DOI: 10.22122/jims.v37i529.11964 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هفتم/شماره‌ی ۵۲۹/هفته‌ی اول مرداد ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۳۰ تاریخ چاپ: ۱۳۹۸/۵/۱

شناسایی گونه‌های Fasciola در استان‌های گرمسیر و سردسیر غرب ایران با استفاده از روش‌های مولکولی و ریخت‌شناسی

کیا بهرام‌نژاد[۱]، محمدحسین راضی جلالی[۲]، علیرضا البرزی[۳]، محمدرضا تابنده[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Fasciolosis یک بیماری انگلی است که توسط گونه‌های Fasciola hepatica، Fasciola gigantica و Fasciola حد واسط ایجاد می‌گردد. این بیماری، در طیف گسترده‌ای از گونه‌های پستانداران نظیر انسان در سراسر جهان شیوع یافته است. روش Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)، یکی از بهترین روش‌های تشخیص گونه‌های Fasciola در نقاطی است که دو گونه‌ی Fasciola hepatica و Fasciola gigantica در دام‌های اهلی وجود دارند.

روش‌ها: در این مطالعه، کرم‌های Fasciola از کشتارگاه‌های چهار استان غرب کشور ایران جمع‌آوری گردید. گونه‌های انگلی، با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شدند. از ۷۱۵ رأس دام (گاو و گوسفند) مورد بررسی، ۹۲ رأس کبد آلوده به کرم بالغ Fasciola داشتند. ۱۸ کرم بالغ از نظر ریخت‌سنجی بررسی شدند و از تخم این کرم‌ها، استخراج DNA صورت گرفت. قطعه‌ای از ژنوم نواحی ITS1,5.8S,ITS2 تکثیر و با استفاده از آنزیم TasI، آزمون PCR-RFLP روی قطعات تکثیر یافته انجام شد.

یافته‌ها: در مجموع، ۱۷۸ کرم بالغ Fasciola از کبدهای آلوده‌ی گاو و گوسفند جداسازی گردید. طی بررسی که در فصل بهار سال ۱۳۹۶ انجام شد، بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به استان ایلام (گاو ۲۸/۵۷ درصد) و استان خوزستان (گوسفند ۸/۲۶ درصد) گزارش گردید. آنزیم TasI در Fasciola hepatica سه قطعه‌ی به طور تقریبی ۴۲۷، ۳۶۰ و ۱۱۷ جفت‌باز و Fasciola gigantica، سه قطعه‌ی به طور تقریبی ۳۶۰، ۲۲۰ و ۱۱۷ جفت‌باز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ایجاد کرد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی می‌تواند برای توصیف میکروسکوپیک گونه‌های Fasciola کافی باشد، اما استفاده از روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم TasI ساده‌تر، سریع‌تر و دقیق‌تر می‌باشد. استفاده از روش PCR-RFLP و نشانگر ژنتیک ITS، جهت شناسایی گونه‌های Fasciola بسیار مناسب است.

واژگان کلیدی: Fasciola hepatica، Fasciola gigantica، Polymerase chain reaction، Restriction fragment length polymorphism

ارجاع: بهرام‌نژاد کیا، راضی جلالی محمدحسین، البرزی علیرضا، تابنده محمدرضا. **شناسایی گونه‌های Fasciola در استان‌های گرمسیر و سردسیر غرب ایران با استفاده از روش‌های مولکولی و ریخت‌شناسی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۹): ۶۰۷-۶۰۱

مقدمه

Fasciolosis، یک بیماری انگلی است که توسط گونه‌های Fasciola hepatica، Fasciola gigantica و Fasciola حد واسط ایجاد می‌گردد. این بیماری، در طیف گسترده‌ای از گونه‌های پستانداران نظیر انسان در سراسر جهان شیوع یافته و خسارات اقتصادی سنگینی در پرورش نشخوارکنندگان ایجاد کرده است (۱). Fasciolosis، نه تنها از نظر شیوع و خسارات اقتصادی توجه جهان را به خود جلب کرده؛ بلکه به عنوان یک بیماری زئونوز موجب نگرانی در مناطق مختلف جهان شده است. امروزه، تعداد روزافزون موارد آلوده شدن انسان‌ها به Fasciola hepatica و Fasciola gigantica و یا فرم‌های هیبرید گزارش شده است (۲). این بیماری، به علت تأثیر بالا بر سلامت عمومی، در لیست مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در سومین نشست

۱- دانشجوی دکتری، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: کیا بهرام‌نژاد

Email: bahramnejadkia@yahoo.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

جهـــانی کنتـــرل بیماری‌هـــای انگلـــی در نـــوامبر ۲۰۰٤ در ســـتاد World Health Organization (WHO) قرار گرفت (۳).

با توجه به افزایش این بیماری در سال‌های اخیر، تشـخیص گونـه‌های این جنس از کرم‌ها برای پیش‌گیری، کنترل و درمان بیماری حـایز اهمیـت است. روش‌های سنتی جهت شناسایی بر اساس تمایز ریخت‌شناسـی بـین گونـه‌های Fasciola hepatica و Fasciola gigantica نمـی‌تواننـد بـه طـور دقیـق ماهیـت ایـن دو گونـه را مشـخص نماینـد(۵-٤). روش جدیـــدتری بـــه نـــام واکـــاوی سیســـتمی تصـــویر کـــامپیوتری (Computer image analysis system یا CIAS) برای تشخیص به کـار برده می‌شود که بر اساس اندازه‌گیری‌های استاندارد فاصله‌ی بین انـدام‌های فلوک می‌باشـد (٦). روش دیگـر جهـت تأییـد گونـه‌ی Fasciola، روش تشـخیص مولکـولی Polymerase chain reaction (PCR) اسـت (۷). روش Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)، یکـی از بهتـرین روش‌هـای تشـخیص گونـه‌های Fasciola در نقاطی است که دو گونه‌ی Hepatica و Gigantica در دام‌های اهلی وجود دارند.

از آن جایی که بعضی از کرم‌ها را نمی‌توان از نظر ریخت‌شناسـی به طور قطع به عنوان یکـی از دو گونـه‌ی Hepatica یـا Gigantica شناسایی نمود و همچنین، وجود شکل حد واسط که در ایران گزارش شده است، مطالعه‌ی حاضر به منظور شناسایی گونـه‌های Fasciola از نظـر ریخت‌شناسـی بـا روش CIAS و از نظـر مولکـولی بـا روش PCR-RFLP در استان‌های غرب ایران(کردستان، کرمانشـاه، ایـلام و اهواز) انجام شد.

روش‌ها

این مطالعه در بهار سال ۱۳۹٦ انجام شد. به منظور انجام این مطالعـه، ٤ استان غرب کشور شـامل کردسـتان، کرمانشـاه، ایـلام و خوزسـتان انتخاب شدند. با مراجعه به کشتارگاه، کبد ۷۱۵ دام (گـاو و گوسـفند) از لحاظ آلودگی به کرم بـالغ Fasciola مـورد بررسـی قـرار گرفـت. کبدهای آلوده به آزمایشـگاه دانشـکده‌ی دام‌پزشـکی دانشـگاه شـهید چمران اهواز منتقل و ویژگی‌های ریخت‌سنجی و مولکولی گونه‌هـای Fasciola بررسی شدند. در مجموع، ۹۲ کبـد (٤۲ کبـد گـاوی و ۵۰ کبد گوسفندی) به کرم بالغ Fasciola آلوده بودند. پس از برش کامـل کبـدها، بـا اسـتفاده از پـنس اسـتریل کرم‌هـای Fasciola از مجـاری صفراوی خارج شدند. قبل از این که نمونه‌ها در الکل اتیل ۷۰ درصـد ثابـــت شـــوند، فلوک‌هـــا بـــه صـــورت تکـــی بـــا محلـــول Phosphate buffered saline (PBS) شستشو داده شدند و بر روی یک لام مسطح قرار داده شدند، سپس، اسلاید دیگری بـا کمـی فشـار بر روی کرم گذاشته شد.

معیارهای ریخت‌شناسی شامل عرض بدن، طـول بـدن، فاصـله‌ی بادکش شکمی تا انتهای خلفی، فاصله‌ی بین بادکش دهانی و بـادکش خلفی، طول مخروط رأسی، عرض مخروط رأسـی، نسـبت طـول بـه عرض، محیط و مساحت اندازه‌گیری با اسـتفاده از نرم‌افـزار Image J اندازه‌گیری شدند (۸). به طور خلاصه، عکس از فلوک‌ها که کنـار آن یک خط‌کش گذاشته شده باشد، تهیه گردید. آن گاه با استفاده از ایـن نرم‌افزار، معیارهای مختلف ریخت‌شناسی اندازه‌گیری شدند.

کرم‌های Fasciola پس از تعیین گونه از نظر ریخت‌شناسـی، بـه ظرف حاوی ۱۰ سی‌سی آب‌مقطر استریل منتقل و له گردیدند. سپس، محتویات له شده از الک ۱۰۰ عبور داده شد و به این ترتیـب، تخم‌هـا در لوله‌ی آزمایش جمع‌آوری شدند. جهت شستشـو، بـه هـر کـدام از نمونه‌های تخـم، مقـداری سـرم فیزیولـوژی اضـافه گردیـد و در دور ۲۰۰۰ به مـدت ۵ دقیقـه سـانتریفیوژ شـدند (۹). اسـتخراج DNA از تخم‌ها با استفاده از کیت CinnaPrue انجام گردید. DNA اسـتخراج شـده مربـوط بـه هـر نمونـه‌ی تخـم، بـه طـور جداگانـه در دمـای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان PCR نگهداری شد. ارزیابی کیفیـت نمونه‌های DNA بر اساس خوانش جـذب آن‌هـا در طـول موج‌هـای ۲٦۰ و ۲۸۰ نـانومتر بـا اسـتفاده از دسـتگاه میکـرو اسـپکتروفتومتر (اپندورف، آلمان) و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. نمونه‌های نسبت جذب ۲٦۰/۲۸۰ بالای ۱/۸ جهت انجام PCR مطلوب در نظر گرفتـه شـد. پرایمرهـای اسـتفاده شـده جهـت تشـخیص تفریقـی دو گونـــه‌ی Fasciola از تکثیـــر یـــک قطعـــه‌ی ۹۲۹ جفت‌بـــازی از ژن ITS1,5.8S,ITS2 اسـتخراج شـد (۱۰). تـوالی نوکلئوتیـدی پرایمرهـا در مـدل Forward یـا ITS1,5.8S,ITS2-F بـه صـورت '5-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3 و در مـدل Reverse یـا '5-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3 ITS1,5.8S,ITS2-R بـه شـکل ملاحظه می‌شد.

واکنش PCR با حجم کلـی ۲۰ میکرولیتـر شـامل ۱۰ میکرولیتـر مخلـوط واکـنش (سـیناکلون)، ٦ میکرولیتـر آب مقطـر دیـونیزه، ۰/۵ میکرولیتـر پرایمـر حـاوی ۱۰ پیکومـول پرایمـر Forward، ۰/۵ میکرولیتر حاوی ۱۰ پیکومول پرایمر Reverse و ۳ میکرولیتـر از DNA استخراج شده انجام گردید. تکثیر قطعه‌ی مورد نظر بر اسـاس روش توصیف شده در مطالعات قبلی انجام شد (۱۰).

پس از اتمام مرحله‌ی تکثیر، برای مشاهده و شناسایی نمونـه‌های مثبت، از هر محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مقدار ۷ میکرولیتر بـه همراه Ladder DNA بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۹۵ ولـت الکتروفورز گردید. برای انجام PCR-RFLP، از آنـزیم TasI شـرکت فرمنتاز استفاده شد. ایـن آنـزیم تـوالی '5AATT3' را بـرش می‌دهـد (۱۱). جهـت تعیـین چنـد شـکلی در قطعـه‌ی تکثیـر یافتـه، بـر روی

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR، ۱ میکرولیتر آنزیم برشگر TasI، ۲ میکرولیتر بافرآنزیم و ۷ میکرولیتر آب‌مقطر اضافه شد. سپس، واکنش پیش‌گفته، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت، از هر محصول PCR-RFLP مقدار ۷ میکرولیتر به همراه Ladder DNA بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۹۵ ولت الکتروفورز گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۷۱۵ کبد گاو و گوسفند از نظر آلودگی به انگل Fasciola بررسی شدند (جدول ۱). در مجموع، ۱۷۸ نمونه‌ی Fasciolaی بالغ از ۹۲ کبد آلوده‌ی گاو و گوسفندی از مناطق مورد مطالعه جمع‌آوری شد. ۱۸ کرم بالغ به صورت تصادفی انتخاب شدند و از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). جهت بررسی ریخت‌شناسی، از ۸ پارامتر ریخت‌سنجی با استفاده ه از نرم‌افزار ImageJ به دست آمد.

جدول ۱. فراوانی آلودگی انگل Fasciola در دام‌های کشتارگاه‌های غرب و جنوب غرب ایران

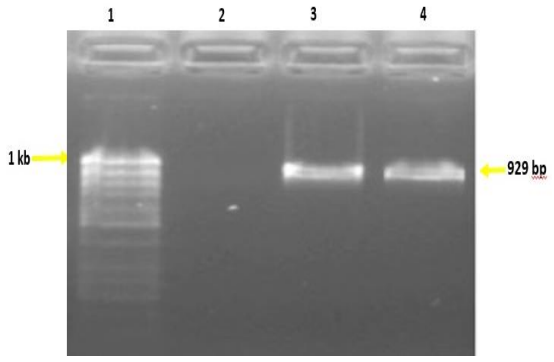
ردیف	استان	تعداد دام بازرسی شده		دام آلوده تعداد (درصد)	
		گاو	گوسفند	گاو	گوسفند
۱	خوزستان	۹۸	۱۲۱	۱۱ (۱۱/۲۲)	۱۰(۸/۲۶)
۲	کردستان	۷۹	۱۳۲	۱۲ (۱۵/۱۸)	۱۴ (۱۰/۶)
۳	کرمانشاه	۵۲	۱۱۳	۹ (۱۷/۳۰)	۱۱ (۹/۷۰)
۴	ایلام	۳۵	۸۵	۱۰ (۲۸/۵۷)	۱۵ (۱۷/۶۴)
۵	جمع کل	۲۶۴	۴۵۱	۴۲ (۱۵/۹۰)	۵۰ (۱۱/۰۸)

از تخم این کرم‌ها جهت آزمون مولکولی استفاده شد. الکتروفورز تمام ایزوله‌ها پس از PCR، باند ۹۲۹ جفت‌باز را نشان دادند (شکل ۱).

جهت تشخیص گونه، از آزمون RFLP استفاده شد. آنزیم محدودالاثر TasI، جهت افتراق بین دو گونه انتخاب شد.

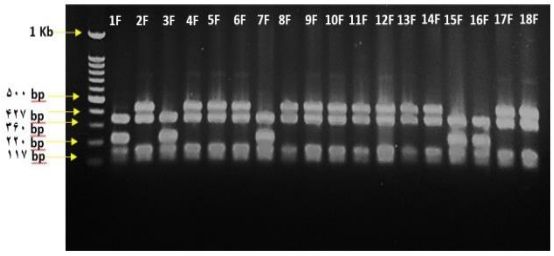
جدول ۲. معیارهای ریخت‌سنجی گونه‌های Fasciolaی جدا شده از کبد دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی کردستان، کرمانشاه، خوزستان و ایلام با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (سانتی‌متر)

کد نمونه	استان	میزبان	طول	عرض	نسبت طول به عرض	طول مخروط رأسی	عرض مخروط رأسی	فاصله‌ی بادکش شکمی تا انتها	مساحت بدن	محیط بدن
1F	خوزستان	گوسفند	۵/۳	۱/۳	۴/۰۷	۰/۴	۰/۵	۴/۷	۳/۰۲۰	۸/۳۴۰
2F	ایلام	گوسفند	۲/۵	۱/۰	۲/۵۰	۰/۴	۰/۳	۲/۰	۱/۷۸۲	۶/۵۹۱
3F	خوزستان	گاو	۴/۷	۰/۹	۵/۲۲	۰/۵	۰/۸	۴/۴	۷/۲۳	۱۴/۰۲۰
4F	کرمانشاه	گوسفند	۲/۶	۱/۰	۲/۶	۰/۲	۰/۴	۲/۲	۱/۸۹	۶/۷۸۹
5F	کرمانشاه	گاو	۲/۴	۱/۲	۲/۰۰	۰/۳	۰/۴	۲/۰	۱/۷۸۹	۶/۵۷۶
6F	کردستان	گاو	۲/۰	۰/۸	۲/۵۰	۰/۳	۰/۴	۱/۷	۱/۴۸۹	۶/۴۱۱
7F	کردستان	گوسفند	۴/۱	۰/۸	۵/۱۲	۰/۲	۰/۳	۳/۹	۳/۶۸۵	۸/۳۶۴
8F	کردستان	گاو	۲/۱	۱/۰	۲/۱۰	۰/۴	۰/۴	۱/۸	۱/۵۲۳	۶/۲۳۴
9F	ایلام	گاو	۲/۴	۰/۹	۲/۶۶	۰/۳	۰/۳	۲/۱	۱/۵۶	۶/۳۴۴
10F	ایلام	گوسفند	۳/۱	۰/۹	۳/۴۴	۰/۳	۰/۳	۲/۸	۲/۴۸۹	۷/۷۴۳
11F	کرمانشاه	گاو	۲/۶	۱/۰	۲/۶۰	۰/۳	۰/۵	۲/۲	۱/۹۸۷	۷/۰۱۱
12F	کرمانشاه	گوسفند	۲/۳	۱/۲	۱/۹۱	۰/۴	۰/۵	۲/۰	۱/۸۱۱	۶/۶۹۸
13F	کردستان	گوسفند	۲/۰	۱/۰	۲/۰۰	۰/۳	۰/۴	۱/۶	۱/۳۵۷	۶/۲۱۵
14F	ایلام	گاو	۲/۸	۱/۳	۲/۱۵	۰/۳	۰/۴	۲/۵	۱/۶۲۳	۶/۵۱۲
15F	ایلام	گوسفند	۴/۰	۰/۸	۵/۰۰	۰/۴	۰/۴	۳/۵	۲/۹۸۷	۸/۲۸۲
16F	خوزستان	گاو	۵/۴	۱/۳	۴/۱۵	۰/۵	۰/۴	۴/۹	۶/۲۷۸	۱۳/۲۳۴
17F	کرمانشاه	گوسفند	۲/۱	۱/۴	۱/۵۰	۰/۴	۰/۴	۱/۸	۱/۲۶۷	۶/۰۷۸
18F	کردستان	گاو	۲/۵	۱/۱	۲/۲۷	۰/۵	۰/۴	۲/۱	۱/۷۸۶	۶/۶۴۳



شکل ۱. محصولات Polymerase chain reaction (PCR) حاصل از تکثیر DNA با ۹۲۹ جفت‌باز: ستون ۱ اندازه‌ی نشانگر، ستون ۲ شاهد منفی، ستون ۳ شاهد مثبت و ستون ٤ نمونه‌ی Fasciola با ژل آگارز ۱/۵ درصد و نشانگر ۱ کیلوباز

به دلیل حضور آنزیم فرمتاز، الگوی RFLP در گونه‌ی Fasciola hepatica ۳ محل برش و تشکیل باندهای ٤۲۷، ۳٦۰ و ۱۱۷ جفت‌باز بود و در گونه‌ی Fasciola gigantica نیز سه باند ۳٦۰، ۲۲۰ و ۱۱۷ جفت‌باز تشکیل داد (شکل ۲).



شکل ۲. الگوی Restriction fragment length polymorphism (RFLP) محصولات Polymerase chain reaction (PCR) حاصل از تکثیر ژن کد کننده‌ی ITS1,5.8S,ITS2 گونه‌های Fasciola با استفاده از آنزیم TasI چاهک‌های 1F، 3F، 7F، 15F و 16F تخم Fasciola gigantica با سه باند ۳٦۰، ۲۲۰ و ۱۱۷ جفت‌باز و چاهک‌های 2F، 4F، 5F، 6F، 8F، 9F، 10F، 11F، 12F، 13F، 14F، 17F و 18F تخم Fasciola hepatica با سه باند ٤۲۷، ۳٦۰ و ۱۱۷ جفت‌باز

نتایج به دست آمده از PCR-RFLP، پارامترهای ریخت‌سنجی را تأیید کرد. همچنین، می‌توان از طریق تخم با استفاده از پرایمرهای به کار برده شده در این مطالعه و آنزیم TasI، گونه‌های Fasciola را از هم افتراق داد. بر اساس مطالعه‌ی انجام شده، اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی، می‌تواند برای توصیف میکروسکوپیک گونه‌های Fasciola کافی باشد، اما استفاده از روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم TasI ساده‌تر، سریع‌تر و دقیق‌تر است.

بحث

با وجود مطالعات متعددی که در طی چند سال اخیر در زمینه‌های مختلف Fasciolosis در ایران به انجام رسیده است، متأسفانه جنبه‌های کلیدی و اساسی اپیدمیولوژیک بیماری که مبنای هر گونه برنامه‌ریزی اصولی و علمی در زمینه‌ی کنترل بیماری است، هنوز ناشناخته‌اند. هم‌پوشانی انتشار دو گونه‌ی Fasciola hepatica و Fasciola gigantica در آسیا و همچنین در ایران، به سبب حضور گونه‌های متنوع میزبان واسط، شرایط اقلیمی مطلوب برای هر دو گونه و آلودگی توأم و فراوان انگل در دام‌های مناطق مختلف ایران، احتمال وجود اشکال حد واسط انگل را مطرح نموده است. وجود گونه‌ی حد واسط، می‌تواند فرایند انتقال را تحت تأثیر قرار دهد.

امروزه، به طور کامل مشخص شده است که این دو گونه، علاوه بر تفاوت‌های ریخت‌شناسی، در راه‌های انتقال، خصوصیات اپیدمیولوژیک، کنترل، پیش‌گیری و الگوی پاتولوژیک با هم اختلاف دارند (۱۲). Fasciola gigantica بیشتر در مناطق گرمسیری دیده شدند، اما Fasciola hepatica، دامنه‌ی وسیع‌تری را از منطقه‌ی جغرافیایی آلوده می‌کند. البته، حضور این گونه‌ها در مناطق مختلف کشور، ممکن است به خاطر مهاجرت دام و حضور میزبان واسط مناسب نیز باشد.

برخی محققان بر این باورند که هیچ کدام از روش‌های بالینی انگل‌شناسی و روش‌های ایمنی‌شناسی، نمی‌توانند دو گونه‌ی Fasciola hepatica و Fasciola gigantica را از هم تشخیص دهند (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر، با توجه به معیارهای ریخت‌سنجی و استفاده از روش CIAS، گونه‌های Fasciola hepatica و Fasciola gigantica از هم تفکیک شدند. در این مطالعه، با توجه به مقایسه‌ی معیارهای ریخت‌شناسی، نشان داده شد که Fasciola gigantica موجود در خوزستان اندازه‌ی بزرگ‌تری نسبت به گونه‌های موجود در استان‌های دیگر دارد.

همچنین، Fasciola hepatica موجود در کرمانشاه، اندازه‌ی بزرگ‌تری نسبت به گونه‌های موجود در استان‌های دیگر دارد. این یافته، ممکن است به خاطر شرایط اقلیمی و جغرافیایی استان‌ها، گونه‌ی دام و یا سن انگل باشد (٦). البته باید به این نکته توجه داشت که هم‌پوشانی آن‌ها در مناطق مختلف، حضور گونه‌های حد واسط Fasciola را قوی‌تر می‌کند (٤). همچنین، آزمون RFLP با استفاده از آنزیم TasI، حضور این دو گونه را در شهرستان‌های غرب ایران تأیید نمود. روش‌های مبتنی بر DNA، می‌توانند در تشخیص دقیق گونه‌ها، تأیید مطالعات ریخت‌سنجی و تسهیل در تمایز بین گونه‌ها بسیار کارآمد باشند (۱۳). وجود تفاوت‌های فنوتیپی در فلوک‌های کبدی، نشان دهنده‌ی هیبریداسیون دو گونه می‌باشد (۱٤). کریمی با استفاده

از Ribosomal DNA-RFLP (rDNA-RFLP) و توالی‌یابی، اولین گزارش مولکولی از ژنوتیپ Fasciola در استان فارس در جنوب ایران را ارایه نمود (۱۵).

اشرفی و همکاران نیز از توالی‌یابی ITS2 استفاده کردند و آلوگی به دو گونه‌ی Fasciola hepatica و Fasciola gigantica را در استان گیلان نشان دادند (۱۶). در مطالعه‌ی دیگری، اشرفی و همکاران، Fasciola hepatica و Fasciola gigantica و فرم حد واسط را بر اساس واکاوی ریخت‌شناسی و فنوتیپی فلوک‌های Fasciola گزارش نمودند (٤). مهامی اُسکویی و همکاران، ۹۰ ترماتود را از گاو و گوسفندهای آلوده در بازرسی کشتارگاهی سه استان (خراسان، فارس و آذربایجان شرقی) در ایران جداسازی نمودند و توسط روش ریخت‌سنجی تمایز جدایه‌های Fasciola را انجام دادند. از ۹۰ نمونه‌ی Fasciolaی جدا شده، ۷۰ مورد Fasciola hepatica و ۲۰ مورد Fasciola gigantica شناسایی شدند. با استفاده از روش PCR-RFLP و با واکاوی توالی‌های قطعه‌های ITS1، rDNA 5.8S و ITS2 از کرم‌های Fasciola hepatica و Fasciola gigantica سه ژن را در بانک ژن ثبت کردند (HM746785-HM746788) (۱۷).

ساکی و همکاران، در شهرستان اهواز ۵۰۲ نمونه را از کبدهای آلوده‌ی گاو، گوسفند، بز و گاومیش در کشتارگاه جداسازی کردند. برای شناسایی مولکولی گونه‌های Fasciola از قطعه‌ی ژنی 28S rRNA با روش PCR-RFLP استفاده کردند. از ۵۰۲ نمونه‌ی جدا شده، ٦۲/۵ درصد از نمونه‌ها Fasciola gigantica و ۳۷/۵ درصد از نمونه‌ها Fasciola hepatica بودند. در این مطالعه، ۹۰/٦۰ درصد Fasciola gigantica از گاومیش و ٦۸/۷۵ درصد Fasciola hepatica از گوسفند جداسازی گردید. شایان ذکر است که با استفاده از روش ریخت‌سنجی، Fasciola hepatica، Fasciola gigantica و فرم حد واسط را شناسایی کردند، اما با واکاوی توالی‌های 28S rRNA با استفاده از روش RFLP دو گونه‌ی Fasciola hepatica و Fasciola gigantica را شناسایی کردند. نتایج مولکولی نشان داد که Fasciola gigantica در خوزستان، همولوژی بالایی با JF323865 (Fasciola gigantica ی هندی) دارد (۱۸).

رکنی و همکاران، با استفاده از ناحیه‌ی ژنی ITS1، PCR-RFLP و آنزیم محدودالاثر TasI گونه‌های Fasciola را از استان‌های تهران، آذربایجان غربی و خوزستان از همدیگر متمایز کردند (۱۹). آنزیم TasI برای Fasciola hepatica و Fasciola gigantica به ترتیب باندهایی به اندازه‌ی ۱۵۱، ۳۱۲ جفت‌باز و ۲۱۹، ۱۵۱ و ۹۳ جفت‌باز نشان داد، اما در مطالعه‌ی حاضر که بر روی تخم‌های Fasciola و ناحیه‌ی ژنی ITS2، 5.8S، ITS1 انجام شده بود، برای Fasciola hepatica و Fasciola gigantica به ترتیب باندهایی به اندازه‌ی ٤۲۷، ۳٦۰ و ۱۱۷ جفت‌باز و ۳٦۰، ۲۲۰ و ۱۱۷ جفت‌باز نشان داد.

Shalaby و همکاران، از PCR-RFLP و قطعه‌ی ITS برای تمایز میان گونه‌های Fasciola در گوسفندانی که از سودان به عربستان سعودی وارد شده بودند، استفاده کردند. از ۱۰۰ گوسفند وارد شده، ۱۱ مورد به گونه‌های Fasciola آلوده بودند که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌سنجی، ۵ نمونه‌ی Fasciola hepatica (با شماره‌ی دسترسی HE972273)، ۵ نمونه‌ی Fasciola gigantica (با شماره‌ی دسترسی HE972274) و یک نمونه‌ی Fasciola حد واسط (با شماره‌ی دسترسی HE972275) شناسایی شد (۱۲).

Ichikawa و همکاران، از روش PCR-RFLP برای تشخیص خاص Fasciola hepatica از Fasciola gigantica در ITS1 با آنزیم RsaI استفاده کرد (۲۰). استفاده از روش PCR-RFLP و نشانگر ژنتیک ITS جهت شناسایی گونه‌های Fasciola بسیار مناسب است، اما جهت بررسی تنوع ژنتیک این کرم، بهتر است از نشانگرهای ژنتیک دیگر مانند Cox1 و Nnicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen (NADH) و سایر روش‌های مولکولی نظیر Random amplification of polymorphic DNA. (RAPD-PCR) و PCR-Single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) در مطالعات آینده استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل تأمین هزینه‌ها در قالب پژوهانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند. در ضمن، از کارشناس محترم آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی خانم خواجه و تمام مسؤولین کشتارگاهی استان‌های کردستان، کرمانشاه، ایلام و خوزستان سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB. Fasciola gigantica: Epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton JP, editor. Fasciolosis. Oxon UK: CABI; 1999. p. 465-525.

2. Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo J, Terasaki K, Shibahara T, et al. Genetic characterization of parthenogenic Fasciola sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and

mitochondrial DNA. Parasitology 2005; 131(Pt 5): 679-85.
3. World Health Organization. Report of the WHO informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. Geneva, Switzerland: WHO; 2006.
4. Ashrafi K, Valero MA, Panova M, Periago MV, Massoud J, Mas-Coma S. Phenotypic analysis of adults of Fasciola hepatica, Fasciola gigantica and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. Parasitol Int 2006; 55(4): 249-60.
5. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. Int J Parasitol 2005; 35(11-12): 1255-78.
6. Periago MV, Valero MA, Panova M, Mas-Coma S. Phenotypic comparison of allopatric populations of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). Parasitol Res 2006; 99(4): 368-78.
7. Maley LE, Marshall CR. The coming of age of molecular systematics. Science 1998; 279(5350): 505-6.
8. Valero MA, Darce NA, Panova M, Mas-Coma S. Relationships between host species and morphometric patterns in Fasciola hepatica adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. Vet Parasitol 2001; 102(1-2): 85-100.
9. Georgieva K, Georgieva S, Mizinska Y, Stoitsova SR. Fasciola hepatica miracidia: lectin binding and stimulation of in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. Acta Parasitol 2012; 57(1): 46-52.
10. Luton K, Walker D, Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). Mol Biochem Parasitol 1992; 56(2): 323-7.
11. 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; 124(2): 209-13.
12. Shalaby I, Gherbawy Y, Banaja A. Molecular characterization of Fasciola species isolated from imported sheep in Taif region (Saudi Arabia). Trop Biomed 2013; 30(1): 15-26.
13. Marcilla A, Bargues MD, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between Fasciola hepatica and Fasciola gigantica. Mol Cell Probes 2002; 16(5): 327-33.
14. Moghaddam AS, Massoud J, Mahmoodi M, Mahvi AH, Periago MV, Artigas P, et al. Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. Parasitol Res 2004; 94(1): 61-9.
15. Karimi A. Genetic diagnosis of Fasciola species based on 18S ribosomal DNA Sequences. Journal of Biological Sciences 2008; 8(7): 1166-73.
16. Ashrafi K, Massoud J, Holakouie Naieni K, Jo-Afshani MA, Mahmoodi M, Ebadati N, et al. Nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequence characterization of Fasciola hepatica and Galba truncatula. Iran J Public Health. 36(4):42-9.
17. 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; 6(3): 35-42.
18. Saki J, Khademvatan S, Yousefi E. molecular identification of animal Fasciola isolates in southwest of Iran. Aust J Basic Appl Sci 2011; 5(11): 1878-83.
19. Rokni MB, Mirhendi H, Behnia M, Harandi MF, Jalalizand N. Molecular Characterization of Fasciola hepatica Isolates by RAPD-PCR and ribosomal ITS1 sequencing. Iran Red Crescent Med J 2010; 12(1): 27-32.
20. Ichikawa M, Itagaki T. Discrimination of the ITS1 types of Fasciola spp. based on a PCR-RFLP method. Parasitol Res 2010; 106(3): 757-61.

DOI: *10.22122/jims.v37i529.11964* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 37, No. 529, 1st Week, August 2019**

Received: 22.05.2019 Accepted: 21.07.2019 Published: 23.07.2019

Identification of Fasciola Species in Warm and Cool Western Provinces of Iran, Using Molecular and Morphometric Methods

Kia Bahramnejad[1], Mohamad Hossein Razi-Jalali[2], Alireza Alborzi[3], Mohammad Reza Tabandeh[4]

Original Article

Abstract

Background: Fascioliasis is a parasitic disease caused by Fasciola hepatica, Fasciola gigantica, and intermediate Fasciola, which is present in a wide variety of mammalian species, including humans, throughout the world. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method is one of the best methods for detecting Fasciola species in places where there are two types of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica in domestic livestock.

Methods: In this study, Fasciola worms were collected from slaughterhouses in five western provinces of Iran. Parasitic species were identified using morphological and molecular methods. A total of 756 livestocks (cattle and sheep) were studied, with 89 livers infected with adult Fasciola worms. 18 worms were morphometrically examined, and DNA from the eggs of these worms were extracted. A fragment of genome containing the ITS1,5.8S, ITS2 gene was amplified and utilized by TasI enzyme, and PCR-RFLP was performed on amplified parts.

Findings: A total of 178 adult Fasciola worm were isolated from infected cattle and sheep livers. During the spring 2017, the highest and the lowest levels of contamination were reported in Ilam Province (sheep, 28.53%) and Kermanshah Province (sheep, 7.9%), Respectively. In Fasciola hepatica, TasI enzyme produced three fragments of 427, 360 and 117 base pair (bp), and for Fasciola gigantica, it produced three fragments of 360, 220, and 117 bp on 1.5% agarose gel.

Conclusion: According to the study, microscopic measurements can be sufficient for microscopic characterization of Fasciola species, but the PCR-RFLP method using TasI enzyme is simpler, faster, and more accurate. The use of PCR-RFLP method and ITS genetic marker is very suitable for identification of Fasciola species.

Keywords: Fasciola, Fasciola hepatica, Polymerase chain reaction, Restriction fragment length polymorphism

Citation: Bahramnejad K, Razi-Jalali MH, Alborzi A, Tabandeh MR. **Identification of Fasciola Species in Warm and Cool Western Provinces of Iran, Using Molecular and Morphometric Methods.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(529): 601-7.

1- PhD Student, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Kia Bahramnejad, Email: bahramnejadkia@yahoo.com