مجلهی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دورهی ۱۶، شمارهی ۶۵، زمستان ۱۳۸۷، صفحات ۴۱ تا ۴۸

تعیین گونهی فاسیولا با استفاده از روش PCR-RFLP

پری رحیمی[۱]، دکتر محمدباقر قوامی[۲]، دکتر علی هانیلو[۳]، دکتر عباسعلی نوریان[۴]، دکتر علیرضا بیگلری[۵]

نویسندهی مسئول: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکدهی پزشکی، گروه انگلشناسی hani@zums.ac.ir

دریافت: ۸۷/۸/۳۰ پذیرش: ۸۷/۱۲/۳

چکیده

زمینه و هدف: *فاسیولیازیس یکی از بیماریهای مشترک انسان و دام است که آسیبهای بهداشتی و لطمات اقتصادی زیادی را در مناطق مختلف ایران به وجود میآورد. فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا از عوامل شناخته شده فاسیولیازیس هستند که هر کدام چهرهی اپیدمیولوژیک خاصی دارند. شناخت گونههای فاسیولا در انتخاب صحیح روشهای کنترل بیماری در یک منطقه نقش بسزایی دارد. با عنایت به اهمیت بهداشتی و اقتصادی این بیماری، مطالعهی حاضر با هدف تعیین گونهی انگل در زنجان به شیوهی مولکولی انجام یافته است.*

روش بررسی: *تعداد ۵۳۵ کرم بالغ فاسیولا پس از جمعآوری از کبدهای آلوده (گاو و گوسفندهای ذبح شده در کشتارگاه زنجان) در بافر PBS شستشو شدند. نیمهی پیشین کرمها به الکل ۷۰ درصد منتقل و تا استخراج اسیدهای نوکلئیک در ۲۰ - درجهی سانتیگراد نگهداری شدند. اسیدهای نوکلئیک نمونهها به شیوهی اصلاح شدهی فنل کلروفرم استخراج و در آنها قطعهی بین دو ژن 5.8S و28S از rDNA با روش PCR تکثیر یافت. چندشکلی قطعهی ITS2 به روش PCR-RFLP و توالی بازهای آلی آن با تکنیک تعیین توالی DNA تعیین شد.*

یافتهها: *نتایج PCR-RFLP و مقایسهی توالی بازهای ناحیه ITS2 با توالیهای ثبت شده در بانک ژنی نشان داد که همهی نمونههای مورد مطالعه، فاسیولاهپاتیکا بودند. همچنین تعیین توالی نشان داد که در ناحیهی ITS2 تعداد ۳۶۱ جفت باز آلی وجود دارد. توالی بازهای ناحیه ITS2 سیزده نمونه در بانک ژنی به شمارههای EU391412-EU391424 ثبت شد.*

نتیجهگیری: *بر اساس نتایج این مطالعه شواهدی از وجود فاسیولا ژیگانتیکا در زنجان بدست نیامد و کلیه نمونههای مورد بررسی فاسیولا هپاتیکا تشخیص داده شدند.*

واژگان کلیدی: فاسیولا، ترماتود کبدی، ITS2 و rDNA وPCR-RFLP

مقدمه

فاسیولیازیس یک بیماری مشترک انسان و حیوان است که توسط ترماتودهای کبدی فاسیولا هپاتیکا (*Fasciola hepatica*) و فاسیولا ژیگانتیکا (*Fasciola gigantica*) ایجاد میشود. در عفونتهای انسانی، انگل میتواند باعث التهاب و آسیب کبد و مجاری صفراوی شود (۱). نقش این انگلها در کاهش تولید گوشت و سایر فرآوردههای دامی مشخص شده است (۲). در سالهای اخیر با تغییر الگوی

۱- کارشناسارشد انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان ۲- دکترای تخصصی حشرهشناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۳- دکترای تخصصی انگلشناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان ۴- دکترای تخصصی انگلشناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۵- دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

اپیدمیولوژیک بیماری، اهمیت بهداشتی و درمانی آن برای انسان نمود بیشتری پیدا کرده است (۱). در مطالعات اخیر موارد انسانی بیماری در مناطق مختلف دنیا ۲/۴ تا ۱۷ میلیون نفر برآورد شده است. این بیماری از سالیان گذشته در ایران در بین دام‌ها شایع بوده و موارد تک‌گیر آن در انسان از مناطق مختلف گزارش شده است (۳). در سال‌های اخیر موارد انسانی عفونت به میزان چشمگیری افزایش یافته است. به طوری که در سال ۱۳۶۸ همه‌گیری بزرگ آن در استان گیلان به وقوع پیوست و در اثر آن هزاران نفر از ساکنین شهرهای بندر انزلی و رشت به فاسیولیازیس مبتلا شدند (۵ و۴).

جهت پیشگیری و اتخاذ شیوه‌های کنترل فاسیولیازیس، افتراق دو گونه‌ی فاسیولاهپاتیکا و فاسیولاژیگانتیکا از اهمیت خاصی برخوردار است. دو گونه‌ی مذکور در روش انتقال، خصوصیات اپیدمیولوژیک و فیلوژنیک اختلاف دارند و هر کدام توسط گونه‌های خاصی از حلزون‌های جنس لیمنه (*Lymnaea*) انتقال می‌یابند (۱). خصوصیات مورفولوژیک کرم بالغ و تخم تحت‌تأثیر عوامل مختلفی چون سن انگل، نوع میزبان، شدت عفونت میزبان و روش ثابت کردن نمونه‌ها قرار می‌گیرد و روش‌های سنتی مطالعه خصوصیات مورفولوژیک نمی‌تواند به طور دقیق ماهیت این دو گونه را مشخص نمایند (۶و۱). از طرفی این دو گونه می‌توانند با همدیگر جفت‌گیری نموده و نمونه‌های دورگه (Hybrid) را به‌وجود آورند که با روش‌های مورفولوژیک قابل‌تفکیک نیستند (۸ و۷). هم‌چنین در عفونت‌های انسانی، علایم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی و آزمون‌های سرولوژیک در تفکیک دو گونه فاسیولا کارآیی ندارند (۹). بنابراین به کارگیری یک روش دقیق و مطمئنی که بتواند این دو گونه را از همدیگر تفکیک کند، ضرورت پیدا می‌کند.

در سال‌های اخیر پیشرفت‌هایی که در زمینه‌ی بیولوژی مولکولی به ویژه تکثیر نواحی خاصی از ژنوم انگل به شیوه‌ی واکنش‌های آنزیمی پلیمراز (PCR) حاصل شده، اختلافات بارزی در نوع و ترتیب بازهای آلی گونه‌های مختلف موجودات شناسایی نموده که این تفاوت‌ها می‌توانند گونه‌های مشابه را از همدیگر تفکیک کنند (۱۰). در مطالعات سیستماتیک مولکولی، نواحی کدکننده‌ی rRNA که شامل 18Sو 28S هستند در تفکیک جنس‌ها و سطوح پایین‌تر از آن نظیر گونه دقت لازم را ندارند. در حالی که مقایسه‌ی ترتیب نوکلئوتیدهای بخش (internal transcribed spacer 2 [ITS2]) می‌تواند گونه‌های مختلف یک جنس و حتی سویه‌های مختلف یک گونه را به طور دقیق از یکدیگر تفکیک نماید (۱۱). در پژوهشی در کشور مصر با تأثیر آنزیم‌های برشگر بر محصول قطعه‌ی 28S -rDNA با روش PCR-RFLP، دو گونه فاسیولاهپاتیکا و فاسیولاژیگانتیکا از هم افتراق داده شدند (۷). برخی از سویه‌های فاسیولاهپاتیکا و فاسیولاژیگانتیکا فقط در دو جایگاه باز آلی ناحیه‌ی D2 قطعه‌ی 28S با همدیگر تفاوت دارند و در برخی سویه‌ها این اختلاف نیز دیده نمی‌شود (۱۲)، در حالی‌که در ناحیه‌ی ITS2 در شش ناحیه‌ی ثابت با همدیگر تفاوت دارند (۸).

گونه‌های فاسیولاهپاتیکا و ژیگانتیکا در بعضی از نقاط ایران همچون مناطق دیگری از دنیا با یکدیگر همپوشانی دارند و در مقالات منتشر شده، به گونه‌ی انگل اشاره نمی‌شود و عوامل عفونت بدون رده‌بندی خاص غالبا تحت عنوان *Fasciola spp* گزارش می‌شود (۱۳و ۲، ۹). لذا هدف از انجام این پژوهش روشن ساختن ماهیت مولکولی و تاکسونومیک انگل فاسیولا در زنجان، با روش مولکولی PCR-RFLP بر پایه‌ی توالی نوکلئوتیدهای ITS2 می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه، بر روی کرم‌های فاسیولای جدا شده از کبدهای آلوده‌ی گاو و گوسفندهای ذبح شده در کشتارگاه

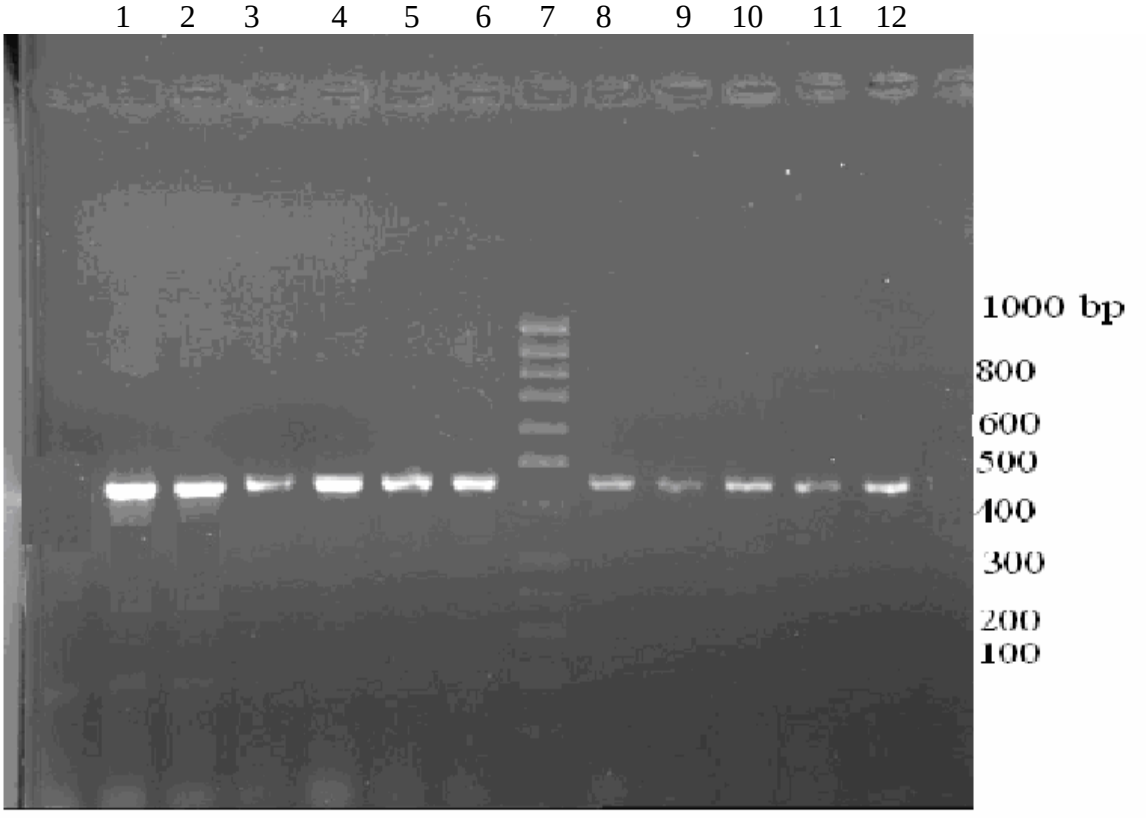
زنجان انجام شد. کبدهایی کـه آلـودگی کمتـر از ۱۰ فاسـیولا داشتند همه‌ی کرم‌های بالغ و در کبدهایی که آلودگی بیشتری داشتند به طور تصادفی فقط ۱۰ نمونـه بـالغ انتخـاب شـدند. مجاری صفراوی کبدهای آلوده با چـاقوی جراحـی بـه دقـت بررسی و کرم‌های فاسـیولا از آن‌هـا جـدا و در محلـول بـافر فسفات سالین (PBS) در حرارت ۳۷ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد به مدت ٤ ساعت شستشو داده شدند. نمونه‌ها در میان دو لام به طور کامـل ثابـت شـدند. بـا کمـک استریومیکروسـکوپ نمونه‌های بالغ مشخص و نیمه‌ی پیشین آن‌ها جدا شد. پس از انتقال به الکل اتیلیک ۷۰ درصد تا استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرارگرفتند. DNA نمونه‌هـا مطـابق روش فنـل‌کلروفـرم اسـتخراج شـد. پرایمرهـا بـا اسـتفاده از تـوالی‌هـای rDNA اسـتاندارد موجـود در بانـک ژن بـا شـمـاره‌هـای دسترسـی AB010974، AB010975، AB207148 و AB207149 طراحـی شـدند. پرایمـر بالادست ('5-TCTTGAACGCATATTGCGGC-3') از نوکلئوتیدهای شماره‌ی ۳۹ تا۵۹ 5/8S-rDNA و پرایمر پایین دسـت ('5-AGTTCAGCGGGTAATCACGT-3') از نوکلئوتیدهای شماره ۴۷۶ تـا ۴۹۶ 28S-rDNA طراحـی شـدند. ۱ تـا ٤ میکرولیتـر از DNA هـر یـک از نمونـه‌هـا به همراه پرایمرهای فوق در حضور آنزیم تک پلی‌مراز و بافر ۱۰x با حجم واکـنش ۵۰ میکرولیتـر و بـا برنامـه‌ی حرارتـی پیش‌واسرشت در دمـای ۹٤ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۵ دقیقه انجـام شـد. تکثیـر در ۳ مرحلـه و ۳۵ تکـرار شـامل واسرشت در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مـدت ۱ دقیقـه، اتصال پرایمر (annealing) در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بـه مـدت ۱ دقیقـه و پلیمریزاسـیون در دمـای ۷۲ درجـه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقـه انجـام شـد. در ادامـه، مرحلـه‌ی پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مـدت ۷ دقیقـه صـورت گرفـت. نمونـه‌هـای تکثیـریافتـه در اگـارز ۱/۵ درصد، با ولتاژ ۸۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند.

جهت تعیین چندشـکلی در قطعـه‌ی تکثیریافتـه، بـر روی ۱۰ میکرولیتـر از محـصول PCR، ۲ میکرولیتـر آنـزیم برشگر *BamHI* (ER0051, 00022259, Fermentase) و ۲ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم اضافه شد. این آنزیم تـوالی '5'...G↓GATCC...3' را برش می‌دهد. همچنین بـر روی ۱۰ میکرولیتر دیگـر از محـصول PCR، ۲ میکرولیتـر آنـزیم برشـگر *PagI* (ER1282, 00022771, Fermentase) و ۲ میکرولیتر از بافر مخصوص آنزیم اضـافه شـد. ایـن آنـزیم توالی '5'...T↓CATGA...3 را برش می‌دهد. با آب مقطـر حجم واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسید. نمونـه‌هـا بـه مـدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد طبـق دسـتورالعمل شـرکت سازنده‌ی آنزیم انکوبـه و بعـد از اضـافه شـدن ۵ میکرولیتـر EDTA، ۱۰ میکرولیتر از آن‌ها در آگارز ۱/۵ درصد و با ولتاژ ۸۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شد. محصول تکثیر شـده بین دو ژن 5.8S و 28S بعد از خالص‌سازی، توسط شـرکت زیست‌فناوری کوثر تعیین توالی شد. توالی بازهای قطعات بـا نـرم‌افزارهـای Bioalign و مگـا ۳ (MEGA3) و تطـابق توالی‌ها با توالی‌های ثبت شده توسط نـرم‌افـزار NCBI Blast انجام شد.

یافته‌ها

در این پژوهش، در مجموع تعداد ۵۳۵ نمونه‌ی فاسیولای بالغ (۴۱۹ نمونه‌ی گـاوی و ۱۱۶ نمونـه‌ی گوسـفندی) مـورد مطالعه قرار گرفتند. بعد از انجام PCR و الکتروفورز قطعـه‌ی تکثیر یافته، باند ۴۵۶ جفت بازی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مورد تایید قرار گرفت. قطعـه‌ی تکثیـریافتـه، تحـت تـأثیر دو آنزیم محدود کننـده‌ی *BamHI* و *PagI* قـرار گرفتنـد و در آن‌ها محصول هضم‌شده‌ای مشاهده نشد (شکل ۱). سه نمونـه از ۱۰ نمونه‌ی گوسفندی که از نظر معیارهای مورفومتریک به فاسیولا هپاتیکا شبیه بودند (فاصله‌ی بادکش شکمی تا انتهـای بدن ۱۵/۶۸ تا ۱۹/۸۸ میلی‌متر و نسبت طول بـه عـرض بـدن

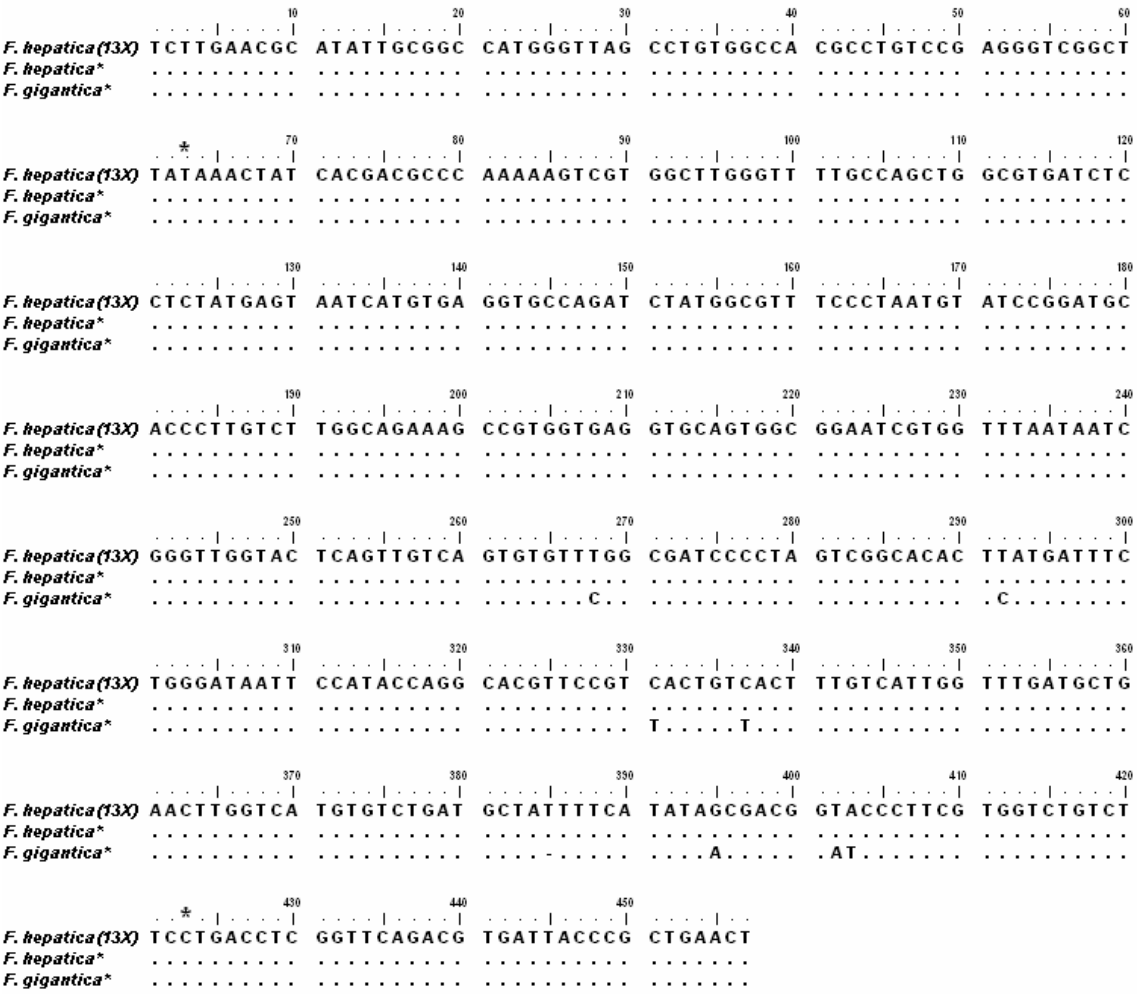
۲/۵ تا ۲/۶) و ده نمونه از ۴۰ نمونه‌ی گاوی که از نظر معیارهای مورفومتریک به فاسیولا ژیگانتیکا شبیه بودند (فاصله بادکش شکمی تا انتهای بدن ۲۹/۷ تا ۳۲/۹ میلی‌متر و نسبت طول به عرض بدن ۳/۷ تا ۴/۵)، به صورت تصادفی انتخاب و قطعه‌ی تکثیر شده‌ی آن‌ها تعیین توالی شد (شکل ۲). توالی این نمونه‌ها در بانک ژنی به شماره‌های EU391412-EU391424 ثبت شدند.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR-RFLP نمونه‌های فاسیولا روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. محصول PCR و وجود باند ۴۵۶bp (۱و۲). محصول واکنش بعد از اثر آنزیم برشگر PagI (۶-۳) و محصول واکنش بعد از اثر آنزیم برشگر BamHI (۱۱-۸) که در هر دو مورد آنزیم‌ها اثر نداشته‌اند. مارکر وزن مولکولی DNA (۷). نمونه‌ی کنترل فاسیولا هپاتیکا (۱۲).

مقایسه این نمونه‌ها با نمونه‌های ثبت شده فاسیولا هپاتیکا با شماره‌ی دسترسی AJ557568 و فاسیولا ژیگانتیکا با شماره‌ی دسترسی AJ557569 در بانک ژنی، نشان داد که در مطالعه‌ی حاضر، هر ۱۳ نمونه مربوط به فاسیولا هپاتیکا هستند و چندشکلی در جایگاه‌های ۲۳۰، ۳۴۰ و ۳۴۱ مربوط به ناحیه ITS2 (به ترتیب جایگاه‌های ۲۹۲، ۴۰۲ و ۴۰۳ از کل قطعه) دیده نمی‌شود. در ۳۶۱ جفت باز متعلق به ناحیه ITS2، فراوانی بازهای آلی آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین

به ترتیب ۶۹، ۱۱۶، ۸۱ و ۹۵ بود و نسبت گوانین و سیتوزین به بازهای دیگر به ۴۸/۸ درصد می‌رسید.



شکل ۲: آرایش توالی بازهای آلی ناحیه‌ی ITS2 (بازهای ۴۲۳-۶۳) و قطعه‌ی ثابت ژن‌های 5.8S (بازهای ۶۲-۱) و 28S (بازهای ۴۵۷-۴۲۴) از DNA ریبوزومی در ۱۳ نمونه از فاسیولای تعیین توالی شده. دو نمونه‌ی مورد مقایسه مربوط به فاسیولا هپاتیکا با شماره‌ی دسترسی AJ557568 و فاسیولا ژیگانتیکا با شماره‌ی دسترسی AJ557569 می‌باشند. (.) نشانگر توالی‌های مشابه است.

بحث

دو گونه فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا در ایران، چرخه‌ی زندگی خاصی را در مناطق جغرافیایی مختلف دارند و جهت تکمیل دوره‌ی زندگی انگل، وجود گونه‌ی خاصی از حلزون‌های ناقل به عنوان میزبان واسط ضروری است. بدیهی است تدوین سیاست‌های پیشگیری و کنترل بیماری در هر منطقه مستلزم شناسایی دقیق انگل و گونه غالب آن است. در مطالعه‌ی حاضر با بررسی ناحیه ITS2 از rDNA مشخص شد که فاسیولا هپاتیکا احتمالا تنها گونه‌ی فاسیولا می‌باشد که در استان زنجان پراکنده است. در مطالعات محققین دیگر که ناحیه ITS2 را مورد مقایسه قرار داده‌اند، فاسیولا هپاتیکا از ایران و کشورهای آسیای مرکزی، اروپایی آسیای جنوب‌شرقی

و افریقایی گزارش شده است (۱۵ و ۱۴). مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که توالی بازهای آلی در ناحیه‌ی ITS2 وضعیت کاملا ثابتی دارد. این قطعه از ۳۶۱ جفت باز آلی تشکیل شده و در آن سیتوزین و گوانین نزدیک به نیمی از بازهای آلی را تشکیل می‌دهند. این یافته‌ها در مطالعات انجام شده از مناطق کوهستانی استان گیلان (۱۲)، کشورهای حاشیه‌ی شمال ایران، اروپا و آسیای جنوب‌شرقی نیز دیده می‌شود (۱۴). بر اساس آرایش بازهای آلی در ناحیه‌ی ITS2 تا کنون ۴ ژنوتیپ برای فاسیولا هپاتیکا بیان شده‌است (۱۴). توالی بازها نشان داد که نمونه‌های استان زنجان همگی از ژنوتیپ H1 و از نظر ژنتیکی مشابه نمونه‌های آسیای مرکزی و اروپای جنوبی هستند. در این مطالعه جهت تکثیر قطعه‌ی ITS2 نمونه‌ها از پرایمرهای اختصاصی که در نواحی ثابت ژن‌های 5/8S و 28S قرار دارند استفاده شده است. گرچه نواحی این دو ژن در مطالعات محققین دیگر به کار رفته (۱۵و ۱۴، ۱۲، ۸) ولی پرایمرهای به کار رفته در پروژه‌ی حاضر با پرایمرهای سایر مطالعات تفاوت دارد. با توجه به عدم تشکیل پرایمر دایمر و شفاف بودن الگوی الکتروفورز، به نظر می‌رسد که پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه از کیفیت خوبی بر خوردار است و می‌تواند در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد. به کارگیری ذرات شیشه در تهیه‌ی هوموژن و رسوب اسیدهای نوکلئیک در محیط فاقد آنزیم DNAase از اصلاحاتی است که در این مطالعه برای استخراج اسیدهای نوکلئیک به‌کار رفته است. با انجام این اصلاحات همه‌ی نمونه‌ها کیفیت لازم برای تعیین ماهیت ژنتیکی را داشتند ولی برای انجام مطالعات بسیار حساس مولکولی، اصلاحات دیگری برای ارتقای کمی و کیفی اسیدهای نوکلئیک استخراج شده لازم است. از آن‌جا که در مطالعات مولکولی اخیر آلودگی حلزون گابلا (*Galba truncutula*) به سرکر فاسیولاهپاتیکا در استان گیلان مسلم شده است (۱۲)، بنابراین انجام پژوهش‌های بعدی برای تعیین میزان آلودگی حلزون‌های لیمنه استان به فاسیولا هپاتیکا و نقش گونه‌های مختلف حلزون در انتقال انگل به منظور تدوین برنامه‌های کنترلی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه شواهدی از وجود فاسیولا ژیگانتیکا در زنجان بدست نیامد و کلیه نمونه‌های مورد بررسی فاسیولا هپاتیکا تشخیص داده شدند. در ضمن انجام پژوهش‌های بیشتر برای تعیین حلزون‌های ناقل فاسیولا هپاتیکا در منطقه به منظور تدوین برنامه‌های کنترل انگل پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان‌نامه‌ی دانشجویی دوره‌ی کارشناسی‌ارشد می‌باشد و مؤلفین این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان در اجرای پژوهش و سازمان کشتارگاه زنجان به خاطر فراهم نمودن امکانات در گردآوری نمونه‌ها اعلام می‌نمایند.

منابع

1- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol.* 2005; 35: 1255-78.

2- Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG. Human fascioliasis. In: Dalton JP editors, Fascioliasis. CAB International; Wallingford: 1999, 411-34.

3- Sahba GH, Arfaa F, Farahmandian I, Jalali H. Animal fascioliasis in Khuzestan, south western Iran. *J Parasitol*. 1972; 58: 712-6.

4- Massoud J. Fascioliasis outbreak of man and drug test (triclabendazole) in Caspian littoral, northern part of Iran 1989. *Bull Soc Fr Parasitol*. 1990; 8: 438.

5- Moghaddam AS, Massoud J, Mahmoodi M, et al. Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. *Parasitol Res*. 2004; 94: 61-69.

6- Ashrafi k, Valero MA, Panova M, Periago MV, Massoud J, Mas-Coma S. Phenotypic analysis of adults of Fasciola hepatica, F. gigantica and intermediate forms from the endemic region of Gilan Iran. *Parasitol Int*. 2006; 55: 249-60.

7- Marcilla A, Bargues MD, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between Fasciola hepatica and F. gigantica. *Mol Cell Probes*. 2002; 16: 327-33.

8- Agatsuma T, Arakawa Y, Iwagami M, et al. Molecular evidence of natural hybridization between *Fascoiola hepatica* and *F. gigontica*. *Parasitol Int*. 2000; 49: 231-8.

9- Esteban JG, Bargues MD, Mas-Coma S. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Res Rev Parasitol*. 1998; 58: 13-42.

10- Maley LE, Marshall CR. The coming of age of molecular systematics. *Science*. 1998; 279: 505- 6.

11- Hwang UW, Kim W. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J Parasitol*. 1999; 37: 215-28.

12- Ashrafi K, Massoud J, Holakouie Naieni K, et al. Nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequence characterization of *Fasciola hepatica* and *Galba truncatula*. *Iran J Publ Health*. 2007; 36: 42-9.

13- Curtale F, Hammoud ES, EL Wakeel S, Mas-Coma S, Savioli L. Human fascioliasis, an emerging public health problem in the Nile delta, Egypt. *Res Rev Parasitol*. 2000; 60: 129-34.

14- Semyenova SK, Morozova EV, Vasil.ev VA, et al. Polymorphism of internal transcribed spacer 2 (ITS-2) sequence and genetic relationships between Fasciola hepatica and F. gigantica. *Acta Parasitol*. 2005; 50: 240-43.

15- Huang WY, He B, Wang CR, Zhu XQ. Characterization of Fasciola species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Vet Parasitol*. 2004; 120: 75-83.

Identification of Fasciola Species by PCR-RFLP Assay

Rahimi P[1], Ghavami MB[1], Haniloo A[1], Nourian AA[1], Biglari AR[2]

[1]Dept. of Parasitology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[2]Dept. of Pathology and Mulecular Medicine, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Haniloo A, Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

E-mail: hani@zums.ac.ir

Received: 20 Nov 2008 **Accepted:** 21 Feb 2009

Background and Objective: Fascioliasis is an important zoonotic disease that causes several health problems and economical losses in different parts of Iran including Zanjan. *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* are recognized as causative agents of the disease. The differential diagnosis between these two species is very important for planning and control of infection. This study was designed to identify the Fasciola species by molecular methods in Zanjan (Iran).

Methods and Materials: A number of 535 adult Fasciola worms were collected from the natural infected livers of cattles and sheep in local slaughterhouse. Living flukes were washed extensively in PBS at 37 ^{O}C and then anterior half of adult worms were stored at -20 ^{O}C in 70% ethanol. Total genomic DNA was extracted from individual flukes by modified phenol-chloroform method. Nucleotide polymorphism of ITS2 fragment of rDNA was investigated using PCR-RFLP assay and sequencing technique.

Results: The results of PCR-RFLP and comparison of ITS2 sequences with the BLAST GenBank database clarified that all specimens were *F. hepatica*. The obtained sequences are available in the GenBank, with accession numbers EU391412 to EU391424.

Conclusion: The results of this study showed no evidence of *F. gigantica* infection in sheep and cattles in Zanjan as all of the isolates were found to be *F. hepatica.*

Key words: Fasciola, Liver flukes, rDNA, ITS2, PCR-RFLP