بیماری‌های کرمی حیوانات و راه‌های مختلف تشخیص آن ها

بخش دوم: روش‌های غیر انگل‌شناسی

مشگی، ب. [۱*]، اسلامی، ع. [۲]، سلیمی بجستانی، م.ر. [۳]، جالوسیان، ف. [۱]

دریافت: ۱۳۸۹/۲/۲۰ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۲۵

خلاصه:

تشخیص دقیق بیماری‌های مختلف، برای انجام اقدامات بعدی از قبیل بررسی اپیدمیولوژی، درمان، کنترل و... آنها اهمیت بسیار زیادی دارد. برای تشخیص بیماری‌ها و یا آلودگی ناشی از کرم‌ها، در اکثر موارد می‌توان با به کارگیری روش‌های نسبتاً دقیق و ارزان انگل‌شناسی آنها را تشخیص داد. ولی در بسیاری از موارد مانند ابتلای خوک به تریشین و یا مراحل داخل بافتی و یا مهاجر انگل‌ها از قبیل مرحلهٔ مهاجر داخل پارانشیمی *فاسیولا* و یا مرحله روده ای آمفیستومیازیس، تشخیص مراحل نوزادی سستودها، تشخیص همونکوزیس در شرایط صحرائی می توان از روش های سرولوژیکی (فاسیولیازیس، دیکروسلیازیس، نوزاد سستودها و...)، آنزیمی (اوسترتاژیازیس) کیت های تجارتی (همونکوزیس و دیرو فیلاریازیس) وجود آنتی ژن در مدفوع (سستودهای بالغ گوشتخواران و نماتودهای لوله گوارش نشخوارکنندگان) و ... استفاده کرد. گاهی روش های غیر انگل شناسی کمک زیادی به تشخیص بیماری ها می نمایند. استفاده از آندوسکوپی تنها راه تشخیص برخی بیماری ها (تومور موجود در هابرونمیازیس اسب، ابتلای گربه به *فیزالوپترا* و اسپیرسرکوزیُس سگ و ...) است. اکوکاردیوگرافی، آنژوگرافی، الکتروکاردیوگرافی و سونوگرافی گاهی به تشخیص صحیح برخی بیماری ها (دیروفیلاریازیس ناشی از *دیروفیلاریا ایمیتیس*) کمک شایانی می نمایند. بی شک در آینده روش های دقیقتری از روش های متداول انگل شناسی، برای تشخیص آلودگی برای آن دسته از انگل ها که تشخیص آن ها با ر وش های انگل شناسی مشکل است، بوجود خواهد آمد و درمان، کنترل و یا ریشه کنی بسیاری از بیماری های انگلی را آسان تر خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: تشخیص، روش های غیر انگل شناسی، آلودگی‌های کرمی، حیوانات.

۱- گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳-دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
*نویسنده مسؤول: bmeshgi@ut.ac.ir

مقدمه:

بطور کلی انگل‌ها در دو گروه ماکروپارازیت ها (کرم‌ها و بندپایان) و میکروپارازیت‌ها (تک‌یاخته‌ها) قرار دارند. تشخیص آلودگی به ماکروپارازیت‌ها در حیوانات زنده با استفاده از روش‌های انگل‌شناسی از جمله دیدن جرم‌آلوده با چشم غیرمسلح در روی بدن (مانند: کنه ها، شپش‌ها، و ...) بند در مدفوع (سستودها) و یا در آزمایش میکروسکوپی دیدن تخم کرم در مدفوع (ترماتودها و نماتودها و ندرتا سستودها)، نوزاد در مدفوع (کرم‌های ریوی) نوزاد (میکروفیلر) در خون (*دیروفیلاریا ایمی‌تیس*) و یا ترشحات پوستی (*پارافیلاریا مولتی‌پاپیلوزا*) و تخم در ادرار (*دیوکتوفیما رناله*) انجام می‌گیرد. آزمایش خلط در تشخیص آلودگی‌های کرمی متداول نیست. با استفاده از روش‌های فوق می‌توان به سادگی و با هزینه‌ای اندک، بسیاری از آلودگی‌های کرمی را تشخیص داد و نیازی به استفاده از روش‌های پیچیده و گران قیمت سرمی، بیولوژی مولکولی، سونوگرافی، الکتروکاردیوگرافی، رادیوگرافی و ... نیست. اگر چه در صورت نیاز می‌توان از روش‌های اخیر که کمتر متداول هستند، استفاده کرد. در مواردی حتی روش‌های اخیر هم می‌توانند کمک شایسته‌ای به تشخیص آلودگی‌های کرمی بنمایند و در برخی موارد استفاده از روش‌های غیرانگل‌شناسی برای تشخیص برخی آلودگی‌های کرمی (مانند: تریشینوز در خوک و گراز زنده) تقریبا الزامی است.

شایان ذکراست بیولوژی مولکولی نیزبعنوان ابزار توانمندی برای تشخیص انگل ها و بیماری های انگلی و غلبه بر محدودیت های حاصل از روش های انگل شناسی و مکمل روش های ایمنی شناسی، بیوشیمی، تصویربرداری و...محسوب می شوند. نوشته حاضر مروری بر استفاده کاربردی از روش‌های غیر انگل‌شناسی برای تشخیص آلودگی‌های کرمی حیوانات مختلف بدون توضیح روش های مربوطه می باشد.

نشخوارکنندگان

۱- اندازه‌گیری آنزیم‌ها و هورمون‌ها

۱-۱: نماتودهای لوله‌گوارش

در لوله گوارش نشخوارکنندگان بیش از ۶۰ گونه نماتود زندگی می‌کند (اسلامی و فیضی،۱۳۵۴؛ Eslami و Fakhrzadegan، ۱۹۷۲؛ Eslami و Nabavi، ۱۹۷۶) در بین آنها اوسترتاژیازیس به دلیل ایجاد ضایعات آسیب‌شناسی و بیوشیمیایی زیاد از اهمیت خاصی برخوردار است. استقرار مرحله چهارم نوزادی گونه‌های *اوسترتاژیا* در غدد پاریتال شیردان در چرخه حیاتی انگل سبب شده است تا بتوان بر اساس آزمایش خون به وجود آلودگی به ویژه در دوره توقف انگل در داخل مخاطات پی برد. استقرار انگل در غدد پاریتال موجب کاهش ترشح اسید کلریدریک و رسیدن pH شیردان از ۲ به ۷ و ایجاد محیط قلیایی می‌شود، این پدیده علاوه بر سایر آثار مخرب باعث عدم تبدیل پپسینوژن به پپسین و ورود بیش از حد آن به خون می‌شود، بطوریکه میزان آن در گاو از یک واحد بین‌المللی تیروزین به ۳ واحد و در گوسفند از یک واحد به ۲ واحد می‌رسد و با توسل به روش‌های مختلف می‌توان میزان آن را اندازه‌گیری کرد و آلودگی را تشخیص داد. لازم به یادآوری است که این افزایش ممکن است در اثر سایر عوامل بیماری‌زا هم به وجود آید.

۱-۲: فاسیولیازیس و دیکروسلیازیس

برای تشخیص فاسیولیازیس اگر چه استفاده از روش‌های انگل‌شناسی رایج است ولی با توجه به تاثیری که کرم بالغ بر سلول‌های کبدی می‌گذارد می‌توان از اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی (نظیر[1] LDH، [2]GST، [3]ALT و [4] AST) هم استفاده کرد. در دیکروسلیازیس هم تغییرات مشابه بوجود می‌آید بنابراین در مواردی که فقط یکی از این آلودگی‌ها وجود داشته باشد استفاده از این روش‌ها مفید است. چون آنزیم‌های مذکور می‌توانند تحت تاثیر سایر عواملی که بافت کبدی و هپاتوسیت‌ها را متاثر می‌سازند تغییر کنند، لذا استفاده از آنها به صرف تشخیص به عنوان روش‌های اختصاصی مطرح نیستند.

[1] - Lactate dehydrogenase (LDH)
[2] - Glutamine s-transferase (GST)
[3]- Alanine aminotransferase (ALT)
[4] - Aspartate aminotransferase (AST)

۲-استفاده از کیت در تشخیص و درمان همونکوزیس

کم خونی یکی از نشانه‌های مشخص ابتلای نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ به *همونکوس* است. در سال‌های اخیر در برخی از کشورهای آفریقایی که همونکوزیس خسارات اقتصادی زیادی وارد کرده است به منظور تشخیص آسان و سریع، همچنین درمان به موقع دام‌های آلوده توسط دامدارها از کیت مخصوصی به نام فاماچا (FAMACHA)[5] استفاده می‌شود، هر کیت حاوی طیف های مختلفی از رنگ است. به دامداران آموزش داده شده است چنانچه رنگ مخاط چشم، لثه و سایر نواحی، مشابه طیفی از رنگ قرمز روی کیت شود که در مطالعات قبلی و در آلودگی تجربی برابر با بیماری زا بودن انگل بوده است ، دام‌های خود را درمان کنند. این روش از سال ۲۰۰۴ برای پیشگیری از مقاومت دارویی در برابر *همونکوس کونتورتوس* از سوی OIE[6] و FAO[7] معرفی شده است.

۳-روش‌های سرم‌شناسی

در حال حاضر در بین روش‌های سرمی، الایزا یکی از رایج‌ترین روش‌های غیرانگل‌شناسی برای تشخیص همونکوزیس، اوسترتاژیازیس، فاسیولیازیس، دیکروسلیازیس و ... محسوب می‌شود که ذیلا مهمترین و متداولترین آنها توضیح داده می‌شود:

۳-۱- کرم‌های لوله‌گوارش

۳-۱-۱- نماتودیازیس

برای تشخیص همونکوزیس از پروتئین‌های سطحی کوتیکول مراحل سوم و چهارم نوزادی (George و همکاران، ۱۹۸۹)، همچنین پیگیری آنتی‌ژن‌های سطحی کرم بالغ در مدفوع با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال استفاده شده است (Ellis و همکاران، ۱۹۹۳).

از روش وسترن بلاتینگ نیز می‌توان همزمان برای تشخیص آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه چندین پروتئین انگل استفاده کرد. ژل آگارز و ژل پلی‌اکریلامید موادی هستند که برای جدا کردن پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند این مواد پروتئین‌ها را بر اساس اندازه‌شان جدا می‌کنند.

Kaur و همکاران (۲۰۰۲)، توسط سرم هیپرایمیون خرگوش و با استفاده از این روش پروتئینی با وزن مولکولی ۹۱/۲ کیلودالتون در کرم بالغ *همونکوس کونتورتوس* شناسایی و آن را به عنوان پروتئین اختصاصی معرفی کردند. در بررسی مشابهی بر روی سرم گوسفندان با آلودگی طبیعی در بین ۵ آنتی‌ژن مختلف رحم، روده و کوتیکول کرم نر و کرم ماده که تحت آزمایش قرار گرفته بودند، دو پروتئین با وزن مولکولی ۳۵ و ۴۰ کیلودالتون به ترتیب با منشا آنتی‌ژن روده و رحم به عنوان آنتی‌ژن تشخیصی گزارش شد (Meshgi و همکاران، ۲۰۰۷).

۳-۱-۲-آمفیستومیازیس

آمفیستومیازیس از جمله بیماری‌های کرمی با شیوع بالا در گاو به‌ویژه گاوهای بومی برخی مناطق کشور مانند گیلان ، مازندران و خوزستان است (اسلامی، مکالمات شخصی و در حال چاپ) که تشخیص این بیماری به دلیل چهره تحت بالینی، شباهت تخم آن با دیگر ترماتودها ضمن آزمایش مدفوع و عدم وجود تخم در مرحله روده‌ای انگل،از طریق انگل‌شناسی چندان دقیق نیست و زیاد هم به آن توجه نشده است، به همین دلایل اخیرا روش‌های سرمی برای تشخیص آن مورد توجه قرار گرفته است. Anuracpreeda و همکاران (۲۰۰۸)، ضمن بررسی الگوی الکتروفورتیک *پارامفیستوموم سروی*، پروتئین با وزن مولکولی ۵۲ کیلودالتون را شناسایی و حساسیت و ویژگی آن را به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸ درصد گزارش کردند. Meshgi و همکاران (۲۰۰۹)، در ایمونوبلاتینگ سرم گاوان مبتلا به آمفیستومیازیس، آنتی‌ژن با وزن مولکولی ۹۰ کیلودالتون را مناسب برای تشخیص معرفی کردند. اگر چه هنوز عملی‌ترین راه تشخیص مرحله بالغ انگل، آزمایش مدفوع و تشخیص تفریقی تخم آن با *فاسیولا* است.

[5] - Faffa malan chart (FAMACHA)
[6] - Organization international Des Epizoocies= (OIE)
[7] - Food and agriculture organization (FAO)

۳-۲- فاسیولیازیس و دیکروسلیازیس

در بین انگل‌های کرمی نشخوارکنندگان، فاسیولیازیس از اهمیت زیادی برخوردار است و از دیرباز هم روش‌های مختلف سرمی بر اساس تعیین آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی در سرم، شیر، مدفوع و صفرا برای تشخیص آن استفاده و پیشنهاد شده است (Salimi-Bejestani، ۲۰۰۴؛ Salimi-Bejestani و همکاران، ۲۰۰۷). در حال حاضر الایزا روش متداول تشخیص این بیماری به‌شمار می‌آید، به‌طوری که در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی از کیت‌های مخصوص برای تشخیص آن استفاده می‌گردد. نوعی از این روش بنام الایزای نقطه‌ای، روش مطلوبی بوده و با استقرار آنتی‌ژن بر روی یک غشا از جنس نیتروسلولز انجام می‌شود. از طرفی روش وسترن‌بلاتینگ به خصوص در چند دهه اخیر با استفاده از آنتی‌ژهای مختلف بدنی و دفعی ترشحی کرم بالغ و مرحله متاسرکر برای تشخیص مورد استفاده قرار گرفته است.

Meshgi و همکاران (۲۰۰۷ و ۱۳۸۶)، ضمن بررسی الگوی الکتروفورتیک گونه‌های *فاسیولا* از روش الایزا نقطه‌ای برای تشخیص سرمی این بیماری استفاده کردند.Salimi-Bejestani و همکاران (۲۰۰۵)، از روش الایزا با حساسیت ۹۸٪ و ویژگی ۹۶٪ برای تشخیص این بیماری در گاو استفاده کردند که می تواند در ۴-۲ هفته پس از ورود متاسرکر به بدن و قبل از بلوغ کرم و دفع تخم ، آلودگی را تشخیص دهد. Ibarra و همکاران (۱۹۹۸)، سه روش مختلف الایزا را جهت تشخیص فاسیولیازیس بررسی کردند و نشان دادند که الایزا غیر مستقیم دارای حساسیت ۹۷٪ و ویژگی ۹۹٪، الایزا ژل دیفوزیون دارای حساسیت ۹۸٪ و ویژگی ۸۰٪ و الایزا نقطه‌ای دارای حساسیت ۹۳٪ و ویژگی ۹۵٪ می‌باشد. در تشخیص این بیماری از آنتی‌ژن‌های در گردش هم می‌توان استفاده کرد، برای مثال در آلودگی تجربی گاو با *فاسیولا ژیگانتیکا* پروتئین ۵۴ کیلودالتون در طی ۲ هفته پس از آلودگی گزارش شده است (**Velusamy** و همکاران، ۲۰۰۴).

دیکروسلیازیس از دیگر بیماری‌های کرمی کبدی است که وجود بیش از یک میزبان واسط، تعدد و تنوع میزبان‌های واسط اول و دوم، عدم پاسخ مطلوب به درمان‌های معمول ضد کرمی و... نه تنها همه‌گیری‌شناسی بلکه تشخیص آن را با مشکلاتی مواجه کرده است. اگرچه در دو بررسی جامع توسط Otranto و Traversa (۲۰۰۲ و ۲۰۰۳) اطلاعات مختلفی از این بیماری جمع‌آوری شده است ولی در مجموع در مقایسه با فاسیولیازیس روش‌های تشخیص آن توسعه کمتری پیدا کرده است.

در مطالعه‌ای که توسط Wedrychowicz و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد از روش وسترن‌بلاتینگ برای آنالیز پروتئین‌های دفعی-ترشحی و پروتئین‌های سطحی *دیکروسلیوم دندریتیکم* در خرگوش‌هایی که با پروتئین بدنی *دیکروسلیوم* آلوده شده بودند، استفاده کردند. در این مطالعه در مورد آنتی‌ژن‌های سطحی ۸-۷ پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۲۸ تا ۱۲۴ کیلودالتون و در آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی، ۸ پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۲۱ تا ۱۵۸ کیلودالتون شناسایی گردید.

از دیگر روش‌های سرمی می توان به پرسیپیتاسیون[8] ، کانترایمنوالکتروفورز[9] و هموگلوتیناسیون غیر فعال[10] اشاره کرد. Jithendran و همکاران (۱۹۹۶)، این سه روش را با هم مقایسه کردند و نشان دادند که روش دوم بیشترین حساسیت (۶۹/۸ درصد) را دارد. در حالی‌که در روش سوم این میزان ۵۰ درصد و در روش اول ۲۳/۸ درصد بود، ولی ویژگی سه روش به ترتیب ۹۳/۳ درصد و ۸۴ درصد و ۹۳/۳ درصد گزارش گردید.

پایین بودن حساسیت تست پرسیپیتاسیون در تشخیص دیکروسولیازیس توسط Swarup و همکاران (۱۹۸۷) در تشخیص فاسیولیازیس در گاومیش نیز گزارش شده است. در مقابل بالا بودن حساسیت روش کانتر ایمنوالکتروفورز در تشخیص دیکروسلیازیس، توسط Pathak و همکاران (۱۹۸۶) در گوسفند و توسط Swarup و همکاران (۱۹۸۷) در گاومیش آلوده با *فاسیولا ژیگانتیکا* نیز تأیید شده است.

[8] - Agar Gel Precipitation Test (AGPT)
[9] - Counter Immuno Electro Phoresis (CIEP)
[10] - Passive Haemaggutination Test (PHT)

تشخیص نوزاد *سستودها*

۱-تست بین جلدی

می‌توان از آزمون‌های داخل پوستی توسط آنتی‌ژن‌های خام تهیه شده از انگل برای تشخیص برخی از آلودگی‌های کرمی استفاده کرد. این آزمون که براساس یک نوع واکنش ازدیاد حساسیت است، اگرچه به طور اولیه برای تشخیص آلودگی با نوزاد سستودها به خصوص کیست هیداتیک استفاده می‌شود ولی در مورد سیستی‌سرکوز، فاسیولیازیس و فیلریازیس هم قابل استفاده است.

۱-روش های سرم شناسی

انواع مختلف روش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های مرحله نوزادی مانند پروتواسکولکس، مایع و دیواره کیست نوزاد سستودها، همچنین انکوسفر تخم برای تشخیص کرم بالغ و نوزاد مورد استفاده قرار می‌گیرند. بعنوان مثال در ارتباط با تشخیص کیست هیداتیک از دو نوع آنتی‌ژن شامل آنتی‌ژن‌های محلول در مایع کیست و مقاطع تهیه شده از انگل یا اسکولکس برای تشخیص سرمی هیداتیدوز را استفاده می شود.

روش‌های سرمی متعددی برای تشخیص این بیماری به ویژه در انسان بصورت کاربردی استفاده و ارزیابی شده است که به عنوان نمونه می‌توان به ایمونوفلورسانس غیر مستقیم[11]، ثبوت کمپلمان[12]، آگلوتیناسیون غیر مستقیم[13] هماگلوتیناسیون غیر مستقیم[14]، آزمون‌های رسوبی مثل روش ژل دیفوزیون مضاعف[15] ایمونوالکتروفورز[16]، الایزا و وسترن بلات اشاره کرد. از این روش‌ها برای جستجوی آنتی‌ژن‌های در گردشی همچنین کمپلکس ایمنی هم می‌توان استفاده کرد. البته در این موارد باید به واکنش‌های متقاطع با سایر بیماری‌های انگلی توجه داشت، مثلا در تشخیص کیست هیداتیک آلوئولی، وجود پاسخ مثبت کاذب در اثر ابتلا به سیستی‌سرکوزیس و برخی از تومورها را باید مدنظر قرار داد (Biava و همکاران، ۲۰۰۱).

در بین روش‌های بالنسبه آسان و قابل انجام در شرایط غیر آزمایشگاهی برای تشخیص هیداتیدوز، می‌توان به الایزای نقطه‌ای اشاره کرد. Rogan و همکاران (۱۹۹۱)، حساسیت ۹۴٪ و ویژگی ۹۰/۵٪ را برای این آزمون به عنوان یک روش مزرعه‌ای گزارش کرده‌اند، همچنین بنا بر مطالعه Romia و همکاران (۱۹۹۲)، حساسیت و ویژگی الایزای نقطه‌ای در تشخیص هیداتیک به ترتیب ۸۸/۹٪ و ۹۶/۹٪ می‌باشد.

کانترایمونوالکترفورز که از جمله روش‌های مبتنی بر الکترفورز است همچنین ژل دیفوزیون مضاعف که هر دو با ایجاد خط رسوبی ناشی از تشکیل کمپکس آنتی‌ژن آنتی‌بادی بر روی ژل همراه هستند، برای تشخیص بسیاری از آلودگی‌های کرمی نظیر ترماتودها و نوزاد سستودها استفاده می‌شوند. Deka و Gaur (۱۹۹۰)، از این روش در تشخیص *سیستی‌سرکوس تنیوکولیس* با استفاده از سه نوع آنتی‌ژن مایع، پروتواسکولکس و دیواره استفاده کردند.

تک‌سمیان

۱-کرم‌های لوله گوارش

۱-۱: روش‌های سرمی

با توجه به شباهت تخم استرونگل‌های کوچک و بزرگ در تک‌سمیان و اختلاف زیاد بین بیماری‌زایی آنها، برای تشخیص انگل‌شناسی پس از آزمایش مدفوع و برای تشخیص تفریقی دقیق، باید به کشت مدفوع متوسل شد و با توجه به ریخت شناسی نوزادهای مرحله سوم در کشت، تشخیص را قطعی نمود. ولی از روش‌های سرمی با بهره‌گیری از آنتی‌ژن‌های مرحله سوم نوزادی هم می‌توان در تشخیص استرونژیلوزیس تک‌سمیان استفاده کرد. ضمنا در دو بررسی (Hoglund و همکاران، ۱۹۹۵؛ Proudman و Trees ، ۱۹۹۶) در روش الایزا از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی *آنوپلوسفالا پرفولیاتا* برای تشخیص سستودیازیس اسب استفاده شد.

[11] - Indirct Immunofluorescence Assay (IFA)
[12] - Complement Fixation Test (CFT)
[13] - Indirect Agglutination Test (IAT)
[14] - Indirect Haemagglutination Test (IHT)
[15] - Double Diffusion Gel (DDG)
[16] - Immunoelectrophoresis Test (IEP)

۱-۲- روش‌های مولکولی

از روش‌های مولکولی هم برای تشخیص آلودگی‌های کرمی تک‌سمیان می‌توان استفاده کرد. در مورد آلودگی‌های کرمی اسب به ویژه استرونگل‌های گوارشی بررسی جامعی توسط Hodgkinson (۲۰۰۶) انجام شده است. همچنین Traversa و همکاران (۲۰۰۴) از نوعی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[17] با ویژگی و حساسیت بالا برای تشخیص اختصاصی هابرونمیازیس معدی استفاده کرده‌اند. Iorio (۲۰۰۹)، از ژن سیتوکروم اکسیدازI برای تعیین ارتباط فیلوژنتیک *هابرونما موسکه* و *هابرونما میکروستوما* استفاده کرد (Iorio و همکاران، ۲۰۰۹).

لازم به ذکر است که استفاده از روش‌های مختلف مولکولی برای شناسایی آلودگی با نماتودهای گوارشی نشخوارکنندگان و کرم‌های قلاب‌دار گوشتخواران نیز گزارش شده است.

گوشتخواران

۱- آزمایش خون

می‌توان با اندازه‌گیری تعدادی از پارامترهای خونی، تعدادی از بیماری‌های کرمی را تشخیص داد. اگر چه ائوزینوفیلی در بسیاری از آلودگی‌های انگلی دیده می‌شود.

در ابتلا به *اسپیروسرکا لوپی*، با آزمون‌های خون‌شناسی در ۵۰ درصد سگ‌های مبتلا می‌توان کمخونی و افزایش کراتین‌کیناز خون را مشاهده کرد. در آلودگی با *تریشوریس ولپیس*، شمارش سلول‌های خونی و نمودار بیوشیمیایی سرم، در صورت شدید نبودن اسهال، طبیعی است، ولی چنانچه اسهال شدید باشد (دراثر هیپوآدرنوکرتیزیسم کاذب) هیپوناترمی، هیپرکالمی، کاهش نسبت سدیم/ پتاسیم دیده شود (Rathor و Sengar، ۲۰۰۵).

برای تشخیص دیرفیلاریازیس ناشی از *دیروفیلاریا ایمیتیس* یا کرم قلب در گوشتخواران از روش‌های مختلفی می‌توان استفاده کرد. برای جستجوی میکروفیلر در خون می‌توان از گسترش مستقیم و روش نات اصلاح شده استفاده کرد، که البته در این موارد باید نسبت به شناسایی دقیق میکروفیلر دقت زیادی صورت پذیرد (مشگی و اسلامی، ۱۳۷۹). در شمارش سلول‌های خونی، کمخونی خفیف تا شدید، وجود توأم ائوزینوفیلی و بازوفیلی همچنین لکوسیتوز و ترومبوسیتوپنی بخصوص در سگ‌های بیمار دیده می‌شود. در نمودار بیوشیمیایی خون و آزمایش ادرار، هموگلوبینوری ناپایدار وجود دارد، این موضوع بویژه در سندرم اجوف به دلیل همولیزحاد و پروتئینوری که به خاطر گلومرولونفریت ناشی از تشکیل کمپکس‌های ایمنی ایجاد می‌شود، قابل شناسایی است.

علاوه براین از روش میکروهماتوکر هم برای مشاهده حرکت میکروفیلر و تفریق آنها از روی خصوصیات زیستی و نحوه حرکت استفاده می‌شود.

۲- آندوسکوپی و سونوگرافی

در اسپیروسرکوز، آندوسکوپی دقیق‌ترین روش تشخیص است. با استفاده از آندوسکوپی معده در گربه‌های آلوده به *فیزالوپترا* می‌توان کرم‌های بالغ و نوزادها را مشاهده و در صورت لزوم خارج کرد (Rathor و Seng، ۲۰۰۵). با استفاده از سونوگرافی در بیماری کرم قلب می‌توان کرم بالغ را مشاهده کرد (اسلامی، ۱۳۸۵).

۳- پرتونگاری

در آلودگی گوشتخواران به *اسپیروسرکا لوپی*، پرتونگاری از قفسه سینه وجود توده‌هایی در خلف مری و استئوپروزیس مهره‌های سینه را نمایان می‌سازد (Rathor و Sengar، ۲۰۰۵).

در بیماری کرم قلب با پرتونگاری از قفسه سینه، می‌توان بزرگ‌شدگی و پیچ در پیچ شدن سرخرگ‌های ریوی به همراه تراوشات بافتی در اطراف سرخرگ‌ها را نشان داد. استفاده از این روش نه تنها از نظر تشخیص دیروفیلاریازیس بلکه از حیث بررسی شدت ضایعات ریوی قبل از درمان مفید است (اسلامی، ۱۳۸۵).

[17] - Polymerase Chain Reaction (PCR)
Cytochrome oxidase I(cox I)s

٤- شناسایی آنتی‌ژن‌های مدفوعی[18]

اگرچه استفاده از آنتی‌ژن‌های موجود در مدفوع بطور اولیه برای تفریق گونه‌های *تنیا* از یکدیگر و *اکینوکوکوس* مطرح بوده است ولی برای تشخیص گونه‌ای، آلودگی با نماتودهای گوارشی نشخوارکنندگان هم گزارش شده است. به هر حال در بکارگیری این روش‌ها حتما باید به واکنش متقاطع با سایر آلودگی‌ها بخصوص انگل‌های کرمی توجه کرد.

٥- اکوکاردیوگرافی، آنژیوگرافی، الکتروکاردیوگرافی و سونوگرافی

در تشخیص بیماری کرم قلب می‌توان با اکوکاردیوگرام، استقرار کرم‌های بالغ در بطن راست و در موارد پیشرفته شدت انقباض قلب را نشان داد. آنژیوگرافی در تشخیص این بیماری کاربرد چندانی ندارد، الکتروکاردیوگرافی هم معمولا طبیعی است ولی در صورت وجود هیپرتروفی بطن راست امواج S و موج P پولمونال همچنین انحراف محور قلب به سمت راست دیده می‌شود. البته الکتروکاردیوگرافی می‌تواند آریتمی‌های قلبی را بخوبی نشان دهد (اسلامی، ١٣٨٥).

٦- هضم بافت

از روش هضم بافت در تشخیص تعدادی از آلودگی‌های کرمی استفاده می‌شود که البته اندام و بافت مربوط، بسته به نوع آلودگی متفاوت خواهد بود. این روش در تشخیص آلودگی با *تریشینلا اسپیرالیس* با هضم ماهیچه‌های مشکوک به تریشینوز و شناسایی نوزادان خفته (بررسی وجود پدیده هایپوبیوزیس) و در آلودگی با نماتودهای لوله گوارش نشخوارکنندگان مثل *اوسترتاژیا* و *مارشالا جیا*، با هضم شیردان انجام می‌شود. در هر مورد بعد از هضم بافت اقدام به جداسازی نوزادان می‌گردد.

٧- آزمون‌های سریع[19]

در حال حاضر یکی از مهمترین اهداف تشخیص بیماری‌ها اعم از انگلی و غیر آن، استفاده از روش‌هایی است که در شرایط غیر آزمایشگاهی هم قابلیت انجام داشته و در عین آسان و کم‌هزینه بودن، نیاز به مواد و تجهیزات اختصاصی نداشته باشند که به اختصار توضیح داده می‌شوند.

٧ – ١: Dipstick

این روش شباهت زیادی به الایزا نقطه‌ای دارد و همانند آن، اساس آزمایش بر ایجاد واکنش رنگی می‌باشد، ولی برای انجام آن فقط به ٢٠-١٥ دقیقه (در برابر ٥-۴ ساعت در روش الایزا نقطه‌ای) زمان نیاز است. اولین بار این روش توسط Pappas (١٩٨۶)، به‌عنوان یک روش تغییر یافته و اصلاح شده‌ای از الایزا نقطه‌ای که بر پایه استقرار آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی بر یک بستر جامد است، استفاده شد. بعد از آن Allan و همکاران (١٩٩٣)، از آن برای تشخیص آنتی‌ژن‌های مدفوعی در آلودگی با گونه‌های مختلف *تنیا* استفاده کردند.

روش Dipstick توسط Van Etten و همکاران (١٩٩۴)، برای شناسایی آنتی‌ژن *شیستوزوما*، در ادرار مبتلایان به شیستوزومیاز و سپس توسط Al Sherbiny (١٩٩۶) جهت تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی در گونه‌های *شیستوزوما*، تحت بررسی و ارزیابی قرار گرفت. ولی Al Sherbiny و همکاران (٢٠٠۴)، از این روش برای تشخیص تریشینوز و هیداتیدوز انسانی استفاده کردند. محققین اخیر حساسیت و ویژگی این روش را برای تشخیص هیداتیدوز انسانی ١٠٠٪ و ٩١/۴٪ گزارش کردند.

٧-٢: ایمونوکروماتوگرافی (با استفاده از کلوئید طلا)

در اوایل قرن بیستم کلوئید طلا حاوی ذرات کوچکتر از ١٠ نانومتر با روش‌های شیمیایی تهیه شد و در سال ١٩٧١ تکنیک رنگ آمیزی با کلوئید طلا[20] با هدف نشاندار کردن پروتئین ها مورد استفاده قرار گرفت. نه تنها ذرات کلوئید طلا (به علت دانسیته الکترونی بالایی که دارند) به عنوان نشانگر برای میکروسکوپ الکترونی کاربرد دارند، بخاطر قدرت اتصال به ماکرومولکول‌هایی مثل ایمونوگلوبولین‌ها، استرپتوآویدین، لکتین و پروتئین A در ایمونوهیستوشیمی هم قابل

[18] - Coproantigens
[19] - Rapid test
[20] - Immunostaining-Gold

استفاده هستند. از سال ۱۹۷۵ از ذرات طلا برای نشاندار کردن آنتی ژن های سطحی سلول‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و آنتی‌ژن‌های داخل سلولی استفاده شد. بکارگیری کلوئید طلا روشی آسان، سریع و ارزان است و قابلیت تکرارپذیری زیادی دارد، این موارد سبب شده است تا استفاده از آن در روش‌های ایمونوکروماتوگرافی میسر و بجا باشد. در بین روش‌های سنجش ایمنی غیرایزوتوپی، بکارگیری ذرات کلوئید فلزاتی مثل طلا، نقره، مس، سلنیوم و ..... جایگاهی خاص داشته و باعث شده است تا طی دو دهه گذشته، بویژه استفاده از کلوئید طلا[۲۱] در امر تشخیص پیشرفت کند.

اگر چه روش‌های ایمونواسی نظیر الایزا به دلیل دقت و حساسیت بالا برای تشخیص بیماری‌های مختلف روش‌های ایده‌آلی محسوب می‌شوند اما بخاطر نیاز به آزمایشگاه تشخیص و وسایل و مواد مختلفی که در طی آزمون مورد نیاز است، در هر جا و هر شرایطی امکان انجام این روش‌ها وجود ندارد.

ولی در تست‌های سریع نیازی به وسایل خاص و یا افراد با تجربه نبوده و به همین دلیل امروزه در تشخیص‌های پزشکی، کشاورزی، مطالعات محیط زیست و دامپزشکی موارد استفاده آن روبه فزونی است.

روش‌های ایمونوکروماتوگرافی اغلب بر اساس قوانین ایمونومتریک می‌باشند. ماده اساسی در ایمونوکروماتوگرافی یک نوار از جنس نیتروسلولز است که یک پد حاوی گونژوکه طلا خشک شده به استریپ غشای نیتروسلولز چسبیده است. در این کیت‌ها آنتی‌ژن بر روی غشای نیتروسلولز قرار داده شده و نمونه (که می‌تواند خون، سرم، پلاسما و ..... باشد) از طریق یک جاذب (که در انتهای نوار نیتروسلولز مستقر شده تا به حرکت کونژوکه طلا بر اساس خاصیت مویینگی در غشا کمک نماید) در طول غشا به حرکت در می‌آید. در انتهای غشای نیتروسلولز، خطوط کنترل و تست قرار گرفته‌اند.

تا قبل از ۱۹۸۰ بیشتر از گونژوکه لاتکس که در آن زمان معمول بود ،استفاده می‌شد ولی از آن به بعد بخاطر پایداری زیاد گونژوکه طلا، در آزمون‌های سریع از این ماده استفاده شد. ذرات طلا که با آنتی بادی پوشیده شده‌اند دارای رنگ قرمز هستند و حداکثر جذب آنها در طول موج ۵۴۰–۵۲۰ می باشد. در حضور آنالیت مورد نظر، ذرات آگلوتینه شده و رنگ آنها تغییر می‌کند.

در حال حاضر این نوع کیت‌های سریع برای تشخیص دیروفیلاریوز ناشی از کرم قلب در گوشتخواران بصورت تجاری در دسترس می‌باشد، علاوه بر این برای تشخیص تریشینوز و شیستوزومیاز که در بسیاری از مناطق (اندمیک) دنیا شیوع زیادی داشته و از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، استفاده می‌شود.

استفاده از روش های مولکولی در تشخیص آلودگی های کرمی

روش های مولکولی باعث ایجاد انقلابی نوین در طبقه بندی و شناسائی ژنتیک کرم ها شده اند ودرچند دهه اخیر موجب پیشرفت های زیادی عمدتا در تشخیص گونه و سویه کرم ها و یا تشخیص آلودگی های کرمی شده اند. این روش ها از حساسیت بالایی برخوردارند، ودرمواردی که جمع آوری مقادیرکافی نمونه از بعضی کرم ها در مراحل مختلف چرخه زندگیشان (مثل تخم یا نوزاد) برای انجام آزمایشات معمولی تقریبا غیر ممکن است، می توان با حداقل DNA، قطعات انتخابی از ژن را تکثیرکرد، که این موضوع یکی از ویژگی های منحصر به فرد واکنش زنجیره ای پلیمراز است.

جداسازی وتخلیص اسیدهای نوکلئیک الگو، اولین و مهمترین مرحله برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز با کیفیت مطلوب وکارایی بالاست (Pena و همکاران، ۱۹۹۴). بعضی مواقع استخراج مقادیر کافی DNA ژنومی از بعضی کرم ها بسیار مشکل است که دلیل آن کوتیکول سفت نماتود و مواد فلوکولیت است که بهمراه اسیدهای نوکلئیک حین استخراج رسوب می کند و باعث ممانعت ازواکنش زنجیره ای پلیمرازمی شود (Gasser و همکاران، ۱۹۹۳). بنابراین استخراج اسیدهای نوکلئیک از کرم ها باید با دقت وصحیح انجام شود (Gasser و همکاران، ۱۹۹۳). به منظور استخراج DNA از کرم ها، برای درهم شکنی بافت های سخت نظیر غشای تخم یا پوشش بدنی (تگومنت، کوتیکول) می توان از سونیکاسیون، نیتروژن مایع، هموژنیزاتورهای دستی و مکانیکی، ساچمه های شیشه ای واسترس های فیزیکی بهره گرفت.

[21] - Gold Colloidal

در تشخیص کرم ها برای انجام هر بررسی مولکولی، استفاده از موتورهای جستجو در پایگاه های داده های ژنتیکی، به منظور جستجوی توالی های مشابه با توالی هدف و انتخاب اولیگونوکلئوتید مناسب به عنوان پرایمر اجتناب ناپذیر است. در ادامه ضمن توضیح یکی از کاربردی ترین روش های مولکولی در شناسایی کرم های انگلی، موارد استفاده آن نیزعنوان می شود.

انتخاب ناحیه هدف

انتخاب ناحیه هدف برای تکثیر توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز، به پرسشی که بدنبال پاسخ آن هستیم وهدفی که دنبال می کنیم، بستگی دارد. تمام نواحی DNA ژنومی ومیتوکندریال انگل ها همواره دارای تجمع موتاسیون ها هستند اما بعضی نواحی نسبت به سایر قسمت ها برای تغییر نوکلئوتیدها در دسترس تر می باشند. بعنوان مثال نواحی غیر کدشونده [22] و اینترون ها نسبت به نواحی کدشونده سریع تر درگیر می شوند. بطورکلی ناحیه هدف باید بتواند مارکرهای ژنتیکی را برای افتراق وتعیین گونه ها فراهم کند، چرا که سطح تغییرات درون گونه ای در توالی از سطح تغییرات بین گونه ها کمتر است. rDNA هسته ای یک ناحیه هدف کاربردی و کلیدی برای شناسایی گونه ها و سویه هاست.

تعیین توالی ژن های ITS-1 و ITS-2 [23] استخراج شده از rDNA در تشخیص گونه ای طیف وسیعی از نماتودها استفاده می شود (Host و همکاران، ۱۹۹۳). شناسایی گونه های *همونکوس* (Bandyopadhyay و همکاران، ۲۰۱۰)، *استرتاژیا*(Grillo و همکاران، ۲۰۰۶)، *فاسیولا*(Amer و همکاران، ۲۰۱۰) و... مثال هایی ازاین قبیل اند.

DNA میتوکندریایی[26] ،کوچک ومعمولا حلقوی است (Brown، ۱۹۸۵) و برای آنالیز تغییرات ژنتیکی درداخل و بین جمعیت های انگلی مناسب است (Bowlese و همکاران، ۱۹۹۲). از جمله ژن های میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز I است که برای تعیین سویه های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در جدایه های مختلف تحت مقایسه قرار می گیرد (Simsek و همکاران، ۲۰۰۸). نوکلئوتید آدنین دهیدرو ژناز (NADH) از دیگر ژن های میتوکندریایی است که برای تشخیص *همونکوس پلاسه ای* در گاو وتعیین سویه *اکینوکوکوس گرانولوزوس* درجدایه های مختلف تعیین توالی می شود (Mwambete و همکاران، ۲۰۰۴). در بررسی دیگری با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز[1] وتعیین توالی قطعه تکثیر شده از یک ناحیه طویل غیر کدشونده، DNA میتوکندریایی گونه های انگلی تریکوسترونژیلید (*استرتاژیا استرتاژی، همونکوس پلاسه ای، همونکوس کونتورتوس، تلادورساژیا سیرکومسینکتا*) را از یکدیگر تشخیص دادند.

تغییرات طول قطعات حاصل از آنزیم های با اثرمحدود(RFLP)

محصول PCR تکثیر شده از توالی هدف با استفاده از روش PCR-RFLP در نواحی متغیر توالی، آنالیز می شود. توالی هدف در نواحی دارای تغییر، با استفاده از آنزیم های اندونوکلئاز با اثر محدود، هضم شده و بر روی ژل آگاروز، الکتروفورز می شود، قطعات حاصل پس از هضم آنزیمی، الگوی الکتروفورتیک متفاوتی نشان می دهند که به شناسایی وتشخیص گونه ها یا سو یه های مختلف انگلی می انجامد. این روش کاربرد بسیار گسترده ای در انگل شناسی نوین دارد که می توان به موارد زیر اشاره کرد.

Newton و همکاران (۱۹۹۸)، ۲۴ گونه ازنماتدهای استرونژیلید (خانواده: تریکوسترونژیلیده، مولینی ایده وشابرتی ایده) را درنشخوارکنندگان (گوسفند، بز، گاووخوک) با این روش شناسایی وجداکردند. ژن های rDNA ناحیه ITS-1،5.8srRNA ، ITS-2 تکثیر شدند وبا آنزیم های اندونوکلئاز NaIII, DraI, Hinf I, Rsa I هضم شدند. الگوی برش با آنزیم ها، پس ازالکتروفورز، در هرگونه منحصر بفرد بود بجز *کوپریا سورنابادا*[1] و *کوپریا انکوفورا*[2] که اکنون بعنوان یک گونه واحد در نظرگرفته شده اند. با استفاده از روش های مولکولی، نوزاد مرحله اول (L1) *مولریوس کاپیلاریس*[2] را در گوسفندان وحشی مونتانا که اولین گزارش انگل در این نواحی است، شناسایی کردند (Ezenwa و همکاران، ۲۰۱۰)۰ *دیروفیلاریا ایمیتیس*[3] با تعیین توالی ژن 16s rRNA در میزبان واسط تشخیص داده شده است (Vezzani و همکاران، ۲۰۱۰)۰

[22]- Non-coding
[23]- Internal transcribed spacers (ITS)
26-Mitocondtial DNA(mtDNA)

در بیوپسی اخذ شده از پوست زنی که ازافریقا برگشته بود، تخم انگلی مشاهده شد که تشخیص اولیه، آلودگی اکتوپیک با جنس *شیستوزوما* رانشان داد. ولی با استفاده از بیولوژی مولکولی و استخراجDNA وتعیین توالی ژن 28s rRNA نشان داده شد که گونه انگل، *شیستوزوما هماتوبیوم*[۴] می باشد. در مسافرینی که به نقاط مختلف سفرمی کنند عوامل متفاوت انگلی باعث زخم های پوستی می شوند، علاوه بر روش های بررسی میکروسکوپی عوامل ایجاد کننده ضایعه و سایر روش های جاری، با استفاده از روش های مولکولی می توان انگل را تا حد گونه شناسایی کرد و در تصمیم گیری های بعدی جهت درمان وپایش آلودگی از آن استفاده نمود (Van Dijk و همکاران، ۲۰۱۰)۰

Real-Time PCR ازابزارهای جدید تشخیص مولکولی اجرام مختلف از جمله انگل ها می باشد. دراین روش از انواع پروب ها استفاده می شود و قابلیت تشخیص اختصاصی، دقیق وسریع را درحیطه های مختلف انگل شناسی ارائه می دهد. با استفاده از پروب های هیبریدیزاسیون، پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی مرتبط با مقاومت به داروهای ضدانگلی دقیق وسریع تعیین می شود. اساس پروب های هیبریدیزاسیون بر دو پروب الیگونوکلئوتیدی مجاورهمدیگر استوار است که بافلورسنت نشاندار شده اند و طی پدیده انتقال رزونانس انرژی فلورسنس، به یکدیگر فلورسنس می رسانند و یک اسیدنوکلئیک خاص با هیبریدیزاسیون دو پروب درمجاورت آن با موفقیت تشخیص داده می شود (Jalousian و همکاران، ۲۰۰۷). با بکارگیری روش Real-Time Quantitative PCR تعداد نسخه های ژن مورد نظر و یا بیان ژن های خاص، طی مراحل مختلف سیرتکاملی انگل، بطورکمی تعیین می شود (Jalousian و همکاران، ۲۰۰۷). بنا براین می توان از روش های مولکولی برای تشخیص دقیق تر انگل ها و آلودگی های انگلی استفاده کرد.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 2 (2010) 5-19

Helminth infections of animal and diagnostic methods
Part II: Non parasitological methods

Meshgi, B. [1]*, Eslami, A. [2], Salimi-Bejestani, M.R. [3], Jaloosian, F.[1]

Received: 10.05.2010 Accepted: 15.06.2010

Abstract:

Precise diagnosis of different diseases including parasitic infections has an important role in their epidemiological studies, treatment and control. In most cases, it is possible to diagnose diseases or infections caused by helminths, using cheap and accurate parasitological methods.

Diagnosis of pork *Trichinella* infection, Intramuscular or migrant stages of parasites such as *Fasciola* interparanchymal stage, intestinal stage of amphystomiasis, metacestodiasis , hemonchosis under field condition were performed using serological methods ,Enzyme methods (Ostertagiasis), commercial kits (haemonchosis, dirofilariasis), detecting of coproantigen (adult cestodes in carnivores, ruminant GI nematodes).

Sometimes other non parasitological methods such as endoscopy are the only methods for diagnosis of some diseases (equine habronemiasis, feline phisalopteriasis and dog spirocercosis). Meanwhile echocardiography, angiography, electrocardiography and sonography are useful for accurate

diagnosis of dirofilariasis and … Certainly, more accurate methods, parasitological or non parasitological, other than the current methods will be presented in future for diagnosis of parasites, which will improve the treatment, control and eradication of many parasitic diseases.

Key words: Diagnosis, Non parasitological methods, Helminths infections, Animals.

1: Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O. Box: 14155-6453 Tehran, Iran.2: Department of Parasitology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
3: Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
*Corresponding author:Bmeshgi@ut.ac.ir

منابع

اسلامی، ع. ۱۳۸۵. کرم‌شناسی دامپزشکی، جلد سوم، نماتودا و آکانتوسفالا، انتشارات دانشگاه تهران.

اسلامی، ع.، فیضی، ع. ۱۳۵۴. بررسی کرم‌های دستگاه گوارش بز در ایران. نامه دانشکده دامپزشکی. **۳۱ (۳، ٤)**، ۲۵ – ۳۴.

مشگی، ب.، اسلامی، ع.، همت زاده، ف. ۱۳۸۶. شناسایی پادگن‌های بدنی و دفعی ترشحی *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* توسط SDS-PSGE. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران. **۹(۲۲)**، ۷۷– ۸۰.

مشگی، ب.، اسلامی، ع. ۱۳۷۹. بررسی فیلاریوز سگ‌های گلهٔ اطراف تهران. مجلهٔ دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تهران. **۵۵(٤)**، ۵۳ – ۵۶.

Al Sherbiny, M.M., Abd-Al Farrag, M.M.K., Fayad Mohamed, H., Makled Mohamed, K., Tawfeek Gihan, M., Ali Nehad, M.S. 2004. Application and assessment of a dipstick assay in the diagnosis of hydatidosis and trichinosis. Parasitology Research. **93**, 87-95.

Al Sherbiny, M.M. 1996. Field applicable method for detection of antibodies to *schistosoma* species and genus specific antigens using dipstick. Journal of Egypt Society Zoology. **20**, 81-97.

Allan, J.C., Mencos, F., Garcia, J., Sarti, E., Flisser, A., Wang, Y., Liu, D., Craig, P.S. 1993. Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigen in humans. Parasitology. **107**, 79-85.

Amer, S., Dar, Y., Ichikawa, M., Fukuda, Y., Tada, C., Itagaki, T., Nakai, Y. 2010. Identification of Fasciola species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (NDI and COI) gene markers. Parasitology International. Oct 1. [Epub ahead of print]

Anuracpreeda, P., Wanichanon, C., Sobhon, P. 2008. *Paramphistomum cervi*: Antigenic profile of adults as recognized by infected cattle sera. Experimental Parasitology, **118**, 203-207.

Bandyopadhyay, S., Bera, A.K., Sikdar, S., De, S., Das, S., Rana, T., Pan, D., Bandyopadhyay, S., Bhattacharya, D. 2010. Intra-species variability in ITS-1 sequences of Haemonchus contortus isolated from goats in West Bengal, Indian Journal Helminthology. **31**, 1-6 .

Biava, M.F. Dao, A. and Fortier, B. 2001. Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease. World Journal Surgery, **25**, 10-14.

Deka, D.K., Gaur, S.N.S. 1990. Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of *Taenia hydatigena* cysticercosis in goats. Veterinary Parasitology, **37**, 223-228.

Densmore, L.D., Wright J.W., Brown, W.M. 1985. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (genus Cnemidophorus). Genetics. **110(4)**, 689-707.

Eslami, A., Fakhrzadegan, F. 1972. Les nematodes du tube digestif des bovines en Iran. Review Elev Veterinary Pays Tropical. **25**, 527-529.

Eslami, A., Nabavi, L. 1976. Species of gastrointestinal nematodes of sheep from Iran. Bulletin of the Exotic Pathology Society, **69**, 92-95.

Ezenwa, V.O., Hines, A.M., Archie, E.A., Hoberg, E.P., Asmundsson, I.M., Hogg, J.T. 2010. Muellerius capillaris dominates the lungworm community of bighorn sheep at the National Bison Range, Montana.Jounal of Wildlife diseases. 46(3), 988-93.

Ellis, T.M., Georgy, A., Turnor, R., Kalkhoven, M., Wroth, R.H. 1993. Detection of *Haemonchus contortus* surface antigen in faeces from infwected sheep. Veterinary Parasitology, **51**, 85-97.

Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Beveridge, I. 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. Nucleic Acids Research. 21, 2525-2526.

George, N.C., Lisa, M.S., Rudolph, J.B. 1989. Identification and preliminary characterization of cuticular surface proteins of *Haemonchus contortus*. Molecular and Biochemical Parasitology. **36**(3), 233-241.

Grillo, V., Jackson, F., Gilleard, J.S. 2006. Characterisation of Teladorsagia circumcincta microsatellites and their development as population genetic markers. Molecular and biochemical parasitology. **148**, 181-189.

Hodgkinson, J.E. 2006. Molecular diagnosis and equine parasitology. Veterinary Parasitology, **136**, 109-116.

Hoglund, J., Ljungstrom, B.L., Nilsson, O., Uggla, A. 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. Veterinary Parasitology, **61**, 151-156.

Hoste, H., Chilton. N. B., Gasser, R. B., Beveridge, I. 1995. Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). International Journal for Parasitology**. 25**, 75-80.

Ibarra, F., Montenegro, N., Vera, Y., Boulard, C., Quiroz, H., Flores, J. and Ochoa, P. 1998. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fascioliosis. Veterinary Parasitology, **77,** 229 – 236.

Iorio, R., Slapeta, J., Otranto, D., Paoletti, B., Giangaspero, A., Traversa, D. 2009. Phylogenetic relationships of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* (Spirurida: Habronematidae) within the order Spirurida inferred using mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene analysis. Parasitology Research. **104(5)**, 979-84.

Jalousian, F., Dalimi, A.H., Mirab Samiee, S., Ghaffarifar, F., Soleymanloo, F., Naghizadeh, R. 2007. Mutation in *pfmdr1* gene in Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* isolates in Southeast Iran. International Journal of Infectious Diseases. **12(6)**, 630-634.

Jalousian, F., Dalimi, A., Mirab Samiee, S., Ghaffarifar, F., Soleymanloo, F.,Naghizadeh, R. 2007.Application of Real-Time PCR for detection of *pfcrt* Single Nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum* in Southeast Iran. Journal of Medical Sciences. **7(7)**, 1082-1087.

Jithendran, K.P., Vaid, J., Krishna, L. 1996. Comparative evaluation of agar gel precipitation, counterimmunoelectrophoresis and passive haemaglutination tests for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep and goats. Veterinary Parasitology, **59(2)**, 97-106.

Kaur, K., Kapur, J., Parmar, A., Sood, M.L. 2002. Identification of immunodominant antigens of adult *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). Journal of Veterinary Medicine, **49 (5)**, 260-262.

McManus, D.P., Bowles, J. 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. International Journal of Parasitology. **26(7)**, 687-704.

Meshgi, B., Eslami, A., Shayan, P. 2007. Evaluation of Dot-ELISA for serodiagnosis of fasiolosis in naturally infected sheep. Journal of Applied Animal Research, **31**, 89-91.

Meshgi, B., Hosseini, S. H. 2007. Evaluation of different antigens in western blotting technique for the diagnosis of sheep haemonchosis. Iranian Journal of Parasitology, **2 (4)**, 12-16.

Meshgi, B., Eslami, A.,Halajian, M. 2009. Determination of diagnostic antigens in cattle amphistomiasis using western blotting. Iranian Journal of Parasitology, **4 (2)**, 32-37.

Mwambete, K.D., Ponce-Gordo, F., Cuesta-Bandera, C. 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosu*s. Acta Tropica. **91**, 87-93.

Newton, L.A., Chilton, N.B., Beveridge I., Hoste, H., Nansen, P., Gasser , R.B. 1998. Genetic markers for strongylid nematodes of livestock defined by PCR-based restriction analysis of spacer rDNA. Acta Tropica. **69(1)**, 1-15.

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. Trend of Parasitology. **19**, 12-15.

Pappas, M.G. 1986. Rapid serodiagnosis of parasitic infections by Dot-ELISA using dipsticks. Transection Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene. **80**, 1006.

Pathak, K.M.L., Kumar, D., Gaur, S.N.S. 1986. Immunodiagnosis of fascioliasis by counterimmunoelectrophoresis in sheep. Indian Journal of Veterinary Medicine. **6**, 38-40.

Pena, S. D. J., Barreto, G., Vago, A. R., De Marco, L., Reinach, F. C., Dias Neto, E. Simpson, A. J. G. 1994. Sequence-specific 'gene signatures' can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. Proceeding of the National Academy of Sciences USA. **91**, 1946–1949.

Proudman, C.J., Trees, A.J. 1996. Use of excretory secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodiasis. Veterinary Parasitology, **61**, 239-247.

Rathor, V.S., Sengar, Y.S. 2005. Diagnostic Parasitology. Aavishkar Publishers, Distributors.

Rogan, M.T., Craig, P.S., Zeyhle, E. 1991. Evaluation a rapid of Dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. Transection of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene. **85**, 773-777.

Romia, S.A., Youssef, M.E., Handoussa, A.E. 1992. Dot-ELISA as a diagnostic test in hydatid disease. Journal of Egypt Society of Parasitology. **22**, 603-610.

Salimi-Bejestani, M.R. 2004. Epidemiology and immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. PhD thesis, The University of Liverpool, Liverpool, UK.

Salimi-Bejestani, M.R., Daniel, R., Cripps, P., Felstead, S., Williams, D.J.L. 2007. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. Veterinary Parasitology, **149**, 290 – 293.

Salimi-Bejestani, M.R., McGarry, J.W., Felstead, S., Ortiz, P., Akca, A., Williams, D.J.L. 2005. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. Research in Veterinary Science, **78**, 177 – 181.

Simsek, S., Koroglu, E., McManus, D.P. 2008. Molecular genetic charaterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. Acta Tropica. 107, 192-194.

Sim, K.A., Hoar, B., Kutz, S.J., Chilton, N.B. 2010. Amplification of the second internal transcribed spacer ribosomal DNA of individual trichostrongylid nematodes larvae by nested polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. **22(3)**, 433-7 .

Swarup, D., Pachauri, S.P., Sharma, B., Bandhopadhyay, S.K. 1987. Serodiagnosis of Fasciola gigantic infection in buffaloes. Veterinary Parasitology. **24**, 67-74.

Traversa, A., Giangaspero, A., Iorio, R., Otranto, D., Paoletti, B., Gasser, R.B. 2004. Semi-nested PCR for the specific detection of *Habronema microstoma* or *Habronema muscae* DNA in horse faeces. Parasitology, **126(6)**, 733-739.

Van Dijk, K., Starink, M.V., Bart, A., Nijhuis, E.W., van der Wa, A.C., van Thiel, P.P., de Vries, H.J., van Gool, T. 2010. The potential of molecular diagnosis of cutaneous ectopic schistosomiasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **83(4)**, 958-9.

Van Etten, L., Floman, C.C., Eggelte, T.A., Kremsner, P.G., Deelder, A.M. 1994. Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip. Journal of Clinical Microbiology. **32**, 2404-2406.

Velusamy, R., SINGH, B.P., Sharma, R.L., Chandra, D. 2004. Detection of circulating 54 kDa antigen in sera of bovine calves experimentally infected with *F. gigantioca*. Vetrinary Parasitology. **119**, 187-195.

Vezzani, D., Mesplet, M., Eiras, D.F., Fontanarrosa, M.F., Schnittger, L. 2010. PCR detection of Dirofilaria immitis in Aedes aegypti and Culex pipiens from urban temperate Argentina. Parasitology Research. Nov 12. [Epub ahead of print]

Wedrychowicz, H., Ducommun, D., Klockiewicz, M., Pfister, K. 1996. Surface and ES antigens of adult *Dicrocoelium dendriticum* inducing bile antibody responses in naturally infected cattle, Acta Parasitology, **41(3)**, 139-144.