Original Article

Molecular and genotyping identification of *Echinococcus granulosus* from camel and dog isolates in Isfahan, Iran (2015-2016)

Arbabi M[1*], Pestechian N[2], Tavasol Khamseh H[3], Hooshyar H[1], Delavari M[1]

1- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.
2- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I. R. Iran.
2- Student Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Isfahan, I. R. Iran.

Received November 5, 2016; Accepted January 21, 2017

Abstract:

Background: Hydatidosis is one of the most important zoonotic parasitic disease worldwide caused by *Echinococcus granulosus*. Given the importance of parasite genotyping in disease control, this study was aimed to evaluate the genetic variation of the camel and dog isolates in Isfahan.

Material and Methods: This cross-sectional study was done on infected livers and lungs of camels with hydatid cyst (n=51) during 2015-2016, collected from Zarinshahr and Najafabad industrial abattoir and 200 adult *E. granulosus* worms collected from stray dogs in different geographical regions of Isfahan for the molecular identification of mitochondrial genes (CO1, ND1). The DNA of protoscolices and adult worms were extracted, the PCR and sequencing were done using specific primers. Pairwise sequence alignment was used to identify the genetic similarity between the sequences and the registered ones in Gen bank using Clustalw2 software.

Results: The PCR and sequencing of CO1 and ND1 genes on dog and camel samples showed different *E. granulosus* genotypes, including the common sheep strain (G1), bovid strain(G3) and camel strain (G6) in Isfahan region. The most frequent strains were the common sheep strain (G1). The genetic similarity between both ND1 and CO1 isolates taken from camel, dog and the isolates registered in Gene bank were 30.25-100% and 27.47-100% for camel and dog, respectively.

Conclusion: Mitochondrial ND1 and CO1 genes are proper molecular markers for identifying the genetic variation of the camel and dog *E. granulosus*. The dominant strain of the worm in Isfahan, is the same as the other parts of the country, i.e., the G1 genotype (the most common sheep strain) belonged to the G1- G1 *E. granulosus* complex.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, Camel, Dog, PCR, Sequencing, Strain

* **Corresponding Author.**
Email: arbabi4.mohsen@yahoo.com
Tel: 0098 913 361 1303
Fax: 0098 315 551 112

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2017; Vol. 21, No 2, Pages 134-141

Please cite this article as: Arbabi M, Pestechian N, Tavasol Khamseh H, Hooshyar H, Delavari M. Molecular and genotyping identification of *Echinococcus granulosus* from camel and dog isolates in Isfahan, Iran (2015-2016). ***Feyz*** 2017; 21(2): 134-41.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

شناسایی مولکولی و ژنوتایپینگ سویه‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* جدا شده از شتر و سگ در منطقه اصفهان طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴

محسن اربابی [*۱]، نادر پسته‌چیان [۲]، هادی توسل خمسه [۳]، حسین هوشیار [۴]، مهدی دلاوری [۵]

خلاصه:

سابقه و هدف: هیداتیدوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی زئونوز در سطح جهان است و عامل آن *اکینوکوکوس گرانولوزوس* می‌باشد. باتوجه به اهمیت شناسایی ژنوتایپ‌های انگل در کنترل بیماری، این مطالعه با هدف سنجش تنوع ژنتیکی ایزوله‌های شتر و سگ در منطقه اصفهان صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه با طراحی مقطعی طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ روی ۵۱ کبد و ریه شتر آلوده به کیست هیداتید جمع‌آوری شده از کشتارگاه‌های صنعتی زرین‌شهر و نجف‌آباد و۲۰۰ کرم بالغ جمع‌آوری شده از سگ‌های ولگرد مناطق مختلف جغرافیایی اصفهان جهت شناسایی ژن‌های میتوکندریایی CO1 و ND1 صورت گرفت. DNA پروتواسکولکس و کرم بالغ استخراج شده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، واکنش PCR و تعیین توالی صورت گرفت. به‌منظور تعیین میزان مشابهت ژنتیکی بین توالی‌ها و هم‌چنین موارد ثبت شده در بانک ژن، آنالیز دوبه‌دو با نرم‌افزار ClustalW2 صورت گرفت.

نتایج: روش‌های PCR و تعیین توالی ژن‌های CO1 و ND1 در سگ و شتر، وجود ژنوتایپ گوسفندی (G1)، گاوی (G3) و شتری (G6) *اکینوکوکوس گرانولوزوس* را در منطقه اصفهان نشان داد. ژنوتایپ غالب در هر دو میزبان، سویه شایع گوسفندی (G1) بود. میزان مشابهت ژنتیکی دو ژن ND1 و CO1 بین ایزوله‌های شتر و موارد ثبت شده در بانک ژن ۳۰/۲۵ تا ۱۰۰ درصد و برای ایزوله‌های سگ ۲۷/۴۷ تا ۱۰۰ درصد تعیین شد.

نتیجه‌گیری: ژن‌های میتوکندریایی ND1 و CO1 مارکرهای مولکولی مناسبی برای تعیین تغییرات ژنتیکی ایزوله‌های شتر و سگ *اکینو-کوکوس گرانولوزوس* می‌باشد. سویه غالب این کرم در منطقه اصفهان همانند سایر نقاط کشور، ژنوتیپ G1 (استرین شایع گوسفندی) متعلق به کمپلکس G1-G3 اکینوکوکوس گرانولوزوس می‌باشد.

واژگان کلیدی: *اکینوکوکوس گرانولوزوس، شتر، سگ، PCR، تعیین توالی، ژنوتایپ*

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۶، صفحات ۱۴۱-۱۳۴

مقدمه

هیداتیدوزیس (Hydatidosis) بیماری انگلی ناشی از ابتلا به مرحله متاسستودی کرم بالغ *اکینوکوکوس گرانولوزوس* می‌باشد.کرم بالغ در روده باریک سگ‌سانان به‌عنوان میزبان قطعی و مرحله متاسستودی یا کیست هیداتید در نشخوارکنندگان به‌عنوان میزبان واسط و انسان مشاهده می‌شود [۱]. هیداتیدوزیس یک عفونت زئونوز می‌باشد که شیوع آن در استرالیا و آفریقا و کشور-های منطقه مدیترانه حائز اهمیت بسیاری می‌باشد [۲].

این بیماری در علف‌خواران و نشخوار کنندگان مانند شتر، بز، گاو و گوسفند و به‌ندرت انسان به‌عنوان میزبانان واسط در نقاط مختلف جهان گزارش شده است [۵-۳]. هم‌چنین، آلودگی در سگ‌ها به-خصوص سگ‌های ولگرد و گله به کرم بالغ از تمام نقاط کشور گزارش گردیده است [۷،۶]. از بین دام‌های اهلی در ایران، کیست هیداتید در گوسفند به‌عنوان میزبان واسط دارای شیوع بالایی می-باشد. میزان فراوانی آلودگی به کیست هیداتید در ایران و جهان بین ۷۰-۱/۵ درصد متغیر می‌باشد [۸]. بررسی‌های متعدد در ایران میزان شیوع کیست هیداتید را در گوسفند ۷۲-۵ درصد، در شتر ۷۰-۱/۴ درصد، در گاو ۳۸-۳/۵ درصد و در بز ۲۰-۱/۷ درصد نشان داده است [۹]. تاکنون در جهان بر اساس اختلافات زیست-شناختی و ریخت‌شناسی و با استفاده از روش‌های مولکولی و آنالیز ژنتیکی ژن‌های هسته و میتوکندری ۱۰ ژنوتایپ مجزا (G1-G10) گزارش گردیده [۱۰] که شایع‌ترین آن در جهان ژنوتایپ G1 (سویه گوسفندی) می‌باشد [۱۱]. در حال حاضر *اکینوکوکوس گرانولوزوس* بر اساس خصوصیات تاکسونومیک و بررسی‌های ژنتیکی میتوکندریایی در چهار گونه (G1-G3

[۱] دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۲] دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۴] استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۵] استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

* **نشانی نویسنده مسئول:**

کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه انگل شناسی

تلفن: ۰۹۱۳۳۶۱۱۳۰۳ **دورنویس:** ۰۳۱۵۵۵۱۱۱۲

پست الکترونیک: arbabi4.mohsen@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۵ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۱۱/۲

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

(G5 ،*E. equinus* (G4) ،*E. granolusus* Sensu Stricto *E. ortleppi* و *E. canadensis* (G6-G10) قرار دارد [۱۲،۱۱]. سویه خوکی (G7) از اروپای مرکزی و جنوبی و ژنوتایپ (G10) از حیوانات وحشی نیمکره شمالی گزارش شده است [۱۳]. براساس شواهد موجود، برخی سویه‌ها برای انسان نسبت به سایر سویه‌ها دارای قدرت بیماری‌زایی بالاتری می‌باشد. *E. granolusus* در برخی از مناطق به‌صورت کمپلکسی از استرین‌های مختلف در بیماری‌زایی کیست هیداتید و همه‌گیرشناسی آن تاثیر می‌گذارد [۱۴]. بنابراین تعیین دقیق ژنوتایپ *اکینوکوکوس گرانولوزوس* برای تعیین استراتژی‌های کنترل بیماری و تهیه واکسن و پیشگیری از بیماری در مناطق مختلف جغرافیایی حائز اهمیت می‌باشد [۱۶،۱۵]. در استراتژی‌ها کنترل، تشخیص بیماری، درمان موثر دارویی، واکسیناسیون علیه انگل، پاتولوژی بیماری، الگوی چرخه زندگی انگل، روند انتقال بیماری، آنتی‌ژنیسیتی انگل، تغییرات ژنتیکی و تنوع استرین‌های *E. granolusus* تاثیرات بسیاری دارند [۱۹-۱۷]. مطالعات انجام شده در ایران دو سویه سگ/گوسفندی (ژنوتایپ G1) و سگ/شتری (ژنوتایپ G6) را نشان داده است. سویه سگ/گوسفندی در انسان دارای بیماری‌زایی بیشتری است، ولی برخلاف آن سویه سگ/شتری در انسان توانایی ایجاد عفونت ندارد [۲۰]. به‌دلیل اینکه *اکینوکوکوس گرانولوزوس* هرمافرودیت بوده و به روش خودگشنیدگی لقاح می‌یابد، در صورت بروز جهش در ژنوم و ورود متاستود به بدن میزبان مهره‌دار، پروتواسکولکس‌هایی با خصوصیات جدید و سویه جهش‌یافته ایجاد می‌گردد [۲۱]. ازآنجاکه استان اصفهان به‌خاطر شرایط خاص اقلیمی و پرورش و نگهداری شتر و دام‌پروری به‌عنوان یکی از مشاغل رایج و مهم مردم و وجود سگ‌های ولگرد در کنار جمعیت دامی و علفخواران و شرایط فرهنگی و وجود بافت روستایی در حاشیه این استان از مناطق پرخطر ابتلای به بیماری کیست هیداتید می‌باشد، مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی مولکولی و تعیین سویه‌های کرم بالغ و مرحله متاستودی انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ (CO1) و نیکوتین آمین دی هیدروژناز ۱ (ND1) و تکنیک‌های PCR و تعیین توالی در سگ به‌عنوان میزبان نهایی و شتر به‌عنوان میزبان واسط عمده صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در بررسی مقطعی حاضر ۳۰ قلاده سگ ولگرد حاشیه و داخل شهر اصفهان و ۵۱ نفر شتر آلوده به مرحله متاستودی (کیست هیداتید) *اکینوکوکوس گرانولوزوس* که در کشتارگاه صنعتی زرین شهر و نجف آباد استان اصفهان ذبح شده بودند، به‌صورت تصادفی طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ مورد مطالعه قرار گرفتند. روده سگ و کبد و ریه شترهای آلوده به کیست هیداتید به آزمایشگاه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان منتقل شده و به‌ترتیب از نظر وجود کرم بالغ و پروتواسکولکس مورد بررسی قرار گرفت. پس از ضدعفونی کردن سطح کیست با الکل ۸۰ درصد، مایع کیست با سرنگ استریل ۵ میلی‌لیتری آسپیره شده و به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. زنده بودن پروتواسکولکس‌ها با استفاده از رنگ حیاتی ائوزین ۰/۱ درصد با مشاهده میکروسکوپی حرکات سلول‌های شعله‌ای تایید گردید. کیست‌های غیربارور از مطالعه حذف شدند. پروتواسکولکس‌های جدا شده از کیست بارور کبد و ریه پس از ۳ بار شستشو با سرم فیزیولوژی در اتانول ۸۰ درصد ثابت شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هم‌چنین، محتویات روده سگ‌ها پس از باز شدن کامل از نظر وجود کرم بالغ مورد بررسی قرار گرفت. پس از تایید خصوصیات مورفولوژیک انگل با استفاده از کلیدهای تشخیصی، کرم‌های بالغ *اکینوکوکوس گرانولوزوس* جمع‌آوری شده در اتانل ۸۰ درصد تا زمان استخراج DNA و انجام مطالعات مولکولی نگهداری گردید.

استخراج DNA، واکنش PCR و تعیین توالی:

به‌منظور حذف الکل، پروتواسکولکس‌ها و کرم‌های بالغ سه بار با بافر PBS استریل شستشو داده شد. قبل از عمل استخراج، محلول هموژنی از بافت انگل تهیه شده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده اضافه گردیده و به‌مدت یک شب در حمام آب گرم ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت شرکت Bioneer ساخت کشور کره و با تغییراتی در زمان انکوباسیون و مقدار آنزیم پروتئیناز K انجام گردید. خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و بارگذاری در ژل تایید شد و نمونه‌ها تا زمان انجام PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پرایمرهای اختصاصی گونه برای هردو ژن مورد مطالعه بااستفاده از نرم‌افزار AmplifX طراحی شده و اختصاصیت و عمکرد آن‌ها بااستفاده از نرم‌افزار BLAST تائید گردید. در جدول شماره ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده نشان داده شده است. واکنش PCR با حجم کلی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر Master Mix (حاوی: Taq DNA Polymerase, Mgcl2, PCR buffer, dNTPs)، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward و ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse، ۴ میکرولیتر DNA و

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

۱۲ میکرولیتر آب مقطر استریل تحت برنامه حرارتی: واسرشت ابتدایی ۹۵°C (۳ دقیقه)، واسرشت ۹۵°C (۳۰ ثانیه)، اتصال °C ۵۵/۵ برای ژن CO1 و ۴۷/۷°C برای ژن ND1، طویل شدن زنجیره ۷۲°C و طویل شدن نهایی ۷۲°C و تکرار سیکل ۳۵ مرتبه به‌منظور تکثیر قطعات انجام گردید.

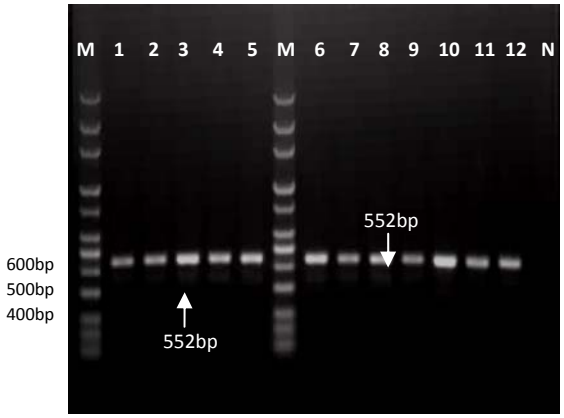
جدول شماره ۱- پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر قطعات CO1 و ND1

پرایمر	نام	ژن	ترادف	طول
رفت	Eg-F-CO1	CO1	5-TTTTTTGGGCATCCTGAGGT-3	۲۰
	Eg-F-ND1	ND1	5- GTTTTTGGGTTAGTCTCTGG-3	۲۰
برگشت	Eg-R-CO1	CO1	5-TAAAGAAAGAACATAATGAA-3	۲۰
	Eg-R-ND1	ND1	5-ATCATAACGAACACGTGG-3	۱۸

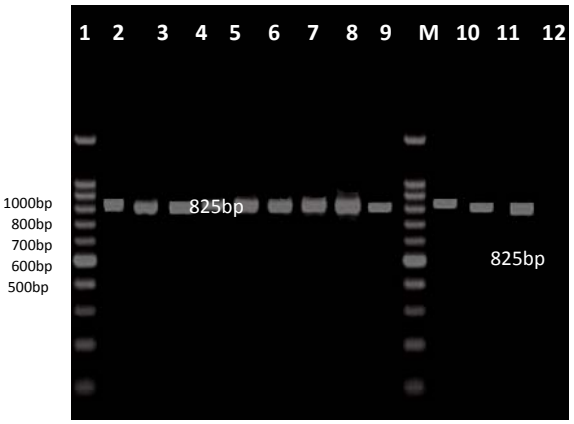
سپس، ۴ میکرولیتر از محصول PCR تهیه شده به همراه ۲ میکرو-لیتر بافر loading در کنار مارکر وزنی DNA 100bp، کنترل منفی (آب مقطر دوبار تقطیر) و کنترل مثبت (محصول PCR حاوی DNA استاندارد شده انگل) در ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شده و در ولتاژ ۸۰ به‌مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز انجام شد. و با استفاده از ترانس‌لومیناتور باندهای تشکیل شده آنالیز گردید. مشاهده باندهای تقریبی 550bp و 820bp به‌ترتیب نشان-دهنده وجود ژن CO1 و ND1 در ایزوله‌های مورد مطالعه بود. هم‌چنین، برای ۷ نمونه محصول PCR ایزوله‌های شتر و ۵ نمونه محصول PCR ایزوله‌های سگ تعیین توالی صورت گرفت. به-منظور تعیین میزان مشابهت ژنتیکی بین سکانس‌ها و در مقایسه با موارد ثبت شده در بانک ژن، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 مورد آنالیز دوبه‌دو قرار گرفت.
(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2).

نتایج

در این مطالعه ۵۱ کبد و ریه شتر آلوده به کیست هیداتید شامل: ۸ کیست کبدی (۱۵/۷ درصد) و ۴۳ کیست ریوی (۸۴/۳ درصد) و ۲۰۰ کرم بالغ *اکینوکوکوس گرانولوزوس* جمع‌آوری شده از سگ‌های ولگرد منطقه اصفهان با روش PCR و تعیین توالی جهت تعیین ژنوتایپ‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* مورد بررسی قرار گرفت. نواحی ژنومی CO1 و ND1 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (Eg-F و Eg-R) پس از تکثیر به روش PCR اندازه‌ای به‌ترتیب 552bp و 825bp نشان دادند. شکل‌های شماره ۱ و ۲ محصول الکترفورز ژل دو ژن مورد مطالعه را در سگ و شتر نشان می‌دهد. نتایج حاصل از بلاست توالی‌های ایزوله‌های شتر و سگ در سایت NCBI نشان داد ژنوتایپ غالب *اکینوکوکوس گرانولوزوس* هم در میزبان نهایی (سگ) و هم در میزبان واسط (شتر)، سویه شایع گوسفندی (G1) می‌باشد. هم-چنین سویه‌های G3 و G6 (ایزوله شتری) نیز در منطقه اصفهان مشاهده می‌شود. در جدول شماره ۲ ژنوتایپ‌های شناسایی شده نشان داده شده است.



شکل شماره ۱- الکتروفورز ژل ۱/۵ درصد محصول PCR ناحیه ژنومی CO1 ایزوله‌های شتر و سگ منطقه اصفهان، (۵-۱) باندهای 552bp ایزوله سگ (۱۲-۶) باندهای 552bp ایزوله شتر، M مارکر وزنی 100bp و N کنترل منفی



شکل شماره ۲- الکتروفورز ژل ۱ درصد محصول PCR ناحیه ژنومی ND1 ایزوله‌های شتر و سگ منطقه اصفهان، (۹-۱) باندهای 825bp ایزوله شتر (۱۲-۱۰) باندهای 825bp ایزوله سگ، M مارکر وزنی 100bp و N کنترل منفی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

جدول شماره ۲- ژنوتایپ‌های ژن ND1 و CO1 *اکینوکوکوس گرانولوزوس* جمع‌آوری شده از شتر و سگ در منطقه اصفهان

ایزوله سگ				ایزوله شتر			
ژن CO1		ژن ND1		ژن CO1		ژن ND1	
شماره نمونه	ژنوتایپ	شماره نمونه	ژنوتایپ	شماره نمونه	ژنوتایپ	شماره نمونه	ژنوتایپ
۱	G1,G3	۱	G1	۷	G6	۴	G6
۲	G1,G3	۲	G1	۱۲	G6	۵	G3
۳	G3	۳	G1	۱۳	G6	۱۳	G1
۴	G1	۴	G1	۱۴	G6	۱۶	G1,G3
۵	G1,G3	۵	G1	۱۵	G6	۱۷	G1
				۱۷	G3	۲۴	G1,G3
				۲۵	G3	۲۸	G1,G3
				۴۳	G3		

نتایج حاصل از آنالیز دوبه‌دوی توالی‌های ایزوله‌های شتر با یکدیگر و در مقایسه با موارد ثبت شده در بانک ژن اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان داد،به‌گونه‌ای‌که میزان مشابهت ژنتیکی ایزوله‌ها در دو ژن ND1 و CO1 مورد بررسی بین ۳۰/۲۵ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. چنین اختلاف قابل ملاحظه‌ای در بین سگ‌های مورد مطالعه نیز مشاهده شد، به‌گونه‌ای‌که میزان مشابهت ژنتیکی دو ژن مورد بررسی بین ۲۷/۴۷ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. جداول شماره ۳ و ۴ میزان مشابهت ژنتیکی ژن‌های ND1 و CO1 را در دو میزبان مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه کرده است.

جدول شماره ۳- مقایسه میزان مشابهت ژنتیکی ژن‌های ND1 و CO1 بین ایزوله‌های شتری *اکینوکوکوس گرانولوزوس* جمع‌آوری شده از کشتارگاه‌های صنعتی نجف آباد و زرین شهر استان اصفهان در مقایسه با ایزوله‌های ثبت شده در ژن بانک

درصد مشابهت ژنتیکی ژن ND1 ایزوله‌های شتر										
ایزوله	نمونه ۲۴	AB668376	نمونه ۱۳	KJ162560	نمونه ۲۸	نمونه ۵	نمونه ۴	نمونه ۱۶	نمونه ۱۷
نمونه ۲۴	۱۰۰	۵۵/۳۵	۶۳/۸۷	۶۶/۴۹	۴۸/۰۸	۴۵/۸۵	۴۷/۷۲	۵۶/۷۸	۵۴/۲۲
AB668376	۵۵/۳۵	۱۰۰	۷۴/۷۱	۸۴/۶۸	۲۹/۵۶	۳۰/۲۵	۳۴/۱۶	۳۵/۰۴	۳۶/۹۱
نمونه ۱۳	۶۳/۸۷	۷۴/۷۱	۱۰۰	۹۱/۴۸	۳۱/۷۴	۳۲/۸۵	۳۷	۴۱/۲۲	۴۲/۴۶
KJ162560	۶۶/۴۹	۸۴/۶۸	۹۱/۴۸	۱۰۰	۳۰/۶۳	۳۱/۸۲	۳۵/۵۰	۴۱/۲۶	۴۲/۰۸
نمونه ۲۸	۴۸/۰۸	۲۹/۵۶	۳۱/۷۴	۳۰/۶۳	۱۰۰	۴۷/۰۵	۵۰/۸۹	۹۲/۹۲	۵۶/۴۸
نمونه ۵	۴۵/۸۵	۳۰/۲۵	۳۲/۸۵	۳۱/۸۲	۴۷/۰۵	۱۰۰	۵۷/۹۸	۵۲/۳۴	۵۹/۵۳
نمونه ۴	۴۷/۷۲	۳۴/۱۶	۳۷	۳۵/۵۰	۵۰/۸۹	۵۷/۹۸	۱۰۰	۵۹/۰۴	۶۴/۲۲
نمونه ۱۶	۵۶/۷۸	۳۵/۰۴	۴۱/۲۲	۴۱/۲۶	۶۲/۹۲	۳۲/۳۴	۵۹/۰۴	۱۰۰	۶۷/۳۹
نمونه ۱۷	۵۴/۲۲	۳۶/۹۱	۴۲/۴۶	۴۲/۰۸	۵۶/۴۸	۵۹/۵۳	۶۴/۲۲	۶۷/۳۹	۱۰۰

درصد مشابهت ژنتیکی ژن CO1 ایزوله‌های شتر									
ایزوله	نمونه ۱۳	نمونه ۴۳	JN084225	نمونه ۱۲	نمونه ۱۴	نمونه ۷	نمونه ۱۵	نمونه ۱۷	نمونه ۲۵	KJ162569
نمونه ۱۳	۱۰۰	۵۳/۰۸	۳۸/۱۲	۳۸/۲۸	۳۹/۰۹	۴۳/۶۲	۴۱/۴۴	۴۲/۸۲	۴۵/۱۰	۴۱/۵۸
نمونه ۴۳	۵۳/۰۸	۱۰۰	۶۳/۹۶	۷۶/۱۱	۶۶/۶۷	۶۹/۱۳	۶۹/۴۷	۷۳/۹۳	۷۲/۹۰	۷۳/۹۹
JN084225	۳۸/۱۲	۶۳/۹۶	۱۰۰	۷۷/۴۰	۷۸/۱۰	۷۶/۰۹	۷۴/۷۰	۷۸/۴۴	۷۶/۷۸	۸۳/۴۸
نمونه ۱۲	۳۸/۲۸	۶۷/۱۱	۷۷/۴۰	۱۰۰	۸۷/۱۴	۷۹/۶۰	۸۰/۱۸	۸۱/۶۰	۸۱/۲۹	۸۵/۳۰
نمونه ۱۴	۳۹/۰۹	۶۶/۶۷	۷۸/۱۰	۸۷/۱۴	۱۰۰	۸۱/۷۰	۸۰/۹۳	۸۱/۳۴	۷۸	۸۷/۵۹
نمونه ۷	۴۳/۶۲	۶۹/۱۳	۷۶/۰۹	۷۹/۶۰	۸۱/۷۰	۱۰۰	۸۶/۳۵	۸۲/۵۹	۸۴/۹۸	۸۹/۸۳
نمونه ۱۵	۴۱/۴۴	۶۹/۴۷	۷۴/۷۰	۸۰/۱۸	۸۰/۹۳	۸۶/۳۵	۱۰۰	۸۲/۵۶	۸۵/۵۹	۸۹/۰۲
نمونه ۱۷	۴۲/۸۲	۷۳/۹۳	۷۸/۴۴	۸۱/۶۰	۸۱/۳۴	۸۲/۵۹	۸۲/۵۶	۱۰۰	۸۴/۰۱	۹۰/۰۵
نمونه ۲۵	۴۵/۱۰	۷۲/۹۰	۷۶/۷۸	۸۱/۲۹	۷۸	۸۴/۹۸	۸۵/۵۹	۸۴/۰۱	۱۰۰	۹۱/۷۵
KJ162569	۴۱/۵۸	۷۳/۹۹	۸۳/۴۸	۸۵/۳۰	۸۷/۵۹	۸۹/۸۳	۸۹/۰۲	۹۰/۰۵	۹۱/۷۵	۱۰۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

جدول شماره ۴- مقایسه میزان مشابهت ژنتیکی ژن‌های ND1 و CO1 بین ایزوله‌های سگ *اکینوکوکوس گرانولوزوس* جمع‌آوری شده مناطق مختلف جغرافیایی اصفهان در مقایسه با ایزوله‌های ثبت شده در ژن بانک

درصد مشابهت ژنتیکی ژن ND1 ایزوله‌های سگ							
ایزوله	نمونه ۳	نمونه ۱	JN831290	نمونه ۴	نمونه ۵	KU169240	KU169238
نمونه ۳	۱۰۰	۵۰/۰۶	۸۳/۳	۳۲	۲۷/۴۷	۷۹/۳	۶۷/۷
نمونه ۱	۵۰/۰۶	۱۰۰	۵۱/۶۱	۵۹/۹	۶۳/۱۲	۶۸/۳۹	۶۸/۵۳
JN831290	۸۳/۳	۵۱/۶۴	۱۰۰	۶۸/۵۴	۶۹/۶۹	۷۵/۹۱	۷۵/۴۹
نمونه ۴	۳۲	۵۹/۹	۶۸/۵۴	۱۰۰	۸۴/۶۸	۹۳/۴۳	۹۳/۵۷
نمونه ۵	۲۷/۴۷	۶۳/۱۲	۶۹/۶۹	۸۴/۶۸	۱۰۰	۹۶/۵۶	۹۶/۷۰
KU169240	۷۹/۳	۶۸/۳۹	۷۵/۹۱	۹۳/۴۳	۹۶/۵۶	۱۰۰	۹۸/۱۸
KU169238	۶۷/۷	۶۸/۵۳	۷۵/۴۹	۹۳/۵۷	۹۶/۷۰	۹۸/۱۸	۱۰۰

درصد مشابهت ژنتیکی ژن CO1 ایزوله‌های سگ							
ایزوله	HQ204206	نمونه ۲	JN604105	KM014641	نمونه ۵	نمونه ۳	نمونه ۱	نمونه ۴
HQ204206	۱۰۰	۸۱/۷۷	۸۳/۳۳	۸۴/۲۴	۷۹/۳۳	۸۰/۳۹	۸۰/۶۸	۸۱/۲۵
نمونه ۲	۸۱/۷۷	۱۰۰	۹۸/۰۹	۹۷/۲۷	۸۸/۴۶	۹۲/۳۱	۹۰/۵۲	۹۵/۹۳
JN604105	۸۳/۳۳	۹۸/۰۹	۱۰۰	۹۹/۱۸	۹۵/۶۳	۹۵/۹۰	۹۵/۶۳	۹۵/۹۰
KM014641	۸۴/۲۴	۹۷/۲۷	۹۹/۱۸	۱۰۰	۹۵/۷۲	۹۶/۴۵	۹۵/۷۰	۹۵/۲۱
نمونه ۵	۷۹/۳۳	۸۸/۴۶	۹۵/۶۳	۹۵/۷۲	۱۰۰	۹۴/۸۷	۹۵/۶۸	۹۵/۴۵
نمونه ۳	۸۰/۳۹	۹۲/۳۱	۹۵/۹۰	۹۶/۴۵	۹۴/۸۷	۱۰۰	۹۵/۸۰	۹۶/۱۴
نمونه ۱	۸۰/۶۸	۹۰/۵۲	۹۵/۶۳	۹۵/۷۰	۹۵/۶۸	۹۵/۸۰	۱۰۰	۹۷/۶۰
نمونه ۴	۸۱/۲۵	۹۵/۹۳	۹۵/۹۰	۹۵/۲۱	۹۵/۴۵	۹۶/۱۴	۹۷/۶۰	۱۰۰

بحث

این بررسی نشان داد ژنوتایپ G1 شایع‌ترین سویه بین شتر به‌عنوان میزبان واسط و سگ به‌عنوان میزبان نهایی در منطقه اصفهان می‌باشد. مطالعات انجام شده در سایر مناطق کشور نیز موید این نتیجه می‌باشد. مطالعات شربت‌خوری و همکاران (۲۰۱۰) که روی ایزوله‌های کیست هیداتید جمع‌آوری شده از شتر در مناطق مختلف مرکزی ایران با استفاده از توالی ژن‌های میتوکندریایی (ND1 و CO1) صورت گرفت وجود ۳ ژنوتایپ G1، G3 و G6 را در این میزبان مورد تائید قرارداده است. هم‌چنین، این محققین (۲۰۱۱) همولوژی ژنتیکی بین ایزوله‌های مورد مطالعه را در مقایسه با موارد ثبت شده در بانک ژن تا ۱۰۰ درصد گزارش نموده‌اند [۲۳،۲۲]. در بررسی مشابهی که توسط رستمی نژاد و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از ژن atp6 روی ایزوله‌های کیست هیداتید کبد گاو، گوسفند و شتر در ورامین انجام شد ژنوتایپ‌های G1 و G6 در میزبانان مورد بررسی شناسایی شده است [۲۴]. در بررسی مشابه دیگری که توسط فصیحی هرندی و همکاران (۲۰۱۲) روی ایزوله‌های کیست هیداتید، گوسفند، بز، گاو، شتر و انسان در استان کرمان صورت گرفت، ژنوتایپ غالب منطقه در میزبانان واسط انگل G1 و G6 گزارش شده است [۲۵]. مطالعه حسین زاده و همکاران (۲۰۱۲) در استان فارس روی کبد و ریه آلوده کیست هیداتید گاو، گوسفند و بز نیز ژنوتایپ غالب منطقه را G1 و G6 نشان داده است [۲۶]. هم‌چنین، مطالعه شهنازی و همکاران (۲۰۱۱) در اصفهان که روی ایزوله‌های گاو، گوسفند، شتر و انسان انجام شده است، استرین گوسفندی (G1) را ژنوتایپ غالب نشان داده و استرین شتری (G6) در انسان، شتر و گاو را به‌عنوان منبع مهم عفونت برای انسان عنوان نموده است [۲۷]. مطالعه یخچالی و همکاران (۲۰۱۵) که در ارومیه به‌روش PCR-RFLP و با استفاده از ناحیه ژنومی ND1 صورت گرفت، ژنوتایپ گوسفندی (G1) را در تمامی ایزوله‌های مورد مطالعه گزارش نموده است [۲۸]. تعیین ژنوتایپ‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* با استفاده از مارکرهای مولکولی در دیگر کشورهای جهان نیز صورت گرفته است که از جمله می‌توان به مطالعه Beato و همکاران (۲۰۱۰) در کشور پرتغال اشاره کرد که با استفاده از مارکرمولکولی atp6، ژنوتایپ‌های G1 و G6 را درایزوله‌های کیست هیداتید جداشده از کبد و ریه گاو و گوسفند شناسایی کرده است [۲۹]. در مطالعه مشابه دیگری که توسط Snábel و همکاران (۲۰۱۰) در کشور ترکیه با استفاده از ژن‌های میتوکندریایی ND1، CO1 و هم‌چنین atp6 صورت گرفت، وجود ژنوتایپ‌های G1 و G3 در بین دام‌های اهلی مورد تائید قرار گرفته است [۳۰]. هم‌چنین، پژوهش Balbinotti و همکاران

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

(۲۰۱۲) در برزیل ژنوتایپ غالب اکینوکوکوس را در بین دام‌های اهلی برزیل سویه گوسفندی (G1) نشان داده است [۳۱]. در *اکینوکوکوس گرانولوزوس* مجموعه‌ای از ژنوتایپ‌ها وجود دارد. مطالعات مولکولی مبتنی بر آنالیز DNA میتوکندریائی (mtDNA) و DNA هسته‌ای (rDNA) در ایران و نقاط مختلف جهان وجود ۱۰ ژنوتایپ (G1-G10) را در میزبانان مختلف این انگل نشان داده است. این بررسی‌ها نشان داده ژنوتایپ G1-G3 دارای توزیع جغرافیائی گسترده‌تر و مسئول اصلی عفونت‌های انسانی می‌باشد. ژنوتایپ G6-G10 دارای انتشار محدودتر و دارای قدرت آلوده‌کنندگی کمتری در انسان نسبت به ژنوتایپ‌های ذکر شده می‌باشد. تمامی مطالعات صورت گرفته ژنوتایپ غالب را G1 نشان داده است [۳۴-۳۲]. پژوهش حاضر نیز به‌وضوح نشان داد ژن‌های میتوکندریایی CO1 و ND1 مارکرهای مولکولی بسیار مناسبی برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی و افتراق بین ایزوله‌های اکینوکوکوس در میزبانان واسط و نهایی انگل می‌باشد، به‌گونه‌ای‌که همانند دیگر نقاط جهان، وجود سویه (G1) را به‌عنوان ژنوتایپ غالب و شایع در منطقه اصفهان تایید کرد. اگرچه روش‌های مولکولی مانند PCR و تعیین توالی در تعیین وضعیت تاکسونومیک انگل‌ها و شناسائی ژنوتایپ‌های آن‌ها هم‌چون *اکینوکوکوس گرانولوزوس* بسیار مفید و با ارزش می‌باشد، ولی استفاده از آنها مستلزم داشتن DNA خالص و با کیفیت و هم‌چنین پرایمرهای اختصاصی می‌باشد [۳۲،۲۸،۲۴]. نتایج حاصل از آنالیز تعیین توالی در بررسی حاضر همانند برخی نقاط دیگر کشور [۳۵] بیانگر حضور فعال ژنوتایپ شتر (G6) و کمپلکس (G1-G3) در منطقه مورد مطالعه می‌باشد و به‌نظر می‌رسد شتر به‌عنوان یک میزبان واسط مهم در چرخه *اکینوکوکوس گرانولوزوس* ایفای نقش نموده و حاکی از وجود چرخه فعال سگ/شتر در کنار چرخه سگ/گوسفند در منطقه می‌باشد. مشاهده استرین گوسفندی در برخی ایزوله‌های شتری نیز حاکی از تداخل دو چرخه تکاملی مذکور می‌باشد. باتوجه به خصوصیات بیولوژیکی و ژنتیکی متفاوت دو سویه فوق در برنامه‌ریزی‌های کنترل بیماری هیداتیدوز باید این مسئله مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر نشان داد آنالیز توالی‌های ژن‌های میتوکندریایی ND1 و CO1 مارکرهای مولکولی بسیار مناسبی برای شناسایی و جداسازی ژنوتایپ‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در منطقه جغرافیایی مورد مطالعه می‌باشد. علاوه براین، با استفاده از این مارکرهای مولکولی می‌توان به‌طور دقیق میزان مشابهت و اختلافات ژنتیکی را در بین ایزوله‌ها و هم‌چنین موارد ثبت شده در بانک ژن تعیین نمود. باتوجه به اهمیت پزشکی، دامپزشکی و اقتصادی بیماری هیداتیدوز پیشنهاد می‌گردد اقدامات موثر و مفیدی جهت کنترل و پیشگیری به‌منظور قطع کامل چرخه زندگی انگل بین انسان، دام و گوشتخواران گام‌های موثر و مفیدی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان می‌باشد. پژوهشگران برخود لازم می‌دانند از مسئولین فنی کشتارگاه‌های نجف‌آباد و زرین‌شهر و هم‌چنین کارشناسان محترم شهرداری اصفهان که در انجام تحقیق و تامین نمونه مورد نیاز همکاری نمودند، تشکر و قدرانی نمایند. هم‌چنین، از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان به‌خاطر تامین منابع مالی تحقیق (طرح تحقیقاتی شماره ۹۳۱۱۷)، صمیمانه تشکر و قدرانی می‌گردد.

References:

[1] Thompson RCA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus. ***Trends Parasitol*** 2002; 18(10): 452–7.

[2] Sadjjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. ***Parasitol Int*** 2006; 55 Suppl: S197-202.

[3] 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. ***Parasitology*** 2002; 125(4): 367-73.

[4] Singla LD, Singh H, Kaur P, Singh ND, Singh NK, Juyal PD. Serodetection of Ehrlichia canis infection in dogs from Ludhiana district of Punjab, India. ***J Parasit Dis*** 2011; 35(2): 195-8.

[5] Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran. ***Infect Genet Evol*** 2006; 6(2): 85-90.

[6] Ansari-Lari M. A retrospective survey of hydatidosis in livestock in Shiraz, Iran, based on abattoir data during 1999-2004. ***Vet Parasitol*** 2005; 133(1): 119-23.

[7] Dalimi A, Motamedi G, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, et al. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. ***Vet Parasitol*** 2002; 105(2): 161-71.

[8] Rajabloo M, Hosseini SH, Jalousian F. Morphological and molecular Characterisation of Echinococcus granulosus from goat isolates in Iran. ***Acta Trop*** 2012; 123(2): 67-71.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

[9] Ahmadi NA. Hydatidosis in camels (Camelus dromedarius) and their potential role in the epidemiology of Echinococcus granulosus in Iran. ***J Helminthol*** 2005; 79(2): 119-25.
[10] Thompson RC. The taxonomy,phylogeny and transmission of Echinococcus. ***Exp Parasitol*** 2008; 119(4): 439-46.
[11] 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. ***Parasitology*** 2008; 135(5): 647-54.
[12] Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus Echinococcus inferred from complete mitochondrial genomes. ***Parasitology*** 2007; 134 (Pt 5): 713-22.
[13] Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A, Garippa G. Molecular characterization of Echinococcus granulosus strains in Sardinia. ***Parasitol Res*** 2006; 98(3): 273-7.
[14] Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S. Molecular genetic charact- errization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of Echinococcus granulosus. ***Parasitology*** 2003; 127(Pt 3): 207-15.
[15] McManus DP, Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. ***Parasitology*** 2003; 127 Suppl: 37-51.
[16] McManus DP. The molecular epidemiology of Echinococcus granulosus and cystic hydatid disease. ***Trans R Soc Trop Med Hyg*** 2002; 96 Suppl 1: 151-7.
[17] 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.
[18] Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, et al. Several strains of Echinococcus granulosus infect livestock and humans in Argentina. ***Infect Genet Evol*** 2002; 2(2): 129-36.
[19] McManus DP, Zhang L, Castrodale LJ, Le TH, Pearson M, Blair D. Short report: molecular genetic characterization of an unusually severe case of hydatid disease in Alaska caused by the cervid strain of Echinococcus granulosus. ***Am J Trop Med Hyg*** 2002; 67(3): 296-8.
[20] Dyachenko V, Pantchev N, Gawlowska S, Vrhovec MG, Bauer C. Echinococcus multilocularis infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. ***Vet Parasitol*** 2008; 157(3-4): 244-53.
[21] Bowles J, Blair D, McManus DP. Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of Echinococcus granulosus. ***Parasitology*** 1994; 109 (Pt2): 215-21.
[22] Sharbatkhori M, Mirhendi H, Fasihi Harandi M, Rezaeian M, Mohebali 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.
[23] Sharbatkhori M, Fasihi Harandi M, Mirhendi H, Hajialilo E. Beigom Kia E. Sequence analysis of cox1 and nad1 genes in Echinococcus granulosus G3 genotype in camels (Camelus dromedarius) from central Iran. ***Parasitol Res*** 2011; 108(3): 521–7.
[24] Rostami Nejad M, Nazemalhosseini Mojarad E,Taghipour N, Nochi Z, Cheraghipour K, Dabiri H, et al. Molecular determination of Echinococcus granulosus isolated from hydatid cyst using mitoconderial atp6 gene. ***J Gorgan Uni Med Sci*** 2010; 13(2): 61-7. [in Persian]
[25] Fasihi Harandi M, Hajialilo H, Shokouhi M. Larval Hook Length Measurement for Differentiating G1 and G6. ***Turkiye Parazitol Derg*** 2012; 36: 215-8.
[26] Hosseinzadeh S, Fazeli M, Hosseini A, Shekarforoush SS. Molecular Characterization of Echinococcus granulosus in South of Iran. ***Open J Vet Med*** 2012; 2: 201-6.
[27] Shahnazi M, Hejazi H, Salehi M, Andalib AR. Molecular characterization of human and animal Echinococcus granulosus isolates in Isfahan, Iran. ***Acta Trop*** 2011: 117(1): 47-50.
[28] Yakhchali M, Malekzadeh-Viayeh R, Imani-Baran A, Mardani K. Morphological and molecular discrimination of fasciola species isolated from domestic ruminants of Urmia city, Iran. ***Iran J Parasitol*** 2015; 10(1): 46-55.
[29] Beato S, Parreira R, Calado M, Grácio MA. Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of Echinococcus granulosus strains in the central inland region of Portugal. ***Parasitol Int*** 2010; 59(4): 638-42.
[30] Snábel 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. ***Parasitol Res*** 2009; 105(1): 145-54.
[31] Balbinotti H, Santosa GB, Badaracoa J, Arenda AC, Graichena DNS, Haagd KL, et al. Echinococcus ortleppi (G5) and Echinococcus granulosus sensu strict (G1) loads in cattle from Southern Brazil. ***Vet Parasitol*** 2012; 188(3-4): 255–60.
[32] Rahimi HR, Beigom Kia E, Mirhendi SH, Talebi A, Fasihi Harandi M, Jalali-zand N, et al. A New Primer Pair in ITS1 Region for Molecular Studies on Echinococcus granulosus. ***Iran J Public Health*** 2007; 36(1): 45-9.
[33] Cucher MA, Macchiaroli N, Baldi GA, Camicia F, Prada L, Lucas Maldonado L, et al. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of Echinococcus granulosus sensu lato in humans and natural domestic hosts. ***Trop Med Int Health*** 2016; 21(2): 166–75.
[34] Grosso G, Gruttadauria S, Biondi A, Marventano S, Mistretta A. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. ***World J Gastroenterol*** 2012; 18(13): 1425-37.
[35] Moghaddas E, Borji H, Naghibi A, Shayan P, Razmi GR. Molecular genotyping of Echinococcus granulosus from dromedaries (Camelus dromedarius) in eastern Iran. ***J Helminthol*** 2015; 89(1): 100-4.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]