



## Molecular Investigation of Bovine Hydatid Cyst Strains from A Slaughterhouse in Zabol, Southeast of Iran

Nahid Ozbakzaee<sup>1</sup> , Maryam Ganjali<sup>2</sup> , Fereshteh Mirshekar<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>2</sup> Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>3</sup> Member of Young and Elite Researchers Club, Zabol Branch, Islamic Azad University, Zabol, Zabol, Iran

Received: 22 Oct 2025, Reciver in revised from: 10 Dec 2025, Accepted: 23 Dec 2025, Available online: 18 Mar 2026

 [10.22059/jvr.2025.385638.3467](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.385638.3467)

J Vet Res, Volume 81, Number 1, 2026, 1-11

### Abstract

**BACKGROUND:** Hydatid cyst, caused by the larval stage of the cestode *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*) is one of the most significant zoonotic diseases and a major global public health concern. In endemic regions, this parasite exhibits substantial genetic diversity in its biological characteristics. To date, 10 distinct genotypes of *E. granulosus* (G1–G10) have been identified. Studies worldwide demonstrate that the genotypic variation and complex nature of *E. granulosus* influence the parasite's life cycle, transmission pathways, pathogenicity, antigenicity, immunogenicity, drug response, epidemiology, and disease control strategies.

**OBJECTIVES:** This study aimed to perform a molecular characterization of bovine hydatid cyst strains collected from a slaughterhouse in Zabol, south of Iran.

**METHODS:** This study was conducted in the autumn and winter of 2022 on 50 samples with a definitive diagnosis of hydatid cyst collected from a slaughterhouse in Zabol city. DNA was extracted from protoscolices and germinal layers, followed by PCR amplification of the ITS2 gene. The PCR products were then digested with the restriction enzyme HpaII and the samples were sequenced.

**RESULTS:** The PCR product ITS2 was 750 bp in size and was digested with HpaII restriction enzymes. According to the Restriction fragment length polymorphism analysis, the isolates belonged to a single species named *E. granulosus* sensu stricto (G1–G3 complex) and sequencing also confirmed the results.

**CONCLUSIONS:** Based on the determination of parasite genotypes in the region, a sheep transmission pattern is proposed, which can provide the appropriate prevention pattern according to the life cycle of the parasite.

**Keywords:** HpaII, Hydatid cyst, Protoscolex, PCR-RFLP, Strain

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

**Corresponding author:** Maryam Ganjali, Tel/Fax: +9854-31232279 / +9854-31232251



### How to cite this article:

Ozbakzaee N, Ganjali M, Mirshekar F. Molecular investigation of bovine hydatid cyst strains from a slaughterhouse in Zabol, southeast of Iran. *Journal of Veterinary Research*, 2026; 81(1): 1-11. doi: 10.22059/jvr.2025.385638.3467

### Figure Legends and Table Captions

**Figure 1.** PCR products for rDNA-ITS2 of protoscolices on agar gel. N: Negative control; P: Positive control; M: 100-bp ladder DNA marker; band weight = 750 bp.

**Figure 2.** PCR-RFLP of ITS2 gene using the restriction endonuclease HpaII. M: 100-bp DNA ladder; band weight = 360 and 390 bp.

**Figure 3.** Phylogenetic relationship of ITS2 gene sequences with other sequences available in the GenBank using the neighbor-joining method, performed in MEGA X software.



## بررسی مولکولی سویه‌های کیست هیداتیک گاوی در زابل، جنوب شرق ایران

ناهید ازبک‌زایی<sup>۱</sup>، مریم گنجعلی<sup>۲</sup>، فرشته میرشکار<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

<sup>۲</sup> گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

<sup>۳</sup> عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۳۰ مهر ۱۴۰۴، تاریخ بازنگری: ۱۹ آذر ۱۴۰۴، تاریخ پذیرش: ۲ دی ۱۴۰۴، تاریخ انتشار: ۲۷ اسفند ۱۴۰۴

doi: 10.22059/jvr.2025.385638.3467

دوره ۸۱، شماره ۱، ۱۴۰۴، ۱-۱۱

### چکیده

**زمینه مطالعه:** کیست هیداتیک از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که توسط مرحله نوزادی سستود/کینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود و یک مشکل عمده بهداشت عمومی در سراسر جهان است. معمولاً در مناطقی که بیماری آندمیک است، از لحاظ بیولوژی تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی در انگل وجود دارد. تاکنون ۱۰ ژنوتیپ مجزا از این انگل (G10-G1) گزارش شده است. مطالعات انجام‌شده در مناطق مختلف دنیا نشان می‌دهد تنوع ژنوتیپی و ماهیت کمپلکس/کینوکوکوس گرانولوزوس بر چرخه زندگی انگل، مسیرهای انتقال، بیماری‌زایی، آنتی‌ژنیسیته، ایمنی‌زایی، پاسخ به داروها، همه‌گیرشناسی و کنترل این بیماری تأثیرگذار است.

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی مولکولی سویه‌های کیست هیداتیک گاوی در منطقه زابل انجام شده است.

**روش کار:** این مطالعه در پاییز و زمستان سال ۱۴۰۱ بر روی ۵۰ نمونه کیست هیداتیک اخذشده از کشتارگاه زابل انجام شد. بعد از استخراج DNA از پروتو اسکولکس و لایه زایا، آزمایش PCR ژن ITS2 صورت گرفت. سپس محصول PCR توسط آنزیم HpaII مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و نمونه‌ها تعیین توالی شدند.

**نتایج:** اندازه قطعه ITS2 تکثیرشده ۷۵۰ جفت باز بود. الگوی قطعات به‌دست‌آمده از محصول PCR-RFLP وجود *E. granulosus sensu stricto* (G1- G3 complex) را نشان داد و تعیین توالی هم نتایج هضم آنزیمی نمونه‌ها را تأیید کرد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** با مطالعه و تعیین ژنوتیپ‌های انگل در منطقه براساس میزبان، الگوی انتقال گوسفندی مطرح است که می‌توان الگوی پیشگیری مناسب را با توجه به چرخه زندگی انگل ارائه داد.

**کلمات کلیدی:** آنزیم HpaII، پروتواسکولکس، PCR-RFLP، سویه، کیست هیداتیک

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: مریم گنجعلی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

### مقدمه

کیست هیداتیک یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان در بسیاری از مناطق دنیا، از جمله ایران است که توسط مرحله نوزادی سستود/کینوکوکوس گرانولوزوس (*Echinococcus Granulosus*) ایجاد می‌گردد. کرم بالغ در روده سگ و سگ‌سانان (میزبان نهایی) استقرار دارد و انسان و دام‌ها که نقش میزبان واسط انگل را دارند با خوردن تخم دفع‌شده با مدفوع سگ به مرحله لاروی انگل یا کیست هیداتیک مبتلا می‌شوند. میزبان نهایی زمانی به انگل آلوده می‌شود که امعا و احشای علفخواران آلوده به کیست هیداتیک را بخورد. این علفخوار می‌تواند گوسفند، بز، گاو، شتر، خوک یا سایر علفخواران وحشی باشد. انسان به‌صورت تصادفی همانند دام‌ها با خوردن آب یا مواد غذایی و سبزیجات که به تخم‌های این انگل آلوده باشد یا از طریق تماس با حیوانات آلوده و یا خاک‌خواری به این انگل مبتلا می‌شود. این بیماری در انسان به‌دلیل ابتلای اعضای حساس و حیاتی بدن، مانند

کبد، ریه و انجام عمل‌های جراحی و در دام از نظر غیرقابل مصرف بودن احشای آلوده، موجب خسارات بهداشتی و اقتصادی زیادی می‌شود (۱، ۲).

معمولاً در مناطقی که بیماری اندمیک است، از نظر بیولوژی، تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی در *اکینوкокوس گرانولوزوس* وجود دارد (۲). مطالعات متعدد ثابت کرده‌اند در این مناطق، *اکینوкокوس* به صورت کمپلکسی از سویه‌های مختلف وجود دارد که این تنوع ممکن است بر روی اپیدمیولوژی و بیماری‌زایی کیست هیداتیک اثر بگذارد (۳). *اکینوкокوس گرانولوزوس* دارای ۱۰ سویه (*G1-G10*) است (۴، ۵) که ۷ سویه آن می‌تواند انسان را درگیر کند (۶). کمپلکس (*G1-G3*) *E. granulosus sensu stricto* علاوه بر انسان در گوسفند، گاو، بز، بوفالو، شتر و خوک، ژنوتیپ *G4* در اسب و الاغ، ژنوتیپ *G5* در گوسفند، بز، گاو، بوفالو، خوک و انسان و کمپلکس *E. canadensis* (*G6-G10*) گزارش شده است. این کمپلکس به ۲ ژنوتیپ مجزای *G8* *E. canadensis* (*G10*)، در گوزن و انسان و *E. intermedius* (*G6, G7*) در خوک، گاو، گوسفند، بز و انسان تقسیم شده است (۷، ۸). رایج‌ترین سویه زئونوز انسانی در اکثر کشورها، شامل جنوب و شرق اروپا، شمال و شرق آفریقا، قسمت‌هایی از آسیا، استرالیا و جنوب آمریکا (آرژانتین) *G1* (سویه گوسفندی) است. طبق مطالعات انجام‌شده در ایران نیز شایع‌ترین سویه گزارش‌شده، سویه *G1* است. تاکنون گزارش‌هایی مبنی بر وجود سویه‌های *G3* و *G6* در گوسفندان ایران داده شده است (۹).

*Haniloo* و همکاران در سال ۲۰۱۲ عنوان کردند کیست هیداتیک در گوسفند (۵ تا ۷۲ درصد)، شتر (۴/۱۱ تا ۷۰ درصد)، گاو (۵/۳ تا ۳۸ درصد) و بز (۷/۱ تا ۲۰ درصد) شایع می‌باشد. همچنین عفونت‌های انسانی به‌طور مداوم از مناطق مختلف کشور گزارش می‌شود (۱۰).

این بیماری تأثیر مهمی در سلامت انسان و حیوان دارد؛ همچنین از نظر ضررهای اقتصادی نیز بسیار بااهمیت است. شواهد نشان می‌دهند در سالیان اخیر نه تنها از شیوع بیماری در دنیا کاسته نشده، بلکه در بسیاری از کشورها شیوع و شدت بیماری در انسان و حیوانات در حال گسترش است. در ایران آلودگی انسان به این بیماری از نقاط مختلف کشور گزارش شده است (۱۱).

شناسایی مولکولی گونه‌ها و ژنوتیپ‌های عامل کیست هیداتیک انسان برای اهداف تشخیصی تأییدی، برای درک مسیرهای انتقال انگل و درنهایت برای اجرای برنامه‌های کنترل هدفمند مهم است (۱۲).

تکنیک‌های استفاده‌شده برای تعیین سویه، شامل تعیین ترادف ژن‌های میتوکندری *COX1* و *NAD1* و آنالیز مناطق ریپوزومال DNA شامل *ITS1* و *ITS2* به‌وسیله *RFLP* و *RAPD* و *SSCP* است. در حال حاضر برای شناخت سویه‌های *اکینوкокوس گرانولوزوس* علاوه بر خصوصیات ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و زیستی از روش‌های مولکولی، به‌خصوص روش‌هایی بر مبنای *PCR-RFLP* استفاده می‌شود. با توجه به اهمیتی که ژن‌های میتوکندری *COX1* و *NAD1* در تعیین ژنوتیپ سویه‌های مولد بیماری کیست هیداتیک دارند، برای شناخت اولیه ژنوتیپ‌های انگل از ژن‌های مذکور برای شناسایی بهره گرفته شده است (۲، ۱۳). ناحیه *ITS* از DNA ریپوزومی نیز به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی که ابزاری ساده و قدرتمند برای شناسایی دقیق و تمایز سویه‌های *اکینوкокوس گرانولوزوس* فراهم می‌کند، مطرح شده است (۱۴).

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با شناسایی ژنوتیپ‌های *اکینوкокوس* در گاوها در منطقه زابل انجام نشده است، به همین منظور بررسی و شناسایی ژنوتیپ انگل با استفاده از روش *PCR-RFLP* مدنظر قرار گرفت.

## مواد و روش کار

**نمونه‌گیری:** در مطالعه حاضر با مراجعه به کشتارگاه و بررسی دقیق لاشه‌ها تعداد ۵۰ نمونه مثبت (کبد و ریه) از نظر کیست هیداتیک در پاییز و زمستان سال ۱۴۰۱ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها با رعایت تمام موارد بهداشتی جمع‌آوری و در کنار یخ با حفظ شرایط به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل منتقل شدند. در شرایط آسپتیک با استفاده از سرنگ استریل مایع درون کیست‌ها کشیده و در لوله‌های آزمایشگاهی خالی شد. لوله‌های حاوی مایع کیست هیداتیک جمع‌آوری شده از هر عضو (کبد و ریه) با دور ۸۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و باقی‌مانده تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

در هر عضو امکان وجود کیست‌های بارور، استریل و یا کلسیفیه وجود دارد. به کیستی که حاوی مایع بدون پروتواسکولکس باشد، کیست استریل می‌گویند. باتوجه‌به اینکه نمونه‌های جمع‌آوری شده از گاوها اکثراً استریل بودند لایه زایای (Germinal Layer) نمونه‌ها هم جهت استخراج DNA جداسازی گردید.

**استخراج DNA و آزمایش PCR:** محتویات کیست‌ها با سرنگ استریل آسپیره و از نظر وجود پروتواسکولکس بررسی شدند و در نمونه‌هایی که فاقد پروتواسکولکس بودند، از لایه زایای آن‌ها جهت استخراج DNA استفاده شد. عمل سایش و خرد کردن نمونه‌ها در هاون چینی انجام شد. هضم اولیه نمونه با افزودن بافر لیزکننده و پروتئیناز K انجام شد. استخراج DNA با استفاده از کیت MBST و طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. غلظت DNA استخراج‌شده توسط اسپکتروفوتومتر تعیین و نمونه‌ها تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تکنیک PCR بر روی ژن ITS2 نمونه‌ها، با استناد به روش Gareh و همکاران در سال ۲۰۲۱ (۱۴) و با استفاده از پرایمرهای forward '5'GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCG3' و پرایمر reverse '5'GGGATCCTGGTTAGTTTCTTTTCTCCGC3' انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل ۱/۵ میلی‌مولار، DNA الگو ۲/۵ میکرولیتر، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر و ۲۰۰ میکرومولار dNTP Mix می‌باشد. آغازگرهای استفاده‌شده در مطالعه حاضر از شرکت پیشگام تهیه شدند. تکثیر قطعه موردنظر براساس الگوی دمایی و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) به ترتیب زیر انجام شد:

مرحله اول شامل ۵ دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد بود. مرحله دوم شامل ۳۰ سیکل و هر سیکل شامل سه گام بود: گام اول دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، گام دوم شامل اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، گام سوم شامل گسترش قطعات به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط و گسترش نهایی که به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

محصول PCR، بر روی ژل آگارز در بافر EDTA-boric-Tris الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، تصاویر باندهای DNA توسط دستگاه Documentation UV ثبت شد. در فرایند PCR یک نمونه به‌عنوان کنترل منفی (بدون DNA) و یک نمونه به‌عنوان کنترل مثبت (با استفاده از DNA سویه استاندارد) مورد استفاده قرار گرفت.

**PCR-RFLP:** بعد از تکثیر قطعه ژنی، هضم آنزیمی محصول PCR توسط آنزیم HpaII (MspI) (C/CGG) انجام شد. در این آزمایش ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به‌دست‌آمده، ۱۸ میکرولیتر از آب فاقد نوکلئاز، ۲ میکرولیتر بافر R و ۲ میکرولیتر از آنزیم HpaII (MspI) به میکروتیوب انتقال داده شد. حجم کلی واکنش ۳۲ میکرولیتر بود که به مدت ۶ تا ۱۰ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم محصول انجام شد. پس از هضم آنزیمی، محصول PCR بر روی آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

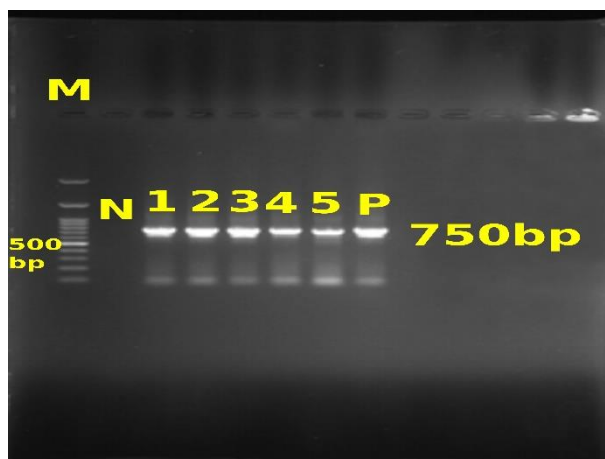
**تعیین توالی نوکلئوتیدی و تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیک:** پس از انجام آزمایشات، ۴ نمونه از محصولات PCR جدایه‌های مختلف اکینوکوکوس گرانولوزوس برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به‌صورت دوطرفه به شرکت پیشگام ارسال گردید. بعد از مشاهده نتایج، توالی موردنظر از طریق نرم‌افزار distance new به دست آمد. توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده با نرم‌افزار Blast هم‌ردیف‌سازی شد و با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، برای رسم درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی موردبررسی و سایر توالی‌های موجود در بانک ژن از روش neighbor-joining استفاده شد و تجزیه و تحلیل تکاملی در نرم‌افزار MEGA X انجام شد (۱۵، ۱۶).

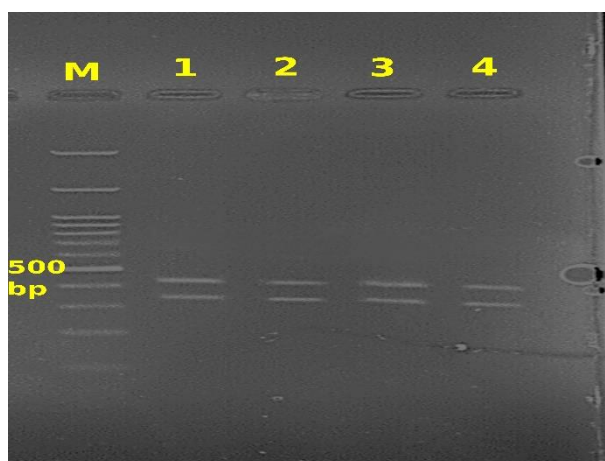
## نتایج

**نتایج استخراج DNA:** استخراج DNA از تمام نمونه‌های کیست هیداتیک ریه و کبد با استفاده از کیت MBST (MBST, Tehran, Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده با موفقیت انجام گرفت.

**نتایج واکنش PCR:** قطعه تکثیرشده ناحیه ITS2 به روش PCR با پرایمرهای اختصاصی روش Gareh و همکاران در سال ۲۰۲۱ (۱۴) واجد باند ۷۵۰ جفت باز بودند. بعد از انجام PCR، محصول واکنش همراه با کنترل مثبت و منفی در چاهک‌های ژل ۱ درصد قرار گرفتند و سپس الکتروفورز شدند. نتایج مربوط به نمونه‌ها در تصویر ۱ قابل مشاهده است.



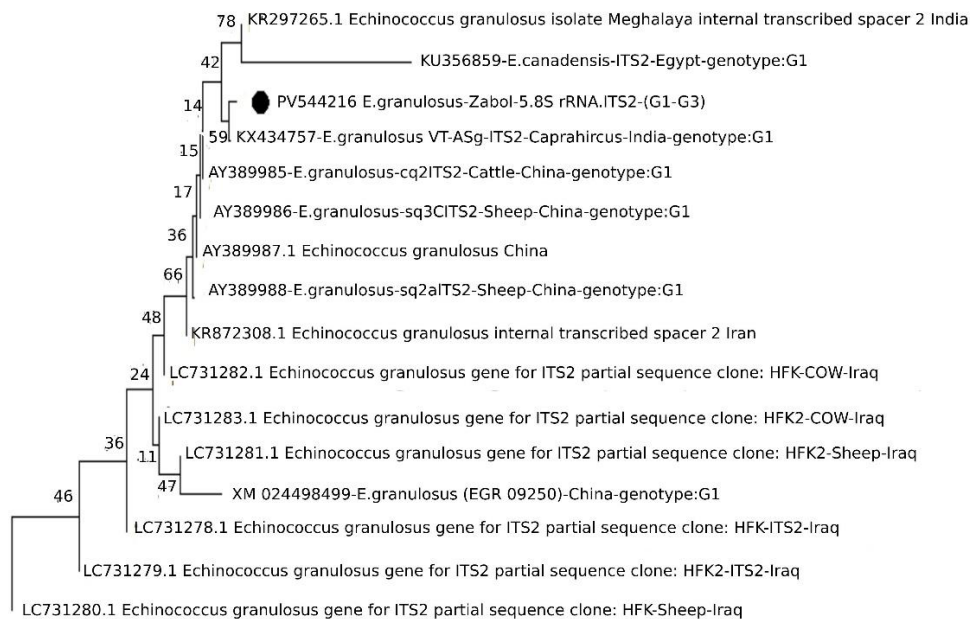
تصویر ۱. محصولات PCR مربوط به ITS2- rDNA پروتواسکولکس‌ها روی ژل آگارز N معرف کنترل منفی، p معرف کنترل مثبت و M نشان‌دهنده مارکر، وزن باند حدود ۷۵۰ جفت باز.



تصویر ۲. آنالیز PCR-RFLP ژن ITS2 با استفاده از اندونوکلاز محدودکننده HpaII بر روی ژل آگارز، M نشان‌دهنده مارکر، وزن باند حدود ۳۹۰ و ۳۶۰ جفت باز می‌باشد.

نتایج حاصل از هضم آنزیمی: محصولات PCR توسط آنزیم HpaII طی واکنش PCR-RFLP مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. محل برش این آنزیم C/GCC است، بنابراین براساس تعداد بازهای CGCC در قطعه تکثیرشده در واکنش PCR الگوی هضم آن بر روی محصول روی ژل مشاهده شد (تصویر ۲). الگوهای قطعات به‌دست‌آمده از محصول PCR ناحیه ITS2-rDNA بعد از برش توسط آنزیم HpaII نشان داد تمام نمونه‌ها منطبق با *E. granulosus sensu stricto* (G1- G3 complex) می‌باشند، به‌طوری‌که با آنزیم HpaII نشان‌دهنده قطعاتی با اندازه‌های حدود ۳۹۰ و ۳۶۰ جفت باز ایجاد شد (تصویر ۲). بنابراین براساس الگوی PCR-RFLP به‌دست‌آمده و با توجه به تقسیم‌بندی پیشنهادی *اکینوکوکوس گرانولوزوس* توسط Nakao و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Moks و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۵، ۱۷) نمونه‌های مورد مطالعه به‌عنوان *E. granulosus sensu stricto* (G1- G3 complex) شناسایی شدند.

نتایج تعیین توالی نوکلئوتیدی و تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج به‌دست‌آمده با اطلاعات موجود در بانک جهانی ژن که از جدایه‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* شامل ژنوتیپ G1 ثبت شده است، با استفاده از ابزار بلاست مقایسه گردید. آنالیز توالی‌های به‌دست‌آمده، نشان داد همه آن‌ها واجد یک الگو می‌باشند. بررسی هم‌ردیفی توالی‌های به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر با توالی‌های ژن ITS2 ثبت‌شده در بانک ژنی و بررسی ماتریس فاصله برای مطالعه حاضر نشان داد توالی به‌دست‌آمده تا ۹۶ درصد به توالی‌های G1 به‌دست‌آمده از سایت شباهت داشت که این نتایج تأییدی بر دقت و صحت توالی‌یابی می‌باشد.



تصویر ۳. رابطه فیلوژنی توالی ITS2/اکینوкокوس گرانولوزوس با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از روش neighbor-joining method تجزیه و تحلیل تکاملی در نرم‌افزار MEGA X انجام شد (۱۵، ۱۶).

**نتایج تحلیل درخت فیلوژنتیک:** در مطالعه حاضر برای رسم درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی مورد بررسی از روش neighbor-joining method با بوت استرپ ۱۰۰۰ استفاده شد (تصویر ۳). همان‌طور که در تصویر ۳ مشاهده می‌گردد درخت فیلوژنتیک رسم‌شده براساس توالی ژن ITS2 از نمونه‌های مختلف اکینوкокوس گرانولوزوس روابط تکاملی میان این توالی‌ها را به خوبی نشان می‌دهد. توالی‌ها در خوشه‌ای شامل ژنوتیپ G1 است که شایع‌ترین ژنوتیپ در بین گونه‌های انسانی و دامی در مناطق مختلف جغرافیایی است. بررسی فیلوژنتیکی ژن اکینوкокوس گرانولوزوس نشان داد نمونه مورد نظر در مطالعه حاضر نزدیک‌ترین خویشاوندی را با ژنوتیپ G1 عراق داشت. توالی مطالعه حاضر در Gen Bank با کد PV544216 ثبت شده است.

## بحث

باتوجه به تنوع درون‌گونه‌ای اکینوкокوس گرانولوزوس اکتفا کردن به اطلاعات به‌دست‌آمده از شاخص‌های ریخت‌شناسی جهت تمایز سویه و گونه، قابل‌اعتماد نیست؛ بنابراین تلفیقی از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی با هم می‌تواند اطلاعات جامع‌تری را در رابطه با شناسایی تنوع در سویه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس فراهم کند. برای مطالعه ژنوتیپ‌های اکینوкокوس گرانولوزوس از روش‌های مولکولی به‌ویژه روش‌های مبتنی بر PCR-RFLP استفاده می‌گردد که از کیفیت و کمیت مناسبی برای تهیه محصولات PCR برخوردار است (۱۸). باتوجه به اهمیت ژن‌های میتوکندری COX1 و NAD1 در تعیین ژنوتیپ سویه‌های مولد بیماری کیست هیداتیک، برای شناخت اولیه ژنوتیپ‌های انگل از ژن‌های مذکور بهره گرفته شده است (۲، ۱۳) در مطالعه Gareh و همکاران در سال ۲۰۲۱ ناحیه ITS از DNA ریبوزومی به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی که روشی ساده برای شناسایی دقیق و تمایز سویه‌های اکینوкокوس گرانولوزوس فراهم می‌کند، مطرح شده است (۱۴). بررسی مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد ژنوتیپ G1 شایع‌ترین علت ایجادکننده کیست هیداتیک انسانی در دنیا محسوب می‌شود (۱۹).

از آنجایی که اطلاعات کمی در مورد خصوصیات ژنتیکی *E. granulosus* در زابل وجود دارد، شناسایی ژنوتیپ انگل در گاوهای منطقه مدنظر قرار گرفت. روش مولکولی مورد استفاده در مطالعه حاضر، روش PCR-RFLP روی قطعه ITS2 با استفاده از یک آنزیم اندونوکلاز محدودکننده (HpaII) بود. این آنزیم قادر به تفریق اغلب سویه‌های اکینووکوکوس گرانولوزوس از یکدیگر می‌باشد. نتیجه مطالعه نشان‌دهنده وجود *E. granulosus sensu stricto* (G1- G3 complex) در گاوهای این منطقه می‌باشد.

درخت فیلوژنتیک رسم‌شده براساس توالی ژن ITS2 از نمونه‌های مختلف اکینووکوکوس گرانولوزوس (تصویر ۳)، روابط تکاملی میان این توالی‌ها را به خوبی نشان می‌دهد. توالی‌ها در خوشه‌ای شامل ژنوتیپ G1 قرار می‌گیرد که شایع‌ترین ژنوتیپ در بین گونه‌های انسانی و دامی در مناطق مختلف جغرافیایی است (۱۹). این نکته می‌تواند در مطالعات اپیدمیولوژیک و تکمیلی حائز اهمیت باشد.

در مطالعه Matini و همکاران در سال ۲۰۱۸ در همدان برای شناسایی ژنتیکی ایزوله‌های اکینووکوکوس گرانولوزوس، در مجموع ۷۴ نمونه دامی شامل ۶۹ گوسفند، ۳ گاو و ۲ بز و ۹ کیست هیداتید انسانی با روش PCR-RFLP بر روی ژن ITS1 و با آنزیم‌های RsaI, HpaII, AluI, TaqI مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت پس از تعیین توالی نمونه‌ها *E. granulosus sensu stricto* (G1- G3 complex) گزارش شد (۲۰) که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین در مطالعه Dousti و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایلام، برای شناسایی ژنوتیپ‌های کیست هیداتید بر روی ۳۴ نمونه حیوانی و انسانی با روش PCR-RFLP بر روی ژن ITS1 و با آنزیم‌های RsaI, HpaII, AluI, TaqI نتیجه مشابه با مطالعه حاضر به دست آمده است (۲۱).

در مطالعه Jamali و همکاران در سال ۲۰۰۴ در تبریز با جمع‌آوری ۲۰ نمونه کیست هیداتیک گاوی و انجام PCR-RFLP با آنزیم RsaI و HpaII سویه‌های موجود در آن‌ها را G1 تشخیص دادند (۱۸).

در مطالعه Gholami و همکاران در سال ۲۰۰۹ که در شهر ساری بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک بارور گاو با روش PCR-RFLP بر روی ژن ITS1 و هضم آنزیمی با آنزیم‌های تجزیه‌کننده اندونوکلاز AIIspl, EcoR 1, HhaI, atq1 انجام شده بود، تنها ژنوتیپ G1 گزارش گردید (۱۱).

در مطالعه Haniloo و همکاران در سال ۲۰۱۲ جهت شناسایی ژنوتیپ‌های کیست هیداتیک در ۷۷ نمونه اخذشده از گاو و گوسفند و ۹ نمونه انسانی در استان زنجان، از روش PCR-RFLP استفاده شد. الگوهای قطعات به دست آمده از محصول PCR ناحیه ITS1 بعد از برش با آنزیم‌های RsaI, Msp1, AluI, TaqI و نشان داد تمام نمونه‌ها منطبق با ژنوتیپ G1 یا همان ژنوتیپ شایع گوسفندی می‌باشند (۱۰).

Yakhchali و همکاران در سال ۲۰۱۳ در استان آذربایجان غربی در کیست‌های جداشده از گاو با استفاده از روش PCR-RFLP بر روی NAD1 سویه G1 را گزارش نموده‌اند (۲۲).

در مطالعه اولیه‌ای توسط Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۸ در مناطق مختلف ایران، از ۴ ایزوله کیست هیداتیک گاوی با تعیین توالی COX1 و NAD1 ۲ سویه G1 (گوسفندی) و G6 (شتری) شناسایی شد (۲۳). Harandi و همکاران در سال ۲۰۰۲ نیز در مطالعاتی که در مناطق مختلف ایران بر روی ۳۲ نمونه جمع‌آوری شده گاوی با روش PCR-RFLP انجام دادند وجود ۲ سویه گوسفندی و شتری را تأیید کردند (۲۴).

Shahnazi و همکاران در سال ۲۰۱۱ در اصفهان با انجام تکنیک PCR-RFLP ژن ITS1 نمونه‌های کیست هیداتید گاوی و انجام تعیین توالی ۲ ژن COX1 و NAD1، ۲ ژنوتیپ G1 و G6 را تشخیص دادند (۲۵).

در مطالعه Sharbatkhori و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ در نواحی مختلف ایران بر روی ۱۱۲ نمونه کیست هیداتیک از دام‌های مختلف با انجام روش PCR-RFLP ژن ITS1 ژنوتیپ‌های G1 و G6 گزارش شد (۱۹).

در سال ۲۰۰۹ تکنیک single-strand conformation polymorphism (SSCP) بر روی ۳۰ ایزوله گرفته شده از گاو در مناطق مختلف ایران، ۲ ژن COX1 و NAD1 از ژنوم میتوکندری تعیین سویه شد. نتایج این مطالعه نشان داد ۱۰۰ درصد نمونه‌های گاوی متعلق به ژنوتیپ G1-G3 بودند (۲۶).

Hajjalilo و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه کیست‌های جدا شده از دام‌های مختلف در استان کرمان با روش PCR ژن‌های COX1 و NAD1 سویه‌های G1 را در گوسفند، گاو، شتر، بز و G3 را از گاو، گوسفند و شتر جدا کردند و در مورد نمونه انسانی سویه G6 را گزارش کردند (۲۷).

Fallahizadeh و همکاران در سال ۲۰۱۹ در کیست‌های جدا شده از گاومیش، گاو، بز و گوسفند از کشتارگاه شهرستان شوش با روش PCR-RFLP بر روی قطعه ژنی ITS1، بعد از برش با آنزیم‌های Alu1، Rsa1، HpaII و Taq1، کمپلکس *E. granulosus* sensu stricto (G1- G3) را در این نمونه‌ها گزارش کردند (۲۸).

Hedayati و همکاران در سال ۲۰۱۹ در بررسی مولکولی ژنوتیپ کیست هیداتیک انسانی در مازندران با استفاده از ژن‌های NAD1، سویه‌های G1، G2 و G3 شناسایی شد (۲۹).

Shahbazi و همکاران در سال ۲۰۲۰ در تعیین ژنوتیپ کیست‌های هیداتیک انسانی تازه و پارافینه شده با استفاده از ژن‌های COX1 و NAD1 در استان همدان، سویه‌های G1 و G3 را گزارش کردند (۳۰).

Arabloo و همکاران در سال ۲۰۲۵ در شهرستان قزوین، با بررسی ژن‌های COX1 و NAD1 در ۸۰ نمونه کیست هیداتیک جدا شده از انسان و گاو، گوسفند و بز، سویه‌های G1 (۹۷/۵ درصد) و G3 (۲/۵ درصد) را گزارش کردند (۳۱).

همان‌طور که از نتایج مطالعات صورت گرفته پیداست، ژنوتیپ G1 به‌عنوان ژنوتیپ غالب و اصلی در آلوده کردن گاوها نقش دارد و به دنبال آن ژنوتیپ G6 و G3 گزارش شده است. در مطالعات پیشین انجام گرفته در سایر نقاط دنیا نیز از ژنوتیپ G1 به‌عنوان ژنوتیپ غالب یاد شده و آلودگی با سایر ژنوتیپ‌ها به میزان کمتری صورت گرفته است.

Utuk و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ترکیه از ۷ کیست هیداتیک گاوی با انجام روش PCR-RFLP روی قطعه ژنی ITS1 ژنوتیپ G1 را گزارش کردند (۳۲). Andresiuk و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای بر روی ۳۲ نمونه گاوی از اسپانیا و ۲۲ نمونه گاوی از آرژانتین با روش PCR، ژنوتیپ G1 را جدا کردند (۳۳).

Dinkel و همکاران در سال ۲۰۰۴ در آفریقا ۶ مورد کیست‌های گاوی را توسط تکنیک semi-nested PCR مورد آزمایش قرار دادند که ۴ کیست ژنوتیپ G6/G7 و ۲ مورد ژنوتیپ G5 را داشتند (۳۴). Busi و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ایتالیا با مطالعه بر روی ۱۵ کیست هیداتیک گاوی ژنوتیپ‌های G1 و G3 را گزارش کردند (۳۵). در مطالعه Vural و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ترکیه بر روی کیست‌های جدا شده از ۱۲ گاو با روش semi-nested PCR، ژنوتیپ G1 را از ۹ گاو و ژنوتیپ G3 را از ۳ گاو جدا کردند (۳۶). Rad و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تونس ۵ کیست گاوی را با تعیین توالی ژن COX1 مورد بررسی قرار دادند و ژنوتیپ G3 را شناسایی کردند (۳۷).

باتوجه به اینکه گونه غالب در گاوهای منطقه زابل (*E. granulosus sensu stricto* (G1- G3 complex) است، محتمل‌ترین چرخه زندگی انگل، چرخه زندگی سگ - گوسفند است. در مناطقی که گوسفندان با سایر دام‌های اهلی نگهداری می‌شوند، انسان هم به‌علت تماس با میزبان نهایی گوشتخوار در معرض آلودگی با ژنوتیپ گوسفندی قرار می‌گیرد (۲۰). باتوجه به اهمیت بهداشتی و اقتصادی این بیماری، لازم است اقدامات مؤثری در کنترل بیماری صورت گیرد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** مطالعه حاضر در واقع یک اقدام اولیه برای تشخیص ژنوتیپ‌های *E. granulosus* در زابل بود. باتوجه به یافته‌های مطالعه حاضر (*E. granulosus sensu stricto* (G1- G3 complex) به‌عنوان ژنوتیپ غالب و اصلی در آلوده کردن گاوهای منطقه نقش دارد. از آنجایی که طراحی یک استراتژی مناسب برای کنترل آلودگی مستلزم درک خوب چرخه انتقال در هر منطقه است، اطلاعات کسب شده در هنگام اجرای برنامه‌های کنترل این بیماری مشترک انسان و حیوان می‌تواند مفید واقع شود؛ بنابراین مطالعات ژنتیکی بیشتری برای تعیین دقیق ژنوتیپ‌های *E. granulosus* در منطقه و در سطح استان نیاز است.

## ملاحظات اخلاقی

کلیه مراحل انجام مطالعه حاضر در کمیته تحقیقات اخلاق دانشگاه زابل با کد: IR.UOZ.REC.1403.025 تأیید شد.

## سپاسگزاری

از دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل جهت حمایت و پشتیبانی در انجام مطالعه حاضر تشکر می‌شود.

## تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

## References

1. Eslami A. Veterinary helminthology: Cestoda. 2<sup>nd</sup> ed. Tehran: Tehran University Publisher; 2006.p.120-121.
2. Shamsi M, Dalimi A, Khosravi A, Ghafarifar F. Determination of genotype isolates of human and sheep hydatid cyst in Ilam. J Ilam Univ Med Sci. 2015;23(2):111-9.
3. Yousefi H, Hashemzadeh CM, Aliyari Z, Zebardast N, Farokhi E. Molecular characterization of the strains cause sheep-hydatid cyst, in Chaharmahal and Bakhtiary Province using restriction fragment length polymorphism. J Shahrekord. 2007;9(2):28-33.
4. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol. 1992;54(2):165-73. doi: [10.1016/0166-6851\(92\)90109-w](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90109-w)
5. Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitol. 2007;134:713-22. doi: [10.1017/S0031182006001934](https://doi.org/10.1017/S0031182006001934) PMID: [17156584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17156584/)
6. Bardonnet K, Piarroux R, Dia L, Schneegans F, Beurdeley A, Godot V, et al. Combined eco-epidemiological and molecular biology approaches to assess *Echinococcus granulosus* transmission to humans in Mauritania: occurrence of the 'camel' strain and human cystic echinococcosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96(4):383-6. doi: [10.1016/s0035-9203\(02\)90369-x](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90369-x) PMID: [12497974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12497974/)
7. Thompson RC. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. Exp Parasitol. 2008;119(4):439-46. doi: [10.1016/j.exppara.2008.04.016](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016) PMID: [18539274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18539274/)
8. Saarma U, Jõgisalu I, Moks E, Varcasia A, Lavikainen A, Oksanen A, et al. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. Parasitol. 2009;136(3):317-28. doi: [10.1017/S0031182008005453](https://doi.org/10.1017/S0031182008005453) PMID: [19154654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19154654/)
9. Mirshekar F, Hashemitabar G, Razmi G. A morphological and molecular study of hydatid cyst in slaughtered sheep in Mashhad area. Vet Res & Biol Pr. 2021;34(2):68-76. doi: [10.22092/vj.2020.341360.1678](https://doi.org/10.22092/vj.2020.341360.1678)
10. Haniloo A, Farhadi M, Farzali A, Nourian A. Genotype characterization of hydatid cysts isolated from Zanjan using PCR-RFLP technique. Zanjan Univ Med Sci J. 2012;84:57-65.
11. Gholami S, Irshadullah M, Khan A. Genetic variation of *Echinococcus granulosus* isolates from Indian buffalo and Iranian sheep, cattle and camel. J Maz Univ Med Sci. 2009;19(71):60-9.
12. Issa AR, Arif SH, Mohammed AA, Santolamazza F, Santoro A, Mero WM, Casulli A. Insights into human cystic echinococcosis in the Kurdistan Region, Iraq: characteristics and molecular identification of cysts. Pathog. 2022;11(4):408. doi: [10.3390/pathogens110404083](https://doi.org/10.3390/pathogens110404083) PMID: [PMC9025470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC9025470/)

13. Gholami SH, Sosarai M, Fakhar M, Sharif M, Daryani A. Genotype identification of *Echinococcus granulosus* from paraffin-embedded tissues of hydatid cysts isolated from human by PCR-RFLP. *J Maz Univ Med Sci*. 2011;21(85):10-9.
14. Gareh A, Saleh AA, Moustafa SM, Tahoun A, Baty RS, Khalifa RM, et al. Epidemiological, morphometric, and molecular investigation of cystic echinococcosis in camel and cattle from upper Egypt: current status and zoonotic implications. *Front Vet Sci*. 2021;8:750640. doi: [10.3389/fvets.2021.750640](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.750640)
15. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:11030-11035. doi: [10.1073/pnas.0404206101](https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101)
16. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 2018;35:1547-1549. doi: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096) PMID: [29722887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29722887/)
17. Moks E, Jogisalu 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;135:645-54. doi: [10.1017/S0031182008004198](https://doi.org/10.1017/S0031182008004198) PMID: [18261256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18261256/)
18. Jamali R, Ghazanchaei A, Asgharzadeh M. Identification and characterization of *Echinococcus granulosus* by PCR-RFLP technique in Tabriz district. *J parasitic Dis*. 2004; 28(2): 69-72.
19. Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF, Rezaeian M, Mohebbali M, Eshraghian M, et al. *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. *Exp Parasitol*. 2010;124(4):373-9. doi: [10.1016/j.exppara.2009.11.020](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.020) PMID: [20004194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20004194/)
20. Matini M, Roostami M, Fallah M, Maghsood AH, Saidijam M, Fasihi Harandi M. Genetic Identification of *Echinococcus granulosus* Isolates in Hamadan, Western Iran. *Iran J Parasitol*. 2018;13(3):423-429. PMID: [30483334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30483334/)
21. Dousti M, Abdi J, Bakhtiyari S, Mohebbali M, Mirhendi S, Rokni M. Genotyping of Hydatid Cyst Isolated from Human and Domestic Animals in Ilam Province, Western Iran Using PCR-RFLP. *Iran J Parasitol*. 2013;18(1):47-52. PMID: [23682259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23682259/)
22. Yakhchali M, Mardani K. A study on *Echinococcus granulosus* strains using nucleotide sequence of co-1 gene by PCR-RFLP technique in West Azarbaijan province, Iran. *Med Sci*. 2013;23(7):792-798.
23. 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. doi: [10.4269/ajtmh.1998.59.171](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.171) PMID: [9684648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9684648/)
24. Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RC. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitol*. 2002;125(4):367-73. doi: [10.1017/s0031182002002172](https://doi.org/10.1017/s0031182002002172) PMID: [12403325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12403325/)
25. Shahnazi M, Hejazi H, Salehi M, Andalib AR. Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran. *Act Trop*. 2011;117:47-50. doi: [10.1016/j.actatropica.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.002) PMID: [20858453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20858453/)
26. 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. doi: [10.1007/s00436-010-2092-7](https://doi.org/10.1007/s00436-010-2092-7) PMID: [20922418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20922418/)
27. Hajjalilo E, Harandi MF, Sharbatkhori M, Mirhendi H, Rostami S. Genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in camels, cattle and sheep from the south-east of Iran indicates the presence of the G3 genotype. *J Helminthol*. 2012;86(3):263-70. doi: [10.1017/S0022149X11000320](https://doi.org/10.1017/S0022149X11000320) PMID: [21749740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21749740/)

28. Fallahizadeh S, Arjmand R, Jelowdar A, Rafiei A, Kazemi F. Determination of genotypes in livestock slaughtered in Shush County, Southwest Iran using PCR-RFLP. *Helminthol.* 2019;56(3):196-201. [doi: 10.2478/helm-2019-0023](https://doi.org/10.2478/helm-2019-0023) PMID: 31662691
29. Hedayati Z, Daryani A, Sarvi S, Gholami S, Sharif M, Pirestani M, et al. Molecular genotyping of the human cystic echinococcosis in Mazandaran Province, North of Iran. *Iran J Parasitol.* 2019;14(1):151-158.
30. Shahbazi AE, Saidijam M, Maghsood AH, Matini M, Haghi MM, Fallah M. Genotyping of fresh and Parafinized human hydatid cysts using nad1 and cox1 genes in Hamadan Province, west of Iran. *Iran J Parasitol.* 2020;15(2):259-265. [PMID: 32595717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32595717/)
31. Arabloo S, Johkool MG, Mohammadi MA, Mohammadzadeh A, Mohammadi D, Harandi MF, et al. Genetic profile of *Echinococcus granulosus* isolated from the livestock and human in northwest Iran. *J Parasit Dis.* 2025;49(1):142-8. [doi: 10.1007/s12639-024-01738-3](https://doi.org/10.1007/s12639-024-01738-3) PMID: 39975620
32. Utuk AE, Simsekb S, Koroglu E, McManus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. *Acta Trop.* 2008;107:192-4. [doi: 10.1016/j.actatropica.2008.05.026](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.026) PMID: 18579101
33. Andresiuk M, Ponce gordo F, Elissondo C. *Echinococcus granulosus*: biological comparison of cattle isolates from endemic regions of Argentina and Spain. *Rev Asoc Argent Microbiol.* 2009;41:218-225.
34. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Wälz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, et al. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol.* 2004;34(5):645-53. [doi: 10.1016/j.ijpara.2003.12.013](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.013) PMID: 15064129
35. Busi M, Šnábel V, Varcasia A, Garippa G, Perrone V, De Liberato C, D'Amelio S. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol.* 2007;150(1-2):75-83. [doi: 10.1016/j.vetpar.2007.09.003](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.003) PMID: 17951008
36. Vural G, Baca A.U, Gauci C.G, Bagci O, Gicik Y, Lightowlers MW. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase I mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol.* 2008;154:347-350. [doi: 10.1016/j.vetpar.2008.03.020](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.020) PMID: 18485601
37. M'Rad S, Filisetti D, Oudni-M'rad M, Mekki M, Belguith M, Nouri A, et al. Molecular evidence of ovine (G1) and camel (G6) strains of *Echinococcus granulosus* in Tunisia and putative role of cattle in human contamination. *Vet Parasitol.* 2005;129:267-72. [doi: 10.1016/j.vetpar.2005.02.006](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.02.006) PMID: 15845282