مقایسه دو روش نات اصلاح شده (Modified Knott test) و سرم‌شناسی (ELISA antigen test) در تشخیص *دیروفیلاریا ایمیتیس*

حسینی، س.ح. [۱*]، ملماسی، ع. [۲]، آرامون، م. [۳].

دریافت: ۱۳۸۹/۷/۱۹ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۸

خلاصه:

دیروفیلاریا ایمیتیس (*Dirofilaria immitis*) عامل بیماری فیلاریوز قلبی عروقی در سگ و انسان است. این بیماری انتشار جهانی دارد ولی آلودگی در نواحی معتدل، گرمسیری و نیمه گرمسیری به صورت بومی دیده می‌شود. آلودگی به کرم قلب را می‌توان با آزمایش خون و نشان دادن میکروفیلرهای در گردش و یا پادگن‌های کرم بالغ تشخیص داد. به منظور ارزیابی کارایی روش‌های متداول در تشخیص دیروفیلاریوز، در این مطالعه وضعیت آلودگی ۳۵۰ قلاده سگ به *دیروفیلاریا ایمیتیس* در نواحی مورد مطالعه با دو روش سرم‌شناسی و نات اصلاح شده مورد آزمایش قرار گرفت. از مجموع ۳۵۰ نمونه، ۵۲ (۱۴/۸درصد) نمونه در روش الیزا و تعداد ۴۲ (۱۲درصد) نمونه در روش نات مثبت بودند. تعداد ۱۲ نمونه در روش سرم‌شناسی مثبت ولی در روش اصلاح‌شده نات منفی بودند، درحالی‌که در دو نمونه مثبت با روش نات، در روش سرولوژی واکنشی مشاهده نشد. در بررسی آماری درجهٔ همخوانی تشخیص دو روش در موارد مثبت و منفی با استفاده از ضریب کاپا (kappa) ۸۳/. به دست آمد (P=/0005) ، که نشان‌دهنده همبستگی خوب دو روش است.

واژه‌های کلیدی: *دیروفیلاریا ایمیتیس*، تشخیص، روش اصلاح یافته نات، روش الیزا

۱.گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق پستی ۶۴۵۳ - ۱۴۱۵۵، تهران، ایران.
۲.گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق پستی ۶۴۵۳ - ۱۴۱۵۵، تهران، ایران.
۳.دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران. ایران.
*نویسنده مسؤول: hhoseini@ut.ac.ir

مقدمه:

آلودگی گوشتخواران، بویژه سگ، به *دیروفیلاریا ایمیتیس* دارای انتشار جهانی است و بر اساس گزارش‌های موجود دامنهٔ انتشار جغرافیایی انگل در حال گسترش است (Genchi و همکاران، ۲۰۰۵ و ۲۰۰۹؛ Simon و Ghenchi 2000). سابقهٔ گزارش اولین مورد آلودگی در ایران به حدود ۴۰ سال پیش بر می گردد و مربوط به یک قلاده سگی است که از آمریکا وارد ایران شده است (Sanjar و همکاران، ۱۹۶۹). در مطالعات بعدی آلودگی از بسیاری از مناطق دیگر گزارش گردید و دامنهٔ آلودگی از حداقل ۱/۱۴ درصد در استان تهران تا ۵۱/۴ درصد در استان گیلان متفاوت بود (بکایی و همکاران، ۱۳۷۷؛ حسینی و همکاران، ۱۳۸۹؛ جمالی و هاشم زاده، ۱۳۷۵؛ راضی جلالی، ۱۳۸۸؛ رزمی، ۱۳۷۸؛ رنجبر بهادری و اسلامی، ۱۳۸۶؛ رنجبر بهادری و همکاران، ۱۳۸۴؛ مشگی ۱۳۸۰؛ مشگی و اسلامی ۱۳۷۹؛ مشگی و همکاران، ۱۳۸۱؛ موبدی و همکاران، ۱۳۶۹؛ Jafari و همکاران، ۱۹۹۶؛ Rnjbar- Bahadori وEslami، ۲۰۰۷، Hekmatkhah و Ranjbar- 2007 Bahadori). دیروفیلاریوز بعنوان یک بیماری مشترک مطرح است و میزان موارد آلودگی انسانی به آن نیز در دنیا رو به افزایش است. آلودگی انسان به گونه‌های *دیروفیلاریا* در ایران به صورت موردی گزارش شده است (صلاحی مقدم و همکاران، ۱۳۷۹؛ Jamshidi و همکاران ۲۰۰۸؛ Ashrafi و همکاران، ۲۰۰۹؛ Siavashi و Masoud 1995).

باتوجه به اطلاعات موجود، ایران یکی از مناطق آندمیک آلودگی در جهان است (حسینی و همکاران، ۱۳۸۹). روش تشخیص کرم قلب بر اساس مشاهدهٔ میکروفیلر در نمونه‌های خون، روش‌های سرم‌شناسی، مولکولی، تصویربرداری و الکتروکاردیوگرافی است (اسلامی، ۱۳۸۵، Ettinjer و Feldman ،۲۰۰۵ McCal و همکاران، ۲۰۰۸). یکی از راه‌های متداول در تشخیص آلودگی، آزمایش نمونه‌های خون برای نشان دادن میکروفیلر است. این آزمایش‌ها، به صورت تهیهٔ گسترش مستقیم از خون، تهیهٔ گسترش ضخیم، صاف کردن خون از غشاهای صافی، استفاده از لوله میکروهماتوکریت (مشاهده بافی کوت) و روش اصلاح شدهٔ نات انجام می-گیرد. از میان روش‌های یاد شده، روش اصلاح شدهٔ نات از روش‌های مناسب انگل‌شناسی برای جستجوی میکروفیلر *دیروفیلاریا* در خون است؛ زیرا با تغلیظ میکروفیلر می‌توان حتی تعداد کم آنها را جستجو کرد و گونه‌های آنها را از هم تشخیص داد. برای شناسایی این میکروفیلر و تشخیص تفریقی آن از سایر میکروفیلرها، باید مشخصات دقیق ریخت شناسی نوزاد را به دست آورد (جدول ۱). تشخیص تفریقی نوزادها مهم است، زیرا اگر میکروفیلر مربوط به *آکانتوکیلونما رکوندیتوم* (*دیروفیلاریا* رکوندیتوم) باشد، به درمان گران‌قیمت مبتلایان نیاز نیست (Ettinjer و Feldman ، ۲۰۰۵).

نام گونه	طول(μ)	عرض(μ)	مشخصات
دیروفیلاریا ایمیتیس	۳۳۰-۲۹۰	۷- ۵	بدون غلاف، انتهای قدامی تیز، دم مستقیم در انتها تیز است.
دیروفیلاریا رپنس	۳۶۰-۳۰۰	۸-۶	بدون غلاف، انتهای قدامی گرد دم تیز و نخ مانند، غالباً انتهای آن مانند دسته چتر خمیده است.
آکانتوکیلونما رکوندیتوم	۱۸۳-۲۶۰	۴	بدون غلاف انتهای قدامی گرد انتهای دم قلاب مانند و خمیده است.

جدول ۱: مقایسه مشخصات ریخت‌شناسی گونه‌های *دیروفیلاریا* در سگ (Ettinjer و Feldman، ۲۰۰۵)

در حال حاضر آزمایش های خون برای ردیابی پادگن‌های در گردش بر مبنای روش های الایزا و ایمونوکروماتوگرافی به عنوان آزمون‌هایی اختصاصی که با سایر گونه‌ها (*دیروفیلاریا رپنس* و *آکانتوکیلونما رکوندیتوم*) واکنش متقاطع ندارد مورد توجه قرار گرفته است و به طور منظم برای غربالگری و همچنین در سگ‌هایی که مشکوک به عفونت کرم قلب هستند استفاده می‌شوند (Nelson و همکاران، ۲۰۰۵؛ Longhofer و همکاران، ۲۰۰۵؛ Ellen 1998). این روش های تشخیصی به علت حساسیت و ویژگی‌های بالا و انجام آسان رایج شده‌اند (Ettinjer و Feldman، ۲۰۰۵؛ McCal و همکاران، ۲۰۰۸).

روش های مولکولی نیز ابزار حساس و دقیقی برای تفریق میکروفیلر *دیروفیلاریا ایمیتیس* در سگ های آلوده است. این روش ها بیشتر در مواردی که آلودگی مختلط وجود دارد و یا مواردی که میکروفیلرها از نظر ریخت‌شناسی غیر طبیعی باشند توصیه می‌شود. همچنین PCR روش مناسبی برای ردیابی عفونت در بدن پشه‌های ناقل آلودگی است (Casiraghi و همکاران، ۲۰۰۶؛ Mar و همکاران، ۲۰۰۲؛ Sang-Eun و همکاران، ۲۰۰۷؛ Watts و همکاران، ۱۹۹۹).

رادیوگرافی قفسهٔ سینه نیز روش مناسبی برای نشان دادن ناهنجاری‌های ریوی قلبی از جمله بزرگ شدن شریان ریوی و بزرگ شدن بطن راست است. اکو کاردیوگرافی و الکترو کاردیوگرافی نیز برای تشخیص بیماری کرم قلب مورد استفاده قرار گرفته است. (اسلامی، ۱۳۸۶؛ Ettinjer و Feldman، ۲۰۰۵؛ McCal و همکاران، ۲۰۰۸).

در مناطقی که آلودگی به صورت بومی وجود دارد سگ ها باید به صورت سالیانه آزمایش شوند. در ایران معمولاً تشخیص دیروفیلاریوزیس به جز در بررسی‌های تحقیقاتی، مورد توجه دامپزشکان نمی‌باشد. باتوجه به اهمیت دیروفیلاریوز در برخی از مناطق کشور، بررسی و معرفی روش های تشخیص انگل ضروری است. در این مطالعه نتایج دو روش نات و سرولوژی در تشخیص آلودگی سگ‌ها به کرم قلب ارزیابی شده است.

مواد و روش کار

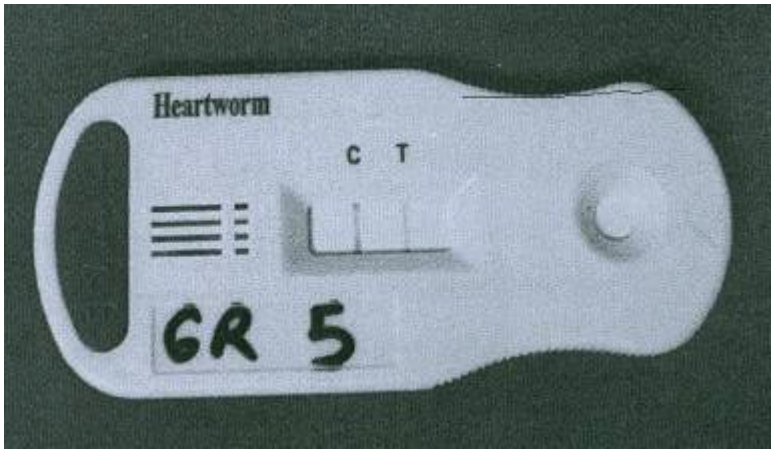
نمونه‌گیری

بدین منظور تعداد ۳۵۰ نمونه خون از سگ‌های گله و خانگی از استان تهران (۱۵۰نمونه) و استان‌های شمالی کشور (گیلان ۷۰ نمونه و گلستان و مازندران هرکدام ۶۵ نمونه) اخذ گردید. برای خون‌گیری بعد از مقید نمودن حیوان، دست حیوان را بلند و کشیده نگه داشته، سپس تورنیکت در بالای آرنج بسته شد. محل مورد نظر با الکل ضد عفونی شد و با استفاده از ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد خون‌گیری به عمل آمد. در مواردی از آسه پرومازین به عنوان آرام بخش به میزان ۲/. میلی-گرم به کیلوگرم به صورت تزریق عضلانی استفاده شد. نمونه‌های گرفته شده در کنار یخ به آزمایشگاه انگل - شناسی ارسال گردید.

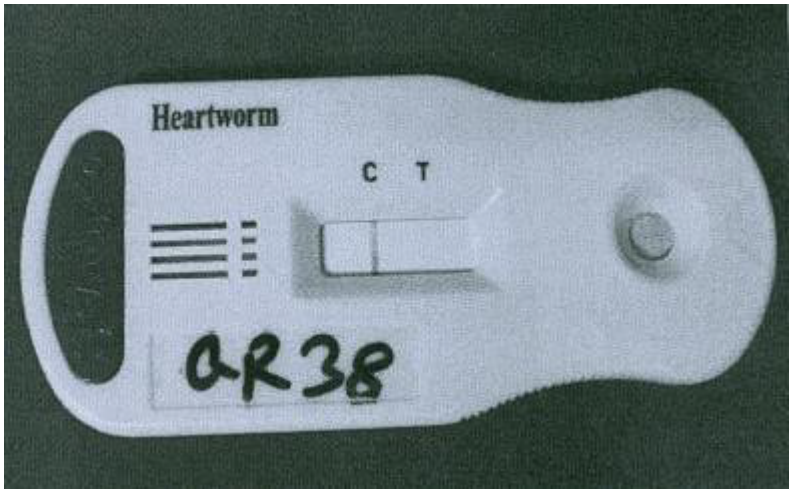
سرم شناسی

به منظور بررسی حضور پادگن انگل از کیت پادگنی تشخیص سریع *دیروفیلاریا ایمیتیس* (RAPID Canine *D. immitis* AG test) ساخت شرکت آنیژن (Anigen company) استفاده شد. جهت آزمایش نمونه به وسیله یک پی‌پت پاستور یک قطره از خون سیتراته، در گودی تعبیه شده ریخته شد و به آن ۴ قطره از مایع رقیق‌کننده اضافه گشت و بمدت ۵ تا ۱۰ دقیقه بی‌حرکت نگه داشته شد. روی کیت دو نقطه C (کنترل) به منظور ارزیابی سالم بودن کیت و T (تست) به منظور بررسی نمونه آزمایش قرار داشت. در صورتی که در مقابل حرف C خط ارغوانی تشکیل می‌شد و در مقابل حرف T خطی تشکیل نمی‌گردید، کیت سالم بوده و نمونه از نظر وجود پادگن *دیروفیلاریا ایمیتیس* منفی و در صورتی که جلوی هر دو حرف خط ارغوانی تشکیل می-گردید نمونه مثبت بوده است (تصویر ۱).

الف .نمونه مثبت



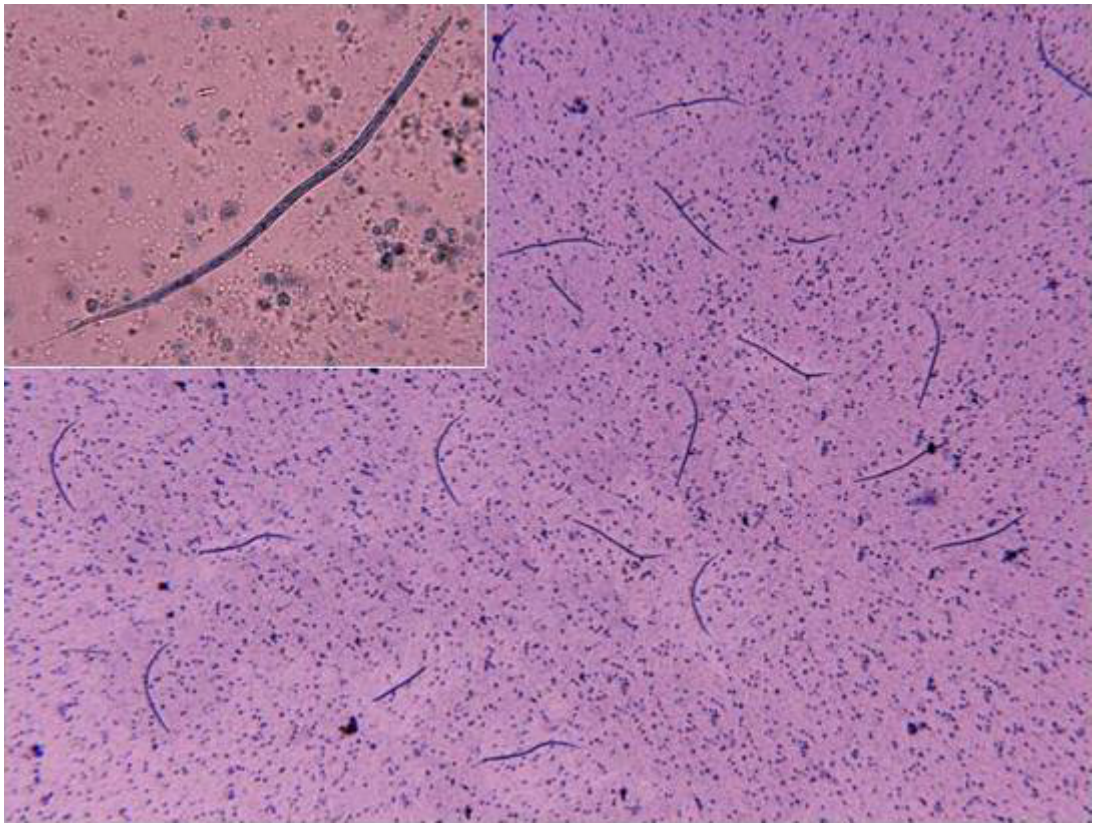
ب. نمونه منفی



تصویر ۱- کیت ایمونوکرامانوگرافی. الف) نمونه مثبت؛ ب) نمونه منفی

انگل شناسی

یک میلی لیتر از خون دارای مادهٔ ضد انعقاد را به لوله سانتریوفوژ ریخته و ۹ سانتی‌متر مکعب فرمالین ۲ درصد به آن اضافه شد. بعد از مخلوط کردن کامل نمونه، بمدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور سانتریوفوژ گردید. محلول بالای لوله به آرامی خالی شد. به رسوب، یک تا دو قطره بلودومتیلن اضافه شد و با یک پی‌پت آن را به روی لام منتقل کرده، در زیر میکروسکوپ برای مشاهده میکروفیلر مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس شاخص‌های ریخت-شناسی میکروفیلرها از هم تفریق گردیدند.



تصویر ۲: نمونه خون آلوده به میکروفیلر *دیروفیلاریا ایمیتیس* (روش اصلاح شده نات)

درجهٔ همخوانی دو روش در تشخیص موارد مثبت ومنفی با استفاده ار ضریب کاپا (kappa) محاسبه گردید.

نتایج

در این بررسی تعداد ۳۵۰ نمونه خون با هر دو روش سرولوژی و نات اصلاح شده بررسی شده است. مقایسهٔ نتایج دو روش در جدول ۲ نشان داده شد. همانطور که در جدول نشان داده شده است، از مجموع تعداد ۳۵۰ نمونه، ۵۲ (۱۴/۸درصد) نمونه در روش الیزا و تعداد ۴۲ (۱۲درصد) نمونه در روش نات مثبت تشخیص داده شد. تعداد ۱۲ نمونه که در روش سرم‌شناسی مثبت بودند در روش اصلاح شده نات منفی بود، درحالی که در مورد ۲ نمونه مثبت در روش اصلاح شده نات ، در روش سرولوژی واکنشی مشاهده نشد. در مجموع ۷۴/۱ درصد موارد آلوده توسط هر دو روش قابل تشخیص هستند.

درجهٔ همخوانی تشخیص دو روش در موارد مثبت و منفی با استفاده از ضریب کاپا (kappa) ۸۳/. به دست آمد (P=/0005) . در بررسی نمونه‌ها با روش نات اصلاح شده در ۱۶ نمونه (۴/۸درصد) میکروفیلر *دیپتالونما رکوندیتوم (آکانتوکیلونما رکوندیتوم)* مشاهده شد.

مناطق نمونه برداری	تعداد نمونه های مورد آزمایش	تعداد نمونه‌های آلوده	تعداد نمونه های آلوده (درصد)					
			Ag+	Mic+	Ag+	Mic-	Ag-	Mic+
تهران	۱۵۰	۳	-		۳ (٪۱۰۰)		-	
گیلان	۷۰	۳۶	۳۰ (٪ ۸۳/۳۳)		۶ (٪۱۶/۶۶)		-	
مازندران	۶۵	۵	۴ (٪۸۰)		-		۱ (٪۲۰)	
گلستان	۶۵	۱۰	۶(٪۶۰)		۳ (٪۳۰)		۱ (٪۱۰)	
جمع کل	۳۵۰	۵۴	۴۰ (٪۷۴/۱)		۱۲ (٪۲۲/۲)		۲ (٪۳/۷)	

جدول ۲: مقایسه نتایج روش سرولوژی و نات اصلاح شده در تشخیص *دیروفیلاریا ایمیتیس* (Ag: آنتی ژن، Mic: میکروفیلر، + : مثبت، - : منفی)

بحث

بر اساس اطلاعات موجود، آلودگی به *دیروفیلاریا* در نواحی اندمیک در حال گسترش است. ایران یکی از مناطق آندمیک آلودگی در جهان است. (حسینی و همکاران، ۱۳۸۹). از طرف دیگر *دیروفیلاریا ایمیتیس* انگل مشترک بین انسان و حیوان است. باتوجه به اهمیت این انگل، باید در نواحی‌ای که آلودگی شدید است آزمایش سالیانه سگ‌ها به اجرا درآید و برای تشخیص، درمان و کنترل آلودگی برنامه‌ریزی لازم صورت گیرد (Ettinjer و Feldman ۲۰۰۵؛ McCal و همکاران، ۲۰۰۸؛ Simon و Ghenchi 2000). در این بررسی نتایج دو روش نات و سرم‌شناسی در تشخیص آلودگی سگ‌ها به کرم قلب ارزیابی شده است. مقایسهٔ نتایج تشخیص آلودگی در دو روش نشان می‌دهد که از مجموع تعداد ۳۵۰ نمونه، ۵۲ نمونه در روش الیزا و تعداد ۴۲ نمونه در روش نات مثبت تشخیص داده شد. تعداد ۱۲ نمونه که در روش سرولوژی مثبت تشخیص داده شد، در روش نات منفی بودند. اگرچه مشاهده میکروفیلر در آزمایش خون از نظر ویژگی تا ۱۰۰ درصد ارزش تشخیصی دارد ولی در مواقعی که تعداد میکروفیلر خون کم باشد و یا مقدار خون آزمایش شده کافی نباشد و یا مواردی که آلودگی مخفی وجود دارد (کرم‌های موجود از یک جنس باشند) امکان مشاهده میکروفیلر در خون، ضعیف یا غیر ممکن است. همچنین ممکن است به علت سن کرم‌ها در دورهٔ پیش‌آشکاری و یا کرم‌های ماده مسن که باروری آنها کاهش یافته است و یا به دلیل پاسخ‌های ایمنی میزبان علیه کرمها، نتایج آزمایش منفی باشد. از عوامل دیگری که می توانند حضور میکروفیلر را در خون تحت تأثیر قرار دهند، تجویز داروهای میکروفیلر کش (ماکروسیکلیک لاکتونز) است. بنابراین حساسیت این تست برای نشان دادن موارد منفی کافی نیست. همچنین تعداد میکروفیلرهای موجود در خون محیطی رابطه مستقیمی با تعداد کرم بالغ ندارد و معمولاً در سگ‌هایی که میکروفیلر زیاد دیده می‌شود به تعداد کمی کرم آلوده هستند. بنابراین تعداد میکروفیلر نشان‌دهندهٔ شدت عفونت نمی باشد (McCal و همکاران، ۲۰۰۸؛ Ettinjer و Feldman، ۲۰۰۵). در این بررسی تعداد ۲ نمونه خون

که از نظر وجود میکروفیلر *دیروفیلاریا ایمیتیس در روش نات* مثبت تشخیص داده شد، در روش سرولوژی منفی بودند. بر اساس اعلام شرکت سازندهٔ کیت (Anigen Co) میزان حساسیت این کیت ۹۶ درصد و میزان ویژگی آن ۱۰۰ درصد محاسبه شده است. درجهٔ همخوانی دو روش در موارد مثبت و منفی ۸۳/. بود که از نظر آماری ضریب خوبی برای روش اصلاح شده نات است (P=/0005). روش‌های سرم‌شناسی به دلیل حساسیت و ویژگی بالا، باارزشتر از روش‌های انگل‌شناسی هستند. باتوجه به ویژگی بالای روش‌های سرم‌شناسی در تشخیص *دیروفیلاریا ایمیتیس*، با سایر فیلرها واکنش متقاطع دیده نمی‌شود. در این بررسی نیز تمام نمونه‌هایی که در روش نات به *آکانتو کیلونما رکوندیتوم* آلوده بودند، با روش سرولوژی منفی تشخیص داده شده‌اند. با این وجود این کیت‌ها تنها می توانند پادگن‌های کرم ماده‌ای که بالاتر از ۶ ماه سن دارند را ردیابی کند (Courtney و Zeng، 2001؛ Ellen ۱۹۹۸؛ Ettinjer و Feldman، ۲۰۰۵؛ Longhhofe و همکاران، ۲۰۰۵؛ Nelson و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین در آلودگی‌هایی که تعداد کرم ماده کمتر از ۴ عدد باشد با وجود حضور کرم، نتیجه آزمون سرمی ممکن است منفی باشد. در مطالعه‌ای که اخیراً بر روی حساسیت و اختصاصی بودن ۳ کیت تجاری الایزا در تشخیص پادگن‌های کرم قلب در سگ های آلوده به کمتر از ۴ عدد کرم قلب انجام شده است، حساسیت این تست‌ها حدود ۷۹ درصد و ویژگی آنها ۹۷ درصد تعیین شده است. حساسیت این تست‌ها بر اساس تعداد کرم ماده بالغ متغیر است بطوری که حساسیت در سگ هایی که به یک، دو، سه و یا چهار عدد کرم قلب ماده آلوده بودند به ترتیب ۶۴ درصد، ۸۵ درصد، ۸۸ درصد و ۸۹ درصد است (Ettinjer و Feldman، ۲۰۰۵). اگر کرم بالغ در بدن میزبان از بین برود، میکروفیلرها در حدود ۱- ۳ سال در گردش خون باقی خواهند ماند و در این مدت علی‌رغم مثبت بودن آلودگی در روش نات، نتیجه بررسی سرمی منفی می‌شود (Ettinjer و Feldman، ۲۰۰۵؛ McCal و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین علی‌رغم حساسیت بالای این تست‌ها، موارد منفی کاذب در دورهٔ پیش-آشکاری، آلودگی کم به کرم ماده و یا زمانی که تنها آلودگی به کرم نر وجود دارد، دیده می شود. روش الیزا به عنوان یک روش کمّی بر اساس میزان غلظت پادگن و شدت واکنش می‌تواند، تعداد کرم بالغ را پیش بینی کند (McCal و همکاران، ۲۰۰۸). این کاربرد روش سرم‌شناسی از اهمیت زیادی برخوردار است. غلظت کم پادگن و واکنش ضعیف معمولاً نشان‌دهندهٔ بار کرمی کم است، با این وجود غلظت‌های بالای پادگنی ممکن است مربوط به زمانی باشد که تمام کرم یا غالب آنها مرده باشند. روش الیزا همچنین اثربخشی داروها علیه کرم بالغ را تعیین می‌کند. معمولاً ۸ تا ۱۲ هفته بعد از درمان موفقیت‌آمیز کرم بالغ، پادگن توسط روش الیزا قابل جستجو نمی‌باشد، بنابراین مثبت بودن الیزا ۱۲ هفته بعد از درمان، نشان‌دهندهٔ وجود عفونت است. با این وجود آزمایش پادگن ممکن است برای دوره طولانی‌تر مثبت باشد و نمی تواند عدم موفقیت درمانی محسوب شود، مگر آن که آزمایش ۶ ماه بعد از درمان همچنان مثبت باشد (Ettinjer وFeldman ، ۲۰۰۵؛ McCal و همکاران، ۲۰۰۸). هیچکدام از روش‌های ذکر شده به طور قطعی نمی توانند آلودگی به کرم قلب را تأیید یا رد کنند. به همین دلیل در حال حاضر استفاده همزمان روش سرم-شناسی و روش اصلاح شده نات توصیه می‌شود (Ettinjer و Feldman ۲۰۰۵).

روش تغییر یافتهٔ نات روش ارزان و نسبتاً سریع است و با استفاده از این روش می‌توان میکروفیلر *دیروفیلاریا ایمیتیس* را از سایر میکروفیلرها تفکیک نمود. اجرای این روش نیاز به امکانات و تجهیزات پیشرفته ندارد. افزون بر آن حتی سگ‌هایی که از نظر پادگنی مثبت هستند، برای تعیین وضعیت حضور میکروفیلر باید با روش اصلاح شده نات آزمایش شوند. به همین دلیل روش اصلاح شدهٔ نات همچنان به عنوان یک روش تشخیصی مناسب مورد استفاده قرار می گیرد.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 2 (2010) 87-96

Comparison of two diagnostic methods for *Dirofilaria immitis*: modified Knott test and ELISA

Hosseini, S.H. [1]*, Malmasi, A. [2], Aramon, M.[3].

Received:11.10.2010 Accepted: 29.12.2010

Abstract:

Heartworm disease caused by *Dirofilaria immitis*, affect canine and human population. Distribution of the diseases is worldwide, however endemic in temperate, tropical and sub tropical zones. Adult heartworm infection can be diagnosed with blood tests that detect circulating microfilariae or adult antigens. To evaluate the efficacy of common diagnostic tests of Dirofilariosis, in this study the rate of infection to *Dirofilaria immitis* were evaluated In 350 dogs in studied area, using a commercial ELISA kit (Anigen co.) for detecting circulating antigen and modified Knott test for detecting microfilariae.

Out of 350 blood samples, 52 (14.8%) samples with ELISA kit and 42(12%) samples with modified Knott tests were positive. In this study, 12 samples were positive when ELISA applied but they were negative with Knott test, while 2 positive samples in Knott test had not reaction in other test. In statistical analysis, the Kappa value between these two test were calculated as 0.83 (p=0.0005) showing good consistency of these two tests.

Key words: *Dirofilaria immitis,* diagnosis, modified Knott test, ELISA antigen test

1. Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Graduated student. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding author: hhoseini@ut.ac.ir

منابع

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

بکایی، س.؛ موبدی، ا.؛ محبعلی، م.؛ حسینی، ح.؛ ندیم، آ. ۱۳۷۷. بررسی شیوع دیروفیلاریوزیس در شهرستان مشکین‌شهر، شمال غرب کشور. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران **۵۳ (۱ و ۲)**، ۲۳ – ۲۷.

حسینی، س.ح.؛ مشگی، ب.؛ ملماسی، ع.؛ آرامون، م. ۱۳۸۹. دیروفیلاریوزیز در ایران و چشم انداز آن. هفدمین کنگره دامپزشکی ایران. ۶۱ – ۶۴.

جمالی، ر.؛ هاشم‌زاده، ف. ۱۳۷۵. بررسی آلودگی سگ‌های ولگرد شهر تبریز به *دیروفیلاریا ایمیتیس*، سومین کنگره ملی بیماری-های قابل انتقال بین انسان و حیوان، مشهد، ۱۷۹ (انتشارات سازمان دامپزشکی کشور).

راضی جلالی، م.ح. ۱۳۸۸. بررسی میزان شیوع دیروفیلاریوزیس در سگ‌های روستایی شهرستان اهواز. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه اهواز. **۵(۲)**، ۸۱ – ۸۸.

رزمی، غ.ر. ۱۳۷۸. بررسی وضعیت آلودگی شهرستان مشهد به انواع فیلرها. مجله دانشکده دامپزشکی تهران . **٥٤(۱)**، ۵ – ۷.

رنجبر بهادری، ش.؛ اسلامی، ع. ۱۳۸۶. میزان شیوع فیلرهای خونی در سگ‌های استان گلستان با استفاده از روش نات اصلاح شده و تعیین تناوب داری آن. مجله تحقیقات دامپزشکی، **٦٢(۱)**، ۱۱ – ۱۴.

رنجبر بهادری، ش.؛ محتشم، ر.؛ اسلامی، ع.؛ مشکی، ب. ۱۳۸۴ .بررسی فیلرهای خونی در شهرستان تنکابن. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهرن، **٦٠(٤)**، ۳۵۳ – ۳۵۷.

صلاحی مقدم، ع.؛ موبدی، ا.؛ بنی‌هاشمی، س.ج. ۱۳۷۹. گزارش یک مورد *دیروفیلاریا در* هیدروسل کودک پنج ساله، سومین کنگره سراسری انگل‌شناسی پزشکی ایران، ساری. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران، ۳۱۹.

مشکی، ب. ۱۳۸۰. اپیدمیولوژی دیروفیلاریوز ناشی از *دیروفیلاریا ایمیتیس* در سگ‌های تبریز. پایان‌نامه شماره ۱۲۳. دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

مشکی، ب.؛ اسلامی، ع.؛ اشرفی هلان، ج. ۱۳۸۱. بررسی اپیدمیولوژی آلودگی به فیلرهای خونی در سگ های شهری و روستایی تبریز. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. **٥٧(٤)**، ۵۹-۶۳.

مشکی، ب.؛ اسلامی، ع. ۱۳۷۹. بررسی فیلاریوز سگ‌های گله اطراف تهران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران **٥٥ (٤)**، ۵۳ – ۵۶.

موبدی، ا.؛ جوادیان، ع.؛ عبایی، م.ر. ۱۳۶۹. معرفی کانون زئونوز کرم قلب سگ در منطقه مشکین شهر. اولین کنگره سراسری بیماری‌های انگلی در ایران، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی گیلان. ۷۸ .

Ashrafi, J., Golchani , S., Granmayeh, H. 2009. Human Subcutaneous Dirofilariasis due to *Dirofilaria repens*: Clinically Suspected as Cutaneous Fascioliasis. Iranian Journal of Public Health, **39 (1),** 105-109

Casiraghi, M., Mazzocchi, C., Mortarino, M., Ottina, E., Genchi, C. 2006. A simple molecular method for discrimination common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). Veterinary Parasitology, **141,** 368–372.

Courtney, C.H., Zeng, Q.Y. 2001. Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis. Veterinary Parasitology. **94(3),**199-204.

Ellen, W.H. 1998. Your diagnostic protocol for *Dirofilaria immitis* infection in dogs. Veterinary Medicine. **83(4),** 328-345.

Ettinger, S.J., Feldman, E.C. 2005. Text book of Veterinary Internal Medicine, 6th Edn., Vol. 1, 2, W. B. Saunders Co, USA.

Genchi, C. Rinaldi, L. cascone, C. Mortarino, M., Cringoli, G. 2005. Is heartworm disease really spreading in Europe. Veterinary Parasitology, **133**, 137-148.

Genchi, C. Rinaldi , L. Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli , G. 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe .Veterinary Parasitology, **163**, 286-292.

Jafari, S., Gaur, N.S., Khaksar, Z. 1996. Prevalence of *Dirofilaria immitis* on dog of Fars province of Iran. Journal of Applied Animal Research**. 9(1),** 27-31.

Jamshidi, A., Jamshidi, M., Mobedi, I. 2008. Periocular Dirofilariasis in a Young Woman: A Case Report. Korean Journal of Parasitology. **46(4),** 265–267.

Longhofer, S.L., Guerrero, J., Robertson-Plough, C., Paul, A. 2005. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis)* infection in dogs. Veterinary Parasitology. **133**, 255–266.

Mar, P.H.,Yang, I.C., Chang, G.N., Fei, A.C. 2002. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2).Veterinary Parasitology **106**, 243-252.

McCal, J.W., Genchi, C., Kramer, H.L., Guerreor, J., Venco, L. 2008. Heartworm Diseases in Animals and Humans. Advances in Parasitology**. 66(4),** 223 – 227.

Nelson, C.T., McCall, J.W., Rubin, S.B., Buzhardt, L.F., Doiron, D.W., Graham, W., Longhofer, S.L., Guerrero, J., Robertson-Plough, C., Paul, A. 2005. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. Veterinary Parasitolgy. **133**, 255–266.

Ranjbar Bahadori, Sh., Eslami, A. 2007. Prevalence of blood filaria in dogs in Golestan province (North of Iran) Using Modified Knott Method and determination of its periodicity. Journal of Veterinary Research**. 62(1),** 11-14.

Ranjbar-Bahadori, Sh., Hekmatkhah, A. (2007). A study on filariosis of stray dogs in Garmsar. Journal of Veterinary Research. **62(4),** 73-76.

Sanjar, M., Niak, A., Khatibi, S. (1969). Dirofilariosis in the dog in Iran. Veterinary Research, 204.

Sang-Eun, I., Heung-Chul, K., Sung-Tae, C., Terry, A.K., Won-Ja, L. 2007. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in republic. KoreanVeterinary Parasitology **148**, 149-155.

Simon ,F., Gnchi, C .2000. Dirofilariosis and other zoonotic filariosis: An emerging public health in development countries. Research Review Parasitology. 60 -61

Siavashi, M.R., Masoud, J. 1995. Human coetaneous dirofilariasis in Iran: A report of two cases. Iranian Journal of Medical Science, **20,** 85-86.

Watts, K.J., Courtney, C.H., Reddy, G.R. 1999. Development of a PCR-and probe-based test for the sensitive and specific detection of the dog Heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. Molecular and Cellular Probes, **13**, 425 - 430.