ارزیابی روش الایزای نقطه ای در تشـــخیص دیکروســـلیازیس در گاو

مشگی، ب.[۱*] فرید خمامی، م.[۲]،حسینی، س.ح.[۱]، پوراکبری، ش.[۲].

دریافت: ۱۳۸۸/۶/۸ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۲۴

خلاصه:

دیکروســـلیوم دندریتیکوم در زمره ترماتودهای دیژنه آ مســـتقر در مجاری صفراوی نشخوار کنندگان است که در بعضی مناطق ایران نظیر استان های شمالی کشور، در صد بالایی از جمعیت دامی مذکور به آن آلوده اند. هدف از بررسی حاضر ارزیابی یکی از روش های تشخیص سرمی با استفاده از دو پادگن مختلف کرم بالغ در آلودگی طبیعی گاو به این ترماتود کبدی بود. بدین منظور طی بازرســـی کشـــتارگاهی نمونه های مثبت و منفی سرمی (از هر مورد ۴۰ نمونه) با استفاده از دو پادگن بدنی و دفعی ترشحی به روش الایزای نقطه ای آزمایش شد. برای تهیه پادگن ها بعد از مراجعه به کشـــتارگاه، کبدگوســـفندهایی که به دیکروسلیوم آلوده بودند به آزمایشگاه منتقل گردید و کرم های بالغ از آن جدا شد. پادگن بدنی با هموژنیزاسیون و پادگن دفعی ترشحی با انکوباسیون ترماتودهای بالغ تهیه گردید. روش الایزای نقطه ای با اســـتقرار پادگن ها بر روی کاغذ نیتروســـلولز و انکوباسیون در مجاورت سرم های تحت آزمایش و سپس سرم کونژوگه انجام شد.

حساسیت و ویژگی آزمون الایزای نقطه ای با استفاده از پادگن بدنی ۷۵/۵٪ و ۷۷٪ و در استفاده از پادگن دفعی ترشـــحی ۶۴/۵٪ و ۸۷٪ بود. ارزش پیشـــگویی مثبت و منفی در اســـتفاده از پادگن بدنی و دفعی ترشحی به ترتیب ۷۷٪، ۷۵/۵٪ و ۸۷٪، ۶۴/۵٪ ارزیابی گردید. با توجه به نتایج بدســـت آمده در این تحقیق پیشـــنهاد می شود بعد از شناســـایی پادگن اختصاصی جهت تشخیص آلودگی با دیکروســـلیوم دندریتیکوم کارایی آن در روش های مختلف سرمی بررسی شود تا بتوان روش تشخیصی مناسب در غربالگری موارد آلودگی معرفی کرد.

واژه های کلیدی: *دیکروسلیوم دندریتیکوم*، تشخیص، الایزای نقطه ای، گاو.

۱- گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
* نویسنده مسئول: bmeshgi@ut.ac.ir

مقدمه:

دیکروسلیوم دندریتیکوم ترماتودی با گسترش جهانی است. کرم بالغ در کیسه صفرا و مجاری صفراوی کبد پستانداران و اساسا نشخوارکنندگان زندگی می کند، ولی انسان هم تصادفا به آن مبتلا می شود(Rack و همکاران ۲۰۰۴). در این مورد در سال های اخیر آلودگی انسانی در عربستان (Helmy و همکاران ۲۰۰۳) و ترکیه (Karadag و همکاران ۲۰۰۳) گزارش شده است.

در مورد جنبه های مختلف آلودگی با این ترماتود (بر خلاف فاسیولا) مطالعات مفصل و جامعی صورت نگرفته است و آنچه انجام شده هم اکثرا مربوط به دهه اخیر می باشد (Otranto و همکاران ;۲۰۰۲ Otranto و همکاران ۲۰۰۳).

در ۳۰ سال گذشته روش های ایمنی شناسی پیشرفت قابل توجهی در تشخیص دیکروسلیازیس داشته اند (Oranto و همکاران ۲۰۰۲). گسترش روش های تشخیص ایمنی بخصوص روش الایزا با نتایج مطلوبی همراه بوده و نقاط ضعف مربوط به آزمایشات مدفوعی را تا حدودی پوشانده است، مثلا با توجه به طولانی بودن فاصله آلودگی و دفع تخم، این آزمون ها مناسب تر هستند، به عبارت دیگر این روش ها در تشخیص زود هنگام آلودگی ارزش زیادی دارند. از طرفی در این روش ها میزان و شدت آلودگی و مرحله بیماری مشخص نمی شود، همچنین در این روش ها واکنش متقاطع با سایر انگل ها نظیر فاسیولا و پارامفیستوموم در کسب نتایج ایجاد اشکال می کند (Gonzalez-lanza و همکاران ۲۰۰۰).

پادگن های مختلفی برای بررسی و ارزیابی پاسخ ایمنی بدن در برابر دیکروسلیوم وجود دارد ولی اکثر محققین از پادگن های بدنی برای تشخیص استفاده کرده اند. البته انواع دیگری نظیر پادگن های دفعی – ترشحی و پروتئین های مربوط به تخم دیکروسلیوم نیز برای تشخیص مورد استفاده قرار گرفته است (Jithendran و Bhat ۱۹۹۶).

Wedrychowicz و همکاران در سال ۱۹۹۶ پاسخ آنتی بادی صفراوی علیه پادگن های بدنی و دفعی – ترشحی و پادگن های سطحی (کرم بالغ *دیکروسلیوم دندریتیکوم*) را در گاو های با آلودگی طبیعی مورد مطالعه قرار دادند، همچنین پاسخ پادتن های سرمی علیه پروتئین های بدنی، پروتئین های سطحی، گلیکوپروتئین ها و ترکیبات دفعی ترشحی کرم بالغ در گوسفندانی که به صورت طبیعی با *دیکروسلیوم دندرتیکوم* آلوده شده بودند را بررسی کردند.

Gonzalez-lanza و همکاران در سال ۲۰۰۰ مطالعه ای بر روی بره هایی که به صورت تجربی با *دیکروسلیوم دندریتیکوم* آلوده شده بودند را انجام دادند، در این مطالعه روش های تشخیص دیکروسلیازیس بررسی شد و نشان داده شد روش الایزا ۲۰ روز زودتر از روش مدفوعی (رسوبی) قادر به تشخیص بیماری بوده است، لذا اگر چه دام آلوده شده است ولی به دلیل نابالغ بودن انگل که در مرحله مهاجرت قرار دارد، تخمی دفع نشده است. در این مطالعه بالاترین عیار پادتن در روز ۶۰ پس از عفونت بوده است که این روند تا آخر دوره یعنی روز ۱۸۰ بعد از عفونت نیز ادامه داشته است.

مواد و روش کار:

بررسی حاضر به منظور ارزیابی روش الایزای نقطه ای جهت تشخیص آلودگی طبیعی گاو با دیکروسلیوم دندریتیکوم در سه مرحله به شرح زیر انجام گرفت:

۱- تهیه نمونه های سرمی:

تهیه سرم با همکاری شبکه دامپزشکی شهرستان بندرانزلی و مراجعه به کشتارگاه نیمه صنعتی واقع در این شهرستان صورت گرفت. در هر بار مراجعه (در مجموع ۱۵ نوبت) قبل از ذبح هر راس گاو، از آن خونگیری به عمل آمد و هر نمونه همراه با دام مربوط شماره گذاری شد و در چرخه کشتار ضمن بازرسی اندام های مختلف هر نوع آلودگی ثبت گردید و در بررسی بافت کبدی چنانچه آلودگی به *دیکروسلیوم* وجود می داشت، نمونه سرمی به عنوان سرم مثبت *دیکروسلیوم* در نظر گرفته می شد.

در هر نوبت بازرسی کشتارگاهی معمولا ۱۵ – ۱۰ نمونه اخذ می شد، هر نمونه خون با حفظ شماره و نوع آلودگی به آزمایشگاه انتقال می یافت و بعد از تهیه سرم بسته به نوع آلودگی ثبت می گردید. بدین ترتیب تعداد ۴۰ نمونه مثبت سرمی *دیکروسلیوم* و ۴۰ نمونه سرم منفی و عاری ازآلودگی با *دیکروسلیوم* به عنوان کنترل تهیه شد، سپس همه نمونه ها در لوله هایی به حجم یک

سانتی متر مکعب انتقال یافت و در برودت ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده، نگهداری گردید.

۲- تهیه پادگن:

جهت تهیه پادگن بدنی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* بعد از بازرسی کشتارگاهی، ۳ کبد با آلودگی بیش از ۱۰۰۰ عدد ترماتود بالغ در کنار یخ به آزمایشگاه ارسال شد و بلافاصله ضمن شست و شوی کبد کرم های مربوط جدا شد و به تدریج همه کرم ها برای ۳ بار در فسفات بافر سالین (PBS) با pH = ۷/۴ جهت دفع مواد زاید شسته شدند.

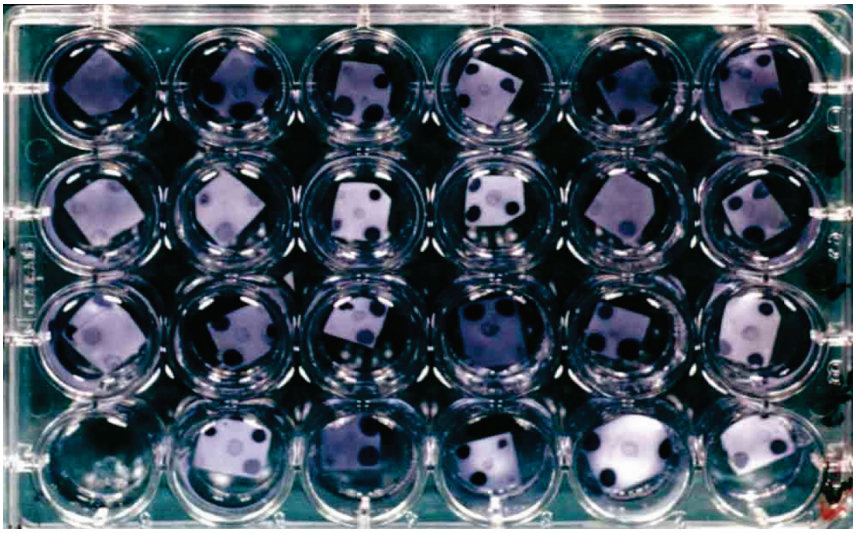
پادگن بدنی بر اساس هموژنیزاسیون کرم بالغ تهیه شد. نمونه ها در PBS حاوی فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) ۰/۰۵ میلی مولار به عنوان آنتی پروتئاز (مجاورت یخ) بطور کامل هموژنیزه شدند. سپس محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g و در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید و مایع رویی حاصل از سانتریفوژ پس از تعیین غلظت تا زمان استفاده در ویال های مخصوص با حجم ۱۰۰ میکرولیتر و در برودت ۲۰- درجه سانتی گراد به عنوان پادگن بدنی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* تا زمان استفاده نگهداری گردید. برای تهیه پادگن دفعی ترشحی ابتدا کرم های بالغ در محلول فسفات بافر سالین با pH = ۷/۲ در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند، سپس محلول حاصل در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰/۰۰۰ g تحت سانتریفوژ قرار گرفت و مایع رویی آن به عنوان پادگن دفعی – ترشحی (همانند پادگن بدنی) تا زمان استفاده نگهداری شد.

۳- آزمون الایزای نقطه ای:

جهت انجام آزمون الایزای نقطه ای، غشا نیتروسلولز به اندازه ۱ در ۱ سانتی متر بریده شده و ۱ میکرولیتر از هر پادگن همراه با کنترل شامل پادگن آیمریا تنلا بر روی هر گوشه کاغذ انتقال یافت. مرحله مسدود سازی با سرم آلبومین گاوی (BSA) ۳٪ در محلول فسفات بافر سالین حاوی ۰/۵٪ توئین ۲۰ به مدت یک ساعت انجام گرفت.

پس از سه بار شست و شوی غشا، آن را به مدت ۱ ساعت در آنتی بادی اولیه و با ۳ نوبت شستشوی دیگر به آنتی بادی ثانویه (آنتی بادی کونژوگه با پراکسیداز، ساخت سیگماAnti Bovine IgG Rabbit, Code No: 021109 KOMA) انتقال داده و پس از شستشوی کامل از سوبسترای دی آمینو بنزیدین جهت مشخص شدن لکه در محل واکنش استفاده گردید.

به منظور بررسی واکنش متقاطع با کیست هیداتیک و *فاسیولا* به ترتیب از پادگن مایع کیست و پادگن دفعی ترشحی کرم بالغ *فاسیولا* استفاده شد.



تصویر ۱- کاغذ نیتروسلولز بعد از انجام واکنش

نتایج :

قرائت نتایج حاصل از روش الایزا بر اساس تغییر رنگ ایجاد شده در محل لکه گذاری پادگن ها صورت گرفت (تصویر ۱). نتایج بدست آمده در این قسمت در جدول ۱ ملاحظه می شود. در مورد استفاده از پادگن بدنی در روش الایزای نقطه ای از ۴۰ نمونه مثبت سرمی ۲۷ نمونه مثبت و از ۴۰ نمونه منفی (کنترل) ۲۸ نمونه منفی وجود داشت و در مورد پادگن دفعی ترشحی از ۴۰ نمونه مثبت سرمی ۱۸ نمونه مثبت و از ۴۰ نمونه منفی (کنترل) آزمایش شده ۳۴ نمونه منفی وجود داشته است.

علاوه بر ویژگی و حساسیت ارزش پیشگویی در استفاده از دو پادگن مختلف نیز ارزیابی شد. بطوری که ارزش پیشگویی مثبت و منفی بترتیب در استفاده از پادگن بدنی ۷۷٪ و ۷۵/۵٪ و در مورد پادگن دفعی ترشحی ۸۷٪ و ۶۴/۵٪ بود.

پادگن مورد استفاده	حساسیت (٪)	ویژگی(٪)	ارزش پیشگویی مثبت (٪)	ارزش پیشگویی منفی(٪)
پادگن بدنی	۷۵/۵	۷۷	۷۷	۷۵/۵
پادگن دفعی-ترشحی	۶۴/۵	۸۷	۸۷	۶۴/۵

جدول ۱ – اندیس های آماری در استفاده از دو پادگن جهت تشخیص آلودگی با *دیکروسلیوم دندریتیکوم* توسط روش الایزای نقطه ای

بحث :

تحقیق حاضر با هدف استفاده و ارزیابی روش الایزای نقطه ای در تشخیص دیکروسلیازیس گاو به مرحله اجرا درآمد. هدف از آزمایش مدفوع جستجو و مشاهده تخم های مشخص است که در تشخیص دیگر بیماری های ترماتودی نظیر فاسیولیازیس و پارامفیستومیازیس هم مورد استفاده قرار می گیرد. البته استفاده از روش های رسوبی در تشخیص تخم *دیکروسلیوم* مناسب نبوده و تکنیک های شناور سازی توسط محلول های با وزن مخصوص ۱/۴۵ – ۱/۳ توصیه می شود (Rehbin و همکاران ۱۹۹۹). اگر چه در بین سه ترکیب شناور سازی شامل ZnSo4 (1/45 – 1/3)، K2Co3 (1/45) و HgI2/K1 (1/44) و با استفاده از روش اصلاح شده مک ماستر محلول اخیر بیشترین (۹/۴٪ ± ۹۱/۲) قدرت جداسازی تخم کرم از مدفوع گوسفند را دارا می باشد.

Jithendran و Bhat در سال ۱۹۹۶ در این زمینه مقایسه ای بین جداسازی کرم بالغ از کبد گوسفند و بز و نتایج آزمایش مدفوع به عمل آوردند و نشان دادند که در آزمایش مدفوع از هر سه مورد آلودگی فقط یک مورد قابل شناسایی است. همچنین Campo و همکاران در سال ۲۰۰۰ مشخص کردند دفع تخم در آلودگی تجربی از ۷۹ – ۴۹ روز پس از آلودگی اتفاق می افتد، نتایج این بررسی نشان دهنده جواب منفی کاذب در آزمایش مدفوع در دوران پیش آشکاری می باشد. از دیگر نقاط ضعف آزمایش مدفوع می توان به نظر Ambrosi و همکاران (۱۹۸۰) اشاره کرد که اعتقاد دارد در گوسفندانی که به کمتر از ۱۰۰ عدد ترماتود بالغ مبتلا هستند جواب آزمایش منفی خواهد بود.

در بررسی Senlik و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که متوسط شمارش تعداد تخم دیکروسلیوم در هر گرم مدفوع گوسفندان با آلودگی طبیعی در ساعات بعد از ظهر بیشتر از صبح است. Campo و همکاران در سال ۲۰۰۰ و همچنین Rehbin

و همکاران در سال(۱۹۹۹) معتقدند که در گوسفندان بین این دو عامل ارتباط مستقیمی وجود دارد. در مورد ناهمخوانی بین آزمایش مدفوع و بازرسی کبد جهت جدا سازی کرم بالغ باید به گزارش Scala و همکاران (۱۹۹۱) اشاره کرد که در روش اول موارد آلودگی ۲۶/۹ ٪ بوده در حالی که در جداسازی کرم بالغ به حدود دو برابر (۵۰/۳٪) رسیده است.

به هر حال باید در نظر داشت که در آزمایش مدفوع محلول شناور سازی، رقت نمونه و نوع لام انتخاب شده (در روش ماک ماستر) نه تنها در جدا سازی تخم دیکروسلیوم دندریتیکوم بلکه بر روی استرونگل های لوله گوارشی تاثیری مستقیم و با اهمیت دارند به گونه ای که Cringoli و همکاران در سال ۲۰۰۴ برای حصول بهترین نتیجه در مورد جدا سازی تخم این ترماتود توصیه می کنند، از محلول شناور کننده یدور پتاسیم و مرکورات با رقت کمتر از ۱:۱۵ و لام مک ماستر به حجم ۰/۱ سانتی مترمکعب استفاده شود.

در هر صورت به موازات آزمایش مدفوع در دام زنده و بازرسی کبد بعد از مرگ روش های تشخیص سرمی در ۳۰ سال گذشته مسیر پیشرفت خود را طی می‌کند. اگرچه در بررسی حاضر روش الایزای نقطه‌ای مورد استفاده قرار گرفت اما روش های دیگر نظیر ایمونوفلورسانس، هماگلوتیناسیون، پرسیپیتاسیون، ثبوت کمپلمان و الایزا از جمله روش های مورد استفاده برای تشخیص دیکرسلیازیس بوده است که همگی بر اساس جستجوی پادتن ضد دیکروسلیوم در دام های با آلودگی تجربی و طبیعی پایه گذاری شده اند (Oranto و همکاران،۲۰۰۳; Jithendra و Bhat، ۱۹۹۶ ; Sanchez و همکاران، ۲۰۰۳).

روش الایزای نقطه ای بارها برای تشخیص تعدادی از آلودگی های کرمی مهم نظیر فاسیولیازیس و هیداتیدوزیس مورد استفاده قرار گرفته است (Mousa و همکاران، ۲۰۰۱).

مسلما یکی از عوامل تعیین کننده دقت آزمایش در این روش نوع پادگن مورد استفاده می باشد. در بررسی حاضر با هدف تشخیص دیکروسلیازیس از دو پادگن بدنی و دفعی- ترشحی کرم بالغ استفاده شد. حساسیت آزمون در استفاده از پادگن بدنی و پادگن دفعی- ترشحی به ترتیب ۷۵/۵ ٪ و ۶۴/۵ ٪ و ویژگی آن به ترتیب ۷۷٪ و۸۷ ٪ بود. علاوه بر اینکه وجود واکنش متقاطع در آلودگی با *فاسیولا* (۳ مورد) و در آ لودگی با کیست هیداتیک (۲ مورد) هم باید در استفاده از این روش مد نظر قرار گیرد.

تا کنون هر دو پادگن بدنی و دفعی ترشحی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* جهت تشخیص آلودگی با روش الایزا مورد استفاده قرار گرفته اند (Gonzalez-lanza و همکاران، ۲۰۰۰ ; Wedrychowicz و همکاران، ۱۹۹۶) نتایج این بررسی ها نشان داده است اگرچه پروتئین های بدنی و مولکول های سطحی انگل منجر به پاسخ (پادتن) بیشتری در میزبان می شوند ولی نسبت به پادگن های دفعی ترشحی از ویژگی و حساسیت کمتری برخوردار هستند.

الایزا می تواند روش مطلوبی برای تشخیص زود هنگام آلودگی باشد چرا که بعد از اولین آلودگی و ۴ تا ۸ هفته قبل از ظهور تخم در مدفوع عیار آنتی بادی ضد دیکروسلیوم افزایش می یابد (Ambrosi و همکاران، ۱۹۸۰). پاسخ سیستم ایمنی (ایمونو گلوبولین IgG) در ۲ گروه گوسفندان با آلودگی تجربی (توسط ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ عدد متاسرکر) بررسی شد و مشخص گردید حدود ۳۲-۱۹ روز زودتر از حضور تخم در مدفوع پاسخ مربوط ایجاد می شود و عیار پادتن در دام های آلوده (هر دو گروه) ۲ ماه پس از آلودگی به حداکثر میزان خود رسیده و کماکان تا ۱۸۰ روز بعد هم بالا باقی می ماند (Gonzalez-lanza و همکاران، ۲۰۰۰). لذا در بررسی های سرواپیدمیولوژیک و در تشخیص زود هنگام موارد آلودگی (پادتن ۳۰ روز بعد از آلودگی تولید می شود) و هدایت جهت درمان قبل از بروز ضرر وزیان اقتصادی آزمون الایزا می تواند روش تشخیص مناسب و ایده آلی باشد.

به عنوان یک اصل کلی می توان نتایج بهتری در استفاده از این روش در صورتی که بتوان از پادگن های اختصاصی استفاده کرد انتظار داشت همچنان که Mousa در سال ۲۰۰۱ این روش را برای تشخیص فاسیولیازیس در صورتی که از پادگن مرحله نابالغ (سرکر) استفاده شود توصیه کرده و بدین ترتیب حساسیت ۱۰۰ ٪ و ویژگی ۹۰ ٪ را برای آن گزارش می کند. در پایان جهت مطالعات و تحقیقات بعدی، جداسازی پادگن اختصاصی برای تشخیص و استفاده از آن به عنوان یک روش سرمی، همچنین ارزیابی و مقایسه روش های سرمی با آزمایش مدفوع و آلودگی واقعی توصیه می شود.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 1 (2009) 17-25

Evaluation of Dot-ELISA method in diagnosis of cattle dicrocoeliasis

Meshgi, B.* [1], Farid-Khomami, M. [2], Hosseini, S.H. [1], Pour Akbari, S. [2]

Received: 09.08.2009; Accepted: 15.11.2009

Abstract

Dicrocoeliasis is a parasitic disease caused by digenean tremarode *Dicrocoelium dendriticum*. The serological diagnosis of this helmenthic disease can be made by different techniques. In the present study the Dot-ELISA (Dot – Enzyme linked immunosorbent assay) was used for serodiagnosis of naturally infected cattle. Adult *Dicrocoelium dendriticum* obtained from the liver of naturally infected sheep were washed in cold phosphate buffer saline (PBS, pH=7.4) and stored at -20 °c. To detect antibody in sera, somatic and excretory-secretory (ES) antigens of mature trematode were used. Somatic and ES antigens prepared with haemogenization

1- Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box: 14155-6453 Tehran, Iran.
2- Under Graduate Student- Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. P.O.Box: 14155-6453 Tehran, Iran
*Corresponding author: bmeshgi@ut.ac.ir

and incubation of mature trematode, respectively. For diagnostic purposes 40 positive and 40 negative cattle sera after confirmed by slaughtered were tested.

Diagnostic sensitivity and specificity values for Dot – ELISA using somatic and ES antigens were: 75.5 %, 77 % and 64.5 %, 87% respectively. Positive and negative predictive values for somatic and ES antigens were 77 %, 75.5 %, and 87 %, 64.5 % respectively. Cross reactivity occurred with hydatid cyst (2 cases) and *Fasciola* (3 cases). Our findings suggested that using specific antigens for serodiagnosis of dicrocoeliasis in ruminant, particularly sheep in Iran is a primary screening test.

Key words: *Dicrocoelium dendriticum*, Diagnosis, Dot-ELISA, Cattle.

منابـع:

Ambrosi, M., Baldelli, B., Piergili Fioretti, D., Polidori, G.A., Girelloni, V., Moretti, A., Principato, M. 1980. Dicroceliosi ovina: insorgenza e decorso della infezione da *Dicrocoelium dendriticum* studiati con metodi parassitologici e serologici (ELISA) in Quattro gruppi di ovini di traccia. Rivista di Parasitologia. 3, 299-307.

Campo, R., Manga-Gonzàlez, M.Y., Gonzàlez-Lanza, C. 2000. Relationship between egg output and parasitic burden in lambs experimentally infected with different doses of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). Veterinary Parasitology. 87, 139-149.

Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Campelli, G., Scala, A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the fecal egg counts of gastrointestinal strongyles and Dicrocoelium dendriticum in sheep. Veterinary Parasitology. 123, 121-131.

Gonzalez-lanza, C., Manga-Gonzalez, M.Y., Campo R. 2000. IgG antibody response to ES or somatic antigen of *Dicrocoelium dentriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. Parasitology Research. 86, 472-479.

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

Jithendran, K.P., Bhat, T.K. 1996. Prevalence of dicrocoeliosis in sheep and goats in Himachal Pradesh. Indian journal of Veterinary Parasitology. 61, 265-271.

Karadag, B., Bilici, A., Doventas, A., Kantarci, F., Selcuk, D., Dincer, N., Oner, Y.A., Erdincler, D. 2005. An unusual case of biliary obstruction caused by *Dicrocoelium dendriticum* Scand. Journal of Infectious Disease. 37, 385-388.

Mousa, W.M. 2001. Evaluation of cercarial antigen for the serodiagnosis of fasciolosis in experimentally and naturally infected sheep. Veterinary Parasitology. 97, 47-54.

Otranto, D., Traversa, D. 2002. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. Veterinary parasitology. 107, 317-335.

Otranto, D., Traversa, D. 2003. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. Trends in Parasitology. 19, 12-15.

Rack, J., Adusu, E., Jelinek, T. 2004. Human infection with Dicrocoelium dendriticum. Dtsch Med Wochenschr. 129(47), 2538-2540.

Rehbein, S., Kokott, S., Lindern, T. 1999. Evaluation of techniques for the enumeration of Dicrocoelium egg in sheep feces. Zentralbl Veterinarmed. 46, 133-139.

Sanchez–Andrade, R., Paz–silva, A., Suarez, J.L., Arias, M., Lopez, C., Morrondo, P., Scala, A. 2003. Serum antibodies to Dicrocoelium dendriticum in sheep from Sardinia (Italy). Preventive Veterinary Medicine. 57, 1-5.

Scala, A., Coda, S., Ximenes, L.A., Cavedagna, G. 1991. Dicroceliosi ovina in Sardegna: tassi di prevalenza, lesioni anatomo-istopatologiche e tests ematochimici. Atti della Federazione Mediterranea. Sanità e Produzione ruminanti. 1, 209-214.

Şenlik, B., Veli Çirak-Muz, M., Tinar, R. 2005. Change in fecal egg counts at different hours of the day and relationship between fecal egg count and parasite burden in sheep naturally infection with Dicrocoelium dendriticum. Turkish Journal of Animal Science. 30, 107-111.

Wedrychowicz, H., Ducommun, D., Pfister, K. 1996. Surface and ES antigen of adults Dicrocoelium dendriticum inducing bile antibody responses in naturally infected cattle. Acta Parasitologica. 41, 139-144.