامی، ۱۳۸۵). بنا بر مستندات سازمان بهداشت جهانی فاسیولیازیس انسانی یک بیماری کرمی و بومی ایران به شمار می‌آید که در برخی مناطق، از جمله استان‌های اطراف دریای خزر، در انسان و دام از شیوع بالاتری برخوردار است (Eslami و همکاران، ۲۰۰۹). بررسی کشتارگاهی، شناورسازی تخم کرم در مدفوع و روش‌های ایمنی‌شناسی نظیر الایزا برای تشخیص بیماری در انسان و دام مورد استفاده قرار می گیرند (Meshgi و همکاران، ۲۰۰۷; Salimi Bejestani و همکاران، ۲۰۰۵). دو گونهٔ شایع *فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا* در ایجاد این بیماری دخالت دارند. تشخیص گونهٔ انگل با استفاده از روش‌های انگل‌شناسی و سرم‌شناسی امکان‌پذیر نیست. علاوه بر آن هویت گونهٔ جدیدی که از نظر ریخت‌شناسی با دو گونهٔ موجود فرق دارد، تحت شناسایی قرار گرفته است. اختلافات ریختی این دو گونه و گونهٔ حدواسط، محققان ایرانی را بر آن داشت تا در مورد ساختار ژنتیکی گونه‌های *فاسیولا* مطالعاتی انجام دهند. در بررسی Rokni و همکاران، (۲۰۱۰) که بر اساس ژن ITS۱ و روشPCR-RFLP صورت پذیرفت، مشخص شد که گونه‌های حدواسط *فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگلانتیکا* از نظر ژنتیکی ویژگی خاصی ندارد و مانند دو

1- National Center Bioinformatic (NCBI)
2- European Molecular Biology Laboratory (EMBL)
3- DNA Data Bank of Japan (DDBJ)
4- Gen Bank
5 - Sequence alignment

گونهٔ دیگر هستند. در مطالعهٔ دیگری در همین زمینه، تنوع ژنتیکی *فاسیولا هپاتیکا* در سه جدایه گاو، گوسفند و گاومیش با روش RAPD-PCR تحت بررسی قرار گرفت (Meshgi و همکاران، ۲۰۰۸). ولی بررسی الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های بدنی دو گونه *فاسیولا* از وجود اختلافاتی در این پروتئین‌ها در میزبان‌های مختلف حکایت دارد (مشگی و همکاران، ۱۳۸۶).

۳-۱) *دیکروسلیوم دندریتیکم*

در مقایسهٔ با *فاسیولا* تحقیقات اندکی در مورد دیکروسلیازیس در ایران و دنیا انجام شده است. اگرچه باید به شیوع بالای آلودگی در اکثر مناطق کشور و ضرر و زیان اقتصادی ملموس آن اعتقاد داشت. میزان خسارت اقتصادی سالیانهٔ این کرم کبدی در آذربایجان شرقی (فیروزوند و همکاران، ۱۳۸۸) سه میلیارد ریال برآورد شده است. ابتلا به *دیکروسلیوم دندریتیکم* در نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ شایع بوده و در بیشتر موارد تشخیص به صورت کشتارگاهی و در بازرسی کبد انجام می‌گیرد. در چندین بررسی جامع توسط (Otranto و Traversa، ۲۰۰۲) به وجود پیچیدگی‌های اختصاصی در این ترماتود کبدی تأکید شده است، که می‌تواند به چرخهٔ زندگی، بیماری زایی مبهم به همراه اختلالات ناشی از مهاجرت و بلوغ انگل در بافت کبدی، استقرار تعداد بیشماری کرم بالغ در کبد میزبان آلوده و یا بیمار، مربوط باشد. ضمناً وجود پلی‌مورفیسم بر اساس اندام‌های مختلف (طائفی نصرآبادی و همکاران، ۱۳۸۷)، ساختار پروتئینی (Meshgi و همکاران، در حال چاپ) و تنوع ژنی با استفاده از ترادف نوکئوتیدی دو ژن ITS۲ و COX۱ (مشگی و جالوسیان، در حال انجام) در مورد این ترماتود می‌تواند گویای برخی جنبه‌های ناشناخته در بیولوژی و فیزیولوژی انگل و تأثیر آن بر اپیدمیولوژی انگل باشد.

۴-۱) *گونژیلونما پولکروم*

گونژیلونما پولکروم، نماتودی غیر بیماری‌زا است که به صورت زیگزاگ در داخل مخاطات مری زندگی می-کند. در ایران از همهٔ نشخوارکنندگان (اسلامی، ۱۳۸۵)، همچنین انسان (Molavi و همکاران، ۲۰۰۶) گزارش شده است. به نظر می‌رسد این نماتود همانند بسیاری از انگل‌های دیگر دچار پلی‌مورفیسم شده است، به‌همین دلیل ساختار ژنی آن برای اولین بار در دنیا بر اساس توالی DNA ریبوزومی توسط (Halajian و همکاران، ۲۰۱۰) بررسی شد. در مطالعهٔ انجام شده، توالی ژن‌های ITS1, 5/8srDNA, ITS2 و قسمت زیادی از ژن 28srDNA بررسی و مشخص شد که ناحیهٔ ITS1 تفاوتهای فراگونه‌ای با دیگر جدایه آن در گاو (از ژاپن) دارد، اما در سایر توالی‌های تحت بررسی چنین اختلافی وجود نداشت.

۲) تولید پروتئین نوترکیب

از دیگر کاربردهای روش‌های مولکولی باید به بیان پروتئین‌های نوترکیب اشاره کرد. در این خصوص در ایران زیر واحد ۱۶ کیلو دالتونی آنتی‌ژن B با منشاء مایع کیست هیداتیک به صورت نوترکیب تهیه شده است. تهیهٔ آنتی‌ژنB ، که آنتی‌ژن تجاری در کیت های تشخیص سرمی هیداتیدوز است، نیاز به جمع‌آوری مقادیر بسیار زیادی مایع کیست دارد. از طرفی آنتی‌ژن B به دست آمده بسیار ناچیز است، بنابراین استخراج این پروتئین در مقادیر زیاد مقرون به صرفه نبوده و علاوه بر این تخلیص آنتی‌ژن حاصل و حذف ایمنوگلوبولین‌های میزبانی در این روش به طور کامل امکان پذیر نیست؛ در حالی که تهیهٔ آنتی‌ژن نوترکیب کاملاً خالص و در مقیاس زیاد مقرون به صرفه است (Abdi و همکاران، ۲۰۱۰). ضمناً واکسن نوترکیب EG۹۵ علیه کیست هیداتیک تهیه شده است که در ایران مورد استفاده قرار نگرفت (Lightowlers و همکاران، ۱۹۹۹). باتوجه به چالش‌های موجود و به دلیل واکنش‌های متقاطع آنتی‌ژن‌های تشخیصی کیست هیداتیک و پتانسیل موجود برای ساخت و تولید آنتی‌ژن‌های نوترکیب در ایران، به نظر می‌رسد باید کاربردی شدن و تجاری‌سازی آنتی‌ژن‌های نوترکیب و افزایش حساسیت و ویژگی روش‌های سرمی در تشخیص کیست هیداتیک را در الویت‌های تحقیقاتی قرار داد.

۳- مقاومت دارویی

یکی از مشکلات عمده در پروش دام‌ها، بویژه دام‌هایی که گوشت و سایر فراورده‌های آنها به مصرف تغذیه جمعیت‌های انسانی می‌رسد، ایجاد مقاومت نماتودها و ترماتودها در برابر داروهای ضدکرمی است. در برخی از مناطق دنیا نماتودها علیه تعداد زیادی از خانواده‌های دارویی موجود در بازار مقاوم شده اند.

برابر آلبندازول و لوامیزول صورت گرفته است. بررسی انجام گرفته با استفاده از روش‌های بیولوژی مولکولی و ژن بتا توبولین در برخی گله‌های شوشتر واقع در استان خوزستان مقاومت در برابر آلبندازول گزارش گردید (Golamian و همکاران، ۲۰۰۷). بررسی‌های انجام گرفتهٔ بعدی توسط روش PCR-RFLP نشان داد، اگرچه برخی جدایه‌های *تلادورساژیا سیرکومسینکتا* در برابر آلبندازول، مقاوم و برخی حساس هستند (Shayan و همکاران،۲۰۰۷) ولی در *همونکوس کونتورتوس* هنوز مقاومت دارویی دیده نشده است (Nabavi و همکاران، ۲۰۱۱).

نتیجه‌گیری

دستیابی به اطلاعات ژنومی کرم‌هایی مانند *سنورابدیتیس الگانس* مسیر جدیدی را برای پیشرفت‌های علوم زیست مولکولی انگل‌ها و روش‌های تشخیص و کنترل آنها در بردارد. پیشرفت این علم یاری‌کنندهٔ محققان در ارتباط با بیولوژی انگل‌ها و کمک به تشخیص صحیح و کنترل انگل‌های کرمی است. روش‌های جدید مانند ریزآرایه‌های DNA و Real-time PCR بسرعت اطلاعات جدید در مورد ژنوم انگل را در اختیار قرار می‌دهند تا محققان از آن بهره‌برداری کنند و واکسن های نوترکیب ضد کرمی طراحی کنند و یا در جهت رفع مسائل جدید (مانند مقاومت دارویی) که دنیای امروز با آن روبه روست، از این روش‌های نوین استفاده نمایند. تشخیص و پایش موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت دارویی، از اولویت‌های تحقیقاتی است که با استفاده از ابزارهای مولکولی و پتانسیل موجود در ایران قابل انجام است و محققان با تکیه بر اطلاعات روزآمد شده از تحقیقات میدانی باید حضور این موتاسیون‌ها را در جمعیت‌های انگلی مورد بررسی قرار دهند.

یکی از مهمترین مشکلات در حوزهٔ روش‌های مولکولی در کرم‌شناسی، استخراج DNA از کرم‌هاست. درنماتودها به دلیل پوشش کوتیکولی سطح بدن و در سستودهای پسودوفیلیده، به دلیل بافت سینسیتیال، استخراج DNA همچنان با مشکلاتی همراه است. در بررسی پدیده های زیست مولکولی کرم های انگلی، نه تنها شناسایی گونه‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است بلکه باید به آلودگی نمونه-های DNA با دیگر ارگانیسم ها مثل DNA میزبان و منابع غذایی هم توجه داشت؛ چراکه این موضوع می تواند باعث جداسازی و تعیین توالی اشتباه یک ژن شود. ژن‌هایی که در روند تکامل بشدت محافظت شده‌اند، هم در بین گونه‌ها و هم در رده‌های بالاتر طبقه‌بندی (مثل فوق شاخه) تحت این حفاظت قرار دارند و پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ممکن است به طور تصادفی باعث تکثیر DNA های سایر آلودگی‌ها یا منابع غذایی گردد و این موضوع بخصوص در مورد نمونه های موزه‌ای باید مدنظر قرار گیرد. در حال حاضر امکان تکثیر ژن هایی از نمونه های فرمالینه وجود دارد، اما وجود مقادیر کمی DNA آلوده کننده، یا آلودگی با DNA قارچ‌های همزیست که بیشتر در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی وجود دارد، می‌تواند موجب بروز اشتباه در تشخیص صحیح شود.

در این مطالعات در گام اول باید ژن منتخب برای هدف مورد نظر شناسایی شود. تغییرات ژنتیکی را می‌توان هم در هسته و هم در میتوکندری بررسی کرد. آن دسته از ژن‌هایی که بسرعت تکامل می‌یابند برای تحلیل جمعیت و آنالیز گونه‌های نزدیک به یکدیگر و گروهی که با روندی آهسته‌تر به تکامل می‌رسند، برای آنالیز در سطوح بالاتر، طبقه‌بندی می شود و ارتباط کرم‌های گرد با سایر شاخه‌ها و یا ارتباطات داخل راسته‌ای تحت انتخاب و بررسی قرار می‌گیرند. با مطالعهٔ ژن‌هایی که به آرامی به تکامل می‌رسند، می‌توان تغییراتی را که طی یک دورهٔ طولانی اتفاق افتاده است، مشخص کرد ولی تغییراتی که در مقطع زمانی کوتاهی اتفاق می افتد قابل شناسایی نیستند. ژنوم هسته از تعدادی کروموزوم خطی ساخته شده است و بیشتر ترادف‌های مربوط به این ژنوم غیرقابل ترجمه است، از طرفی، نواحی غیرقابل ترجمه کمتر در معرض تغییرات قرار می‌گیرند. مناطقی از ژنوم که جایگاه های فعال آنزیم‌ها یا سایر پروتئین ها را کد می کنند تحت محافظت قرار دارند، البته امکان ایجاد موتاسیون خودبه خودی در آنها وجود دارد. برخی از ترادف های کدکنندهٔ پروتئین در هسته، دارای کپی تک بوده و به همین دلیل باید بشدت محافظت شوند؛ ولی از آنجا که فقط یک کپی از آنها در هسته وجود دارد، برای مقایسه ارگانیسم ها مناسب نیستند (Harnett وkennedy ، ۲۰۰۰). ترادف‌های ژنی کدکنندهٔ آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا، که تعداد کپی آنها در هسته کم است، بعنوان ژن‌های منتخب برای ساخت واکسن به¬کار می‌روند؛ برای مثال ژن کدکنندهٔ گلوتانیون S ترانسفراز برای ایجاد محافظت در چهار گونه *شیستوزوما* مقایسه شده‌اند (Prichard Tait ، ۲۰۰۰).

ژن‌های کدکنندهٔ RNA ریبوزومی برای مطالعات تاکسونومیک کاربرد دارند. این نواحی شامل مناطق حفاظت شده کامل تا متغیر هستند، لذا امکان پیداکردن ناحیه‌ای برای مطالعات تکاملی و رده‌بندی موجودات وجود دارد (kennedy وHarnett ، ۲۰۰۰). از بررسی ترادف RNA ریبوزومی هسته، برای یافتن ارتباط بین گونه‌ها و سویه‌های جنس *اکینوکوکوس* و سایر سستودهای خانواده تنیده استفاده می‌شود.

در مطالعات مولکولی که با هدف بررسی روند تکامل انجام می‌گیرد، می‌توان از ژنوم میتوکندری استفاده کرد. این ژنوم کوچک و حلقوی است که به طور مادرزادی و بدون وابستگی به ژنوم هسته به ارث می‌رسد؛ لذا مطالعهٔ آن منعکس کنندهٔ ارتباطات ژنی و تاریخچهٔ تکاملی است. ترادف ژنوم میتوکندری بدون اینترون و بسیار کوچک است ولی توانایی کدکردن ندارد. ژن‌های میتوکندری در مهره‌داران تقریباً ۱۰-۵ بار سریع تر از ژن‌های هسته ظاهر می‌شوند؛ بنابراین یکی از مزایای استفاده از ژنوم میتوکندری ظاهرشدن سریع آنهاست. نوترکیبی ژنتیکی در ژنوم میتوکندری اتفاق نمی‌افتد و باتوجه به وجود نواحی حفاظت شدهٔ بسیار قوی، انتخاب این ژنوم برای مطالعات تکاملی مفید است که مثال بارز آن مطالعات تکامی و طبقه‌بندی *اکینوکوکوس* است که از دو قطعهٔ سیتوکروم اکسیداز ۱ و NA دی دهیدروژناز۱ استفاده می‌شود. این مطالعات مولکولی به موازات مطالعات ریخت‌شناسی در انگل‌شناسی کرم‌ها به کار گرفته می‌شوند.

استفاده از دانش مولکولی و ابزارهای آن در تحقیقات انگل‌شناسی اجتناب‌ناپذیر است. آموزش و کاربرد روش‌های مولکولی و سایر روش های جدید باید در سرفصل دروس انگل‌شناسی قرار گیرد. در ایران با وجود توانایی محققان، امکان دسترسی و پتانسیل به کارگیری روش‌های نوین مولکولی در انگل‌شناسی کرم‌ها فراهم شده و امید است در آینده ضمن حفظ ارزشمندی روش‌های فیلدی بتوان از این روش‌ها در جهت پیشبرد اهداف و فرضیات مورد نظر گام برداشت.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 3 (2011) 81-90

Application of molecular biology in diagnosis of helminth and helminth infections in Iran

Jalosian, F.[1], Meshgi, B.[1*], Eslami, A.[2], Salimi-Bajestani, M.R.[3]

Received: 28.11.2011 Accepted: 31.12.2011

Abstract

In our scientific world, one can consider the close relationship between different sciences such as mathematic and medical sciences, physics and astronomy and so on. Therefore based on molecular biology, mathematics and internet, new fields of researches are developed. In Iran, comprehensive studies have been carried out on diagnosis of infectious organisms such as parasites based on morphological characteristics. But application of molecular biology in different sciences including parasitology still is in its infancy. Then in order to give some ideas to the interested researchers, especially young ones, brief presentation of how to access to the different sources for receiving the required information in genetic such as Gene Bank and the scientific works carried out in Iran in different fields including helminths and helminths infections seemed to be a necessity. Accordingly, different researches carried out in the field of helminthology in Iran such as identification of two distinct strains of *Echinococcus*, e,g, sheep –dog and camel – dog strains; development of an antigen and vaccine based on recombinant technique; genetic similarity between *Fasciola hepatica*, *F. gigantica* and newly found isolate morphologically different with two known species; determination of genetic structure of *Gongylonema pulchrum* of cattle for the first time in the world and its comparison with that of Japan and showing that their sequences of rDNA were similar to each other except in ITS1 region; genetic polymorphism in *Dicrocoelium dendriticum*; resistance and its absence to benzimidazoles in *Haemonchus contortus* using PCR-RFLP and the existence of some resistance and susceptible isolates of *Teladorsagia circumcincta* to albendazole. The aim of this study was to provide provisional introduction to young researchers about Gen Banks and also about those researches which is done on identification of helminth and their resistance to different drugs by molecular biology in Iran.

Key words: Diagnosis, Helminthes, Molecular Biology.

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

2. Department of Parasitology, School of Specialized Veterinary Sciences, Sciences and Research Unit, Islamic Azad University, and Fellow Academy of Sciences IR, Iran.

3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: bmeshgi@ut.ac.ir

منابع

اسلامی، ع. ۱۳۸۵. کرم‌شناسی دامپزشکی، جلد سوم، نماتودا و آکانتوسفالا، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران.

اسلامی، ع.؛ فیضی، ع. ۱۳۵۴. بررسی کرم‌های دستگاه گوارش بز در ایران. نامه دانشکده دامپزشکی. **۳۱**، ۶۸–۷۷.

علیایی، ع.، اسلامی، ع.، بکائی، س.، حقوقی‌راد، ن. ۱۳۸۷. بررسی پلی‌مورفیسم نماتودهای شیردان، خانواده تریکوسترونژیلیده در نشخوارکنندگان کازرون. مجله علوم دامپزشکی. ۳، ۴۸۶–۴۸۸.

فیروزوند، ی.؛ اسلامی، ع؛ بکائی س. ۱۳۸۸. بررسی اهمیت اقتصادی دیکروسلیازیس شخوارکنندگان کوچک در استان آذربایجان شرقی. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. **۹(۳)** ۳۱–۳۶.

طایفی–نصرآبادی، ن.، اسلامی، ع؛ بکائی س. ۱۳۸۷. پلی‌مورفیسم *دیکروسلیوم دندریتیکم* در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی ایران. مجله علوم دامپزشکی. **۵۰**، ۴۲۳ – ۴۲۸.

مشگی، ب.؛ اسلامی، ع.؛ همت زاده، ف. ۱۳۸۶. شناسایی پادگن‌های بدنی و دفعی ترشحی *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* توسط SDS–PAGE. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران. **۲۲(۱)**، ۷۷ – ۸۰.

Abdi, J., Kazemi, B., Haniloo, A., Mohebali, M., Mahmoudi, M., Rezaei, S., Bandehpour, M., Maghen, L., Rokni, M.B. 2010. Serological Evaluation of EgAgB16 kDa, a Recombinant Antigen from *Echinococcus granulosus* for Diagnosis of Human Hydatidosis. Iranian Journal of Parasitology. **5(3)**, 1-10.

Amin Pour, A., Hosseini, S.H., Shayan, P. 2011. Comparative genotyping of *Echinococcus granulosus* infecting buffalo in Iran using cox1 gene. Parasitology Research. **108**, 1229–1234.

Eslami, A., Fakhrzadegan, F. 1972. Les nematodes du tube digestif des bovines en Iran. Review Elev Veterinary Tropical. **25,** 527-529.

Eslami, A., Farsad Hamdi, S. 1992. Helminth parasites of wild boar, sus scrofa in Iran. Journal of wildlife Disease. **28**, 316-318.

Eslami, A., Hosseini, S.H., Meshgi, B. 2009. Animal fasciolosis in North of Iran. Iranian Journal of Public Health. **38(4)**, 132-135.

Eslami, A., Nabavi, I. 1976. Species of gastro-intestinal nematodes of sheep from Iran. Bulletin Society of Pathology. **69,** 92-95.

Gholamian, A., Galehdari, H., Eslami, A., Nabvi.L. 2007. Study of ß- tubuline gene polymorphysm in *Haemonehus contortus* isolated from sheep populations in khuzestan, south western Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University. **8(3)**, 239-242.

Halajian, A., Eslami, A., Salehi, N., Ashrafi-Helan, J., Sato, H. 2010. Incidence and genetic characterization of *Gongylonema pulchrum* in cattle slaughtered in Mazandaran province, Northern Iran. Iranian Journal of parasitology. **5(2),** 10-18.

Harandi, M.F., Hobbs, P.J., Adams, R.P., 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. Parasitology. **125**, 367–373.

Hoseini, S. H., Eslami, A. 1998: Morphological and developmental characteristics of *Echinococcus granulosus* derived from sheep, cattle and camel in Iran. Journal of Helminthology. **72**, 337-341.

Jalousian, F., Dalimi, A., Mirab Samiee, S., Ghaffarifar, F., Soleymanloo, F., Naghizadeh, R. 2007. Application of Real–Time PCR for detection of pfcrt single nucleotide polymorphisms in Plasmodium falciparum in southeast Iran. Journal of Medical Sciences. **7 (7)**, 1082-1087.

Jalousian, F., Dalimi, A., Samiee, S.M., Ghaffarifar, F., Soleymanloo, F., Naghizadeh, R. 2008. Mutation in pfmdr1 gene in chloroquine-resistant Plasmodium falciparum isolates, Southeast Iran. International Journal of Infection Disease. **12(6),** 630 – 634.

Kennedy, M.W., Harnett, W. 2000. Parasitic Nematodes, 2nd ed. CABI publishing, UK. 317-397.

Lightowlers, M.W., Jensen, O., Fernandez, E., Iriarte, J.A., Woollard, D.J., Gauci, C. G., Jenkins, D.J., Heath, D.D. 1999. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. International Journal for Parasitology. **29**, 531-534.

Meshgi, B., Eslami, A., Nasrabadi, T. 2009. Determination of electrophoretic pattern of Dicrocoelium *dendriticum* somatic antigens in different hosts. (In Press)

Meshgi. B., Eslami, A., Shayan, P. 2007. Evaluation of Dot-ELISA for serodiagnosis of fasiolosis in naturally infected sheep. Journal of Applied Animal Research. **31**, 89-91.

Meshgi, B., Karimi, A. and Shayan, P. 2008. Genetic variation of *Fasciola hepatica* from sheep, cattle and buffalo. Research Journal for Parasitology. **3 (2)**, 71-78.

Molavi, G.H., Massoud, J., Gutienez, Y. 2006. Human *Gongylonema* infection in Iran. Journal of Helminthology. **80**, 425-428.

Nabavi, R., Shayan, P., Shokrani, H. R., Eslami, A., Bokaie, S. 2011. Evaluation of Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using comparative PCR-RFLP methods. Iranian Journal Parasitology. **6 (2),** 45-53.

Nakao, M., Yokoyama, N., Sako, Y., Fukunaga, M., Ito, A. 2002. The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidea: Taeniidae). Mitochondrion. **1(6),** 497-509.

Otranto, D., Traversa, D. 2002. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. Veterinary Parasitology. **107,** 317-335.

Prichard, P., Tait, A. 2001. The role of molecular biology in veterinary parasitology. Veterinary Parasitology. **98**, 169–194.

Rokni, M.B., Mirhendi, H., Mizani, A., Moheali, M., Sharbatkhori, M., Kia, E.B., Abdoli, H., Izadi, S. 2010. Identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using a simple PCR-restriction enzyme method. Experimental Parasitology. **124**, 209-213.

Salimi-Bejestani,M.R.,McGarry,J.W.,Felstead,S.,Ortiz,P.,Akca,A.,Williams,D.J.L.2005.Development

of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. Research in Veterinary Science. **78**, 177 – 181.

Shayan, P., Eslami, A., Borji, H. 2007. Innovative restriction site created PCR-RFLP for detection of bnzimidazole resistance in *Teladorsagia Circumcincta*. Parasitology Research. **100(5)**,1063-1068.

Thompson, R.C. and McManus, D.P. 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *echinococcus.* Trends in Parasitology. **18**, 452–457.

Zhang, L,. Eslami, A., Hosseini, S.H., McManus, D.P. 1998. Identification of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. American Journal of Tropical Medicine and Hygeine. **59(1),** 171-174.