

Morphological and Molecular (28s rDNA) Characterization of Dicrocoelium dendriticum Isolates from Sheep, Goat and Cattle in Mazandaran Province, Iran

Simin Bari¹,
Mohsen Arbabi²,
Pooria Gill³,
Mehdi Sharif⁴,
Hajar Ziaei Hezarjaribi⁵,
Samira Dodangeh⁶,
Abbas Alizadeh⁷,
Zeinab Hedayati¹,
Shahabeddin Sarvi⁵

¹ MSc in Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Parasitology, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

³ Departments of PhysioPharmacology & NanoBioMedicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ PhD Student in Medical Parasitology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ PhD in Veterinary Physiology, Mazandaran Provincial Veterinary Service, Sari, Iran

(Received December 24, 2017 ; Accepted February 12, 2018)

Abstract

Background and purpose: Dicrocoeliasis is a prevalent parasite in ruminants caused by different species of *Dicrocoelium* spp. This parasite lives in bile duct and gallbladder of ruminants and accidentally in human. The economic significance of dicrocoeliasis is due to direct damage to the liver and, consequently, to the loss of significant amounts of protein. The present study aimed to investigate the morphometric and molecular (PCR and PCR-RFLP) parameters of *Dicrocoelium* species isolates from sheep, goat, and cattle in Mazandaran province, Iran during 2013-2015.

Materials and methods: In this descriptive study, 50 trematodes isolated from livers of sheep (n= 20), goat (n= 20), and cattle (n= 10) were collected from abattoirs in Mazandaran province. Adult worms were studied by morphometric and molecular methods on 28s rDNA. The RFLP technique was used to identify the genus. Some samples were also sequenced.

Results: All isolates of three hosts (sheep, goat, and cattle) showed significant differences in many morphological parameters. According to characterization of testicles that is a remarkable characteristic for differential diagnosis of *Dicrocoelium* species, they were in tandem position in all isolates. Moreover, no significant difference was observed in their size in different hosts. Four bands, including 116, 145, 393, and 409 bp were produced from PCR method after treatment by enzyme. In molecular technique, there were no any significant differences but in morphometric analysis, some differences were found.

Conclusion: The molecular and morphometric results indicated that *D. dendriticum* is the only species infecting sheep, goat, and cattle in Mazandaran province.

Keywords: *Dicrocoelium*, morphology, 28s rDNA, PCR-RFLP

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی (28s rDNA) دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گوسفند، بز و گاو در استان مازندران

سیمین باری^۱
محسن اربابی^۲
پوریا گیل^۳
مهدی شریف^۴
هاجر ضیایی^۵
سمیرا دودانگه^۶
عباس علیزاده^۷
زینب هدایتی^۱
شهاب الدین سروی^۵

چکیده

سابقه و هدف: دیکروسلیازیس بیماری شایع در نشخوارکنندگان است که توسط گونه‌های مختلف دیکروسلیوم ایجاد می‌شود. این انگل در مجاری صفراوی و کیسه صفرا نشخوارکنندگان و به طور تصادفی انسان دیده می‌شود. اهمیت اقتصادی دیکروسلیازیس به علت خسارت به کبد و در نتیجه از دست دادن مقادیر قابل توجهی از مواد پروتئینی می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی پارامترهای مورفومتریک و مولکولی (PCR و PCR-RFLP) ایزوله‌های گوسفندی، بز و گاو دیکروسلیوم دندریتیکوم در استان مازندران در سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۴ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی، در مجموع ۵۰ ایزوله ترما تود از کبدهای گوسفندی (۲۰ مورد)، بز (۲۰ مورد) و گاو (۱۰ مورد)، از کشتارگاه‌های مازندران جمع‌آوری شدند. کرم‌های بالغ با روش‌های مورفومتریک و مولکولی ناحیه 28s rDNA مورد بررسی قرار گرفتند. برای تشخیص گونه‌ی انگل از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. علاوه بر این، تعدادی از نمونه‌ها تعیین توالی شدند.

یافته‌ها: تمام ایزوله‌های سه میزبان (گوسفند، بز و گاو) در اغلب شاخصه‌های مورفولوژیک با هم اختلاف معنی‌دار داشتند. در مورد شاخص بیضه‌های انگل، که شاخص قابل اعتمادی برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم می‌باشد، در تمام ایزوله‌ها، بیضه‌ها پشت سر هم قرار داشتند و اختلاف معنی‌داری در اندازه آن‌ها در بین میزبانان مشاهده نشد. در بررسی مولکولی چهار باند ۱۱۶bp، ۱۴۵bp، ۳۹۳bp و ۴۰۹bp از محصول PCR بعد از تماس با آنزیم مشاهده شد. در بررسی توالی ایزوله‌های انگل، اختلاف ژنتیکی چندانی دیده نشد، در حالی که در بررسی مورفومتریک، تفاوت‌هایی مشاهده شد.

استنتاج: بررسی‌های مولکولی و مورفومتریک نشان داد که دیکروسلیوم دندریتیکوم تنها گونه‌ی آلوده کننده‌ی گوسفند، بز و گاو در استان مازندران است.

واژه‌های کلیدی: دیکروسلیوم، مورفولوژی، 28s rDNA، PCR-RFLP

مقدمه

دیکروسلیوم دندریتیکوم ترما تودی است که انگل پستانداران اهلی و وحشی به خصوص نشخوارکنندگان می‌باشد و حتی انسان نیز ممکن است به طور تصادفی به این انگل مبتلا شود. این کرم، انگل مجاری صفراوی،

E-mail: shahabesarvi@yahoo.com

مؤلف مسئول: شهاب الدین سروی - ساری: مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم - دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

۱. کارشناسی ارشد انگل شناسی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۲. دانشیار گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
 ۳. دانشیار گروه فیزیوفارماکولوژی و نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۴. استاد، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۵. دانشیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۶. دانشجوی دکتری انگل شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۷. دکترای تخصصی فیزیولوژی دامپزشکی، اداره کل دامپزشکی استان مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۱/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۲۳

مواد و روش ها

جمع آوری انگل دیکروسلیوم

در این مطالعه که از نوع توصیفی می باشد، با مراجعه به کشتارگاه های استان مازندران، تعداد ۵۰ کبد (۲۰ نمونه گوسفند، ۲۰ بز و ۱۰ گاو) آلوده به دیکروسلیوم از استان مازندران جمع آوری شد. کبدهای آلوده به آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی مازندران انتقال یافت و سپس با استفاده از قیچی جراحی و بیستوری، تمامی مجاری کبدی باز گردید و با سرم فیزیولوژی شسته شدند.

بررسی مورفومتريک و استخراج DNA

در این مرحله با استفاده از میکروسکوپ نوری، ۱۷ پارامتر مورفولوژیک مختلف از جمله اندازه ی بدن (طول و عرض)، نسبت طول به عرض، قطر بادکش شکمی (داخلی و خارجی)، قطر بادکش دهانی (داخلی و شکمی)، نسبت اندازه ی بادکش شکمی به بادکش دهانی، طول و عرض بیضه ها، طول غدد ویتلوژن، نسبت طول بدن به غدد ویتلوژن، فاصله ی بین بادکش شکمی تا انتهای بدن، طول کیسه ی سیر، طول و عرض تخمدان و فاصله ی بین بادکش دهانی و شکمی بر حسب میکرون اندازه گیری شدند. در مرحله بعد، جهت آماده سازی برای آزمایشات مولکولی، DNA انگل ها با استفاده از روش فنل کلروفرم استخراج شدند.

انجام واکنش PCR و تعیین توالی ژن 28s rDNA

تکثیر قطعات 28s rDNA با استفاده از مخلوط PCR به حجم ۲۵ μl شامل ۴ انگل، Master Mix به میزان ۱۲/۵ μl، ۰/۵ μl از هر آغازگر رفت و برگشت و ۷/۵ μl آب مقطر تریقی انجام شد. قطعه باز 28s rDNA به اندازه ی ۹۶۳bp (Gen Bank accession no: AF151939.1) Dd28SF و با استفاده از پرایمرهای (3'-GTGGCCAGTTGGTCATTAGG-5') و (3'-ACCTCAGTCTGGACAAGCCA-5') Dd28SR

کبد و کیسه صفرا است (۱). میزبان اصلی آن، گوسفندها، میزبانان واسط اول، حلزون های خاکزی از جمله هلی سلا و زبرینا و میزبان واسط دوم آن مورچه ها به ویژه فورمیکا فوسکا هستند (۲). اندازه ی این کرم نسبت مستقیمی با اندازه جثه ی میزبان نهایی دارد.

دیکروسلیوم انتشار جهانی دارد و در اروپا، آسیا و امریکای شمالی و جنوبی شایع تر است (۱، ۲). در ایران نیز آلودگی به این انگل در اکثر نقاطی که پرورش دام رایج است، دیده می شود (۳). مطالعات نشان داده است که آلودگی به این کرم موجب زیان های اقتصادی فراوانی می شود، که از جمله می توان به افت کیفیت محصولات دام در اثر جایگزینی انگل در کبد، حذف کبدهای آلوده، ضبط و حذف لاشه های آلوده در اثر لاغری مفرط، مرگ و میر گوسفندها در آلودگی های بسیار شدید و هزینه های درمانی آن اشاره کرد (۴). این کرم در گاو، بز و گوسفند جوان علایم بالینی مشخصی ایجاد نمی کند، اما به علت این که به مدت طولانی در بدن زنده می ماند، به مرور زمان بر حدت و بیماری زایی آن افزوده می شود و در گوسفندهای مسن باعث سیروز کبدی پیشرفته می شود. از علایم بالینی آن می توان به لاغری مفرط، کاهش تولید پشم و شیر و کاهش رشد اشاره نمود. هم چنین استقرار این کرم باعث مستعد شدن گوسفند و بز به بیماری مهلک تورم قانقاریایی کبد می گردد (۵). اختلالات کبدی در انسان، که معمولاً دچار عفونت خفیف می شود، چندان بارز نیست. علائم بیماری در انسان شامل اختلالات گوارشی، نفخ، استفراغ، کولیت صفراوی، یبوست مزمن یا اسهال بوده و مسمومیت با آن، خفیف تر از فاسیولیازیس است (۶-۸). به همین دلایل دیکروسلیازیس از نظر اقتصادی و پزشکی حائز اهمیت است. اختلافات مورفولوژیکی بین گونه های دیکروسلیوم وجود دارد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی مورفومتريک و مولکولی (PCR-RFLP و PCR) ایزوله های گوسفندی، بز و گاو دیکروسلیوم دندرتیکوم در استان مازندران در سال های ۱۳۹۲-۱۳۹۴ می باشد.

میزبان‌های استان مورد مطالعه می‌باشد. علاوه بر شاخص فوق، موقعیت بیش‌ترین عرض بدن که در تمامی ایزوله‌ها پشت قسمت میانی بدن قرار گرفته بود نیز تفریق‌کننده‌ی گونه‌ی دیکروسلیوم دندریتیکم از دیکروسلیوم هاسپس و دیکروسلیوم چاینسیس می‌باشد.

جدول شماره ۱: خصوصیات مرفولوژیکی دیکروسلیوم جدا شده از کبد گوسفند در استان مازندران

شاخص مرفولوژیک (μm)	گوسفند (X±SE)	بیش‌ترین	کم‌ترین	سطح معنی‌داری
طول بدن	۷۰۸۷۵±۱۶۵/۶۹۵	۱۰۵۲۵	۵۱۲۵	۱
عرض بدن	۱۶۴۵/۱۷±۴۶/۲۸۹	۲۲۲۵	۳۰۰	۰/۹۹۷
قطر خارجی بادکش دهانی	۳۴۲/۸۳±۷/۳۳۰	۴۹۰	۱۶۰	۰/۹۱۰
قطر داخلی بادکش دهانی	۱۷۲/۳۳±۵/۲۹۰	۳۵۰	۱۰۰	۰/۹۹۹
قطر خارجی بادکش شکمی	۴۳۲/۱۷±۸/۳۰۷	۶۱۰	۲۰۰	۱
قطر داخلی بادکش شکمی	۲۲۵/۳۳±۱۱/۸۹۳	۸۰۰	۱۲۰	۱
طول بیضه	۷۶۰/۵۰±۱۵/۲۰۷	۱۰۲۰	۵۲۰	۱
عرض بیضه	۵۰۴/۶۶±۱۳/۸۳۶	۷۳۰	۲۵۰	۱
طول غدد زرده	۱۸۷۶/۶۷±۴۷/۴۵۲	۳۰۲۵	۱۲۵۰	۱
فاصله بین بادکش شکمی تا انتها	۶۰۵۰/۰۰±۱۵۲/۳۲۷	۸۵۵۰	۲۲۷۵	۱
طول سیروساک	۴۲۷/۵۰±۱۵/۷۸۶	۹۰۰	۲۳۰	۱
طول تخمدان	۳۴۹/۰۰±۶/۹۶۵	۵۰۰	۲۵۰	۱
عرض تخمدان	۲۴۹/۱۷±۶/۱۷۲	۳۵۰	۱۳۰	۱
فاصله بین بادکش دهانی تا شکمی	۱۳۸۷/۹۲±۲۷/۲۲۱	۱۷۷۵	۹۵۰	۱
نسبت طول به عرض	۴/۵۹±۰/۰۹۲	۷	۳	۰/۹۷۵
نسب بادکش شکمی به دهانی	۱/۲۳±۰/۰۱۶	۱	۱	۰/۹۹۸
نسبت طول بدن به غدد زرده	۴/۱۷±۰/۰۸۲	۶	۳	۰/۹۷۲

جدول شماره ۲: مقایسه خصوصیات مرفولوژیکی دیکروسلیوم جدا شده از کبد بز در استان مازندران

شاخص مرفولوژیک (μm)	بز (X±SE)	بیش‌ترین	کم‌ترین	سطح معنی‌داری
طول بدن	۶۷۳۴/۱۷±۱۰۴/۰۸۸	۸۱۷۵	۴۸۷۵	۱
عرض بدن	۱۶۴۹/۱۷±۳۰/۱۰۷	۲۰۷۵	۱۰۲۵	۱
قطر خارجی بادکش دهانی	۳۴۷/۳۳±۴/۲۹۱	۴۰۰	۲۵۰	۰/۹۹۹
قطر داخلی بادکش دهانی	۱۵۸/۳۳±۲/۶۷۰	۲۱۰	۱۲۰	۰/۹۹۹
قطر خارجی بادکش شکمی	۴۲۵/۵۰±۳/۸۶۱	۴۸۰	۳۵۰	۱
قطر داخلی بادکش شکمی	۲۱۱/۶۷±۳/۷۴۴	۲۷۰	۱۶۰	۰/۹۹۹
طول بیضه	۷۶۶/۶۷±۲۰/۳۶۸	۱۰۰۰	۳۸۰	۱
عرض بیضه	۴۶۳/۳۳±۱۶/۳۹۰	۷۰۰	۲۱۰	۱
طول غدد زرده	۱۷۴۸/۳۳±۴۷/۵۸۲	۲۳۲۵	۱۲۲۵	۱
فاصله بین بادکش شکمی تا انتها	۵۳۴۱/۶۷±۹۰/۱۸۳	۶۶۵۰	۳۷۵۰	۱
طول سیروساک	۴۹۲/۰۰±۱۱/۴۴۶	۶۶۰	۳۳۰	۱
طول تخمدان	۳۴۸/۳۳±۸/۳۵۷	۴۵۰	۱۸۰	۱
عرض تخمدان	۲۴۵/۰۰±۶/۲۷۷	۳۳۰	۱۵۰	۰/۹۹۹
فاصله بین بادکش دهانی تا شکمی	۱۲۵۸/۳۳±۱۸/۹۱۰	۱۶۲۵	۸۷۵	۱
نسبت طول به عرض	۴/۲۱±۰/۱۰۳	۶	۳	۰/۹۹۹
نسب بادکش شکمی به دهانی	۱/۲۳±۰/۰۱۲	۱	۱	۰/۹۶۲
نسبت طول بدن به غدد زرده	۳/۸۸±۰/۰۷۶	۵	۲	۰/۹۸۲

تکثیر شد. مراحل PCR شامل مرحله واسرشت 95°C به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی اتصال پرایمرها 55°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله‌ی طولیل شدن زنجیره 72°C به مدت ۴۵ ثانیه، که این ۳ مرحله به تعداد ۳۰ سیکل و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در 72°C انجام شد. $4\ \mu\text{l}$ محصول PCR داخل چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار مارکر وزنی 100 bp DNA (Fermentas) بارگذاری و در ولتاژ ۹۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. در نهایت ۳ نمونه جهت سکانس به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

انجام واکنش RFLP-PCR

برای انجام واکنش RFLP-PCR، مخلوطی به حجم نهایی $30\ \mu\text{l}$ شامل $10\ \mu\text{l}$ محصول PCR انگل دیکروسلیوم، $2\ \mu\text{l}$ بافر، $1\ \mu\text{l}$ آنزیم TruII و $17\ \mu\text{l}$ آب مقطر تزریقی تهیه شده و به مدت ۴۰ دقیقه در حمام آب گرم 65°C قرار داده شد. سپس $4\ \mu\text{l}$ از هر محصول PCR-RFLP داخل چاهک‌های ژل آگارز ۳ درصد در کنار مارکروزی 100 bp بارگذاری و در ولتاژ ۷۰ به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز گردید.

یافته‌ها

الف- بررسی مرفولوژی: در این مطالعه در مجموع ۵۰ ایزوله‌ی گاوی (۱۰)، گوسفندی (۲۰) و بز (۲۰) دیکروسلیوم از کبد دام‌های کشتار شده استان مازندران برای شناسائی ۱۷ پارامتر مورفومتریک برحسب میکرون اندازه‌گیری و ثبت شدند. مقایسه پارامترهای مورفومتریکی در هر میزبان، اختلاف معناداری مشاهده نشد (جدول شماره ۱، ۲ و ۳)، در صورتی که در مقایسه این پارامترها در بین میزبانان، اختلاف معنادار به غیر از اندازه طول بیضه‌ها مشاهده شد (جدول شماره ۴). در مشاهده میکروسکوپی، موقعیت بیضه‌ها که شاخص قابل اعتمادی برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم می‌باشد، نشان داد که در تمامی ایزوله‌ها، بیضه‌ها پشت سر هم قرار دارد، این امر تأیید کننده‌ی گونه‌ی دندریتیکم در

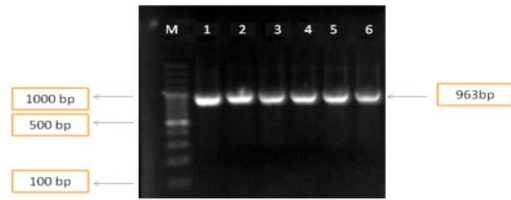
جدول شماره ۳: مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی دیکروسلیوم جدا شده از کبک گاو در استان مازندران

شاخص مورفولوژیک (μm)	گاو (X±SE)	بیش ترین	کم ترین	سطح معنی داری
طول بدن	937.00±183/259	10525	7400	1
عرض بدن	1935.00±40/500	2225	1600	1
قطر خارجی بادکش دهانی	441.33±2/336	460	420	0.999
قطر داخلی بادکش دهانی	392.67±5/444	450	340	1
قطر خارجی بادکش شکمی	470.00±2/034	490	460	1
قطر داخلی بادکش شکمی	418.67±5/461	460	360	1
طول بیضه	748.67±15/099	880	630	1
عرض بیضه	701.33±13/811	850	600	1
طول غدد زرده	2358.33±96/127	3200	1625	1
فاصله بین بادکش شکمی تا انتها	7573.33±160/893	8625	5725	1
طول سیروساک	356.00±3/575	380	310	1
طول تخمدان	440.67±1/585	460	430	0.998
عرض تخمدان	395.33±4/004	430	360	0.999
فاصله بین بادکش دهانی تا شکمی	1768.33±37/157	2075	1500	1
نسبت طول به عرض	4/83±0/071	5	4	0.944
نسب بادکش شکمی به دهانی	1/09±0/018	1	1	0.822
نسبت طول بدن به غدد زرده	4/10±0/116	5	3	0.977

جدول شماره ۴: مقایسه‌ی شاخص‌های مورفومتریک دیکروسلیوم دندرتیکوم جدا شده از کبک گوسفند، بز و گاو در استان مازندران

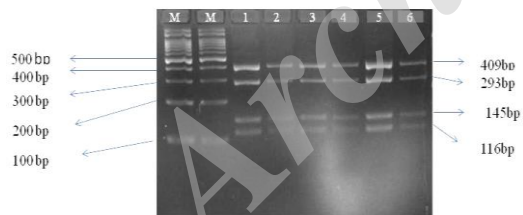
شاخص مورفولوژیک (μm)	گوسفند (X±SE)	بز (X±SE)	گاو (X±SE)	سطح معنی داری
طول بدن	1708.875±165/695	6734.17±104/088	937.00±183/259	0.000
عرض بدن	1645.17±46/289	1649.17±30/107	1935.00±40/500	0.000
قطر خارجی بادکش دهانی	342.83±7/330	347.33±4/291	441.33±2/336	0.000
قطر داخلی بادکش دهانی	172.33±5/290	158.33±2/670	392.67±5/444	0.000
قطر خارجی بادکش شکمی	433.17±8/307	425.50±3/761	470.00±2/034	0.000
قطر داخلی بادکش شکمی	335.33±11/793	211.67±3/744	418.67±5/461	0.000
طول بیضه	760.50±15/207	746.67±20/368	748.67±15/099	0.830
عرض بیضه	504.67±13/836	463.33±16/390	701.33±13/811	0.000
طول غدد زرده	1876.67±47/652	1748.33±37/582	2358.33±96/127	0.000
فاصله بین بادکش شکمی تا انتها	6050.00±152/327	5341.67±90/183	7573.33±160/893	0.000
طول سیروساک	427.50±15/786	492.00±11/446	356.00±3/575	0.000
طول تخمدان	349.00±6/965	348.33±8/257	440.67±1/585	0.000
عرض تخمدان	249.17±6/172	245.00±6/277	395.33±4/004	0.000
فاصله بین بادکش دهانی تا شکمی	1387.92±27/221	1258.33±18/910	1768.33±37/157	0.003
نسبت طول به عرض	4/59±0/092	4/21±0/013	4/83±0/071	0.000
نسب بادکش شکمی به دهانی	1/13±0/016	1/13±0/012	1/09±0/018	0.000
نسبت طول بدن به غدد زرده	4/17±0/082	3/88±0/076	4/10±0/116	0.034

ثبت شد. مقایسه توالی‌ها با موارد ثبت شده در بانک ژن، تشابه ۹۹ درصد را نشان دادند.



تصویر شماره ۱: محصول PCR دیکروسلیوم از ایزوله‌های گاو، بز و گوسفند M ستون مارکر 100 bp، ستون ۱ و ۲ ایزوله گوسفندی، ۳ و ۴: ایزوله گاو، ۵ و ۶ ایزوله بز

علاوه بر این، برای تشخیص گونه از تکنیک RFLP نیز جهت تشخیص گونه استفاده شد. به دلیل وجود آنزیم محدودالتر (FastDigest TruII (Fermentas) الگوی RFLP نشان دهنده ۴ محل برش و تشکیل باندهای 116 bp، 145 bp، 293 bp و 409 bp بود (تصویر شماره ۲). آنزیم FastDigest TruII به طور اختصاصی دیکروسلیوم دندرتیکوم را از گونه‌های مشابه آن شامل دیکروسلیوم‌ها سپس و دیکروسلیوم چاینسیس تفکیک نمود. در این مطالعه، سایر گونه‌های دیکروسلیوم یافت نشدند.



تصویر شماره ۲: الگوی PCR-RFLP ایزوله‌های گوسفند، گاو و بز دیکروسلیوم دندرتیکوم با استفاده از آنزیم Fast Digest TruII ستون M مارکر 100 bp، ستون ۱ و ۲: ایزوله گوسفندی، ۳ و ۴: ایزوله گاوی، ۵ و ۶: ایزوله بز

بحث

انگل دیکروسلیوم دندرتیکوم تقریباً در تمام مناطق جهان انتشار دارد و کم‌تر جایی در دنیا یافت می‌شود که عاری از این ترماتود باشد. تنوع فنوتیپی و ژنتیکی

ب- مطالعه مولکولی: الکتروفورز تمام ایزوله‌ها پس از PCR، باند 963 pb را نشان دادند (تصویر شماره ۱). برای تایید گونه انگل از محصول به دست آمده از PCR تعیین توالی گردید و سپس در بانک جهانی ژن با شماره‌های MF952875, MF946552 MF946561

عمدتاً مناطق DNA ریبوزومی) این انگل قبلاً از کشورهای مختلف از جمله ایران گزارش شده است (۹،۲). به رغم شیوع فراوان دیکروسلیازیس در ایران (۳/۱، ۱/۳ و ۱/۲ درصد به ترتیب در بین گوسفند، بز و گاو) (۳)، در زمینه‌ی شناخت مرفولوژیک و مولکولی عامل این بیماری تحقیقات کمی صورت گرفته و مطالعات عمدتاً در زمینه‌ی موارد شیوع، روش‌های تشخیصی سرولوژیک و بررسی‌های ریخت‌شناسی انگل بوده است. با استفاده از سه روش مورفومتریک، PCR و RFLP مشخص شد که از بین ۳ گونه‌ی جنس دیکروسلیوم، تنها دیکروسلیوم دندریتیکوم باعث آلودگی گوسفند، بز و گاو شمال ایران می‌شود.

یکی از شاخص‌های مورفومتریک قابل اعتماد برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم، موقعیت بیضه‌ها می‌باشد. در دیکروسلیوم دندریتیکوم دو بیضه به صورت پشت سرهم (tandem) قرار دارد، درحالی‌که در دیکروسلیوم چاینسیس به صورت دو طرفه (bilatera) قرار دارد (۱۰،۹). با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر، بیضه‌ها در تمامی ایزوله‌های جمع‌آوری شده از استان مازندران، در موقعیت پشت سرهم قرار داشتند و با نتایج مطالعات گرجی‌پور و اربابی همخوانی دارد (۱۰،۹). در مطالعه‌ی Otranto و همکاران، دو گونه دندریتیکوم و چاینسیس را بر اساس موقعیت بیضه‌ها در گوسفند‌های اتریشی، آلمانی و ایتالیایی تشخیص دادند (۱۱). علاوه بر این، Taira و همکاران با استفاده از شاخص نامبرده، دیکروسلیوم چاینسیس را تنها گونه‌ی آلوده کننده‌ی آهوی Sika در ژاپن تشخیص دادند (۱۲).

بر اساس مطالعه حاضر، طول بدن کرم در بین ایزوله‌های گوسفندی، بزی و گاوی به ترتیب (۷/۴۰-۱۰/۵۲ μm)، (۸/۲۷-۴/۸۷ μm)، و (۱۰/۵۲-۵/۱۲ μm) و عرض آن نیز به ترتیب (۲/۲۲-۰/۹ μm)، (۲/۰۷-۱/۰۲ μm) و (۲/۲۲-۱/۶۰ μm) متغیر گزارش شد. در مطالعه‌ی Otranto و همکاران، طول انگل را در گوسفند ۴/۷۰-۵/۶۰ μm و عرض آن را

گزارش کردند (۱۱). در مطالعه دیگر، اربابی و همکاران، طول انگل را در همین میزبان ۶/۱۲-۷/۱۲ μm و عرض بدن را ۱/۵۱-۵/۷ μm گزارش نمودند (۹). این در حالی است که در مطالعه‌ی گرجی‌پور و همکاران، طول بدن ۶/۳۸±۱/۵۶ μm و عرض بدن ۱/۷۰±۰/۳۹ μm گزارش شده است (۱۰)، ولی هیچ گونه اشاره‌ای به کم‌ترین و بیش‌ترین اندازه طول و عرض بدن انگل در میزبان‌های مورد مطالعه نشده است.

هم‌چنین، بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، اختلاف معنی‌داری بین اندازه‌ی شاخص‌های مورفومتریک در استان مازندران مشاهده می‌شود و این یافته‌ها با یافته‌های به دست آمده از مطالعه‌ی اربابی و همکاران همخوانی داشته است (۹). این در حالی است که در مطالعات بررسی شده در کشورهای ایتالیا، اتریش و آلمان و هم‌چنین در شیراز (ایران)، اختلافات معناداری بین شاخص‌های مورفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم در بین میزبانان انگل در مناطق مورد مطالعه‌ی خود گزارش نکردند (۱۱،۱۰). احتمالاً این اختلاف ناشی از سن، وضعیت تغذیه‌ای میزبان، وضعیت بلوغ کرم، شدت آلودگی، شرایط اقلیمی و اکولوژیکی مناطق مورد مطالعه می‌باشد (۱۳).

بررسی مولکولی به خصوص در ژن 28s rDNA نشان داد که تفاوت ژنتیکی در میان ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم موجود در ایران وجود ندارد. این در حالی است که آنالیز نتایج حاصل از مورفومتری شاخص‌های نامبرده به غیر از طول بیضه دارای اختلاف معناداری در بین ایزوله‌ها نشان داد. مطالعات اخیر مولکولی انگل بر اساس زیرواحد کوچک ریبوزومی (ناحیه‌ی 18s rDNA) و زیرواحد بزرگ ژن ریبوزومی (28s rDNA) موفق به نشان دادن تفاوت‌های ژنتیکی میان ایزوله‌های این انگل نشده است، به نظر می‌رسد این امر به دلیل بالا بودن سطح حفاظت شده‌ی این نواحی از انگل باشد (۱۱،۱۰). Maurelli و همکاران (۲۰۰۷) و هم‌چنین اربابی و همکاران (۲۰۱۲)، تنوع ژنتیکی

رو با توجه به زیان های اقتصادی که این انگل بر اقتصاد کشور تحمیل می کند، کنترل و پیشگیری از آن کاملاً ضروری می باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان نامه دوره ارشد رشته انگل شناسی پزشکی می باشد که هزینه آن طی طرح شماره ۱۳۶۷ مصوب تامین شده است. بنابراین نویسندگان، از معاونت محترم پژوهشی و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

- Otranto D, Traversa D. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. Trends Parasitol 2003; 19(1): 12-15.
- Manga-González M, 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(7): 91-114.
- Bari S, Sarvi S, Daryani A, Ziaeei Hezarjaribi H, Arbabi M, Pirestani M, et al. *Dicrocoelium dendriticum* infection among domestic animals in Iran: A systematic review and meta-analysis. J Mazandaran Uni Med Sci 2016; 25(132): 367-375 (Persian).
- Manga-González M, 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.
- Manga-González M, Ferreras M, Campo R, González-Lanza C, Perez V, García-Marín J. Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). Parasitol Res 2004; 93(5): 344-355.
- Fauci AS. Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill; 2008.
- Helmy M, Al-Mathal E. Human infection with *Dicrocoelium dendriticum* in Riyadh district (Saudi Arabia). J Egypt Soc Parasitol 2003; 33(1): 139-144.
- Magi B, Frati E, Bernini L, Sansoni A, Zanelli G. *Dicrocoelium dendriticum*: a true infection. Infez Med 2009; 17(2): 115-116.
- Arbabi M, Dalimi-Asl A, Ghaffarifar F, Foorozandeh-Moghadam M. Morphological and molecular characterization of *Dicrocoelium* isolated from sheep in the north and center of Iran. Feyz J Kashan Uni Med Sci 2012; 16(2): 135-145 (Persian).
- Gorjipoor S, Moazeni M, Sharifiyazdi H. 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 2015; 89(2): 158-164.

11. Otranto D, Rehbein S, Weigl S, Cantacessi C, Parisi A, Lia RP, et al. Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Trop* 2007; 104(2): 91-98.
12. 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): 375-377.
13. 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.
14. Maurelli M, Rinaldi L, Capuano F, Perugini A, 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): 1251-1255.

Archive of SID