

# شناسائی مرفومتريک و مولکولی دیکروسلیوم دندریتیكوم با استفاده از مارکر ژنتیکی ND1 در دام‌های اهلی استان مرکزی

الناز نظامی، محسن اربابی، حسین هوشیار، مهدی دلاوری

گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

(دریافت مقاله: ۲۵ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۵ شهریور ماه ۱۳۹۷)

## چکیده

**زمینه مطالعه:** دیکروسلیازیس از شایع‌ترین بیماری‌های انگلی مجاری صفراوی و کیسه صفراوی طیف وسیعی از پستانداران از جمله نشخوارکنندگان اهلی و گاهی انسان است. این بیماری حائز اهمیت پزشکی، دامپزشکی و اقتصادی فراوانی است به گونه‌ای که سالیانه باعث از دست رفتن مقادیر قابل توجهی مواد پروتئینی با ارزش از رژیم غذایی انسان می‌شود. به منظور کنترل بیماری، شناخت مرفولوژیکی و خصوصیات مولکولی انگل در مناطق آندمیک ضروری است.

**هدف:** مطالعه حاضر به منظور تعیین خصوصیات مرفولوژیکی و مولکولی ایزوله‌های گاوی، گوسفندی و بز دیکروسلیوم با استفاده از مارکر ژنتیکی ND1 در استان مرکزی صورت گرفت.

**روش کار:** در این مطالعه مقطعی، ۴۸۰ کرم بالغ تازه دیکروسلیوم از کبد ۱۲۰ گاو، گوسفند و بز ذبح شده در کشتارگاه استان مرکزی، جمع آوری گردید. به منظور تعیین گونه انگل، شاخص‌های مرفولوژیکی کرم بالغ بر اساس پارامترهای استاندارد محاسبه شد. از این تعداد DNA میتوکندریایی ۶۰ ایزوله استخراج و واکنش PCR برای تکثیر بخشی از ناحیه ND1 صورت گرفت. سپس محصول PCR خالص و تعیین توالی گردید و درصد مشابهت ژنتیکی بین سکانس‌ها و در مقایسه با موارد ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نرم افزار Clustalw2 تعیین و گونه دقیق انگل تشخیص داده شد.

**نتایج:** بررسی مرفومتريک کرم بالغ در تمامی ایزوله‌ها، بیضه‌ها را پشت سرهم و طول کرم را برای ایزوله‌های گاوی، گوسفندی و بز به ترتیب:  $799.4 \pm 96.7 \mu\text{m}$ ،  $684.4 \pm 110 \mu\text{m}$  و  $657.0 \pm 110 \mu\text{m}$  ( $P < 0.0001$ ) و عرض کرم را برای ۳ میزبان مورد بررسی به ترتیب:  $4.64 \pm 0.622$  و  $4.58 \pm 0.625$ ،  $4.187 \pm 0.641$  و نسبت طول به عرض را به ترتیب:  $143.0 \pm 25.2 \mu\text{m}$  و  $149.0 \pm 22.1 \mu\text{m}$  ( $P < 0.0001$ ) و آنالیز الکتروفورز ژل محصول PCR در تمامی ایزوله‌ها، وجود باند  $200 \text{ bp}$  را نشان داد. درصد مشابهت ژنتیکی توالی‌های بدست آمده در مقایسه با موارد ثبت شده در بانک ژن بین ۹۷ تا ۹۹ درصد بود.

**نتیجه گیری نهایی:** آنالیز مولکولی و مرفومتريک نشان داد که دیکروسلیوم دندریتیكوم، تنها عامل ایجاد کننده دیکروسلیازیس در دام‌های کشتارگاهی استان مرکزی می‌باشد. شناسائی مولکولی انگل با استفاده از مارکرهای ژنتیکی هسته توصیه می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** دیکروسلیوم دندریتیكوم، شاخص مرفومتريک، شناسائی مولکولی، ژن ND1، دام اهلی

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

(\* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۱-۵۵۵۴۰۰۲۱، نمابر: ۰۳۱-۵۵۵۴۱۱۲، Email: arbabi4.mohsen@yahoo.com

## How to Cite This Article

Nezami, E., Arbabi, M., Hooshyar, H., Delavari, M. (2019). Morphological and Molecular Detection of *Dicrocoelium dendriticum* Isolated from Domestic Animals Based on Genetic ND1 Marker in Markazi Province. *J Vet Res*, 74(1), 27-34. doi: 10.22059/jvr.2019.229991.2605



## مقدمه

شناسائی گونه‌ها از یکدیگر بطور دقیق می‌باشد (۲۰، ۲۰). علی‌رغم اهمیت دیکروسلیازیس، اطلاعات محدودی در مورد خصوصیات مرفومتربیک و ژنومیک عامل ایجاد کننده بیماری در دسترس می‌باشد. با توجه به شیوع بالای دیکروسلیازیس و لزوم بکارگیری استراتژی‌های کنترل و پیشگیری مؤثر و کارآمد در دام‌های کشور، لازم است در کنار استفاده از روش‌های انگل شناسی، از تکنیک‌های نوین بخصوص روش‌های مولکولی حساس و قابل اعتماد جهت تشخیص دقیق عامل بیماری و انتشار گونه‌ها در میزبانان مناطق مختلف جغرافیائی کشور استفاده شود. به همین منظور هدف از مطالعه حاضر، تعیین خصوصیات مرفولوژیکی و مولکولی ایزوله‌های دیکروسلیوم جمع آوری شده از دام‌های ذبح شده در کشتارگاه استان مرکزی براساس مارکر ژنتیکی ND۱ می‌باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند در تشخیص، درمان، بکارگیری استراتژی‌های کنترل و پیشگیری از بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش کار

**جمع آوری نمونه:** این تحقیق با طراحی مقطعی (Cross-Sectional) روی ۱۲۰ کبک شامل (۴۰ کبک گاو، ۴۰ کبک گوسفند و ۴۰ کبک بز) جمع آوری شده از کشتارگاه صنعتی استان مرکزی طی سال ۱۳۹۵ صورت گرفت. تشخیص آلودگی به ترمانود کبیدی دیکروسلیوم پس از کالبد گشائی کامل حیوان و معاینه دقیق کبک و مجاری صفراوی و ایجاد برش در بافت توسط دامپزشک صورت گرفت. کبدهای آلوده در اسرع وقت به آزمایشگاه انگل شناسی منتقل و پس از باز نمودن کامل کلیه مجاری صفراوی، تمامی کرم‌های موجود بدون هر گونه آسیب فیزیکی جدا و شمارش گردید. از هر میزبان ۱۶۰ کرم بالغ تازه دیکروسلیوم دندریتیوکوم و در مجموع ۴۸۰ کرم برای شناسایی ۲۱ شاخص مرفولوژیکی و مرفومتربیک پس از حداقل ۳ بار سستشو با سرم فیزیولوژی انتخاب گردید. شاخص‌ها و نسبت‌های مرفولوژیکی و مرفومتربیک مورد مطالعه عبارت بود از: اندازه بدن (طول و عرض و نسبت طول به عرض بدن)، اندازه بادکش‌ها (قطر داخلی و خارجی بادکش شکمی و دهانی، نسبت قطر خارجی بادکش دهانی به شکمی و فاصله بین بادکش‌ها)، اندازه بیضه (طول و عرض)، اندازه تخمدان (طول و عرض)، طول غدد زرده (راست و چپ)، قطر اووتیپ، فاصله بادکش شکمی تا انتهای خلفی بدن، اندازه رحم (طول و عرض)، طول سیر و نسبت طول بدن به طول غدد زرده برحسب میکرومتر اندازه‌گیری و محاسبه شد (۱۸). نمونه‌ها تا انجام کار مولکولی در  $80^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ تجزیه و تحلیل و مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

**استخراج DNA ژنومی از کرم بالغ:** از هر میزبان، ۲۰ کرم بالغ دیکروسلیوم با ویژگی‌های متفاوت مرفولوژیکی و مرفومتربیک و در

دیکروسلیازیس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مجاری صفراوی و کیسه صفراوی طیف وسیعی از نشخوارکنندگان اهلی و وحشی و گاهی خرگوش، خوک، اسب و انسان با گسترش جهانی می‌باشد (۱۳، ۳). عامل ایجاد کننده بیماری ترمانود دی ژنه‌آمتعلق به جنس دیکروسلیوم است که تاکنون ۳ گونه از آن به نام‌های: دیکروسلیوم دندریتیوکوم از سراسر اروپا، آفریقا و آمریکا، دیکروسلیوم هاسپس از آفریقا و دیکروسلیوم چاینسیس از آسیا گزارش شده است (۱). از بین این ۳ گونه، دیکروسلیوم دندریتیوکوم حائز اهمیت پزشکی، دامپزشکی و اقتصادی بیشتری است. شیوع آلودگی انسانی روند افزایشی داشته و از این جهت ترمانود کبیدی دیکروسلیوم دندریتیوکوم یکی از عوامل مهم تهدید کننده سلامت انسان بشمار می‌رود (۱۴). این بیماری بشدت سلامت میزبان خود را به خطر انداخته به گونه‌ای که باعث عفونت شدید کبد و در نتیجه تحمل خسارات قابل توجهی به اقتصاد دامپروری، مرگ و میر، کاهش تولیدات دامی و افزایش استفاده از داروهای ضد کرمی می‌شود (۱۳، ۹، ۱۱). بررسی‌های صورت گرفته در نقاط مختلف ایران نشان می‌دهد، آلودگی به ترمانود کبیدی دیکروسلیوم دندریتیوکوم شیوع متفاوتی دارد، به گونه‌ای که نسبت آلودگی در گاو ۰/۰۱ درصد تا ۶ درصد، گوسفند ۰/۰۳ درصد تا ۲۰ درصد، بز ۰/۰۲ درصد تا ۳۳/۳ درصد و در گاو میش ۰/۸ درصد تا ۱۱/۱ درصد در مناطق مختلف جغرافیائی کشور گزارش شده است (۸-۲). همچنین یک مرور سیستماتیک و متاآنالیز شیوع نسبی آلودگی در گوسفندان، بزها و گاوهای کشتار شده در مناطق مختلف کشور را به ترتیب: ۳/۱ درصد، ۱/۳ درصد و ۰/۵ درصد نشان داده است (۳). ارزش اقتصادی کبدهای معدوم شده دام‌های کشتارگاهی آلوده به این کرم در ایران بالغ بر ۸۰۹۹۴۱۸ دلار برآورد شده است (۷). تشخیص دیکروسلیازیس براساس آزمایش مدفوع و مشاهده تخم، بررسی‌های هماتولوژیک، شناسائی آنتی بادی‌های اختصاصی و تکنیک‌های بیوشیمیائی (۱۶) صورت می‌گیرد. در کشتارگاه پس از اتوپسی کامل حیوان، تشخیص بر اساس مشاهده کرم بالغ در کبک، کیسه صفر و همچنین معاینات آناتومیک و بررسی‌های ایمونوپاتولوژیک صورت می‌گیرد (۵). استفاده از شاخص‌ها و نسبت‌های مرفومتربیک از جمله: وضعیت قرار گرفتن بیضه‌ها، اندازه بدن (طول و عرض)، قطر بادکش شکمی (داخلی و خارجی)، قطر بادکش دهانی (داخلی و خارجی)، طول و عرض بیضه‌ها و طول غدد و تیلوژن برای شناسائی گونه‌های جنس دیکروسلیوم توسط محققین بکار گرفته شده و براساس آن گونه‌های مختلف انگل از یکدیگر تشخیص داده شده است. در عین حال این روش برای تشخیص دقیق تغییرات درون گونه‌ای فاقد حساسیت لازم می‌باشد (۲، ۱). امروزه برای شناسائی تغییرات درون گونه‌ای و بین گونه‌ای ترمانودهای کبیدی جنس دیکروسلیوم از مارکرهای ژنتیکی قابل اعتماد از جمله ژن‌های هسته ۱۸S، ۲۸S و ITS۲ و همچنین ژن‌های میتوکندریائی (ND۱ و CO۱) استفاده می‌شود. این مارکرها قادر به جداسازی و

جدول ۱. جفت پرایمراختصاصی استفاده شده برای تکثیر ناحیه میتوکندریایی ND1.

پرایمر	نام	ترادف	طول
رفت	DdND1F	۳-TGTGTTTCGTTCTGCTTTGGG-۵	۲۰bp
برگشت	DdND1R	۳-ACTCACACAACACGCCAATC-۵	۲۰bp

جدول ۲. مقایسه شاخص‌های مرفومتريک دیکروسلیوم دندریتیکیوم جمع آوری شده از کشتارگاه اراک به تفکیک میزبان طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴.

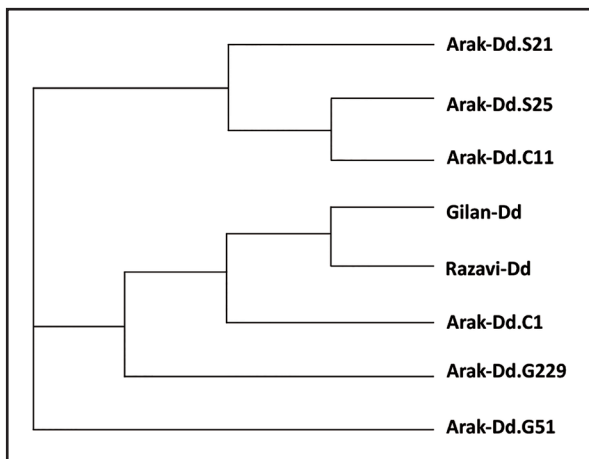
میزبان شاخص مرفومتريک	گاو X±SD	گوسفند X±SD	بز X±SD	مقایسه آماری
طول (µm)	۷۹۹۴±۹۶۷	۶۸۴۴±۱۰۰	۶۵۷±۱۱۰	P<۰/۰۰۰۱
عرض (µm)	۱۶۴۹±۳۳۹	۱۴۹±۲۲۱	۱۴۳±۲۵۲	P<۰/۰۰۰۱
نسبت طول به عرض	۴/۸۷±۰/۶۴۱	۴/۵۸±۰/۶۲۵	۴/۶۴±۰/۶۲۲	P<۰/۰۰۰۱
قطر خارجی بادکش شکمی (µm)	۴۳۲/۲±۱۰۷/۳۶	۴۰۳/۱۳±۱۲۵/۸۲	۳۸۹/۳۸±۸۷/۴۴	P<۰/۰۰۰۱
قطر داخلی بادکش شکمی (µm)	۱۵۹/۲۲±۴۴/۹۲	۱۴۸/۷۹±۵۲/۱۲	۱۵۷/۰۳±۴۹/۲۲	P<۰/۰۰۰۱
قطر خارجی بادکش دهانی (µm)	۳۱۲/۵±۷۷/۴۵	۲۷۹/۵۳±۷۴/۱	۲۷۴/۶۶±۷۷/۳۲	P<۰/۰۰۰۱
قطر داخلی بادکش دهانی (µm)	۱۲۷/۴±۴۷/۹۶	۱۰۷/۶۳±۲۸/۸۰	۱۱۴/۶۹±۲۷/۱	P<۰/۰۰۰۱
نسبت قطر خارجی بادکش دهانی به شکمی	۷/۴۶±۰/۴۷۵	۷/۴۴±۰/۲۲۵	۷/۴۴±۰/۲۲۹	P<۰/۰۰۰۱
فاصله بین بادکش‌ها (µm)	۷۸۹/۲۲±۲۳۷/۳۳	۷۰۵/۱۳±۱۹۳/۵۵	۷۸۲/۴±۶۹/۵۰	P<۰/۰۰۰۱
طول بیضه (µm)	۷۲۶/۲±۱۰۶/۱۱	۷۰۹/۲±۴۴۷/۶۷	۷۴۹/۵۴±۷۸/۵۴	P<۰/۰۰۰۱
عرض بیضه (µm)	۵۹۰/۱±۱۲۳/۳۳	۵۲۳/۱±۱۲۰/۰۱	۵۰۷/۶۳±۱۲۲/۹۷	P<۰/۰۰۰۱
طول تخمدان (µm)	۳۱۸/۴۴±۷۸/۱۳	۲۹۱/۴±۷۹/۲۶	۳۰۲/۷۲±۹۷/۳۱	P<۰/۰۰۰۱
عرض تخمدان (µm)	۱۷۸/۸۳±۱۶/۸۰	۱۶۶/۷۲±۶۷/۶۹	۱۶۶/۳±۶۴/۹۰	P<۰/۰۰۰۱
طول غدد زرده سمت راست (µm)	۱۸۱±۴۴۹	۱۵۳±۳۴۹	۱۵۰±۳۱۷	P<۰/۰۰۰۱
طول غدد زرده سمت چپ (µm)	۱۷۹±۴۳۸	۱۵۶±۳۲۱	۱۴۸±۳۵۹	P<۰/۰۰۰۱
قطر اووتیپ (µm)	۵۸/۱۳±۵/۶۳	۵۸/۲۲±۵/۶۶	۵۸/۱۶±۵/۳۱	P<۰/۰۰۰۱
فاصله بادکش شکمی تا انتها (µm)	۶۷۳۹/۳۸±۹۵/۲۵	۵۷۲۶/۵۷±۱۰۰۷/۰۹	۵۵۸۳/۱±۱۰۲۷/۵۵	P<۰/۰۰۰۱
طول رحم (µm)	۶۴۶۶/۱±۱۱۷۴/۰۲	۵۴۶۴/۸۴±۱۱۳۸/۰۴	۵۳۵۹±۱۲۹۱/۷۶	P<۰/۰۰۰۱
عرض رحم (µm)	۱۲۴۹/۳۸±۲۳۰/۵۷	۱۱۷۷/۸۸±۲۳۷/۷۳	۱۰۸۰/۴۷±۲۰۶/۲۶	P<۰/۰۰۰۱
طول سیر (µm)	۳۲۸/۷۶±۱۷۵/۸۲	۲۶۲/۶۶±۱۲۶/۸۳	۲۶۶/۴±۱۲۷/۰۲	P<۰/۰۰۰۱
نسبت طول بدن به طول غدد زرده	۴/۵۴±۰/۶۷۶	۴/۵۰±۰/۶۵۱	۴/۴۵±۰/۵۵۷	P<۰/۰۰۰۱

واکنش PCR، تعیین توالی ژن و ترسیم درخت فیلوژنی ND1:

قطعه‌ای از ژن ND1 به اندازه تقریبی ۲۰۰ bp تکثیر شد. مخلوط PCR به حجم ۲۰ µl شامل: ۲ µl DNA انگل، ۲ µl Master Mix، ۱ µl پرایمر Forward، ۱ µl پرایمر Reverse و ۱۴ µl آب مقطر استریل تهیه و واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Flex cycler (انگلستان) با پروتکل زیر صورت گرفت: مرحله واسرشت ابتدایی ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر ۵۵°C به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل شدن زنجیره ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه. این ۳ مرحله به تعداد ۳۰ سیکل و در نهایت یک سیکل به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام گرفت. سپس ۴ µl از محصول PCR تهیه شده به همراه ۲ µl بافر loading در ژل آگاروز ۱/۵ درصد به همراه مارکر وزنی DNA ۱۰۰ bp، کنترل منفی (آب مقطر دو بار تقطیر) و کنترل مثبت (محصول PCR حاوی DNA استاندارد شده انگل) در ژل آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری و در ولتاژ ۸۰ آمپر به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و با

مجموع ۶۰ نمونه برای استخراج DNA انتخاب گردید. برای انجام این کار، نمونه‌ها را از فریزر خارج نموده و پس از ۳ بار شستشو با بافر PBS استریل سرد، محلول هموزنی از بافت انگل تهیه و به آن ۲۰۰ µl بافر لیز کننده اضافه و به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم ۵۶°C انکوبه و سپس عمل استخراج DNA با استفاده از کیت بافتی Bioneer Accu Prep (کره جنوبی) و مطابق با دستور العمل کارخانه سازنده با تغییراتی در زمان انکوباسیون و مقدار آنزیم پروتئیناز K صورت گرفت. خلوص DNA استخراج شده با دو روش الکتروفورز ژل آگاروز و اسپکتروفتومتری UV طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تایید گردید. طراحی پرایمرهای اختصاصی گونه برای ژن مورد مطالعه، با استفاده از نرم افزار Primer3 صورت گرفت و اختصاصیت و عملکرد آن با نرم افزار BLAST تایید گردید. در جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده نشان داده شده است. پس از حصول اطمینان از کیفیت محصول، DNA استخراج شده با ۸۰ µl محلول Elution رقیق شده و تا زمان انجام واکنش PCR در ۲۰°C - نگهداری شد.





تصویر ۱. درخت فیلوژنتیک ایزوله‌های گاو، گوسفند و بز دیکروسلیوم دندردیتیکوم جمع آوری شده از کشتارگاه استان مرکزی براساس ناحیه ND1 (mtDNA) و استفاده از الگوریتم neighbor joining با ۲۰۰۰ بازتکرار در استان مرکزی.



تصویر ۲. الکتروفورز ژل ۱/۵ درصد محصول PCR ناحیه ژنومی ND1 دیکروسلیوم دندردیتیکوم قطعات تکثیر شده ۲۰۰ bp، ۳-۱ ایزوله گاو، ۴، ۵، ۶، ۷ بزی نمونه گیری شده از کشتارگاه استان مرکزی، (N) کنترل منفی، (M) مارکر وزنی ۱۰۰ bp.

نشخوارکنندگان استان مرکزی می‌شود. یکی از شاخص‌های مرفومتريک قابل اعتماد و مهم برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم، موقعیت قرار گرفتن بیضه‌ها می‌باشد. مطالعه Otranto و همکارانش در سال ۲۰۰۷ که بر روی گوسفندان اتریشی، آلمانی و ایتالیایی آلوده به ترماتود کبیدی دیکروسلیوم صورت گرفته بود، نشان داد در تمامی ایزوله‌های دیکروسلیوم چاینسیس دو بیضه در کنار هم قرار دارد، ولی در ایزوله‌های دیکروسلیوم دندردیتیکوم موقعیت قرار گرفتن بیضه‌ها پشت سرهم می‌باشد. همچنین پهنای بدن در قسمت میانی دیکروسلیوم چاینسیس نسبت به دیکروسلیوم دندردیتیکوم بیشتر می‌باشد (۱۵). یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد، بیضه‌ها در تمامی ایزوله‌ها موقعیت پشت سرهم دارد که بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت، تنها عامل دیکروسلیازیس در استان مرکزی، دیکروسلیوم دندردیتیکوم می‌باشد. Taira و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ با استفاد از این شاخص، تنهاگونه آلوده کننده آهوی ika در ژاپن را دیکروسلیوم چاینسیس تشخیص دادند (۱۸). شاخص مهم دیگر اندازه طول و عرض

استفاده از ترانس لومیناتور باندهای تشکیل شده آنالیز گردید. برای منظور دستیابی به توالی ژن ND1 دیکروسلیوم، محصول PCR ۸ ایزوله با استفاده از سکانس DNA automa ۳۱۰ و هر دو پرایمر بکار رفته در واکنش PCR تهیه شده و پس از مرتب سازی در بانک ژن ثبت شد. توالی‌ها با استفاده از نرم افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) با موارد ثبت شده در بانک ژن مقایسه و میزان مشابهت ژنتیکی آن‌ها با استفاده از نرم افزار Clustalw2 مورد آنالیز دوبدو قرار گرفت. همچنین درخت فیلوژنی پس از هم ترازی چندگانه توالی‌ها، به همراه چند توالی ثبت شده از راسته پلاژور کید در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA5 و الگوریتم neighbor joining ترسیم گردید (۱۹).

## نتیج

**بررسی مرفومتريک:** از هر میزبان مورد مطالعه، ۱۶۰ گرم بالغ تازه دیکروسلیوم دندردیتیکوم و در مجموع ۴۸۰ نمونه برای شناسایی ۲۱ شاخص و نسبت مرفومتريک مورد مطالعه قرار گرفت. مقایسه پارامترهای مرفومتريک نشان داد که اندازه شاخص‌ها در ۳ میزبان تحت مطالعه با یکدیگر متفاوت است ( $P < 0.001$ ). در جدول ۲ شاخص‌ها و نسبت‌های مرفولوژیک و مرفومتريک ترماتود کبیدی دیکروسلیوم در گاو، گوسفند و بز با یکدیگر مقایسه شده است. موقعیت قرار گرفتن بیضه‌ها که معیار قابل اعتمادی برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم می‌باشد، در تمامی ایزوله‌ها، پشت سرهم (tandem) بود که خود موید گونه دیکروسلیوم دندردیتیکوم در میزبانان منطقه مورد مطالعه می‌باشد.

**بررسی مولکولی:** پس از استخراج DNA موجود در پیکره ۶۰ گرم بالغ، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، واکنش PCR انجام و اندازه ناحیه ژنومی ND1 در تمامی ایزوله‌ها باند ۲۰۰ bp نشان داده شد (تصویر ۱).

پس از بررسی‌های مولکولی، به منظور تأیید گونه انگل، از محصول تخلیص شده PCR تعیین توالی صورت گرفت. توالی‌ها پس از مرتب سازی در بانک جهانی ژن با شماره‌های LC189317/1، LC189318/1 به ثبت رسید. نتایج آنالیز دوبدوی توالی‌های ۳ میزبان مورد مطالعه و همچنین در مقایسه با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن، نشان دهنده مشابهت ژنتیکی ایزوله‌ها، بین ۹۷ تا ۹۹ درصد بود و به این ترتیب دیکروسلیوم دندردیتیکوم تنها گونه آلوده کننده جنس دیکروسلیوم در بین نشخوارکنندگان استان مرکزی تعیین گردید. همچنین آنالیز فیلوژنتیک توالی‌ها نشان داد، تمامی ایزوله‌های مورد مطالعه مربوط به گونه دیکروسلیوم دندردیتیکوم می‌باشد (تصویر ۲).

## بحث

در این مطالعه با دوروش مرفومتريک و تعیین توالی نشان داده شد از بین ۳ گونه جنس دیکروسلیوم، تنها دیکروسلیوم دندردیتیکوم باعث آلودگی

توالی بدست آمده گونه، و توالی بدست آمده، دیکروسلیوم دندریتیوکوم را تنها گونه غالب انگل در گاو و گوسفند در ایران معرفی کرده است (۶). در تحقیق حاضر از این ژن برای توصیف تغییرات درون گونه‌ای دیکروسلیوم در استان مورد مطالعه استفاده شد. براساس این مارکربین توالی‌های ایزوله‌های گاوی گوسفندی بزی با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن تا ۹۹ درصد شباهت دارند.

**نتیجه گیری:** پژوهش حاضر که برای اولین بار در استان مرکزی به مطالعه شاخص‌های مرفومتربیک و خصوصیات مولکولی (ND۱) و تعیین توالی پرداخته است، نشان داد دیکروسلیوم دندریتیوکوم تنها گونه دیکروسلیوم است که باعث بروز دیکروسلیوزیس در نشخوارکنندگان استان مرکزی می‌شود. از این رو با توجه به زیان‌های اقتصادی بیماری کنترل و پیشگیری از آن کاملاً ضروری می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مدیریت اداره دامپزشکی و دامپزشکان محترم مسئول فنی کشتارگاه استان مرکزی که در انجام نمونه‌گیری نهایت همکاری را مبذول داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد. این تحقیق از محل اعتبار ویژه پژوهشی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان (طرح شماره ۹۴۱۴۲) انجام شده که بدین وسیله از مسئولین محترم معاونت پژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

### References

1. Arbabi, M., Dalim, A., Ghafarifar, F., Foroozaneh- Moghadam, M. (2011). Prevalence and Intensity of *Dicrocoelium dendriticum* in Sheep and Goats of Iran. Res J Parasitol, 6, 160-167.
2. Bari, S., Arbabi, M., Gill, P., Sharif, M., Ziaei Hezarjaribi, H., Dodangeh, S., Alizadeh, A., Hedayati, Z., Sarvi, S.H. (2018). Morphological and Molecular (28s rDNA) Characterization of *Dicrocoelium dendriticum* Isolates from Sheep, Goat and Cattle in Mazandaran Province, Iran. J Mazandaran Univ Med Sci, 28, 38-45 (Persian).
3. Bari, S., Sarvi, S.H., Daryani, A., Ziaei Hezarjaribi, H., Arbabi, M., Pirestani, M., Mizani, A. (2015). *Dicrocoelium dendriticum* infection among domestic animals in Iran: A systematic Review and Meta-analysis. J Mazandaran Uni

کرم بالغ می‌باشد. در مطالعه حاضر طول کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیوکوم در ایزوله‌های گوسفند و بز به ترتیب:  $6/84 \pm 0/1$  mm و  $6/57 \pm 0/11$  mm ( $P < 0/0001$ ) و عرض آن برای ۲ میزبان مورد بررسی به ترتیب:  $1/49 \pm 0/22$  و  $1/43 \pm 0/25$  ( $P < 0/0001$ ) و نسبت طول به عرض به ترتیب:  $4/58 \pm 0/625$  و  $4/64 \pm 0/622$  ( $P < 0/0001$ ) محاسبه شد که موید گونه دیکروسلیوم دندریتیوکوم در میزبانان منطقه مورد مطالعه می‌باشد. در مطالعه Bari و همکاران در سال ۲۰۱۸ طول و عرض کرم بالغ در ایزوله‌های گوسفند دیکروسلیوم  $7/71 \pm 1/66$  mm و  $1/65 \pm 0/46$  mm و در ایزوله‌های بز  $6/73 \pm 0/104$  mm و  $1/65 \pm 0/03$  mm محاسبه شده است (۲). در مطالعه Otranto و همکارانش در سال ۲۰۰۷، طول و عرض کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیوکوم ایزوله گوسفند به ترتیب در محدوده  $4/70 - 5/60$  mm ( $4/05 \pm 0/33$ ) و  $1/30 - 1/80$  mm ( $1/47 \pm 0/29$ ) گزارش شده است (۱۵) که بدین ترتیب طول و عرض کرم‌های بالغ دیکروسلیوم دندریتیوکوم دام‌های کشتارگاهی استان مرکزی در مقایسه با نتایج مطالعه Bari و همکاران کوتاه‌تر است (۲) ولی در مقایسه با مطالعه Otranto و همکاران بلندتر می‌باشد (۱۵). نتایج این تحقیق نشان داد، علی‌رغم مشاهده اختلافات مرفومتربیک قابل ملاحظه درون گونه‌ای، تفاوت اندکی در توالی‌های ژن میتوکندریایی ND۱ مشاهده می‌شود، به گونه‌ای که در بین ایزوله‌ها و همچنین در مقایسه با موارد ثبت شده در بانک ژن حداقل ۷۰ درصد شباهت ژنتیکی وجود دارد که خودگوبایی این واقعیت است که تنها گونه دیکروسلیوم دندریتیوکوم قادر به آلودگی دام‌های منطقه مورد مطالعه می‌باشد. تاکنون اطلاعاتی کمی در مورد خصوصیات مرفومتربیک گونه‌های دیکروسلیوم در اختیار می‌باشد (۱۷، ۱۲، ۱۰). از این رو ارزیابی تغییرات درون گونه‌ای و بررسی موتاسیون با این روش بطور دقیق امکان پذیر نمی‌باشد. بنابراین استفاده از تکنیک‌های نوین از جمله روش‌های مولکولی جهت تشخیص هویت انگل و بررسی تغییرات درون گونه‌ای و بین گونه‌ای با استفاده از مارکرهای ژنتیکی قابل اعتماد ضروری است. پیشرفت‌هایی که در زمینه بیولوژی مولکولی به ویژه تکثیر نواحی خاصی از ژنوم انگل به شیوه واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز حاصل شده، اختلافات بارزی در نوع و ترتیب بازهای آلی گونه‌های مختلف موجودات شناسایی نموده که این تفاوت‌ها می‌توانند گونه‌های مشابه را از همدیگر تفکیک کنند. مطالعات مولکولی در زمینه ویژگی‌های ژنتیکی گونه دیکروسلیوم به‌طور محدودی در ایران و جهان صورت گرفته است و در عین حال تمامی مطالعات نشان دهنده دیکروسلیوم دندریتیوکوم به عنوان گونه غالب که قادر به ایجاد بیماری دیکروسلیوزیس در دام‌های اهلی می‌باشد، از جمله مطالعات Bari و همکاران در سال ۲۰۱۸ که با استفاده از مارکر ژنتیکی (28S,rDNA) تنها عامل دیکروسلیوزیس در گوسفندان استان مازندران را دیکروسلیوم دندریتیوکوم گزارش کرده است (۲). همچنین Gorjipoor و همکاران در سال ۲۰۱۵ با استفاده از ژن ND۱ و ITS۲



- Med Sci, 25(132), 362-370 (Persian).
4. Borji, H., Azizzadeh, M., Kameli, M. (2012). A retrospective study of abattoir condemnation due to parasitic infections and its economic importance in Ahwaz, southwestern of Iran. *J Parasitol*, 98, 954-957. <https://doi.org/10.1645/GE-2988.1> PMID: 22568697
  5. Ferreras-Estrada, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F., Manga-González, M.Y. (2007). Immunohistochemical study of the local immune response in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol Res*, 101, 547-555. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0511-1> PMID: 17393185
  6. Gorjipoor, S., Moazeni, M., Sharifyazdi, H. (2015). Characterization of *Dicrocoelium dendriticum* haplotypes from sheep and cattle in Iran based on the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) and NADH dehydrogenase gene (nad1). *J Helminthol*, 89, 158-164. PMID: 24119243
  7. Jahed Khaniki, Gh.R., Beigom Kia, E., Raei, M. (2013). Liver condemnation and economic losses due to parasitic infections in slaughtered animals in Iran. *J Parasit Dis*, 37, 240-244. <https://doi.org/10.1007/s12639-012-0172-6> PMID: 24431577
  8. Khanjari, A., Bahonar, A., Fallah, S., Bagheri, M., Alizadeh, A., Fallah, M., Khanjari, Z. (2014). Prevalence of fasciolosis and dicrocoeliosis in slaughtered sheep and goats in Amol Abattoir, Mazandaran, northern Iran. *Asian Pac J Trop Dis*, 4, 120-124. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60327-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60327-3)
  9. Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Prepelitchi, L., Carbajo, A.E., Wisnivesky-Colli, C. (2007). Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. *Vet Parasitol*, 145, 274-286. <https://doi.org/10.1016/j.vet-par.2006.12.020> PMID: 17270347
  10. Manga-González, M.Y., Gonzalez-Lanza, C. (2005). Field and experimental studies on *Dicrocoelium dendriticum* and dicrocoeliasis in northern Spain. *J Helminthol*, 79, 291-302. PMID: 16336711
  11. Manga-González, M.Y., Quiroz-Romero, H., González-Lanza, C., Miñambres, B., Ochoa, P. (2010). Strategic control of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg excretion by naturally infected sheep. *Vet Med*, 55, 19-29.
  12. Maurelli, M.P., Rinaldi, L., Capuano, F., Perugini, A.G., Veneziano, V., Cringoli, G. (2007). Characterization of the 28S and the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium hospes*. *Parasitol Res*, 101, 1251-1255. PMID: 17605007
  13. Meshgi, B., Khodaveisi, M. (2014). Determination of immunodominant antigens of *Dicrocoelium dendriticum* by hyperimmune sera. *Immunol Infect Dis*, 2, 4-8.
  14. Nguyen, T.G., Van De, N., Vercruyse, J., Dorny, P., Le, T.H. (2009). Genotypic characterization and species identification of *Fasciola* spp. with implications regarding the isolates infecting goats in Vietnam. *Exp parasitol*, 123, 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.09.001> PMID: 19733565
  15. Otranto, D., Rehbein, S., Weigl, S., Cantacessi, C., Parisi, A., Lia, R.P., Olson, P.D. (2007). Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Tropica*, 104, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.07.008> PMID: 17803950
  16. Samadie, H., Mohammadi Gh.R., Heidarpour, M., Azizzadeh, M., Maleki, M., Borji, H. (2016). Parasitic burdens, egg output, hemathologic, and biochemical changes in naturally infected lambs with *Dicrocoelium dendriticum*. *Iran J Parasitol*, 11, 358-363. PMID: 28127341
  17. Sandoval. H., Manga-González. Y., Campo, R., García, P., Castro, J.M., Pérez de la Vega, M. (1999). Preliminary study on genetic variability of *Dicrocoelium dendriticum* determined by random amplified polymorphic DNA. *Parasitol Int*, 48, 21-26. PMID: 11269322
  18. Taira, K., Shirasaka, S., Taira, N., Ando, Y., Adachi, Y. (2006). Morphometry on lancet flukes

- found in Japanese Sika deer (*Cervus nippon centralis*) captured in Iwate Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci*, 68, 375–377. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.375> PMID: 16679730
19. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Bio Evol*, 28, 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121> PMID: 21546353
20. Zhao, G.H., Bian, Q.Q., Ren, W.X., Jia, Y.Q., Cheng, W.Y., Fang, Y.Q., Song, J.K., Lin, Q. (2013). Genetic variability among *Dicrocoelium dendriticum* isolates from different regions in Shaanxi Province, China revealed by sequences of three mitochondrial genes. *Mitochondrial DNA*, 24, 683-688. PMID: 23521316



# Morphological and Molecular Detection of *Dicrocoelium dendriticum* Isolated from Domestic Animals Based on Genetic ND1 Marker in Markazi Province

Elnaz Nezami, Mohsen Arbabi, Hoosein Hooshiyar, Mahdi Delavari

Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received 15 May 2018, Accepted 27 August 2018)

## Abstract:

**BACKGROUND:** Dicrocoeliasis is one of the commonest parasitic diseases of the bile ducts and gallbladder in a wide range of mammals including ruminants and sometimes human being. The disease is really important in medicine, economy, and veterinary medicine. Annually, slaughter house loses a huge amount because of losing a great deal of valuable proteins in people daily diets. In order to bring the disease under control, morphological and molecular analysis of parasite in endemic districts is essential.

**OBJECTIVES:** The present study was conducted to determine the morphological as well as molecular characterization of cattle, sheep and goats isolated from *Dicrocoelium* by applying ND1 genetic marker in the Markazi province, Iran.

**METHODS:** In this cross-sectional study 480 fresh adult worms were collected from livers of 120 cattle, sheep and goats slaughtered in abattoirs in Markazi province. To diagnose the species of parasite, morphometric indices of mature worms were calculated based on standard parameters. Then DNA of 60 isolates with different morphometric characteristics was extracted and PCR reaction was performed for a part of ND1 (mtDNA). PCR was purified and its sequence was defined, the percentage of genetic similarity was compared to cases registered by GenBank and the exact species of parasite was recognized.

**RESULTS:** The morphometric analysis in all isolates was as follows: testicles were sequential, the length and the width of the worm for all cattle, sheep and goat isolates were  $7994 \pm 967 \mu\text{m}$ ,  $6844 \pm 100 \mu\text{m}$ ,  $6570 \pm 110 \mu\text{m}$  ( $P < 0.0001$ ) and  $1649 \pm 339 \mu\text{m}$ ,  $1490 \pm 221 \mu\text{m}$  and  $1430 \pm 252 \mu\text{m}$  ( $P < 0.0001$ ) respectively. The proportion of the length to the width was  $4.87 \pm 0.641$ ,  $4.58 \pm 0.625$ , and  $4.64 \pm 0.622$  respectively. All the results mentioned above confirmed *Dicrocoelium dendriticum* in the hosts of the district under investigation. The analysis of the gel electrophoresis in all isolates showed the existence of band 200pb. The percentage of genetic similarity to the registered items, cases were determined by the Gen bank between 97 and 99 percent.

**CONCLUSIONS:** Molecular identification and morphometric assays clearly showed that *D. dendriticum* is the only agent of Dicrocoeliasis among cattle, sheep and goats in the Marakazi province, Iran. Molecular diagnosis of parasite by applying genetic marker of the nucleus is recommended.

## Keywords:

*Dicrocoelium dendriticum*, Morphometric assays, Molecular identification, ND1 gene, Livestock

## Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Specific pairs of primers used to amplify mitochondrial ND1 region.

**Table 2.** Comparison of morphological indices of *Dicrocoelium dendriticum* collected from Markazi province slaughterhouse according to the host species.

**Figure 1.** Electrophoresis analysis of ND1(200 bp). PCR amplification provided from cattle, sheep, and goats *Dicrocoelium dendriticum* samples collected from Markazi province (lane 1-3: Cattle,4,5:Sheep,6,7: goats) compared with the molecular weight marker(lane M, 100bp) and negative control(lane N).

**Figure 2.** Phylogenetic tree of *Dicrocoelium dendriticum* inferred from nucleotide sequences of partial ND1 isolates from cattle, sheep and goat in Markazi province of Iran and other previous registered sequences of different areas using maximum likelihood algorithm with kimura 2- parameter model and 2000 bootstrap resampling. Number indicates bootstrap values (%) from 2000 replicates.

