Animal Health and Infectious Diseases
Volume 3, Issue 1
Journal homepage: https://jahid.lu.ac.ir/

Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Pleurogenoides medians* Cercariae (Digenea: Pleurogenidae) Found in the Freshwater Snail *Bithynia tentaculata* (Gastropoda: Bithyniidae) in Khorramabad, Lorestan Province, Iran

Faezeh Salavati [1], Hassan Nayebzadeh [2], Asadollah Hosseini-Chegeni [3*], Narges Nazifi[4], Yasin Valizadeh[5]

1- Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
4- Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
5- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Digenean trematodes are among the most important parasites with complex life cycles, in which the cercarial stage plays a decisive role in disease transmission. Freshwater snails, particularly *Bithynia tentaculata*, are recognized as the first intermediate hosts of many trematodes, and their wide distribution in western and central Iran highlights the need for investigating associated parasitic infections. Given the difficulty of species-level identification of cercariae based solely on morphological characteristics, this study aimed to investigate trematode infection in *B. tentaculata* and to identify the isolated species using molecular methods in the Khorramabad region.

Materials and Methods: Snails were collected from natural habitats, and the presence of trematode cercariae in some specimens was confirmed through examination. DNA was then extracted from the entire body of each snail and used as a template for PCR amplification of a fragment of the trematode parasite's 28S rRNA gene. The resulting PCR products were subsequently sequenced.

Results: BLAST analysis revealed that the examined cercarial DNA showed the highest genetic similarity to *Pleurogenoides medians* (family Pleurogenidae). Phylogenetic analysis further confirmed this finding, as the study samples clustered within the species-specific clade of *P. medians*.

Conclusion: The identification of *P. medians* in *B. tentaculata* represents the first molecular report of this species in Iran and the first record of its occurrence in a first intermediate host in the country. Previous reports of this trematode have mainly been from definitive hosts, particularly amphibians. These findings not only expand the known geographical range and host spectrum of *P. medians* but also emphasize the importance of assessing larval trematodes in freshwater snails and their potential role in the transmission cycles of pathogenic parasites in Lorestan Province. The results of this study provide a basis for future research on parasite epidemiology, ecology, and the assessment of environmental risks associated with larval trematodes in Iranian freshwater ecosystems.

Keywords: *Pleurogenoides medians*; *Bithynia tentaculata*; Cercaria; 28S rRNA; Molecular identification

Received:02/05/2026 **Accept:23/05/2026** **Final Edit:04/06/2026** **Online Publish:29/06/2026**

Corresponding Information:Asadollah Hosseini-Chegeni, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: hosseini.a@lu.ac.ir

Cite this article: Salavati, F; Nayebzadeh, H; Hosseini-Chegeni, A; Nazifi, N; Valizadeh, Y (2025). Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Pleurogenoides medians* Cercariae (Digenea: Pleurogenidae) Found in the Freshwater Snail *Bithynia tentaculata* (Gastropoda: Bithyniidae) in Khorramabad, Lorestan Province, Iran. *Animal Health and Infectious Diseases*. 1(3), 108-117.
© Author (s)retain the copyright.
DOI: https://doi.org/10.22034/jahid.2026.2090644.1071

بهداشت و بیماری های عفونی دام
شماره 1 ، دوره ۳
صفحه مجله: https://jahid.lu.ac.ir/

شناسایی مولکولی و تحلیل تبارشناسی سرکر *پلوروجنویدس مدینس* (دیژنهآ: پلوروجنیده) یافت شده در حلزون آب‌شیرین، *بیتینیا تنتاکولاتا* (شکم پایان: بیتینیده) در خرم‌آباد، استان لرستان، ایران

فائزه صلواتی [۱]، حسن نایب زاده [۲]، اسداله حسینی چگنی [۳*]، نرگس نظیفی [۴]، یاسین ولی زاده [۵]

۱. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
۳. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
۴. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
۵. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

چکیده

زمینه و هدف: ترماتودهای دیژنهآ از مهم‌ترین انگل‌های دارای چرخه‌های زیستی پیچیده‌اند که مرحله سرکری آن‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در انتقال بیماری ایفا می‌کند. حلزون‌های آب‌شیرین، به‌ویژه گونه *Bithynia tentaculata*، به‌عنوان میزبان واسط اول بسیاری از ترماتودها شناخته می‌شوند و پراکنش گسترده آن‌ها در غرب و مرکز ایران ضرورت بررسی آلودگی‌های انگلی مرتبط را افزایش می‌دهد. با توجه به دشواری شناسایی گونه‌ای سرکرها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، این مطالعه با هدف بررسی آلودگی ترماتودی در *B. tentaculate* و تعیین گونه جداشده با روش‌های مولکولی در منطقه خرم‌آباد انجام شد.

مواد و روش ها: حلزون‌ها از زیستگاه‌های طبیعی جمع‌آوری شدند و وجود سرکرهای ترماتودی در آن‌ها از طریق بررسی نمونه‌ها تأیید شد. سپس DNA از کل بدن حلزون‌ها استخراج و به‌منظور تکثیر قطعه‌ای از ژن 28S rRNA انگل ترماتودی، در واکنش PCR استفاده شد. در ادامه، محصولات PCR حاصل توالی‌یابی شدند.

یافته ها: نتایج BLAST نشان داد که DNA سرکریایی مورد بررسی بیشترین شباهت ژنتیکی را با *Pleurogenoides medians* از خانواده *Pleurogenidae* دارند. تحلیل فیلوژنتیکی نیز این یافته را تأیید کرد و نمونه‌های مطالعه در کلاد اختصاصی این گونه قرار گرفتند.

نتیجه گیری: شناسایی *P. medians* در *B. tentaculata*، نخستین گزارش مولکولی این گونه در ایران و اولین مشاهده آن از یک میزبان واسط اول در کشور به‌شمار می‌رود؛ در حالی‌که اغلب گزارش‌های پیشین از این ترماتود مربوط به میزبان‌های نهایی، عمدتاً دوزیستان، بوده است. این نتایج نه‌تنها دامنه جغرافیایی و میزبان‌های شناخته‌شده *P. medians* را گسترش می‌دهد، بلکه اهمیت ارزیابی انگل‌های لاروی در حلزون‌های آب‌شیرین و نقش احتمالی آن‌ها در چرخه انتقال انگل‌های بیماری‌زا در منطقه لرستان را برجسته می‌سازد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند مبنایی برای مطالعات آینده در حوزه اپیدمیولوژی، بوم‌شناسی انگل‌ها و ارزیابی خطرات زیست‌محیطی مرتبط با ترماتودهای لاروی در اکوسیستم‌های آب شیرین ایران باشد.

کلیدواژه ها: *Pleurogenoides medians*؛ *Bithynia tentaculata*؛ سرکر؛ 28S rRNA؛ شناسایی مولکولی

دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۲ پذیرش:۱۴۰۵/۰۳/۰۲ ویرایش نهایی:۱۴۰۵/۰۳/۲۴ انتشار آنلاین:۱۴۰۵/۰۴/۰۸

اطلاعات نویسنده مسئول: اسداله حسینی چگنی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

Email: Hosseini.a@lu.ac.ir

استناد: صلواتی، ف؛ نایب زاده، ح؛ حسینی چگنی، ا؛ نظیفی، ن؛ ولی زاده، ی (۱۴۰۵). شناسایی مولکولی و تحلیل تبارشناسی سرکر *پلوروجنویدس مدینس* (دیژنهآ: پلوروجنیده) یافت شده در حلزون آب‌شیرین، *بیتینیا تنتاکولاتا* (شکم پایان: بیتینیده) در خرم‌آباد، استان لرستان، ایران. *بهداشت و بیماری های عفونی دام*، ۱(۳)، ۱۰۸-۱۱۷.

© نویسندگان

DOI: https://doi.org/10.22034/jahid.2026.2090644.1071

مقدمه

ترماتودهای دیژنهآ (Digenea) از شاخص‌ترین گروه‌های کرم‌های پهن انگلی (Platyhelminthes) به شمار می‌آیند که بسیاری از آن‌ها دارای چرخه‌های زندگی پیچیده‌ای هستند. این چرخه‌ها معمولاً شامل یک یا چند میزبان واسط و یک میزبان نهایی‌اند و تعداد و نوع میزبان‌ها و نیز مسیر انتقال انگل، بسته به گونه متفاوت است. در بسیاری از دیژنه‌آها، نرم‌تنان آبزی به‌عنوان میزبان واسط اول ایفای نقش می‌کنند؛ میزبان واسط دوم، در صورت وجود، می‌تواند از میان گروه‌های مختلف بی‌مهرگان یا مهره‌داران انتخاب شود. میزبان نهایی نیز بسته به گونه انگل، اغلب مهره‌دارانی مانند دوزیستان، پرندگان، پستانداران یا انسان است [۱, ۲]. یکی از مراحل حیاتی در چرخه زندگی این انگل‌ها، مرحله سرکری (Cercaria) است که در بدن حلزون‌ها تولید می‌شود. این لارو متحرک پس از خروج از حلزون می‌تواند وارد بدن میزبان واسط دوم شود یا مستقیماً توسط میزبان نهایی بلعیده شود و به مرحله متاسرکر و سپس بلوغ جنسی برسد [۳]. حلزون‌های آب شیرین، به‌ویژه گونه‌های متعلق به جنس *Bithynia*، در این چرخه نقشی کلیدی دارند و به‌عنوان میزبان واسط اولیه برای بسیاری از ترماتودهای بیماری‌زا شناخته می‌شوند. این حلزون‌ها معمولاً در زیستگاه‌های آبی راکد یا جاری مانند برکه‌ها، شالیزارها، نهرها و کانال‌های آبیاری یافت می‌شوند. در ایران، گونه‌های مختلفی از این جنس شناسایی شده‌اند که از میان آن‌ها *B. tentaculata* به‌دلیل پراکندگی وسیع در استان‌های غربی و مرکزی از جمله لرستان، کرمانشاه، کردستان، قزوین، اصفهان، فارس و آذربایجان شرقی، اهمیت ویژه‌ای دارد [۴–۶]. با توجه به نقش این حلزون‌ها در انتقال انگل‌های بیماری‌زا، از جمله ترماتودهای مشترک بین انسان و دام (زئونوزها)، بررسی آلودگی آن‌ها از نظر اپیدمیولوژیک و بهداشت عمومی ضروری است. مرحله سرکری ترماتودها، پس از تکثیر غیرجنسی در بدن حلزون، از میزبان خارج شده و در شرایط مناسب می‌تواند بیماری‌زایی قابل توجهی ایجاد کند. این لاروها در صورت تماس با انسان یا دام و یا مصرف میزبان‌های واسط آلوده، قادر به انتقال انگل هستند [۷, ۸].

در میان خانواده‌های مختلف ترماتودهای دیژنهآ، خانواده Pleurogenidae یکی از گروه‌های متنوع از نظر گونه‌ای و زیست‌شناختی است که اعضای آن عمدتاً انگل دستگاه گوارش و سایر اندام‌های داخلی دوزیستان و خزندگان هستند. چرخه زندگی این خانواده معمولاً شامل حلزون‌های آب‌شیرین به‌عنوان میزبان واسط اول و طیف متنوعی از بی‌مهرگان، به‌ویژه بندپایان آبزی، به‌عنوان میزبان واسط دوم است. در این چرخه، سرکرهای آزادشده از حلزون پس از ورود به میزبان واسط دوم، در شرایط مناسب به متاسرکر تبدیل می‌شوند و با انتقال به میزبان نهایی، چرخه زندگی انگل تکمیل می‌شود [۹, ۱۰]. جنس *Pleurogenoides* از اعضای شناخته‌شده این خانواده است و گونه‌هایی مانند *Pleurogenoides medians*، *P. cyanophlycti* و *P. euphlycti* در آن قرار می‌گیرند. همچنین، جنس *Prosotocus*، با گونه‌هایی مانند *P. confusus*، از دیگر جنس‌های خانواده Pleurogenidae محسوب می‌شود. تنوع میزبان‌ها و پیچیدگی چرخه زندگی اعضای این خانواده، بررسی مراحل لاروی و شناسایی دقیق آن‌ها را برای شناخت بهتر تنوع زیستی و روابط میزبان ـ انگل ضروری می‌سازد.

یکی از چالش‌های اساسی در شناسایی این انگل‌ها، شباهت ظاهری بسیار زیاد سرکرهای ترماتودهای مختلف است. روش‌های سنتی بر پایه خصوصیات ریخت شناسی، به‌ویژه در مورد لاروها، اغلب ناکافی بوده و یا دقیق نیستند. در چنین شرایطی، روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و توالی‌یابی ژن‌هایی چون 28S rRNA، ابزارهای دقیق و معتبری برای تشخیص گونه و تعیین روابط فیلوژنتیکی انگل‌ها فراهم می‌کنند [۱۱, ۱۲]. در سال‌های اخیر، مطالعات مولکولی با استفاده از نشانگرهای ریبوزومی و میتوکندریایی، نقش مهمی در شناسایی گونه‌ها و بررسی روابط فیلوژنتیکی اعضای خانواده Pleurogenidae، به‌ویژه جنس *Pleurogenoides*، ایفا کرده‌اند [۱۳, ۱۴]. به‌طور مشخص، تحلیل توالی‌های ژن 28S rRNA در گونه‌های *Pleurogenoides*، از جمله *P. cyanophlycti* و *P. euphlycti*، برای بررسی روابط فیلوژنتیکی این گونه‌ها و مقایسه آن‌ها با سایر اعضای Pleurogenidae به کار رفته است [۱۳]. همچنین، در مطالعه‌ای اخیر در غرب ایران، یک جنس جدید از خانواده Pleurogenidae بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی و توالی‌های 28S rRNA معرفی شد و روابط آن با سایر اعضای خانواده، از جمله *P. medians*، در چارچوب تحلیل‌های فیلوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت [۱۵]. از سوی دیگر، تعیین و تحلیل ژنوم کامل میتوکندریایی *P. japonicus*، داده‌های مولکولی موجود برای جنس *Pleurogenoides* را گسترش داده و کاربرد نشانگرهای میتوکندریایی را در بررسی روابط فیلوژنتیکی این گروه نشان داده است [۱۴].

شناسایی دقیق گونه‌های ترماتود با این روش‌ها علاوه بر افزایش دقت تشخیص، امکان بررسی تنوع زیستی، ردیابی مسیرهای انتقال و برنامه‌ریزی برای کنترل بیماری‌ها را فراهم می‌آورد. به‌عبارتی، اطلاعات ما در مورد انگل، منطقه جغرافیایی، نوع حلزون و میزبان های مربوطه آن میتواند در طراحی مداخلات کنترلی موثر باشد. در این راستا، پژوهش حاضر برای نخستین بار در منطقه خرم‌آباد انجام و با جمع‌آوری حلزون‌های *Bithynia* و بررسی مولکولی آن‌ها، موفق به شناسایی سرکر انگل *P. medians* شد. این گونه از ترماتودها پیش‌تر در برخی کشورهای اروپایی گزارش شده‌اند، اما تاکنون شناسایی مولکولی آن در ایران و از حلزون‌های بومی مستند نشده بود. اگرچه فرم کیستی *Pleurogenoides medians* پیش‌تر از مثانه قورباغه مردابی، *Pelophylax ridibundus* (با نام قدیمی *Rana ridibunda*)، در منطقه آقابابا، استان قزوین، گزارش شده است [۱۶]، تاکنون شناسایی مولکولی این گونه از حلزون‌های جنس *Bithynia* در ایران گزارش نشده است. یافته‌های مطالعه حاضر از آن جهت اهمیت دارند که وجود این انگل در حلزون‌های آب شیرین منطقه لرستان را به‌صورت قطعی تأیید کرده و نشان می‌دهند که این حلزون‌ها می‌توانند در چرخه انتقال انگل‌های حیوانی نقش داشته باشند. نتایج حاصل، پایه‌ای برای مطالعات آینده در زمینه اپیدمیولوژی و حفاظت از محیط زیست در مناطق مشابه است و می‌تواند مورد استفاده نهادهای مرتبط با سلامت، دامپزشکی و محیط‌زیست قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

محل و زمان نمونه‌برداری

در پاییز سال ۱۴۰۲، نمونه‌برداری میدانی از حلزون‌های آب شیرین در برکه‌های اطراف روستای ده‌سفید با میانگین دما ۱۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۴۲٪ و ۱۵۱۷ متر ارتفاع از سطح دریا واقع در حومه شهرستان خرم‌آباد (استان لرستان، ایران) انجام شد. نمونه‌برداری در محدوده روستای ده‌سفید، شهرستان خرم‌آباد، استان لرستان، ایران انجام شد. مختصات جغرافیایی منطقه با استفاده از دستگاه GPS ثبت گردید. مختصات 33°30'4.65"N 48°32'13.72"E به‌عنوان مرجع جغرافیایی روستای ده‌سفید در نظر گرفته شد (بیانگر موقعیت دقیق تک‌تک محل‌های نمونه‌برداری نیست). برای هر نقطه نمونه‌برداری، شرایط زیست‌محیطی نظیر نوع بستر، میزان پوشش گیاهی، دمای آب، و pH به‌صورت میدانی اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۱).

جدول ۱) مشخصات محیطی ایستگاه‌های نمونه‌برداری حلزون‌ها در روستای ده‌سفید، شهرستان خرم‌آباد، استان لرستان (پاییز ۱۴۰۲)

ردیف	نام ایستگاه	نوع بستر	دمای آب (°C)	pH آب	پوشش گیاهی غالب	توضیحات تکمیلی
۱	برکه ده‌سفید	گلی–لجنی	۱۶/۵	۷/۳	خزه، جگن	آب راکد، عمق حدود ۳۰ سانتی‌متر
۲	کانال کشاورزی	ماسه‌ای–سنگریزه‌ای	۱۷/۲	۷/۱	خزه، علف‌های آبزی	جریان کم، لبه‌های گل‌آلود
۳	چشمه محلی	سنگی با رسوب	۱۵/۸	۷/۵	کم‌پوشش	جریان پیوسته، آب شفاف

جمع‌آوری و شناسایی حلزون‌ها

در مجموع ۵۰ عدد حلزون از نوع آب شیرین با استفاده از تور دستی و ظروف نمونه‌برداری استریل‌شده از نقاط مختلف زیستگاه جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در ظروف حاوی آب محل و مقدار کمی خزه قرار داده شده و در دمای پایین به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی منتقل شدند. شناسایی اولیه حلزون‌ها به روش مورفولوژیکی بر اساس کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد[۴]. مشخصات صدف شامل شکل، اندازه، رنگ، برجستگی حلزونی، و ساختار اپرکولوم با استفاده از استریومیکروسکوپ (Olympus SZ60, Japan) بررسی گردید.

بررسی آلودگی حلزون‌ها به سرکرهای ترماتودی

برای بررسی آلودگی به مرحله سرکری ترماتود، از روش صلاحی مقدم استفاده شد **[۱۷]**؛ هر حلزون در پلیت پتری مجزا قرار گرفت و خرد شد تا بافت‌های نرم داخلی آن آزاد شود. محتویات پلیت با استفاده از قطرات محلول فیزیولوژیک (NaCl 0.9%) شفاف‌سازی شده و زیر استریومیکروسکوپ (با بزرگنمایی ۱۰×–۳۰×) مشاهده گردید.

استخراج DNA و PCR

برای استخراج DNA ژنومی، از کل بدن نمونه‌های حلزون آلوده به سرکر استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) و با اعمال تغییراتی در پروتکل اولیه انجام گرفت. پس از استخراج DNA، قطعه‌ای از ژن 28S rRNA با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر توالی هدف از ترماتودها، در واکنش PCR تکثیر شد. پرایمرهای اختصاصی برای این ناحیه توسط پژوهشگر به صورت کلاسیک با استفاده از نرم‌افزارهای GeneDoc [۱۸] و SeaView [۱۹] و نرم‌افزار برخط

IDT (https://www.idtdna.com/calc/analyzer) بر اساس توالی‌های مرجع موجود در پایگاه NCBI طراحی شدند. طراحی پرایمرها با در نظر گرفتن پارامترهایی مانند دمای ذوب (Tm)، GC content، طول مناسب و عدم تشکیل دایمر یا حلقه انجام شد. مشخصات کامل پرایمرها، شامل طول، درصد GC، دمای ذوب (Tm) و اندازه محصول PCR، در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲) ویژگی‌های پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر قطعه‌ای از ژن 28S rRNA

نام پرایمر	توالی پرایمر (′3→′5)	طول پرایمر (nt)	درصد GC (%)	دمای ذوب (Tm, °C)	اندازه محصول PCR (bp)
Forward (FORDIG)	AGAGAGAGTAAACAGTGCG	19	47.4	51.5	866
Reverse (REVDIG)	CCTCTGGCTTCAACCT	16	56.2	51.2	866

اختصارات nt: نوکلئوتید؛ GC: درصد گوانین و سیتوزین؛ Tm: دمای ذوب؛ bp: جفت‌باز.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس آماده با آنزیم Taq، و آب دیونیزه تا حجم نهایی انجام شد. برنامه PCR نزول دمایی (Touchdown) شامل مراحل دناتوراسیون اولیه: ۹۵° به مدت ۳ دقیقه، ۱۰ چرخه: دناتوراسیون: ۹۵° – ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها: ۶۰° تا ۵۰° – ۳۰ ثانیه، گسترش: ۷۲° – ۶۰ ثانیه، ۳۰ چرخه: دناتوراسیون: ۹۵° – ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها: ۵۰° – ۳۰ ثانیه، گسترش: ۷۲° – ۶۰ ثانیه، گسترش نهایی: ۷۲° – ۵ دقیقه. به‌عنوان کنترل مثبت، DNA استخراج‌شده از نمونه حلزون آلوده به سرکر که هویت آن پیش‌تر با توالی یابی تأیید شده بود، استفاده شد. سپس محصول PCR با ژل آگارز ۱ درصد تفکیک و با رنگ SYBR Safe رنگ‌آمیزی شد. مشاهده باندها با استفاده از دستگاه UV Transilluminator انجام گرفت و از ژل تصویربرداری شد.

توالی‌یابی و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت کدون ژنتیک ایران ارسال شد. توالی به‌دست‌آمده با نرم‌افزار FinchTV مشاهده و در صورت نیاز ویرایش و تصحیح شد و در بانک ژن NCBI با شماره دسترسی PP337905 ثبت گردید. مطابقت توالی با سایر توالی‌های گزارش‌شده در GenBank از طریق BLASTn انجام شد. برای تحلیل فیلوژنتیکی، توالی‌های منتخب از گونه‌های مشابه در خانواده Pleurogenidae دانلود و در نرم افزار SeaView هم‌ردیف شدند. سپس درخت فیلوژنتیکی در بسته نرم افزاری BEAST [۲۰] با الگوریتم بیزین ترسیم شد.

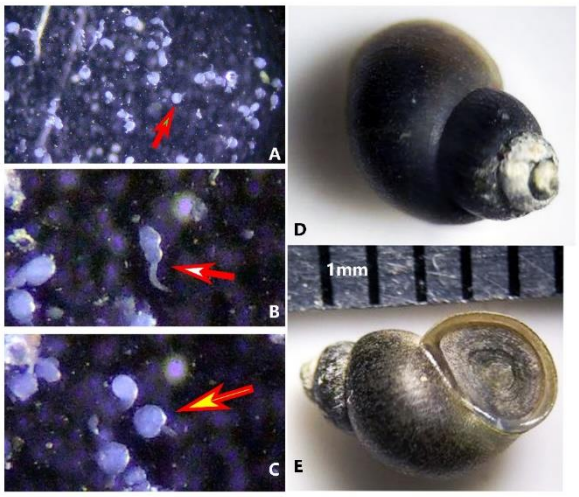
نتایج

ویژگی‌های ریخت‌شناسی حلزون

حلزون های جمع‌آوری‌شده در مطالعه حاضر بر اساس بررسی‌های مورفولوژیکی و کلیدهای شناسایی معتبر، متعلق به گونه‌ی *Bithynia tentaculata* تشخیص داده شدند. این گونه یکی از اعضای جنس *Bithynia* از خانواده Bithyniidae و زیررده Prosobranchia است که در زیستگاه‌های آب شیرین ایران، به‌ویژه در مناطق غربی و مرکزی، پراکندگی وسیعی دارد و به‌عنوان میزبان واسط برخی ترماتودهای مهم مطرح است. گونه‌ی *B. tentaculata* دارای اپرکول آهکی (لایمی) است که یکی از ویژگی‌های بارز حلزون‌های این زیررده محسوب می‌شود. صدف این گونه شکل تخم‌مرغی یا نیمه‌کروی داشته و سطح آن صاف و بدون برآمدگی‌های شدید است. اپرکول در این گونه کان‌سنتریک، بزرگ با هسته کوچک بوده و فاقد زائده داخلی (اپوفایز) است. همچنین، سوهانک (رادولا) در *Bithynia tentaculate* از نوع تینی‌گلوسیت (taenioglossate) بوده و آرایش دندان‌های آن شامل یک دندان مرکزی، یک دندان جانبی و دو دندان حاشیه‌ای در هر طرف است [۲۱]. در نمونه مورد بررسی، صدف حلزون قهوه‌ای‌رنگ، به‌طور متوسط ۵ میلی‌متر طول داشت و دارای ۴ پیچش مارپیچی با برجستگی ملایم بود. ناف (umbilicus) در این گونه وجود نداشت، اما لب خارجی صدف ضخیم و کاملاً مشخص بود. دهانه صدف (aperture) نسبتاً کوچک‌تر از نیمی از طول کلی صدف بود که با ساختار عمومی گونه تطابق کامل داشت (شکل ۱).

بررسی آلودگی حلزون‌ها به سرکر ترماتود

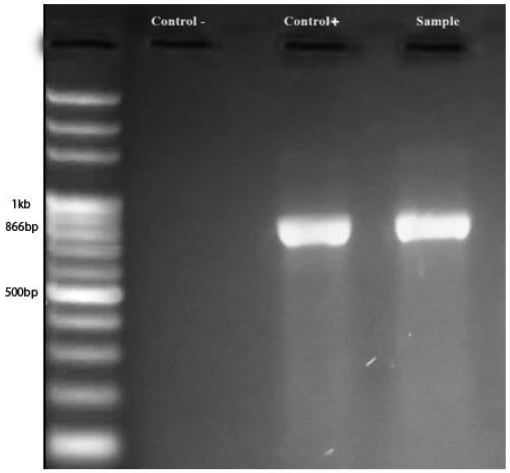
از مجموع ۵۰ عدد حلزون آب شیرین جمع‌آوری‌شده از منطقه مورد مطالعه (برکه‌ها و منابع آب سطحی اطراف روستای ده‌سفید)، ۲ نمونه (۴٪) دارای آلودگی به مرحله لاروی سرکری تشخیص داده شد. در تمامی موارد آلوده، سرکرهای مشاهده‌شده دارای خصوصیات مورفولوژیکی مشترک شامل دم ساده، بدن بیضی‌شکل و وجود کیسه دفعی بودند که به‌طور اولیه با ترماتودهای راسته Plagiorchiida مشابهت داشتند (شکل ۱).



شکل ۱) نمای میکروسکوپی از سرکر ترماتود *Pleurogenoides medians* با بزرگ‌نمایی ×۱۰ (A) و ×۳۰ (B-C) جداشده از حلزون *Bithynia tentaculata* از نماهای مختلف (D-E)

نتایج PCR و مشاهده باند ژل

از میان دو حلزون آلوده شناسایی‌شده، سرکرهای جداشده از هر دو حلزون با موفقیت استخراج DNA شدند و در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ژن 28S rRNA واکنش مثبت نشان داد. محصول PCR با اندازه ۸۶۶ جفت باز روی ژل آگارز مشاهده شد که با اندازه پیش‌بینی‌شده برای این بخش از ژن کاملاً تطابق داشت (شکل ۲).



شکل ۲– تصویر الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سرکرهای جداشده از حلزون *Bithynia tentaculata*؛ به‌ترتیب از چپ به راست DNA ladder :(۱۰۰ جفت‌باز)، کنترل منفی، کنترل مثبت و نمونه DNA استخراج‌شده از سرکرهای جداشده از حلزون آلوده. اندازه محصول تکثیرشده ۸۶۶ جفت‌باز است.

توالی‌یابی و مشابهت یابی (BLAST)

محصول PCR به شرکت تخصصی برای توالی‌یابی یک طرفه ارسال گردید. نتایج BLASTn در پایگاه GenBank نشان داد که توالی به‌دست‌آمده دارای بیش از ۹۸٪ شباهت با توالی گزارش‌شده از گونه *Pleurogenoides medians* مشابهت دارد. این توالی مربوط به انگل جداشده از قورباغه مردابی گونه *Rana lessonae* از کشور اوکراین (شماره دسترسی AF433670) در بانک ژن ثبت شده است. این درصد شباهت بالا و تطابق ناحیه‌ای با بخش محافظت‌شده ژن، تأییدکننده تعلق سرکر مورد بررسی به این گونه خاص از خانواده *Pleurogenidae* است. مقایسه درصد شباهت توالی نمونه مورد مطالعه با سایر توالی‌های ثبت‌شده از جنس *Pleurogenoides* در پایگاه GenBank در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳) توالی‌های نزدیک به نمونه‌های مورد مطالعه از جنس *Pleurogenoides* بر پایه نتایج BLAST. اطلاعات شامل نام گونه، میزبان، کشور منشأ، درصد همپوشانی، درصد شباهت و شماره دسترسی در پایگاه NCBI است.

نام علمی	میزبان	کشور	درصد همپوشانی	درصد شباهت	شماره دسترسی
Pleurogenoides medians	*Rana lessonae*	اوکراین	۱۰۰	۹/۱۱۸	AF433670
Pleurogenoides euphlyctis	*Euphlyctis cyanophlyctis*	هند	۶۶	۹/۵۲۱	MN218391
Pleurogenoides cyanophlyctis	*Euphlyctis cyanophlyctis*	هند	۵۷	۸/۶۳۳	MN218390

برای بررسی ارتباط فیلوژنتیکی فراتر از سطح جنس، شباهت توالی نمونه با گونه‌هایی از خانواده *Pleurogenidae* در جدول ۴ نمایش داده شده است.

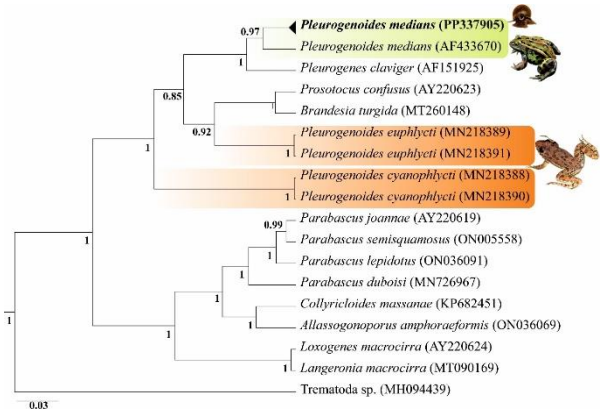
نام علمی	میزبان	کشور	درصد همپوشانی	درصد شباهت	شماره دسترسی
Pleurogenes claviger	-	-	۱۰۰	۹/۸۸۵	AF151925
Prosotocus confusus	*Rana lessonae*	اوکرای ن	۱۰۰	۹/۱۷۴	AY220623
Brandesia turgida	*Pelophylax ridibundus*	روسیه	۱۰۰	۹/۶۵۳	MT260148
Allassogonoporus amphoraeformis	-	-	۱۰۰	۹/۰۲۰	ON036069
Collyricloides massanae	*Erithacus rubecula*	جمهوری چک	۱۰۰	۸/۴۹۹	KP682451
Parabascus semisquamosus	-	-	۱۰۰	۸/۱۵۹	ON005558
Parabascus joannae	*Myotis daubentoni*	اوکرای ن	۱۰۰	۸/۱۵۹	AY220619

Parabascus lepidotus	-	-	۱۰۰	۸/۸۱	ON036091
Parabascus duboisi isolate	*Bithynia tentaculata*	آلمان	۱۰۰	۸/۷۸	MN726967
Loxogenes macrocirra	*Rana berlandieri*	گواتمالا	۱۰۰	۸/۱۷	AY220624
Langeronia macrocirra	*Langeronia macrocirra*	مکزیک	۱۰۰	۸/۹۸	MT090169

جدول ۴) مشخصات توالی‌های ژنتیکی مربوط به گونه‌های مختلف از خانواده‌های مرتبط با ترماتودهای دیژنه، شامل نام گونه، میزبان میزبانان در صورت وجود، کشور محل نمونه‌برداری، درصد همپوشانی، درصد شباهت، و شماره دسترسی آن‌ها در پایگاه داده NCBI. این توالی‌ها برای تحلیل‌های فیلوژنتیکی و مقایسه با نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر استفاده شده‌اند.

تحلیل فیلوژنتیکی

تحلیل فاصله‌های ژنتیکی بر اساس توالی ژن نشان داد که کمترین میزان اختلاف ژنتیکی بین نمونه مورد مطالعه و گونه *Pleurogenoides medians* مشاهده شد، که این یافته‌ها هم‌راستا با نتایج درخت فیلوژنتیکی است. فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها و سایر جنس‌های خانواده Pleurogenidae به‌طور قابل‌توجهی بیشتر بود، که تأییدی بر صحت شناسایی مولکولی گونه موردنظر است. درخت فیلوژنتیکی حاصل از تحلیل بیزین با استفاده از نرم‌افزار BEAST، مبتنی بر توالی‌های ژن 28S rRNA، ساختار مشخصی شامل سه کلاد اصلی درون جنس *Pleurogenoides* را نشان داد (شکل۳). یکی از این کلادها به‌وضوح شامل توالی مطالعه حاضر و یک توالی ثبت‌شده از بانک ژن مربوط به گونه *P. medians* بود که با ضریب پشتیبانی بیزین بالا (Posterior Probability > 0.95) خوشه‌بندی شده‌اند. این تطابق، تأییدی قوی بر تعیین گونه‌ای نمونه مورد بررسی به عنوان *P. medians* محسوب می‌شود. نکته جالب و در عین حال غیرمنتظره در ساختار این درخت، حضور دو کلاد جداگانه و نسبتاً دورتر برای دو گونه دیگر از همین جنس یعنی *P. euphlycti* و *P. cyanophlycti* بود. این دو کلاد با فاصله نسبتاً زیادی از کلاد *P. medians* قرار گرفته‌اند، به‌گونه‌ای که ارتباط نزدیک درون‌جنسی مورد انتظار در ساختار درخت مشاهده نمی‌شود.



شکل ۳) درخت فیلوژنتیکی حاصل از تحلیل توالی ژن 28S rRNA سرکر جداشده از *Bithynia tentaculate* با استفاده از روش بیزی در نرم‌افزار BEAST. یک توالی ترماتود غیر دیژنی (شماره دسترسی MH094439) به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد. اعداد نشان‌داده‌شده در گره‌ها مقادیر حمایت بیزی هستند. تصاویر سمت راست نشان‌دهنده میزبانانی هستند که سرکرهای مورد بررسی از آن‌ها جدا شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه مبنی بر شناسایی مولکولی گونه *Pleurogenoides medians* از سرکرهای استخراج‌شده از حلزون *Bithynia tentaculata*، شواهد جدیدی را در خصوص پراکنش جغرافیایی و تنوع میزبان‌های این گونه فراهم می‌کند. شناسایی این انگل در منطقه خرم‌آباد (غرب ایران) می‌تواند مکملی بر گزارش‌های پیشین در کشورهای هم‌جوار باشد که حضور این گونه را در میزبان‌های نهایی دوزیست تأیید کرده‌اند. به عنوان نمونه، Yıldırımhan و همکاران در بررسی انگل‌های کرمی قورباغه *Bombina variegata* در شمال‌غرب ترکیه، موفق به شناسایی دو گونه از دیژنهآ شدند که یکی از آن‌ها *P. medians* بود [۲۲]. این مطالعه که بر روی ۴۵ نمونه از قورباغه *Bombina variegata* انجام شد، نخستین بررسی انگل‌شناختی این میزبان در شمال‌غرب ترکیه بود و حضور *P. medians* را در آن به‌عنوان میزبان نهایی گزارش کرد. این یافته، در کنار گزارش مطالعه حاضر، اطلاعات مربوط به پراکنش جغرافیایی این ترماتود را گسترش می‌دهد؛ بااین‌حال، از آنجا که مطالعه ترکیه بر روی میزبان نهایی و مطالعه حاضر بر روی نمونه‌های حلزون انجام شده است، این دو گزارش را نمی‌توان شاهدی برای شباهت چرخه انتقال انگل در دو منطقه دانست. همچنین، در مطالعه‌ای دیگر توسط Abdel-Gaber و همکاران بر روی قورباغه *Rana ridibunda* در مصر، میزان آلودگی به *P. medians* بسیار بالا گزارش شده است (۶۳/۲۳٪ از ۳۰۰ نمونه) ، که در فصل زمستان به ۹۳/۳۳٪ نیز رسیده است [۲۳]. این مطالعه علاوه بر تأکید بر

وابستگی آلودگی به اندازه میزبان، برای نخستین بار حضور این گونه از ترماتود را در قورباغه‌های مردابی مصر به‌صورت رسمی ثبت کرده است. نتایج مورفومتریک این تحقیق نیز ویژگی‌های این گونه را به‌خوبی تأیید می‌کند. مطالعه حاضر در مقایسه با این پژوهش‌ها، برای اولین بار وجود *P. medians* را در میزبان واسط اول، یعنی حلزون آب شیرین *Bithynia tentaculata*، و آن هم به‌طور مولکولی شناسایی کرده است. این موضوع می‌تواند درک ما از چرخه زیستی انگل، نقاط ورود آن به میزبان نهایی، و همچنین تفاوت‌های منطقه‌ای در الگوی انتقال را تعمیق بخشد. در کنار تفاوت‌های میزبانی (دوزیستان در مطالعات قبلی در مقابل حلزون در مطالعه حاضر)، استفاده از توالی‌یابی ژنوم و ابزارهای مولکولی در این تحقیق، دقت بالاتری در تعیین گونه فراهم آورده و زمینه را برای تحلیل‌های تطبیقی عمیق‌تر در سطح منطقه‌ای فراهم می‌سازد.

در تکمیل تحلیل‌های فیلوژنتیکی این مطالعه، مقایسه توالی به‌دست‌آمده با داده‌های منتشرشده در پایگاه GenBank نشان می‌دهد که گونه‌ی *P. medians* در مطالعات اخیر نیز از میزبان‌های متفاوتی جدا شده و توالی‌های آن با شماره دسترسی‌های مختلف در بانک ژن ثبت شده‌اند. به عنوان نمونه: توالی ژن SSU rRNA با شماره دسترسی PV659144 از نمونه‌ای جداشده از قورباغه *Pelophylax ridibundus* در اوکراین، توالی‌های با شماره دسترسی PV659147، PV659163 و PV659375 مربوط به نمونه‌های جداشده از گونه دوزیست *Pelophylax lessonae* در لیتوانی، همچنین توالی ژن COX1 (میتوکندریایی) با شماره دسترسی PV659820 نیز از *P. ridibundus* به دست آمده است. تفاوت در میزبان‌ها (دوزیستان در مقایسه با حلزون‌ها به‌عنوان میزبان واسط اول) و همچنین تفاوت ناحیه‌های ژنی مورد استفاده، می‌تواند یکی از عوامل ایجاد تفاوت‌های نسبی در جایگاه فیلوژنتیکی این توالی‌ها در درخت‌های حاصل از آنالیز باشد. مطالعه حاضر، برای نخستین بار، این گونه را از حلزون آب شیرین (*Bithynia tentaculata*) شناسایی کرده که میزبان واسط اول در چرخه زندگی ترماتود محسوب می‌شود در حالی‌که اکثر داده‌های موجود در GenBank تاکنون از میزبان‌های نهایی دوزیستان مانند *Pelophylax* گزارش شده‌اند. این اختلافات در میزبان، چه از نظر مرحله تکاملی انگل و چه از نظر محیط زیست میزبانی، ممکن است بر تغییرات ژنتیکی محدود یا میکروتکامل محلی اثر گذاشته باشد؛ مسئله‌ای که در سایر مطالعات مشابه نیز مطرح شده است [۱۳]. مطالعه Dmytriieva حضور هم‌زمان *P. medians* و گونه‌هایی مانند *Prosotocus confusus* را در یک میزبان نهایی گزارش کرده است. بااین‌حال، مشاهده هم‌زمان این ترماتودها در یک میزبان نهایی، به‌تنهایی نشان‌دهنده استفاده مشترک آن‌ها از میزبان‌های واسط یکسان نیست [۲۴]. این هم‌زیستی انگلی می‌تواند بازتابی از مسیرهای انتقال مشترک یا اشتراک زیستگاه‌های میزبان‌های واسط (مانند حلزون‌ها) باشد. در این زمینه، یافته‌های مولکولی مطالعه حاضر که برای نخستین بار حضور *P. medians* را در میزبان واسط اول (*Bithynia tentaculata*) تأیید می‌کند، می‌تواند گام مهمی در درک چرخه زیستی این انگل در مناطق جدید باشد. در کنار تفاوت در میزبان نهایی و واسط، داده‌های منتشرشده در بانک ژن نیز نشان می‌دهند که ترکیب میزبان‌ها و منطقه جغرافیایی می‌تواند بر ساختار فیلوژنتیکی جمعیت‌های این گونه اثرگذار باشد.

حلزون *Bithynia tentaculata* به‌عنوان یکی از گونه‌های آب شیرین پرمطالعه در اروپا و آمریکای شمالی، به‌ویژه در زمینه زیست‌شناسی رشد، تولیدمثل، و نقش در انتقال ترماتودها، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است [۲۵, ۲۶]. تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که این گونه میزبان واسط مؤثری برای مراحل لاروی انگل‌های Digenea از جمله سرکرها و متاسرکرهای بیماری‌زا برای دوزیستان، پرندگان و پستانداران است. مطالعاتی همچون بررسی‌های [۲۷] حتی به تأثیرات پاتولوژیک انگل‌ها بر بافت‌های این حلزون پرداخته‌اند و گزارش کرده‌اند که حضور اسپوروکیست، ردیا و متاسرکرها می‌تواند باعث تحلیل بافت‌های گوارشی این گونه شود. در مطالعه حاضر، شناسایی مولکولی گونه‌ی *Pleurogenoides medians* از سرکرهای جداشده از *B. tentaculata* نه‌تنها بر نقش این حلزون به‌عنوان میزبان واسط اول در ایران تأکید می‌کند، بلکه نشان می‌دهد این گونه می‌تواند در مناطق غربی کشور نیز به عنوان حلقه کلیدی در چرخه زندگی ترماتودهای خانواده *Pleurogenidae* عمل کند. این یافته، اهمیت انجام بررسی‌های دقیق‌تر جمعیت‌های حلزون های بومی از نظر انگل شناسی، اکولوژی و اپیدمیولوژی را نشان می دهد.

در تحلیل انجام‌شده با نرم‌افزار BEAST بر مبنای توالی ژن 28S rRNA، تاکسون‌های جنس *Pleurogenoides* در سه کلاد متمایز قرار گرفتند: یکی شامل توالی نمونه ما و یک توالی مرجع مربوط *P. medians* بود (با شاخص اطمینان posterior probability > 0.95)، و دو کلاد دیگر که شامل گونه‌های *P. euphlycti* و *P. cyanophlycti* هستند، با فاصله قابل توجهی از کلاد ما قرار داشتند.

این نتایج قابل مقایسه با یافته‌های Chaudhary و همکاران است که با استفاده از ژن 28S rRNA نشان دادند گونه‌های *P. cyanophlycti* و *P. euphlycti* در یک کلاد مشترک قرار دارند و هر دو در جایگاه خواهری به سایر گونه‌های *Pleurogenidae* قرار گرفته‌اند [۱۳]. مشابه آن، مطالعه تکامل مولکولی *Pleurogenoides* توسط همان محققان تأکید می‌کند که این گونه‌ها بخش مشخصی از خانواده را تشکیل می‌دهند و بر اساس میزبان مشترک (دوزیستان) خوشه‌بندی شده‌اند. اما فاصله میان کلاد *P. medians* و کلاد ترکیبی *P. euphlycti–P. cyanophlycti* نشان می‌دهد که جنس *Pleurogenoides* ممکن است پارافیلتیک یا تکاملی واگرا باشد؛ همان‌طور که Chaudhary و همکاران بیان کرده‌اند، کمبود اطلاعات ژنتیکی برای بسیاری از گونه‌ها و همچنین تفاوت‌های تکاملی در توالی ژن‌ها می‌تواند باعث شود که برداشت ما از روابط تکاملی و غیرتک‌تباری (پارافیلی) بودن جنس‌ها نادقیق یا گمراه‌کننده باشد

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش، با مشاهده سرکرها در نمونه‌های حلزون آب‌شیرین *Bithynia tentaculata* و شناسایی توالی 28S rRNA با شباهت بالا به توالی مرجع منتسب به *Pleurogenoides medians* در DNA استخراج‌شده از کل بدن حلزون، شواهد اولیه‌ای درباره حضور احتمالی این ترماتود در منطقه خرم‌آباد فراهم می‌کند. تحلیل فیلوژنتیکی نیز قرارگیری توالی حاصل در کنار توالی مرجع *P. medians* را با حمایت پسین بالا نشان داد؛ بااین‌حال، به دلیل استخراج DNA از کل بدن حلزون و استفاده از یک نشانگر مولکولی، انتساب قطعی توالی به سرکرهای مشاهده‌شده و تأیید هویت گونه‌ای نیازمند بررسی‌های تکمیلی است. همچنین، نقش *B. tentaculata* به‌عنوان میزبان واسط این ترماتود هنوز به‌طور قطعی اثبات نشده است. بنابراین، جداسازی مستقل سرکرها، بررسی آن‌ها با نشانگرهای مولکولی مکمل، از جمله ITS2 و COI، و انجام مطالعات چرخه زندگی برای تأیید هویت انگل و تعیین نقش این حلزون در چرخه انتقال آن ضروری است. این یافته‌ها می‌توانند زمینه‌ای برای بررسی گسترده‌تر تنوع و پراکنش ترماتودهای خانواده Pleurogenidae در غرب ایران فراهم کنند.

تعارض منافع

هیچ تعارض منافع شخصی، مالی یا حرفه‌ای مرتبط با این مقاله وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان به جهت حمایت مالی از پژوهش حاضر در قالب پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Cribb TH, anderson GR, Adlard RD, Bray RA. A DNA-based demonstration of a three-host life-cycle for the Bivesiculidae (Platyhelminthes: Digenea). Int J Parasitol. 1998;28(11):1791–5. doi:10.016/S0020–7519(98)00127–1.
2. Cribb TH, Bray RA, Olson PD, Littlewood DT. Life cycle evolution in the digenea: a new perspective from phylogeny. Adv Parasitol. 2003;54:197–254. doi:10.1016/s0065–308x(03)54004–0.
3. Galaktionov KV, Dobrovolskij A. The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes: Springer Science & Business Media; 2013.
4. Glöer P, Pešić V. The freshwater snails (Gastropoda) of Iran, with descriptions of two new genera and eight new species. ZooKeys. 2012(219):doi:10.3897/zookeys.219.406.
5. Modabbernia G, Meshgi B, Rokni MB. A faunistic survey of snails and their infection with digenean trematode cercariae in Bandar-e Anzali at the littoral of the Caspian Sea. Ann Parasitol. 2021;67(4):703–13. doi:10.17420/ap6704.387.
6. Razi Jalali MH, Mirzaei M, Jahangiri Nasr F, Sharifi H. Identification and Determination of the Geographical Distribution of Freshwater Snails in Lorestan, Iran. Arch Razi Inst. 2019;74(4):423–31. doi:10.22092/ari.2018.123286.1244.
7. Schwelm J, Kudlai O, Smit N, Selbach C, Sures B. High parasite diversity in a neglected host: larval trematodes of *Bithynia tentaculata* in Central Europe. J Helminthol. 2020;94:e120. doi:10.1017/S0022149X19001093.
8. Serbina E. Larval trematodes in bithyniid snails (Gastropoda: Bithyniidae) in the lake-rivers systems from the steppe zone (The West Siberian Plain, Russia). Helminthologia. 2014;51(4):293–300. doi:10.2478/s11687–014–0244–5.
9. Besprozvannykh VV. [The biology of the trematodes Nenimandijea kashmirensis and Pleurogenoides medians (Pleurogenidae)--parasites of frogs in the Maritime Territory]. Parazitologiia. 2000;34(4):349–54.
10. Malek EA. Snail transmitted parasitic diseases: Volume I. New York USA: CRC press; 1980. 334 p.

11. Bawm S, Khaing NHE, Win SY, Thein SS, Khaing Y, Thaw YN, et al. Morphological and molecular identification of trematode cercariae related with humans and animal health in freshwater snails from a lake and a dam in Myanmar. Parasitol Res. 2022;121(2):653–65. doi:10.1007/s00436–022–7428–4.
12. Pitaksakulrat O, Sithithaworn P, Kopolrat K, Kiatsopit N, Saijuntha W, Andrews R, et al. Molecular identification of trematode parasites infecting the freshwater snail *Bithynia siamensis* goniomphalos in Thailand. J Helminthol. 2022;96:e49. doi:10.1017/S0022149X22000402.
13. Chaudhary A, Shinad K, Prasadan PK, Singh HS. Phylogenetic Position of *Pleurogenoides* Species (Plagiorchiida: Pleurogenidae) from the Duodenum of Indian Skipper Frog, *Euphlyctis cyanophlyctis* (Amphibia: Dicroglossidae) Inhabiting the Western Ghats, India. Helminthologia. 2020;57(1):71–7.
14. Gao J-F, Ma T-S, Hou M-R, An Q, Liu X-W, Zhang X-H, et al. Characterization of the Complete Mitochondrial Genome of *Pleurogenoides japonicus* (Digenea, Pleurogenidae): Comparison With the Members of Microphalloidea and Phylogenetic Implications. Ecol Evol. 2024;14(10):e70430.
15. Maleki L, Shahmoradi M, Golzarianpour K. *Parapleurogenoides* (Digenea), a new genus in *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae) from kurdistan, iran with comments on the relationships within Pleurogenidae. J Parasitol. 2025;111(4):431–40.
16. Mashaii N, Balouch M, Moubedi I. New records about helminth parasites of the marsh frog, *Rana ridibunda ridibunda* (Anura: Ranidae) from the north of Iran. Iranian J Fish Sci. 2000;2(2):77–88. doi:10.18869/acadpub.ijfs.
17. Salahi-Moghaddam A. Medical malacology for student of health sciences. Hormozgan Iran: Hormozgan University of Medical Sciences - Rasul Publications; 2013. 253 [In Persian] p.
18. Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. GeneDoc; analysis and visualization of genetic variation. EMBnetnews. 1997;4(2):1–4.
19. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol. 2010;27(2):221–4.
20. Baele G, Ji X, Hassler GW, McCrone JT, Shao Y, Zhang Z, et al. BEAST X for Bayesian phylogenetic, phylogeographic and phylodynamic inference. Nat Methods. 2025.
21. Kim JJ. Radula Tooth Structure of Eight Bithyniid Snails Observed by Scanning Electron Microscopy. The Korean J Malacol. 2015;31(1):49–59.
22. Yıldırımhan HS, Sümer N, Redhwan AM, Bülbül U, Karış M, Civil Y, et al. Helminth Fauna of the Yellow-bellied Toad *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758)(Anura: Bombinatoridae) from North-western Türkiye. Acta Zoologica Bulgarica. 2025;77(2):279.
23. Abdel-Gaber R, Maher S, Kamel R, El Deeb N. Supplementary studies of *Pleurogenoides medians* (Digenea: Lecithodendriidae) infecting the marsh frog *Rana ridibunda* (Amphibia: Ranidae) in Egypt. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci. 2017;6(2):154–9.
24. Dmytriieva I, editor Helminth species co-occurrence in marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in Ukraine. 10th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology; Book of abstracts; 2023 (5.) 6.–7. June, 2023; Tartu, Estonia.
25. Brendelberger H. Growth of juvenile bithynia tentaculata (prosobranchia, bithyniidae) under different food regimes: A long-term laboratory study. J Molluscan Stud. 1995;61(1):89–95. doi:10.1093/mollus/61.1.89.
26. Morley N, Adam M, Lewis J. The role of *Bithynia tentaculata* in the transmission of larval digeneans from a gravel pit in the Lower Thames Valley. J Helminthol. 2004;78(2):129–35. doi:10.1079/joh2003223.
27. Reader TA. The pathological effects of sporocysts, rediae and metacercariae on the digestive gland of *Bithynia tentaculata* (Mollusca: Gastropoda). Parasitol. 1971;63(3):483–9. doi:10.1017/s0031182000080008.