

دراسة وبائية وتشخيصية لطيفلي دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica* في الجاموس باستعمال تقنية الـ
PCR في محافظة ذي قار

website :http:// jsci.utq.edu.iq

Email: utjsci@utq.edu.iq

** عبد الحسين حبش عواد

* فاضل عباس منشد العبادي

** قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة البصرة.

* قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة ذي قار.

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية وبائية طفيلي دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica* في حيوانات الجاموس المذبوحة في مجزرة مدينة الناصرية - محافظة ذي قار وللفترة من شهر آب 2008 إلى شهر تموز 2009. فحص خلالها 323 رأس من الجاموس بنسبة إصابة كلية 142 (43.96%) وشدة إصابة كلية 17.5. بلغت أعلى نسبة إصابة كلية في الجاموس خلال شهر تشرين الثاني 71.43% وسجلت أقل نسبة للإصابة في شهر آب 23.53% في حين سجلت أعلى شدة إصابة كلية في شهر نيسان 47.91% وأقلها كانت في شهر آب 5.25% ، ولوحظ فرق معنوي في نسبة وشدة إصابة الجاموس خلال أشهر السنة ($P<0.01$)، بلغ معدل نسبة إصابة الكبد في الجاموس 43.96% أعلى مما عليه في كيس الصفراء 7.12% وفي جميع أشهر السنة. لوحظ فرق معنوي في نسبة إصابة كل من الكبد وكيس الصفراء خلال أشهر السنة ($P<0.01$). كانت شدة إصابة الكبد في الجاموس أعلى من شدة إصابة كيس الصفراء في جميع أشهر السنة ويفرق معنوي ($P<0.01$) ما عدا شهري نيسان وأيار. اثر العمر على نسبة وشدة الإصابة في الجاموس إذ تأثرت نسبة وشدة الإصابة معنوياً في الجاموس باختلاف المجاميع العمرية ($P<0.01$) إذ شكلت الفئة العمرية اكبر من 4 سنة أعلى نسبة إصابة 73.08% وشدة إصابة 19.83 في حين كانت الفئة العمرية اقل من سنة واحدة اقل نسبة إصابة 1.19% وشدة إصابة 0.5. أظهرت نسبة إصابة الإناث 57.02% في الجاموس فروق معنوياً ($P<0.01$) باختلاف الجنس مقارنة بالذكور 9.09%. استعملت تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز (PCR) Polymerase Chain Reaction في تأكيد تشخيص طفيلي دودة الكبد العملاقة *F.gigantica* المعزولة من قنوات الصفراء للجاموس المصاب وتمييزها عن دودة حلزون الكبد *F.hepatica*.

Epidemiological and Diagnostic Study for *Fasciola gigantica* in Buffaloes by using PCR Technique at Thi-Qar Province

* Fadhil Abbas Al-Abady

** Abdul-Hussein H. Awad

*Biology Dep.-College of Education-Uni.of Thi-Qar.

**Biology Dep.-College of Education-Uni.of Basrah.

Abstract

The present study includes epidemiological survey for giant liver fluke parasite *Fasciola gigantica* in immolated buffaloes in slaughter house of Nasirriya city in Thi-Qar Province. The period of study extends from the beginning August 2008 up to end of July 2009. A total of 323 buffaloes were examined with percentage of whole infection 142(43.96%) and intensity of whole infection 17.5. The highest percentage for whole infection in buffaloes is in November 71.43 % and the least one is recorded in August 23.53 %, while the highest intensity of infection is recorded in April 47.91 and their least was in August 5.25 and the significant difference ($P<0.01$) is found in percentage and intensity of infection in buffaloes during the month of the year. The rate of liver infection percentage in buffaloes 43.96 % is higher than rate of gallbladder infection percentage 7.12 % in all the months of the year.

Significant differences are observed in the percentage of infection in both liver and gallbladder during the months of the year ($P < 0.01$). The infection intensity of liver in buffaloes is higher from gallbladder infection intensity in all months of the year with significant differences ($P < 0.01$) except April and May. The age has an influence on the percentage and intensity of infection in buffaloes. The percentage and intensity of infection is distinguished significantly in buffaloes with a difference of aged groups ($P < 0.01$) and buffaloes infection is recorded high in ages older than 4 years (73.08 %) and intensity of infection 19.83 while the buffaloes with age less than one year record a low percentage and intensity of infection 1.19 % and 5 respectively. The percentage of infection in females of buffaloes 57.02 % is distinguished significantly with difference of sex compared with males 9.09 % .

المقدمة

يعد مرض ديدان الكبد Fascioliasis أو ما يعرف بمرض تعفن الكبد Liver Rot من الأمراض المشتركة Zoonotic Diseases المهمة اقتصادياً والتي تؤثر بصورة رئيسة على الماشية في معظم دول العالم (Daniel & Mitchell, 2002 ; Saleha, 1991). تكمن أهمية المرض بصورة أساسية إما بسبب الخسائر المباشرة المقرونة بنقص معدل النمو وضعف إنتاجية الحليب ومصادرة الأكياد التالفة في المجزرة (Fagbemi & Hillyer, 1992) أو خسائر غير مباشرة بسبب التداخل مع القدرة التناسلية إضافة إلى التأخر في نمو الحيوانات الصغيرة (Heath et al., 1997). يشمل جنس *Fasciola* نوعين رئيسيين هما دودة حلزون الكبد *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 والنوع الآخر يعرف بدودة الكبد العملاقة *F. gigantica* Cobbold, 1856، ويعد النوعان عاملان مسببان للمرض في الإنسان والمجترات (Mas-Coma et al., 2005 ; Soulsby, 1982 ; Malek, 1980). عالمي الانتشار بينما يتمثل النوع الثاني في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من أفريقيا وآسيا (Bargues et al., 2001 ; Mas-Coma et al., 1999).

أشار التقرير المقدم من خبير منظمة الأغذية والزراعة التابعة لهيئة الأمم المتحدة إلى الحكومة العراقية بأن دودة حلزون الكبد تنتشر في المناطق الشمالية بينما دودة الكبد العملاقة تنتشر في المناطق الوسطى والجنوبية (Leiper, 1957)، وأكد التوزيع الجغرافي للنوعين أعلاه كل من (Al-Barwari (1971) و (Abdul-Rahman (1978).

تبدأ الإصابة بالطفيلي نتيجة تناول النباتات المائية المصابة بالذئبة المنكيسة أو شرب الماء الذي يحتوي على الذئبة المنكيسة (Roberts & Janovy, 2000)، وتعتمد وبائية المرض على تفضيل واختيار مكان الرعي حيث بين (Njau & Scholtens (1991 أن الذئبة المنكيسة تبقى حية لمدة ثلاثة أشهر في القش بعد عملية الحصاد.

تظهر المسوحات في بعض الأقطار الآسيوية أن الجاموس من بين الحيوانات الداجنة الذي يعاني من شدة الإصابة بالمرض (Sheikh et al., 1983 ; AL-Barwari, 1978 ; Balasingam, 1962) استعملت التقنيات الجزيئية مثل تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز Polymerase Chain Reaction (PCR) ومتغيراتها لتشخيص الأمراض الطفيلية ولدراسة الاستجابة المناعية في المصابين. أصبحت التقنيات الجزيئية مقبولة عموماً في العالم وتعد أكثر تخصصاً من الطرق التقليدية المستعملة في الدراسات الويائية (Mostafa et al., 2003 ; Kramer & Schnieder, 1994 ; Rognlie et al., 1998). والهدف من الدراسة الحالية هو:

١. تشخيص وجود الطفيلي في كبد وكيس الصفراء للجاموس المصابة في محافظة ذي قار باستخدام تقنية PCR
٢. دراسة تأثير العلاقة بين انتشار المرض و العوامل المؤثرة عليه .

المواد وطرائق العمل

الدراسة الويائية

جرى المسح الويائي لطفيلي دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica* في مجزرة مدينة الناصرية الواقعة في مركز محافظة ذي قار وللمدة من شهر آب 2008 ولغاية شهر تموز 2009. فحص 323 رأس من الجاموس (٨٨ ذكور ، ٢٣٥ إناث).

جمع العينات

جمعت العينات الخاصة بالمسح الويائي (ثلاث مرات في الأسبوع وطيبة مدة الدراسة) بين الساعة الرابعة صباحاً وحتى الساعة الثامنة والنصف صباحاً (فترة ذبح الحيوانات في المجزرة).

عزل الطفيلي

عزل طفيلي دودة الكبد العملاقة من أكباد حيوانات الجاموس المصابة بعد ذبح هذه الحيوانات إذ فتحت قنوات الصفراء الرئيسة الواقعة على السطح البطني للكبد وضغطت باليد لغرض جمع الطفيلي

استعملت طريقة (Yap & Thompson 1987) في استخلاص الـ DNA من ديدان الكبد مع بعض التحويرات البسيطة:

استعملت المواد التالية في عملية الترحيل الكهربائي :

- 1- محلول TBE buffer -2 مادة Agarose -3 DNA
- 4- Bromophenol blue in 2% glycerol
- 5- Ethidium bromide

أجريت طريقة الترحيل الكهربائي باستعمال جهاز Electrophoresis- isco-493-USA حسب طريقة (Sambrook *et al.* 1989)

وعلى ثلاث مراحل:

- 1- مرحلة تحضير الاكاروز
- 2- مرحلة صب الاكاروز
- 3- مرحلة الإضافات

طريقة عمل PCR

المواد المستعملة في الاختبار.

المادة	المصدر
Go TaqR Green master mix, 2X (PH 8.5) 1.25ml.	Promega.
Forward primer FgigF.	Alpha.
Reverse primer FgigR.	Alpha.
Forward primer FhepF.	Alpha.
Reverse primer FhepR.	Alpha.
100 base pair (bp) DNA ladder 250µL.	Promega.
Blue/orange 6X loading dye 1.25ml.	Promega.

- استعملت البادئات التالية لعمل PCR التي تضمنت بادئات لنوعي طفيلي *Fasciola* حسب (McGarry *et al.*, 2007).

Primer	Primer Sequences	Length	Tm	Ta
FgigF	(5'-GTT CAG GTG ACA AGC CAA-3')	18	54	49
FgigR	(5'-ATC ACA CCG TGA AGC AGA-3')	18	54	49
FhepF	(5'-GCG GCC AAA TAT GAG TCA-3')	18	54	49
FhepR	(5'-CTG GAG ATT CCG GTT ACC AA-3')	20	60	55

Tm = Melting Temperature.

Ta = Annealing Temperature.

كذلك عزل الطفيلي من كيس الصفراء في حالة الإصابة الشديدة وفي بعض الحالات فتح نسيج الكبد بواسطة السكين لاستخراج أكثر عدد من الديدان كما هو الحال في أكباد الجاموس المصاب وتمت عملية الجمع كالأتي :-

* جمعت الديدان بعد استخراجها في قناني زجاجية مختلفة الأحجام حاوية على المحلول الفسلجي وجلبت إلى مختبر الطفيليات - قسم علوم الحياة - كلية التربية.

* حسبت أعداد الديدان التي عزلت من كل حيوان مصاب ووضعت في قناني زجاجية مرقمة كتب عليها جنس الحيوان وعدد الديدان المعزولة بعد غسلها 3-4 مرات بمحلول دارئ الفوسفات الملحي (. PH 7.2) وفي كل مرة يسكب المحلول ويبدل بأخر.

* أضيف محلول الفورمالين تركيز 10 % لغرض حفظ هذه الديدان وبعد فترة 2 - 3 يوم أبدل الفورمالين بكحول الايثانول 70 % وأضيفت فطرئين كليسيرين نقي.

حساب نسبة الإصابة وشدتها

حسبت نسبة الإصابة وشدتها تبعاً لطريقة (Margolis *et al.* 1982)

- نسبة الإصابة Percentage of infection

$$\text{نسبة الإصابة} = \frac{\text{عدد الحيوانات المصابة}}{\text{عدد الحيوانات المفحوصة}} \times 100$$

- شدة الإصابة Intensity of infection

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{\text{معدل عدد الديدان}}{\text{عدد الحيوانات المصابة}}$$

تقدير عمر الحيوانات المذبوحة

قدر أعمار الحيوانات المذبوحة بطريقة التسنين (صالح وآخرون ، 1989) بالإضافة إلى مظهر الحيوان ورأي مربي الجاموس عند تقدير العمر في الجاموس.

الدراسة التشخيصية

حضرت المواد المستعملة في اختبار PCR حسب طريقة Yap & Thompson (1987) وطريقة (Sambrook *et al.* 1989).

استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

PCR product -4 Ethidium bromide -3
Blue/orange 6X loading dye -5 100 bp DNA ladder

بعد اكتمال عمل الجهاز أجري لنواتج تقنية PCR الترحيل الكهربائي وكما موضح سابقا في طريقة التحضير السابقة ماعدا وزن الاكاروز كان 0.5 غرام ليصبح التركيز 2% حيث أضيف 6 مايكروليتر من DNA ladder و 1 مايكروليتر من صبغة Blue/orange.6X loading Dye في إحدى الحفر كما أضيفت 9 مايكروليتر من عينات ناتج PCR في الحفر الأخرى.

التحليل الإحصائي

استعمل اختبار مربع كاي (Chi-Square (X2 في هذه الدراسة وباستعمال برنامج التحليل الإحصائي SPSS (الراوي، 1984).

النتائج

الدراسة الويائية

توزعت نسبة إصابة الجاموس على مدار السنة إلا أن نسبة الإصابة كانت مختلفة حيث سجلت أعلى نسبة للإصابة الكلية في الجاموس في شهر تشرين الثاني 71.43 % في حين سجلت أقل نسبة للإصابة في شهر آب 23.53 % ، ولوحظ أن أعلى شدة إصابة كلية كانت في شهر نيسان 47.91 وأقل شدة للإصابة سجلت في شهر آب 5.25 (جدول 1). اظهر التحليل الإحصائي أن نسبة الإصابة تأثرت معنوياً عند مستوى احتمالية (P<0.01) بأشهر السنة (X2=67.37) ، وتأثرت أعداد الديدان معنوياً عند مستوى احتمالية (P<0.01) بأشهر السنة (X2=1884.23) كذلك تأثرت شدة الإصابة معنوياً عند مستوى احتمالية (P<0.01) بأشهر السنة (X2=93.19).

• استعملت PCR Microtubes لغرض الإضافات في اختبارين منفصلين.

المكونات	الحجم	التركيز النهائي
Go Taq Green master mix.	12.5µL	1X
Primer FgigF .	1µL	0.1 – 1.0µM
Primer FgigR.	1µL	0.1 – 1.0µM
DNA	5.5µL	50ng
Distal water.	5µL	
Minerals.	25µL	

المكونات	الحجم	التركيز النهائي
Go Taq Green master mix.	12.5µL	1X
Primer FhepF.	1µL	0.1 – 1.0µM
Primer FhepR.	1µL	0.1 – 1.0µM
DNA	5.5µL	50ng
Distal water.	5µL	
Minerals.	25µL	

طردت العينات مركزياً باستعمال جهاز PCR centrifuge (Fisher Scientific – USA) لمدة ثلاث ثواني ، ونقلت العينات بعدها إلى جهاز PCR sprint (Thermo – Cyler – USA) وضبط برنامج عمل الجهاز وكالاتي :

الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
Preincubation.	95 م°	15 min	1
Denaturation.	94 م°	30 Sec	
Annealing.	56 م°	40 Sec	٣٠
Extention.	72 م°	1 min	
Extraincubation.	72 م°	3 min	1

الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية الـ PCR

المواد المستعملة :

1- محلول TBE buffer مادة Agarose 2-

في كل من الكبد والصفراء معنويا عند مستوى احتمالية ($P<0.01$) باختلاف أشهر السنة ($X^2=67.69$ و $X^2=20.82$ على التوالي لكل منهما). إن معدل شدة إصابة الكبد 13.96 اقل مما عليه في كيس الصفراء 21.96 إذ سجلت أعلى شدة إصابة في الكبد في شهر نيسان 23.91 في حين سجلت اقل شدة إصابة في الكبد في شهر أيار 5 جدول (2). بلغت أعلى شدة إصابة في كيس الصفراء في شهر نيسان 88 ولم تسجل أي شدة إصابة في كيس الصفراء في أشهر حزيران وتموز وأب جدول (3). إن شدة إصابة الكبد كانت أعلى من شدة إصابة كيس الصفراء في جميع أشهر السنة ما عدى شهري نيسان وأيار كانت اقل. تأثرت شدة الإصابة في كل من الكبد وكيس الصفراء معنويا عند مستوى احتمالية ($P<0.01$) بأشهر السنة ($X^2=37.04$ و $X^2=310.17$ على التوالي لكل منهما). كذلك تأثرت أعداد الديدان في كل من الكبد وكيس الصفراء معنويا ($P<0.01$) بأشهر السنة ($X^2=1238.71$ و $X^2=1039.16$ على التوالي لكل منهما).

جدول (1) نسبة وشدة الإصابة الكلية (الكبد وكيس الصفراء) لطيفلي دودة الكبد العملاقة في الجاموس حسب أشهر السنة.

الشهر	عدد الجاموس المفحوص	عدد الجاموس المصاب	نسبة الإصابة الكلية	عدد الديدان	شدة الإصابة الكلية (الكبد + كيس الصفراء)
آب	17	4	23.53	21	5.25
أيلول	23	9	39.13	86	9.56
تشرين الأول	28	15	53.57	184	12.27
تشرين الثاني	35	25	71.43	246	9.84
كانون الأول	49	15	30.61	247	16.47
كانون الثاني	37	22	59.46	608	27.64
شباط	18	10	55.56	121	12.1
آذار	29	14	48.28	257	18.36
نيسان	21	11	52.38	527	47.91
أيار	24	6	25	55	9.17
حزيران	19	5	26.32	38	7.6
تموز	23	6	26.09	95	15.83
المجموع	323	142	43.96	2485	17.5

نسبة الإصابة الكلية : $P<0.01$ ، X^2 tab.: 24.72 ، X^2 cal.: 67.37

شدة الإصابة الكلية : $P<0.01$ ، X^2 tab.: 24.72 ، X^2 cal.: 93.19 ،

عدد الديدان : $P<0.01$ ، X^2 tab.: 24.72 ، X^2 cal.: 1884.23 ،

سجلت أعلى نسبة إصابة في كبد الجاموس في شهر تشرين الثاني 71.43% في حين سجلت اقل نسبة إصابة في الكبد في شهر آب 23.35% جدول (2). بلغت أعلى نسبة إصابة في كيس الصفراء في الجاموس في شهر كانون الثاني 16.22% ولم تسجل نسبة إصابة في كيس الصفراء في أشهر حزيران ، تموز وأب جدول (3) إذ كانت نسبة إصابة الكبد أعلى من نسبة إصابة كيس الصفراء في جميع أشهر السنة. بينت نتائج التحليل الإحصائي تأثر نسبة الإصابة

جدول (3) نسبة الإصابة وشدها في كيس الصفراء للجاموس لطفيلي دودة الكبد العملاقة حسب أشهر السنة.

الشهر	عدد الجاموس المفحوص	عدد الجاموس المصاب في كيس الصفراء	نسبة الإصابة في كيس الصفراء	عدد الديدان في كيس الصفراء	شدة الإصابة في كيس الصفراء
آب	17	-	-	-	-
أيلول	23	3	13.04	18	6
تشرين الأول	28	3	10.71	21	7
تشرين الثاني	35	1	2.86	9	9
كانون الأول	49	4	8.16	52	13
كانون الثاني	37	6	16.22	113	18.83
شباط	18	1	5.56	2	2
آذار	29	1	3.45	1	1
نيسان	21	3	9.52	264	88
أيار	24	1	4.17	25	25
حزيران	19	--	-	-	-
تموز	23	-	-	-	-
المجموع	323	23	7.12	505	21.96

نسبة الإصابة في كيس الصفراء : $X^2 \text{ tab.}: 20.09$ ، $X^2 \text{ cal.}: 20.82$ $P<0.01$:
شدة الإصابة في كيس الصفراء : $X^2 \text{ tab.}: 20.09$ ، $X^2 \text{ cal.}: 310.17$ ، $P<0.01$
عدد الديدان في كيس الصفراء : $X^2 \text{ tab.}: 20.09$ ، $P<0.01$ ، $X^2 \text{ cal.}: 1039.16$ ،

بينت الدراسة أن للعمر تأثير على نسبة الإصابة وشدها في الجاموس إذ سجلت أعلى نسبة للإصابة بالطفيلي في الجاموس في الفئة العمرية أكبر من 4 سنوات بلغت 73.08 % وشدة إصابة 19.83 في حين سجلت الفئة العمرية أقل من سنة واحدة أقل نسبة

جدول(2) نسبة الإصابة وشدها في كبد الجاموس لطفيلي دودة الكبد العملاقة حسب أشهر السنة.

الشهر	عدد الجاموس المفحوص	عدد الجاموس المصاب في الكبد	نسبة الإصابة في الكبد	عدد الديدان في الكبد	شدة الإصابة في الكبد
آب	17	4	23.53	21	5.25
أيلول	23	9	39.13	68	7.56
تشرين الأول	28	15	53.57	163	10.87
تشرين الثاني	35	25	71.43	237	9.48
كانون الأول	49	15	30.61	195	13
كانون الثاني	37	22	59.46	495	22.5
شباط	18	10	55.56	119	11.9
آذار	29	14	48.28	256	18.29
نيسان	21	11	52.38	263	23.91
أيار	24	6	25	30	5
حزيران	19	5	26.32	38	7.6
تموز	23	6	26.09	95	15.83
المجموع	323	142	43.96	1980	13.94

نسبة الإصابة في الكبد : $X^2 \text{ tab.}: 24.72$ ، $X^2 \text{ cal.}: 67.69$ $P<0.01$:
شدة الإصابة في الكبد : $X^2 \text{ tab.}: 24.72$ ، $P<0.01$ ، $X^2 \text{ cal.}: 37.04$ ،
عدد الديدان في الكبد : $X^2 \text{ tab.}: 24.72$ ، $P<0.01$ ، $X^2 \text{ cal.}: 1238.71$ ،

جدول (5) تأثير الجنس على نسبة الإصابة وشدها في الجاموس.

الجنس	عدد الجاموس المفحوص	عدد الجاموس المصاب	نسبة الإصابة %	عدد الديدان	شدة الإصابة
ذكور	88	8	9.09	44	5.5
إناث	235	134	57.02	2441	18.22

نسبة الإصابة : $P < 0.01$ ، $X^2 \text{ tab.} : 6.63$ ، $X^2 \text{ cal.} : 34.90$

شدة الإصابة : $P < 0.01$ ، $X^2 \text{ tab.} : 6.63$ ، $X^2 \text{ cal.} : 8.16$ ،

عدد الديدان : $P < 0.01$ ، $X^2 \text{ tab.} : 6.63$ ، $X^2 \text{ cal.} : 2312.11$

توضح الدراسة التأثير المشترك للعمر والجنس على نسبة الإصابة وشدها في ذكور وإناث الجاموس إذ تزداد نسبة الإصابة في ذكور الجاموس بزيادة العمر إذ شكلت الفئة العمرية أكبر من 4 سنوات أعلى نسبة إصابة 66.66 % وأقلها سجلت في الفئة العمرية أقل من سنة واحدة 1.75 % ، ولم تسجل إصابة في الفئة العمرية 3 - 4 سنة. تزداد نسبة الإصابة في إناث الجاموس بزيادة العمر إذ شكلت الفئة العمرية أكبر من 4 سنوات نسبة إصابة 72.73 % ، ولم تسجل نسبة إصابة في الفئة العمرية أقل من سنة واحدة. تأثرت نسبة الإصابة معنويًا عند مستوى احتمالية ($P < 0.01$) بالتداخل بين العمر والجنس ($X^2 = 94.97$). جدول (6).

جدول (6) نسبة الإصابة في الجاموس المصاب بطفيلي دودة الكبد العملاقة حسب العمر والجنس.

العمر	عدد الجاموس المفحوص		عدد الجاموس المصاب		نسبة الإصابة %	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
أقل من سنة	57	27	1	--	1.75	--
1 - 2 سنة	27	15	5	5	18.52	33.33
3 - 4 سنة	1	39	--	17	--	43.59
أكبر من 4 سنوات	3	154	2	112	66.66	72.73

نسبة الإصابة : $P < 0.01$ ، $X^2 \text{ tab.} : 15.08$ ، $X^2 \text{ cal.} : 94.97$

تأثرت شدة الإصابة معنويًا عند مستوى احتمالية ($P < 0.01$) بالتداخل بين العمر والجنس ($X^2 = 18.32$) إذ سجلت الفئة العمرية أكبر من

1.19 % وشدة إصابة 5 ، إذ تأثرت نسبة الإصابة وشدها معنويًا عند مستوى احتمالية ($P < 0.01$) بالمجموعة العمرية ($X^2 = 79.00$) . كذلك تأثر عدد الديدان معنويًا بالمجموعة العمرية عند مستوى احتمالية ($P < 0.01$). جدول (4).

جدول (4) تأثير العمر على نسبة الإصابة وشدها في الجاموس.

العمر	عدد الجاموس المفحوص	عدد الجاموس المصاب	نسبة الإصابة %	عدد الديدان	شدة الإصابة
أقل من سنة	84	1	1.19	5	5
1 - 2 سنة	42	10	23.81	92	9.02
3 - 4 سنة	40	17	42.5	127	7.47
أكبر من 4 سنوات	157	114	73.08	2261	19.83

نسبة الإصابة : $P < 0.01$ ، $X^2 \text{ tab.} : 11.34$ ، $X^2 \text{ cal.} : 79.00$

شدة الإصابة : $P < 0.01$ ، $X^2 \text{ tab.} : 11.34$ ، $X^2 \text{ cal.} : 12.28$ ،

عدد الديدان : $P < 0.01$ ، $X^2 \text{ tab.} : 11.34$ ، $X^2 \text{ cal.} : 5783.39$ ،

بينت نتائج الدراسة أن للجنس تأثير على نسبة الإصابة وشدها في الجاموس إذ بلغ عدد ذكور الجاموس التي فحصت 88 وينسب إصابة 9.09 % وتم فحص 235 من إناث الجاموس وينسب إصابة 57.02 % حيث تأثرت نسبة الإصابة وعدد الديدان وشدة الإصابة معنويًا عند مستوى احتمالية ($P < 0.01$) مع جنس الحيوان وذلك بتفوق الإناث على الذكور ($X^2 = 34.90$ ، $X^2 = 2312.11$ ، $X^2 = 8.16$ على التوالي). جدول (5).

جدول (8) نسبة الإصابة بطفيلي دودة الكبد العملاقة في ذكور وإناث الجاموس حسب أشهر السنة.

الشهر	الذكور			الإناث		
	مفحوص	مصاب	% الإصابة	مفحوص	مصاب	% الإصابة
أب	7	1	14.29	10	3	30
أيلول	6	2	33.33	17	7	41.18
تشرين الأول	2	—	—	26	15	57.69
تشرين الثاني	4	—	—	31	25	80.65
كانون الأول	25	1	4	24	14	58.33
كانون الثاني	11	2	18.18	26	20	76.92
شباط	1	—	—	17	10	58.82
آذار	2	—	—	27	14	51.85
نيسان	2	1	50	19	10	52.63
أيار	10	1	10	14	5	35.71
حزيران	8	—	—	11	5	45.45
تموز	10	—	—	13	6	46.15

نسبة الإصابة : $X^2 \text{ tab.} : 33.40$, $P < 0.01$, $X^2 \text{ cal.} : 186.83$,

الدراسة التشخيصية

استعملت تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز في تشخيص طفيلي دودة الكبد العملاقة *F.gigantica* في الجاموس وتميزها عن طفيلي حلزون الكبد *F.hepatica* باستعمال نوعين من البادئات حيث أعطى التفاعل نتيجة موجبة عند استعمال البادئ الخاص بطفيلي *F.gigantica* بوجود DNA الطفيلي بحجم 235 bp مقارنة مع DNA Ladder في حين كانت النتيجة سالبة مع البادئ الخاص بطفيلي *F.hepatica* وكما موضح في الصور (1) و (2). مما يدل على أن الطفيلي الذي عزل هو طفيلي *F.gigantica*.

4 سنوات أعلى شدة إصابة في الذكور 10 في حين كانت شدة الإصابة في الفئة العمرية أقل من سنة واحدة 5 أعلى من الفئة العمرية 1 - 2 سنة 3.8 ولم تسجل شدة إصابة في الفئة العمرية 3 - 4 سنة. سجلت الإناث أعلى شدة إصابة بعمر أكبر من 4 سنوات 20.01 إلا أن شدة الإصابة في الفئة العمرية 3 - 4 سنوات 7.47 أقل مما عليه في الفئة العمرية 1 - 2 سنة 14.6 ، جدول (7).

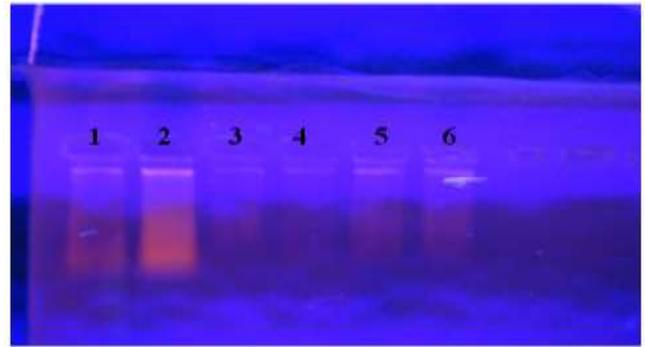
جدول (7) شدة الإصابة في الجاموس المصاب بطفيلي دودة الكبد العملاقة حسب العمر والجنس.

العمر	عدد الجاموس المصاب		عدد الجاموس المفحوص		شدة الإصابة
	♀	♂	♀	♂	
أقل من سنة	57	1	27	5	57.69
1 - 2 سنة	27	5	15	5	41.18
3 - 4 سنة	1	—	39	17	7.47
أكبر من 4 سنوات	3	2	154	112	20.01

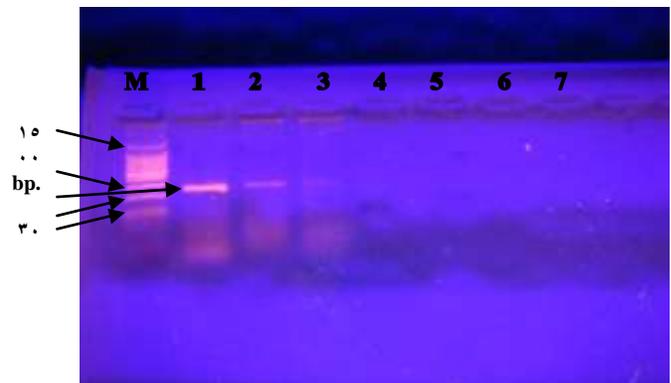
شدة الإصابة : $X^2 \text{ tab.} : 15.08$, $P < 0.01$, $X^2 \text{ cal.} : 18.32$,

سجلت أعلى نسبة إصابة في الجاموس في شهر تشرين الثاني 80.65 % وسجلت أقل نسبة إصابة في شهر آب 30 % وكانت أعلى نسبة إصابة للذكور في شهر نيسان 50 % وأقلها في شهر كانون الأول % 4 ولم تسجل إصابة في أغلب أشهر السنة. تأثرت نسبة الإصابة معنويًا عند مستوى احتمالية ($P < 0.01$) بالتداخل بين الجنس وأشهر السنة ($X^2 = 186.83$) جدول (8).

العالية لإصابة الجاموس في الهند ربما تكون بسبب تواجده في المسطحات المائية الحاوية على القواقع والتي تجعلها تشكل نسبة إصابة عالية. أوضح (Durrani *et al.* (2007) في الباكستان أن نسبة حدوث المرض العالية في الجاموس تعود إلى عدة عوامل منها تواجد الجاموس في أماكن المستنقعات والاهوار الغنية بالنباتات والحشائش في ضفاف القنوات التي تلتصق عليها المذنبات فضلا عن تواجد القواقع في هذه البيئات. لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسة Daryani *et al.* (2006) في شمال إيران إذ بين أن نسبة إصابة الجاموس بطفيلي *Fasciola sp* (11.4 %) ، كذلك لم تتفق مع دراسة Haridy *et al.* (1999) في مصر الذي بين أن نسبة إصابة الجاموس 1.58 % . بينت الدراسة الحالية وجود فروق معنوية في نسبة وشدة الإصابة في الجاموس باختلاف أشهر السنة. بينت عبد الرزاق (1988) في دراسة أجريت في محافظة البصرة أن نسبة الإصابة كانت عالية في شهري تشرين الأول والثاني . أشارت دراسة Adedokun *et al.* (2008) في نيجيريا وجود فترتين رئيسيتين في ارتفاع نسبة انتشار الإصابة الأولى في شهر شباط والأخرى من شهر أيلول إلى شهر تشرين الأول ، كذلك تتفق مع دراسة (Yadav *et al.* (2007) في الهند الذي سجل أعلى نسبة انتشار للإصابة في الأبقار والجاموس في أشهر كانون الثاني وشباط مع فترة أخرى في تشرين الأول في الجاموس وسجل نسبة انتشار واطئة للإصابة في شهر تموز. اظهر (Maqbool *et al.* (2002) في الباكستان نسبة واطئة للإصابة في الجاموس في أشهر الصيف (أيار- آب) إلا انه سجل أعلى نسبة انتشار للإصابة في أشهر الخريف (أيلول- تشرين الأول). قد يعود التباين في ارتفاع نسب الإصابة خلال أشهر السنة في الجاموس إلى العديد من العوامل البيئية والظروف المناخية خصوصا درجة الحرارة والرطوبة وتساقط الأمطار التي تلعب دورا كبيرا في تباين نسب الإصابة وكذلك تواجد المضيف الوسطي والنهائي في المكان نفسه والعوامل التي تؤثر على كثافة وفترة إصابة المضيف الوسطي والفترة التي تقضيها المراحل اليرقية وانطلاق المذنبه وتكيسها على النباتات إذ تحتاج إلى ثلاثة أشهر لنضجها في المضيف النهائي. بين Ollershaw (1958) وجود عاملين مهمين يؤثران في نسبة انتشار مرض ديدان الكبد هما درجة الحرارة والرطوبة لتأثيرهما على عملية فقس بيوض المتقوية ، حيوية المذنبه المتكيسة وكثافة القواقع كذلك بين وجود موسمين تكون فيهما درجة الحرارة والرطوبة ملائمة للتكرار السريع لدورة الحياة الطفيلية. سجل Phiri *et al.* (2005) التباين الموسمي



صورة (1) تبين الترحيل الكهربائي Electrophoresis للتأكد من وجود الـ DNA المعزول من الديدان.



صورة (2) تبين الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية PCR. تمثل العينات 1 ، 2 ، 3 طفيلي *F.gigantica* (235 bp). بينما تمثل العينات 4 ، 5 ، 6 ، 7 طفيلي *F.hepatica* M يمثل DNA Ladder.

المناقشة

الدراسة الوبائية

بينت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع معدل نسبة إصابة الجاموس بطفيلي دودة الكبد العملاقة *F.gigantica* حيث تتفق نتائج الدراسة الحالية مع الدراسات التي أجريت في العراق إذ بينت دراسة Al-Mashhadani (1970) أن نسبة إصابة الجاموس بلغت 42.6 % . يعود السبب في ارتفاع نسبة وشدة إصابة الجاموس بالطفيلي إلى أسلوب معيشته وتربيته وتواجده في بيئات الاهوار والمستنقعات. أشار صالح وآخرون (1989) أن الجاموس في العراق يتركز في مناطق الاهوار وخاصة محافظات البصرة وميسان وذي قار إذ يعيش معظم جاموس الاهوار على النباتات الطبيعية التي تنمو في الاهوار كالبردي والجولان والمران. بين Gupta & Singh (2002) أن نسبة الانتشار

(2003) Scroferneker في البرازيل اللذين بينا أن نسبة إصابة الجاموس بطفيلي *F. hepatica* كانت أعلى بعمر سنتين أو أقل. أوضحت الدراسة الحالية تأثر نسبة وشدة الإصابة في إناث الجاموس ويفارق معنوي مقارنة بالذكور. قد يعود السبب في تفوق نسبة وشدة الإصابة في الإناث على الذكور إلى تربية الذكور في حظائر خاصة إذ يقدم لها العلف الجاهز لغرض الاهتمام بصحتها وتسمينها حيث تذب في أعمار مبكرة في حين تترك الإناث للرعي في المراعي المفتوحة واقترباها من مصادر الإصابة خصوصا النباتات القريبة من حافة النهر فضلاً عن أنها تذب في أعمار متأخرة.

الدراسة التشخيصية

أثبتت نتائج تقنية PCR اعتماداً على نوعين من البادئات أحدهما لطفيلي دودة الكبد العملاقة والأخر لطفيلي دودة حلزون الكبد تشخيص طفيلي دودة الكبد العملاقة في الجاموس في الدراسة الحالية إذ كانت النتيجة موجبة مع بادئ دودة الكبد العملاقة بوجود DNA الطفيلي بحجم 235 bp عند مقارنته مع DNA Ladder في حين كانت النتيجة سالبة مع البادئ الأخر. اتفقت نتائج الدراسة أعلاه مع دراسة (McGarry et al. (2007 في تمييز نوعي طفيلي *Fasciola* والمؤكدة تشريحياً وشكلياً باستعمال نوعين من البادئات أحدهما لطفيلي دودة الكبد العملاقة (وجود DNA الطفيلي بحجم 235 bp) والأخر لطفيلي دودة حلزون الكبد (وجود DNA بحجم 391 bp) في تفاعلين منفصلين باستعمال تقنية PCR. بين (Mostafa et al. (2003 في دراسة أجراها في مصر لتشخيص دودة الكبد العملاقة في المضائف النهائية (الأغنام، الأبقار والجاموس) باستعمال بادئات خاصة إذ لاحظ وجود DNA بحجم 124 bp وكانت النتيجة سلبية مع دودة حلزون الكبد. يعتمد سابقاً في التمييز بين النوعين المذكورين أعلاه طبقاً إلى الحجم والشكل وحجم البيوض التي تطرحها (Valero et al., 2001) إلا أن دراسة المظهر الخارجي لهذين النوعين لا يعتمد عليه في التمييز بين النوعين بشكل مؤكد (Marcilla et al., 2002).

ونمط التوزيع لطفيلي دودة الكبد العملاقة إذ شكلت المناطق التي يحدث فيها تساقط الأمطار بنسبة عالية نسبة انتشار للمرض أكثر من المناطق التي يكون فيها تساقط الأمطار قليل نسبياً. إن ارتفاع نسب الإصابة في أشهر تشرين الأول والثاني، كانون الأول، كانون الثاني وشباط في الدراسة الحالية ربما يعود إلى إصابة المضائف النهائية بالمذنبات المتكيسة في أشهر الصيف حزيران، آب وأيلول. أظهر (Adedokun et al. (2008 في نيجيريا أن الارتفاع في نسب الإصابة في شهر أيلول وتشرين الأول بسبب اخذ كمية كبيرة من اليرقات (المذنبات المتكيسة على النباتات) في شهر حزيران وتموز حيث تحتاج المذنبات المتكيسة إلى ثلاثة أشهر إلى نضجها في المضيف النهائي. أوضح (Yadav et al. (2007 إن نسبة الانتشار العالية لإصابة القواقع في أشهر أيار، حزيران، آب وأيلول تتفق أيضاً مع أعلى نسبة انتشار للإصابة في المضائف النهائية خلال تشرين الأول وكانون الثاني وشباط بعد إصابة المضيف الملائم حيث تتضج المثقوبات في حوالي 14 - 15 أسبوع أو كحد أقصى 110 يوم (Verma, 1981). لوحظ في الدراسة الحالية وجود فروق معنوية في نسبة وشدة الإصابة في الكبد وكيس الصفراء للجاموس باختلاف أشهر السنة (ومن الجدير بالذكر أن سبب حساب نسبة إصابة الكبد وكيس الصفراء هو لمعرفة موقع تواجد الطفيلي في قناة الصفراء وفي كيس الصفراء ومعرفة الضرر الذي يسببه في كل من قناة وكيس الصفراء). يعود السبب في ارتفاع شدة الإصابة في كيس الصفراء إلى كثرة عدد الديدان وقلة الحيوانات المصابة حيث تتركز إصابة كيس الصفراء بالطفيلي في الحيوانات الكبيرة (3 - 4 سنوات) والأكبر من 4 سنوات) والتي تكون أصابتها مزمنة. شكلت الفئة العمرية أقل من سنة واحدة أقل نسبة وشدة إصابة في الجاموس ويفارق معنوي عن المجاميع العمرية الأخرى. يعود السبب ربما في ارتفاع نسب الإصابة في الحيوانات الكبيرة العمر إلى أسلوب تربية وتغذية الحيوانات وغالباً ما تكون أكثر عرضه للإصابة نتيجة ضعف مقاومتها وتواجدها في المرعى وتتاول النباتات القريبة من حافة النهر في حين تربي الحيوانات التي بعمر أقل من سنة واحدة داخل حظائر خاصة ويقدم لها العلف الجاهز كذلك يميل المربين إلى بيع الحيوانات الكبيرة والاحتفاظ بالحيوانات الصغيرة بين (Maqbool et al. (2002 في الباكستان في دراسته أن نسبة حدوث الإصابة كانت أكثر تكراراً في الجاموس بعمر أكبر من سنتين. لم تتفق نتائج الدراسة مع دراسة Marques &

References

المصادر

صالح، أحمد الحاج طه و يونس، أكرم ذنون والراشد، محمود راشد (1989). ماشية الحليب. دار الكتب للطباعة والنشر - جامعة الموصل. 356 صفحة .

- of Liver Fluke Infection in Slaughtered Animals in Ardabil Province, Northwestern Iran. *J. Ani & Vet. Adv.*, 5: 408 – 411.
- Durrani, A. Z.; Khan, M. S.; and Kamal, N. (2007). Prevalence of Fasciolosis in buffaloes and Comparative Efficacy of Endoactiven and Nitroxynil against Fasciolosis. *J. Anim. Sci.* 17: 1 – 2.
- Fagbemi, B. O. and Hillyer, G. V. (1992). Partial purification and characterization of the proteolytic enzymes of *F. gigantica* adult worms. *Vet. Parasitol.*, 40 :217 – 226.
- Gupta, S. C. and Singh, B. P. (2002). Fasciolosis in cattle and buffaloes in India. *J. Vet. Parasitol.*, 16: 139 – 46 .
- Haridy, F. M.; Ibrahim, B. B. and Morsy, T. A. (1999). Fascioliasis an increasing zoonotic disease in Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 29: 35 – 48 .
- Heath, H.; Blagburn, B. L.; Esasser, T. T.; Pugh, D. G.; Sanders, G.; Sartin, E.; Steele, B. and Sartin, J. L. (1997). Hormonal modulation the physiological responses of Calves infected with *Eimeria bovis*. *J. Vet. Res.*, 58 :891- 896.
- Kramer, F. and Schnieder, T. (1998). Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola* . *Int. J. parasitol.*, 28: 1923 – 1929.
- Leiper ,J. W. (1957). Animal parasites and their control . Report to the Government of Iraq . FAO .Rome , No.610 .
- Malek, E. A. (1980). Snail –transmitted parasitic disease .Library of congress cataloging in publication data,USA 11 : 131 – 170.
- Maqbool, A.; Chuadhry, S. H.; Akhtar, T.; and Hashmi, H. A. (2002). Epidemiology of fasciolosis in buffaloes under different manaaemental conditions. *Vet. Arhiv.*, 72: 221 – 228.
- Marcilla, A.; Bargues, M. D. and Mas-Coma, S. (2002). A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *F.gigantica*. *Mol. Cell. Pro.*, 16 : 327 – 333.
- Margolis, L.; Esch, G. W.; Holmes, J. C.; Kuris, A. M. and Schad, G. A. (1982). The use of عبد الرزاق ، أحلام طارش (1988). بعض التأثيرات المرضية التي تسببها ديدان الكبد فاشيولا جايجانتিকা في الأبقار. رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة البصرة . 85 صفحة . الراوي ، خاشع محمود (1984) . مدخل الى الاحصاء ، جامعة الموصل ، ص 469 .
- Abdul – Rahman, R. A. (1978). Studies on some aspects of ovine fascioliasis in Iraq with particular reference to pathology and haematology of the disease due to *Fasciola gigantica* infection. M.Sc. Thesis, Univ. Baghdad .
- Adedokun, O. A.; Ayinmode, A. B.; and Fagbemi, B. O. (2008). Seasonal prevalence of *Fasciola gigantica* infection among the sexes in Nigerian Cattle. *Vet . Res.*, 2 : 12 – 14 .
- Al-Barwari, S. E. (1971) .The role of carbohydrate in the biology of the liver fluke, *Fasciola gigantica* (Cobbold 1856). M.Sc. Thesis. Univ. Baghdad.
- Al-Barwari, S. E. (1978). Survey on liver infections with *Fasciola gigantica* among slaughtered animals in Iraq . *Bull. End. Dis.*, 18:75 – 92
- Al-Mashhadani, H. M. (1970). Morphology and ecology of Lymnaeid snail of Iraq with special references to fascioliasis. M.Sc. Thesis, Univ. Baghdad. PP: 179.
- Balasingam, E. (1962). Studies on fascioliasis of cattle and buffaloes in Singapore due to *Fasciola gigantica*. *Cobbold Ceylon Vet. J.*, 10: 10 – 29 .
- Bargues, M. D.; Vigo, M.; Horak, P.; Dvorak, J.; Patzner, R. A.; Poinitier, J. P.; Jackiewicz, M.; Meier – Brook C.; Mas – Coma, S. (2001). European Lymnaeidae (Mollusca:Gastropoda), intermediate host of trematodiasis based on nucleated ribosomal DNA Its-2 sequences infection. *Gen. Evol.*, 1:85 – 107.
- Bindernagel, J. A. (1972). Liver fluke *Fasciola gigantica* in African buffalo and Antelope in Uganada, East Africa. *J. Wildlife. Dis.*, 8: 315 – 317.
- Daniel, R. and Mitchell, S. (2002). Fascioliasis in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, 151 – 219.
- Daryani, A.; Alaei, R.; Arab, R.; Sharif, M.; Dehghan, M.H.; and Ziaei, H. (2006). Prevalence

- Saleha, A. A. (1991). Liver fluke disease (Fascioliasis): Epidemiology, economic impact and public health significance. *southeast Asian. J. Trop. Med. Pub. Health.*, 22 : 361 – 364 .
- Sambrook, J.; Fritsh, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2ndEd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
- Sheikh, H. U.; Haq, M. M.; Karim, M. J.; and Khan, M. M. (1983). Parasites of zoonotic importance in domestic ruminants. *Pak. Vet. J.*, 3 : 23 – 25 .
- Silva, A. P.; Hillyer, V.; Arias, S.; Andrade, R. S.; Pedreira, J.; Suarez, J. (2007). A Cross - Sectional Study of Fasciolosis in Autochthonous Cattle from NW Spain by Using a 2.9-KDa Recombinant protein. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 5: 52 – 56.
- Soulsby, E. J. (1982). *Helminthes ,arthropods and domesticated animals* .7th Ed., Bailliere ,Tindall and casell, London .PP. 40 – 52.
- Ulayi, B. M.; Umaru – Sule, B.; and Adamu, S. (2007). Prevalence of *Dicrocoelium hospes* and *Fasciola gigantica* infections in cattle at Slaughter in Zaria, Nigeria. *J. Anim. Vet. Adv.*, 6 : 1112 – 1115 .
- Valero, M. A.; Darce, N. A.; Panova, M. and Mas-Coma, S. (2001). Relationships between host species and morphometric Bolivian Altiplano hyperendemic patterns in *Fasciola hepatica* adult and eggs from northern region. *Vet. Parasitol.*, 102 : 85 – 100 .
- Verma, A. K. (1981). Epidemiology, host-parasite relationship and control of fascioliasis in sheep, goats, cattle and buffaloes. *Pro. Sum. Inst., ICAR.* PP. 39.
- Yadav, C. L.; Garg, R.; Kumar, R. R.; Banerjee, P.S.; and Godara, R. (2007). Seasonal dynamics of *Fasciola gigantica* infection in cattle and buffaloes in Uttaranchal, India . *Indian. J. Anim. Sci.*, 77 : 133 – 135 .
- Yap, K. W. and Thompson, R. C. (1987). CTAB precipitation of cestode DNA . *Parasitol., Today*, 3 : 220 – 22
- ecological terms in parasitology. *J. Parasitol.*, 68 : 131 – 133.
- Marques, S. M. and Scroferneker, M. L. (2003). *Fasciola hepatica* infection in cattle and buffaloes in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Parasitol Latinoam* 58: 169 – 172.
- Mas-Coma, S.; Bargues, M. D. and Valero, M. A. (2005). Fascioliasis and Other plant –borne trematode Zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 35:1255 – 1278 .
- Mas-Coma, S.; Esteban, J. G.; Bargues, M. D. (1999). Epidemiology of human fascioliasis : a review and proposed new classification . *Bull. W. H. O.*, 77: 340 – 346.
- McGarry, J. W.; Ortiz, P. L.; Hodgkinson, J. E.; Goreish, I. and Williams, D. J. (2007). PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: Fasciolidae), using primers based on RAPD-derived sequences. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 5 : 415 – 421.
- Mostafa, O. M.; Taha, H. A. and Ramadan, G. (2003). Diagnosis of *Fasciola gigantica* in snail using polymerase chain reaction (PCR) assay. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 33 : 733 – 742.
- Njau, B. C. and Scholtens, R. G. (1991). The role of traditionally harvested hay in the transmission of ovine fascioliasis in the Ethiopian highlands. *Vet. Res. Com.*, 15: 369 – 372 .
- Ollerenshaw, C. B. (1958). Climate and liver fluke. In Maqbool, A.; Chuadhry, S. H.; Akhtar, T.; and Hashmi, H. A. (2002). Epidemiology of fasciolosis in buffaloes under different manaaemental conditions. *Vet. Arhiv.*, 72: 221 – 228.
- Phiri, A. M.; Phiri, I. k.; Sikasunge, C. S. and Monrad, J. (2005). Prevalence of fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with Emphasis on Age, Sex and origin. *J. Vet. Med. B.*, 52: 414 – 416 .
- Roberts , L. S. and Janovy, J. (2000). *Foundation of parasitology* . 6th Edn ., J. McGraw Hill Book Co., PP. 256 - 259 .
- Rognlie, M.; Dimke, K. and Knapp, S. (1994). detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT- PCR. *J. Parasitol.*, 80 : 748 – 755 .