

***In-vitro* assessment of drug resistance to albendazole and rafoxanide in *Fasciola hepatica* in sheep**

Abstract

Fasciolosis is an important parasitic disease that limits the productivity of ruminants. During the last two decades, anthelmintic drugs have been increasingly applied in Iran. The aim of the present study was to evaluate drug resistance of *Fasciola hepatica* to albendazole and rafoxanide in sheep under laboratory conditions in Marivan municipality, West of Iran. For this purpose, a total number of 290 sheep livers were collected. They were cut into small pieces and adult *F. hepatica* were removed from naturally infected livers of sheep. Then were count and crushed. About 1,000 eggs of *F. hepatica* in 0.9% Ringer's solution were provided and incubated at 28°C for 16 days. On the 14th day, albendazole (0.1 µg/ml) and rafoxanide (0.1 µg/ml) along with control group were incubated at 28°C for 48 h. The percentage of hatched eggs and lethal dose of 50% larvae (LD₅₀) were figure out. Overall, 50 out of 290 examined livers (17.24%) were positive for *F. hepatica* infection. The highest infection rate of *F. hepatica* was found in the winter (2.17%). There was significant difference between percentage of the hatched eggs and both treated with albendazole and rafoxanide and control groups. The average of the hatched eggs of *F. hepatica* was lower in rafoxanide treated group (19.6±17.6) than albendazole treated group (32.8±14.9) and control group (35.4±12.1). LD₅₀ did not demonstrate resistance to albendazole (32.75%) and rafoxanide (19.5%) in treated groups. It was concluded that there was no resistance to albendazole and rafoxanide in sheep.

KEY WORDS: Drug resistance, Albendazole, Rafoxanide, *Fasciola hepatica*, Sheep.

مقاومت دارویی فاسیولا هیپاتیکا نسبت به آلبندازول و رافوکساناید به روش برون تنی در گوسفند

چکیده:

فاسیولوزیس بیماری انگلی با اهمیتی است که موجب کاهش تولیدات در نشخوارکنندگان می‌گردد. در دهه‌های اخیر تجویز داروهای ضد کرمی فاسیولا هیپاتیکا در ایران و شهرستان مریوان افزایش یافته است. هدف از این تحقیق تعیین مقاومت دارویی فاسیولا هیپاتیکا به آلبندازول و رافوکساناید در گوسفندان شهرستان مریوان بود. به این منظور ۲۹۰ کبد گوسفندان در شهرستان مریوان جمع‌آوری شدند. ۱۰۰۰ تخم فاسیولا هیپاتیکا در ۱ میلی لیتر محلول رینگر ۰/۰۹٪ تهیه شد و به مدت ۱۶ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. در روز ۱۴، با غلظت ۰/۱ µg/mL آلبندازول و رافوکساناید و گروه شاهد ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. درصد تخم‌های تفریح شده فاسیولا هیپاتیکا و دوز کشنده ۵۰٪ محاسبه شد. فراوانی آلودگی فاسیولا هیپاتیکا در کشتارگاه شهرستان مریوان، (۲۹۰:۵۰) ۱۷/۲٪ بود. بیشترین فراوانی آلودگی، در فصل بهار (۶/۸۹٪) بود. اختلاف میانگین تعداد تخم تفریح شده بین تیمار دریافت‌کننده آلبندازول و رافوکساناید و گروه شاهد، معنی‌دار بود. میانگین تخم فاسیولا هیپاتیکا تفریح شده در تیمار رافوکساناید (۱۷/۶±۱۹/۶) کمتر از آلبندازول (۳۲/۸±۱۴/۹) و گروه شاهد (۳۵/۴±۱۲/۱) بود. دوز کشنده ۵۰٪ در سوسپانسیون تخم فاسیولا هیپاتیکا مجاور شده با آلبندازول (۳۲/۷۵٪) کمتر از ۵۰٪ بود که بیانگر موثر بودن آلبندازول بر تخم فاسیولا هیپاتیکا و عدم بروز مقاومت دارویی

بود. دوز کشنده در سوسپانسیون تخم فاسیولا هیپاتیکا مجاور شده با رافوکساناید (۱۹/۵٪) کمتر از ۵۰٪ بود. بنابراین رافوکساناید نیز مانند آلبندازول توانایی جلوگیری از تفریح تخم های فاسیولا هیپاتیکا و عدم بروز مقاومت دارویی را در منطقه داشت.

کلمات کلیدی: مقاومت دارویی، آلبندازول، رافوکساناید، فاسیولا هیپاتیکا، گوسفند

مقدمه:

تهدیدهای ناشی از طیف وسیعی از بیماری های عفونی مشترک بین انسان و دام به دلیل تاثیرات آشکار و مخرب آن بر اقتصاد و سلامت انسان، در پی همه گیری های جهانی مورد توجه قرار گرفته است، با این حال، زئونوزهای انگلی، که بسیاری از آنها روزانه میلیون ها نفر را تحت تأثیر قرار می دهند، اغلب نادیده گرفته می شوند (Imani-Baran *et al.*, 2016). فاسیولوزیس یکی از بیماری های انگلی مهم در ایران و جهان می باشد و مشترک بین انسان و دام است. فاسیولوزیس انسانی نیز از ۵۱ کشور در پنج قاره گزارش شده است (Yakhchali *et al.*, 2015). فاسیولوزیس در کشورهای در حال توسعه و در جوامع فقیر بیشترین فراوانی را دارد. بیماری با خوردن سبزیجات آلوده به متاسرکر گونه های فاسیولا ایجاد می گردد (Hajipour *et al.*, 2021). فاسیولا انتشار جهانی داشته و در نواحی معتدله و گرم و مرطوب، بخصوص در مناطقی که پرورش دام های اهلی در آن ها رایج است، شایع می باشد (Edalatzadeh *et al.*, 2006). فاسیولوزیس در ایران یک بیماری بومی بوده که در مناطق شمالی به ویژه گیلان با توجه به شرایط اقلیمی وجود دارد (Taramian & Joukar, 2009).

اگرچه بسیاری از ترکیبات کشنده انگل در بازار موجود است اما اعتقاد بر این است که برخی از آنها در درمان بیماری کبد کاملاً موثر نیستند. اساساً، کنترل فاسیولوزیس در نشخوارکنندگان بستگی به تجویز داروهای ضدکرمی دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که با استفاده از ترکیبات ترماتودکش بر ضد کرم های نابالغ و دوزهای راهبردی در زمان های خاصی از سال موجب قطع چرخه زندگی انگل می شود (Hajipour *et al.*, 2021). با این حال، از آنجا که تنوع ترکیبات ترماتودکش بسیار محدود است و حیوانات سالانه بدون نظارت بر کارایی درمان، تحت درمان قرار میگیرند، ممکن است جمعیت انگل های مقاوم در برابر این ترکیبات ایجاد شود و کنترل فاسیولوزیس را دشوار کند (Ghaffari *et al.*, 2012).

در چند سال اخیر، با توجه به مصرف خودسرانه دارو توسط دامداران، حیوانات اهلی دچار مقاومت دارویی گردیده اند. این موضوع با توجه به اینکه ژن های پاتوژن های انگلی می تواند با رسیدن به ژن جدید و انتقال آن به نسل های بعد نسبت به دارو مقاوم شوند. بنابراین و در صورت بروز بیماری در صورت ابتلا به عفونت یا ارگانسیم مقاوم به دارو بایستی از داروی موثرتر و یا روش درمانی دیگری استفاده نمود. نخستین مورد مقاومت از همونکوس کونتورتوس نسبت به بنزیمیدازول ها از آمریکا گزارش گردید (Waller, 1997). بر اساس اطلاعات موجود مصرف بنزیمیدازول ها از جمله آلبندازول از سال ۱۳۵۳ در دامداری ها شروع شد. گرچه نزدیک به نیم قرن از

عرضه ترکیبات ضد نماتود در دنیا می‌گذرد و مقاومت کرم‌های انگل نشخوارکنندگان در برابر این ترکیبات از جمله بنزیמידازول‌ها یکی از مشکلات پرورش نشخوارکنندگان کوچک در سرتاسر دنیا است ولی این ترکیبات تاکنون در ایران تجویز می‌شوند (Gholamian *et al.*, 2006).

روش‌های مختلفی برای تشخیص مقاومت کرم‌ها در برابر ترکیبات ضد کرمی وجود دارد. در برخی مناطق از روش‌هایی نظیر کالبدگشایی دام‌های درمان شده و آزمایش رشد نوزاد نظیر میراسیدیوم در تخم جهت تشخیص مقاومت استفاده می‌گردد. در ایران بررسی مقدماتی مقاومت دارویی در نماتودهای دستگاه گوارش گوسفند در مشهد، بررسی صحرایی مقاومت دارویی نماتودها به لوامیزول و آلبندازول و بررسی مقاومت دارویی نماتودهای دستگاه گوارش گوسفند با استفاده از روش آزمایش رشد نوزاد گزارش گردید (Ebrahimi *et al.*, 2020; Gholamian *et al.*, 2006). در تمام مطالعات مورد اشاره، مقاومت دارویی در تمامی گونه‌های کرمی اعم از نماتود و ترماتود، در اثر مصرف بی‌رویه دارو ایجاد شده است. در ایران سالانه مبالغ زیادی صرف خرید داروهای ضد انگلی از خارج و یا تولید آن در داخل کشور می‌شود (Gholamian *et al.*, 2006). بر این اساس در مطالعه مقاومت دارویی فاسیولا هیپاتیکا ترماتود انگلی کبد نسبت به داروهای متداول ضد کرمی آلبندازول و رافوکساناید در دامداری‌های اطراف شهرستان مریوان ضروری بود. بنابراین تحقیق حاضر به منظور ارزیابی میزان مقاومت دارویی فاسیولا هیپاتیکا به روش برون تنی در گوسفندان شهرستان مریوان نسبت به آلبندازول و رافوکساناید انجام شد.

روش‌شناسی پژوهش:

روش نمونه برداری و جداسازی کرم بالغ فاسیولا هیپاتیکا

تعداد ۲۹۰ عدد کبد به صورت تصادفی ساده از کشتارگاه شهرستان مریوان (۳۰° ۴۶'N و ۱۰۰° ۳۵'E) از مهر ۱۳۹۹ تا خرداد ۱۴۰۰ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. اطلاعات دام از قبیل سن، جنس و وضعیت آلودگی کبد نیز ثبت گردید. در آزمایشگاه به هر کبد پس از بررسی ماکروسکوپی با مشاهده مستقیم و معاینه فیزیکی، برش عمودی به مجاری صفراوی کبد داده شده و با فشار دادن به مجرای صفراوی، در صورت وجود آلودگی، انگل‌ها خارج و جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه کبد و مجاری صفراوی به دقت برش داده شد و کرم‌های بالغ فاسیولا هیپاتیکا از کبد گوسفندان آلوده کشتار شده جدا شد. سپس کبد به قطعات کوچکی برش داده شدند و در آب ولرم به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردیدند. کرم‌های بالغ فاسیولا هیپاتیکا جمع‌آوری گردید (Yakhchali & Bahramnejad, 2016).

روش جداسازی تخم فاسیولا هیپاتیکا

از کرم‌های بالغ فاسیولا هیپاتیکا جدا شده لام مستقیم تهیه شد و براساس کلید تشخیص شناسایی شدند (Papadopoulos *et al.*, 2001). سپس کرم‌ها را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و در هاون چینی له شدند. مخلوط هموژن بدست آمده از الک ۱۲۰

عبور داده شد و تخم ها با استفاده از سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ سانتریفوژ (۲۰۰۰ دور در ۵ دقیقه) شدند. Georgieva et al., 2012; (Yakhchali & Bahramnejad, 2016). مایع رویی را دور ریخته و این عمل تا ۳ بار تکرار شد. تخم های رسوب داده شده در بطری شیشه ای تیره حاوی سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ در دمای ۴ درجه سانتی گراد در آزمایشگاه نگهداری شدند.

روش آزمایش برون تنی

۱ میلی لیتر محلول حاوی ۱۰۰۰ تخم فاسیولا هیپاتیکا تهیه و به تعداد گروه های درمانی و شاهد با احتساب ۳ تکرار در در چاهک های پلیت ۴۸ خانه ریخته شدند. کشت تخم های فاسیولا هیپاتیکا به مدت ۱۶ روز در تاریکی و در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد در انکوباتور انجام شد. در روز ۱۴ کشت، به چاهک های ۳ گروه درمانی آلبندازول ۲۰ میکرو لیتر داروی آلبندازول (۰/۱ μg/mL) و به چاهک های ۳ گروه درمانی رافوکساناید نیز ۲۰ میکرو لیتر داروی رافوکساناید (۰/۱ μg/mL) جداگانه اضافه شدند. گروه شاهد، مایع حاوی ۱۰۰۰ تخم فاسیولا هیپاتیکا و بدون دارو بود. سپس پلیت مجدداً در ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گذاشته شد. در روز ۱۶ کشت، اثرات دوز کشنده و ممانعت کننده خروج میراسیدیوم در حداقل ۵۰٪ تخم های فاسیولا هیپاتیکا داروی ضد کرمی آلبندازول (LD₅₀) در گروه های تیمار و شاهد بررسی گردید. به این منظور تعداد ۱۰۰ عدد تخم فاسیولا هیپاتیکا شمارش شد و در مطالعه ریزینی میزان اثرات ممانعت کنندگی آلبندازول بر خروج نوزاد از تخم، ارزیابی و ثبت گردید.

بر اساس LD₅₀ و غلظت ۰/۱ μg/mL دارو، میزان تأثیرگذاری مطلوب داروی آلبندازول بر روی تخم ها و ممانعت از خروج نوزاد فاسیولا هیپاتیکا از تخم، تفسیر گردید. به این ترتیب که درصد ممانعت از خروج نوزاد در کرم حساس فاسیولا هیپاتیکا به مقاومت دارویی کمتر از ۴۵٪، درصد ممانعت از خروج نوزاد در کرم مشکوک فاسیولا هیپاتیکا به مقاومت دارویی بین ۴۵٪ تا ۵۰٪ و درصد ممانعت از خروج نوزاد در کرم مقاوم فاسیولا هیپاتیکا با مقاومت دارویی بیشتر از ۵۰٪ باشد (Coles, 2005).

روش ارزیابی آماری:

برای ارزیابی یافته ها از آزمون آماری دانکن و با استفاده از نرم افزار آماری (USA.SAS , version 9.1)، تجزیه و تحلیل شد. P≤0.05 معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش:

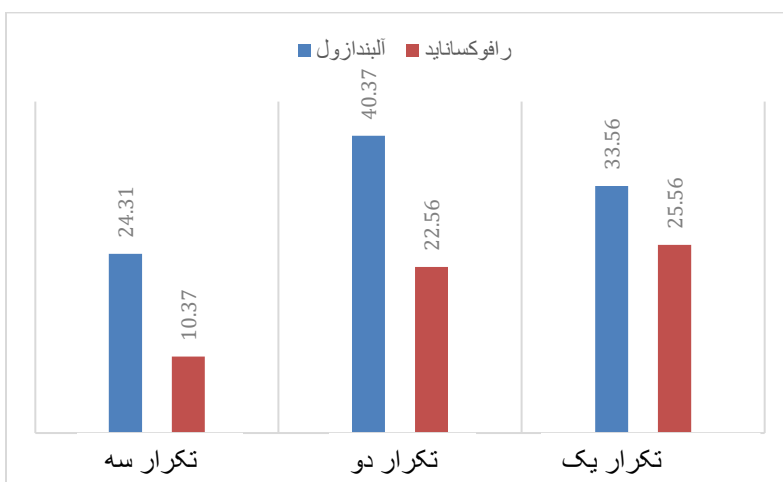
در بازرسی کشتارگاهی کبد گوسفندان در شهرستان مریوان، فراوانی آلودگی کبد به کیست هیداتید (۳/۷۹٪)، دیکروسلیوم دندریتیکوم (۱/۷۲٪)، انگل فاسیولا هیپاتیکا (۱/۰۳٪) و سایر عوامل عفونی (۱/۳۷٪) بود. بیشترین فراوانی آلودگی در فصل بهار (۶/۸۹٪) بود ($P > 0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی آلودگی کبد گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه شهرستان مریوان.

فصل (%)	زمان (ماه)	فراوانی آلودگی (%)			
		تعداد کبد ضبط شده	کیست هیداتید	دیکروسلیوم دندریتیکوم	فاسیولا هیپاتیکا
	مهر	۲۳	۳/۷۹	۱/۷۲	۱/۰۳
پاییز (۷۳/۳)	آبان	۲۷	۳/۴۴	۲/۷۵	۱/۷۲
	آذر	۳۳	۴/۱۳	۳/۴۵	۱/۰۳
جمع کل		۸۳	۱۱/۳۷	۷/۹۳	۳/۷۹
	دی	۳۳	۳/۷۹	۴/۱۳	۱/۷۲
زمستان (۵۵/۶)	بهمن	۳۲	۳/۱۰	۵/۱۷	۲/۰۶
	اسفند	۳۹	۳/۴۴	۶/۲۰	۲/۷۵
بروردین		۱۰۴	۱۰/۳۴	۱۵/۵۱	۶/۵۵
		۳۶	۵/۱۷	۳/۴۴	۱/۷۲
بهار (۸۹/۶)	دیبهشت	۳۵	۴/۱۳	۳/۴۴	۲/۷۵
	خرداد	۳۲	۳/۴۴	۴/۱۴	۲/۴۱
جمع کل		۱۰۳	۱۲/۷۵	۱۱/۰۳	۶/۸۹ ^a
جمع کل		۲۳	۳/۷۹	۱/۷۲	۱/۰۳

میانگین میزان خروج نوزاد میراسیدیوم فاسیولا هیپاتیکا از تخم به ترتیب در گروه‌های تیمار دریافت کننده آلبندازول، رافوکساناید و گروه شاهد $32/8 \pm 14/9$ ، $19/5 \pm 17/6$ و $35/4 \pm 12/1$ بود. به طوری که اختلاف میانگین میزان خروج نوزاد میراسیدیوم فاسیولا هیپاتیکا از تخم بین گروه‌های تیمار دریافت کننده آلبندازول، رافوکساناید و گروه شاهد معنی دار بود ($P < 0.001$). اختلاف بین گروه شاهد

(۳۵/۳۵)٪ با تیمارهای دریافت کننده آلبندازول (۳۲/۷۵)٪ معنی دار نبود ($P > 0.05$). براساس نتایج، دوز کشنده در سوسپانسیون تخم فاسیولا هیپاتیکا مجاور شده با آلبندازول (۳۲/۷۵)٪ کمتر از ۵۰٪ بود که بیانگر موثر بودن آلبندازول بر جلوگیری از خروج نوزاد میراسیدیوم فاسیولا هیپاتیکا از تخم و نبود مقاومت دارویی بود. دوز کشنده در سوسپانسیون تخم فاسیولا هیپاتیکا مجاور شده با رافوکساناید (۱۹/۵)٪ کمتر از ۵۰٪ بود (نمودار ۱). رافوکساناید نیز مانند آلبندازول توانایی جلوگیری از خروج نوزاد میراسیدیوم فاسیولا هیپاتیکا از تخم و عدم بروز مقاومت دارویی را داشت.



شکل ۱. مقاومت سنجی در تیمارهای آلبندازول و رافوکساناید بر اساس درصد خروج نوزاد میراسیدیوم از تخم فاسیولا هیپاتیکا و دوز کشنده ۵۰ درصد (LD_{50}) در آزمون برون تنی.

بحث:

با توجه به آندمیک بودن فاسیولوزیس در ایران، کنترل و پیشگیری از آن دارای اهمیت زیادی است. وضعیت فاسیولوزیس در کشور ما به دلیل شرایط اقلیمی متغیر، متفاوت می‌باشد. بنابراین، در هر منطقه نیاز به مطالعات اپیدمیولوژیک وجود دارد و به دلیل اهمیت اقتصادی و انتقال عفونت آن به انسان، لزوم کنترل آلودگی و همچنین یافتن مناسب‌ترین راه‌های پیشگیری هم‌چنان احساس می‌شود. همراه با فعالیت‌های دام‌پروری وجود بیماری‌های انگلی که میزبان‌های واسط آن‌ها حلزون‌ها هستند، دائماً در بررسی‌های کشتارگاهی از کشتارگاه‌های تمامی استان‌ها با درصدهای مختلف گزارش می‌شوند (Lotfy, 2014). فراوانی آلودگی کبد گوسفندان به انگل فاسیولا هیپاتیکا در کشتارگاه شهرستان مریوان با بیشترین فراوانی آلودگی در فصل بهار مطرح بود. این یافته با میزان شیوع فاسیولا هیپاتیکا در دام‌های کشتار شده شهرستان گچساران (۵/۳)٪ در استان کهگیلویه و بویراحمد مشابهت داشت (Edalatzadeh et al., 2006). بررسی Ghobadi و Yakhchali از کشتارگاه ارومیه در سال ۱۳۸۲، از ۲۲۰ عدد کبد آلودگی کرمی فاسیولا هیپاتیکا (۰/۶۵)٪ و

فاسیولا ژینگانتیکا (۰/۱۱۴٪) گزارش گردید به طوری که میزان آلودگی با ترماتود ۶۷/۲۷٪ و میانگین آلودگی هر کبده به فاسیولا هیپاتیکا ۲ و فاسیولا ژینگانتیکا ۳۵ بود (Ghobadi & Yakhchali, 2003). حاجی پور و همکاران در سال ۱۴۰۰ کبدهای کشتارگاه تبریز را از نظر وجود فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژینگانتیکا از طریق برش بر روی کبدها و مشاهده چشمی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ۱۶٪ گوسفندان کشتار شده آلوده به ترماتودهای کبدی بودند ($P > 0/05$) (Hajipour et al., 2021). در مطالعه Ghahavi et al. در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۲ با بررسی میزان آلودگی گاوهای کشتار شده در کشتارگاه شهرستان سرپل ذهاب ۶۴ مورد فاسیولا با شیوع ۵/۴۷٪ را گزارش کردند. (Ghahavi et al., 2019). Shahatha et al. در سال ۲۰۲۱، نشان داد که بزهای استان انبار به میزان ۴۳/۵٪ به انگل فاسیولا هیپاتیکا آلوده بودند (Shahatha et al., 2021).

با توجه به تحقیقات و گزارش‌های جهانی، یکی از بزرگ‌ترین مشکلات پیش رو در عصر حاضر مقاومت دارویی می‌باشد و این مایه نگرانی است. مقاومت دارویی در فاسیولا هیپاتیکا ممکن است تحت شرایط خاصی از جمله شرایط آب‌وهوایی، ادامه آلودگی در طول سال، عفونت‌های گوارشی هم‌زمان با نماتودها و استفاده نادرست از داروهای ضد کرمی به سرعت ایجاد شود (Alvarez-Sanchez et al., 2006). در ایران استفاده سرخود و نابجا از داروهای ضد انگلی از عوامل موثر در بروز مقاومت دارویی هستند (Gholamian et al., 2006). بر اساس نتایج این تحقیق در آزمون برون تنی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دریافت‌کننده آلبندازول و دریافت‌کننده رافوکساناید از گوسفندان تحت مطالعه با گروه شاهد وجود داشت. اختلاف بین تیمار شاهد و تیمار دریافت‌کننده آلبندازول نیز زیاد نبود. در تحقیق Novobilsk et al. در سال ۲۰۱۶، فعالیت تخم‌کشی آلبندازول برای جدایه B در مزرعه گوسفندان به‌طور قابل توجهی کمتر از جدایه مزرعه A گزارش شد. کارایی پایین آلبندازول در گله گوسفند B با مقاومت آلبندازول مرتبط بود. (Novobilsk et al., 2016). مهار تفریح تخم‌های انکوبه شده با آلبندازول گزارش شد ($P > 0/05$) (Alvarez et al., 2009). در تحقیقی در سال ۲۰۱۳ در امریکا فعالیت تخم‌کشی آلبندازول در فلوک بسیار کم (۱۳/۴٪) بود. برعکس، در جدایه‌های INTA-Bariloche و Río Chico حساس به آلبندازول، فعالیت تخم‌کشی ۷۰/۳٪ پس از انکوباسیون با آلبندازول گزارش گردید (Canevari et al., 2014). در حالی که در مطالعه Hardi et al. در سال ۲۰۱۹ مقاومت به رافوکساناید (۷۰/۱٪)، کلوزانتل (۷۰/۲٪) و تری‌کلاندازول (۷۳/۹٪) در فاسیولا هیپاتیکا از گوسفندان مناطق شارزور و سلیمانیه عراق تأیید شد. (Hardi et al., 2019). در مطالعه Benchaoui و McKellar در سال ۱۹۹۳ اثر ضد کرمی رافوکساناید بر مراحل نابالغ فاسیولا هیپاتیکا ناقص بود (Benchaoui & McKellar, 1993).

در این مطالعه، LD₅₀ در تخم‌های فاسیولا هیپاتیکا مجاور شده با آلبندازول کمتر از ۵۰٪ بود. بنابراین آلبندازول در خروج نوزاد میراسیدیوم فاسیولا هیپاتیکا از تخم و عدم بروز مقاومت دارویی موثر بود. این یافته با بررسی Alvarez et al. در سال ۲۰۰۹ هم‌خوانی داشت که در آزمون برون تنی آلبندازول، رشد تخم در دو جدایه فاسیولا هیپاتیکا مهار شد ($P > 0/05$) (Alvarez et al., 2009). در

بررسی Babják et al. در سال ۲۰۲۱ نیز رشد و تفریح تخم های فاسیولا هیپاتیکا در شرایط آزمایشگاهی توسط آلبندازول مهار شد (Babják et al., 2021) (% ۶۵/۴۰).

در مطالعه حاضر، LD₅₀ در تخم‌های فاسیولا هیپاتیکا مجاور شده با رافوکساناید نیز کمتر از ۵۰٪ بود. در بررسی مشگی و همکاران در سال ۱۳۸۹ اثر بخشی تریکلاندازول و آلبندازول به عنوان داروهای ضدکرمی وسیع الطیف بر علیه فاسیولا هیپاتیکا ۱۰۰٪ تایید گردید (Meshgi et al., 2010). بر اساس تحقیقات Richards در سال ۱۹۹۰ اثربخشی تری کلاندازول، کلروسولون، نیتروکسینیل و رافوکساناید نیز بر تخم ۱۰ تا ۱۲ هفته انگل فاسیولا هیپاتیکا به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۹٪، ۹۹/۱٪ و ۹۰/۱٪ بود (Richards et al., 1990). در بررسی دیگری توسط Armour و Corba در سال ۱۹۷۰ در هر کیلوگرم، راندمان در برابر فلوک های ۲، ۴ و ۶ هفته به ترتیب ۳۶٪، ۹۸٪ و ۹۶٪ بود. التیام ضایعات کبدی در حیوانات تحت درمان ۴ و ۶ هفته پس از عفونت مشاهده شد. (Armour & Corba, 1970). با توجه به اطلاعات ثبت شده از دامپزشکان منطقه و شهرستان مریوان، استفاده از داروی رافوکساناید در شهرستان مریوان به تازگی و در چند سال اخیر معمول شده است ولی به دلیل هزینه بیشتر آن نسبت به آلبندازول، این دارو کمتر تجویز می‌گردد.

نتیجه گیری و پیشنهادها:

نتایج به دست آمده از این تحقیق به طور معناداری نشان دهنده تاثیر مورد انتظار داروهای ضد کرمی آلبندازول و رافوکساناید معمول و موجود در بازار بر روی تفریح تخم فاسیولا هیپاتیکا بود. در این تحقیق همچنین نشان داده شد که حساسیت دارویی نسبت به آلبندازول کمتر از رافوکساناید بود. با توجه به این نتایج حاصل از مطالعه و شرایط پرورش گوسفندان و راهبردهای درمان ضد انگلی در دامداری های اطراف شهرستان مریوان توجیه دامدارها به استفاده صحیح و برنامه ریزی شده از داروهای ضدکرمی با ارتقا آگاهی آنها از طریق آموزش شان توسط شبکه های دامپزشکی منطقه توصیه می‌شود.

سپاسگزاری:

بدینوسیله نویسندگان از همکاری شبکه دامپزشکی شهرستان مریوان در استان کردستان در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می

نمایند

۱. ابراهیمی، رزگار، یخچالی، محمد، ملکی نژاد، حسن (۱۳۹۹). مطالعه مقاومت دارویی آلبندازول و فنبندازول در نماتودهای دستگاه گوارش گوسفند در شهرستان سقز. *مجله تحقیقات دامپزشکی*، ۷۵(۱)، ۴۵-۵۱.
۲. حاجی پور، ناصر، ولی زاده، هادی، حسن زاده، پرویز. (۱۴۰۰). مطالعه نقش سن، جنس و فصل بر میزان شیوع فاسیولیاژیس و دیکروسلیبازیس در دام‌های کشتاری در کشتارگاه تبریز، *بهداشت مواد غذایی*، ۱۱(۴۲)، ۶۹-۷۹.
۳. عدالت زاده، محمداسماعیل، و دلیمی اصل، عبدالحسین، و غفاری فر، فاطمه، صیاد، بابک (۱۳۸۵). روند تغییرات شاخص‌های خونی و کبدی در خلال آلودگی انسان به فاسیولا پس از درمان با تریکلاندازول. *مجله پزشکی بالینی ابن سینا (مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان)*، ۱۳(۲)، ۲۹-۳۶.
۴. غفاری حسینی، شروین، سپیده طلوعی (۱۳۹۱). *بیولوژی انگل‌ها*. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد.
۵. غلامیان، عباس، اسلامی، علی، نبوی، لیلا، راسخ، عبدالرحمن، گله داری، حمید (۱۳۸۶). بررسی وجود مقاومت نسبت به آلبندازول در نماتودهای دستگاه گوارش گوسفندان استان خوزستان، *مجله تحقیقات دامپزشکی*، ۶۲(۱): ۴۵-۵۱.
۶. غلامیان، عباس، اسلامی، علی، نبوی، لیلا، راسخ، عبدالرحمن، گله داری، حمید (۱۳۸۷). بررسی مقاومت دارویی نماتودهای دستگاه گوارش گوسفند با استفاده از روش آزمایش رشد نوزاد. *مجله دامپزشکی ایران*، ۴(۳): ۴۸-۵۷.
۷. قبادی، کیومرث، یخچالی، دکتر محمد (۱۳۸۲). بررسی میزان آلودگی کبد گاومیش و خسارت اقتصادی حاصل از آن در کشتارگاه ارومیه. *مجله تحقیقات دامپزشکی*، ۵۸(۱)، ۲۰-۲۱.
۸. قهویی، یونس، نقیبی، نسیم، زینل زاده، الهه (۱۳۹۸). بررسی میزان آلودگی های انگلی (فاسیولا، دیکروسلیوم، کیست هیداتید و سیستی سرکوس) در کبد و ریه ی گاوهای ذبح شده در کشتارگاه شهرستان سرپل ذهاب (کرمانشاه) طی سال های ۹۳-۹۲. *مجله دانش و تندرستی*، ۱۴(۲): ۱۵-۲۲.
۹. مشگی، بهنام، اسلامی، علی، سلیمی بجزستانی، محمد رضا، جالوسیان، فاطمه (۱۳۹۸). بیماری‌های کرمی حیوانات و راه‌های مختلف تشخیص آن‌ها بخش دوم: روش‌های غیر انگل‌شناسی. *مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی*، ۲(۱): ۱۹-۵.

References

1. Alvarez-Sanchez, M. A., Mainar-Jaime, R. C, Perez-Garcia, J., & Rojo-Vázquez, F. A. (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*, 159(13), 424-425. <https://doi.org/10.1136/vr.159.13.424>

2. Alvarez, L., Moreno, G., Moreno, L., Ceballos, L., Shaw, L., Fairweather, I., & Lanusse, C. (2009). Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 211-216. [https://doi.org/ 10.1016/j.vetpar.2009.05.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.014)
3. Armour, J., & Corba, J. (1970). The anthelmintic activity of rafoxanide against immature *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Record*, 87(7), 213-214. [https://doi.org/ 10.1136/vr.87.7.213](https://doi.org/10.1136/vr.87.7.213)
4. Babják, M., Königová, A., Burcáková, E., Komáromyová, M., Dolinská, M. U., & Várady, M. (2021). Assessing the efficacy of Albendazole against *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle by in vivo and in vitro methods. *Veterinary Sciences*, 8(11), 249. [https://doi.org/ 10.3390/vetsci8110249](https://doi.org/10.3390/vetsci8110249)
5. Benchaoui, H. A., & McKellar, Q. A. (1993). Effect of early treatment with rafoxanide on antipyrine clearance in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica*, 23(4), 439-448. <https://doi.org/10.3109/00498259309057032>
6. Canevari, J., Ceballos, L., Sanabria, R., Romero, J., Olaechea, F., Ortiz, P., Cabrera, M., Gayo, V., Fairweather, I., Lanusse, C., & Alvarez, L. (2014). Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *Journal of Helminthology*, 88(3), 286-292. <https://doi.org/10.1017/S0022149X13000163>
7. Coles, G. C. (2005). Anthelmintic resistance—looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Sciences*, 78(2), 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.09.001>
8. Ebrahimi, R., Yakhchali, M., & Malekinejad, H. (2020). Anthelmintic resistance to albendazole and fenbendazole in gastrointestinal nematodes of sheep in Saghez Municipality, Iran. *Journal of Veterinary Research*, 75(1), 1-7. (In Persian). <https://doi.org/10.22059/jvr.2018.253326.2771>
9. Edalatzadeh, M. I., Dalimi Asl, A., Ghafarifar, F., & Sayaad, B. (2006). Alteration in haematological and liver function indices during human infection with *Fasciola* spp. post treatment with Triclabendazole. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*, 13(2), 29-36. (In Persian). <https://doi.org/10.22059/jvr.2018.253326.2771>
10. Georgieva, K., Georgieva, S., Mizinska, Y. & Stoitsova, S. (2012). *Fasciola hepatica* miracidia: lectin binding and stimulation of in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Acta Parasitologica*, 57(1), 46-52. <https://doi.org/10.2478/s11686-012-0007-8>
11. Ghahavi, Y., Naqibi, N., & Zeinalzadeh, E. (2019). Prevalence of Parasitic Infections in Livestock in Slaughterhouses of Kermanshah Province during 2013-2017. *Journal of Knowledge and Health*, 14(2):15-22. (In Persian).
12. Ghobadi, K., & Yakhchali, M. (2003). A survey on helminthes infection of liver and economic loss in slaughtered sheep. *Journal of Veterinary Research*, 58 (1), 20-21.(In Persian).
13. Gholamian, A., Eslami, A., Nabavi, L., & Rasekh, A. A. R. (2006). A field survey on resistance of gastrointestinal nematodes to levamisole in sheep in Khuzestan Province of Iran. *Journal of Veterinary Research*, 62(1), 45-51.(In Persian).

14. Gholamian, A., Eslami, A., Nabavi, L., Rasekh, A. A. R., & Galedari H. (2008). A survey on drug resistance in gastrointestinal nematodes of sheep using larval development assay. *Iranian Veterinary Journal*, 4(3), 48-57. (In Persian).
15. Hajipour, N., Valizadeh, H., & Hassanzadeh, P. (2021). Study on the role of age, sex and season on the prevalence of fascioliasis and dicrocoeliasis in animals slaughtered in Tabriz slaughterhouse. *Food Hygiene*, 11 (42), 69-79.(In Persian).
16. Hardi, F. M., Rashid, Z. M., Mohammed, H. O. & Dyary, H. O. (2019). Resistance of *Fasciola hepatica* to Triclabendazole, Clozantel and rafoxanide in a sheep from in Sharazor district, Kurdistan Iraq. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 18(2), 16-26. <https://doi.org/10.23975/bjvetr.1970.171180>
17. Ghaffari Hosseini, S., & Tolouei, S. (2012). *Biology of Parasites*. Islamic Azad University Press, Boroujerd Branch. 352pp. (In Persian).
18. Karimi dehkordi, M., & Mohammadi, F. (2022). Prevalence of parasitic infections in livestock in slaughterhouses of Kermanshah province during 2013-2017. *Infection Epidemiology and Microbiology*, 14(2), 15-22. (In Persian).
19. Lotfy, W. M. (2014). Climate change and epidemiology of human parasitosis in Egypt: A review. *Journal of Advanced Research*, 5(6), 607-613. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.06.009>
20. Meshgi, B., Eslami, A., Salimi-Bejestani, M.R., & Jaloosian, F. (2010). Helminth infections of animal and diagnostic methods Part II: Non parasitological methods. *Veterinary Laboratory Research*, 2 (1), 5-19. (In Persian). <https://doi.org/10.22075/jvlr.2017.805>
21. Papadopoulos, E., Himonas, C., & Coles, G.C. (2001). Drought and flock isolation may enhance the development of anthelmintic resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, 97, 253-259. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00435-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00435-6)
22. Richards, R. J., Bowen, F. L., Essenwein, F., Steiger, R. F. & Büscher, G. (1990). The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against *Fasciola hepatica* in controlled studies in cattle. *Veterinary Records*, 126(9), 213-216. PMID: 2316160
23. Shahatha, S. S., Ayyed, I. M. & Mousa, M.O. (2021). An epidemiological and therapeutic study of *Fasciola hepatica* parasite in goats of Anbar Province-Iraq. *Earth and Environmental Science*, 904(1), 012024. <https://doi.org/10.2174/1871526518666180816102040>
24. Taramian, S., & Joukar, F. (2009). Fascioliasis. *Journal of Medical Council of I.R.I.*, 27(2), 239-249.
25. Waller, P. J. (1997). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 72(3-4), 391-412. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00107-6)
26. Yakhchali, M., Malekzadeh-Viayeh, R., Imani-Baran, A., & Mardani, K. (2015). Morphological and molecular discrimination of *Fasciola* species isolated from domestic ruminants of Urmia city, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(1), 46-55. PMID: 25904945

27. Yakhchali, M.; Bahramnejad, K. (2016). Inhibition effect of pH on the hatchability of *Fasciola* miracidia under laboratory conditions. *Iranian Journal of Parasitology*, 11(1), 30-34. PMID: 27095966

پایزناسنای نیشده

Abstract:

Introduction: Fasciolosis is an important parasitic disease among humans and animals in Iran and throughout the world, which especially limits the productivity of ruminants. Fasciolosis is prevalent in developing countries and poor societies with temperate, hot and/or humid areas. In Iran, it is a prevalent disease in northern regions due to climatic conditions and consumption of contaminated vegetables with metacerceriae of *Fasciola* species. Control of fasciolosis in ruminants is dependent on anthelmintic drugs' prescription. During the last two decades, anthelmintic drugs have been increasingly applied in Iran. There are several methods for determining the resistance to anthelmintic compounds, *i.e.* necropsy, Egg hatch assay (EHA), larval development assay (LDA), faecal egg count reduction test (FECRT), and molecular tools. They demonstrated Benzimidazoles (BZs)-resistance was present and sometimes widespread in examined farms. Thus the aim of the present study was to evaluate drug resistance of *Fasciola hepatica* to albendazole and rafoxanide in sheep under laboratory conditions in Marivan municipality, West of Iran.

Materials and Methods: A total number of 290 sheep livers were randomly collected in Marivan municipality, West of Iran from October 2020 to June 2021 and transferred to the Parasitology Lab. They were cut into small pieces and adult *F. hepatica* were removed from naturally infected livers of sheep. They were counted and identified using key identification. Then, the helminths were washed into 10 ml of sterile distilled water and crushed. The homogeneous mixture was passed through a 120 sieve and centrifuged at 2,000 rpm for 5 minutes. About 1,000 eggs of *F. hepatica* in 0.9% Ringer's solution were provided and incubated at 28°C for 16 days. On the 14th day, albendazole (0.1 µg/ml) and rafoxanide (0.1 µg/ml) along with control group were incubated at 28°C for 48 h. The percentage of hatched eggs and lethal dose of 50% larvae (LD₅₀) were figured out.

Results and Discussion: Fifty out of 290 examined livers (17.24%) were positive for *F. hepatica* infection. The highest infection rate of *F. hepatica* was found in spring (6.89%). There was significant difference between percentage of the hatched eggs and both treated with albendazole and rafoxanide and control groups. The average of the hatched eggs of *F. hepatica* was lower in rafoxanide treated group (19.6±17.6) than albendazole treated group (32.8±14.9) and control group (35.4±12.1). LD₅₀ did not demonstrate resistance to albendazole (32.75%) and rafoxanide (19.5%) in treated groups.

Conclusions: This study significantly demonstrated expected effect of examined anthelmintic drugs, *i.e.* Albendazole and Rafoxanide on egg hatching of *F. hepatica*. The study also uncovered that the helminths were less sensitive to Albendazole than Rafoxanide. It was also concluded that there was no resistance to albendazole and rafoxanide in sheep in the region. It is therefore recommended that farmers correctly applied anthelmintic drugs and raised their awareness on drug control principles.

KEY WORDS: Drug resistance, Albendazole, Rafoxanide, *Fasciola hepatica*, Sheep.