DOI: 10.22092/vj.2020.127828.1621
شماره ۱۳۰ بهار ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی شیوع و شناسایی مرفومتریک و مولکولی دیکروسلیوم دنتدریتیکوم در نشخوارکنندگان کشتار شده در کشتارگاه اسلام آباد غرب

• فروغ محمدی (نویسنده مسئول)
گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۶-۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۱۰-۱۷
Email: forogh_mo58@yahoo.com

چکیده

هدف از انجام مطالعه کنونی بررسی شیوع و شناسایی مرفومتریک و مولکولی دیکروسلیوم دنتدریتیکوم در گاو، گوسفند و بزهای کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر اسلام آباد غرب (کرمانشاه) طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶بود. به منظور تعیین شیوع و شدت آلودگی به انگل مذکور، در مجموع ۲۱۶۰ راس گاو، ۴۳۲۰ راس گوسفند و ۳۲۴۰ راس بز از هر دو جنس نر و ماده به نسبت مساوی و به شکل کاملا تصادفی طی مدت ۳ سال نمونه‌برداری شدند. خصوصیات مرفولوژیک و مرفومتریک انگل با استفاده از میکروسکوپ نوری مطالعه شد. سپس جهت تایید تشخیص، از هر میزبان،۲۰ کرم بالغ دیکروسلیوم با ویژگی‌های متفاوت مرفولوژیک و مرفومتریک و در مجموع۶۰ نمونه برای استخراج DNA انتخاب گردید و ناحیه‌ای از ژن هدف NAD1 با استفاده از واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) تکثیر گردید. طبق نتایج به دست آمده، شیوع آلودگی در گوسفند (۱۰/۲۰٪، ۴/۸۵٪ و ۷/۰۱٪ به ترتیب سال) همواره بیشتر از گاو (۳/۰۵٪، ۱/۸۰٪ و ۲/۲۲٪ به ترتیب سال) بود. همچنین بیشترین میزان آلودگی در فصل پاییز مشاهده شد. آنالیز دو به دوی توالی‌های به دست آمده برای هر ۳ میزبان و همچنین 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 دندریتیکوم تنها گونه آلوده‌کننده جنس دیکروسلیوم دربین نشخوارکنندگان شهرستان اسلام آباد تعیین گردید. با توجه به شیوع نسبتا زیاد آلودگی در دام‌های منطقه و توان بالقوه سرایت انگل به انسان، اقدامات پیشگیرانه و بهداشتی شدیدتری باید اتخاذ گردد.

کلمات کلیدی: دیکروسلیوم دنتدریتیکوم، نشخوارکنندگان، خصوصیت مولکولی

Veterinary Researches & Biological Products No 130 pp: 46-54

A survey on prevalence and morphometric and molecular characterization of Dicrocoelium dendriticum in ruminants slaughtered in Eslamabad-e Gharb slaughterhouse

By: Mohammadi, F., (Corresponding Author) Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

Received: 2019-09-21 Accepted: 2020-01-07

Email: forogh_mo58@yahoo.com

The aim of current study was to investigate the prevalence as well as morphometric and molecular characterization of Dicrocoelium dendriticum in cattle, sheep and goat slaughtered in Eslamabad-e Gharb (Kermanshah) industrial abattoir from 1394 to 1396. To determine the prevalence and severity of D. dendriticum, 2160 cattle, 4320 sheep and 3240 goats were randomly sampled from the both genders equally during the course of study. Morphologic and morphometric characterization done using a light microscope. For molecular characterization, 20 adult worms with different morphologic and morphometric properties from each species and total of 60 samples were selected for extraction of DNA and amplification of the target gene NAD1 using polymerase chain reaction (PCR). The obtained results indicated that the infection rate was higher in sheep (10.20%, 4.85% and 7.01%, respectively) compared to cattle (3.05%, 1.80% and 2.22%). Furthermore, the highest infection intensity was observed in autumn. Pairwise comparison of the obtained sequences with each other and the recorded cases in Genbank revealed the similarity 97% to 99% among isolates. Therefore, D. dendriticum was the only infective species of Eslamabad-e Gharb ruminants. The results of genetic evaluation showed no variation between the isolated samples and those in GenBank. Considering the high prevalence rate of infection, stricter preventive and hygienic measures should be taken.

Keywords: Dicrocoelium dendriticum, ruminants, molecular characterization

مقدمه

دیکروسلیوم دندریتیکوم (Dicrocoelium dendriticum) که با نام عامیانه کپلک نیشتری (Lancet fluke) شناخته می شود، بیشتر در مجاری صفراوی و کیسه صفرا قابل مشاهده است. اگر چه انگل برای اولین بار در سال ۱۸۱۹ توسط Rudolphi شناسایی شد، اما چرخه زندگی کامل آن بین سال‌های ۱۹۵۱ تا ۱۹۵۳ توسط طبعیت‌شناس انگلیسی Wendell Krull مشخص گردید. خصوصیت مورفولوژیک اصلی انگل، بیضه‌های لوبوله در قسمت قدامی و بدن پهن و نواری شکل آن است (۲۸).

آلودگی به این انگل باعث ایجاد بیماری دیکروسلیوزیس در میزبان‌های نهایی می‌گردد. نشخوارکنندگان اهلی و وحشی میزبان نهایی این انگل می‌باشند، اما احتمال آلودگی اسب، خرگوش، سگ، خوک و حتی انسان نیز وجود دارد. انواع گونه‌های حلزون و مورچه به ترتیب به عنوان میزبان اولیه و ثانویه واسط عمل می‌کنند که این امر باعث پیچیدگی چرخه زندگی انگل می‌شود (۲۵). زمین‌های خشک، گچی با خاک‌های قلیایی برای رشد و گسترش میزبان‌های واسط بسیار مناسب هستند (۲۱). آلودگی اغلب به دنبال بلعیده شدن مورچه‌های آلوده به متاسرکاریا توسط نشخوارکنندگان و گاها انسان رخ می‌دهد (۱۹). علایم بالینی در حیوانات آلوده شامل کاهش وزن، تاخیر در رشد، کم خونی، اختلالات گوارشی، ادم و کاهش تولید شیر و خسارت‌های ناشی از درمان ضد انگلی می‌شود (۱۳, ۲۱, ۲۴). خوردن جگر خام و نیمه خام باعث ایجاد عفونت کاذب در انسان می‌گردد (۲۷).

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که دیکروسلیوم در میزبان‌های نهایی از اختصاصیت انگلی بسیار پایین برخوردار هستند (۲۲). انگل دیکروسلیوم، دارای سه گونه می‌باشد: دیکروسلیوم دندریتیکوم که در سراسر اروپا، آسیا، شمال آفریقا و آمریکا انتشار دارد، گونه دیکروسلیوم هاسپس که در آفریقا و دیکروسلیوم چایننسیس که در آسیا انتشار دارند (۲). طبق گزارشات موجود، چنین به نظر می‌رسد که شیوع این انگل در نشخوارکنندگان بومی ایران زیاد باشد (۱, ۶, ۹, ۱۴). تشخیص این بیماری به روش مرسوم و سنتی شامل، شناسایی تخم در نمونه‌های مدفوع حیوانات آلوده، و یا جداسازی انگل بالغ از کبد میزبان نهایی، حین کالبد گشایی می‌شود. امروزه تشخیص رابطه فیلوژنیک بین موجودات مختلف و طبقه بندی و تاکسونومی دقیق آنها توسط روش‌های مختلف ریخت‌شناسی و بیولوژی مولکولی همانند انواع روش‌های PCR وارد حیطه جدید و بسیار متفاوتی شده است. به گونه‌ای که ارزیابی تفاوت‌های احتمالی و حتی تشخیص سویه یا گونه‌های جدید انگلی به وسیله روش‌های مذکور ضروری به نظر می‌رسد (۱۰).

علی رغم اهمیت دیکروسلیوم دندریتیکم، اطلاعات بسیار اندکی در مورد خصوصیات مورفولوژیک و ژنتیکی این انگل در دسترس است. همچنین،

شیوع آلودگی دام‌های منطقه غرب کشور، تاکنون ارزیابی نشده است. لذا مطالعه کنونی با هدف بررسی شیوع و شناسایی مرفومتریک و مولکولی این انگل با استفاده از ژن NAD۱ در گاو، گوسفند و بزهای کشتار شده در استان کرمانشاه طی ۳ سال متوالی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

مطالعه کنونی در غرب ایران، استان کرمانشاه، شهرستان اسلام آباد غرب، طی سال های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ صورت گرفت. پس از هماهنگی‌های لازم با اداره دامپزشکی و مسئولین فنی کشتارگاه شهرستان مذکور، بصورت تصادفی طی ساعات اولیه صبح در ابتدای خط کشتار حاضر شده و پس از کالبدگشایی کامل حیوان، بر اساس روش Ongoma-Ogambo (۱۹۷۲) نسبتss به معاینه‌ی دقیق کبد از طریق ایجاد برش در بافت و مجاری صفراوی بزرگ و کوچك و کیسه‌ی صفرا 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 به طور کامل تمامی مجاری باز گردید. تمامی کرم‌های موجود بدون هر گونه آسیب فیزیکی جدا و شمارش گردید، سپس چند مرتبه با استفاده از بافر PBS شستشو داده شده و تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای مرفومتریك در اتانول۸۰ درصد فیکس گردید. در نهایت با استفاده از میکروسکوپ نوری شاخص‌های مرفومتریك برحسب میکرون اندازه‌گیری و ثبت شد (۲۳). نمونه‌برداری به طور روازنه و به شکل برابر از هر دو جنس نر و ماده انجام شد. تعداد نمونه‌ها به طوری انتخاب شد که حداقل نیمی (۵۰٪) از حیوانات کشتار شده را در بر گیرد. به دلیل کاهش تولید گوشت گاو و بز در سال ۱۳۹۶ تقریبا تمامی حیوانات مذکور (۷۲۶ راس گاو و ۱۰۸۲ راس بز) کشتار شده وارد مطالعه شدند. در مجموع ۲۱۶۰ راس گاو، ۴۳۲۰ راس گوسفند و ۳۲۴۰ راس بز بررسی شدند.

آنالیز مولکولی

از هر میزبان، ۲۰ کرم بالغ دیکروسلیوم با ویژگی‌های متفاوت مرفولوژیک و مرفومتریک و در مجموع ۶۰ نمونه برای استخراج DNA انتخاب گردید. بدین منظور، نمونه‌ها را از فریزر خارج نموده پس از ۳ بار شستشو با بافر PBS استریل سرد، محلول هموژنی از بافت انگل تهیه و به آن ۲۰۰ µl بافر لیز کننده اضافه و به مدت ۳ ساعت درحمام آب گرم ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس عمل استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (MBST) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده با تغییراتی در زمان انکوباسیون و مقدار آنزیم پروتئیناز K صورت گرفت. خلوص DNA استخراج شده با دو روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکترو فتومتری UV در طول موج‌های nm ۲۶۰ و۲۸۰ تایید گردید. تکثیر ژن در ۵۰ میلی‌لیتر محلول حاوی: ۱۰mM (pH ۹,۰ ¼ Tris-HCl)، ۵۰mM KCl، ۴ میلی‌لیتر نمونه DNA استخراج شده به عنوان تمپلیت، ۱,۵mM MgCl۲، ۲۰۰ mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)، ۲۰ pM of each primer و ۲U of Taq DNA polymerase (Fermentas, Hanover, Maryland, USA) انجام شد. پرایمرهای مصرفی برای ژن NAD-۱ در جدول ۱ درج شده است (۷, ۱۷).

پرایمر مذکور برای تکثیر قطعه ۵۲۰ bp از ژن NAD۱ استفاده شد. واکنش PCR تحت برنامه ذیل صورت گرفت: یک چرخه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه (دناتوراسیون)، باز پخت (۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه) و توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه. هر سه مرحله ۳۵ مرتبه تکرار شد و نهایتا یه مرحله توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اعمال گردید. محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵٪ (وزنی/حجمی) و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر) تحت تابش اشعه فرابنفش ارزیابی شدند. محصولات به دست آماده جهت توالی‌یابی و خالص‌سازی به شرکت سینا کلون (تهران-ایران) ارسال گردید و توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BLAST() Tool Search Alignment Local Basic با موارد ثبت شده در بانک ژن مقایسه و میزان مشابهت ژنتیکی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustalw۲ مورد آنالیز دوبه‌دو قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های مربوط به بررسی شیوع انگل با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه شماره ۲۲ و آمار توصیفی و آزمون X۲ تجزیه و تحلیل شدند. داده‌های مربوط به مرفومتری نیز با استفاده از تحلیل خوشه‌بندی (K-Means Cluster) و تحلیل واریانس (ANOVA) مقایسه شدند. همچنین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد (P<۰/۰۵) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

بررسی مرفولوژیک و مرفومتریک

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در مطالعه کنونی

Forward	JB-۵ ۱۱CAGAGGTTTGCTGATCTATTG۳-
Reverse	JB-۵ ۱۲CTTTCAGCCTCAGCATAATCC۳-

بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها، از هرمیزبـان مورد مطالعه، ۱۶۰کـرم بالغ تازه دیکروسلیوم دندریتیکوم و در مجموع ۴۸۰ نمونه برای شناسایی ۱۶ شاخص و نسبت مرفومتریک مورد مطالعه قرار گرفت. مقایسه پارامترهای مرفومتریک نشان داد که اندازه شاخص‌ها در ۳ میزبان تحت مطالعه با یکدیگر متفاوت اسـت (P<۰/۰۱). در جدول ۲ شـاخص‌ها و نسبت‌های مرفولوژیک و مرفومتریک ترماتود کبدی دیکروسـلیوم در گاو، گوسـفند و بز به روش خوشه‌بندی (clustering) با یکدیگر مقایسـه شده اسـت. موقعیت قرارگرفتن بیضه‌ها که معیار قابل اعتمادی برای تشخیص افتراقی گونه‌های دیکروسلیوم می‌باشد، در تمامی ایزوله‌ها، پشت سرهم (tandem) بود که خود موید گونه دیکروسلیوم دندریتیکوم در میزبانان منطقه مورد مطالعه می‌باشد.

ارزیابی مولکولی

تمامی نمونه‌های جداسازی شده، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه ۵۲۰ جفت بازی از ژن هدف NAD۱ را تکثیر کردند (شکل ۱). همچنین، توالی‌های به دست آمده در شکل ۲ رسم شده است. آنالیز دو به دوی توالی‌های ۳ میزبان مورد مطالعه و مقایسه با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن، گوسفند: MG۸۸۹۳۹۹ ، MG۸۸۹۴۰۰ ، MG۸۸۹۴۰۱، MG۸۸۹۴۰۲ ، MG۸۸۹۴۰۳ ، JX۰۵۰۱۲۱,۱، KC۱۶۴۱۵۵,۱، JX۰۵۰۱۲۷,۱ بز: MG۸۸۹۴۰۹، MG۸۸۹۴۱۰، MG۸۸۹۴۱۱، MG۸۸۹۴۱۲، MG۸۸۹۴۱۳، LC۱۵۹۵۲۲,۱، KC۱۶۴۱۵۸,۱، LC۱۵۹۵۱۹,۱ و گاو: JX۰۵۰۱۳۳,۱، JX۰۵۰۱۱۶,۱، JX۰۵۰۱۲۷,۱، LC۱۵۹۵۲۱,۱، LC۱۵۹۵۲۲,۱، KF۳۱۸۷۸۷,۱ نشان‌دهنده مشابهت ژنتیکی ایزوله‌ها، بین ۹۷ تا ۹۹ درصد بود و به این ترتیب دیکروسلیوم دندریتیکوم تنها گونه آلوده‌کننده جنس دیکروسـلیوم در بین نشـخوارکنندگان شهرستان اسلام‌آباد تعیین گردید. نتایج حاصل از آنالیز توالی نشان داد که نمونه‌های دیکروسلیوم گوسفندی و بزی کاملا شبیه هم بوده ولی تفاوت‌های اندکی در توالی‌های دیکروسلیوم گاوی مشاهده گردید (جدول ۳).

آنالیز فیلوژنتیک توالی‌ها نشان داد تمامی ایزوله‌های مورد مطالعه مربوط به گونه دیکروسـلیوم دندریتیکوم می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد، علیرغم مشـاهده اختلافات مرفومتریک قابل ملاحظـه، تفاوت اندکی در توالی‌های ژن میتوکندریائی ND۱ مشـاهده می‌شود، به طوری که در بین ایزوله‌ها و همچنین در مقایسـه با موارد ثبت شـده در بانک ژن حداقل ۷۰ درصد مشـابهت ژنتیکی وجود دارد که خود گویای این واقعیت است که تنها گونه دیکروسلیوم دندریتیکوم قادر به آلودگی دام‌های منطقه مورد مطالعه می‌باشد. آنالیز فیلوژنتیکی ژن مذکور روشن کرد که دیکروسلیوم‌های بررسی شده به طور نزدیکی با یکدیگر مرتبط هستند و دارای شباهت توالی ژنومی بالایی با سایر دیکروسلیوم‌های مربوط به سایر نقاط دنیا می‌باشند.

شیوع و شدت آلودگی

نتایج حاصل از ارزیابی شیوع و شدت آلودگی به انگل دیکروسلیوم دندریتیکم در سال‌های ۱۳۹۴، ۹۵ و ۹۶ برای هر سه حیوان گاو، گوسفند و بز به ترتیب در جداول ۳ تا ۵ ترسیم شده است. همانطور که می‌توان مشاهده کرد، همواره شیوع انگل در گاو نسبت به گوسفند و بز کمتر می‌باشد. همچنین هیچ اختلاف آماری بین جنس نر و ماده وجود ندارد (P>۰/۰۵). نکته حائز اهمیت این است که شدت آلودگی در اواخر تابستان (شهریور) رو به افزایش گذاشته و در فصل پاییز، به خصوص آذر ماه به اوج خود می‌رسد. به طوری که تعداد انگل جدا شده از هر راس دام در این فصل تا حدود ۲ برابر بیشتر از سایر ماه‌ها بود. همچنین، شیوع انگل در گاو و گوسفند در سال ۹۵ (به ترتیب ۱/۸ ٪ و ۴/۸٪) نسبت به سال ۹۴ (به ترتیب ۳٪ و ۱۰٪) و ۹۶ (به ترتیب ۲/۲٪ و ۷٪) کاهش چشم‌گیری یافته است.

جدول ۲- مقایسه شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم جمع آوری شده از کشتارگاه اسلام آباد غرب به تفکیک میزبان طی سالهای ۹۶-۱۳۹۴(اعداد داخل جدول مرکز هر خوشه را نشان می دهد).

میزبان شاخص مرفومتریک (mμ)	گاو	گوسفند	بز	ANOVA
نست طول به عرض	۴/۰۹۷	۴/۵۷	۴/۶۲	۰/۰۵>P
نسبت قطر خارجی بادکش شکمی به قطر داخلی	۲/۱۳	۲/۶۷	۲/۴۶	۰/۰۱>P
نسبت قطر خارجی بادکش دهانی به قطر داخلی	۲/۵۶	۲/۵۹	۲/۴۰	۰/۰۳>P
نسبت طول بیضه به عرض بیضه	۱/۲۳	۱/۳۵	۱/۴۷	۰/۰۵>P
نسبت طول تخمدان به عرض تخمدان	۱/۷۸	۱/۳۵	۱/۸۱	۰/۰۵>P
نسبت طول رحم به عرض رحم	۵/۲۵	۴/۷۶	۵/۰۵	۰/۰۱>P

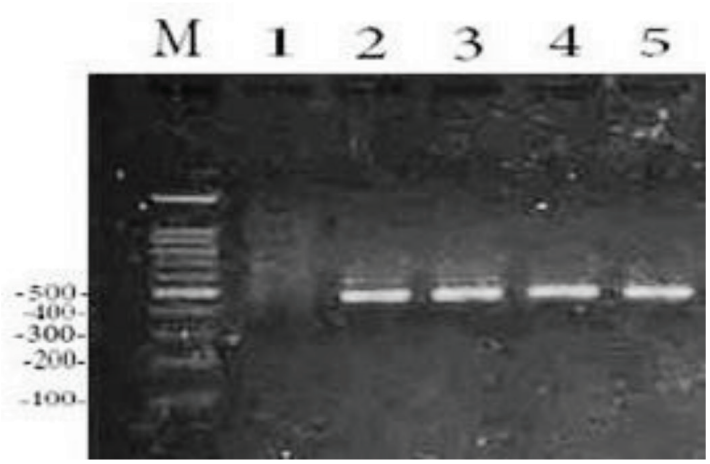
بحث

مطالعه کنونی یک بررسی جامع از شیوع آلودگی به دیکروسلیوم دندریتیکوم در غرب کشور است که طی ۳ سال متوالی صورت گرفت و در مجموع ۲۱۶۰ راس گاو، ۴۳۲۰ راس گوسفند و ۳۲۴۰ راس بز نمونه‌برداری شدند. تا کنون هیچ مطالعه‌ای در چنین وسعت و گستردگی بر روی ارزیابی شیوع انگل مذکور صورت نگرفته است، و از این لحاظ مطالعه حاضر کاملا بدیع می‌باشد. میزان شیوع انگل طی مدت مطالعه کاملا متفاوت بوده، به طوری که شیوع انگل در سال ۹۵ نسبت به دو سال دیگر (۹۴ و ۹۶) در گاو و گوسفند کمترین مقدار را داشته است. اما در مورد بز این الگو کاملا متفاوت بود، به طوری که میزان شیوع انگل از نقطه آغاز مطالعه (سال ۹۴، ۶/۴۸٪) رو به کاهش گذاشته و تا پایان مطالعه (سال ۹۶، ۲/۵۹٪) این روند کاهشی ادامه یافته است.

طی مطالعه حاضر، همواره شیوع آلودگی در گوسفندان بیشتر از گاو اندازه‌گیری شد. این یافته با گزارشات مجیدی‌راد و همکاران (۲۰۱۸) که به مطالعه شیوع انگل دیکروسلیوم در نوار شمالی کشور می‌پرداختند، مطابقت کامل دارد (۲۰). آن‌ها شیوع انگل را در گوسفندان استان گیلان ۳۶/۲۱٪، مازندران ۲۱/۳۵٪ و در استان گلستان ۶/۸۷ ٪ گزارش نمودند که به مراتب از مقادیر مشاهده شده در این مطالعه بالاتر است. یک توجیه احتمالی برای شیوع اندک آلودگی طی مطالعه کنونی می‌تواند آب و هوای

جدول ۳-تنوع نوکلئوتیدی ژن NAD1 مربوط به میزبان های مختلف شهرستان اسلام آباد غرب، (یک توالی از بانک ژن با شماره دسترسی MG889412 به عنوان توالی مرجع در نظر گرفته شده است).

codon	۱	۳۱	۸۱	۹۴
Accession No.	Cys	Gly	Cys	Gly
Tamplate (MG889412)	TGC	GGT	TGC	GGC
Sheep Eslamabad	. . .	. . .	. . .	. . .
Goat Eslamabad	. . .	. . .	. . T	. . .
Cattle Eslamabad	. . T	. . C	. . T	. . T



شکل ۱-بررسی محصول تکثیر توسط آگارز ژل اکتروفورز . ستون M: ۱۰۰ bp DNA ladder، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون های ۳ تا ۵: نمونه های جداسازی شده.

جدول۴- فراوانی شیوع آلودگی به انگل دیکروسلیم دندریتیکم در گاو، گوسفند و بز کشتار شده در کشتارگاه اسلام آباد غرب طی سال ۱۳۹۴.

		فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند
گاو (۶۰ راس در هر ماه)	نر	۲ (٪۶/۶۶)	۰	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۳ (٪۱۰)	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۲ (٪۶/۶۶)
	ماده	۰	۰	۱ (٪۳/۳۳)	(۱ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۶/۶۶)	۱ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۶/۶۶)	۲ (٪۶/۶۶)	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۰
	کل	۲ (٪۳/۳۳)	۰	۱ (٪۱/۶۶)	۲ (٪۳/۳۳)	۳ (٪۵)	۲ (٪۳/۳۳)	۳ (٪۵)	۲ (٪۳/۳۳)	۳ (٪۵)	۲ (٪۳/۳۳)	۰	۲ (٪۳/۳۳)
گوسفند (۱۲۰ راس در هر ماه)	نر	۳ (٪۵)	۵ (٪۸/۳۳)	۳ (٪۵)	۳ (٪۵)	۴ (٪۶/۶۶)	۵ (٪۸/۳۳)	۴ (٪۶/۶۶)	(۳ (٪۵)	۱۴ (٪۲۳/۳۳)	۷ (٪۱۱/۶۶)	۹ (٪۱۵)	۹ (٪۱۵)
	ماده	۲ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۳/۳۳)	۳ (٪۵)	۵ (٪۸/۳۳)	۲ (٪۳/۳۳)	۷ (٪۱۱/۶۶)	۶ (٪۱۰)	۱۰ (٪۱۶/۶۶)	۱۷ (٪۲۸/۳۳)	۷ (٪۱۱/۶۶)	۱۰ (٪۱۶/۶۶)	
	کل	۵ (٪۴/۱۶)	۷ (٪۵۸/۳۳)	۶ (٪۵)	۸ (٪۶۶/۶۶)	۶ (٪۵)	۱۲ (٪۱۰)	۱۰ (٪۸/۳۳)	۱۳ (٪۱۰/۸۳)	۳۱ (٪۲۵/۸۳)	۱۴ (٪۱۱/۶۶)	۱۹ (٪۱۵/۸۳)	۱۶ (٪۱۳/۳۳)
بز (۹۰ راس در هر ماه)	نر	۰	۲ (٪۴/۴۴)	۳ (٪۶/۶۶)	۴	۳ (٪۶/۶۶)	۳ (٪۶/۶۶)	۴ (٪۸/۸۸)	۳ (٪۶/۶۶)	۵ (٪۱۱/۱۱)	۲ (٪۴/۴۴)	۲ (٪۴/۴۴)	۱ (٪۲/۲۲)
	ماده	۳ (٪۶/۶۶)	۲ (٪۴/۴۴)	۲ (٪۴/۴۴)	۲ (٪۴/۴۴)		۵ (٪۱۱/۱۱)	۱ (٪۲/۲۲)	۴ (٪۸/۸۸)	۵ (٪۱۱/۱۱)	۳ (٪۶/۶۶)	۵ (٪۱۱/۱۱)	۲ (٪۴/۴۴)
	کل	۳ (٪۳/۳۳)	۴ (٪۴/۴۴)	۵ (٪۵۵/۵۵)	۶ (٪۶۶/۶۶)	۷ (٪۷۷/۷۷)	۸ (٪۸/۸۸)	۵ (٪۵۵/۵۵)	۷ (٪۷/۷۷)	۱۰ (٪۱۱/۱۱)	۵ (٪۵۵/۵۵)	۷ (٪۷/۷۷)	۳ (٪۳/۳۳)

جدول۵- فراوانی شیوع آلودگی به انگل دیکروسلیم دندریتیکم در گاو، گوسفند و بز کشتار شده در کشتارگاه اسلام آباد غرب طی سال ۱۳۹۵.

		فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند
گاو (۶۰ راس در هر ماه)	نر	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۰	۱(٪۳/۳۳)	۰	۰	۰	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۱ (٪۳/۳۳)
	ماده	۰	۰	۲ (٪۶/۶۶)	۲ (٪۶/۶۶)	۰	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۳ (٪۱۰)	۰	۰
	کل	۰	۱ (٪۱/۶۶)	۲ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۱/۶۶)	۰	۱ (٪۱/۶۶)	۰	۱ (٪۱/۶۶)	۴ (٪۶/۶۶)	۰	۱ (٪۱/۶۶)
گوسفند (۱۲۰ راس در هر ماه)	نر	۴ (٪۶/۶۶)	۵ (٪۸/۳۳)	۳ (٪۵)	۲ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۱/۶۶)	(۳ (٪۵)	۳ (٪۵)	۴ (٪۶/۶۶)	۲ (٪۳/۳۳)	۴ (٪۶/۶۶)	۱ (٪۱/۶۶)	۳ (٪۵)
	ماده	۵ (٪۸/۳۳)	۲ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۱/۶۶)	۲ (٪۳/۳۳)	۴ (٪۶/۶۶)	(۳ (٪۵)	۵ (٪۸/۳۳)	۲ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۳/۳۳)	۳ (٪۵)	۳ (٪۵)	۳ (٪۵)
	کل	۹ (٪۷/۵)	۷ (٪۵۸/۳۳)	۴ (٪۶۶/۶۶)	۴ (٪۶۶/۶۶)	۵ (٪۴/۱۶)	۶ (٪۵)	۸ (٪۶/۶۶)	۶ (٪۵)	۴ (٪۳/۳۳)	۷ (٪۵۸/۳۳)	۴ (٪۶۶/۶۶)	۶ (٪۵)
بز (۹۰ راس در هر ماه)	نر	۴ (٪۸/۸۸)	۱ (٪۲/۲۲)	۲ (٪۴/۴۴)	۱ (٪۲/۲۲)	۱ (٪۲/۲۲)	(۱ (٪۲/۲۲)	۲ (٪۴/۴۴)	۵ (٪۱۱/۱۱)	۲ (٪۴/۴۴)	۱ (٪۲/۲۲)	۱ (٪۲/۲۲)	۱ (٪۲/۲۲)
	ماده	۳ (٪۶/۶۶)	۲ (٪۴/۴۴)	۱ (٪۲/۲۲)	۱ (٪۲/۲۲)	۱ (٪۲/۲۲)	(۲ (٪۴/۴۴)	۳ (٪۶/۶۶)	۴ (٪۸/۸۸)	۳ (٪۶/۶۶)	۲ (٪۴/۴۴)	۰	۰
	کل	۵ (٪۵۵/۵۵)	۶ (٪۶۶/۶۶)	۲ (٪۲/۲۲)	۳ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۲/۲۲)	(۳ (٪۳/۳۳)	۵ (٪۵۵/۵۵)	۹ (٪۱۰)	۵ (٪۵۵/۵۵)	۳ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۱/۱۱)	۱ (٪۱/۱۱)

جدول ۶- فراوانی شیوع آلودگی به انگل دیکروسلیم دندریتیکم در گاو، گوسفند و بز کشتار شده در کشتارگاه اسلام آباد غرب طی سال ۱۳۹۶.

		فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند
گاو (۶۰ راس در هر ماه)	نر	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۰	۰	۰	۰
	ماده	۱ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۶/۶۶)	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۶/۶۶)	۰	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۳/۳۳)	۰	۰
	کل	۲ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۱/۶۶)	۲ (٪۳/۳۳)	۲ (٪۳/۳۳)	۳ (٪۵)	۱ (٪۱/۶۶)	۱ (٪۱/۶۶)	۱ (٪۱/۶۶)	۱ (٪۱/۶۶)	۰	۰
گوسفند (۱۲۰ راس در هر ماه)	نر	۳ (٪۵)	۲ (٪۳/۳۳)	۳ (٪۵)	۲ (٪۳/۳۳)	۴ (٪۶/۶۶)	۴ (٪۶/۶۶)	۳ (٪۵)	۵ (٪۸/۳۳)	۱۰ (٪۱۶/۶۶)	۶ (٪۱۰)	۱۰ (٪۱۶/۶۶)	۶ (٪۱۰)
	ماده	۰	۱ (٪۱/۶۶)	۲ (٪۳/۳۳)	۱ (٪۱/۶۶)	۱ (٪۵)	۱ (٪۱/۶۶)	۳ (٪۵)	۷ (٪۱۱/۶۶)	۷ (٪۱۱/۶۶)	۴ (٪۶/۶۶)	۶ (٪۱۰)	۶ (٪۱۰)
	کل	۳ (٪۲/۵)	۳ (٪۲/۵)	۵ (٪۴/۱۶)	۳ (٪۲/۵)	۹ (٪۷/۵)	۵ (٪۴/۱۶)	۶ (٪۵)	۱۲ (٪۱۰)	۱۷ (٪۱۴/۱۶)	۱۰ (٪۸/۳۳)	۱۶ (٪۱۳/۳۳)	۱۲ (٪۱۰)
بز (۹۰ راس در هر ماه)	نر	۰	۰	۰	۰	۲ (٪۴/۴۴)	۰	۲ (٪۴/۴۴)	۱ (٪۲/۲۲)	۱ (٪۲/۲۲)	۵ (٪۱۱/۱۱)	۱ (٪۲/۲۲)	۱ (٪۲/۲۲)
	ماده	۰	۰	۲ (٪۴/۴۴)	۰	۰	۱ (٪۲/۲۲)	۳ (٪۶/۶۶)	۳ (٪۶/۶۶)	۱ (٪۲/۲۲)	۲ (٪۴/۴۴)	۱ (٪۲/۲۲)	۱ (٪۲/۲۲)
	کل	۰	۰	۲ (٪۴/۱۶)	۰	۲ (٪۴/۴۴)	۱ (٪۱/۱۱)	۵ (٪۵/۵۵)	۴ (٪۴/۴۴)	۳ (٪۲/۳۳)	۷ (٪۷/۷۷)	۲ (٪۲/۲۲)	۲ (٪۲/۲۲)

سرد و خشک استان کرمانشاه باشد که شرایط را برای زندگی میزبان‌های واسط سخت‌تر می‌کند. این در حالی است که آب و هوای معتدل و مرطوب استان‌های گیلان و مازندران امکان رشد و گسترش میزبان‌های واسط به خصوص حلزون را فراهم می‌سازد. باری و همکاران (۲۰۱۵) که طی یک مطالعه گسترده به مرور سیستماتیک و متاآنالیز آلودگی به انگل دیکروسلیوم دندریتیکوم در دام‌های اهلی کشور می‌پرداختند، درصد شیوع نسبی انگل را در گوسفندان حدود ۳/۱ درصد (۴/۲-۲/۲ درصد)، در جمعیت بزهای کشتار شده ۱/۳ درصد (۱/۹-۰/۹ درصد) و در گاوهای مورد مطالعه ۰/۵ درصد (۳/۵-۱/۱ درصد) برآورد کردند (۶). همچنین فلاح و همکاران که طی سال ۱۳۸۸ به بررسی شیوع ترماتودهای کبدی در دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی استان همجوار، همدان می‌پرداختند شیوع آلودگی به دیکروسلیوم را در گوسفندان ۶/۹٪، در گاو ۴٪ و در بز ۶/۱٪ گزارش نموده‌اند که به نتایج حاصل از مطالعه کنونی بسیار نزدیک است (۱۱). با این وجود اربابی و همکاران (۲۰۱۱) که به مطالعه شیوع و شدت آلودگی به انگل مذکور در ۸ استان کشور می‌پرداختند، به نتایج کاملا مغایر با مطالعه حاضر و گزارشات فوق‌الذکر دست یافتند. آنها ادعا کرده‌اند که شیوع آلودگی در گوسفند و بز به ترتیب ۰/۸۵ درصد و ۱/۲۹ درصد است که به مراتب پایین‌تر از حد مورد انتظار است. همچنین مطالعه آنها نشان می‌دهد که تفاوت در جنس حیوان بر روی شیوع انگل اثر معنی‌دار دارد. به طوری که شیوع آلودگی در گوسفندان ماده بیشتر از نر و در بزها برعکس بود که کاملا مغایر با نتایج این مطالعه است (۳).

آگاهی از درصد شیوع دیکروسلیوم در دام‌ها به علت زئونوز بودن این انگل و همچنین خسارات اقتصادی فراوانی که ایجاد می‌کند از اهمیت بالایی برخوردار است. در همین راستا Cengiz و همکاران (۲۰۱۰) رخداد انگل را در یک پسر ۲۱ ساله از ترکیه گزارش کرده‌اند (۸). همچنین Schweiger و Kuhn (۲۰۰۸) از رخداد این انگل در یک فرد مبتلا به بیماری کرون (یون) خبر داده‌اند (۲۶). بعلاوه گزارشاتی از ابتلا انسان به دیکروسلیوم از عربستان سعودی و قرقیزستان در دسترس است (۱۶, ۱۸). متاسفانه دو مورد گزارش آلودگی انسان از مرکز ایران، استان اصفهان و شمال کشور، استان گیلان موجود می‌باشد که حاکی از نقش خطیر این انگل در بهداشت عمومی کشور می‌باشد (۴, ۱۲).

مطالعه‌ی حاضر نشان داد در بین ایزوله‌های گوسفندی دیکروسلیوم، میانگین طول کرم ۱۰۱±۶۸۱۱ میکرومتر و عرض آن ۱۲۱±۱۵۰۰ میکرومتر و همچنین در بین ایزوله‌های بزی دیکروسلیوم، میانگین طول کرم ۱۱۳±۶۶۷۱ میکرومتر و عرض آن ۱۵۲±۱۴۱۰ میکرومتر می‌باشد. در مطالعه Bari و همکاران در سال ۲۰۱۸ طول و عرض کرم بالغ در ایزوله‌های گوسفند دیکروسلیوم ۱/۶۶± ۷/۷۱ میلی‌متر و ۰/۰۴۶ ± ۱/۶۵ میلی‌متر و درایزوله های بز ۰/۱۰۴ ± ۶/۷۳ میلی‌متر ۰/۰۳ ± ۱/۶۵ میلی متر محاسبه شده است. همچنین در مطالعه Otranto و همکارانش در سال ۲۰۰۷، طول و عرض کرم بالغ دیکروسلیوم دندریتیکوم ایزوله گوسفند به ترتیب در محدوده ۰/۳۳± ۵/۰۵ میلی‌متر و۰/۲۹± ۱/۴۷ میلی متر گزارش شده است که بدین ترتیب طول و عرض کرم‌های بالغ دیکروسلیوم دندریتیکوم دام‌های کشتارگاهی شهرستان اسلام آباد در مقایسه با نتایج مطالعه Bari و همکاران کوتاهتر است ولی در

مقایسه با مطالعه Otranto و همکاران بلندتر می‌باشد. احتمالا این اختلاف ناشی از سن و وضعیت تغذیه‌ای میزبان، وضعیت بلوغ کرم، شدت آلودگی، شرایط اقلیمی و اکولوژیکی مناطق مورد مطالعه می‌باشد (۵ و ۲۴).

بررسی ژن هدف NAD۱ انگل دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از کبد حیوانات کشتار شده پس از تعیین توالی و بررسی با استفاده از BLAST نشان داد که این قسمت از ژن مورد نظر ۹۷ تا ۹۹٪ هومولوژی با ژن مزبور در داده پایگاه بانک ژنی دارد. گورجی‌پور و همکاران (۲۰۱۵) طی مطالعه خود از ژن مذکور برای شناسایی گونه‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم در گاو و گوسفند کشتارشده در تهران، خراسان، فارس و گیلان استفاده کرده‌اند و به این نتیجه دست یافته‌اند که موقعیت جغرافیایی هیچ تاثیری بر روی طبقه‌بندی هاپلوتیپ‌های انگل ندارد (۱۵). از طرفی یافته‌های مورفولوژیک مطالعه کنونی با گزارشات اربابی و همکاران (۲۰۱۲) که به بررسی شیوع انگل در شمال و مرکز ایران می‌پرداختند، تطابق کامل دارد (۲). مطالعات مولکولی در زمینه ویژگی‌های ژنتیکی گونه دیکروسلیوم به طور محدودی در ایران وجهان صورت گرفته است و در عین حال تمامی مطالعات نشان‌دهنده دیکروسلیوم دندریتیکوم به عنوان گونه غالب که قادر به ایجاد بیماری دیکروسلیازیس در دام‌های اهلی می‌باشد، از جمله مطالعات باری و همکاران در سال ۲۰۱۸ که با استفاده از مارکر ژنتیکی ۲۸S rDNA تنها عامل دیکروسلیازیس در گوسفندان استان مازندران را دیکروسلیوم دندریتیکوم گزارش کرده است (۵). در برخی مطالعات بر روی خصوصیات مولکولی ایزوله‌های دیکروسلیوم بر پایه‌ی تحت واحدهای ۱۸S rDNA و ۲۸S rDNA ژن‌های ریبوزومی نتوانست تغییرات ژنتیکی را نشان بدهد که بر این اساس عنوان کردند که تغییرات مورفولوژیکی در ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم بازتاب تغییرات پلی‌مورفیسم ژنتیکی در سایر مارکرهای ژنتیکی در ژنوم انگل می‌باشد (۲۴).

نتیجه‌گیری کلی

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که شیوع انگل دیکروسلیوم دندرتیکوم در منطقه غرب کشور نسبتا بالا می‌باشد. با توجه این مسئله و به خصوص شیوع بسیار بالای دیکروسلیوزیس در نوار شمالی کشور، لازم است برنامه‌های پیشگیری و کنترل بیماری از جمله خشک کردن برکه‌ها و درمان منظم ضد انگلی دام‌ها با دقت بیشتری مدنظر قرار گرفته شود و از تکنیک‌های نوینی که برای تشخیص گونه‌های انگل وجود دارد به خصوص تکنیک‌های مولکولی حساس جهت تشخیص دقیق عامل بیماری و علل حضور و گسترش برخی گونه‌ها و زیر گونه‌ها در مناطق مختلف کشور و میزبانان متفاوت استفاده نمود. در این راستا، نتایج مطالعه کنونی به خوبی نشان داد که علی رغم وجود تفاوت‌های مرفولوژیک و مرفومتریک تکنیک PCR تشابه ژنتیکی بسیار بالا را بین ایزوله‌ها تایید کرد. همچنین با توجه به عدم آگاهی و عملکرد نامناسب افراد در مصرف احشاء دامی احتمال آلودگی انسان و مشکلات متعاقب بسیار بالا است. از این جهت باید آموزش‌های لازم و مقتضی در مورد نحوه صحیح مصرف احشاء به افراد جامعه داده شود.

تعارض منافع

نویسنده اعلام می دارد که هیچ گونه تضاد منافعی ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Ansari-Lari, M. and M. Moazzeni. 2006. A retrospective survey of liver fluke disease in livestock based on abattoir data in Shiraz, south of Iran. *Preventive Veterinary Medicine*, 73(1), 93-96.

2. Arbabi, M., a. Dalimi-Asl, F. Ghaffarifar and M. Foorozandeh-Moghadam. 2012. Morphological and molecular characterization of Dicrocoelium isolated from sheep in the north and center of Iran. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 16(2), 135-145.

3. Arbabi, M., A. Dalimi, F. Ghafarifar and M. Froozandeh Moghadam. 2011. Prevalence and intensity of Dicrocoelium dendriticum in sheep and goats of Iran. *Research Journal of Parasitology*, 6(5), 160-167.

4. Ashrafi, K. 2010. Human dicrocoeliasis in northern Iran: two case reports from Gilan province. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 104(4), 351-353.

5. Bari, S., M. Arbabi, P. Gill, M. Sharif, H. ZiaeiHezarjaribi, S. Dodangeh, A. Alizadeh, Z. Hedayati and S. Sarvi. 2018. Morphological and molecular (28s RDNA) characterization of dicrocoelium dendriticum isolates from sheep, goat and cattle in Mazandaran province, Iran. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 28(159), 38-45.

6. Bari, S., S. Sarvi, A. Daryani, H. Ziaeei Hezarjaribi, M. Arbabi, M. Pirestani and A. Mizani. 2016. Dicrocoelium dentriticum infection among domestic animals in iran: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 25(132), 367-375.

7. Bowles, J. and D. P. McManus. 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus Echinococcus. *International Journal for Parasitology*, 23(7), 969-972.

8. Cengiz, Z. T., H. Yilmaz, A. C. Dulger and M. Cicek. 2010. Human infection with Dicrocoelium dendriticum in Turkey. *Annals of Saudi Medicine*, 30(2), 159-161.

9. Daryani, A., R. Alaei, R. Arab, M. Sharif, M. Dehghan and H. Ziaei. 2006. Prevalence of liver fluke infections in slaughtered animals in Ardabil province, Northwestern Iran. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(5), 408-411.

10. Eslami, G., S. Khalatbari-limaki, A. Oryan, A. Zohortabar, A. Amiri and B. Hajimohammadi. 2017. A survey on prevalence and molecular characteristics of Linguatula serrata isolated from slaughtered sheep and goat in Yazd slaughterhouse. *Journal of Veterinary Research*, 72(4), 403-410.

11. Fallah, M., M. Matini, E. Begim-Kia and I. Mobedi. 2009. Prevalence of zoonotic parasites in animals slaughtered in Hamad abitrary in 1388 (Hydatic cyst, Liver Trematodes and Sarcositocis). *Journal of Hamadam Medical University* 17(57), 5-12.

12. Farid, H. 1971. Human infection with Fasciola hepatica and Dicrocoelium dendriticum in Isfahan area, Central Iran. *Journal of Parasitology*, 57(1), 160.

13. Ferreras-Estrada, M. C., R. Campo, C. González-Lanza, V. Pérez, J. F. García-Marín and M. Y. Manga-González. 2007. Immunohistochemical study of the local immune response in lambs experimentally infected with Dicrocoelium dendriticum (Digenea). *Parasitology research*, 101(3), 547-555.

14. Ghazani, M. H. M., M. R. Valilou, A. R. Ahmadzadeh, A. R. Karami and K. Zirak. 2008. The prevalence of sheep liver trematodes in the northwest region of Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 32(4), 305-307.

15. Gorjipoor, S., M. Moazeni and H. Sharifiyazdi. 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). *Journal of Helminthology*, 89(2), 158-164.

16. Helmy, M. and E. Al-Mathal. 2003. Human infection with Dicrocoelium dendriticum in Riyadh district (Saudi Arabia). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 33(1), 139-144.

17. Herwerden, L., D. Blair and T. Agatsuma. 2000. Multiple Lineages of the Mitochondrial Gene NADH Dehydrogenase Subunit 1 (ND1) in Parasitic Helminths: Implications for Molecular Evolutionary Studies of Facultatively Anaerobic Eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 51, 339-352.

18. Jeandron, A., L. Rinaldi, G. Abdyldaieva, J. Usubalieva, P. Steinmann, G. Cringoli and J. Utzinger. 2011. Human infections with Dicrocoelium dendriticum in Kyrgyzstan: the tip of the iceberg? *Journal of Parasitology*, 97(6), 1170-1173.

19. Karadag, B., A. Bilici, A. Doventas, F. Kantarci, D. Selcuk, N. Dincer, Y. A. Oner and D. S. Erdincler. 2005. An unusual case of biliary obstruction caused by Dicrocoelium dentriticum. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37(5), 385-388.

20. Majidi-Rad, M., B. Meshgi and S. Bokaie. 2018. The prevalence and intensity rate of Dicrocoelium dendriticum infection in ruminants of 3 provinces in coastal regions of the Caspian Sea. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 12(1), 27-33.

21. Manga-González, M. Y., C. González-lanza, E. Cabanas and R. Campo. 2001. Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of Dicrocoelium dendriticum. *Parasitology*, 123(7), 91-114.

22. Martínez-Ibeas, A., M. Martínez-Valladares, C. González-Lanza, B. Miñambres and M. Y. Manga-González. 2011. Detection of Dicrocoelium dendriticum larval stages in mollusc and ant intermediate hosts by PCR, using mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS-2) sequences. *Parasitology*, 138(14), 1916-1923.

23. Ogambo-Ongoma, A. H. 1972. Fascioliasis survey in Uganda. *Bulletin of epizootic diseases of Africa Bulletin des epizooties en Afrique*, 20(1), 35-41.

24. Otranto, D., S. Rehbein, S. Weigl, C. Cantacessi, A. Parisi, R. P. Lia and P. D. Olson. 2007. Morphological and molecular differentiation between Dicrocoelium dendriticum (Rudolphi, 1819) and Dicrocoelium chinensis (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (platyhelminthes: Digenea). *Acta Tropica*, 104(2-3), 91-98.

25. Otranto, D. and D. Traversa. 2003. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends in Parasitology*, 19(1), 12-15.

26. Schweiger, F. and M. Kuhn. 2008. Dicrocoelium dendriticum infection in a patient with Crohn's disease. *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*, 22(6), 571-573.

27. Sugiyama, H., T. Singh and A. Rangsiruji. 2013. Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens. 1st ed. Taylor & Francis CRC Press. Florida, USA.

28. Taira, K., S. Shirasaka, N. Taira, Y. Ando and Y. Adachi. 2006. Morphometry on lancet flukes found in Japanese sika deer (Cervus nippon centralis) captured in Iwate Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science,* 68(4), 375-377.