Original Article

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

Arbabi M[1], Dalimi-Asl A[1*], Ghaffarifar F[1], Foorozandeh-Moghadam M[2]

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, Tru1I 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 registrated 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 significanly 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

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

محسن اربابی [1]، عبدالحسین دلیمی اصل [2*]، فاطمه غفاری فر [3]، مهدی فروزنده مقدم [4]

خلاصه:

سابقه و هدف: دیکروسلیازیس بیماری انگلی کبدی است که دارای اهمیت بالینی و اقتصادی برای انسان و صنعت پرورش دام است. باتوجه به اهمیت بهداشتی و اقتصادی بیماری، در این مطالعه پارامترهای مرفومتریک 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 ترماتوداز کبد گوسفندانی که به‌طور طبیعی در استان‌های آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، مازندران و تهران آلوده شده بودند، جمع‌آوری گردید. شاخص‌های مرفولوژیک کرم‌های بالغ بر اساس پارامترهای مرفومتریک اندازه‌گیری شد. از این تعداد ٦٠ 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 محدودالاثر Tru1I گونه‌ی انگل تشخیص داده شد. در انتها از محصول خالص شده PCR، تعیین توالی صورت گرفت.

نتایج: بر اساس شاخص قابل اعتماد مرفولوژیک موقعیت بیضه‌ها، تمام ایزوله‌ها، دارای دو بیضه پشت سرهم بودند. الکتروفورز محصول PCR در تمامی ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم باند bp ۹٦۳ نشان داد که شبیه موارد ثبت شده در بانک ژن بود. الگوی RFLP نشان‌دهنده‌ی ٤ محل برش و تشکیل فراگمنت‌های bp ۱۱٦، bp ۱٤٥، bp ۲۹۳ و bp ٤۰۹ بود. گرچه اختلاف شاخص‌های مرفومتریک در استان‌های مختلف معنی‌دار بود، ولی بررسی ژنومیک نشان‌دهنده‌ی وجود مشابهت بین توالی‌ها در استان‌های مورد بررسی بود.

نتیجه‌گیری: شاخص‌های مرفومتریک و مولکولی نشان دادند که دیکروسلیوم دندریتیکوم، 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 ۱٤٥-۱۳٥

مقدمه

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

Dicrocoelium dendriticum در سراسر اروپا، آسیا، شمال آفریقا و آمریکا، *D. hospes* در آفریقا و *D. Chinensis* در آسیا انتشار دارد [۳،۲]. دیکروسلیوم دندریتیکوم 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 [٤] 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 [٦،٥،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 ترماتود می‌باشند [۲]. در دهه‌ی گذشته، مطالعات مختلفی در مورد شیوع دیکروسلیازیس گاو و گوسفند در نقاط مختلف ایران صورت

[1] دانشجوی دکترای تخصصی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[2] استاد، گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[3] دانشیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[4] 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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

گرفته و نتایج حاصل وضعیت متفاوتی از نسبت آلودگی به این کرم را نشان می‌دهد. اگرچه در حال حاضر دیکروسلیازیس 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، دیکروسلیازیس کمتر به‌صورت کلینیکی ظاهر می‌شود [۱۱]. عفونت واقعی در انسان به‌ندرت 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 به‌علت 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، به‌ترتیب ۳۲ و ۷ نفرمبتلا به عفونت واقعی دیکروسلیوم دندریتیکوم 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 به‌صورت اسهال مزمن، یبوست، تهوع، دردهای شکمی، هپاتومگالی، انسداد مجاری صفراوی، هیپرائوزینوفیلی خون محیطی، خارش، انسداد مجاری صفراوی و کلانژایتیس بروز می‌نماید. عفونت‌های شدید در حیوانات با بزرگی و هیپرپلازی اپیتلیوم و فیبروز اطراف مجرای صفراوی و در نهایت سیروز کبدی همراه می‌باشد [۱۵-۱۱]. تاکنون مطالعات محدودی در خصوص دامنه‌ی تغییرات و اختلافات مرفولوژیک بین تیپ‌های دیکروسلیوم صورت گرفته که نشان می‌دهد دیکروسلیوم هاسپس احتمالا یکی از جمعیت‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم می‌باشد. تغییرات ژنتیکی گونه‌های بالغ دیکروسلیوم دندریتیکوم نیز با استفاده از تکنیک(RAPD) DNA مورد بررسی قرارگرفته است [۱۸-۱۶]. یافته‌های یک مطالعه اخیر نشان دهنده اختلافات قابل توجه در فراساختار اسپرماتوزون گونه‌ی دندریتیکوم و هاسپس می‌باشد. اطلاعات بیشتر نشان داده است که این دو گونه دارای ویژگی‌های اختصاصی مربوط به‌خود می‌باشند [۱۹]. علی‌رغم اهمیت دیکروسلیازیس، اطلاعات اندکی در مورد خصوصیات مرفومتریک 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 دیکروسلیوم در کشور می‌باشد. نتایج این تجربه می‌تواند در تشخیص، درمان، کنترل و پیشگیری از دیکروسلیازیس در کشور مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و مطالعه‌ی مرفومتریک

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، به‌صورت 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، به‌مدت 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 مرفومتریک در اتانل۸۰ درصد فیکس گردید. با استفاده از میکروسکوپ نوری شاخص‌های مرفومتریک 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 وتیلوژن، نسبت طول بدن به غدد وتیلوژن، 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 ۸۰- °C نگهداری شدند. آنالیز داده‌ها بااستفاده از نرم افزارآماری SPSS ویرایش ۱۶ صورت گرفت. به‌منظور مقایسه‌ی آماری و بررسی وجود اختلاف در شاخص‌های مختلف مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم در بین استان‌های مورد مطالعه با یکدیگر، از آنالیزMultiple Comparisons Post Hoc تحلیل واریانس یک طرفه استفاده گردید.

استخراج DNA ژنومی از کرم بالغ

تعداد ۶۰ ایزوله‌ی بالغ گوسفندی دیکروسلیوم از ٤ استان مورد بررسی، برای استخراج DNA انتخاب شدند. استخراج DNA، پس از خارج نمودن نمونه‌ها از ۸۰- °C، توسط کیت بافتی BioneerAccuPrep ساخت کره‌ی جنوبی و پس از ۳ بار شستشو با PBS استریل سرد و مطابق با دستورالعمل کارخانه‌ی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

سازنده صورت گرفت. برای دست‌یابی به بیشترین و بهترین کیفیت DNA از ۲۵µl آنـزیم پروتئینـاز K (داخـل کیـت) و زمـان انکوباسیون ۲ ساعت در حمام آب گـرم اسـتفاده شـد. غلظـت و کیفیـت DNA اسـتخراج شـده بـا دو روش ژل آگـارز و اسپکتروفتومتری و جـذب نـوری در ۲۶۰ و۲۸۰ نـانومتر صـورت گرفت. DNA استخراج شده در ۱۸۰ میکرولیتـر محلـول الوشـن رقیق شده و تا زمان انجام واکـنش PCR در ۲۰ °C- نگهـداری 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 اسـتفاده از پرایمرهـای Dd28SF (5′-GTGGCCAGTTGGTCATTAGG- 3′) و Dd28SR (5′- ACCTCAGTCTGGACAAGCCA- 3′) تکثیر شد. پرایمرها پس از BLAST کردن ژن با اسـتفاده از نـرم افزار Primer 3 طراحی گردید. مخلـوط PCR بـه حجـم ۲۰µl شامل: ۱۵µl آب مقطر تزریقی، ۱ µl DNA انگل، 10 mMTris-HCl (PH:9)، 250 µMdNTP، 30 mMKCl، 1.5 mM MgCl2، 1 U Taq DNA Polymerase و 10 Pmol از پرایمرهای Forward و Reverse تهیه گردید. واکنش PCR بـا استفاده از دسـتگاه ترموسـایکلر My Cycler بـا قابلیـت انجـام گرادیان ساخت شـرکت BIO-RAD آمریکـا بـا پروتکـل زیـر صورت گرفت: مرحله‌ی واسرشت ابتدایی ۹۵ °C به‌مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی واسرشت ۹۵ °C بـه‌مـدت ۱ دقیقـه، مرحلـه‌ی اتـصال پرایمرها ۵۵°C به‌مدت ٤٥ ثانیه، مرحله‌ی طویل شدن زنجیـره °C ۷۲ به‌مدت ٤٥ ثانیه، که این ۳ مرحلـه بـه تعـداد ۳۰ سـیکل و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C انجام گرفت. ٤ µl محصول PCR داخل چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار مارکر وزنی ۱۰۰ bp DNA (Fermentas) بارگذاری شـده و در ولتـاژ ۸۰ به‌مدت ٤٥ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس، بـا اسـتفاده از تـرانس لومیناتور باندهای تشکیل شده مشاهده شـده و بـا مـارکر وزنـی مقایسه شد. به‌منظور دست‌یابی به توالی‌های ژن 28S دیکروسلیوم، محـصول PCR بـا اسـتفاده از کیـت BioneerAccuPrep® ساخت کره‌ی جنوبی و طبق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده مـورد تخلیص ژل قرارگرفت و با سکانـسر automa DNA ۳۱۰ و هـر دو پرایمر به‌کار رفته در واکنش PCR توالی‌ها تعیین گردید. پـس از مرتب‌سازی توالی‌ها، ژن 28S ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم در بانک ژن ثبت شد. تمـامی تـوالی‌هـا BLAST "system basic local alignment tool" شده و با سویه‌ی استاندارد بین المللی ثبت شـده (accession no :AY222261.1, AY251233.1) مقایسه گردید.

ترسیم درخت فیلوژنی

هم‌ترازی چندگانه‌ی توالی‌های مرتب شده ایزولـه‌هـای ٤ استان مورد بررسـی بـه‌همـراه ۳ تـوالی ثبـت شـده از راسـته‌ی پلاژورکید در بانک ژن با نرم‌افزار MEGA4 مورد بررسـی قـرار گرفـت. سـپس، درخـت فیلـوژنی بـا اسـتفاده از الگـوریتم neighbour-joining با ۲۰۰۰ بار تکـرار، جابـه‌جـایی و آنـالیز شاخه‌ها با بهترین حالت و صحت ترسیم گردید.

انجام واکنش PCR-RFLP

از آنزیم محدودالاثر FastDigest Tru1I (Fermentas) برای تعیین الگوی PCR-RFLP استفاده شد.این آنزیم بـه‌طـور اختـصاصی دیکروسـلیوم دنـدریتکوم را از گونـه‌ی مـشابه آن "دیکروسلیوم هاسپس" تفکیک نموده، ولی فاقد محل برش بـرای دیکروسلیوم چایننسیس می‌باشـد. بـرای انجـام واکـنش PCR-RFLP، مخلوطی به حجم نهایی ۱۵ µl شـامل: ۲ µl محـصول PCR 28S دیکروسلیوم، ۱ µl بافر آنزیم، ۰/۵ µl آنزیم Tru1I و ۱۱/۵ µl آب مقطر تزریقی تهیه شـده و بـه‌مـدت ٤٠ دقیقـه در حمام آب گرم ٦٥ °C انکوبه شد. سپس ٤ µl از محصول PCR-RFLP داخـل چاهـک‌هـای ژل آگـارز ۳ درصـد در کنـار مارکروزنی(Fermentas) ۱۰۰ bp DNA بارگذاری و در ولتـاژ ۷۰ به‌مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز گردیـد. در انتهـا بـا اسـتفاده از ترانس لومیناتور، باندهای تشکیل شده در مقایـسه بـا مـارکروزنی مورد بررسی قرارگرفت.

نتایج

الف- بررسی مرفومتریک: در این بررسی از هر استان ۵۰ نمونه و در مجموع ۲۰۰ ایزوله‌ی گوسـفندی دیکروسـلیوم بـرای شناسایی ۱۷ پارامتر مرفومتریک مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه‌ی پارامترهای مرفومتریک در ٤ استان مـورد بررسـی نـشان داد کـه اندازه‌ی شاخص‌ها با یکدیگر کـاملا متفـاوت مـی‌باشـد (جـدول شماره ۱). بررسی موقعیت بیضه‌ها که شاخص قابل اعتمادی برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم می‌باشد، به‌روشـنی نـشان داد، در تمامی ایزوله‌ها، بیضه‌ها پشت سرهم (tandem) قرار دارد که این امر تائیدکننده گونه‌ی دندریتیکوم در میزبان و مناطق مـورد مطالعه می‌باشد.

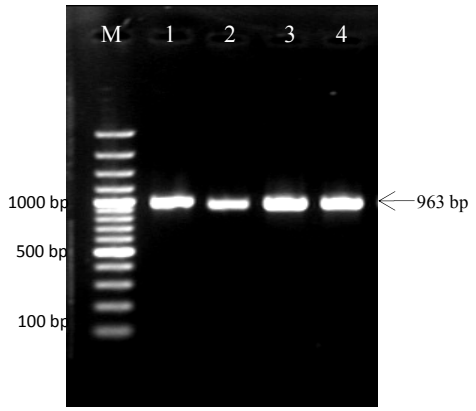
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

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

شاخص مرفومتریک (µm)	آذربایجان شرقی X±SE	مازندران X±SE	خراسان رضوی X±SE	تهران X±SE	مقایسه استان‌ها (P)
طول بدن	٦٩١٢/٠±١٠٣/٩	٧١٢٠/٠±١١٥/٥	٦١٢١/٠±١١٢/٣	٧١١٥/٥±٢١٧/٢	٠/٠٠١
عرض بدن	١٧٠٢/٧±٣٩/٧	١٧٥٣/٠±٥١/٠	١٥١٣/٥±٤٤/٦	١٦٦٤/٥±٣٨/٣	٠/٠٠١
نسبت طول به عرض	٤/١٦٠٤±٠/١	٤/٢١٤±٠/١	٤/٢١٢±٠/١	٤/٢٨٣٠±٠/١	٠/٠٠١
قطر داخلی بادکش دهانی	٢٤٥/٥±٦/٢	٢٤٣/٠±٦/٣	١٩٧/٥±٥/٥	٢٠٣/٠±٦/٦	٠/٠٠١
قطر خارجی بادکش دهانی	٣٦٢/٠±٤/٨	٣٤٢/٠±٥/٧	٣٠١/٥±٦/٢	٣٣٠/٠±٧/٠٥	٠/٠٠١
قطر داخلی بادکش شکمی	٣٠٤/٠±٦/٤	٢٩٧/٥±٨/٢	٢٥٤/٥±٦/٤	٢٨٢/٥±١١/١	٠/٠٠١
قطر خارجی بادکش شکمی	٤٢٩/٠±٥/٩	٤١٧/٠±٨/١	٣٧٩/٠±٥/٧	٤٠٢/٥±٨/٠	٠/٠٠١
نسبت بادکش شکمی به دهانی	١/١٩٠٦±٠/٠١	١/٢٢٤±٠/٠٢	١/٢٧٢٨±٠/٠٢	١/٢٢٩٠±٠/٠٢	٠/٠٠١
طول بیضه	٧٨٠/٥±١٧/٢	٧٠٤/٠±١٧/٢	٧٠٤/٠±١٥/٥	٧٧٠/٥±٢٩/٦	٠/٠٠١
عرض بیضه	٦٧١/٥±١٦/٩	٥٨١/٢±١٦/٨	٥٨٧/٠±١٣/٦	٦٤٧/٥±٢٨/٨	٠/٠٠١
طول غدد زرده	١٩٣٤/٥±٥٥/٥	١٧١٥/٠±٤٦/٩	١٥٧٠/٠±٥٤/٧	١٦٩٨/٠±٥٣/١	٠/٠٠١
نسبت طول بدن به غدد زرده	٣/٦٨٥٦±٠/١	٤/٢٥٤٦±٠/١	٤/٠٢٥٢±٠/٠١	٤/٢٨٣٠±٠/١	٠/٠٥
فاصله بین بادکش شکمی تا انتها	٥٨٢٥/٠±١١٥/٦	٥٤١٩/٥±٩٢/١	٤٧١١/٠±٩٧/٨	٥٤٧٥/٠±١٨٩/٧	٠/٠٠١
طول سیروساک	٥٣٧/٠±٩/٠٩٨	٥٢٨/٠±١٠/٣٤٢	٤٥٧/٥±٩/٢٣٨	٥٠٦/٥٠±١٢/٩٣٢	٠/٠٠١
طول تخمدان	٤٣٠/٠±٧/٤٩١	٤١٠/٥±٥/١٥٥	٣٣٦/٠±٧/٠٧٧	٣٦٦/٥٠±١٣/٤١٣	٠/٠٠١
عرض تخمدان	٣٣٤/٠±٧/٨٩٤	٣١٠/٥±٦/٧٤٢	٢٣٣/٧٠±٦/٩٨٢	٢٧٧/٥٠±٩/٨٥٢	٠/٠٠١
فاصله بین بادکش دهانی و شکمی	٨٧٦/٥±١٠/٦٢٨	٨٤٠/٥±١٠/٢٧٤	٧٦٤/٠±١١/٥٤٣	٨٤٨/٠٠±٢١/٨٣٩	٠/٠٠١

در جدول شماره ۲ شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم 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 ۹٦۳ bp را نشان داد (شکل شماره ۱).



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 ٤ ایزوله‌ی آذربایجان شرقی.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

جدول شماره ۲- مقایسه‌ی شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم گوسفندی در بین استان‌های مورد مطالعه

شاخص مرفومتریک (µm)	استان	آذربایجان 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	۰/۸۶٤	۰/۳۷٤	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/٤۷۳	-	-
نسبت طول به عرض	مازندران	۰/۱٦۸	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۵٦	۰/٤٤۱	-
	تهران	۰/۲۵۲	-	-
قطر داخلی بادکش دهانی	مازندران	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۳۱٦	-
	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	۰/۳٤٦	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
قطر خارجی بادکش شکمی	مازندران	۰/۱۲٤	۰/۳۷۹	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۱٦	-	-
نسبت بادکش شکمی به دهانی	مازندران	۰/۹۰۳	۰/۰۲۱	۰/۳۹۷
	خراسان رضوی	۰/٤٦۹	۰/۱٤۵	-
	تهران	۰/۰۲۹	-	-
طول بیضه	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۰٦	۰/۳۱۹
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰۰۱	-	-
عرض بیضه	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۸٦٦
	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	۰/۰٤۷	۰/٤۷۰	۰/۹۹۰
	خراسان رضوی	۰/۰٤۵	۰/٤۷۸	-
	تهران	۰/۰۰۷	-	-
فاصله بین بادکش شکمی تا انتها	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۳٦	۰/۰۰۱
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	-
	تهران	۰/۰٤۰	-	-
طول سیروساک	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 بین بادکش دهانی و شکمی	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۸۸٤	۰/۱۳۷
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۱۰۳	-
	تهران	۰/۰۰۲	-	-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

در ادامه‌ی بررسی‌های مولکولی و به‌منظور تائید 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 (JQ081959، JQ081962، JQ081971، JQ081972 :Accession no) به ثبت رسید. مقایسه‌ی توالی‌ها بایکدیگر و هم-چنین، با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن (BLAST) نشان دهنده‌ی یکسان بودن آن‌ها و ۹۹ درصد تشابه بود. هم‌چنین، نتیجه-ی سکانس‌ها به‌وضوح نشان داد که دیکروسلیوم دندریتکوم تنها گونه‌ی آلوده کننده جنس دیکروسلیوم در بین گوسفندان استان‌های شمالی و مرکز کشور می‌باشد.

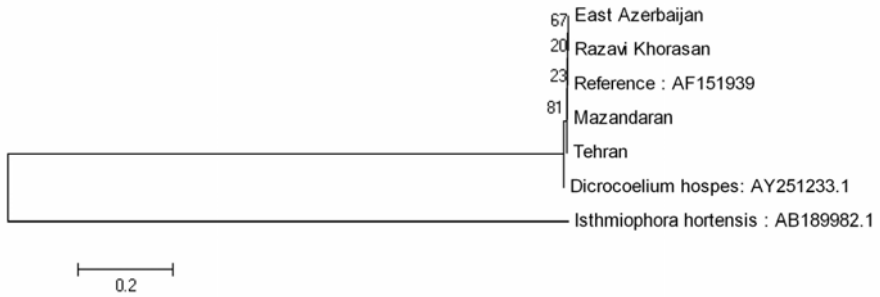
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

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

Mazandaran       CCCCAAGTCCATCAATGAGTACGGTAGTACAGACATGGCCCATGGAGGGTGAAAGGCCCG 120
Tehran           ------------------------------------------------------------ 120
East Azerbaijan  ------------------------------------------------------------ 120
RazaviKhorasan   ------------------------------------------------------------ 120
                 ************************************************************

Mazandaran       TTCGGGTGGAGATTCGGCAGGCCAGTGCTTCTCTGGGTAGACCTTGGAGTCGGGTTGTTT 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       GCGTGAAACCGCTCAGAGGTAAGCAGGTGGAGTTGAACTGCAAGCTTTGAGAATTCAGCT 360
Tehran           ------------------------------------------------------------ 360
EastAzerbaijan   ------------------------------------------------------------ 360
RazaviKhorasan   ------------------------------------------------------------ 360
                 ************************************************************

Mazandaran       GGTGAGGTTGGTTTGGGCTTGGTCAAATTGGTTGGGCCCCGAAGTACGTTAAACCACGTG 420
Tehran           ------------------------------------------------------------ 420
East Azerbaijan  ------------------------------------------------------------ 420
Razavi           ------------------------------------------------------------ 420
                 ************************************************************

Mazandaran       TCCTTTCCCTTTGGGTTGGGATGTGCGATACACTTACCAAGTGTTGCACGCTTTGGGTGT 480
Tehran           ------------------------------------------------------------ 480
East Azerbaijan  ------------------------------------------------------------ 480
RazaviKhorasan   ------------------------------------------------------------ 480
                 ************************************************************

Mazandaran       TCATCGAGCCTCCTTGTCAGTGCACTTTCTCAGAGTGGTCACCACGACCGACGCCGCTGT 540
Tehran           ------------------------------------------------------------ 540
East Azerbaijan  ------------------------------------------------------------ 540
RazaviKhorasan   ------------------------------------------------------------ 540
                 ************************************************************
```


[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

```
Mazandaran       CAGGCTGTCATAGTTAAACCGGTCTTGTAGTGTCCTTGTGGCATTGCCTGGTCGGGATGG 600
Tehran           ------------------------------------------------------------ 600
East Azerbaijan  ------------------------------------------------------------ 600
RazaviKhorasan   ------------------------------------------------------------ 600
                 ************************************************************

Mazandaran       CAGGTAGCTTGTTGGCTCGCTTCGGCTTGCTTTCGAGTGTAATCAGCTGACTGTGACGGT 660
Tehran           ------------------------------------------------------------ 660
East Azerbaijan  ------------------------------------------------------------ 660
RazaviKhorasan   ------------------------------------------------------------ 660
                 ************************************************************

Mazandaran       TCTGTGCAGTGCGTCGGAGACGGCGGCCAGTGGTGTGTGCATGCGTGCCCGATTTGTTGG 720
Tehran           ------------------------------------------------------------ 720
East Azerbaijan  ------------------------------------------------------------ 720
RazaviKhorasan   ------------------------------------------------------------ 720
                 ************************************************************

Mazandaran       CGTACCCTGGTTTGGTTTCTGTGTTGCCTGTGATAGCAGGCCTAGTTATGGCTGGGGTTC 780
Tehran           ------------------------------------------------------------ 780
EastAzerbaijan   ------------------------------------------------------------ 780
RazaviKhorasan   ------------------------------------------------------------ 780
                 ************************************************************

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

Mazandaran       AGACTATCCACCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGAGTAACATGTACGCGAGTC 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 ایزوله های گوسفندی دیکروسلیوم دندریتکوم در استان‌های شمالی و مرکز کشور

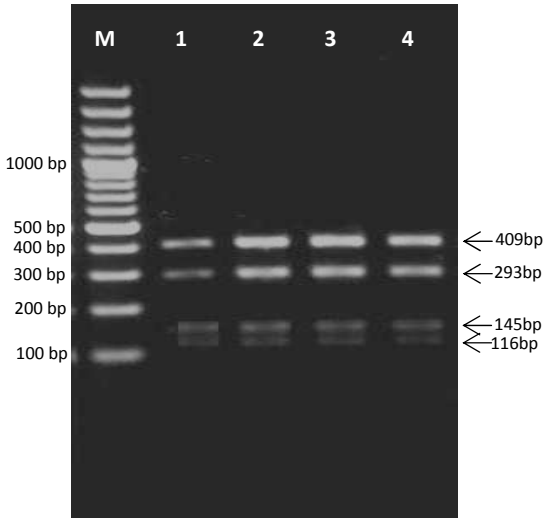


شکل شماره ۳- درخت فیلوژنتیک ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم دندریتکوم بر اساس ناحیه 28SrDNA و استفاده از الگوریتم neighbour-joining با ۲۰۰۰ بارتکرار

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

در انتها علاوه بر روش تعیین توالی، برای تشخیص گونه‌ی دیکروسلیوم در ایران، ازتکنیک RFLP نیز استفاده شد. آنزیم FastDigest Tru1I در موقعیت '5...T↓T A A...3' و '3...A A ↑T...5' ایجاد برش کرده و روی DNA دیکروسلیوم دندریتکوم ایجاد ٤ باند به اندازه‌های ١١٦ bp، ١٤٥ bp، ٢٩٣ bp و ٤٠٩ bp می‌نماید (شکل شماره ٤).



شکل شماره ٤- الگوی PCR-RFLP ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم دندریتیکوم با استفاده آنزیم FastDigest Tru1I. ستون M مارکر bp ١٠٠، ستون ١ ایزوله‌ی تهران، ستون ٢ ایزوله‌ی مازندران، ستون ٣ ایزوله‌ی خراسان رضوی و ستون ٤ ایزوله‌ی آذربایجان شرقی

بحث

در این بررسی با سه روش مرفومتریک، تعیین توالی و RFLP نشان داده شد از بین ٣ گونه‌ی جنس دیکروسلیوم، تنها دیکروسلیوم دندریتیکوم باعث آلودگی گوسفندان ایرانی می‌شود. یکی از شاخص‌های مرفومتریک قابل اعتماد برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم، موقعیت بیضه‌ها می‌باشد. در دیکروسلیوم دندریتیکوم دو بیضه به‌صورت پشت سرهم (tandem) ولی در دیکروسلیوم چایننسیس به‌صورت دوطرفه (bilatera) قراردارد [٢٢،٢١]. یافته‌های این تحقیق نشان داد، بیضه‌ها در تمامی ایزوله‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی، موقعیت پشت سر هم داشت که بدین ترتیب دیکروسلیوم دندریتیکوم 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 [٢٣]. Taira و همکاران نیز با استفاده از این شاخص، دیکروسلیوم چایننسیس را تنها گونه‌ی آلوده کننده‌ی آهوی Sika در ژاپن تشخیص دادند [٢٤]. شاخص مهم دیگر اندازه‌ی (طول و عرض) کرم بالغ می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر نشان داد در بین ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم، طول کرم از mm ٦/١٢±١/١٢ تا mm ٧/١٢±١/١٦ و عرض آن از mm ١/٥١±٠/٤٤٦ تا mm ١/٧٥±٠/٥١ متغیر می‌باشد، که در مقایسه با تحقیق Otranto و همکاران که طول انگل را mm ٤/٧٠-٥/٦٠ (٥/٠٥±٠/٣٣) و عرض آن را (١/٤٧±٠/٢٩) mm ١/٣٠-١/٨٠ گزارش کرده‌اند [٢٣] بلندتر می‌باشد. هم‌چنین، براساس یافته‌های پژوهش حاضر اختلاف معنی‌داری بین اندازه‌ی شاخص‌های مرفومتریک در ٤ استان مورد مطالعه مشاهده می‌شود. این در حالی است که Otranto و همکاران اختلافات اندکی بین شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم را در بین میزبانان انگل در ایتالیا، آلمان و اتریش نشان داده‌اند [٢٣]. احتمالا 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 پلاژورکید ذکرشده است [٢٥]. متاسفانه اطلاعات بسیار اندکی در مورد خصوصیات مرفومتریک گونه‌های دیکروسلیوم در اختیار می‌باشد و از این‌رو به‌سختی می‌توان ارزیابی دقیقی از اختلافات مشاهده شده ارایه نمود. در هرحال، یافته‌ها پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران و خاورمیانه ارایه می‌گردد. نتایج این تحقیق نشان داد، علی‌رغم مشاهده‌ی اختلافات قابل ملاحظه درون گونه‌ای مرفومتریک 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 [٢٦]. 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 برگیرنده‌ی نواحی بسیار ثابت تا بسیار متغیر می‌باشد. ناحیه‌ی 28S نیز از جمله نواحی ثابت بوده و می‌تواند تغییرات را نشان دهد [٢٧]. 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، ٩٩ 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 دندریتکوم جداشده از گوسفند در جنوب ایتالیا با توالی‌های ثبت شده در

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

بانک جهانی ژن وجود ندارد [۱۸]. علی‌رغم این که Otranto و همکاران با استفاده از ناحیه‌ی حفاظت شده‌ی 28S، اختلافات درون گونه‌ای دیکروسلیوم دندریتیکوم 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 مرفومتریک 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 دندریتیکوم است. از این‌رو با توجه به زیان‌های اقتصادی بیماری کنترل و پیشگیری از آن کاملا ضروری می‌باشد.

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 برخود 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.

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-Lanza1 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, Gar cia-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, Meshkehkar 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 (Sau- di 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. 17 th 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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]

Dicrocoelium dendriticum determined by random amplified polymorphic DNA. ***Parasitol Int*** 1999; 48(1): 21–6.

[17] Manga-González MY, Gonzalez-LanzaC. 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 (Cervusnipponcentralis) 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. Mophometry on lancet flukes found in Japanese sika deer (Cervusnipponcentralis) 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 lsrDNA 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-26]