Archive of SID

بررسی مقایسه‌ای اندازه اندام‌های خارجی و الگوهای پروتئین بدنی *فاسیولا هپاتیکا* در میزبان‌های مختلف ایران

نادیا طایفی نصرآبادی[1*]، عباس بایگان[2]، حمید پوربابا[3]

۱- عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی ،واحد کرج ،دانشگاه آزاد اسلامی -کرج - ایران

۲- عضو هیأت علمی پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی ایران، تهران-ایران

۳- دانشجوی دوره دکتری دامپزشکی ،واحد کرج ،دانشگاه آزاد اسلامی -کرج – ایران

***نویسنده مسئول:** *drtaiefi_vet@yahoo.com*

خلاصه:

فاسیولا هپاتیکا انگل مجرای صفراوی کبد و یکی از شایع‌ترین انگل‌های حیوانات مختلف می‌باشد که در ایران از میزبان‌های گاو، گاومیش، شتر، گوسفند، بز، الاغ، خرگوش وحشی و گراز گزارش شده است. این انگل به دلیل عبور از میزبان‌های مختلف و استقرار در آنها تحت تأثیر عوامل مهمی مانند جنس، سن، تغذیه، درجه ایمنی و ... ممکن است دچار تغییرات مورفولوژیک، مورفومتریک و الکتروفورتیک شود. در این پژوهش، نمونه‌های آلوده از کبد گاو، گوسفند و بز کشتار شده از کشتارگاه‌های راک و میثم کرج جدا گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه در محلول بافرمالین PBS با pH=7.4 شسته شد. به منظور اندازه‌گیری دقیق اندام‌های خارجی *فاسیولا هپاتیکا* در میزبان‌های مختلف، نمونه‌های به دست آمده رنگ آمیزی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که اندازه ی اندام‌های خارجی، اختلاف معناداری در طول بادکش دهانی، طول کرم، نسبت طول به عرض کرم و طول مخروط راسی وجود دارد. برای مقایسه ی هر پارامتر در ۳ گونه میزبان مختلف از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شده است. همچنین برای بررسی باندهای پروتئین بدنی گاو، گوسفند و بز، از روش سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) در مجاورت نشان‌دار با وزن مولکولی مشخص استفاده شد. نتایج به دست آمده از پادگن‌های بدنی نمونه‌ها نشان داد که باندهای پروتئینی مربوط به *فاسیولا هپاتیکا* در ۳ نمونه گاو، گوسفند و بز در گستره ۱۸ تا ۶۳ کیلودالتون بوده و تعداد آنها ۷ عدد می‌باشد، همچنین باندهای پروتئینی در میزبان‌های مختلف با یکدیگر اختلاف جزیی داشته و فقط یک باند ۶۳ کیلودالتونی در نمونه گاو مشاهده شد که در نمونه گوسفند و بز وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: *فاسیولا هپاتیکا*، اندام‌های خارجی، الگوهای پروتئینی، SDS-PAGE، الکتروفورز.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

انگل‌ها موجودات زنده‌ای هستند که برای ادامه حیات خود باید در داخل یا خارج میزبان دیگری به نام میزبان اصلی زندگی کنند. تعداد انگل‌های انسان و دام بسیار زیاد بوده و رقم دقیقی برای آن نمی‌توان بیان کرد. در ایران ۵۱ گونه انگل در انسان و ۱۳۵ گونه در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی گزارش شده است (۱). طبق گزارش اشمیت و رابرتس در سال ۱۹۸۹ میلادی تعداد مبتلایان به انواع کرم‌ها در جهان ۴/۵ میلیون نفر بوده است (۲).

در سالیان گذشته نگرانی انسان درباره انگل‌ها با مطالعات کلاسیک، تعیین میزان شیوع، بیماری زایی و یافتن داروهای مناسب برای درمان آنها مرتفع می‌شد، اما در حال حاضر احتمال داده می‌شود که جدایه یا ایزولیت یک انگل خاص که حتی در فاصله نزدیک جغرافیایی از یکدیگر قرار دارند، تحت تأثیر عوامل مختلف فیزیولوژیکی، اکولوژیکی تغییر کرده و موجود جدید دیگری به نام سویه ایجاد شود که برای مبارزه با انگل‌ها مشکلات جدیدی را به وجود می آورند (۲).

فاسیولا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که به موجب *Fasciola hepatica* و *Fasciola gigantica* و چندین گونه دیگر ایجاد می‌شود. در حال حاضر *F. hepatica* در نواحی مختلف، اروپا، افریقا، امریکا، آسیا و اقیانوسیه وجود دارد.

در ایران اگرچه شیوع فاسیولا در بین حیوانات اهلی و خانگی در ناحیه جنوب کشور نسبت به ناحیه شمالی بیشتر است، اما تعداد افرادی که به این بیماری مبتلا شده‌اند در حاشیه دریای خزر و به خصوص در استان گیلان به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است (۳). *فاسیولا هپاتیکا* یکی از انگل‌هایی است که برحسب میزبان هتروژنوس می‌باشد. میزبان اصلی آن گاو، گوسفند، بز، شتر، اسب، گوزن، خرگوش و گوشتخوارانی مثل سگ، روباه، شغال و انسان می‌باشد. میزبان واسط این انگل ۲۱ گونـه از حلزون لیمنـهآ هستند که زیستگاه اصلی آنها آب‌های کند جریان است (۱).

شناسایی گونه‌های مختلف فاسیولا براساس ویژگی‌های مورفولوژیک، مورفوآناتومیک و مورفومتریک و با استفاده از روش ایزو الکترو فوکوسینگ پروتئین‌های محلول انجام می شود.

مواد و روش کار

۱- اندازه‌گیری اندام‌های خارجی *فاسیولا هپاتیکا*

وسایل مورد نیاز

الف ـ کبدهای آلوده‌ی گاو، گوسفند و بز ضبط شده در کشتارگاه.

ب ـ کارد، پنس، قیچی، الک، پلیت، لوله آزمایش.

ج ـ لام، لامل، سرم فیزیولوژی، PBS، لام میکرومتر میزانگر، لام میکرومتر چشمی، میکروسکوپ، استو کارمین، چسب انتلن، محلول رنگ‌بر، سانتریفوژ.

روش اندازه‌گیری

ابتدا کبدهای آلوده گاو، گوسفند و بز ضبط شده در کشتارگاه راک و میثم کرج قبل از اینکه برای معدوم کردن وارد گازوییل شود، جمع‌آوری شده و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل

www.SID.ir

Archive of SID

شد. سپس با تیغ اسکالپر و قیچی مجاری صفراوی آنها باز و محتویات آن (صفرا و کبد) وارد پلیت‌های سرم فیزیولوژی شد. مقداری از کرم‌ها با سرم فیزیولوژی شسته شد و به لوله آزمایش حاوی PBS منتقل و برای یک روز در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد تا بدن کرم کاملاً باز شده و چروکیده و چین خورده نباشد تا در هنگام رنگ آمیزی و اندازه‌گیری دچار اشکال نشود.

از هر میزبان ۱۰ نمونه برای اندازه‌گیری اندام‌های خارجی انتخاب و برای دقت در اندازه‌گیری رنگ‌آمیزی شد. کرم‌های باقی‌مانده در ویال‌های حاوی PBS به فریزر با برودت ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد تا در مرحله دوم و در بررسی الکتروفورز استفاده شود.

پارامترهای مورد ارزیابی اندام‌های خارجی *F. hepatica* در میزبان‌های گاو، گوسفند و بز عبارت‌اند از: طول بادکش دهانی، عرض بادکش دهانی، طول بادکش شکمی، عرض بادکش شکمی، طول حلق، عرض حلق، فاصله بین بادکش شکمی و دهانی، طول کرم، عرض کرم، نسبت طول به عرض کرم، طول مخروط رأسی و عرضی مخروط رأسی.

نمونه‌های رنگ شده از هر میزبان با استفاده از میکروسکوپ کالیبره شده اندازه‌گیری شد.

۲- تعیین الگوی الکتروفورتیک

برای تهیه پادگن بدنی از روش *فارل* و *همکاران* (۴) با اندکی تغییر در روش کار استفاده شد. ترماتودهای بالغ مربوط به هر میزبان به طور جداگانه و هرکدام ۳ بار در محلول فسفات بافر سالین (PBS) با pH=7.4 برای دفع مواد زاید مورد شستشو قرار گرفت و در PBS حاوی فنیل متیل سولفونیل فلوراید ۰/۵ میلی مولار (PMSF-0.5 mm) به عنوان آنتی پروتئاز و در مجاورت یخ به طور کامل هموژنیزه شدند. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در 12000 g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و مایع درونی حاصل بعد از تعیین غلظت به روش *براد فورد* (۶) تازمان تعیین الگوی الکتروفورتیک در ویال مخصوصی با حجم ۱۰۰ میکرولیتر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد به عنوان پادگن بدنی نگه‌داری شدند.

برای تعیین الگوی الکتروفورتیک پادگن بدنی *F. hepatica* از روش سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورزیس(SDS-PAGE) و دستگاه الکتروفورز مدل P۱۰۰۰ ساخت شرکت سینا پژوهش و براساس روش *لاملی* (۶). استفاده شد. نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۲ با بافر نمونه مخلوط شدند و بعد از حرارت دادن به میزان ۳۰ میکرولیتر در هر چاهک انتقال یافت و نشاندار با وزن مولکولی مشخص (SM 431) به میزان ۷ میکرولیترمورد استفاده قرار گرفت.

الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۱۰ ولت انجام شد. پس از پایان آزمایش، ژل‌ها به وسیله کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و در انتها برای آشکار شدن باندهای پروتئین از محلول رنگ‌بر استفاده شد. نتایج براساس منحنی لگاریتمی و حرکت باندهای پروتئینی نمونه‌های تحت آزمایش نسبت به نشان دار انجام و در انتها عکس‌برداری شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

نتیجـه‌های به دست آمده از اندازه‌گیـری انـدام‌های خارجی *F. hepatica* در میزبان‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شدند. برای ارزیابی نتایج به دست آمده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد (جدول ۱). نتایج این پژوهش، تشابهات و اختلافات معناداری را بین پارامترهای اندازه‌گیری شده نشان می‌دهد. این نتایج عبارت‌اند از:

ـ طول بادکش دهانی در گوسفند و بز برابر است ولی در نمونه گاو از بقیه بزرگ‌تر است.

ـ عرض بادکش دهانی در همهٔ نمونه‌ها برابر است.

ـ طول بادکش شکمی در همهٔ نمونه‌ها تقریباً برابر است.

ـ عرض بادکش شکمی در همهٔ نمونه‌ها تقریباً برابر است.

ـ طول حلق در همهٔ نمونه‌ها تقریباً برابر است.

ـ عرض حلق در همهٔ نمونه‌ها تقریباً برابر است.

ـ فاصله بین بادکش شکمی و دهانی در همهٔ نمونه‌ها تقریباً برابر است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ـ آماره های مربوط به پارامترهای جنس *فاسیولا هپاتیکا* برحسب نوع پارامتر و گونه‌ی حیوان مبتلا به کرم

نوع حیوان / پارامترهای مربوط به فاسیولا	گاو Mean ± SE Min - Max	گوسفند Mean ± SE Min - Max	بز Mean ± SE Min - Max	P Value
* طول بادکش دهانی	^{a}۷۶/۵۰ ± ۳/۹۳ ۴۷/۵۰ –۹۰/۰۰	^{b}۵۴/۷۰ ±۳/۶۳ ۴۲/۵۰ – ۷۲/۵۰	^{b}۵۴/۷۰ ±۳/۶۳ ۴۲/۵۰ – ۷۲/۵۰	P<۰/۰۰۱
عرض بادکش دهانی	^{a}۹۵/۰۰ ±۴/۱۹ ۷۲/۵۰ –۱۱۰/۰۰	^{a}۹۵/۰۰ ± ۳/۱۶ ۷۷/۵۰ -۱۱۲/۵	^{a}۹۵/۰۰ ± ۳/۱۶ ۷۷/۵۰ -۱۱۲/۵	P=۱/۰۰۰
طول بادکش شکمی	^{a}۱۳۱/۵۰ ±۴/۱۰ ۱۱۲/۵۰ –۱۵۰/۰۰	^{a}۱۲۴/۷۵ ±۲/۵۹ ۱۱۰/۰۰ – ۱۳۷/۵۰	^{a}۱۲۴/۷۵ ±۲/۵۹ ۱۱۰/۰۰ – ۱۳۷/۵۰	P=۰/۲۴۰
عرض بادکش شکمی	^{a}۱۲۸/۲۰ ±۱/۳۲ ۱۲۰/۰۰ – ۱۳۲/۵۰	^{a}۱۲۵/۵۰ ±۱/۹۶ ۱۱۲/۵۰ – ۱۳۲/۵۰	^{a}۱۲۵/۵۰ ±۱/۹۶ ۱۱۲/۵۰ – ۱۳۲/۵۰	P=۰/۴۷۴
طول حلق	^{a}۸۹/۲۵ ± ۳/۱۴ ۶۷/۵۰ – ۱۰۲/۵۰	^{a}۸۳/۵۰ ±۳/۳۴ ۶۵/۰۰ – ۱۰۵/۰۰	^{a}۸۳/۵۰ ±۳/۳۴ ۶۵/۰۰ – ۱۰۵/۰۰	P=۰/۳۷۱
عرض حلق	^{a}۵۵/۵۰ ±۲/۹۳ ۳۵/۰۰ – ۶۷/۵۰	^{a}۴۹/۵۰ ±۴/۳۶ ۳۰/۰۰ – ۷۲/۵۰	^{a}۴۹/۵۰ ±۴/۳۶ ۳۰/۰۰ – ۷۲/۵۰	P=۰/۴۷۲
فاصله بین بادکش شکمی و دهانی	^{a}۲۳۴/۷۵ ±۱۳/۴۱ ۱۷۷/۵۰ – ۳۰۰/۰۰	^{a}۲۰۴/۰۰ ±۱۲/۵۱ ۱۶۲/۵۰ – ۲۸۷/۵۰	^{a}۲۰۴/۰۰ ±۱۲/۵۱ ۱۶۲/۵۰ – ۲۸۷/۵۰	P=۰/۱۶۶
* طول کرم	^{a}۳۲/۲۰ ±۱/۷۴ ۲۵/۰۰ – ۴۰/۰۰	^{b}۲۲/۳۰ ±۱/۰۳ ۱۷/۰۰ – ۲۷/۰۰	^{b}۲۲/۳۰ ±۱/۰۳ ۱۷/۰۰ – ۲۷/۰۰	P<۰/۰۰۱
* عرض کرم	^{a}۱۱/۲۰ ± ۰/۲۹ ۱۰/۰۰ – ۱۳/۰۰	^{a}۱۰/۱۰ ± ۰/۴۸ ۸/۰۰ – ۱۲/۰۰	^{a}۱۰/۱۰ ± ۰/۴۸ ۸/۰۰ – ۱۲/۰۰	P=۰/۱۳۰
* نسبت طول به عرض کرم	^{a}۲/۸۷ ± ۰/۱۲ ۲/۲۷ – ۳/۳۶	^{b}۲/۲۳ ± ۰/۱۰ ۱/۷۰ – ۲/۸۸	^{b}۲/۲۳ ± ۰/۱۰ ۱/۷۰ – ۲/۸۸	P<۰/۰۰۱
* طول مخروط راسی	^{a}۳۸۴/۷۰ ± ۱۴/۵۵ ۳۰۵/۰۰ – ۴۴۲/۵۰	^{b}۲۶۳/۲۵ ± ۱۷/۱۲ ۱۹۵/۰۰ – ۳۸۰/۰۰	^{b}۲۶۳/۲۵ ± ۱۷/۱۲ ۱۹۵/۰۰ – ۳۸۰/۰۰	P<۰/۰۰۱
عرض مخروط راسی	^{a}۴۱۰/۷۵ ± ۹/۴۹ ۳۷۵/۰۰ – ۴۵۵/۰۰	^{a}۳۸۸/۰۰ ± ۹/۳۲ ۳۲۷/۵۰ – ۴۴۰/۰۰	^{a}۳۸۸/۰۰ ± ۹/۳۲ ۳۲۷/۵۰ – ۴۴۰/۰۰	P=۱/۱۶۰

** در هر ردیف برای مقایسه هر پارامتر در سه گونه حیوان از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شده است. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده تشابه آماری در اندازه‌هاست. حروف ناهماهنگ در هر ردیف دلالت بر اختلاف معنی دار در سطح آلفای ۰/۰۰۱ می باشد (α=۰/۰۰۱).*

www.SID.ir

Archive of SID

ـ طول کرم در گوسفند و بز برابر است ولی در نمونه گاو بزرگ‌تر از بقیه است.

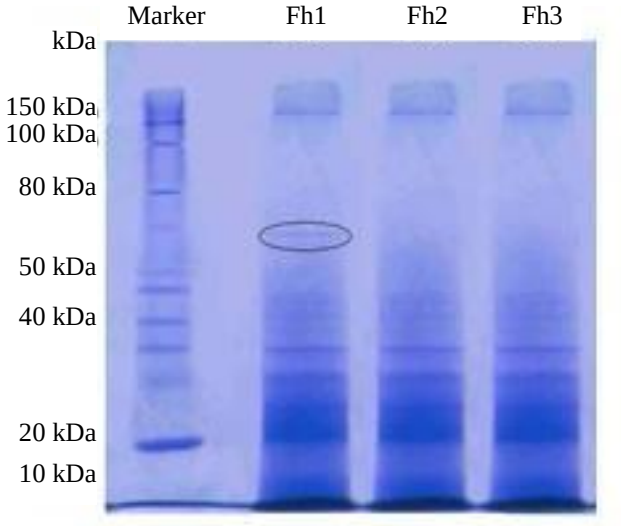
ـ عرض کرم در همه نمونه‌ها تقریباً برابر است.

ـ نسبت طول به عرض کرم در گوسفند و بز برابر است ولی در نمونه گاو بزرگ‌تر از بقیه است.

ـ طول مخروط رأسی در گوسفند و بز برابر است ولی در نمونه گاو بزرگ‌تر از بقیه است.

ـ عرض مخروط رأسی در همه نمونه‌ها تقریباً برابر است.

نتایج مقایسه‌ای الگوی پروتئینی بدنی *F. hepatica* در نمونه‌های گاو، گوسفند و بز در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- مقایسه الگوهای پروتئینی بدنی *F.Hepatica* -Fh1: *فاسیولا هپاتیکا* در گاو، Fh2: *فاسیولا هپاتیکا* در گوسفند Fh3: *فاسیولا هپاتیکا* در بز.

همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، تعداد ۷ عدد باند پروتئینی مشخص در گستره ۱۸ تا ۶۳ کیلو دالتون نشان داده می‌شود. باندهای پروتئینی به دست آمده به وزن مولکولی ۱۸، ۲۴، ۳۳، ۳۶، ۴۲، ۴۷ و ۶۳ کیلو دالتون در این نمونه‌ها قابل شناسایی است که اختلاف جزیی در آن دیده می‌شود. تنها یک باند ۶۳ کیلو دالتونی در نمونه گاو مشاهده شد که در نمونه‌های گوسفند و بز وجود ندارد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

F. hepatica یکی از ترماتودهای کبدی سم‌داران در ایران بوده و از گاو، گوسفند و بز جدا شده است. آلودگی به این انگل در کلیه نواحی جغرافیایی ایران وجود دارد و سالیانه خسارت غیر مستقیم زیادی بر اقتصاد کشور وارد می‌سازد.

علی رغم اهمیت انگل، قسمت اعظم مطالعات و پژوهش-های انجام شده دربارهٔ سیر تکاملی این انگل بوده و جنبه‌های مختلف بیولوژی و فیزیولوژی کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. تنوع میزبان‌های اصلی و واسط، عوامل مختلف فیزیولوژیکی و بوم سازگانی در انگل‌ها باعث ایجاد سویه‌های جدید می‌شود که می‌تواند از لحاظ ساختار بدنی و پروتئینی با هم متفاوت باشد.

در بررسی‌های *اشرفی و همکاران* (۲۰۰۶) سویه‌های واسط *فاسیولا هپاتیکا* و *ژیگانتیکای* گاو در ایران نشان داده شده که با ابعاد استانداردهای جهانی *فاسیولا ژیگانتیکا* و *هپاتیکا* متفاوت بوده است (۷).

در بررسی حاضر، ۱۲ متغیر در ساختمان خارجی (البته به جز طول و عرض حلق) در نظر گرفته شده است. اگرچه بیشتر متغیرها اختلاف آماری با هم نداشتند اما طول بادکش دهانی، طول کرم و طول مخروط رأسی در گاو با گوسفند و بز تفاوت نشان می‌دهد که این اندازه‌ها بیشتر است. با توجه به گزارش رابطه مستقیم بین طول کرم و اندازهٔ جثه ی میزبان چنین رابطه-ای در این بررسی تأیید می‌شود (۱) .

ترکیبات دفعی ترشحی و ساختار بدنی انگل‌ها می‌تواند به عنوان پادگن‌های تشخیصی و ایمنی‌زایی مطرح باشند. شناسایی پادگن‌ها می‌تواند در راستای تولید واکسن، تشخیص، تجزیه و تحلیل فرایندهای ایمنوپاتولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. به اعتقاد *رولینسون* و *همکاران* (۱۹۸۶) ترماتودهای هم شکل می‌توانند چهره‌های مختلفی از بیماری‌زایی، تولید مثل، ایمنی زایی و حساسیت در برابر درمان را از خود نشان دهند و لذا می‌بایست فرایندها و تولیدات مختلف درون سلولی انگل تحت ارزیابی قرار گیرد(۸).

در همین راستا بررسی‌هایی انجام شده است و *رکنی و همکاران* (۲۰۰۴) نشان دادند که پروتئین ۲۷ کیلو دالتونی به عنوان آنتی ژن در تشخیص فاسیولوز انسانی مؤثر است(۹). همچنین پروتئین سبک ۸ کیلو دالتونی که توسط الکتروفورز ژل دو دسیل سدیم سولفات ۱۵- ۷٫۵ درصد تغلیظ شده در تشیخص فاسیولوز انسانی به کار رفته که با سایر ترماتودهای انسانی واکنش متقاطع ندارد (۱۰). در بررسی حاضر هم با روش دو دسیل سدیم سولفات ژل الکتروفورزیس پروتئین‌های بدنی *فاسیولا هپاتیکا* بررسی و ۷ باند پروتئینی در گسترهٔ ۶۳- ۱۸ کیلو دالتون دیده شده است که با یافته‌های *مشکی و همکاران* (۲۰۰۷) که ۸ باند در گسترهٔ ۶۲-۱۸ کیلو دالتون شناسایی کردند هم‌خوانی دارد(۱۱) .

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES:

1-Eslami ,A. 1385.Veterinary Helmintology (Trematoda) ,Third Ed,Tehran University Press, pp:103-113.

2-Tayefinasrabadi, N., Eslami, A., Bokai,S. 1387. Dicrocoelium dentriticum polymorphism in wild and domestic animals, *Journal of Iran Veterinary Science*, 5(2):423-428.

3-Shahlapoor, A .1375 . Human fasciolosis, evaluation of outbreak and epidemy in guilan province, *Journal of Research*, 4(13):15.

4- Farrell, C.J., D.T. Wescott, R.B and Long, B.Z., 1981. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Fasciola hepatica* Infection in Cattle. *American Journal Veterinary Research.*, 42, 237-240.

5- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantitive Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Am. Bioch.*, 22, 248-254.

6- Laenli, U.K. 1970. Cleavage at Stractural Proteins During Assembly of the Head of Bactriophagety, *Nature*, 227, 678-685.

7- Ashrafi, K., Valero, M.A., Parova, M., Periago, M.V., Mssoud, J., Mass-Coma .2006. Phenotypic Analysis of Adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and inter Mediate Formes from the Endemic Region of Gilan. *Iran. Parasitol. Int.*, 55, 249-260.

8- Rollinson, D., Walker, J.K., Simpson, J.G. 1986. The Application of Recombinant DNA Technology to Problems of Helminth Identification, *Parasitology*, 91, 553-571.

9- Rokni, M.B., Baghernejad, A., Mohebali, M., Kia, E.B. 2004. Enzyme-Linked Immanotransfer Blot Analysis of *Fasciola hepatica* in Diagnosis of Human Fascioliasis, *Iranian Journal Public Heath.*, 33, 8-13.

10- Kwansring, K., Jongyong, H., Young. B. 2003. Usefulness of 8 kDa Protein of *Fasciola hepatica* in Diagnosis of Fascioliasis, *Korean Journal of Parasitology*, 41 (2), 121-123.

11- Meshgi, B., Eslami, A., Hematzadeh, F. 2008. Determination of Somatie and Excretory-Secretory Antigens of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Using SDS-PAGE, *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, 9 (1), 77-80.

www.SID.ir