تحقیقی

شناسایی گونه‌های فاسیولا با روش PCR-RFLP در شهرستان گرگان

احمد هلاکو[۱]، دکتر هوشنگ خزان*[۲]، دکتر مژگان بنده پور[۳]، نیلوفر تقی پور[۴]، دکتر بهرام کاظمی[۵]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی پزشکی، شعبه بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران. ۲- دانشیار گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران. ۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران. ٤- مربی گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران. ۵- استاد گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *امروزه شناسایی گونه‌های فاسیولا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گونه‌های این جنس از انگل‌ها باعث فاسیولیازیس شده که از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک در دام‌های اهلی و انسان‌ها است. این مطالعه به منظور شناسایی گونه‌های فاسیولا با روش PCR-RFLP در شهرستان گرگان انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی کرم‌های فاسیولا از کبدهای آلوده گاو و گوسفند کشتارگاه گرگان جدا شد و استخراج ژن با روش فنل –کلروفرم انجام گردید. قطعه‌ای از ژنوم ITS-1 تکثیر و با آنزیم TasI، آزمون RFLP روی قطعات تکثیریافته انجام شد و ۸ نمونه تعیین توالی گردید.*

یافته‌ها : *در مجموع ٤۹ کرم فاسیولا از کبدهای آلوده گاو و گوسفند جداسازی شد. محصولات PCR تمام نمونه‌ها تحت تاثیر آنزیم TasI قرار گرفتند و گونه‌های هپاتیکا دوباند و گونه‌های ژیگانتیکا سه باند را نشان دادند. این آنزیم درگونه هپاتیکا یک قطعه ۱۵۱ جفت بازی و یک قطعه۳۱۲ را نشان داد؛ ولی در گونه ژیگانتیکا سه قطعه ۱۵۱، ۹۳ و ۲۱۹ جفت بازی بود. ۳٦ کرم (۷۳/٤٦درصد) فاسیولا ژیگانتیکا و ۱۳ کرم (۲٦/۵۳درصد) فاسیولا هپاتیکا تشخیص داده شدند. از ٦ کبد آلوده گوسفندی، ۲۲ کرم فاسیولا جدا گردید که ۱۳ گونه هپاتیکا (۵۹/۱درصد) و ۹ گونه ژیگانتیکا (٤۰/۹درصد) تشخیص داده شدند. از ٦ کبد آلوده گاوی، ۲۷ کرم فاسیولا جدا گردید که همگی از گونه گاوی فاسیولا ژیگانتیکا (۱۰۰درصد) شناسایی شدند.*

نتیجه‌گیری : *گونه فاسیولا ژیگانتیکا گونه غالب در شهرستان گرگان است.*

کلید واژه‌ها : *کبد ، گوسفند ، گاو ، فاسیولا هپاتیکا ، فاسیولا ژیگانتیکا ، PCR-RFLP*

* نویسنده مسؤول : دکتر هوشنگ خزان ، پست الکترونیکی khazan_h36@yahoo.co.in

نشانی : تهران، خیابان اوین، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

تلفن ۲۳۸۷۲۵٦-۰۲۱، نمابر ۲۲٤۳۹۹۵٦

وصول مقاله : ۱۳۹۵/۳/۳۱ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۵/٦/۷ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۵/٦/۸

مقدمه

فاسیولیازیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی است که عامل آن جنس فاسیولا با دو گونه شاخص هپاتیکا و ژیگانتیکا است (۱). میزبان اصلی آن حیوانات اهلی از جمله گاو و گوسفند بوده و حلزون‌های گالبا ترونکاتولا، فوزاریا و رادیکس میزبان واسط این کرم‌ها هستند (۲). این بیماری در مرحله اول در حیوانات و در مرحله بعدی در انسان مورد اهمیت است (۳). فاسیولیازیس در انسان به‌طور چشمگیر افزایش یافته و حدود ۲/۴ میلیون انسان مبتلا و ۱۸۰ میلیون نفر در معرض ابتلا به بیماری در جهان هستند (۴). کشور ایران جزء مناطق آندمیک و حدود ۶ میلیون نفر در معرض ابتلا به این بیماری قرار دارند (۵). دو اپیدمی بزرگ در دهه‌های اخیر در شمال ایران و استان کرمانشاه گزارش شده است (۶و۷). همچنین موارد فاسیولیازیس انسانی در سایر نقاط ایران نیز گزارش شده است (۸). با توجه به افزایش این بیماری در سال‌های اخیر، تشخیص گونه‌های این جنس از کرم‌ها برای پیشگیری، کنترل و درمان بیماری حایز اهمیت است. از مهم‌ترین روش‌ها برای تشخیص فاسیولا روش تشخیص مولکولی (PCR) است (۹و۱۰). روش PCR-RFLP یکی از بهترین روش‌های تشخیص گونه‌های فاسیولا در نقاطی است که دو گونه هپاتیکا و ژیگانتیکا در دام‌های اهلی وجود دارند. همچنین می‌توان از این روش در بررسی‌های

اپیدمیولوژیکی دامی و انسانی برای تشخیص فاسیولیازیس استفاده نمود (۱۱). از آنجا که بعضی از کرم‌ها را نمی‌توان از نظر مرفولوژیک به‌طور قطع به‌عنوان یکی از دو گونه هپاتیکا یا ژیگانتیکا شناسایی نمود و همچنین وجود شکل حدواسط نیز گزارش شده است؛ لذا این مطالعه به منظور شناسایی گونه‌های فاسیولا با روش PCR-RFLP در شهرستان گرگان انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی کرم‌های فاسیولا از ۱۲ کبد آلوده (۶ کبد گوسفندی و ۶ کبد گاوی) در فصول مختلف از کشتارگاه گرگان از تاریخ ۱۳۹۳/۹/۲۸ لغایت ۱۳۹۴/۹/۲۸ جداسازی گردید.

کرم‌های فاسیولا با دقت و سه بار با PBS شستشو شدند و قسمتی از کرم‌های فاسیولا با قیچی بریده و به الکل ۷۰ درجه منتقل گردید.

برای استخراج DNA از روش فنل - کلروفرم اصلاح شده استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر یک قطعه ۴۶۳ جفت بازی از ژن ITS-1 شامل پرایمرهای زیر بود که توسط شرکت سیناژن سنتز شدند.

فوروارد: FascF: 5´-ACC GGT GCT GAG AAG ACG-3´

ریورز: 5´- CGA CGT ACG TGC AGT CCA-3´

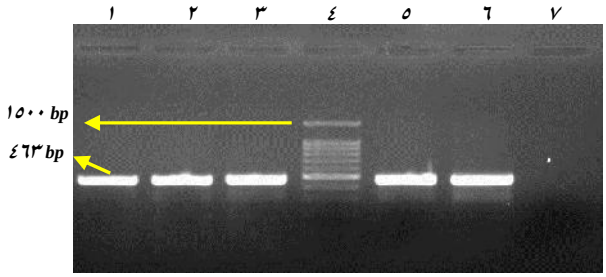
واکنش PCR با حجم کلی ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر ماستر میکس(سینا کلون)، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، یک میکرولیتر پرایمر حاوی ۱۰ پیکومول پرایمر فوروارد و ۱۰ پیکومول پرایمر ریورز و یک میکرولیتر از DNA استخراج شده انجام گردید. برنامه حرارتی ترموسایکلر شامل initial denaturation در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. تکثیر در سه مرحله و ۳۰ تکرار شامل Denaturation در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و Extension در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت مرحله Final Extension در دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از انجام واکنش PCR برای ارزیابی قطعه تکثیر شده، یک میکرولیتر از محصول PCR با لودینگ بافر مخلوط گردید و روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

برای انجام PCR-RFLP از آنزیم TasI شرکت فرمنتاز استفاده شد. این آنزیم توالی 5´AATT3´ را برش می‌دهد. روش انجام کار تهیه واکنش به حجم ۱۵ میکرولیتر بود که شامل ۸ میکرولیتر آب دیونیزه، ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۱/۵ میکرولیتر بافرB و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم TasI بودند. سپس واکنش فوق به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و نهایتاً به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. برای الکتروفورز محصول PCR-RFLP از ژل ۲/۵ درصد استفاده شد و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید.

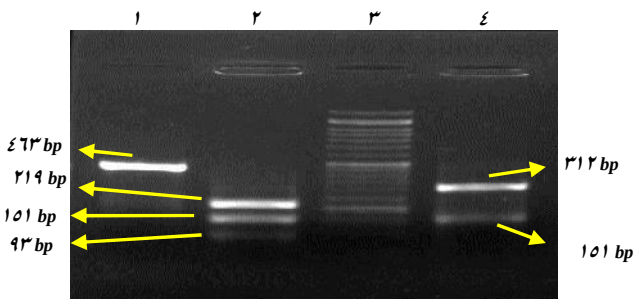
برای تعیین توالی، ۲۵ میکرولیتر از محصولات PCR، ۸ نمونه را همراه با پرایمر فوروارد توسط شرکت تکاپوزیست به بیونیر کره جنوبی ارسال نمودیم و تعیین توالی انجام شد. توالی نوکلئوتیدی تمامی نمونه‌های موردنظر با استفاده از برنامه Chromas بررسی و ویرایش شدند. سپس توسط برنامه Blast آنالیز گردید و براساس بالاترین هومولوژی با ژن‌های موجود در بانک اطلاعات ژن، ارزیابی شدند.

یافته‌ها

در مجموع ۴۹ کرم فاسیولا جداسازی گردید. پرایمر مورد استفاده برای هر دو گونه هپاتیکا باند ۴۶۳ جفت بازی روی ژل آگاروز۱/۵ درصد نشان داد که با انجام PCR نمی‌توان این دو گونه را از هم تشخیص داد (شکل یک).



شکل ۱ : نتایج الکتروفورز محصول PCR قطعه ٤٦۳ جفت بازی روی ژل آگاروز۱/۵ درصد
شماره ۱ الی ۳ : فاسیولا هپاتیکا؛ شماره ٤ : مارکر۱۰۰ جفت بازی؛ شماره ٥ و ٦ : فاسیولا ژیگانتیکا؛ شماره ۷ : کنترل منفی



شکل ۲ : نتایج الکتروفورز محصول PCR-RFLP روی ژل ۲/۵ درصد آگاروز
شماره ۱ : محصول PCR بدون آنزیم؛ شماره ۲ : فاسیولا هپاتیکا با دو باند ۱۵۱ و ۳۱۲ جفت بازی؛ شماره ۳ : مارکر ۵۰ جفت بازی؛ شماره ٤ : فاسیولا ژیگانتیکا با سه باند ۹۳، ۱۵۱ و۲۱۹ جفت بازی

محصولات PCR تمام نمونه‌ها تحت تاثیر آنزیم TasI قرار گرفتند و گونه‌های هپاتیکا دوباند و گونه‌های ژیگانتیکا سه باند را نشان دادند. این آنزیم درگونه هپاتیکا یک قطعه ۱۵۱ جفت بازی و یک قطعه۳۱۲ را نشان داد؛ ولی در گونه ژیگانتیکا سه قطعه ۱۵۱، ۹۳ و ۲۱۹ جفت بازی است (شکل ۲).

براساس روش‌های مولکولی ۳۶ کرم (۷۳/۴۶درصد) فاسیولا ژیگانتیکا و ۱۳ کرم (۲۶/۵۳درصد) فاسیولا هپاتیکا تشخیص داده

شدند.

از ۶ کبد آلوده گوسفندی، ۲۲ کرم فاسیولا جدا گردید که ۱۳ گونه هپاتیکا (۵۹/۱درصد) و ۹ گونه ژیگانتیکا (۴۰/۹درصد) تشخیص داده شدند.

از ۶ کبد آلوده گاوی، ۲۷ کرم فاسیولا جدا گردید که همگی از گونه گاوی فاسیولا ژیگانتیکا (۱۰۰درصد) شناسایی شدند.

بحث

در این مطالعه با استفاده از روش PCR-RFLP، گونه فاسیولا ژیگانتیکا گونه غالب در شهرستان گرگان شناسایی شد.

در مطالعه رکنی و همکاران با استفاده از روش PCR-RFLP روی قطعه ITS-1 و با استفاده از آنزیم TasI گونه‌های فاسیولا در دام‌های اهلی (گوسفند، بز، گاو و بوفالو) سه استان تهران، خوزستان و آذربایجان غربی بررسی شد. این روش مولکولی برای تشخیص گونه هپاتیکا از ژیگاتیکا بسیار مفید ارزیابی شد (۱۲).

در مطالعه ایمانی و همکاران با استفاده از روش PCR-RFLP روی ژن rRNA 28s و آنزیم‌های DraII و AvaII ۳/۱۲درصد از حلزون‌های استان آذربایجان غربی آلوده به فاسیولا ژیگانتیکا گزارش گردید (۱۳). آریایی‌پور و همکاران نیز طبق این آزمون و ژن ITS-1 گونه‌های فاسیولا را در ۳۵ نمونه گاوی و ۳۵ نمونه گوسفندی مشکین شهر استان اردبیل شناسایی کردند. تمام نمونه‌های گوسفندی دارای فاسیولا هپاتیکا بودند و نمونه‌های گاوی شامل هر دو گونه هپاتیکا و ژیگانتیکا بود (۱۴). در مطالعه قوامی و همکاران در استان زنجان ژنوتیپ فاسیولای جدا شده از گاو و گوسفند با استفاده از PCR-RFLP روی قطعه ژنی ITS-2، rDNA 5/8s و rDNA 28s تعیین شد. از ۵۸۴ کرم بالغ از نظر مورفومتریک ۳۱ درصد هپاتیکا، ۷درصد ژیگانتیکا و ۶۲ درصد intermediate بودند. از نظر مطالعات مولکولی که روی ۵۳۵ نمونه فاسیولا انجام شد؛ کلیه نمونه‌ها فاسیولا هپاتیکا گزارش شدند و شواهدی از گونه ژیگانتیکا به‌دست نیامد (۱۵).

در مطالعه Huang و همکاران با آزمون PCR-RFLP، ژن ITS-2 و آنزیم‌های Hsp92II و RcaI گونه‌های فاسیولا در Mainland کشور چین تشخیص داده شد و این روش مناسب و موثر ارزیابی شد (۱۶). در دو دهه اخیر محققین در نقاط مختلف دنیا علاوه بر ژن‌های ITS-1 و ITS-2 از ژن‌های میتوکندریایی ND1 و CO1 نیز برای شناسایی گونه‌های فاسیولا استفاده کردند که بسیار مناسب گزارش شده است (۱۷و۱۸). شفیعی و همکاران با استفاده از ژن ITS-2 و آنزیم‌های MspI و KpnI ۸ ایزوله فاسیولا هپاتیکا را از ۱۸ ایزوله فاسیولا ژیگانتیکا در استان کهگیلویه و بویراحمد شناسایی کردند (۱۹).

در مطالعه حاضر هر دو گونه شاخص فاسیولا در شهرستان گرگان یافت شد. اکثریت گونه‌های جدا شده از گوسفندان فاسیولا هپاتیکا و تمام گونه‌های جدا شده از گاوها فاسیولا ژیگانتیکا بود. این یافته با مطالعه رکنی و همکاران (۱۲) مطابقت دارد. به طوری که ۶۰ درصد گونه‌های فاسیولا در گوسفندان هپاتیکا و ۹۶/۶درصد گونه‌های جدا شده از گاو و بوفالو ژیگانتیکا تعیین شد (۱۲).

محامی اسکویی و همکاران برای تعیین گونه‌های فاسیولای جدا شده از سه استان خراسان، آذربایجان غربی و فارس از روش PCR-RFLP روی ژن‌های ITS1، ITS2 و rDNA 5.8s استفاده نمودند. آنزیم استفاده شده در این روش Tsp509I بود. از ۹۰ نمونه فاسیولا جدا شده از گاو و گوسفند در سه استان، ۷۰ گونه هپاتیکا و ۲۰ گونه ژیگانتیکا شناسایی گردید (۲۰). شهبازی و همکاران برای شناسایی گونه‌های فاسیولا در ۵۰ گوسفند و ۵۰ گاو در کشتارگاه‌های تبریز با بهره‌گیری از ژن ITS-1 توانستند ۷۵ گونه هپاتیکا و ۲۵ گونه ژیگانتیکا را با روش PCR-RFLP (آنزیم Tas1) تشخیص دهند (۲۱). خاکپور و قره‌داغی با روش RAPD-PCR از ۶ کبد آلوده گاو و ۶ کبد آلوده گوسفند در شهرستان تبریز؛ تنوع سویه‌های مختلف گونه‌های هپاتیکا را گزارش کردند (۲۲). در مطالعه Dar و همکاران در مصر برای تشخیص گونه‌های فاسیولا جدا شده از گاو، گوسفند و بوفالو به روش PCR-RFLP و با آنزیم RsaI روی قطعه ژنی ITS-1 انجام شد. از ۱۳۴ فاسیولای جدا شده ۹۳ گونه (۶۹/۴ درصد) هپاتیکا و ۴۱ گونه (۳۰/۶درصد) ژیگانتیکا شناسایی گردید و هیچ گونه هیبرید شناسایی نشد (۲۳). در مطالعه رحیمی و همکاران تعیین گونه‌های فاسیولا در استان زنجان با استفاده از PCR-RFLP انجام شد. تمامی ۵۳۵ کرم فاسیولا جدا شده از گاو و گوسفند فاسیولا هپاتیکا گزارش گردید و هیچ‌گونه فاسیولا ژیگانتیکا گزارش نشد (۲۴). گلوانی و همکاران نیز در استان آذربایجان غربی مطالعه مشابهی روی قطعات ژنی ITS-1 ، ITS2 و 5/8s از ۵۸۰ کرم فاسیولا جدا شده گاو و گوسفند انجام دادند و ۵۰ نمونه تعیین توالی انجام شد. تمامی نمونه‌های تعیین توالی شده فاسیولا هپاتیکا گزارش گردید (۲۵). در چندین سال گذشته مطالعه همزمان روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی (RFLP) برای شناسایی گونه‌های مختلف فاسیولا در نقاط مختلف ایران انجام شده است و بیشتر محققین روش مولکولی را بر روش مورفولوژیکی ترجیح داده‌اند (۲۸-۲۶). روش مولکولی RFLP-PCR روش مناسبی برای تعیین گونه فاسیولا در نقاطی است که دوگونه به‌صورت همپوشانی وجود دارند و روش‌های موفولوژیک (تست‌های مورفومتریک) خسته کننده و طولانی مدت هستند که در بعضی موارد نیز نمی‌توان تعیین گونه را انجام داد(۱۱).

در مطالعه Chaichanasak و همکاران در تایلند ۱۴۷ کرم جدا شده از کبد گاو و با استفاده از روش PCR-RFLP روی قطعات ITS-1 و ND1 تعیین گونه شدند. تمام گونه‌ها فاسیولا ژیگانتیکا تشخیص داده شد و هاپلوتایپ‌های مختلفی از گونه ژیگانتیکا

گزارش گردید (۲۹). اشرفی و همکاران در استان گیلان گونه‌های فاسیولا را در میزبان‌های متعدد که شامل گاو، گوسفند، بوفالو و بز است و بر اساس زندگی میزبان‌ها در ارتفاعات مختلف از سطح دریا بررسی کردند و گزارش گردید که در دشت و ارتفاعات پایین‌تر گونه غالب ژیگانتیکا و در ارتفاعات بالاتر بیشتر گونه فاسیولا هپاتیکا یافت می‌شود (۳۰). شهرستان گرگان با توجه به موقعیت جغرافیایی که بیشتر سرزمین‌های کم‌ارتفاع آن شامل دشت گرگان است و جداسازی بیشتر فاسیولا ژیگانتیکا با مطالعه اشرفی و همکاران (۳۰) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گونه فاسیولا ژیگانتیکا گونه غالب در شهرستان گرگان است و گونه فاسیولا هپاتیکا نیز در این شهرستان یافت می‌شود. همچنین استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP مناسب ارزیابی شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۵۸۳) آقای احمد هلاکو برای اخذ درجه دکتری تخصصی در رشته انگل شناسی پزشکی از شعبه بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی و نیز حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۵۱۳۹) دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بود. بدین‌وسیله از همه کارشناسان و بازرسان کشتارگاه‌های استان گلستان نهایت سپاس خود را اعلام می‌داریم.

References

1. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Chapter 2. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. Adv Parasitol. 2009; 69: 141-46. doi: 10.1016/S0065-308X(09)69002-3

2. Mas-Coma S. Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2004; 35(Suppl 1): 1-11.

3. Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. J Helminthol. 2005 Sep; 79(3): 207-16.

4. Ashrafi K, Saadat F, O'Neill S, Rahmati B, Amin Tahmasbi H, Pius Dalton J, et al. The endemicity of human fascioliasis in Guilan province, Northern Iran: the baseline for implementation of control strategies. Iran J Public Health. 2015 Apr; 44(4): 501-11.

5. Salahimoghaddam A. [Epidemiology of Human Fascioliasis in Iran]. Journal of Kerman University of Medical Science. 2009; 16(4): 385-98. [Article in Persian]

6. Assmar M, Milaninia A, Amirkhani A, Yadegari D, Forghanparast K, Nahravanian H, et al. Seroepidemiological investigation of fascioliasis in northern Iran. Med J Islam Repub Iran. 1991; 5(1): 23-27.

7. Hatami H, Asmar M, Masoud J, Mansouri F, Namdaritabar H, Ramazankhani A. The first epidemic and new-emerging human fascioliasis in Kermanshah (Western Iran) and a ten-year follow ip, 1998-2008. Int J Prev Med. 2012 Apr; 3(4): 266-72.

8. Saberinasab M, Mohebali M, Molawi G, Kia EB, Aryaeipour M, Rokni MB. Seroprevalence of human fascioliasis using indirect ELISA in Isfahan district, central Iran in 2013. Iran J Parasitol. 2014; 9(4): 461-65.

9. Itagaki T, Sakaguchi K, Terasaki K, Sasaki O, Yoshihara S, Van Dung T. Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of Fasciola in vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA. Parasitol Int. 2009 Mar; 58(1): 81-85. doi: 10.1016/ j.parint. 2008.11.003

10. Agatsuma T, Arakawa Y, Iwagami M, Honzako Y, Cahyaningsih U, Kang SY, et al. Molecular evidence of natural hybridization between Fasciola hepatica and F. gigantica. Parasitol Int. 2000 Sep; 49(3): 231-38.

11. Marcilla A, Bargues MD, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between Fasciola hepatica and Fasciola gigantica. Mol Cell Probes. 2002 Oct; 16(5): 327-33.

12. Rokni MB, Mirhendi H, Mizani A, Mohebali M, Sharbatkhori M, Kia EB, et al. Identification and differentiation of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica using a simple PCR-restriction enzyme method. Exp Parasitol. 2010 Feb; 124(2): 209-13. doi: 10.1016/j.exppara.2009.09.015

13. Imani-Baran A, Yakhchali M, Malekzadeh Viayeh R, Paktarmani R. Molecular study for detecting the prevalence of Fasciola gigantica in field-collected snails of Radix gedrosiana (Pulmonata: Lymnaeidae) in northwestern Iran. Vet Parasitol. 2012 Oct; 189(2-4): 374-77. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.027

14. Aryaeipour M, Rouhani S, Bandehpour M, Mirahmadi H, Kazemi B, Rokni MB. Genotyping and phylogenetic analysis of Fasciola Spp. isolated from sheep and cattle using PCR-RFLP in Ardabil province, Northwestern Iran. Iran J Public Health. 2014 Oct; 43(10): 1364-71.

15. Ghavami MB, Rahimi P, Haniloo A, Mosavinasab SN. Genotypic and phenotypic anlaysis of Fasciola isolates. Iran J Parasitol. 2009; 4(3): 61-70.

16. Huang WY, He B, Wang CR, Zhu XQ. Characterisation of Fasciola species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. Vet Parasitol. 2004 Feb; 120(1-2): 75-83.

17. Elliott T, Muller A, Brockwell Y, Murphy N, Grillo V, Toet HM, et al. Evidence for high genetic diversity of NAD1 and COX1 mitochondrial haplotypes among triclabendazole resistant and susceptible populations and field isolates of Fasciola hepatica (liver fluke) in Australia. Vet Parasitol. 2014 Feb; 200(1-2): 90-96. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.11.019

18. Amer S, Dar Y, Ichikawa M, Fukuda Y, Tada C, Itagaki T, et al. Identification of Fasciola species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (NDI and COI) gene markers. Parasitol Int. 2011 Jan; 60(1): 5-12. doi: 10.1016/j.parint.2010.09.003

19. Shafiei R, Sarkari B, Moshfe A. A consistent PCR-RFLP assay based on its-2 ribosomal DNA for differentiation of Fasciola species. Iran J Basic Med Sci. 2013 Dec; 16(12): 1266-69.

20. Mahami-Oskouei M, Dalimi A, Forouzandeh-Moghadam M, Rokni M. Molecular identification and differentiation of Fasciola isolates using PCR- RFLP method based on internal transcribed spacer (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2). Iran J Parasitol. 2011 Aug; 6(3): 35-42.

21. Shahbazi A, Akbarimoghaddam M, Izadi S, Ghazanchaii A, Jalali N, Bazmani A. Identification and genetic variation of Fasciola species from Tabriz, North-Western Iran. Iran J Parasitol. 2011; 6(3): 52-59.

22. Khakpour M, Garedaghi Y. Molecular identification of

sheep and cattle isolates of Fasciola hepatica using RAPD-PCR. Archives of Razi Institute. 2012; 67(2): 109-15.

23. Dar Y, Amer S, Mercier A, Courtioux B, Dreyfuss G. Molecular identification of Fasciola spp. (Digenea: Fasciolidae) in Egypt. Parasite. 2012 May; 19(2): 177-82.

24. Rahimi P, Ghavami MB, Haniloo A, Nourian A, Biglari AR. [Identification of Fasciola Species by PCR-RFLP Assay]. ZUMS Journal. 2009; 16(4): 41-48. [Article in Persian]

25. Galavani H, Gholizadeh S, Hazrati Tappeh K. [Molecular identification of Fasciola species in west Azerbaijan provine]. Urmia Medical Journal. 2015; 25(11): 1033-40. [Article in Persian]

26. Tadayon S, Sharifiyazdi H, Moazeni M, Divar MR. Molecular Differentiation of Fasciola Species and characterization of genetic diversity of F. gigantica using NADH Dehydrogenase I (ND1) gene in the endemic areas of Iran. Iranian J Parasitol. 2015; 10(1): 9-18.

27. 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 Jan-Mar; 10(1): 46-55.

28. Shafiei R, Sarkari B, Sadjjadi SM, Mowlavi GR, Moshfe A. Molecular and morphological characterization of Fasciola spp. isolated from different host Species in a Newly Emerging Focus of human Fascioliasis in Iran. Vet Med Int. 2014; 2014: 405740. doi: 10.1155/2014/405740

29. Chaichanasak P, Ichikawa M, Sobhon P, Itagaki T. Identification of Fasciola flukes in Thailand based on their spermatogenesis and nuclear ribosomal DNA, and their intraspecific relationships based on mitochondrial DNA. Parasitol Int. 2012; 1(4): 545-49. doi: 10.1016/j.parint.2012.03.009

30. Ashrafi K, Valero MA, Peixoto RV, Artigas P, Panova M, Mas-Coma S. Distribution of Fasciola hepatica and F. gigantica in the endemic area of Guilan, Iran: Relationships between zonal overlap and phenotypic traits. Infect Genet Evol. 2015 Apr; 31: 95-109. doi: 10.1016/j.meegid.2015.01.009

Original Paper

Identification of *Fasciola* species by PCR-RFLP assay in northern Iran

Halakou A (M.Sc)[1], Khazan H (Ph.D)*[2], Bendehpour M (Ph.D)[3]
Taghipour N (M.Sc)[4], Kazemi B (Ph.D)[5]

[1]Ph.D Candidate in Parasitology, International Branch, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [2]Associate Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of Biotechnology, Cellular and Molecular Biology Research Center, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [4]Academic Instructor, Department of Parasitology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [5]Professor, Department of Biotechnology, Cellular and Molecular Biology Research Center, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Identification of *Fasciola* species is important. Fascioliasis is one of the important diseases in animals and humans caused by genus *Fasciola*. This study was done to determine the identification of *Fasciola* species with RFLP-PCR in animal liver in Gorgan City, northern Iran.

Methods: In this descriptive study, worms were obtained from the livers of infected sheep and cattle in Gorgan slaughterhouse in northern Iran. DNA of worms was extracted with phenol- chloroform method. Fragment of ITS-1 genome was amplified and TasI enzyme was utilized for amplified fragments then 8 samples were sequenced.

Results: A total of 49 *Fasciola* worms were isolated from infected cattle and sheep. The PCR products of all specimens were affected by the TasI enzyme, and *F.hepatica* species showed two fragments and *F.gigantica* species indicated three fragments. The enzyme in *F.hepatica* species showed a fragment of 151 bp and a fragment of 312, but in the *F.gigantica*, three fragments were 151, 93 and 219 bp. 36 (73.46%) worms were identified as *Fasciola* gigantica and 13 (26.53%) worms were identified as *Fasciola* hepatica. Out of the six infected sheep liver, 22 were isolated from the *Fasciola* worms, 13 (59.1%) of which were *F.hepatica* and 9 (40.9%) of them were *F.gigantica*. Out of the six infected cattle liver, 27 *Fasciola* worms were identified, all of which were identified as *Fasciola* gigantica (100%).

Conclusion: This study showed that *Fasciola* gigantica is the dominant species in infected livers of the cattle in Gorgan city.

Keywords: Liver, Sheep, Cattle, *Fasciola* gigantica, *Fasciola* hepatica, RFLP-PCR

*** Corresponding Author: Khazan H (Ph.D), E-mail: khazan_h36@yahoo.co.in**

Received 20 Jun 2016 **Revised** 28 Aug 2016 **Accepted** 29 Aug 2016

Cite this article as: Halakou A, Khazan H, Bendehpour M, Taghipour N, Kazemi B. [Identification of *Fasciola* Species by PCR-RFLP assay in northern Iran]. J Gorgan Univ Med Sci. Autumn 2017; 19(3): 99-104. [Article in Persian]