مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی گونه‌های فاسیولا در استان آذربایجان غربی

حسین گلوانی[۱]، صابر قلی‌زاده[۲]، خسرو حضرتی تپه[*۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۵/۱۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۷/۱۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: فاسیولیازیس که توسط فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا ایجاد می‌شود، دارای اهمیت بهداشتی و اقتصادی در دنیاست. روش‌های رایج شناسایی عوامل انگلی آن دقیق و قابل‌اعتماد نیستند؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف شناسایی مولکولی گونه‌های فاسیولا در استان آذربایجان غربی طراحی شده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه کرم‌های فاسیولا از کشتارگاه‌های پنج ناحیه استان آذربایجان غربی، شمال غرب ایران جمع‌آوری گردید. گونه‌های انگلی با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی، توالی‌های ITS1، 5.8s و ITS2 ریبوزومال DNA شناسایی شد. تعداد ۵۸۰ کرم بالغ فاسیولا از ۹۰ کبد آلوده (۵۰ کبد گاوی، ۴۰ کبد گوسفندی) جدا شد. از ۱۱۰ نمونه استخراج DNA شده، ۵۰ نمونه تعیین توالی گردید.

یافته‌ها: آنالیز توالی‌ها شباهت ۱۰۰ درصدی را در نواحی ITS1(۴۲۸bp)، 5.8s (۱۵۸bp) و ITS2 (۳۶۶bp) همه نمونه‌های تعیین توالی شده نشان داد. شباهت بین فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا با ۱۱ Mismatch، ۹۸درصد بود. بر اساس توالی‌های ITS1 و ITS2 ریبوزومال DNA تنها گونه فاسیولا هپاتیکا، در بین گاو و گوسفندهای استان آذربایجان غربی، پخش شده است. درنهایت ۱۵۰ توالی فاسیولا هپاتیکا (۵۰ توالی از هر ناحیه ITS) از استان آذربایجان غربی در بانک جهانی ژن ثبت گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه شواهدی از وجود فاسیولا ژیگانتیکا در گاو و گوسفندهای استان آذربایجان غربی به دست نیامد و همه نمونه‌های موردبررسی فاسیولا هپاتیکا تشخیص داده شدند. مطالعات بیشتر با مارکرهای مولکولی جدید برای شناسایی دقیق گونه‌ها و درنهایت برای کنترل و پیشگیری از این بیماری انگلی مفید خواهد بود.

کلیدواژه‌ها: فاسیولا، PCR، ITS_1، ITS_2، 5.8s و ریبوزومال DNA

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره یازدهم، ص ۱۰۴۰-۱۰۳۳، بهمن ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: ارومیه، پردیس نازلو دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، ۰۴۴۳۲۷۸۰۸۰۰

Email: Hazrati_tappeh@yahoo.co.nz

مقدمه

فاسیولیازیسکه یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است، دارای انتشار جهانی بوده و توسط ترماتودهایدای ژن فاسیولاهپاتیکا و فاسیولاژیگانتیکا ایجاد می‌شود (۱). عفونت انسانی با خوردن گیاهان آبزی نپخته و نوشیدن آب آلوده‌شده به لارو این کرم‌ها ظاهر می‌شود (۲). در موارد انسانی این ترماتودها می‌توانند باعث آسیب و التهاب کبد و مجاری صفراوی شوند (۳). همچنین ممکن است این کرم‌ها به‌صورت اکتوپیک در نقاط دیگر بدن نیز یافت شوند (۴). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فاسیولا هپاتیکا در مناطق معتدل وفاسیولا ژیگانتیکا در گرمسیری یافت می‌شوند. از طرفی دو گونه ممکن در مناطق نیمه گرمسیری به‌صورت هیبرید وجود داشته باشند (۱،۳،۵،۶). فاسیولیازیس انسانی از اکثر نقاط دنیا گزارش می‌شود به‌طوری‌که بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۳، این بیماری از بیش از ۷۰ کشور دنیا گزارش شده است (۷). در طی سالیان گذشته این بیماری در ایران در بین دام‌ها شایع بوده و موارد انسانی به‌صورت تک‌گیر از نقاط مختلف گزارش شده است (۸). ولی در سال‌های اخیر موارد انسانی بیماری به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش یافته است بطوریکه در طی سال‌های گذشته ۲ همه‌گیری بزرگ از فاسیولیازیس انسانی

[۱] کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[۲] استادیار حشره شناسی پزشکی، گروه حشره شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[۳] استاد انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-14]

در شمال ایران با چندین هزار مورد آلودگی رخ داده است (۹،۱۰). مطالعات اخیر نشان داده است که در ایران علاوه بر دو گونه رایج فاسیولا (فاسیولاهپاتیکا و فاسیولاژیگانتیکا) فرم‌های حد واسط نیز حضور دارند (۱۱،۶). با توجه به اهمیت بهداشتی و اقتصادی بیماری فاسیولیازیس، شناسایی دقیق گونه‌های مسبب آن از جهت پیشگیری و اتخاذ روش‌های کنترل این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. اگرچه گونه‌های فاسیولا بر اساس معیارهای مورفومتریک مثل طول و عرض کرم بالغ، طول و عرض مخروط رأسی، طول ناحیه‌ی پشت بیضه‌ها تا انتهای کرم، نسبت طول کرم به عرض آن و غیره قابل‌شناسایی هستند (۱۲،۸) اما به دلیل وجود فرم‌های هیبرید و حدواسط این روش‌ها نمی‌توانند دقیق و قابل‌اعتماد باشند. در روش‌های مولکولی با تکثیر ژنوم انگل، اختلافات آشکاری در نوع و ترتیب بازهای آلی ظاهر می‌شود که با این تفاوت‌ها می‌توان گونه‌های موردمطالعه را از هم افتراق داد. ژن‌ها و روش‌های مولکولی بسیاری برای شناسایی گونه‌های فاسیولا بکار گرفته‌شده‌اند که در این میان مارکرهای ناحیه ITS ریبوزومال DNA بیشترین مورداستفاده را داشته‌اند (۱۷-۱۳،۱۱،۶،۵). علیرغم حضور کرم‌های فاسیولا در استان آذربایجان غربی مطالعه مولکولی اندکی روی این کرم‌ها انجام‌گرفته (۱۸) و اطلاعات دقیقی از توالی‌های گونه‌های فاسیولای استان آذربایجان غربی وجود ندارد بنابراین هدف اصلی این مطالعه شناسایی مولکولی گونه‌های فاسیولا، جداشده از کبد گاو و گوسفندهای آلوده‌ی استان آذربایجان غربی و تعیین توالی نواحی ITS آن‌ها و مقایسه این توالی‌های با توالی‌های ثبت‌شده از فاسیولادر بانک جهانی ژن است.

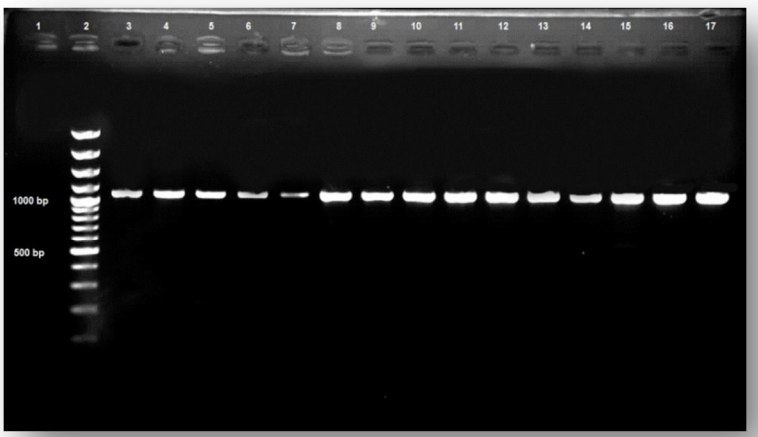
مواد و روش‌ها

پنج شهر از شمال، مرکز و جنوب استان آذربایجان غربی برای انجام این مطالعه انتخاب شد. تعداد ۵۸۰ کرم فاسیولا (۳۳۵ نمونه گاوی و ۲۴۵ نمونه گوسفندی) از ۹۰ کبد آلوده (۵۰ کبد گاوی،۴۰ کبد گوسفندی) از شهرهای ارومیه (۱۶۰ کرم بالغ فاسیولا)، سلماس (۱۱۰ کرم بالغ فاسیولا)، ماکو (۱۰۰ کرم بالغ فاسیولا)، بوکان (۸۰ کرم بالغ فاسیولا) و مهاباد (۱۳۰ کرم بالغ فاسیولا) جمع‌آوری و مجاری صفراوی آن‌ها با تیغ جراحی برش داده شد. بعد از بیرون آوردن کرم‌های بالغ فاسیولا،۳ بار در نرمال سالین شستشو داده شدند. بعد از شناسایی مورفولوژیک با معیارهای مربوطه (۱۲،۸) همه کرم‌ها با الکل اتیلیک ۷۰ در صد فیکس شده و تا زمان استخراج اسیدهای نوکلئیک در دمای اتاق قرار داده شدند. اسیدهای نوکلئیک نمونه‌ها با روش کولینز با کمی تغییر (۱۹) استخراج شد. به‌طور خلاصه، یک قسمت از کرم با تیغ بیستوری جدا و به داخل میکروتیوپ ۱،۵ میکرو لیتری که از قبل ۵۰ میکرو لیتر محلول لایز (8 µL Nacl, 10 µL Tris-Hcl, 6 µL EDTA, 2.5 µL SDS, 16 µL sucrose, 7.5 µL (deionized distilled water) در آن ریخته شده بود انتقال داده شد. بعد از هموژنیزاسیون با پستل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه انکوبه شد. سپس ۱۶،۶۸ میکرو لیتر استات سدیم ۳ مولار اضافه کرده و به مدت ۶۰ دقیقه روی یخ در دمای ۲۰- قرار گرفت. بعد از سانتریفوژ نمودن با دور ۱۲۰۰۰ محلول رویی به میکروتیوپ دیگر انتقال داده شد سپس روی آن ۱۰۰ میکرو لیتر الکل اتیلیک ۹۶ درصد ریخته شده و سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شده و ۱۰۰ میکرو لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درصد به آن‌ها اضافه گردید بعد از اتمام این مرحله محلول رویی دوباره دور ریخته شد و رسوب آن در دمای اتاق قرار داده شد تا الکل آن تبخیر شود. بعد از خشک شدن رسوب، ۵۰ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه شد و در دمای ۲۰- تا زمان استخراج اسیدهای نوکلئیک انکوبه گردید. به دنبال بررسی‌های توالی‌های نوکلئوتیدی نواحی ITS1، 5.8s و ITS2 ریبوزومال DNA گونه‌های مختلف فاسیولا با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Runner(version 3.05,1994,hastings software Inc.)و BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)پرایمرها، برای تکثیر قطعه (۱۰۸۱ bp ناحیه ITS) هر دو گونه فاسیولا هپاتیکا و ژیگانتیکا و فرم‌های حد واسط طراحی شدند. درنهایت پرایمر بالادست به‌صورت (5’GCTGAGAAGACGACCAAAC3’) و پرایمر پایین‌دست به‌صورت (5’AGTTCAGCGGGTAATCAC3’) طراحی و جهت سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده شدند. واکنش PCR با حجم کلی ۲۵µL که شامل۱۲،۵µL محلول Mix کیت PCR،۱µL از هرکدام از پرایمرها، ۱ µL از نمونه DNA استخراج‌شده و۹،۵ µ L آب دیونیزه بود، انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر شامل پیش واسرشت در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. تکثیر در ۳ مرحله و ۳۵ تکرار شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گرادبه مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۷۵ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گرادبه مدت ۱ دقیقه انجام شد. و نهایتاً مرحله پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گرادبه مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. نمونه‌های تکثیر یافته در ژل آگاروز ۱،۵ درصد به مدت ۴۰ دقیقه باولتاژ ۸۰ الکتروفورز شدند. تعداد ۵۰ نمونه (۲۰ نمونه گوسفندی و ۳۰ نمونه گاوی) در حجم بالا (۱۲۵µL) تکثیر داده شدند و جهت تعیین توالی به شرکت سینا کلون ارسال گردیدند. سکانس‌های به دست آمده از ۵۰ نمونه توسط نرم افزارهای BLAST و ClustalW(http://www.ebi.ac.uk/Tools/ClustalW) با توالی‌های نواحی ITS1، 5.8s و ITS2 گونه‌های مختلف فاسیولا، اثبت شده در بانک جهانی ژن مقایسه شدند.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-14]

یافته‌ها

تعداد ۵۸۰ نمونه فاسیولای جمع‌آوری شده از ۹۰ کبد آلوده‌ی گاوی وگوسفندی به‌طور مورفولوژیکی شناسایی شدند. بر اساس معیارهای مورفولوژیک ۵۷۵ نمونه فاسیولا هپاتیکا و ۵ نمونه فاسیولا ژیگانتیکا تشخیص داده شدند. در بررسی مولکولی ناحیه ای بطول ۱۰۸۱ bp نمونه‌ها با موفقیت تکثیر داده شد (شکل ۱) با توجه به طول باند حاصله از PCR هیچ اختلاف سایزی در نمونه‌های گاوی و گوسفندی مشاهده نگردید. تعداد ۵۰ نمونه (۵ کرم که بر اساس معیارهای مورفولوژیک فاسیولا ژیگانتیکا تشخیص داده شده بودند و ۴۵ کرم به‌طور تصادفی از کرم‌های فاسیولا هپاتیکا) تعیین توالی شدند. آنالیز توالی‌ها با نرم افزار BLAST نشان داد که طول نواحی ITS1، 5.8s و ITS2 نمونه‌ها بترتیب ۴۲۸، ۱۵۸ و ۳۶۶ جفت باز است (شکل ۲). همچنین آنالیز توالی‌های استان آذربایجان غربی با توالی فاسیولا هپاتیکا به شماره دسترسی JF708027 و فاسیولا ژیگانتیکا به شماره دسترسی JF432073 نشان داد که نمونه‌ها ۱۰۰ درصد به فاسیولا هپاتیکا و ۹۸ در صد به فاسیولا ژیگانتیکا شباهت دارند؛ و تعداد ۱۱ سکانس اشتباهی (شامل ۵ سکانس اشتباهی در ناحیه ITS1 و ۶ سکانس اشتباهی در ناحیه ITS2) در موقعیت‌های ۲۴، ۱۱۴، ۲۰۸، ۲۸۶، ۳۰۶، ۸۲۱،۸۶۰،۸۶۶، ۹۱۸، ۹۲۴ و ۹۳۸ مشاهده گردید. درصد GC و AT ناحیه ITS1 نمونه‌های موردمطالعه بترتیب ۵۱،۸۷ درصدو ۴۸،۱۳ درصد، ناحیه 5.8s ۵۳،۱۷ درصد و ۴۶،۸۳ درصدو ناحیه ITS2، ۴۸،۶۳ درصد و ۵۱،۳۷ درصد تعیین گردید. همچنین توالی‌های هر سه ناحیه ۵۰ نمونه فاسیولا هپاتیکا (۱۵۰ توالی) از شماره KF531639 تا KF531784 در بانک جهانی ژن ثبت شد.



شکل (۱): نتایج الکتروفورز محصول PCR قطعه FITS۱۰۸۱bp نمونه‌های فاسیولا در استان آذربایجان غربی ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ سایز مارکر، ستون ۳ تا ۱۰ نمونه‌های گوسفندی، ستون ۱۱ تا ۱۷ نمونه‌های گاوی

```
F.hepatica.50X.present.study ATCATTACCTGAAAATCTACTCTCACACAAGCGATACACGTGTGACCGTC 50
JF708027.hepatica.China------ACCTGAAAATCTACTCTCACACAAGCGATACACGTGTGACCGTC 44
JF432073.F.gigantica.Iran----------------TACTCTTACACAAGCGATACACGTGTGACCGTC 33
 ****** *************************

F.hepatica.50X.present.study ATGTCATGCGATAAAAATTTGCGGACGGCTATGCCTGGCTCATTGAGGTC 100
JF708027.hepatica.China ATGTCATGCGATAAAAATTTGCGGACGGCTATGCCTGGCTCATTGAGGTC 94
JF432073.F.gigantica.Iran ATGTCATGCGATAAAAATTTGCGGACGGCTATGCCTGGCTCATTGAGGTC 83
 *********************************************

F.hepatica.50X.present.study ACAGCATATCCGAACACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATG 150
JF708027.hepatica.China ACAGCATATCCGAACACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATG 144
JF432073.F.gigantica.Iran ACAGCATATCCGATCACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATG 133
 ************:************************************

F.hepatica.50X.present.study GTATGCTTGCGTCTCTCGGGGCGCTTGTCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGT 200
JF708027.hepatica.China GTATGCTTGCGTCTCTCGGGGCGCTTGTCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGT 194
JF432073.F.gigantica.Iran GTATGCTTGCGTCTCTCGGGGCGCTTGTCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGT 183
 *********************************************

F.hepatica.50X.present.study ACTGCCACGATTGGTAGTGCTAGGCTTAAAGAGGAGATTTGGGCTACGGC 250
JF708027.hepatica.China ACTGCCACGATTGGTAGTGCTAGGCTTAAAGAGGAGATTTGGGCTACGGC 244
JF432073.F.gigantica.Iran ACTGCCATGATTGGTAGTGCTAGGCTTAAAGAGGAGATTTGGGCTACGGC 233
 ******* ****************************************

F.hepatica.50X.present.study CCTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTACATTTACACTGTTAAAG 300
```

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-14]

```
JF708027.hepatica.China CCTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTACATTTACACTGTTAAAG 294
JF432073.F.gigantica.Iran CCTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTACAATTACACTGTTAAAG 283
 ************************************:**************

F.hepatica.50X.present.study TGGTACTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGCACCCGG 350
JF708027.hepatica.China TGGTACTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGCACCCGG 344
JF432073.F.gigantica.Iran TGGTATTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGCACCCGG 333
 ***** ******************************************

F.hepatica.50X.present.study TCCTTGTGGCTGGACTGCACGTACGTCGCCCGGCGGTGCCTATCCCGGGT 400
JF708027.hepatica.China TCCTTGTGGCTGGACTGCACGTACGTCGCCCGGCGGTGCCTATCCCGGGT 394
JF432073.F.gigantica.Iran TCCTTGTGGCTGGACTGCACGTACGTCGCCCGGCGGTGCCTATCCCGGGT 383
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study TGGACTGATAACCTGGTCTTTGACCATACGTACAACTCTGAACGGTGGAT 450
JF708027.hepatica.China TGGACTGATAACCTGGTCTTTGACCATACGTACAACTCTGAACGGTGGAT 444
JF432073.F.gigantica.Iran TGGACTGATAACCTGGTCTTTGACCATACGTACAACTCTGAACGGTGGAT 433
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study CACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATG 500
JF708027.hepatica.China CACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATG 494
JF432073.F.gigantica.Iran CACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATG 483
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study CAAACTGCATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCC 550
JF708027.hepatica.China CAAACTGCATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCC 544
JF432073.F.gigantica.Iran CAAACTGCATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCC 533
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study ATGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATC 600
JF708027.hepatica.China ATGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATC 594
JF432073.F.gigantica.Iran ATGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATC 583
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study ACGACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATCTCC 650
JF708027.hepatica.China ACGACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATCTCC 644
JF432073.F.gigantica.Iran ACGACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATCTCC 633
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study TCTATGAGTAATCATGTGAGGTGCCAGATCTATGGCGTTTCCCTAATGTA 700
JF708027.hepatica.China TCTATGAGTAATCATGTGAGGTGCCAGATCTATGGCGTTTCCCTAATGTA 694
JF432073.F.gigantica.Iran TCTATGAGTAATCATGTGAGGTGCCAGATCTATGGCGTTTCCCTAATGTA 683
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study TCCGGATGCACCCTTGTCTTGGCAGAAAGCCGTGGTGAGGTGCAGTGGCG 750
JF708027.hepatica.China TCCGGATGCACCCTTGTCTTGGCAGAAAGCCGTGGTGAGGTGCAGTGGCG 744
JF432073.F.gigantica.Iran TCCGGATGCACCCTTGTCTTGGCAGAAAGCCGTGGTGAGGTGCAGTGGCG 733
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study GAATCGTGGTTTAATAATCGGGTTGGTACTCAGTTGTCAGTGTGTTTGGC 800
JF708027.hepatica.China GAATCGTGGTTTAATAATCGGGTTGGTACTCAGTTGTCAGTGTGTTTGGC 794
JF432073.F.gigantica.Iran GAATCGTGGTTTAATAATCGGGTTGGTACTCAGTTGTCAGTGTGTTTGGC 783
 **************************************************

F.hepatica.50X.present.study GATCCCCTAGTCGGCACACTTATGATTTCTGGGATAATTCCATACCAGGC 850
JF708027.hepatica.China GATCCCCTAGTCGGCACACTTATGATTTCTGGGATAATTCCATACCAGGC 844
JF432073.F.gigantica.Iran GATCCCCTAGTCGGCACACTCATGATTTCTGGGATAATTCCATACCAGGC 833
 ******************* ****************************

F.hepatica.50X.present.study ACGTTCCGTCACTGTCACTTTGTCATTGGTTTGATGCTGAACTTGGTCAT 900
JF708027.hepatica.China ACGTTCCGTCACTGTCACTTTGTCATTGGTTTGATGCTGAACTTGGTCAT 894
JF432073.F.gigantica.Iran ACGTTCCGTTACTGTTACTTTGTCATTGGTTTGATGCTGAACTTGGTCAT 883
 ********* ***** *********************************

F.hepatica.50X.present.study GTGTCTGATGCTATTTTCATATAGCGACGGTACCCTT-CGTGGTCTGTCT 949
JF708027.hepatica.China GTGTCTGATGCTATTTTCATATAGCGACGGTACCCTT-CGTGGTCTGTCT 943
JF432073.F.gigantica.Iran GTGTCTGATGCTATTTT-ATATAACGACGGTACCCTTTCGTGGTCTGTCT 932
 ***************** *****.************* ************

F.hepatica.50X.present.study TCC----------- 952
JF708027.hepatica.China TCC----------- 946
JF432073.F.gigantica.Iran TCCTGACCTCGGTT 946
 ***
```

شکل (۲): آرایش توالی بازهای ناحیه‌ی ITS1(۱ تا ۳۶۶)، 5.8s(۳۶۷ تا ۵۲۴) وناحیه ITS2(۵۲۵ تا ۹۵۲) از DNA ریبوزومی در ۵۰ نمونه از فاسیولاهای تعیین توالی شده استان آذربایجان غربی که با نمونه فاسیولا هپاتیکا با شماره دسترسی JF708027 و فاسیولا ژیگانتیکا به شماره دسترسی JF432073 از بانک جهانی ژن مقایسه شده‌اند.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-14]

بحث

بیماری فاسیولیازیس که توسط گونه‌های فاسیولا (فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا) ایجاد می‌شود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز محسوب شده و در هر پنج قاره دنیا پراکنده است (۱۰). افتراق گونه‌های فاسیولا به خاطر وجود فرم‌های هیبرید و حد واسط ضروری است (۳). از طرفی معیارها و شاخص‌های مورفولوژیکی و روش‌های روتین افتراق گونه‌های فاسیولادقیق و قابل‌اعتماد نمی‌باشند (۵،۶،۲۰)

روش‌های مولکولی که در آن‌ها ژنوم کرم مورد بررسی قرار می‌گیرد در مقایسه با روش‌های روتین، از دقت و حساسیت بالایی برخوردار هستند (۲۲) به هر حال مارکرهای مولکولی متعددی برای شناسایی گونه‌های فاسیولا به کاربرده شده‌اند مثل: ITS1، ITS2، COI، ND1 و... (۵،۱۳،۱۶،۱۷). با استفاده از روش PCR-RFLP و توالی‌های نواحی ITS1، 5.8s و ITS2 قطعه ITS ریبوزومال DNA هر دو گونه فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا در تبریز شناسایی شده‌اند (۱۶). قوامی و همکاران با معیارهای مورفولوژیکی در استان زنجان ۳۱ درصد فاسیولاهپاتیکا، ۷ درصد فاسیولا زیگانتیکاو ۶۲ درصد فرم حدواسط تشخیص دادند ولی با مطالعه مولکولی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و تعیین توالی‌های ناحیه ITS2، همه نمونه‌ها فاسیولا هپاتیکا تشخیص داده شدند (۲۱). همچنین با استفاده از مارکرهای مولکولی مختلف علاوه بر دو گونه رایج فاسیولا فرم‌های حدواسط نیز در ایران شناسایی شده است (۵،۱۱). بررسی ۱۵۰ توالی (۵۰ توالی از هر ناحیه ITS) این مطالعه با استفاده از برنامه BLAST نشان داد که نمونه‌ها صد درصد به فاسیولا هپاتیکا شبیه هستند. همچنین آنالیز این توالی‌ها با یک توالی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژِیگانتیکا از بانک جهانی ژن نشان داد که فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا بر اساس توالی‌های ITS1 و ITS2 گونه‌های بسیار نزدیکی به هم بوده و فقط در چند نوکلئوتید باهم دیگر اختلاف دارند. هر چند که یافته‌های مطالعه حاضر با یافته‌های رکنی و همکاران (۱۸) که قبلاً فاسیولا هپاتیکا را از یک بز و هشت بوفالو، از استان آذربایجان غربی گزارش کرده بودمطابقت دارد بلکه از آن‌ها جامع تر و کامل تر است زیرااولاً تعداد نمونه‌های آن‌ها کم بوده و فقط از شهر ارومیه جمع‌آوری شده بودندثانیاً فقط ناحیه ITS1 نمونه‌ها بررسی شده بود این در حالی است که در مطالعه حاضر هر سه ناحیه‌ی ITS1، 5.8s و ITS2 قطعه ITS ریبوزومال DNA موردمطالعه قرار گرفته است. اگرچه در این مطالعه حاضر نیز کمتر از ۱ درصد نمونه‌های مورد بررسی بر اساس شاخص‌های مورفولوژیکی مانند طول و عرض کرم بالغ، طول و عرض مخروط راسی، نسبت طول کرم به عرض آن و...فاسیولا ژیگانتیکا تشخیص داده شدند ولی با بررسی مولکولیمشخص گردید که همه نمونه‌ها ۱۰۰ درصد به فاسیولا شباهت دارند. لازم به ذکر است روش استخراج اسیدهای نوکلئیک بکار گرفته شده در این مطالعه با توجه به کیفیت باندهای حاصله، روش بسیار مطلوب و کم هزینه ای برای استخراج اسیدهای نوکلئیک کرم‌های فاسیولا می‌باشد. از طرفی به نظر می‌رسد پرایمرهای طراحی شده برای این مطالعه، پرایمر های کامل تری نسبت به پرایمر های مطالعات قبلی باشد چرا که با این پرایمر ها ما توانستیم هر سه ناحیه ITS ریبوزومال DNA ی کرم‌های فاسیولا را تکثیر دهیم. اثبات وجود یا عدم وجود فاسیولا ژیگانتیکا در استان آذربایجان غربی نیاز به بررسی میزبان‌های دیگر از قبیل بوفالوی آبی، بزو.. از شهرهای بیشتری نسبت به این مطالعه و فصول مختلف دارد.

مطابق نتایج این مطالعه،۵۸۰ کرم فاسیو لا از پنج ناحیه جغرافیایی استان آذربایجان غربی (شهرهای ارومیه، سلماس، ماکو، بوکانو مهاباد) در دو میزبان گاو و گوسفند با روش PCR و تعیین توالی‌های نواحی ITS1، 5.8s و ITS2 قطعه ITS ریبوزومال DNA مورد بررسی قرار گرفتند و فاسیولا هپاتیکا تشخیص داده شدند. در نتیجه این روش، یک روش حساس، ارزان و دقیقی برای مطالعه گونه‌های فاسیولا می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه همه نمونه‌های مورد بررسی استان آذربایجان غربی فاسیولا هپاتیکا تشخیص داده شدند. برای اثبات وجود یا عدم وجود فاسیولا ژیگانتیگا و فرم‌های حدواسط، به مطالعه و بررسی‌های بیشتری با میزبان‌های دیگری از قبیل بوفالو، بز و... ضروری به نظر می‌رسد درنهایت پیشنهاد می‌شود به منظور اتخاذ برنامه‌های کنترل انگل فاسیولا، پژوهش‌های دیگری برای تعیین حلزون‌های ناقل فاسیولا هپاتیکا در استان آذربایجان غربی انجام پذیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله قسمتی از پایان نامه دانشجویی دوره‌ی کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به شماره قرارداد ۱۱۴۹ مورخه ۹۱/۷/۱۲ مصوبه شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه می‌باشد که بدینوسیله مؤلفین این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌نمایند.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-14]

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;69:41–146.
2. Ashrafi K, Valero MA, Forghan-parast K, Rezaeian M, Shahtaheri SJ, Hadian MR. et al. Potential Transmission of Human Fascioliasis Through Traditional Local Foods, in Northern Iran. Iranian J Pub Health 2006;35(2):57-63.
3. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. Int J Parasitol 2005;35(11-12):1255–78.
4. Dalimi A, Jabarvand M. Fasciola hepatica in the human eye. Trans R Soc Trop Med Hyg 2005;99:798.
5. Amor N, Farjallah S, Salem M, Lamine DM, Merella P, Said K, et al. Molecular characterization of Fasciola gigantica from Mauritania based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences. Exp Parasitol 2011;129(2):127–36.
6. Amor N, Halajian A, Farjallah S, Merella P, Said K, Ben Slimane B. Molecular characterization of Fasciola spp. from the endemic area of northern Iran based on nuclear ribosomal DNA sequences. Exp Parasitol 2011;128(3):196–204.
7. WHO. Foodborne trematode infections [Internet]. WHO. 2013 [cited 2015 Jan 21]. Available from: http://www.who.int/foodborne_trematode_infections/en/
8. SahbaGH, Arfaa F, farahmandian I, Jalali H. Animal fascioliasis in Khuzestan, southwestern Iran. J Parasitol 1972;58:712-6.
9. Massoud J. Fascioliasis outbreak in man and drug test (triclabendazole) in Caspian littoral, northern part of Iran.1989. Bull Soc Fran Parasitol 1990;8:438.
10. World Health Organization. Control of Foodborne trematode infections. World Health Organization, Technical reports Series 1995;849:1-157.
11. Karimi A. Genetic diagnosis ofFasciola species based on 18s ribosomal DNA sequences. J boil Sci 2008 ;7:1166-73.
12. Lotfy WM, El-Morshedy HN, Abou El-Hoda M, El-Tawila MM, Omar EA, Farag HF. Identification of the Egyptian species of Fasciola. Vet Parasitol 2002;103(4):323–32.
13. Farjallah S, Sanna D, Amor N, Ben Mehel B, Piras MC, Merella P, et al. Genetic characterization of Fasciola hepatica from Tunisia and Algeria based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Parasitol Res 2009;105(6):1617–21.
14. 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;58(1):81–5.
15. 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):52–9.
16. 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.
17. Nguyen S, Amer S, Ichikawa M, Itagaki T, FukudaY, NakaiY. Molecular identificationof Fasciolaspp. (Digenea: Platyhelminthes)in cattle from Vietnam. Parasite 2012;19(1):85-9.
18. Rokni MB, Mirhendi H, Behnia M, Fasihi Harand M, Jalalizand N. Molecular Characterization of Fasciola hepatica isolates by RAPD-PCR and

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-14]

Ribosomal ITS1 sequencing. Iran Red Crescent Med J 2010; 12(1):27-32.

19. Collins FH, Petrarca V, Mpofu S, Brandling-Bennett AD, Were JB, Rasmussen MO, et al. Comparison of DNA probe and cytogenetic methods for identifying field collected Anopheles gambiae complex mosquitoes. Am J Trop Med Hyg 1988;39(6):545–50.
20. 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.
21. Ghavami MB, Rahimi P, Haniloo A, Mosavinasab SN. Genotypic and Phenotypic Analysis of Fasciola Isolates. Iran J Parasitol 2009; 4: 61-70.
22. Marcilla A, Bargues MD, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between Fasciola hepatica and Fasciola gigantica. Mol Cell probes 2002;16:327-33.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-14]

Original Article

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *FASCIOLA* SPECIES IN WEST AZERBAIJAN PROVINCE

Hossein Galavani[1], Saber Gholizadeh[2], Khosrow Hazrati Tappeh[3]*

Received: 3 Aug, 2014; Accepted: 2 Oct, 2014

Abstract

Background & Aims: Fascioliasis caused by *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* has medical and economic importance in the world. Traditional approaches are not accurate and reliable in identification of agent parasites. Thus the present study was designed to identify the *Fasciola spp*by molecular methods in West Azerbaijan province.

Materials & Methods: In current study *Fasciola* isolates were collected from slaughterhouses in five districts in West Azerbaijan province, Northwestern Iran. Parasite species were identified using morphological and molecular tools, ribosomal DNA ITS1, 5.8s and ITS2 sequences. A number of 580 adult *Fasciola* worms were isolated from 90 infected livers (50 liver of cattle, 40 liver of sheep). Out of 110 DNA extracted specimens, 50 specimens were subject to direct sequencing.

Results: Sequence analysis showed 100% similarity in ITS1 (428 bp), 5.8s (158 bp) and ITS2 (366 bp) regions of all sequences. The degree of identity between *F. hepatica* and *F. gigantica* sequences was 98% with 11 nucleotide mismatches. Based on rDNA-ITS1 and ITS2 sequences, only *F. hepatica* flukes are scattered among cattle and sheep population in West Azerbaijan province. Finally, 150 sequence of *F. hepatica* (50 sequences of each region of ITS) from West Azerbaijan province were recorded to GenBank.

Conclusion: The results of this study showed no evidence of *F. gigantica*in cattle and sheep in West Azerbaijan province. More studies are essential to design new molecular markers will be helpful in correct species identification and therefore, for control and prevention of this parasitic disease.

Keywords: *Fasciola,* ITS_1, ITS_2, 5.8s, PCR, Ribosomal DNA

Address*:* Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia , Iran, Tel: +98 9143433134

Email: hazrati_tappeh@yahoo.co.nz

SOURCE: URMIA MED J 2015: 25(11): 1040 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc in Medical Parasitology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*

[2] *Assistant Professor, Medical Entomology Department, Faculty of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*

[3] *Professor, Parasitology and Mycology, Department, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-14]