

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, 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 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

بررسی مرفوژیکی 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 مرفوژیک و مولکولی ناحیه 28S rDNA ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم در استان‌های شمالی و مرکزی ایران طی سال‌های ۱۳۸۹-۹۰ تعیین شده است.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۲۰۰ ترماتوداز کبد گوسفندانی که به طور طبیعی در استان‌های آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، مازندران و تهران آلوده شده بودند، جمع‌آوری گردید. شاخص‌های مرفوژیک کرم‌های بالغ بر اساس پارامترهای مرفوژیک 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 محدود الاثر TruII گونه‌ی انگل تشخیص داده شد. در انتهای از محصول خالص شده PCR، تعیین توالی صورت گرفت.

نتایج: بر اساس شاخص قابل اعتماد مرفوژیک موقعیت بیضه‌ها، تمام ایزوله‌ها، دارای دو بیضه پشت سرهم بودند. الکتروفورز محصول PCR در تمامی ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم باند bp ۹۶۳ نشان داد که شبیه موارد ثبت شده در بانک ژن بود. الگوی

نشان‌دهنده‌ی ۴ محل برش و تشکیل فراگمنت‌های ۱۱۶ bp، ۱۴۵ bp، ۲۹۳ bp و ۴۰۹ bp بود. گرچه اختلاف شاخص‌های مرفوژیک در استان‌های مختلف معنی‌دار بود، ولی بررسی ژنومیک نشان‌دهنده وجود مشابهت بین توالی‌ها در استان‌های مورد بررسی بود.

نتیجه‌گیری: شاخص‌های مرفوژیک و مولکولی نشان دادند که دیکروسلیوم دندریتیکوم، تنها گونه‌ی مناطق شمال و مرکز ایران می‌باشد.

واژگان کلیدی: دیکروسلیوم، مرفوژیک، تعیین توالی، گوسفند، 28S rDNA

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 به وجود می‌آید. این ترماتودهای کوچک، انگل مجاري صفرا و کيسه‌ی صفرای نشخوارکنندگان اهلی و وحشی از جمله گوسفند، بز، گاو، گاویش، شتر، آهو و گاهی خرگوش، خوک، اسب و انسان می‌باشند [۱]. جنس دیکروسلیوم دارای سه گونه می‌باشد.

۱. دانشجوی دکترای تخصصی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه

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

*لشان نویسنده مسئول؛

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

دانشگاه تربیت مدرس

تلفن: ۰۹۱۲ ۳۰۴۷۹۳۱؛ ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۵۵؛ دوچرخه‌سوار؛

پست الکترونیک: dalimi_a@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۳؛ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۱۱/۱۸

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 پژوهشی دیکروسلیازیس به‌خاطر خسارات مستقیم به کبد و فساد آن و در نتیجه از دست رفتن مقادیر قابل توجه مواد پرتوئینی با ارزش از رژیم غذایی انسان [۴] و به طور غیر مستقیم به خاطر زیان‌های ناشی از درمان-های ضدکرمی و اختلالات گوارشی به دلیل تغییرات کبدی و صفرایی است که با کاهش وزن، کندی رشد، کم خونی، ادم، کاهش تولید شیر و گاهی عواقب مرگبار همراه می‌باشد [۶،۵،۳،۱]. طیف گسترده‌ای از حلزون‌های خاکزی و مورچه به ترتیب میزان واسط اول و دوم این کرم می‌باشد که این موضوع باعث پیچیدگی چرخی زندگی انگل می‌شود. علاوه بر این، پستانداران وحشی و اهلی مختلفی میزان نهایی این ترماتود می‌باشند [۲]. در دهه‌ی گذشته، مطالعات مختلفی در مورد شیوع دیکروسلیازیس گاو و گوسفند در نقاط مختلف ایران صورت

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، به صورت تصادفی طی ساعات اولیه صبح در ابتدای خط کشتار حاضر شده و پس از کالبد گشایی کامل حیوان، بر اساس روش ایجاد برش در بافت و مجاری صفرایی بزرگ و کوچک و کیسه‌ی صفراء 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 مرفومتریک در اتالیل ۸۰ درصد فیکس گردید. با استفاده از میکروسکوپ نوری شاخص‌های مرفومتریک شامل: اندازه‌ی بدن (طول و عرض)، قطر 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 تیلوبُزن، نسبت طول بدن به غدد تیلوبُزن، فاصله‌ی بین بادکش شکمی تا انتهای بدن، طول کیسه‌ی سیر، طول و عرض تخدمان و فاصله‌ی بین بادکش دهانی و شکمی بر حسب میکرون اندازه‌گیری و ثبت شد [۲۱، ۲۲]. نمونه‌ها تا زمان انجام بررسی‌های مولکولی، در $^{\circ}\text{C}$ ۸۰-۸۲ مورد بررسی افزارآماری SPSS ویرایش ۱۶ صورت گرفت. به منظور مقایسه‌ی آماری و بررسی وجود اختلاف در شاخص‌های مختلف مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم در بین استان‌های مورد مطالعه با یکدیگر، از آنالیز Post Hoc Multiple Comparisons طبقه‌بندی شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 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 مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم در بین استان‌های مورد مطالعه با یکدیگر، از آنالیز Post Hoc Multiple Comparisons طرفه استفاده گردید.

استخراج DNA ژنومی از کرم بالغ

تعداد ۶۰ ایزوله‌ی بالغ گوسفندی دیکروسلیوم از ۴ استان مورد بررسی، برای استخراج DNA انتخاب شدند. استخراج DNA پس از خارج نمودن نمونه‌ها از $^{\circ}\text{C}$ ۸۰-۸۱، توسط کیت باقی PioneerAccuPrep 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 آلوودگی به این کرم را نشان می‌دهد. اگرچه در حال حاضر دیکروسلیازیس در بین گوسفندان و گاوها نواحی شمال و شمال غرب کشور شایع است [۸، ۷]، اما در سایر مناطق انتشار کمتری دارد [۱۰، ۹]. همانند دیگر کشورهای حوزه‌ی مدیترانه، قیوع آلوودگی در ایران در ارتباط با خاک‌های خشک، آهکی و قلیائی می‌باشد که شرایط مطلوب برای زیست میزبانان واسطه انگل فراهم می‌نماید [۲]. با وجود عفونت گسترده‌ی کبد، دیکروسلیازیس کمتر به صورت کلینیکی ظاهر می‌شود [۱۱]. عفونت واقعی در انسان به ندرت مشاهده شده و اغلب در اثر خوردن میزبان واسطه 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 جگه‌های آلووده به انگل و ظهور بعدی تخم کرم در مدفع می‌باشد. یک مطالعه در عربستان نشان داده است، از ۲۰۸۱ و ۲۱۲۱ بیماری که در مدفع آن‌ها تخم کرم مشاهده شده، به ترتیب ۳۲ و ۷ نفر مبتلا به عفونت واقعی دیکروسلیوم دندریتیکوم بوده‌اند [۱۲]. نگرشی به چرخه زندگی انگل بیان گر این واقعیت است که عفونت واقعی در انسان شایع نبوده و اغلب خفیف و بدون نشانه‌ی بالینی می‌باشد و بیشتر به صورت اسهال مزمن، یبوست، تهوع، دردهای شکمی، هپاتومگالی، انسداد مجاری صفرایی، هیپراؤزینوفیلی خون محیطی، خارش، انسداد مجاری صفرایی و کلانژایتیس بروز می‌نماید. عفونت‌های شدید در حیوانات با بزرگی و هیپرپلازی اپیتلیوم و فیروز اطراف مجرای صفرایی و در نهایت سیروز کبدی همراه می‌باشد [۱۵-۱۱]. تاکنون مطالعات محدودی در خصوص دامنه‌ی تغییرات و اختلافات مروفولوژیک بین تیپ‌های دیکروسلیوم صورت گرفته که نشان می‌دهد دیکروسلیوم هاسپس احتمالاً یکی از جمعیت‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم می‌باشد. تغییرات ژنتیکی گونه‌های بالغ دیکروسلیوم دندریتیکوم نیز با استفاده از تکنیک RAPD (DNA مورد بررسی قرار گرفته است [۱۶-۱۸]. یافته‌های یک مطالعه اخیر نشان دهنده اختلافات قابل توجه در فرآساختار اسپرماتوزون گونه‌ی دندریتیکوم و هاسپس می‌باشد. اطلاعات بیشتر نشان داده است که این دو گونه دارای ویژگی‌های اختصاصی مربوط به خود می‌باشند [۱۹]. علیرغم اهمیت دیکروسلیازیس، اطلاعات اندکی در مورد خصوصیات مرفومتریک و ژنومیک عامل بیماری در دسترس می‌باشد. هدف از این پژوهش تعیین خصوصیات مروفولوژیکی و شناسایی مولکولی (28S, rDNA) به عنوان مارکر ژنتیکی قابل اعتماد برای تعیین گونه‌ی دیکروسلیوم در کشور می‌باشد. نتایج این تجربه می‌تواند در تشخیص، درمان، کتترول و پیشگیری از

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

ترسیم درخت فیلوجنی

هم ترازی چندگانه‌ی توالی‌های مرتب شده ایزووله‌های ۴ استان مورد بررسی به همراه ۳ توالی ثبت شده از راستهٔ پلاژور کید در بانک ژن با نرم‌افزار MEGA4 مورد بررسی قرار گرفت. سپس، درخت فیلوجنی با استفاده از الگوریتم neighbour-joining شاخه‌ها با بهترین حالت و صحت ترسیم گردید.

انجام واکنش PCR-RFLP

از آنزیم محدودالاثر (Fermentas) FastDigest TruII برای تعیین الگوی PCR-RFLP استفاده شد. این آنزیم به طور اختصاصی دیکروسلیوم دندریتیکوم را از گونه‌ی مشابه آن "دیکروسلیوم هاسپس" تفکیک نموده، ولی قادر محل برش برای دیکروسلیوم چایننسیس می‌باشد. برای انجام واکنش PCR-RFLP، مخلوطی به حجم نهایی $1\text{ }\mu\text{l}$ شامل: $2\text{ }\mu\text{l}$ محصول TruII 28S PCR ۲۸S دیکروسلیوم، $1\text{ }\mu\text{l}$ بافر آنزیم، $1\text{ }\mu\text{l}$ آنزیم PCR و $11/5\text{ }\mu\text{l}$ آب مقطر تزیقی تهیه شده و به مدت ۴۰ دقیقه در حمام آب گرم 65°C انکوبه شد. سپس $1\text{ }\mu\text{l}$ از محصول PCR داخل چاهک‌های ژل آگارز ۳ درصد در کنار RFLP مارکروزنی (Fermentas) 100 bp DNA بارگذاری و در ولتاژ ۷۰ به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز گردید. در انتهای از ترانس لومیناتور، باندهای تشکیل شده در مقایسه با مارکروزنی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

الف- بررسی مرفومنتریک: در این بررسی از هر استان ۵۰ نمونه و در مجموع ۲۰۰ ایزووله‌ی گوسفندي دیکروسلیوم برای شناسایی ۱۷ پارامتر مرفومنتریک مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه‌ی پارامترهای مرفومنتریک در ۴ استان مورد بررسی نشان داد که اندازه‌ی شاخص‌ها با یکدیگر کاملاً متفاوت می‌باشد (جدول شماره ۱). بررسی موقعیت پیضه‌ها که شاخص قابل اعتمادی برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم می‌باشد، بهروشی نشان داد، در تمامی ایزووله‌ها، پیضه‌ها پشت سرهم (tandem) قرار دارد که این امر تائید کننده گونه‌ی دندریتیکوم در میزان و مناطق مورد مطالعه می‌باشد.

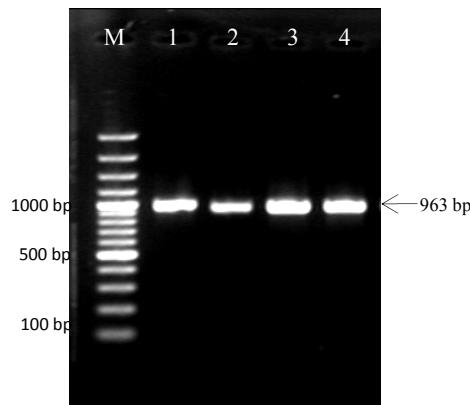
سازنده صورت گرفت. برای دست‌یابی به بیشترین و بهترین کیفیت DNA از $1\text{ }\mu\text{l}$ آنزیم پروتئیناز K (داخل کیت) و زمان انکوباسیون ۲ ساعت در حمام آب گرم استفاده شد. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری و جذب نوری در 260 و 280 نانومتر صورت گرفت. DNA استخراج شده در 180 میکرولیتر محلول الوشن رقیق شده و تا زمان انجام واکنش PCR در -20°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 ($5'-\text{GTGGCCAGTTGGTCATTAGG}-3'$) Dd28SR ($5'-\text{ACCTCAGTCTGGACAAGCCA}-3'$) تکثیر شد. پرایم‌ها پس از BLAST کردن ژن با استفاده از نرم افزار ۳ Primer ۳ طراحی گردید. مخلوط PCR به حجم $1\text{ }\mu\text{l}$ شامل: $1\text{ }\mu\text{l}$ آب مقطر تزیقی، $1\text{ }\mu\text{l}$ انگل، 10 mMTris ، 1.5 mM $.30\text{ mMKCl}$ $.250\text{ }\mu\text{MdNTP}$ ، HCl (PH:9) $1\text{ }\mu\text{l}$ Taq DNA Polymerase، MgCl_2 پرایم‌های 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 95°C به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی واسرشت 95°C به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی اتصال 55°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله‌ی طویل شدن زنجیره 72°C به مدت ۴۵ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد 30 سیکل و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در 72°C انجام گرفت. $1\text{ }\mu\text{l}$ محصول PCR داخل چاهک‌های ژل آگارز $1/5$ درصد در کنار مارکروزنی 100 bp DNA (Fermentas) بارگذاری شده و در ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس، با استفاده از ترانس لومیناتور باندهای تشکیل شده مشاهده شده و با مارکروزنی مقایسه شد. به منظور دست‌یابی به توالی‌های 28S دیکروسلیوم، محصول BioneerAccuPrep® PCR با استفاده از کیت ساخت کره‌ی جنوبی و طبق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده مورد تخلیص ژل قرار گرفت و با سکانسر automa DNA توانی 310 دو پرایم به کار رفته در واکنش PCR توالی‌ها تعیین گردید. پس از مرتب‌سازی توالی‌ها، ژن 28S ایزووله‌های ایرانی دیکروسلیوم در BLAST "system basic" توانی توالی‌ها شد. تسامی توالی‌ها local alignment tool" با سویه‌ی استاندارد بین المللی

جدول شماره ۱ - مقایسه شاخص‌های مرفومنیریک ایزوله‌های گوسفنندی 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 مرفومنیریک (μm)
۰/۰۰۱	۷۱۱۵/۰±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	۴/۲۱۲۰±۰/۱	۴/۲۱۴۰±۰/۱	۴/۱۶۰۴±۰/۱	نسبت طول به عرض
۰/۰۰۱	۲۰۳/۰±۶/۶	۱۹۷/۰±۵/۵	۲۴۳/۰±۶/۳	۲۴۵/۵±۶/۲	قطر داخلی بادکش دهانی
۰/۰۰۱	۳۳۰/۰±۷/۰	۳۰۱/۰±۶/۲	۳۴۲/۰±۵/۷	۳۶۲/۰±۴/۸	قطر خارجی بادکش دهانی
۰/۰۰۱	۲۸۲/۰±۱۱/۱	۲۵۴/۰±۶/۴	۲۹۷/۰±۸/۲	۳۰۴/۰±۷/۴	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	۱/۲۲۴۰±۰/۰۲	۱/۱۹۰۶±۰/۰۱	نسبت بادکش شکمی به دهانی
۰/۰۰۱	۷۷۰/۰±۲۹/۶	۷۰۴/۰±۱۵/۵	۷۰۴/۰±۱۷/۲	۷۸۰/۰±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±۴۵/۷	۱۷۱۵/۰±۴۶/۹	۱۹۳۴/۵±۵۰/۵	طول غدد زرد
۰/۰۰۵	۴/۲۸۳۰±۰/۱	۴/۰۲۵۲±۰/۰۱	۴/۲۵۴۶±۰/۱	۳/۶۸۵۶±۰/۱	نسبت طول بدن به غدد زرد
۰/۰۰۱	۵۴۷۰/۰±۱۸۹/۷	۴۷۱۱/۰±۹۷/۸	۵۴۱۹/۰±۹۲/۱	۵۸۲۵/۰±۱۱۵/۶	فاصله بین بادکش شکمی تا انها
۰/۰۰۱	۵۰۶/۵۰±۱۲/۹۳۲	۴۵۷/۵±۹/۲۳۸	۵۲۸/۰±۱۰/۳۴۲	۵۳۷/۰±۹/۰۹۸	طول سپروساک
۰/۰۰۱	۳۶۶/۵۰±۱۳/۴۱۳	۳۳۶/۰±۷/۰۷۷	۴۱۰/۵±۵/۱۵۵	۴۳۰/۰±۷/۴۹۱	طول تخمدان
۰/۰۰۱	۲۷۷/۵۰±۹/۸۵۲	۲۲۳/۷۰±۶/۹۸۲	۳۱۰/۵±۶/۷۴۲	۳۳۴/۰±۷/۸۹۴	عرض تخمدان
۰/۰۰۱	۸۴۸/۰۰±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 گوسفنندی 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 مرفومنیریک دیکروسلیوم دندریتیکوم گوسفنندی در بین استان‌های مورد مطالعه با استفاده از آنالیز Post Hoc تحلیل واریانس یک طرفه با یکدیگر مقایسه شده است.

ب - بررسی مولکولی: در ابتدا پس از استخراج کامل DNA موجود در پیکره‌ی کرم بالغ از آن به عنوان 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 مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم گوسفنندی 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	۰/۸۶۴	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 زردہ	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۲۸۰	۰/۰۰۱	
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	–	
	تهران	۰/۰۲۲	–	–	
نسبت طول بدن به غدد زردہ	مازندران	۰/۰۴۷	۰/۴۷۰	۰/۹۹۰	
	خراسان رضوی	۰/۰۰۵	۰/۴۷۸	–	
	تهران	۰/۰۰۷	–	–	
فاصله بین بادکش شکمی تا انتهای	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۳۶	۰/۰۰۱	
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	–	
	تهران	۰/۰۴۰	–	–	
طول سبروساک	مازندران	۰/۱۱۲	۰/۰۰۹	۰/۰۳۵	
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	–	
	تهران	۰/۳۰۹	–	–	
طول تخدمان	مازندران	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	
	خراسان رضوی	۰/۰۰۱	۰/۳۸۲	–	
	تهران	۰/۰۰۱	–	–	
عرض تخدمان	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	۰/۸۸۴	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 سکانس‌ها به‌وضوح نشان داد که دیکروسلیوم دندربنکوم تنها گونه‌ی آلوده کننده جنس دیکروسلیوم در بین گوسفندان استان‌های شمالی و مرکز کشور می‌باشد.

در ادامه‌ی بررسی‌های مولکولی و به‌منظور تائید گونه‌ی انگل، از محصول استخراج شده ژل تعیین توالی صورت گرفت که هم‌ترازی 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) به ثبت رسید. مقایسه‌ی توالی‌ها با یکدیگر و هم‌Accession no:

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Mazandaran	GTGGCCAGTTGGTCATTAGGCAATGTGGTGTAGGTCGTTCCGCAGAACGCGCTGCCA	60
Tehran	-----	60
East Azerbaijan	-----	60
RazaviKhorasan	-----	60

Mazandaran	CCCCAAGTCCATCAATGAGTACGGTAGTACAGACATGGCCCATGGAGGGTGAAAGGCCG	120
Tehran	-----	120
East Azerbaijan	-----	120
RazaviKhorasan	-----	120

Mazandaran	TTCGGGTGGAGATTCGGCAGGCCAGTGCTCTGGTAGACCTTGGAGTCGGTTGTT	180
Tehran	-----	180
East Azerbaijan	-----	180
RazaviKhorasan	-----	180

Mazandaran	GTGAATGCAGCCAAAGTGGTGGTAAACTCCATCCAAGGCTAAATACAAGCACGAGTCC	240
Tehran	-----	240
East Azerbaijan	-----	240
RazaviKhorasan	-----	240

Mazandaran	GATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGTACTTGAAGAGAGAGTTAACAGT	300
Tehran	-----	300
East Azerbaijan	-----	300
RazaviKhorasan	-----	300

Mazandaran	GCGTGAAACCGCTCAGAGGTAAGCAGGTGGAGTTGAAGCTTGAGAATTCAAGCT	360
Tehran	-----	360
East Azerbaijan	-----	360
RazaviKhorasan	-----	360

Mazandaran	GGTGAGGTTGGTTGGGCTTGGTCAAATTGGTGGGCCCGAAGTACGTTAACACCACGTG	420
Tehran	-----	420
East Azerbaijan	-----	420
Razavi	-----	420

Mazandaran	TCCTTCCCTTGGGTGGATGTGCGATACACTTACCAAGTGGTGCACGCTTGGGTGT	480
Tehran	-----	480
East Azerbaijan	-----	480
RazaviKhorasan	-----	480

Mazandaran	TCATCGAGCCTCCTGTCAGTGCACCTCTCAGAGTGGTCACCAACGACGCCGCTGT	540
Tehran	-----	540
East Azerbaijan	-----	540
RazaviKhorasan	-----	540

Mazandaran	CAGGCTGTCAAGTTAACCGGTCTTGTAGTGTCCATTGGCATTGCCTGGTCGGATGG	600
Tehran	-----	600
East Azerbaijan	-----	600
Razavi Khorasan	-----	600

Mazandaran	CAGGTAGCTTGGCTCGCTCGGCTTGCTTCGAGTGTAAATCAGCTGACTGTGACGGT	660
Tehran	-----	660
East Azerbaijan	-----	660
Razavi Khorasan	-----	660

Mazandaran	TCTGTGCAGTGCCTCGAGACGGCGGCCAGTGGTGTGCATGCGTCCCCGATTGTTGG	720
Tehran	-----	720
East Azerbaijan	-----	720
Razavi Khorasan	-----	720

Mazandaran	CGTACCCCTGGTTGGTTCTGTGTTGCCTGTGATAGCAGGCCTAGTTATGGCTGGGGTTC	780
Tehran	-----	780
East Azerbaijan	-----	780
Razavi Khorasan	-----	780

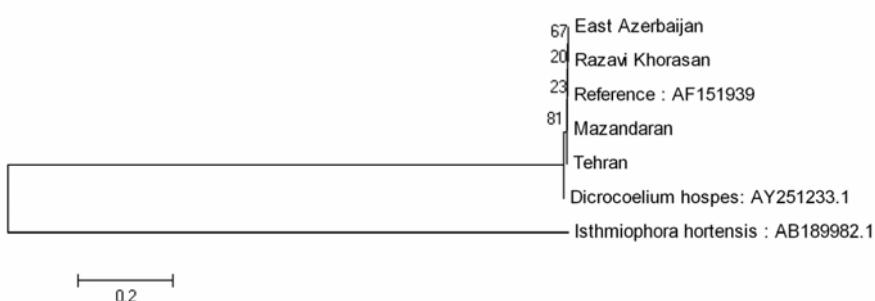
Mazandaran	GTTCGGGCGAATGGTTGCGTGTGGCACCTCCAAGGGCAATAGTCTGGTGTAGTGGT	840
Tehran	-----	840
East Azerbaijan	-----	840
Razavi Khorasan	-----	840

Mazandaran	AGACTATCCACCTGACCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGAGTAACATGTACCGAGTC	900
Tehran	-----	900
East Azerbaijan	-----	900
Razavi Khorasan	-----	900

Mazandaran	-----G-----	960
Tehran	-----G-----	960
East Azerbaijan	-----C-----	960
Razavi Khorasan	-----C-----	960

Mazandaran	GGT 963	
Tehran	--- 963	
East Azerbaijan	--- 963	
Razavi Khorasan	--- 963	

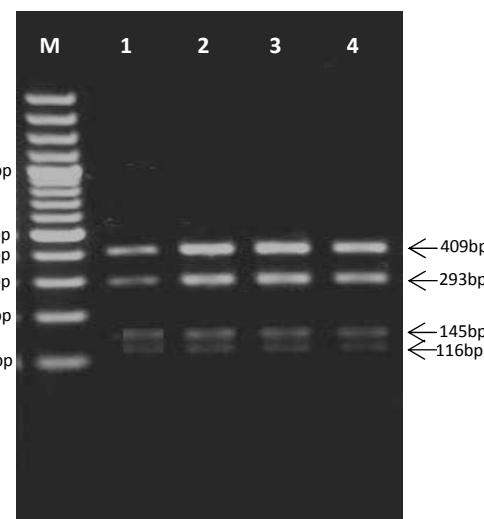
شکل شماره ۲- توالی‌های ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم دندریتکوم در استان‌های شمالی و مرکز کشور



شکل شماره ۳- درخت فیلوزنیک ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم دندریتکوم بر اساس ناحیه 28SrDNA و استفاده از الگوریتم neighbour-joining با ۲۰۰ بار تکرار

از این شاخص، دیکروسیلیوم چاینستیس 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 دیکروسیلیوم، طول کرم از mm ۶/۱۲±۱/۱۶ mm تا ۷/۱۲±۱/۱۶ mm عرض آن از mm ۱/۰۵±۰/۴۶ mm تا ۱/۰۷±۰/۵۱ mm متغیر می‌باشد، که در مقایسه با تحقیق Otranto و همکاران که طول انگل را mm ۴/۷۰-۵/۶۰ mm (۵۰/۳۳) و عرض آن را (۱/۴۷±۰/۲۹) گزارش کرده‌اند [۲۳] بلندتر می‌باشد. هم‌چنین، براساس یافته‌های پژوهش حاضر اختلاف معنی‌داری بین اندازه‌ی شاخص‌های مرفومنتریک در ۴ استان مورد مطالعه مشاهده می‌شود. این در حالی است که Otranto و همکاران اختلافات اندکی بین شاخص‌های مرفومنتریک دیکروسیلیوم دندربیکوم را در بین میزانان انگل در ایتالیا، آلمان و اتریش نشان داده‌اند [۲۳]. احتمالاً این اختلاف ناشی از سن و وضعیت تغذیه‌ای میزان، وضعیت بلوغ کرم، شدت آلودگی، شرایط اقلیمی و اکولوژیکی مناطق مورد مطالعه یا مربوط به فاکتورهای دیگری باشد که در مورد ترماتودهای راسته پلازور کید ذکر شده است [۲۵]. متناسبه اطلاعات بسیار اندکی در مورد خصوصیات مرفومنتریک گونه‌های دیکروسیلیوم در اختیار می‌باشد و از این‌رو به سختی می‌توان ارزیابی دقیقی از اختلافات مشاهده شده ارایه نمود. در هر حال، یافته‌ها پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران و خاورمیانه ارایه می‌گردد. نتایج این تحقیق نشان داد، علی‌رغم مشاهده اختلافات قابل ملاحظه درون گونه‌ای مرفومنتریک در استان‌های مورد بررسی، تفاوت اندکی در توالي‌های 28S وجود دارد. روش تعیین توالي DNA یکی از ایزوله‌های مولکولی موثر برای شناسایی و هویت انگل‌های کرمی - محسوب می‌شود [۲۶]. در میان تمامی اهداف استفاده از توالي‌ها برای مطالعات فیلوجنتیک و آنالیزهای پلی‌مورفیسم، به کارگیری tDNA ابزار قدرتمندی برای توصیف تغییرات درون گونه‌ای و بین گونه‌ای انگل‌ها می‌باشد. زیرا در برگیرنده‌ی نواحی ثابت تا بسیار متغیر می‌باشد. ناحیه 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 دیکروسیلیوم در استان‌های مورد مطالعه استفاده شد. بر اساس این مارکر بین توالي‌های ایزوله‌های گوسفندی با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن، ۹۹ (AF151939.1, AY222261.1, AY251233.1) درصد شبهات وجود دارد. بررسی‌های Maurelli و همکاران نیز نشان داد که هیچ اختلافی بین 28S تمامی دیکروسیلیوم دندربیکوم جداشده از گوسفند در جنوب ایتالیا با توالي‌های ثبت شده در

در انتها علاوه بر روش تعیین توالي، برای تشخیص گونه‌ی دیکروسیلیوم در ایران، از تکنیک RFLP نیز استفاده شد. آنزیم ۳'...A T↓T A A...3' در موقعیت ۵'...A در FastDigest Tru1I دندربیکوم ایجاد برش کرده و روی DNA دیکروسیلیوم ۲۹۳ bp، ۱۴۵ bp، ۱۱۶ bp و ۴۰۹ bp می‌نماید (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴- الگوی PCR-RFLP ایزوله‌های گوسفندی دیکروسیلیوم دندربیکوم با استفاده آنزیم FastDigest Tru1I 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 مرفومنتریک، تعیین توالي و RFLP نشان داده شد از بین ۳ گونه‌ی جنس دیکروسیلیوم، تنها دیکروسیلیوم دندربیکوم باعث آلودگی گوسفندان ایرانی می‌شود. یکی از شاخص‌های مرفومنتریک قابل اعتماد برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسیلیوم، موقعیت بیضه‌ها می‌باشد. در دیکروسیلیوم دندربیکوم دو بیضه به صورت پشت سرهم (tandem) ولی در دیکروسیلیوم چاینستیس به صورت دوطرفه (bilatera) قرارداده‌اند. یافته‌های این تحقیق نشان داد، بیضه‌ها در تمامی ایزوله‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی، موقعیت پشت سرهم داشت که بدین ترتیب دیکروسیلیوم دندربیکوم را تنها عامل دیکروسیلیازیس 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 به عنوان بخشی از رساله دکترای تخصصی انگل شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به شماره 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 به خاطر 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 به خاطر 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 دندربیتکوم را ۱/۳ درصد نشان داده، ولی هیچ ارتباطی بین میزان یا منطقه‌ی جغرافیایی گزارش نکرده است [۲۳]: این در حالی است که پژوهش‌های قبلی اختلاف قابل ملاحظه‌ای بر اساس خصوصیات ژنومی نشان داده‌اند [۲۸، ۲۹].

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر که برای اولین بار در کشور به بررسی شاخص‌های مرفومنتریک و خصوصیات مولکولی (28S, rDNA) شامل تعیین توالی و الگوی RFLP پرداخته، به روشنی نشان داد تنها گونه‌ی دیکروسلیوم که باعث بروز دیکروسلیازیس در گوسفندان شمال و مرکز ایران می‌شود، دیکروسلیوم دندربیتکوم است. از این‌رو با توجه به زیان‌های اقتصادی بیماری کترل 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, 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, Ziae 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 (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. 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 1srDNA 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 digenetic 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.