

Morphological and molecular characterization of *Dicrocoelium* isolated from sheep in the north and center of Iran

Arbabi M¹, Dalimi-Asl A^{1*}, Ghaffarifar F¹, Foorozandeh-Moghadam M²

1- Department of Medical Parasitology and Entomology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran.

2- Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran.

Received December 24, 2011; Accepted February 7, 2011

Abstract:

Background: Dicroceliosis is a hepatic parasitic disease of clinical and financial significance for both human health and animal breeding. Considering the health and economic importance of the disease, this study aimed to determine the morphological and molecular characterization of 28S rDNA for *Dicrocoelium* isolated from sheep in the north and center of Iran during 2010-11.

Materials and Methods: A total number of 200 trematodes were collected during an abattoir inspection from livers of naturally infected sheep in East Azerbaijan, Razavi Khorasan, Mazandaran and Tehran provinces in Iran. Adult worms were morphologically identified based on morphometric characterization and 60 specimens were characterized molecularly by sequencing. For molecular study, DNA was extracted and 28S rDNA region was amplified by PCR. Then, TruII fastdigest restriction enzyme and also RFLP technique were used to identify the parasite species. Finally, the PCR product was sequenced.

Results: A remarked morphological characteristic was that the orientation of testes in all isolates were in tandem position. The homological comparison of sequences showed that 28S rDNA in all isolates of *Dicrocoelium* had 963 bp and were similar to standard strain registered in Genbank. RFLP pattern from *D.dendriticum*, which had 4 cut sites, produced 116, 145, 293 and 409 bp fragments. Although the morphological characterization in various provinces was significantly different, molecular identification showed that all specimens were identical (*D.dendriticum*) and there was not a significant difference between sequences of the collected parasites.

Conclusion: Morphological and molecular assays show that *Dicrocoelium dendriticum* is the only species of *Dicrocoelium* among sheep in the north and center of Iran.

Keywords: *Dicrocoelium*, Morphology, Sequencing, Sheep, 28S gene, rDNA, RFLP

* Corresponding Author.

Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Tel: 0098 912 304 7931

Fax: 0098 21 828 84555

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences May, 2012; Vol. 16, No 2, Pages 135-145

Please cite this article as: Arbabi M, Dalimi A, Ghaffarifar F, Foorozandeh-Moghadam M. Morphological and molecular characterization of *Dicrocoelium* isolated from sheep in the north and center of Iran. *Feyz* 2012; 16(2): 135-45.

بررسی مرفولوژیکی و مولکولی (28S, rDNA) ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم در استان‌های شمالی و مرکز ایران

محسن اربابی^۱، عبدالحسین دلیمی اصل^{۲*}، فاطمه غفاری فر^۳، مهدی فروزنده مقدم^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: دیکروسلیازیس بیماری انگلی کبدی است که دارای اهمیت بالینی و اقتصادی برای انسان و صنعت پرورش دام است. با توجه به اهمیت بهداشتی و اقتصادی بیماری، در این مطالعه پارامترهای مرفومتريک و مولکولی ناحیه 28S rDNA ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم در استان‌های شمالی و مرکزی ایران طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ تعیین شده است.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۲۰۰ ترما توداز کبد گوسفندانی که به‌طور طبیعی در استان‌های آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، مازندران و تهران آلوده شده بودند، جمع‌آوری گردید. شاخص‌های مرفولوژیکی کرم‌های بالغ بر اساس پارامترهای مرفومتريک اندازه‌گیری شد. از این تعداد ۶۰ نمونه برای بررسی‌های مولکولی انتخاب شدند. در ابتدا DNA انگل استخراج شده، سپس واکنش PCR برای تکثیر بخشی از ناحیه 28S صورت گرفت. با تکنیک RFLP و با استفاده از آنزیم محدودالایتر TruII گونه‌ی انگل تشخیص داده شد. در انتها از محصول خالص شده PCR، تعیین توالی صورت گرفت.

نتایج: بر اساس شاخص قابل اعتماد مرفولوژیکی موقعیت بیضه‌ها، تمام ایزوله‌ها، دارای دو بیضه پشت سرهم بودند. الکتروفورز محصول PCR در تمامی ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم باند ۹۶۳ bp نشان داد که شبیه موارد ثبت شده در بانک ژن بود. الگوی RFLP نشان‌دهنده‌ی ۴ محل برش و تشکیل فراگمنت‌های ۱۱۶ bp، ۱۴۵ bp، ۲۹۳ bp و ۴۰۹ bp بود. گرچه اختلاف شاخص‌های مرفومتريک در استان‌های مختلف معنی‌دار بود، ولی بررسی ژنومیک نشان‌دهنده‌ی وجود مشابهت بین توالی‌ها در استان‌های مورد بررسی بود. **نتیجه‌گیری:** شاخص‌های مرفومتريک و مولکولی نشان دادند که دیکروسلیوم دندریتیوکوم، تنها گونه‌ی مناطق شمال و مرکز ایران می‌باشد.

واژگان کلیدی: دیکروسلیوم، مرفولوژی، تعیین توالی، گوسفند، 28S، rDNA، RFLP

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۱، صفحات ۱۴۵-۱۳۵

مقدمه

دیکروسلیازیس توسط چندین گونه دیکروسلیوم شایع در نقاط مختلف جهان به‌وجود می‌آید. این ترما تودهای کوچک، انگل مجاری صفرا و کیسه‌ی صفرا، نشخوارکنندگان اهلی و وحشی از جمله گوسفند، بز، گاو، گاو میش، شتر، آهو و گاهی خرگوش، خوک، اسب و انسان می‌باشند [۱]. جنس دیکروسلیوم دارای سه گونه می‌باشد.

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ استاد، گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ دانشیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۴ دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

*نشانی نویسنده مسئول:

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی

تلفن: ۰۹۱۲ ۳۰۴۷۹۳۱

دورنویس: ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۵۵

پست الکترونیک: dalimi_a@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۳

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۱۱/۱۸

Dicrocoelium dendriticum در سراسر اروپا، آسیا، شمال آفریقا و آمریکا، *D. hospes* در آفریقا و *D. Chinensis* در آسیا انتشار دارد [۳،۴]. دیکروسلیوم دندریتیوکوم مهم‌ترین گونه‌ی این انگل است که باعث عفونت کبدی و خسارات اقتصادی در علفخواران می‌شود. اهمیت اقتصادی و پزشکی دیکروسلیازیس به‌خاطر خسارات مستقیم به کبد و فساد آن و در نتیجه از دست رفتن مقادیر قابل توجه مواد پروتئینی با ارزش از رژیم غذایی انسان [۴] و به‌طور غیر مستقیم به‌خاطر زیان‌های ناشی از درمان‌های ضدکرمی و اختلالات گوارشی به‌دلیل تغییرات کبدی و صفراوی است که با کاهش وزن، کندی رشد، کم‌خونی، ادم، کاهش تولید شیر و گاهی عواقب مرگ‌بار همراه می‌باشد [۶،۵،۳،۱]. طیف گسترده‌ای از حلزون‌های خاک‌زی و مورچه به‌ترتیب میزبانان واسط اول و دوم این کرم می‌باشند که این موضوع باعث پیچیدگی چرخه‌ی زندگی انگل می‌شود. علاوه بر این، پستانداران وحشی و اهلی مختلفی میزبانان نهایی این ترما تود می‌باشند [۲]. در دهه‌ی گذشته، مطالعات مختلفی در مورد شیوع دیکروسلیازیس گاو و گوسفند در نقاط مختلف ایران صورت

دیگروسلیازیس در کشور مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و مطالعه‌ی مرفومتريک

این تحقیق با طراحی مقطعی روی ۲۰۰ کبد گوسفند ذبح شده در کشتارگاه‌های صنعتی استان‌های آذربایجان شرقی، مازندران، خراسان رضوی و تهران از پائیز سال ۱۳۸۹ تا بهار ۱۳۹۰ صورت گرفت. پس از هماهنگی‌های لازم با ادارات دامپزشکی و مسئولین فنی کشتارگاه‌های استان‌های مذکور، به صورت تصادفی طی ساعات اولیه صبح در ابتدای خط کشتار حاضر شده و پس از کالبد گشایی کامل حیوان، بر اساس روش Ogambo-Ongoma [۲۰] نسبت به معاینه‌ی دقیق کبد از طریق ایجاد برش در بافت و مجاری صفراوی بزرگ و کوچک و کیسه‌ی صفرا اقدام گردید. کبدهای آلوده پس از انتقال به آزمایشگاه، به مدت ۲ ساعت در سرم فیزیولوژی قرار داده شده، سپس با استفاده از قیچی جراحی و بیستوری به‌طور کامل تمامی مجاری باز گردید. کرم‌های بالغ و کامل پس از جداسازی، چندبار با بافر PBS شستشو داده شده و تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای مرفومتريک در اتانل ۸۰ درصد فیکس گردید. با استفاده از میکروسکوپ نوری شاخص‌های مرفومتريک شامل: اندازه‌ی بدن (طول و عرض)، نسبت طول به عرض، قطر بادکش شکمی (داخلی و خارجی)، قطر بادکش دهانی (داخلی و خارجی)، نسبت اندازه‌ی بادکش شکمی به بادکش دهانی، طول و عرض بیضه‌ها، طول غدد و تیلوژن، نسبت طول بدن به غدد و تیلوژن، فاصله‌ی بین بادکش شکمی تا انتهای بدن، طول کیسه سیر، طول و عرض تخمدان و فاصله‌ی بین بادکش دهانی و شکمی برحسب میکرون اندازه‌گیری و ثبت شد [۲۲،۲۱]. نمونه‌ها تا زمان انجام بررسی‌های مولکولی، در 80°C نگهداری شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ صورت گرفت. به منظور مقایسه‌ی آماری و بررسی وجود اختلاف در شاخص‌های مختلف مرفومتريک دیگروسلیوم دندریتیوکوم در بین استان‌های مورد مطالعه با یکدیگر، از آنالیز Multiple Comparisons Post Hoc تحلیل واریانس یک طرفه استفاده گردید.

استخراج DNA ژنومی از کرم بالغ

تعداد ۶۰ ایزوله‌ی بالغ گوسفندی دیگروسلیوم از ۴ استان مورد بررسی، برای استخراج DNA انتخاب شدند. استخراج DNA، پس از خارج نمودن نمونه‌ها از 80°C ، توسط کیت بافتی BioneerAccuPrep ساخت کره‌ی جنوبی و پس از ۳ بار شستشو با PBS استریل سرد و مطابق با دستورالعمل کارخانه‌ی

گرفته و نتایج حاصل وضعیت متفاوتی از نسبت آلودگی به این کرم را نشان می‌دهد. اگرچه در حال حاضر دیگروسلیازیس در بین گوسفندان و گاوهای نواحی شمال و شمال غرب کشور شایع است [۸،۷]، اما در سایر مناطق انتشار کمتری دارد [۱۰،۹]. همانند دیگر کشورهای حوزه‌ی مدیترانه، وقوع آلودگی در ایران در ارتباط با خاک‌های خشک، آهکی و قلیائی می‌باشد که شرایط مطلوبی برای زیست میزبانان واسط انگل فراهم می‌نماید [۲]. با وجود عفونت گسترده‌ی کبد، دیگروسلیازیس کمتر به صورت کلینیکی ظاهر می‌شود [۱۱]. عفونت واقعی در انسان به ندرت مشاهده شده و اغلب در اثر خوردن میزبان واسط دوم همراه با میوه‌جات و سبزیجات خام و حتی آب آشامیدنی صورت می‌گیرد. در بسیاری از موارد عفونت‌های انسانی، غیر واقعی بوده و به علت مصرف جگرهای آلوده به انگل و ظهور بعدی تخم کرم در مدفوع می‌باشد. یک مطالعه در عربستان نشان داده است، از ۱۲۱ و ۲۰۸ بیماری که در مدفوع آن‌ها تخم کرم مشاهده شده، به ترتیب ۳۲ و ۷ نفر مبتلا به عفونت واقعی دیگروسلیوم دندریتیوکوم بوده‌اند [۱۲]. نگرشی به چرخه‌ی زندگی انگل بیان‌گر این واقعیت است که عفونت واقعی در انسان شایع نبوده و اغلب خفیف و بدون نشانه‌ی بالینی می‌باشد و بیشتر به صورت اسهال مزمن، بیوست، تهوع، دردهای شکمی، هپاتومگالی، انسداد مجاری صفراوی، هیپرانوزینوفیلی خون محیطی، خارش، انسداد مجاری صفراوی و کلانزایتیس بروز می‌نماید. عفونت‌های شدید در حیوانات با بزرگی و هیپرپلازی اپیتلیوم و فیروز اطراف مجرای صفراوی و در نهایت سیروز کبدی همراه می‌باشد [۱۵-۱۱]. تاکنون مطالعات محدودی در خصوص دامنه‌ی تغییرات و اختلافات مرفولوژیکی بین تیپ‌های دیگروسلیوم صورت گرفته که نشان می‌دهد دیگروسلیوم هاسپس احتمالاً یکی از جمعیت‌های دیگروسلیوم دندریتیوکوم می‌باشد. تغییرات ژنتیکی گونه‌های بالغ دیگروسلیوم دندریتیوکوم نیز با استفاده از تکنیک (RAPD) DNA مورد بررسی قرار گرفته است [۱۸-۱۶]. یافته‌های یک مطالعه اخیر نشان دهنده اختلافات قابل توجه در فراساختار اسپرماتوزون گونه‌ی دندریتیوکوم و هاسپس می‌باشد. اطلاعات بیشتر نشان داده است که این دو گونه دارای ویژگی‌های اختصاصی مربوط به خود می‌باشند [۱۹]. علی‌رغم اهمیت دیگروسلیازیس، اطلاعات اندکی در مورد خصوصیات مرفومتريک و ژنومیک عامل بیماری در دسترس می‌باشد. هدف از این پژوهش تعیین خصوصیات مرفولوژیکی و شناسایی مولکولی (28S, rDNA) به‌عنوان مارکر ژنتیکی قابل اعتماد برای تعیین گونه‌ی دیگروسلیوم در کشور می‌باشد. نتایج این تجربه می‌تواند در تشخیص، درمان، کنترل و پیشگیری از

ثبت شده (accession no :AY222261.1, AY251233.1) مقایسه گردید.

ترسیم درخت فیلوژنی

هم‌ترازی چندگانه‌ی توالی‌های مرتب شده ایزوله‌های ۴ استان مورد بررسی به‌همراه ۳ توالی ثبت شده از راسته‌ی بلاژورکید در بانک ژن با نرم‌افزار MEGA4 مورد بررسی قرار گرفت. سپس، درخت فیلوژنی با استفاده از الگوریتم neighbour-joining با ۲۰۰۰ بار تکرار، جابه‌جایی و آنالیز شاخه‌ها با بهترین حالت و صحت ترسیم گردید.

انجام واکنش PCR-RFLP

از آنزیم محدودالانتر (Fermentas) FastDigest TruII برای تعیین الگوی PCR-RFLP استفاده شد. این آنزیم به‌طور اختصاصی دیکروسلیوم دندریتکوم را از گونه‌ی مشابه آن "دیکروسلیوم هاسپس" تفکیک نموده، ولی فاقد محل برش برای دیکروسلیوم چایننسیس می‌باشد. برای انجام واکنش PCR-RFLP، مخلوطی به حجم نهایی ۱۵ μl شامل: ۲ μl محصول 28S PCR دیکروسلیوم، ۱ μl بافر آنزیم، ۰/۵ μl آنزیم TruII و ۱۱/۵ μl آب مقطر تزریقی تهیه شده و به‌مدت ۴۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ °C انکوبه شد. سپس ۴ μl از محصول PCR-RFLP داخل چاهک‌های ژل آگارز ۳ درصد در کنار مارکروزی (Fermentas) DNA 100 bp بارگذاری و در ولتاژ ۷۰ به‌مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز گردید. در انتها با استفاده از ترانس لومیناتور، باندهای تشکیل شده در مقایسه با مارکروزی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

الف- بررسی مرفومتربیک: در این بررسی از هر استان ۵۰ نمونه و در مجموع ۲۰۰ ایزوله‌ی گوسفندی دیکروسلیوم برای شناسایی ۱۷ پارامتر مرفومتربیک مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه‌ی پارامترهای مرفومتربیک در ۴ استان مورد بررسی نشان داد که اندازه‌ی شاخص‌ها با یکدیگر کاملاً متفاوت می‌باشد (جدول شماره ۱). بررسی موقعیت بیضه‌ها که شاخص قابل اعتمادی برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم می‌باشد، به‌روشنی نشان داد، در تمامی ایزوله‌ها، بیضه‌ها پشت سرهم (tandem) قرار دارد که این امر تأییدکننده گونه‌ی دندریتیکوم در میزبان و مناطق مورد مطالعه می‌باشد.

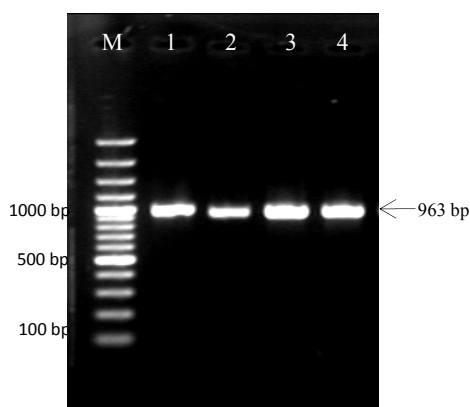
سازنده صورت گرفت. برای دست‌یابی به بیشترین و بهترین کیفیت DNA از ۲۵ μl آنزیم پروتئیناز K (داخل کیت) و زمان انکوباسیون ۲ ساعت در حمام آب گرم استفاده شد. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری و جذب نوری در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر صورت گرفت. DNA استخراج شده در ۱۸۰ میکرولیتر محلول الوشن رقیق شده و تا زمان انجام واکنش PCR در ۲۰ °C - نگهداری گردید.

انجام واکنش PCR و تعیین توالی ژن 28SrDNA

قطعه‌ای از 28S rDNA به اندازه‌ی تقریبی 1000bp (Gen-Bank accession no: AF151939.1) و با استفاده از پرایمرهای Dd28SF (5'-GTGGCCAGTTGGTCATTAGG-3') و Dd28SR (5'-ACCTCAGTCTGGACAAGCCA-3') تکثیر شد. پرایمرها پس از BLAST کردن ژن با استفاده از نرم افزار 3 Primer طراحی گردید. مخلوط PCR به حجم ۲۰ μl شامل: ۱۵ μl آب مقطر تزریقی، ۱ μl DNA، ۱۰ mM Tris، ۱.۵ mM 30 mM KCl، ۰.۲۵ μM dNTP، HCl (PH:9) از 10 Pmol و 1 U Taq DNA Polymerase، MgCl₂ پرایمرهای Forward و Reverse تهیه گردید. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر My Cycler با قابلیت انجام گرادیان ساخت شرکت BIO-RAD آمریکا با پروتکل زیر صورت گرفت: مرحله‌ی واسرشت ابتدایی ۹۵ °C به‌مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی واسرشت ۹۵ °C به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی اتصال پرایمرها ۵۵ °C به‌مدت ۴۵ ثانیه، مرحله‌ی تولید شدن زنجیره ۷۲ °C به‌مدت ۴۵ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ۳۰ سیکل و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C انجام گرفت. ۴ μl محصول PCR داخل چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار مارکروزی 100 bp (Fermentas) DNA بارگذاری شده و در ولتاژ ۸۰ به‌مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. با استفاده از ترانس لومیناتور باندهای تشکیل شده مشاهده شده و با مارکروزی مقایسه شد. به‌منظور دست‌یابی به توالی‌های ژن 28S دیکروسلیوم، محصول PCR با استفاده از کیت BioneerAccuPrep® ساخت کره‌ی جنوبی و طبق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده مورد تخلیص ژل قرار گرفت و با سکانسر automa DNA ۳۱۰ و هر دو پرایمر به‌کار رفته در واکنش PCR توالی‌ها تعیین گردید. پس از مرتب‌سازی توالی‌ها، ژن 28S ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم در بانک ژن ثبت شد. تمامی توالی‌ها با سیستم "BLAST local alignment tool" شده و با سوبه‌ی استاندارد بین‌المللی

جدول شماره ۱- مقایسه‌ی شاخص‌های مرفومتريک ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم در استان‌های شمالی و مرکز کشور

مقایسه استان‌ها (P)	تهران X±SE	خراسان رضوی X±SE	مازندران X±SE	آذربایجان شرقی X±SE	شاخص مرفومتريک (μm)
۰/۰۰۱	۷۱۱۵/۵±۲۱۷/۲	۶۱۲۱/۰±۱۱۲/۳	۷۱۲۰/۰±۱۱۵/۵	۶۹۱۲/۰±۱۰۳/۹	طول بدن
۰/۰۰۱	۱۶۶۴/۵±۳۸/۳	۱۵۱۳/۵±۴۴/۶	۱۷۵۳/۰±۵۱/۰	۱۷۰۲/۷±۳۹/۷	عرض بدن
۰/۰۰۱	۴/۲۸۳۰±۰/۱	۴/۲۱۲±۰/۱	۴/۲۱۴±۰/۱	۴/۱۶۰۴±۰/۱	نسبت طول به عرض
۰/۰۰۱	۲۰۳/۰±۶/۶	۱۹۷/۵±۵/۵	۲۴۳/۰±۶/۳	۲۴۵/۵±۶/۲	قطر داخلی بادکش دهانی
۰/۰۰۱	۳۳۰/۰±۷/۰۵	۳۰۱/۵±۶/۲	۳۴۲/۰±۵/۷	۳۶۲/۰±۴/۸	قطر خارجی بادکش دهانی
۰/۰۰۱	۲۸۲/۵±۱۱/۱	۲۵۴/۵±۶/۴	۲۹۷/۵±۸/۲	۳۰۴/۰±۶/۴	قطر داخلی بادکش شکمی
۰/۰۰۱	۴۰۲/۵±۸/۰	۳۷۹/۰±۵/۷	۴۱۷/۰±۸/۱	۴۲۹/۰±۵/۹	قطر خارجی بادکش شکمی
۰/۰۰۱	۱/۲۲۹۰±۰/۰۲	۱/۲۷۲۸±۰/۰۲	۱/۲۲۴±۰/۰۲	۱/۱۹۰۶±۰/۰۱	نسبت بادکش شکمی به دهانی
۰/۰۰۱	۷۷۰/۵±۲۹/۶	۷۰۴/۰±۱۵/۵	۷۰۴/۰±۱۷/۲	۷۸۰/۵±۱۷/۲	طول بیضه
۰/۰۰۱	۶۴۷/۵±۲۸/۸	۵۸۷/۰±۱۳/۶	۵۸۱/۲±۱۶/۸	۶۷۱/۵±۱۶/۹	عرض بیضه
۰/۰۰۱	۱۶۹۸/۰±۵۳/۱	۱۵۷۰/۰±۵۴/۷	۱۷۱۵/۰±۴۶/۹	۱۹۳۴/۵±۵۵/۵	طول غدد زرده
۰/۰۰۵	۴/۲۸۳۰±۰/۱	۴/۰۲۵۲±۰/۰۱	۴/۲۵۴۶±۰/۱	۳/۶۸۵۶±۰/۱	نسبت طول بدن به غدد زرده
۰/۰۰۱	۵۴۷۵/۰±۱۸۹/۷	۴۷۱۱/۰±۹۷/۸	۵۴۱۹/۵±۹۲/۱	۵۸۲۵/۰±۱۱۵/۶	فاصله بین بادکش شکمی تا انتها
۰/۰۰۱	۵۰۶/۵±۱۲/۹۳۲	۴۵۷/۵±۹/۲۳۸	۵۲۸/۰±۱۰/۳۴۲	۵۳۷/۰±۹/۰۹۸	طول سیروساک
۰/۰۰۱	۳۶۶/۵±۱۳/۴۱۳	۳۳۶/۰±۷/۰۷۷	۴۱۰/۵±۵/۱۵۵	۴۳۰/۰±۷/۴۹۱	طول تخمدان
۰/۰۰۱	۲۷۷/۵±۹/۸۵۲	۲۳۳/۷۰±۶/۹۸۲	۳۱۰/۵±۶/۷۴۲	۳۳۴/۰±۷/۸۹۴	عرض تخمدان
۰/۰۰۱	۸۴۸/۰±۲۱/۸۳۹	۷۶۴/۰±۱۱/۵۴۳	۸۴۰/۵±۱۰/۲۷۴	۸۷۶/۵±۱۰/۶۲۸	فاصله بین بادکش دهانی و شکمی



شکل شماره ۱- محصول PCR ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم. ستون M مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۱ ایزوله‌ی تهران، ستون ۲ ایزوله‌ی مازندران، ستون ۳ ایزوله‌ی خراسان رضوی و ستون ۴ ایزوله‌ی آذربایجان شرقی.

در جدول شماره ۲ شاخص‌های مرفومتريک دیکروسلیوم دندریتیوم گوسفندی در بین استان‌های مورد مطالعه با استفاده از آنالیز Post Hoc تحلیل واریانس یک طرفه بایکدیگر مقایسه شده است.

ب- بررسی مولکولی: در ابتدا پس از استخراج کامل DNA موجود در پیکره‌ی کرم بالغ از آن به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده و سپس محصول تهیه شده پس از بارگذاری در ژل ۱/۵ درصد و انجام الکتروفورز مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. الکتروفورز محصول PCR در تمامی ایزوله‌ها، باند ۹۶۳ bp را نشان داد (شکل شماره ۱).

جدول شماره ۲- مقایسه‌ی شاخص‌های مرفومتريک ديکروسليوم دندريتيکوم گوسفندی در بين استان‌های مورد مطالعه

شاخص مرفومتريک (µm)	استان	آذربايجان شرقی	تهران	خراسان رضوی
طول بدن	مازندران	۰/۲۶۹	۰/۰۳۶	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۳۲۲	-	-
عرض بدن	مازندران	۰/۸۶۴	۰/۳۷۴	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۴۷۳	-	-
نسبت طول به عرض	مازندران	۰/۱۶۸	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۵۶	۰/۴۴۱	-
	تهران	۰/۲۵۲	-	-
قطر داخلی بادکش دهانی	مازندران	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۳۱۶	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
قطر خارجی بادکش دهانی	مازندران	۰/۱۸۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
قطر داخلی بادکش شکمی	مازندران	۰/۳۴۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
قطر خارجی بادکش شکمی	مازندران	۰/۱۲۴	۰/۳۷۹	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۱۶	-	-
نسبت بادکش شکمی به دهانی	مازندران	۰/۹۰۳	۰/۰۲۱	۰/۳۹۷
	خراسان رضوی	۰/۴۶۹	۰/۱۴۵	-
	تهران	۰/۰۲۹	-	-
طول بیضه	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۳۱۹
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
عرض بیضه	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۸۶۶
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
طول غدد زرده	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۲۸۰	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۲۲	-	-
نسبت طول بدن به غدد زرده	مازندران	۰/۰۴۷	۰/۴۷۰	۰/۹۹۰
	خراسان رضوی	۰/۰۴۵	۰/۴۷۸	-
	تهران	۰/۰۰۷	-	-
فاصله بين بادکش شکمی تا انتها	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۳۶	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۴۰	-	-
طول سيروساک	مازندران	۰/۱۱۲	۰/۰۰۹	۰/۰۳۵
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۳۰۹	-	-
طول تخمدان	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۳۸۲	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
عرض تخمدان	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۲۵۷	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
فاصله بين بادکش دهانی و شکمی	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۸۸۴	۰/۱۳۷
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۱۰۳	-
	تهران	۰/۰۰۲	-	-

چنین، با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن (BLAST) نشان دهنده‌ی یکسان بودن آن‌ها و ۹۹ درصد تشابه بود. هم‌چنین، نتیجه‌ی ی سکانس‌ها به‌وضوح نشان داد که دیکروسلیوم دندریتکوم تنها گونه‌ی آلوده کننده جنس دیکروسلیوم در بین گوسفندان استان‌های شمالی و مرکز کشور می‌باشد.

در ادامه‌ی بررسی‌های مولکولی و به‌منظور تأیید گونه‌ی انگل، از محصول استخراج شده ژل تعیین توالی صورت گرفت که هم-ترازی چندگانه‌ی آن‌ها در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. توالی‌ها پس از مرتب سازی در بانک جهانی ژن با شماره‌های (JQ081972، JQ081971، JQ081962، JQ081959) Accession no: به ثبت رسید. مقایسه‌ی توالی‌ها بایکدیگر و هم-

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Mazandaran	GTGGCCAGTTGGTCATTAGGCAATGTGGTGTTTAGGTCGTTCCGCAGAAGCGCTGCTCCA	60
Tehran	-----	60
East Azerbaijan	-----	60
RazaviKhorasan	-----	60

Mazandaran	CCCCAAGTCCATCAATGAGTACGGTAGTACAGACATGGCCCATGGAGGGTGAAGGCCCG	120
Tehran	-----	120
East Azerbaijan	-----	120
RazaviKhorasan	-----	120

Mazandaran	TTCGGGTGGAGATTTCGGCAGGCCAGTGCTTCTCTGGGTAGACCTTGGAGTCGGGTTGTTT	180
Tehran	-----	180
East Azerbaijan	-----	180
RazaviKhorasan	-----	180

Mazandaran	GTGAATGCAGCCCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCCAAGGCTAAATACAAGCACGAGTCC	240
Tehran	-----	240
East Azerbaijan	-----	240
RazaviKhorasan	-----	240

Mazandaran	GATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTAACAGT	300
Tehran	-----	300
EastAzerbaijan	-----	300
RazaviKhorasan	-----	300

Mazandaran	CGGTGAAACCGCTCAGAGGTAAGCAGGTGGAGTTGAAC TGCAAGCTTTGAGAATTCAGCT	360
Tehran	-----	360
EastAzerbaijan	-----	360
RazaviKhorasan	-----	360

Mazandaran	GGTGAGGTTGGTTTGGGCTTGGTCAAATTGGTTGGGCCCGAAGTACGTTAAACCACGTG	420
Tehran	-----	420
East Azerbaijan	-----	420
Razavi	-----	420

Mazandaran	TCCTTTCCCTTTGGGTTGGGATGTGCGATACTTACCAAGTGTTCACGCTTTGGGTGT	480
Tehran	-----	480
East Azerbaijan	-----	480
RazaviKhorasan	-----	480

Mazandaran	TCATCGAGCCTCCTTGTCAGTGCACCTTCTCAGAGTGGTCACCACGACCGACCCGCTGT	540
Tehran	-----	540
East Azerbaijan	-----	540
RazaviKhorasan	-----	540

Mazandaran	CAGGCTGTCATAGTTAAACCGGTCTTGTAGTGTCTTGTGGCATTGCCGTGGTCGGGATGG	600
Tehran	-----	600
East Azerbaijan	-----	600
RazaviKhorasan	-----	600

Mazandaran	CAGGTAGCTTGTGGCTCGCTTCGGCTTGTTCGAGTGTAAATCAGCTGACTGTGACGGT	660
Tehran	-----	660
East Azerbaijan	-----	660
RazaviKhorasan	-----	660

Mazandaran	TCTGTGCAGTGCCTCGGAGACGGCGCCAGTGGTGTGTGCATGCGTGCCCGATTTGTTGG	720
Tehran	-----	720
East Azerbaijan	-----	720
RazaviKhorasan	-----	720

Mazandaran	CGTACCCTGGTTTGGTTTCTGTGTTGCCTGTGATAGCAGGCCTAGTTATGGCTGGGGTTC	780
Tehran	-----	780
East Azerbaijan	-----	780
RazaviKhorasan	-----	780

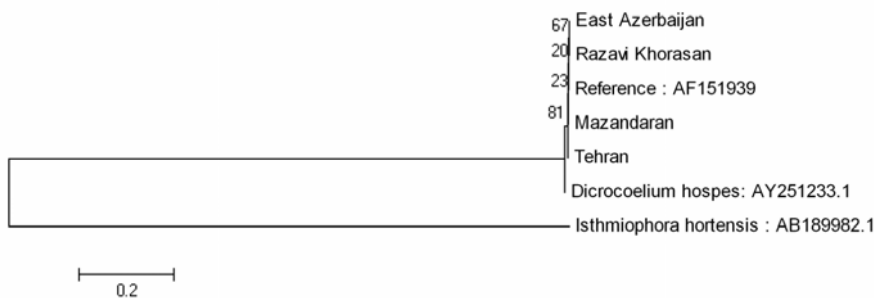
Mazandaran	GTTCGGCGAATGGTTGCGTGTGTGGCACTTCCAAGGGCCAATAGTCTGTGGTGTAGTGGT	840
Tehran	-----	840
East Azerbaijan	-----	840
RazaviKhorasan	-----	840

Mazandaran	AGACTATCCACCTGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGAGTAACATGTACGCGAGTC	900
Tehran	-----	900
East Azerbaijan	-----	900
RazaviKhorasan	-----	900

Mazandaran	-----G-----	960
Tehran	-----G-----	960
East Azerbaijan	-----C-----	960
RazaviKhorasan	-----C-----	960

Mazandaran	GGT	963
Tehran	---	963
East Azerbaijan	---	963
RazaviKhorasan	---	963

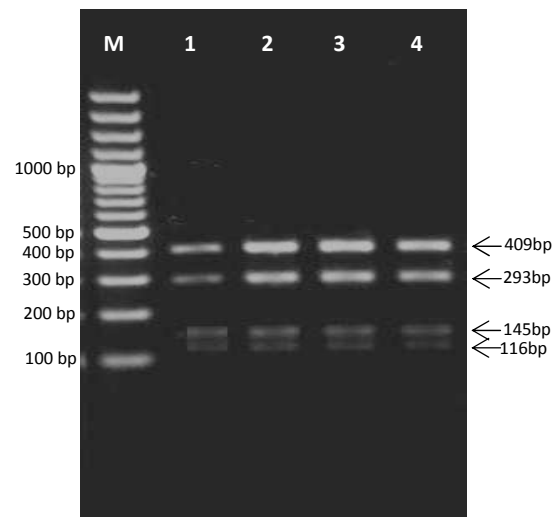
شکل شماره ۲- توالی‌های ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم دندریتکوم در استان‌های شمالی و مرکز کشور



شکل شماره ۳- درخت فیلوژنتیک ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم دندریتکوم بر اساس ناحیه 28SrDNA و استفاده از الگوریتم neighbour-joining با ۲۰۰۰ بار تکرار

از این شاخص، دیکروسلیوم چاینسیس را تنها گونه‌ی آلوده کننده‌ی آهوی Sika در ژاپن تشخیص دادند [۲۴]. شاخص مهم دیگر اندازه‌ی (طول و عرض) کرم بالغ می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر نشان داد در بین ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم، طول کرم از ۱/۱۲ تا ۱/۱۶ mm و عرض آن از ۱/۱۶ تا ۱/۲۲ mm و عرض آن از ۱/۵۱ تا ۱/۷۵ mm متغیر می‌باشد، که در مقایسه با تحقیق Otranto و همکاران که طول انگل را ۱/۷۰-۵/۶۰ mm با تحقیق Otranto و همکاران که طول انگل را ۱/۳۰-۱/۸۰ mm (۱/۴۷±۰/۲۹) و عرض آن را (۵/۰۵±۰/۳۳) گزارش کرده‌اند [۲۳] بلندتر می‌باشد. هم‌چنین، براساس یافته‌های پژوهش حاضر اختلاف معنی‌داری بین اندازه‌ی شاخص‌های مرفومتريک در ۴ استان مورد مطالعه مشاهده می‌شود. این در حالی است که Otranto و همکاران اختلافات اندکی بین شاخص‌های مرفومتريک دیکروسلیوم دندریتیوم را در بین میزبانان انگل در ایتالیا، آلمان و اتریش نشان داده‌اند [۲۳]. احتمالاً این اختلاف ناشی از سن و وضعیت تغذیه‌ای میزبان، وضعیت بلوغ کرم، شدت آلودگی، شرایط اقلیمی و اکولوژیکی مناطق مورد مطالعه یا مربوط به فاکتورهای دیگری باشد که در مورد ترماتودهای راسته پلاژوریکید ذکر شده است [۲۵]. متأسفانه اطلاعات بسیار اندکی در مورد خصوصیات مرفومتريک گونه‌های دیکروسلیوم در اختیار می‌باشد و از این رو به‌سختی می‌توان ارزیابی دقیقی از اختلافات مشاهده شده ارایه نمود. در حال، یافته‌ها پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران و خاورمیانه ارایه می‌گردد. نتایج این تحقیق نشان داد، علی‌رغم مشاهده‌ی اختلافات قابل ملاحظه درون گونه-ای مرفومتريک در استان‌های مورد بررسی، تفاوت اندکی در توالی‌های 28S وجود دارد. روش تعیین توالی DNA یکی از ابزارهای مولکولی موثر برای شناسایی و هویت انگل‌های کرمی - محسوب می‌شود [۲۶]. در میان تمامی اهداف استفاده از توالی‌ها برای مطالعات فیلوژنتیک و آنالیزهای پلی‌مورفیسم، به‌کارگیری rDNA ابزار قدرتمندی برای توصیف تغییرات درون گونه‌ای و بین گونه‌ای انگل‌ها می‌باشد، زیرا در برگزیده‌ی نواحی بسیار ثابت تا بسیار متغیر می‌باشد. ناحیه‌ی 28S نیز از جمله نواحی ثابت بوده و می‌تواند تغییرات را نشان دهد [۲۷]. در پژوهش حاضر از این ژن برای توصیف تغییرات درون گونه‌ای دیکروسلیوم در استان‌های مورد مطالعه استفاده شد. بر اساس این مارکر بین توالی‌های ایزوله‌های گوسفندی با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن، ۹۹ درصد (AF151939.1, AY222261.1, AY251233.1) شباهت وجود دارد. بررسی‌های Maurelli و همکاران نیز نشان داد که هیچ اختلافی بین 28S rDNA تمامی دیکروسلیوم دندریتیوم جدا شده از گوسفند در جنوب ایتالیا با توالی‌های ثبت شده در

در انتها علاوه بر روش تعیین توالی، برای تشخیص گونه‌ی دیکروسلیوم در ایران، از تکنیک RFLP نیز استفاده شد. آنزیم FastDigest TruII در موقعیت '3'...T↓T A A...3' و '5'...A و '5'...T↓T...A ایجاد برش کرده و روی DNA دیکروسلیوم دندریتیوم ایجاد ۴ باند به اندازه‌های ۱۱۶ bp، ۱۴۵ bp، ۲۹۳ bp و ۴۰۹ bp می‌نماید (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴- الگوی PCR-RFLP ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم دندریتیوم با استفاده از آنزیم FastDigest TruII. ستون M مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۱ ایزوله‌ی تهران، ستون ۲ ایزوله‌ی مازندران، ستون ۳ ایزوله‌ی خراسان رضوی و ستون ۴ ایزوله‌ی آذربایجان شرقی

بحث

در این بررسی با سه روش مرفومتريک، تعیین توالی و RFLP نشان داده شد از بین ۳ گونه‌ی جنس دیکروسلیوم، تنها دیکروسلیوم دندریتیوم باعث آلودگی گوسفندان ایرانی می‌شود. یکی از شاخص‌های مرفومتريک قابل اعتماد برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم، موقعیت بیضه‌ها می‌باشد. در دیکروسلیوم دندریتیوم دو بیضه به‌صورت پشت سرهم (tandem) ولی در دیکروسلیوم چاینسیس به‌صورت دو طرفه (bilatera) قرار دارد [۲۲، ۲۱]. یافته‌های این تحقیق نشان داد، بیضه‌ها در تمامی ایزوله‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی، موقعیت پشت سر هم داشت که بدین ترتیب دیکروسلیوم دندریتیوم را تنها عامل دیکروسلیازیس گوسفندان نواحی شمالی کشور نشان می‌دهد. در مطالعه‌ی Otranto و همکاران این دو گونه بر اساس موقعیت بیضه‌ها از یکدیگر در گوسفندان اتریشی، آلمانی و ایتالیایی تشخیص داده شدند [۲۳]. Taira و همکاران نیز با استفاده

تشکر و قدردانی

این پژوهش به‌عنوان بخشی از رساله دکترای تخصصی انگل شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به‌شماره ۵۲/۷۵۷۹۵ و با حمایت مالی دانشگاه مذکور صورت گرفته است. پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی نمایند. از جناب آقای دکتر مجید پیرستانی به‌خاطر همکاری صمیمانه در انجام بررسی‌های مولکولی و جناب آقای دکتر جاوید صدرائی قدردانی می‌گردد. هم‌چنین، از مدیریت دامپزشکی و دامپزشکان محترم استان‌های مورد مطالعه که در انجام نمونه‌گیری نهایت همکاری را داشته و مدیران و کارکنان موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی شعب استان‌های مورد بررسی به‌خاطر همکاری در اجرای تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

بانک جهانی ژن وجود ندارد [۱۸]. علی‌رغم این که Otranto و همکاران با استفاده از ناحیه‌ی حفاظت شده‌ی 28S، اختلافات درون گونه‌ای دیکروسلیوم دندریتیوم را ۱/۳ درصد نشان داده، ولی هیچ ارتباطی بین میزبان یا منطقه‌ی جغرافیایی گزارش نکرده است [۲۳]؛ این در حالی است که پژوهش‌های قبلی اختلاف قابل ملاحظه‌ای بر اساس خصوصیات ژنومی نشان داده‌اند [۲۹،۲۸].

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر که برای اولین بار در کشور به بررسی شاخص‌های مرفومتربیک و خصوصیات مولکولی (28S, rDNA) شامل تعیین توالی و الگوی RFLP پرداخته، به‌روشنی نشان داد تنها گونه‌ی دیکروسلیوم که باعث بروز دیکروسلیازیس در گوسفندان شمال و مرکز ایران می‌شود، دیکروسلیوم دندریتیوم است. از این‌رو با توجه به زیان‌های اقتصادی بیماری کنترل و پیشگیری از آن کاملاً ضروری می‌باشد.

References:

- [1] Otranto D, Traversa D. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends Parasitol* 2003; 19(1): 12–5.
- [2] Manga-González MY, González-Lanza C, Cabanas E, Campo R. Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitology* 2001; 123 Suppl: S91-114.
- [3] Otranto D, Traversa D. A review of Dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Vet Parasitol* 2002; 107(4): 317–55.
- [4] Manga-González MY, Quiroz-Romero H, Gonzalez-Lanza C, Minambres B, Ochoa P. Strategic control of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg excretion by naturally infected sheep. *Vet Med* 2010; 55(1): 19–29.
- [5] Manga-González MY, Ferreras MC, Campo R, Gonzal-ez-Lanza C, Perez V, Garcia-Marin JF. Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitol Res* 2004; 93(5): 344–55.
- [6] Ferreras MC, Camp R, Gonzalez-Lanza C, Perez V, Garcia-Marin JF, Manga-Gonzalez MY. Immunohistochemical study of the local immune response in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol Res* 2007; 101(3): 547–555.
- [7] Movassaghi-Ghazvini MH, Valilou MR, Ahmadzadeh AR, Karimi AR, Zirak K. The Prevalence of Sheep Liver Trematodes in the Northwest Region of Iran. *Turk J Vet Anim Sci* 2008; 32(4): 305-7.
- [8] Daryani A, Alaei R, Arab R, Sharif M, Dehghan MH, Ziaei H. Prevalence of liver fluke infections in slaughter animals in Ardabil province, northwestern Iran. *J Anim Vet Adv* 2006; 5(5): 408-11.
- [9] Ansari-Lari M, Moazzeni M. A retrospective survey of liver fluke disease in livestock based on abattoir data in Shiraz, south of Iran. *Prev Vet Med* 2006; 73(1): 93–6.
- [10] Ahmadi NA, Meshkekar M. Prevalence and long term trend of liver fluke infections in sheep, goats and cattle slaughtered in Khuzestan, southwestern Iran. *JPS* 2010; 1(2): 26-31.
- [11] Karadag B, Bilici A, Doventas A, Kantarci F, Selcuk D, Dincer N, et al. An unusual case of biliary obstruction caused by *Dicrocoelium dendriticum*. *Scand J Infect Dis* 2005; 37(5): 385-8.
- [12] Helmy MM, Al-Mathal EM. Human infection with *Dicrocoelium dendriticum* in Riyadh district (Saudi Arabia). *J Egypt Soc Parasitol* 2003; 33(1): 139-44.
- [13] Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. New York: The McGraw-Hill Comp; 2008. p. 253-4.
- [14] Magi B, Frati E, Bernini L, Sansoni A, Zanelli G. *Dicrocoelium dendriticum* a true infection? *Infez Med* 2009; 17(2): 115-6.
- [15] Arbabi M, Dalimi A, Ghafarifar F, Froozandeh Moghadam M. Prevalence and intensity of *Dicrocoelium dendriticum* in sheep and goats of Iran. *Res J Parasitol* 2011; 10, 3923/Jp.1-8.
- [16] Sandoval H, Manga-González Y, Campo R, García P, Castro JM, Pérez de la Vega M. Preliminary study on genetic variability of

- Dicrocoelium dendriticum* determined by random amplified polymorphic DNA. *Parasitol Int* 1999; 48(1): 21-6.
- [17] Manga-González MY, Gonzalez-Lanza C. Field and experimental studies on *Dicrocoelium dendriticum* and Dicrocoeliasis in northern Spain. *J Helminthol* 2005; 79(4): 291-302.
- [18] Maurelli MP, Rinaldi L, Capuano F, Perugini AG, Veneziano V, Cringoli G. Characterization of the 28S and the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium hospes*. *Parasitol Res* 2007; 101(5): 1251-5.
- [19] Agostini S, Miquel J, Ndiaye PI, Marchand B. *Dicrocoelium hospes* Loos, 1907 (Digenea, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. *Parasitol Res* 2005; 96(1): 38-48.
- [20] Ogambo-Ongoma AH. Fascioliasis survey in Uganda. *Bull Epizoot Dis Afr* 1972; 20(1): 35-41.
- [21] Yamaguti S. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Tokyo: Keigaku Publishing Co.; 1971.
- [22] Taira K, Shirasaka S, Taira N, Ando Y, Adachi Y. Morphometry on lancet flukes found in Japanese Sika deer (*Cervus nippon centralis*) captured in Iwate Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* 2006, 68(4): 375-7.
- [23] Otranto D, Rehbein S, Weigl S, Cantacessi C, Parisi A, Lia RP, Olson PD. Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Tropica* 2007; 104: 91-5.
- [24] Taira K, Shirasaka S, Taira N, Ando Y, Adachi Y. Morphometry on lancet flukes found in Japanese sika deer (*Cervus nippon centralis*) captured in Iwate Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* 2006, 68(4): 375-7.
- [25] Tkach V, Pawlowski J, Mariaux J. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial 18rDNA sequences. *Int J Parasitol* 2000; 30(1): 83-93.
- [26] Nolan MJ, Cribb TH. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Adv Parasitol* 2005; 60: 101-63.
- [27] Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q J Biol* 1991; 66(4): 411-53.
- [28] Sandoval H, Manga-González Y, Campo R, García P, Castro JM, Pérez de la Vega M. Preliminary study on genetic variability of *Dicrocoelium dendriticum* determined by random amplified polymorphic DNA. *Parasitol Int* 1999; 48(1): 21-6.
- [29] Birova V, Macko JK. On the variability of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) in domestic and free-living animals. III. On variability of organophenotes from sheep and cattle in East Slovakia. *Helminthologia* 1987; 24: 197-208.