

Ağrı İli Civarında Görülen *Lymnaea stagnalis* Türü Salyangozlarda *Fasciola hepatica*'nın Larval Dönemlerinin Moleküler Prevalansı

Molecular Prevalence of Larval Stages of Fasciola hepatica in Lymnaea stagnalis Species Snails in the Vicinity of the Ağrı Province

✉ Ahmet Hakan Ünlü¹, ✉ Rahmi Yıldız¹, ✉ Selahattin Aydemir², ✉ Abdurrahman Ekici²

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Gevaş Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Van, Türkiye

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

Cite this article as: Ünlü AH, Yıldız R, Aydemir S, Ekici A. Molecular Prevalence of Larval Stages of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea stagnalis* Species Snails in the Vicinity of the Ağrı Province. Türkiye Parazit Derg 2023;47(1):34-7.

ÖZ

Amaç: Büyük gölet salyangozu olarak bilinen *Lymnaea stagnalis*, zoonoz özellikte bir parazit olan *Fasciola hepatica*'nın ara konaklarından birisidir. Bu çalışmada Ağrı ili civarında toplanan *L. stagnalis* türü salyangozlarda *F. hepatica*'nın larval formlarının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Bu çalışmada Ağrı ilinden toplam 150 adet *L. stagnalis* türü salyangoz toplanmıştır. Laboratuvara getirilen tatlı su salyangozları diseke edildikten sonra yumuşak dokuları mikroskop altında incelenmiştir. Diseke edilen salyangozlara DNA ekstraksiyonu işlemi yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu sonrasında *sitokrom c oksidaz alt birimi 1* gen bölgesini hedefleyen primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Mikroskopik bakıda *F. hepatica*'nın larval formları tespit edilememiştir. Ancak PZR işlemi sonrasında yapılan analizde iki (%1,3) *L. stagnalis* tatlı su salyangozunun *F. hepatica*'nın larval formlarıyla enfekte olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç: Çalışma bölgesinde, *L. stagnalis*'in *F. hepatica*'ya ara konaklık yaptığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağrı, *Fasciola hepatica*, *Lymnaea stagnalis*, PZR

ABSTRACT

Objective: *Lymnaea stagnalis* known as the great pond snail, is one of the intermediate hosts of *Fasciola hepatica*, a zoonotic parasite. In this study, it was aimed to determine the larval forms of *F. hepatica* by polymerase chain reaction (PCR) in *L. stagnalis* species snails collected from the vicinity of Ağrı province.

Methods: In this study, 150 *L. stagnalis* snails were collected from the Ağrı province. The freshwater snails brought to the laboratory were dissected, then their soft tissues were examined under a microscope. DNA extraction was performed on the dissected snails. After DNA extraction, PCR was performed using primers targeting the *cytochrome c oxidase subunit 1* gene region.

Results: In the microscopic examination, larval forms of *F. hepatica* could not be detected. However, it was concluded that two (1.3%) *L. stagnalis* freshwater snails were infected with the larval forms of *F. hepatica* in the PCR.

Conclusion: It was determined that *L. stagnalis* served as an intermediate host to *F. hepatica* in the study area.

Keywords: Ağrı, *Fasciola hepatica*, *Lymnaea stagnalis*, PCR

GİRİŞ

Fascioliasis, son konak olan insanlar ve otobur memeli hayvanlara kontamine olmuş suların içilmesi veya kontamine olmuş yeşil sebzelerin yenilmesi yoluyla bulaşan zoonotik bir hastalıktır (1). Trematod parazitlerden biri olan *Fasciola hepatica*, neden

olduğu fascioliasis hastalığının dünya genelinde geniş yayılım göstermesi hem insan hem de hayvan sağlığı ve ekonomi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle öne çıkan bir parazittir (2,3). Fascioliasis enfeksiyonlarında memeli hayvanlar için enfektif larva dönemi metaserkaryalardır. Bu formların son konak tarafından yutulması sonrasında parazit erişkin



Geliş Tarihi/Received: 04.04.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 17.10.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Ahmet Hakan Ünlü, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Gevaş Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Van, Türkiye

Tel/Phone: +90 555 340 44 51 E-Posta/E-mail: ahakanunlu@yyu.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-3441-8504

döneme geçmektedir (4). Genç parazitler göç esnasında karaciğer parankimasında tahribata ve hemorajiye neden olmaktadır. Erişkin parazitler ise karaciğer ve safra kanallarına yerleştiğinden, buralarda patolojik bozukluklara sebep olabilmektedir (5). Fascioliasis'in ruminantlardaki kontrolü, parazitin dokulara zarar veren erişkin formlarıyla beraber larval formlarını da hedef alan, özellikle triklabendazol başta olmak üzere antelmintik ilaçların kullanımına bağlıdır (6). Bunun yanında, *F. hepatica*'nın triklabendazol'a karşı direnç geliştirmesiyle ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (7,8).

Zoonoz bir parazit olan *F. hepatica*'nın yaşam döngüsü; omurgasız ara konak olarak su salyangozlarını ve son konak olarak memeli hayvanları içermektedir. Omurgalı konaktan çevreye salınan *F. hepatica* yumurtalarında, mirasidyum larvaları gelişmekte ve yumurtayı terk eden mirasidyum daha sonra ara konağı olan su salyangozlarına nüfuz etmektedir. Su salyangozunda sırasıyla sporokist, redi ve serkarya larvalarının gelişimi olmakta ve sonrasında su salyangozunu terk eden serkaryalardan dış ortamda metaserkaryalar meydana gelmektedir (4).

Önceden *Lymnaea truncatula* adıyla bilinen su salyangozu *Galba truncatula*; *F. hepatica*'nın başlıca ara konağıdır (9). Bunun yanında *F. hepatica*'ya ara konaklık yapan *Radix* spp., *Succinidea* spp. ve *Omphiscola glabra* türlerine ait su salyangozları da bulunmaktadır (10,11). Bunlar dışında dünya genelinde *Fasciola* spp. türlerine ara konaklık yapan 30 adet lymnaeid su salyangozu türü olduğu bilinmektedir (12). *Lymnaea stagnalis* de *F. hepatica*'ya ara konaklık yapan tatlı su salyangozu türlerinden bir tanesidir (13). Kuzey Amerika, Avrupa, Kuzey Afrika, Asya ve Avustralya'nın bazı bölgelerinde *L. stagnalis* türüne rastlanılmaktadır (14,15). Bu tatlı su salyangozu birçok balık, kerevit, amfibi, memeli ve kuş türünün beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (16).

Bu çalışmada Ağrı ili civarında sulak alanlardan toplanan *L. stagnalis* türü tatlı su salyangozlarında *F. hepatica*'nın larval formlarının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Salyangozların Toplanması ve Tür Teşhisinin Yapılması

Ağrı ilinde Gürlek ve ark. (17) tarafından yapılmış bir çalışmada araştırma bölgesi haritası üzerinde açık olarak gösterilmiş sulak alanlardan 150 adet tatlı su salyangozu *L. stagnalis* 2021 yılının Mayıs ayında toplandı. Toplanan tatlı su salyangozları ağzı geniş kapaklı plastik kaplara konuldu ve canlı olarak laboratuvara ulaştırıldı. Salyangozların tür teşhisinde Pflieger'den (18) yararlanıldı.

Salyangozların İşlenmesi

Salyangozlar kloru arındırılmış suda yıkandıktan sonra cam petri kutuları içerisinde diseke edildi. Diseke işlemi sonrasında örnekler, *F. hepatica*'nın larval formlarını görebilmek amacıyla Leica DM500 mikroskopunda incelendi. İnceleme sonrasında yumuşak doku parçaları -20 °C'de buzdolabında DNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar saklandı.

DNA İzolasyonu ve Konvansiyonel PZR

Salyangozlara uygulanan DNA ekstraksiyonu işlemi, Promega Wizard DNA (ABD) ekstraksiyon kitinin el kitapçığında

belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. DNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen DNA örneklerinin her birinden birer µL örnek alınarak PZR işlemine geçildi. PZR işleminde *sitokrom c oksidaz alt birimi 1* gen bölgesini hedefleyen ve 405 bp'lik bir bölgeyi çoğaltan FhCO1F (5'-TATGTTTTGATTTTACCCGGG-3') ve FhCO1R (5'-ATGAGCAACCACAAACCATGT-3') primerleri kullanıldı (19). Hedeflenen bölgeyi çoğaltmak için Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PZR işlemi SimpliAmp PZR cihazında gerçekleştirildi. PZR karışımı, cihaz döngü ve sıcaklık dereceleri Cucher ve ark.'nın (19) daha önce gösterdikleri şekilde hazırlandı ve ayarlandı. Pozitif kontrol olarak laboratuvarımızda var olan erişkin *F. hepatica* örneği kullanıldı. PZR örnekleri %1,5'lik agaroz jelde koşturulduktan sonra etidyum bromür ile inkübe edildi ve ultraviyole ışık altında görüntüledi.

İstatistiksel Analiz

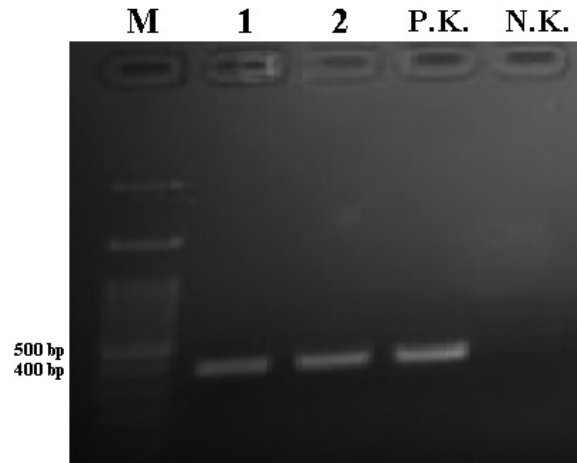
İstatistiksel analiz yapılmamıştır.

BULGULAR

Ağrı ili civarında bulunan sulak alanlardan toplanan tatlı su salyangozu *L. stagnalis*'te *F. hepatica*'nın larval dönemlerinin prevalansını belirlemek amacıyla yapılan PZR analizi sonucunda iki (%1,3) örnekte beklenen uzunlukta pozitif bant tespit edildi (Şekil 1). PZR öncesinde yapılan mikroskopik bakı sonucunda ise *L. stagnalis*'te *F. hepatica*'ya ait herhangi bir larval form tespit edilemedi. Tatlı su salyangozu *L. stagnalis*'nin özellikle suların durgun, sığ ve çamurlu olduğu kıyı bölgelerde yoğunlaştığı görüldü (Şekil 2).

TARTIŞMA

Dünya genelinde en az 2,6 milyon insanın *Fasciola* spp. türleriyle enfekte olduğu tahmin edilmektedir (20). Fascioliasis, genellikle



Şekil 1. Polimeraz zincir reaksiyon işlemi sonrası yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunda iki adet tatlı su salyangozu; *L. stagnalis*'te tespit edilen *F. hepatica*'ya ait 405 bp uzunluğundaki pozitif bantlar

M: Moleküler ağırlık belirleyicisi (100 bp), 1 ve 2 numaralı kuyucuklar: *F. hepatica* pozitif gelen örnekler, P.K.: Pozitif kontrol (1/1000 oranında sulandırılmış erişkin *F. hepatica* DNA'sı), N.K.: Negatif kontrol (ultra saf su)

gelişmekte olan ülkelerdeki yoksul insanları etkilemektedir (21). Fascioliasis, insan tüketimine sunulacak büyükbaş ve küçükbaş hayvanların karaciğerini, genel olarak et kalitesini, büyümesini ve üremesini olumsuz etkilemekte ve bazı durumlarda ölümlerine sebep olabilmektedir. Bu nedenle çiftçiler, kasaplar ve nihayetinde tüketiciler ekonomik açıdan olumsuz etkilenmektedir (3,22). Helmintik enfeksiyonlar nedeniyle dünya çapında yıllık toplam ekonomik kayıpların 200 milyar USD'nin üzerinde olduğu hesaplanmıştır (3).

Zoonoz bir trematod parazit olan *F. hepatica*'nın omurgasız ara konaktaki varlığının rutin olarak belirlenmesi, su salyangozlarının diseksiyonundan sonra mikroskop altında parazite ait larval formların görülmesi yoluyla yapılmaktadır. Rutin olarak yapılan mikroskopik bakının özgüllüğü ve duyarlılığı moleküler teşhis yöntemlerinden biri olan PZR'ye göre daha düşüktür. Bunun sebebi su salyangozunda *F. hepatica*'ya ait larval dönemlerin erken safhalarının kolayca gözden kaçabilmesidir. Ayrıca su salyangozları laboratuvara ulaşmadan veya serkarye salınımı öncesinde ölürlerse, direkt baki ile mikroskopik inceleme işlemi ciddi olarak olumsuz etkilenmektedir (19). Bu durum, çalışmamızda moleküler yöntem olan PZR ile su salyangozunda *F. hepatica*'ya ait larval formların varlığını gösteren iki adet pozitif banda rağmen mikroskopik incelemede herhangi bir larval safhanın teşhis edilememiş olmasını da açıklamaktadır. Böylece, moleküler teşhis yöntemlerinin çalışmalarda kullanılmasının önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır.

Tatlı su salyangozları, türüne göre değişmekle beraber suyun farklı bölge ve derinliklerinde yaşayabilmektedir. Ağrı ilinde yapılmış olan bir ön araştırmada *L. stagnalis* türüne ait tatlı su salyangozlarının bölgedeki varlığı, çalışma alanından ilk defa bildirilmiştir (17). Aynı ön araştırmada, ilgili bölgede *F. hepatica*'nın ana ve doğal ara konağı olan *Galba truncatula* varlığı da bildirilmektedir. Bu çalışmada, örneklerin sahadan toplanması aşamasında *L. stagnalis* türü su salyangozunun akıntının olmadığı, suların sığ ve çamurlu olduğu bölgelerde yoğunlaştığı fark edilmiştir. Bu bilginin benzer çalışma yapmak isteyen araştırmacılara örnek toplama aşamasında yardımcı olabileceği düşünüldüğünden, ayrıca belirtme ihtiyacı duyulmuştur.



Şekil 2. Tatlı su salyangozu *L. stagnalis*'e ait görüntüler (orijinal)

Fransa, İspanya, Portekiz, İsviçre, Almanya, Slovenya, Fas, Bolivya ve Venezuela'da yürütülmüş olan araştırmalara bakıldığında *F. hepatica*'nın ana ara konağının *Galba truncatula* olduğu görülmektedir (23-27). Malekzadeh-Viayah ve ark. (13) tarafından yapılan bir çalışmada İran'da *L. stagnalis* türü su salyangozlarında *F. hepatica*'nın larval dönemlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması sonucunda %1,1'lik bir enfeksiyon oranı tespit edilmiştir. Daha önce *F. hepatica*'nın ülkemizdeki varlığı ile ilgili yapılmış olan çalışmalara bakıldığında, araştırmaların daha çok son konakta kan, dışkı ve post mortem karaciğer muayenesi üzerinde yoğunlaştığı açık bir şekilde görülmektedir (28-30). Yapılan literatür taramalarında, daha önce ülkemizde *F. hepatica*'nın ara konağı olabilecek potansiyeli taşıyan bir su salyangozu hakkında moleküler prevalans çalışmasının yapıldığı görülmüştür. Bu nedenle Ağrı ili civarında toplanan su salyangozu *L. stagnalis*'te, *F. hepatica*'nın larval aşamalarının moleküler bir yöntem olan PZR ile tespit edilmesi, ülkemizde bu konuda yapılmış bir ilk çalışma olma özelliğini de göstermektedir. Ağrı ilinde Saltan ve Taşçı (30) tarafından yürütülen bir araştırmada kesime gönderilmiş 200 sığırın karaciğer ve safra yolları incelenmiş ve 47 sığırın safra yolunda *F. hepatica*'nın erişkin formuna rastlanılmıştır. Aynı çalışmada 188 adet sığırdan elde edilen dışkı ve kan örnekleri sedimentasyon ve ELISA yöntemleri ile incelemeye tabi tutulmuştur. Sonuç olarak 148 (%78,7) adet sığır ELISA testinde pozitif saptanmış ve 63 (%33,5) adet sığır dışkısında da *F. hepatica* yumurtalarına rastlanılmıştır. Ağrı ilinde *F. hepatica*'nın son konaktaki varlığının sabit olduğu göz önüne alındığında, bu çalışma potansiyel olarak ara konak olma özelliği taşıyan tatlı su salyangozlarında da *F. hepatica*'nın larval dönemlerinin araştırılmasının hastalıktan koruma programlarının daha iyi oluşturulabilmesi ve uygulanabilmesi açısından önemini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, parazitile mücadelede ara konak olan su salyangozlarının sayısını azaltmak amacıyla kimyasal ve mollusit kullanımı dahil olmak üzere en önemlisi daha çevreci olan çeşitli biyolojik mücadele yöntemleri ve çevresel-ekolojik yönetim uygulamalarının yapılması tavsiye edilmektedir (31).

SONUÇ

Ağrı ili civarından toplanan tatlı su salyangozu *L. stagnalis*'te *F. hepatica*'nın larval dönemlerinin varlığını belirlemek amacıyla yapılan moleküler prevalans araştırması sonucunda iki (%1,3) adet su salyangozunda, trematod parazitin varlığı PZR yöntemi ile tespit edilmiş ve *L. stagnalis* türüne ait su salyangozlarının, *F. hepatica*'ya ara konaklık yaptığı saptanmıştır. Lymnaeid su salyangozlarının *F. hepatica*'nın larval formlarına ev sahipliği yaptığı düşünüldüğünde, fascioliasis'in yaygın olduğu bölgelerde ara konak ile mücadelede ekolojik dengeyi bozmayacak ve çevreyi kirletmeyecek mücadele yöntemlerinin uygulanmasının önemi ortaya çıkmaktadır.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayına gerek yoktur.

Hasta Onayı: Bu çalışma için hasta onayına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*** Yazarlık Katkıları**

Konsept: A.H.Ü., R.Y., Dizayn: A.H.Ü., Veri Toplama veya İşleme: R.Y., A.H.Ü., Analiz veya Yorumlama: S.A., A.E., A.H.Ü., Literatür Arama: S.A., A.E., R.Y., A.H.Ü., Yazan: A.H.Ü., S.A., A.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek bildirilmemiştir.

KAYNAKLAR

- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1255-78.
- Caravedo MA, Cabada MM. Human fascioliasis: Current epidemiological status and strategies for diagnosis, treatment, and control. *Res Rep Trop Med* 2020; 11: 149-58.
- Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, et al. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog* 2017; 109: 253-62.
- Gayo V, Cancela M, Acosta D. Maintenance of life cycle stages of *Fasciola hepatica* in the laboratory. In: Cancela M, Maggioli G, editors. *Fasciola hepatica: Methods and Protocols*. New York: Springer Nature; 2020.p.1-14.
- Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları; 2007.
- Kaya S. Important anthelmintics used in ruminants and resistance to anthelmintics. *A.Ü Vet Fak Derg* 1986; 33: 318-35.
- Fairweather I, Brennan GP, Hanna REB, Robinson MW, Skuce PJ. Drug resistance in liver flukes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2020; 12: 39-59.
- Morales ML, Tanabe MB, White Jr AC, Lopez M, Bascope R, Cabada MM. Triclabendazole treatment failure for *Fasciola hepatica* infection among preschool and school-age children, Cusco, Peru. *Emerg Infect Dis* 2021; 27: 1850-7.
- Ollerenshaw CB. Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. *Vet Rec* 1971; 88: 152-64.
- Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. Natural infections of *Omphiscola glabra* (Lymnaeidae) with *Fasciola hepatica* in central France. *Parasitol Res* 2003; 91: 458-61.
- Relf V, Good B, McCarthy E, De Waal T. Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family Succineidae in Ireland. *Vet Parasitol* 2009; 163: 152-5.
- Vázquez AA, Alda MDP, Lounnas M, Sabourin E, Alba A, Pointier JP, Hurtrez-Boussès S. Lymnaeid snails hosts of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (Trematoda: Digenea): a worldwide review. *CABI Reviews* 2018; 13: 1-15.
- Malekzadeh-Viayeh R, Imani Baran A, Yakhchali M. Molecular detection of the infection with *Fasciola hepatica* in field-collected snails of *Galba truncatula* and *Lymnaea stagnalis* from West Azarbaijan, Iran. *Archives of Razi Institute* 2015; 70: 195-202.
- Atli G, Grosell M. Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure. *Aquat Toxicol* 2016; 176: 38-44.
- Zhang P, Blonk BA, van den Berg RF, Bakker ES. The effect of temperature on herbivory by the omnivorous ectotherm snail *Lymnaea stagnalis*. *Hydrobiologia* 2018; 812: 147-55.
- Coeurdassier M, De Vaufleury A, Scheifler R, Morhain E, Badot PM. Effects of cadmium on the survival of three life-stages of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda). *Bull Environ Contam Toxicol* 2004; 72: 1083-90.
- Gürlek ME, Kebapçı Ü, Kara C, Korkmaz M, Güneş H. Ağrı ili Malakofaunası üzerine bir ön çalışma. *Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 2013; 3: 1-19.
- Pfleger V. A field guide in colour to Molluscs. Prague, Czech Republic: Aventinum Nakladatelství, STO, Polygrafia; 1999.p.28-9.
- Cucher MA, Carnevale S, Prepelitchi L, Labbé JH, Wisnivesky-Colli C. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet Parasitol* 2006; 137: 74-82.
- Fürst T, Keiser J, Utzinger J. Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012; 12: 210-21.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fascioliasis. *Adv Exp Med Biol* 2014; 766: 77-114.
- Opio LG, Abdelfattah EM, Terry J, Odongo S, Okello E. Prevalence of fascioliasis and associated economic losses in cattle slaughtered at Lira Municipality Abattoir in Northern Uganda. *Animals (Basel)* 2021; 11: 681.
- Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S, Durand P, Bargues MD, Mas-Coma S, et al. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Mol Ecol* 2001; 10: 1333-40.
- Meunier C, Hurtrez-Boussès S, Jabbour-Zahab R, Durand P, Rondelaud D, Renaud F. Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Hereditas (Edinb)* 2004; 92: 316-22.
- Trouvae S, Degen L, Renaud F, Goudet J. Evolutionary implications of a high selfing rate in the freshwater snail *Lymnaea truncatula*. *Evolution* 2003; 57: 2303-14.
- Hurtrez-Boussès S, Hurtrez JE, Turpin H, Durand C, Durand P, De Meeüs T, et al. Hydrographic network structure and population genetic differentiation in a vector of fasciolosis, *Galba truncatula*. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 178-83.
- Burgarella C, Gayral P, Ballenghien M, Bernard A, David P, Jarne P, et al. Molecular evolution of freshwater snails with contrasting mating systems. *Mol Biol Evol* 2015; 32: 2403-16.
- Acici M, Buyuktanir O, Bolukbas CS, Pekmezci GZ, Gurler AT, Umur S. Serologic detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in sheep in the middle Black Sea region of Turkey. *J Microbiol Immunol Infect* 2017; 50: 377-81.
- Çelik ÖY, Çelik BA. Investigation of the prevalence of *Fasciola hepatica* in small ruminants in the Siirt region, Turkey. *Iranian J Parasitol* 2018; 13: 627-31.
- Saltan C, Taşçı GT. Prevalence of liver trematode infections in cattle in the province of Ağrı in Turkey. *Türkiye Parazit Derg* 2020; 44: 132-8.
- Madsen H, Hung NM. An overview of freshwater snails in Asia with main focus on Vietnam. *Acta Trop* 2014; 140: 105-17.