● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ ششم، شمارهٔ ۳، ص ۱۴۰-۱۳۴، ۱۳۷۸

مقالهٔ پژوهشی

مطالعه‌ای بر چرخه زندگی انگل هاپلورکیس تائیشویی از خانواده هتروفیده (Heterophyidae) در آزمایشگاه

دکتر علی فرهناک[1] و دکتر جعفر مسعود[2]

خلاصه

Haplorchis taichui یکی از انگل‌های خانواده هتروفیده (Heterophyidae) که از ترماتدها هستند می‌باشد که در لایه مخاطی روده میزبان زندگی می‌کند و بیماری زئونوز هتروفیدوز (Heterophyidosis) را در انسان بوجود می‌آورد. این مطالعه با هدف ایجاد چرخه زندگی این انگل‌ها به طور تجربی در شرایط آزمایشگاهی و متعاقب مطالعات قبلی نویسندگان بر روی چرخهٔ زندگی انگل در طبیعت، در استان خوزستان انجام گرفت. در این مطالعه تخم انگل هتروفیده در مجاورت حلزون ملانوئیدس توبرکولاتا (Melanoides tuberculata) و ملانوپسیس (Melanopsis spp) قرار داده شد و پس از بدست آوردن سرکر (cercariae) از حلزون ملانوئیدس، ماهی‌های گامبوزیا (Gambusia affinis) توسط آنها آلوده گردیدند که پس از یک ماه، ماهی‌های آلوده به متاسرکر (Metacercariae) به گربه (Domestic cat)، رات (Ratus ratus)، جوجه (Hen's chicken) و موش (Mus musculus) خورانده شدند که متعاقباً پس از یک ماه، حیوانات آزمایشگاهی جهت بازیافت انگل کالبدگشایی گردیدند و انگل هاپلورکیس تائیشویی (Haplorchis taishui) از گربه و رات بدست آمد. این مطالعه نشان می‌دهد چرخه زندگی انگل هاپلورکیس تائیشویی به عنوان یک مدل تحقیقاتی در انگل‌شناسی به راحتی در آزمایشگاه و در حیوانات حساس یعنی رات و گربه قابل نگهداری است.

واژه‌های کلیدی: هاپلورکیس تائیشویی، هتروفیده، چرخه زندگی، مطالعه تجربی

۱- استادیار انگل‌شناسی، ۲- استاد انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

مقدمه

کرم‌های بالغ هتروفیده و از جمله هاپلورکیس (Haplorchis spp) تخم‌مرغی شکل بوده که در لایه مخاطی روده انسان زندگی می‌کنند. انگل، میزبان پستاندار خود را در حالی که کاملاً جنین‌دار (میراسیدیوم) هستند، همراه با مدفوع ترک می‌کند. میزبان واسط حلزونی آنها، Pirenella conica در مصر و Cerithidea و Semisulcospira در ژاپن و چندین حلزون Melaniid, Hydrobiid دیگر، تخم انگل هتروفیده را می‌بلعند و در داخل روده حلزون، میراسیدیوم بارور شده و تبدیل به اسپوروسیت می‌شود و متعاقباً یک تا دو نسل رد یا حاصل می‌شود که در نهایت سرکر را تولید می‌کنند. سرکر معمولاً دارای باله‌های پشتی، شکمی و جانبی و یا فقط جانبی و نیز دو لکه چشمی (Biocellate) است. سرکر پس از خروج از حلزون با شنا خود را به ماهی (میزبان واسط دوم) آب شیرین، نیمه‌شور (Brakish) و یا دریا (Marin) رسانده و روی بدن آنها کیسته می‌شود و متاسرکر تشکیل می‌گردد. مرحله متاسرکر در اغلب گونه‌های هتروفیده در عضلات ماهی دیده می‌شود، اما در بعضی نظیر هاپلورکیس زیرفلس، زیرپوست و یا باله‌ها هم دیده می‌شود. متاسرکر در عرض ۲۰ روز در ماهی عفونی شده و پرندگان یا پستانداران ماهی‌خوار و انسان، عفونت را از طریق مصرف ماهی آلوده خام و یا نیمه خام کسب نموده و در عرض ۱۵-۳ روز تخم را در مدفوع دفع می‌کنند. ماهی‌های آلوده به متاسرکر قرار داده شده در آب نمک و یا شراب برنج (Rice wine) حتی برای چندین روز نیز برای انسان عفونت‌زا باقی می‌مانند. علاوه بر مخازن حیوانی، مواد دفعی انسان به ویژه صیادان و خانواده‌هایشان نیز می‌تواند در صورت دفع در محیط ماهی‌ها و حلزون‌های مربوطه، موجب ابتلاء آنها و تکرار چرخه زندگی انگل شود. علی‌رغم اعتقاد عمومی بر اینکه طول عمر انگل‌ها در بدن میزبان پستاندار و یا پرنده کم است لکن عفونت‌های تجربی نشان داده است که کرم قادر است تا بیش از یکسال هم زندگی کند (۹).

چرخه زندگی هتروفیده اولین بار توسط فاوست نشان داده شد (۴). سرکر هتروفیده از اردن، امارات، فیلیپین و هند و متاسرکر آنها از ویتنام گزارش شده است (۵,۶,۷,۸,۱۱). مطالعه حاضر متعاقب مطالعات قبلی نویسندگان بر روی چرخه زندگی انگل در طبیعت و در انسان و حیوان و حلزون‌ها و ماهی‌ها و با هدف بررسی چرخه زندگی این ترماتد یعنی هاپلورکیس به صورت تجربی و در آزمایشگاه انجام گرفته است (۱,۲,۳).

مواد و روش‌ها

آلوده کردن حلزون با تخم انگل بدست آمده از انسان و یا حیوان

مدفوع آلوده به تخم هتروفیده انسان یا حیوان را پس از چند بار شستشو و عبور از الک‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ به حداقل حجم و حداکثر غلظت تخم در واحد حجم رسانده، از طرف دیگر نسل آزمایشگاهی حلزونهای ملانوئیدس و ملانوپسیس‌های جوان و غیر آلوده را که در روش لوله‌گذاری منفی بودند، در اکواریوم پلاستیکی همراه شن و آب قرار داده و سپس در طی چند روز به طور متوالی نمونه انسانی در اکواریوم حلزونی مربوطه و نمونه حیوانی در اکواریوم مربوطه ریخته می‌شد و پس از یک الی دو ماه حلزون‌ها لوله‌گذاری و یا له گردیده و از نظر وجود سرکر بررسی می‌شدند، در مواردی که انگل هتروفیده زنده و تازه از مخازن یا حیوانات آلوده به دست می‌آمد در بشر به ترتیب فوق عمل می‌شد. ضمناً در این بشر انگل له شده (Crushed) و یا سالم همراه حلزون قرار داده می‌شد و مجدداً ۲-۱ ماه بعد از آلودگی بررسی می‌گردید.

آلوده کردن ماهی گامبوزیا با سرکر به دست آمده از حلزون‌های آلوده

حلزون‌های آلوده به سرکر را که در روش لوله‌گذاری و یا له شده تشخیص داده می‌شدند، به تعداد ۱۰-۵ عدد همراه ۲۰-۱۰ قطعه ماهی گامبوزیا در اکواریوم قرار داده و پس از ۴۸-۲۴ ساعت به اکواریوم مربوطه برگردانده می‌شدند. این ماهی‌ها در طول یک دوره یک ماهه از نظر مراحل تشکیل متاسرکر بررسی گردیدند. بدین ترتیب که ماهی زیر لوپ از نظر آلودگی بررسی و سپس متاسرکرها با آنس از قسمت باله دمی جدا و زیر لام و لامل و با میکروسکوپ مراحل رشد آن دنبال می‌شد. درجه حرارت آب آکواریوم ماهی‌ها ۱۵°C-۱۰ در فصول سرد و ۲۰°C-۱۵ در فصول گرم بود، متقابلاً درجه حرارت آزمایشگاه در فصول سرد ۲۵°C-۲۰ و در فصول گرم ۳۰°C-۲۵ بود. در مرحله بعد، از این ماهی‌ها برای آلوده کردن حیوانات آزمایشگاهی و به دست آوردن فرم بالغ استفاده گردید.

آلوده کردن حیوانات آزمایشگاهی با ماهی گامبوزیا

گربه، رات و جوجه به مدت ۱۲ ساعت گرسنه نگه داشته شدند. سپس ماهی‌های آلوده به متاسرکر به صورت طعمه در دسترس آنها در قفس قرار داده شد و پس از اطمینان از مصرف، به محل اصلی در حیوان‌خانه منتقل گردیدند. سپس حیوانات بعد

از ۱ ماه، اتوپسی و از نظر وجود انگل بالغ احتمالی در روده مورد جستجو قرار گرفتند. مجموعاً ۲ گربه، ۵ رات و ۵ موش و ۵ جوجه آلوده گردیدند که آلودگی موش از طریق قطره‌چکان بود و بقیه از طریق طعمه انجام گرفت.

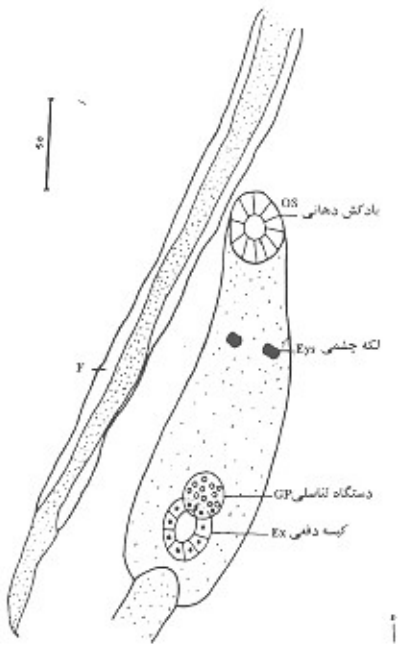
نتایج

پس از آلودگی‌های مکرر حلزون ملانوئیدس و ملانوپسیس با تخم انگل بدست آمده از حیوان و یا انسان (۲ بار با مدفوع آلوده به تخم انگل بیماران، ۷ بار با مدفوع آلوده به تخم انگل سگ مبتلا، ۱ بار با محتویات روده رات آلوده به هتروفیده، ۱ بار با محتویات روده شغال آلوده، ۲ بار با انگل له شده حاصل از گربه آلوده، ۱ بار با انگل له شده حاصل از مخازن) بعد از ۶۵ روز در دو مورد از مجاورت حلزون ملانوئیدس با مدفوع آلوده به تخم انگل سگ و انگل له شده حاصل از گربه، ۵ حلزون آلوده به سرکرهای پلورکیس به دست آمد (جدول ۱). لازم به ذکر است مجموعاً ۱۴ حلزون ملانوئیدس در مجاورت تخم انگل قرار داده شد (شکل ۱).

با قراردادن ماهی‌های گامبوزیا در کنار ملانوئیدس‌های آلوده به سرکر جنس هاپلورکیس، متاسرکر مربوطه در رگ بال‌های غضروفی دم ماهی و یا پوست قاعده ماهی بدست آمد که مشخصات آن در جدول (۱) آمده است. مشخصات مورفولوژیکی مراحل تشکیل متاسرکر در ماهی مورد مطالعه بصورت شماتیک در اشکال ۳ و ۲ نشان داده شده است.

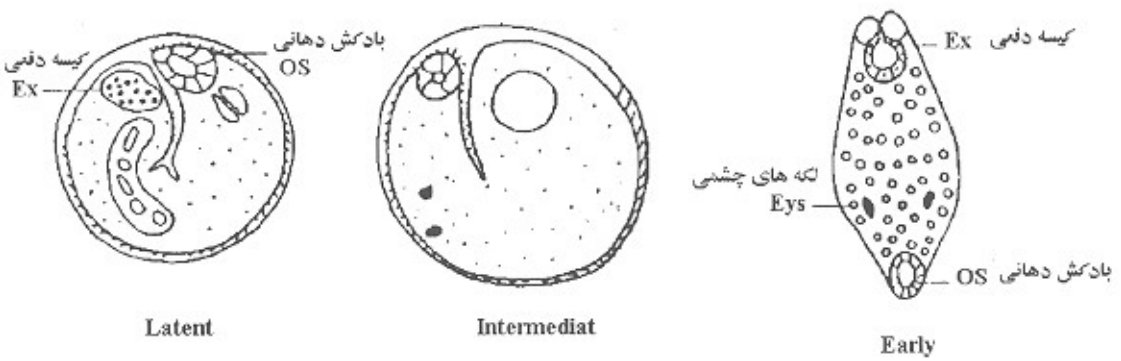
از مجموع ۲ گربه آلوده شده با ماهی گامبوزیا (حاوی متاسرکر)، یک مورد به دلیل مرگ از دست رفت ولی مورد دیگر بعد از ۱ ماه از آلودگی، در اتوپسی تعداد کمی انگل بالغ هاپورکیس تائیشویی را نشان داد (شکل ۴).

همچنین از مجموع ۵ رات آلوده شده با متاسرکر، یک مورد انگل بالغ هاپلورکیس تائیشویی همانند آنچه که در گربه بدست آمد، پیدا شد که مشخصات آن در جدول (۱) آمده است. از ۵ موش و ۵ جوجه آلوده شده توسط گامبوزیای حاوی متاسرکر هاپلورکیس هیچ گونه انگلی بدست نیامد.

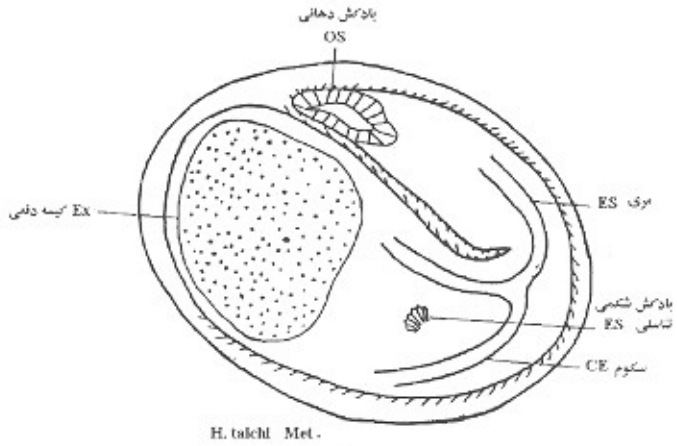


Haplorchis. cer.

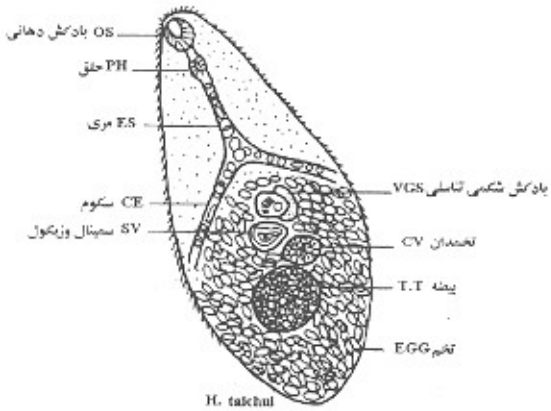
شکل ۱ : سرکر هاپلورکیس به دست آمده از حلزون



شکل ۲ : مراحل تشکیل متاسرکر هاپلورکیس (در زمان‌های مختلف) بر روی ماهی گامبوزیا در شرایط تجربی



شکل ۳ : متاسرکر رسیده هاپلورکیس *تائیشویی*، به دست آمده از ماهی



شکل ۴ : *انگل بالغ هاپلورکیس تائیشویی به دست آمده از گربه اهلی در شرایط تجربی*

جدول ۱ : مشخصات مورفومتری مراحل مختلف چرخه زندگی انگل هتروفیده (*هاپلورکیس تائیشویی*) در آزمایشگاه

نوع نمونه	طول بدن	عرض بدن	قطر بادکش دهانی	قطر کیسه دفعی	طول تخم	عرض تخم	طول کوچکترین قلاب	طول بزرگترین قلاب	میزبان آزمایشگاهی
سرکر**	۲۰۸	۶۹/۶	۳۴/۸	۳۴/۸	-	-	-	-	حلزون ملانوئیدس
متاسرکر	۲۳۷/۵	۱۹۰	-	-	-	-	-	-	ماهی گامبوزیا
کرم بالغ	۱۱۶۰	۷۴۰/۲۴	-	-	۱۳/۴-۲۷/۸***	۱۱/۶	۶/۹۶	۱۸/۵۶	رات

* اندازه‌ها به میکرون است.

** طول بدن بدون احتساب اندازه دم سرکر است.

*** اندازه‌ها مربوط به ۲۰ تخم شمارش شده در زهدان انگل هاپلورکیس تائیشویی است.

بحث و نتیجه‌گیری

در سیکل تجربی تلاش گردید تا سرکر، متاسرکر وانگل بالغ که در مطالعه قبلی به صورت طبیعی بدست آمده بود در آزمایشگاه مورد بررسی قرارگیرد، تا ضمن تعیین دقت یافته‌های مادر سیکل طبیعی انگل های هتروفیده، با خصوصیات آنها که در طبیعت به راحتی قابل وصول نیست آشناتر شویم. همان گونه که در نتایج آمده است، در دو مورد یعنی مجاورت حلزون ملانوئیدس با انگل له شده هاپلورکیس تائیشویی (حاصله از گربه) و نیز مجاورت حلزون با مدفوع آلوده به تخم سگ مبتلا به هاپلورکیس، سرکر بدست آمد. علت عدم موفقیت در سایر مواردی که ملانوئیدس در مجاورت مدفوع آلوده به تخم قرار داده شده بود می‌تواند قبل از هر چیز ناشی از میزان کم تخم موجود در مدفوع آلوده باشد. به ویژه آن که به دلیل الک کردن مدفوع از فیلترهای مختلط مقداری از تخم‌ها نیز از دست می‌رفتند. برعکس موفقیت مطلوب در بدست آوردن سرکر در مواردی که حلزون در مجاورت انگل له شده قرار داده شده بود ناشی از تراکم تخم در واحد حجم بود که احتمال آلودگی حلزون را بالا برده است. متأسفانه به دلیل مشکلات تکنیکی، بررسی مداوم تخم‌ها جهت مشاهده خروج میراسیدیوم در طول این بررسی مدنظر قرار نگرفت که در آن صورت اطلاعات بیشتری از جزئیات

بیولوژیک این انگل در سیر تکاملی بدست می‌آمد. هم‌چنین باید متذکر شد که در چند مورد از ملانوپسیس نیز استفاده گردید ولی به دلیل مقاومت کم آن در برابر شرایط آزمایشگاهی توفیق نگهداری آنها بدست نیامد و به دلیل خطر مرگ ومیر آنها آزمایشات بیشتر با آنها امکان‌پذیر نبود.

ماهی گامبوزیا از جمله میزبانان واسط دوم برای بسیاری از گونه‌های هتروفیده است (۱۰). از این‌رو برای بدست آوردن متاسرکر از این ماهی که به وفور درکانال‌ها و برکه‌ها وجود دارد، استفاده شد. البته ظاهراً گونه‌های هتروفیده در انتخاب این ماهی به عنوان میزبان واسط خود چندان اختصاصی عمل نمی‌کنند (۹،۱۰). معمولاً متاسرکر در عرض حدود ۲۰ روز رسیده و عفونی می‌شود (۹). این با مشاهدات مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. علی‌رغم این هم‌خوانی، معمولاً پس از ۳۰ روز از این ماهی‌ها جهت آلوده کردن حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌کردیم. البته از نقطه نظر بیولوژیک تعیین دقیق این روز مشکل است زیرا معیارهای بالغ شدن متاسرکر به سختی قابل تعیین است. متاسرکرهایی که کاملاً رسیده باشند در عرض ۳ روز در حیوانات آزمایشگاهی تبدیل به فرم بالغ می‌شوند. در حالی که آنهایی که نسبتاً رسیده‌اند در مدت طولانی‌تری، ۲۰-۳ روز یا بیشتر زمان برای بالغ شدن در میزبان قطعی نیاز دارند. تعبیر رسیدن و بالغ شدن نیز بر اساس رشد ارگان‌های حیاتی انگل از قبیل بادکش‌ها، حلق، روده و کیسه دفعی و... است. بدین ترتیب که در متاسرکر رسیده تمام این ارگان‌ها و حتی ارگان‌های جنسی به نهایت رشد و تکامل رسیده‌اند و در میزبان نهایی به محض ورود، فقط رشد در اندازه و رشد جنسی را پیدا می‌کنند، در حالی که در متاسرکرهای نسبتاً رسیده یا این ارگان‌ها بعضاً وجود ندارند یا رشد و تکامل نهایی را پیدا ننموده‌اند و طبیعتاً در میزبان مدتی را صرف تکامل خود نموده و به این ترتیب در مدت طولانی‌تری بالغ می‌شوند (۱۲). متاسرکرهای مصرفی برای آلوده کردن حیوانات آزمایشگاهی در این بررسی از نظر رشد و بلوغ اندام‌های حیاتی بویژه بادکش‌ها و روده و کیسه دفعی بدقت مورد توجه قرار گرفتند. در یک مورد حتی سمینال و زیکول و سمینال رسپتاکل نیز در متاسرکر رؤیت شد که حاکی از بلوغ کامل متاسرکر بود. در این بررسی ماهی‌های گامبوزیا پس از ۴۸-۲۴ ساعت مجاورت در کنار حلزون آلوده ملانوئیدس، به اکواریوم مخزن (Stock) برده شدند زیرا در صورت آلودگی شدید به سرکرها به سرعت می‌مردند، مکانیزم مرگ و میر حاصله هنوز معلوم نیست ولی احتمالاً سلب قدرت شنا که بر اثر تراکم متاسرکرها در قاعده باله دمی و در ماهی‌های آلوده به فراوانی دیده می‌شد از جمله عوامل مرگ و میر آنهاست.

متاسرکرهای هاپلورکیس پومیلیو و تائیشویی به دفعات بر روی گامبوزیاهایی که در اکواریوم حاوی ملانوئیدس آلوده به سرکر هاپلورکیس قرار داده شده بودند بدست آمد، این متاسرکرها از طریق طعمه (ماهی گامبوزیا) به دفعات به حیوانات آزمایشگاهی از جمله ۵ جوجه، ۵ موش، ۵ رات و ۲ گربه خورانده شد که از مجموع این‌ها، انگل هاپلورکیس تائیشویی در ۱ رات و ۱ گربه حاصل گردید. علت اینکه دو متاسرکر بر روی گامبوزیاها بدست آمد این بود که ملانوئیدس‌ها بعضی آلوده به سرکر مولد متاسرکر هاپلورکیس پومبلیو و بعضی آلوده به سرکر مولد متاسرکر هاپلورکیس تائیشویی بودند و چون شناسایی این دو سرکر به دلیل شباهت موفولوژیک، مشکل بود طبیعتاً این‌ها در کنار هم و در یک اکواریوم قرار می‌گرفتند و روی گامبوزیا هر دو متاسرکر تشکیل می‌شد، اصولاً در ماهی‌های فیلد بیشتر متاسرکرها از نوع هاپلورکیس پومبلیو هستند و کمتر به متاسرکر نوع هاپلورکیس تائیشویی آلوده هستند که این امر احتمالاً ناشی از وفور ملانوئیدس‌های آلوده به سرکر مولد آن در طبیعت و وفور مخازن مربوط به آن (پرندگان) در مناطق آلوده است (۳،۱۳).

اما از نظر میزان حساسیت حیوانات آزمایشگاهی به این انگل‌ها باید گفت اصولاً موش و جوجه در بررسی حاضر حیوانات حساسی نبودند. اگر چه پذیرش این مسئله باید محتاطانه باشد لکن قطعاً رات و گربه میزبانان حساس و خوبی برای بدست آوردن انگل بالغ حاصله از متاسرکر هاپلورکیس تائیشویی مشاهده شدند. این نتیجه گیری با تمایل ذاتی و اولیه این انگل (هاپلورکیس تائیشویی) به گربه و سگ در طبیعت سازگاری دارد زیرا انگل بالغ هاپلورکیس پومبلیو دارای تمایل ذاتی و اولیه به پرندگان است و از سگ و گربه به عنوان مخزن فرعی استفاده می‌کند (۱۳).

این مطالعه تجربی ضمن آنکه مؤید یافته‌های قبلی در طبیعت بود، اطلاعات زیادی را در زمینه بیولوژی انگل از نظر زمان لازم برای تشکیل سرکر در حلزون و متاسرکر در ماهیان و کرم بالغ در حیوانات آزمایشگاهی فراهم نمود. علاوه بر این، مقاومت بسیار خوب حلزون ملانوئیدس در آزمایشگاه علی‌رغم آلودگی به سرکر و نیز مقاومت ماهی گامبوزیا در آزمایشگاه علی‌رغم آلودگی به متاسرکر و بالاخره حساس بودن رات به هتروفیده نشان داد که می‌توان چرخه زندگی این انگل را برای مدت‌ها در شرایط آزمایشگاهی جهت آموزش و یا به منظور استفاده در مطالعات روی جنبه‌های مختلف آن نگه‌داری کرد.

سپاسگزاری

از تمامی پرسنل مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اهواز، وابسته به دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به ویژه حمزه عدالت‌نیا مراتب تشکر و تقدیر را داریم.

Summary

A Study on the Life Cycle of Haplorchis Taichui (Heterophyidae: Trematodae) under Laboratory Conditions

A. Farahnak, PhD[1] and J. Massoud, PhD[2].

1. Assistant Professor, 2. Professor of Parasitology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

Haplorchis taichui is parasitic heterophyidae (Trematoda) which lives in the intestinal mucosa of its main host and producing heterophyidosis, which is a zoonotic diseases. Subsequent to the authors' provious studies which were made on parasit's life cycle in nature in Khuzestan province, Iran, this experimental study was performed with the aim of establishing the parasite's life cycle in laboratory. In this study the heterophyidae eggs were exposed to Melonides tuberculata or Melanopsis spp (fresh-water snails) within an aquarium and then cercariae were obtained. In aquarium, Gambosia affinis (fish) were infected with the above cercariae and then metacercariae were obtained from the latter after one month. Domestic cats, Rats, Hen's chicken and Mus musculus were fed with the above infected fishes and then after one month such animals were autopsised, which led to the isolation of H.taichui from rat and cat. This study revealed that H.taichui as a parasitology research model can be established in susceptible animals such as rat and cat under laboratory conditions.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1999; 6(3): 134-140

Key Words: *Haplorchis taichui, Heterophyidae, Life cycle, Experimental study*

منابع

۱. فرهناک، علی و مسعود، جعفر: شیوع انگل‌های خانواده هتروفیده در انسان و حیوان در خوزستان. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره سوم، شماره ۴، ۱۳۷۵، ص ۴-۱۸۱.

۲. فرهناک، علی و مسعود، جعفر: مطالعه‌ای بر سرکرهای (لارو ترماتدها) هتروفیده منتقله توسط حلزون ملانوئیدس و ملانوپسیس در استان خوزستان. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، زیر چاپ.

3. Farahnak A and Masoud J. Medically important metacercariae (Larva trematodes) in Khuzestan fishes, Iran. *Acta Medica Iranica* 1999; 37(1): 59-62.
4. Faust EC and Nisiugori M. The life cycles of two new species of Heterophyidae, Parasitic in mammals and birds. *J Parasitol* 1926; 13(2): 91-127.
5. Ismail NS, *et al.* Seasonal variation in infection rates of melanoides tuberculata snails with Larva trematodes in Azraq. *Jordan* Helminthology, 1987; 24(4): 293-301.
6. Ismail NS and Arif AMS. Population dynamics of melanoides tuberculata snails in a desert spring, United Arab Emirates and infection with larval termatodes. *Hydrobiologia* 1993; 257(1): 57-64.
7. Ito J and Bias BL. Studies on the fresh water cercariae in leyte island,

Philippines. *Jpn J Exp Med* 1977; 47(6): 445-65.

8. Krishna L. Freshwater snails with Larval trematodes in kangra valley Himachal praesh. *J Veterinary Parasitol* 1990; 4(2).
9. Malek EA: Snail transmitted parasitic diseases. Florida, Boca Raton. CRC press, 1980; pp107-126.
10. Morishita K, Komiya Y and Matsubayash H: Progress of medical parasitology in Japan. Vol 2, Tokyo, Meguro parasitologycal museum, 1965; pp167-190.
11. Scholz T, Ditrich O and Giboda M. Larval stages of medically important flukes (Trematoda) from Vientiane province, Laos Part 1 Metacercariae. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 65(2): 238-243.
12. Smyth JD. The physiology of trematods. Oliver & Boyd, 1966.
13. Steele JH. Zoonoses. Florida, Boca Raton, CRC Press, 1982; pp99-109.