# ارزیابی روش کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های پیکری گردشی *فاسیولا ژیگانتیکا* در سرم گاو

وجیهه خدادادیان[1*]، امین حسنوند[2]، محمدحسین راضی جلالی[3]، مسعود قربانپور نجف آبادی[4]

(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱ )

## چکیده

**تشخیص سرولوژیک فاسیولوز یا براساس جستجوی پادتن ضد انگل یا بر پایه جستجوی پادگن انگل در سرم انجام می شود. در صورت جستجوی پادگن تشخیص زود هنگام بیماری امکان‌پذیر می‌گردد. با روش کانترایمونوالکتروفورز می‌توان در کمتر از ۳ ساعت وجود پادتن یا پادگن را مورد بررسی قرار داد. به منظور ارزیابی این روش جهت جستجوی پادگن *فاسیولا ژیگانتیکا* در گاو مطالعه حاضر صورت گرفت. برای این منظور تعدادی کبد گاو آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* از کشتارگاه تهیه شد و از انگل‌های جمع‌آوری شده، پادگن های پیکری به روش اولدهام و ویلیامز تهیه گردید. پادگن های مذکور جهت ایمن‌سازی و تولید سرم هیپرایمون به ۲ قطعه خرگوش تزریق گردید. جهت جمع‌آوری نمونه‌های مثبت و منفی، کبد گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز از نظر آلودگی به *فاسیولا ژیگانتیکا* مورد بررسی قرار گرفت و ۴۰ نمونه خون از گاوهای آلوده و ۲۰ نمونه خون از گاوهای غیرآلوده اخذ گردید و نمونه‌های سرم، از نظر حضور پادگن های گردشی *فاسیولا ژیگانتیکا* به روش کانترایمونوالکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. از ۴۰ نمونه سرم گاوهای آلوده در کانترایمنوالکتروفورز ۳۶ نمونه مثبت بودند و ۲۰ نمونه سرم گاوهای غیرآلوده همگی منفی بودند. حساسیت و ویژگی این تست به ترتیب ۹۰ و ۱۰۰ درصد محاسبه گردید. با توجه به حساسیت و ویژگی قابل قبول و سرعت بالای این روش، می توان از آن به جهت تشخیص زود هنگام آلودگی به *فاسیولا ژیگانتیکا* بهره جست.**

**کلمات کلیدی: کانترایمونوالکتروفورز، *فاسیولا ژیگانتیکا*، گاو.**

---

۱ - کارشناس ارشد انگل شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲ - دانشجوی دکترای داروشناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳ - استادیار انگل شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۴ - استاد میکروب شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*: مسئول مکاتبات؛ پست الکترونیکی: khodadadianvajihe@yahoo.com

**مقدمه**

یکی از مشکلات اصلی و عمده‌ی بهداشتی کشور که سال‌ها است به صورت یک معضل، بخشی از منابع انسانی و مالی کشور را به خود اختصاص داده و هراز چندگاه به صورت بحران جدی در استان‌های مختلف و در قالب بیماری‌های نوپدید و باز پدید مطرح می‌شوند، بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان می‌باشند. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت از میان ۱۷۰۹ عامل بیماری‌زا، ۸۳۲ عامل، از حیوانات به انسان منتقل می‌شود و همچنین از میان ۱۵۶ بیماری نوپدید شناخته شده در انسان، ۱۱۴ مورد آن از حیوانات به انسان منتقل می‌گردند (۴).

آلودگی کبد حیوانات اهلی به *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* انتشار جهانی دارد و باعث بیماری فاسیولوزیس می‌گردد که از نظر اقتصادی موجب خسارات قابل توجهی می‌شود. خساراتی که به صورت مستقیم و غیرمستقیم زیان‌های زیادی به صنعت دامپروری کشور وارد می‌کند قابل توجه است. ابتلا به *فاسیولا* موجب تلفات، ضبط لاشه‌ها، ضبط کبدهای آلوده، کاهش وزن، کاهش پشم، کاهش باروری، مرگ‌زودرس جنین، کاهش شیر و غیره می‌شود (۱۸، ۱۶، ۱).

با توجه به این که روش‌های معمول تشخیص آلودگی عمدتاً پس از استقرار کرم در مجاری صفراوی و با آزمایش مدفوع و دیدن تخم امکان تشخیص را فراهم می‌سازند، توسعه روش‌هایی جهت تشخیص سریع و درمان به موقع ضروری به نظر می‌رسد. بررسی فعلی تلاشی است جهت تشخیص زودرس آلودگی به *فاسیولا ژیگانتیکا* با روش کانترایمونوالکتروفورز ، که با توجه به زئونوز بودن بیماری در صورت داشتن حساسیت و ویژگی مورد قبول، قابل ارزیابی در پزشکی نیز خواهد بود.

**روش بررسی**

**جمع‌آوری انگل:**

تعدادی کبد گاو آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* از کشتارگاه تهیه و به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل گردیدند. تعداد ۳۰ انگل بالغ جهت تهیه آنتی‌ژن-های پیکری جدا شد، برای این کار کبدهای آلوده در داخل ظروف مناسب به قطعات ۱ سانتی‌متر برش داده شد و خوب مخلوط گردید، انگل‌های خارج شده از مجاری و پارانشیم کبد، جدا گردید و برای مرحله‌ی بعد آماده شد (۵).

**تهیه آنتی‌ژن‌های پیکری از انگل بالغ *فاسیولا ژیگانتیکا*:**

از انگل‌های جمع‌آوری شده طبق روش اولدهام و ویلیامز (۱۹۸۵) آنتی‌ژن‌های پیکری تهیه گردید. برای این منظور انگل‌های جمع آوری شده، ۳ بار با PBS شستشو شد و کاملاً آبکشی گردید، سپس انگل‌ها، خشک شد و به مدت ۲۴ ساعت در فریز ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. انگل‌های خشک شده در هاون به صورت پودر در آورده شد. پودر حاصل در PBS هموژن شده و با مخلوط کن برقی به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری گردید. پس از این مدت مایع رویی برداشته شده، داخل لوله‌های استریل ریخته شد و رسوب با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع حاصل از سانتریفیوژ با فیلتر ۰/۲ میکرونی و سرنگ ۲۰ سی‌سی در زیر هود آزمایشگاهی و در کنار شعله، داخل لوله‌های استریل فیلتر شده، سرانجام مایع فیلتر شده تا هنگام استفاده در فریزر ۲۰- نگهداری گردید میزان پروتئین به روش براد-فورد اندازه‌گیری گردید. (۱۷).

**ایمن سازی خرگوش:**

تعداد دو قطعه خرگوش سالم از نظر ظاهری جهت ایمن‌سازی و تولید سرم هیپرایمون طبق روش فاگبمی و همکاران (۱۹۹۵) بکار گرفته شد. خرگوش‌ها به مدت یک هفته برای سازگاری با محیط در داخل قفس در اتاق شستشوی آزمایشگاه انگل‌شناسی نگهداری شدند. جهت ایمن کردن، ۰/۵ سی‌سی ادجوانت کامل فروند با ۱/۵ سی‌سی آنتی‌ژن خام تهیه شده از *فاسیولا ژیگانتیکا* مخلوط شده (وبه طور کلی میزان آنتی‌ژن تزریقی به هر خرگوش ۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) پشت عضله‌ی ران خرگوش‌ها تزریق گردید. به فاصله‌ی دو هفته تزریق دوم آنتی‌ژن به میزان ۱/۵ سی‌سی همراه با ۰/۵ سی‌سی ادجوانت ناقص فروند صورت گرفت (۹).

**جمع‌آوری سرم هیپرایمون (فوق ایمن):**

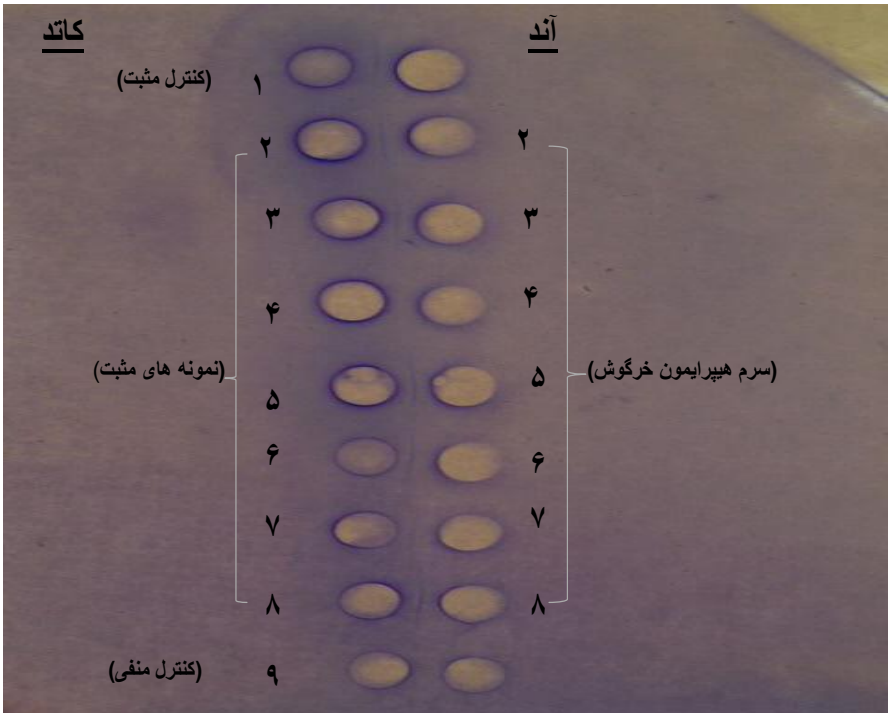
۴ هفته بعد از تزریق دوم از قلب خرگوش‌ها خونگیری بعمل آمد و سرم آن‌ها به وسیله‌ی سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**جمع‌آوری سرم گاوهای آلوده و غیرآلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا*:**

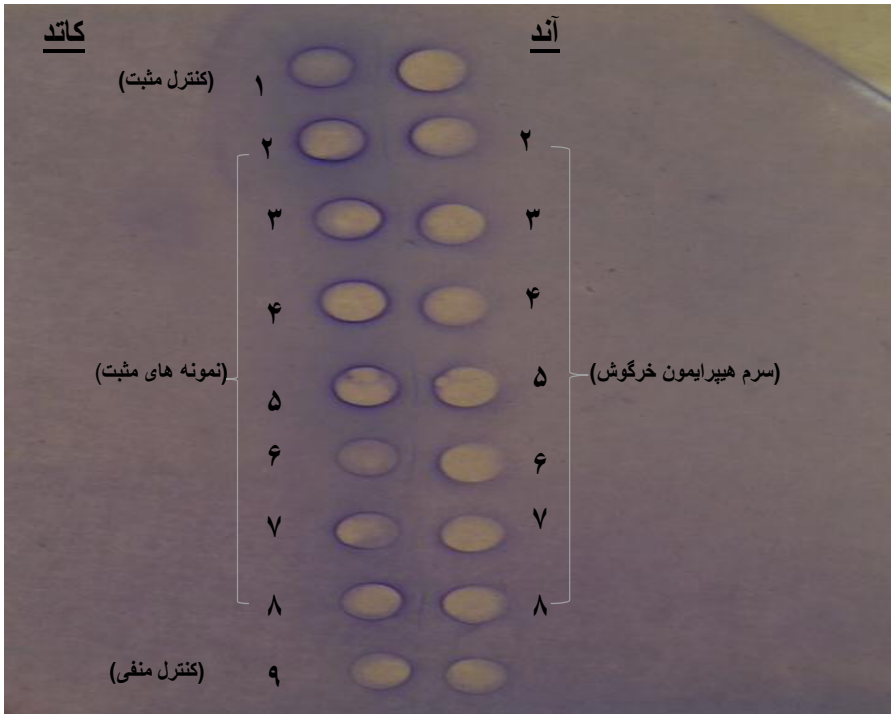
نمونه‌های کبد و سرم از گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز جمع‌آوری گردید و کبدها از نظر آلودگی به *فاسیولا ژیگانتیکا* مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع تعداد ۴۰ نمونه سرم از گاوهایی که آلودگی آن‌ها محرز شده و ۲۰ نمونه سرم از گاوهای غیرآلوده جمع‌آوری گردید. سرم نمونه‌های آلوده و غیرآلوده توسط سانتریفیوژ جدا و در میکروتیوب‌های استریل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

**انجام کانترایمونوالکتروفورز:**

جهت انجام کانترایمونوالکتروفورز مطابق روش آرافا و همکاران (۱۹۹۹) تعداد ۴۰ نمونه سرم گاو آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* و ۲۰ نمونه سرم غیرآلوده بکار رفت. در هر اسلاید مطابق تصویر ۳-۱ تعداد ۹ زوج حفره وجود داشت که در تمام حفرات یک طرف مقدار ۱۰ میکرولیتر سرم هیپرایمون (فوق ایمن) خرگوش و در طرف مقابل مقدار ۱۰ میکرولیتر از سرم‌های شاهد و نمونه‌های مورد مطالعه ریخته شد. اسلایدهای آماده طوری داخل تانک قرار گرفت که سرم هیپرایمون (فوق ایمن) خرگوش در سمت آند و سرم‌های مورد بررسی (جهت جستجوی آنتی‌ژن) در سمت کاتد تانک قرار گیرند. برای برقراری جریان الکتریسته، دو طرف ژل توسط دو قطعه کاغذ آغشته به بافر به محفظه‌های آندی و کاتدی بافر متصل می‌گردید. الکتروفورز با جریان ۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۲ ساعت انجام می‌شد، بعد از ۲ ساعت جریان الکتریسته قطع می‌گردید. به منظور شستشو اسلاید ژل با زاویه‌ی ۴۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت در ظرف محتوی بوراکس به طوری که در محلول غوطه‌ور گردد، قرار داده می‌شد. به منظور رنگ-آمیزی اسلاید به آرامی برداشته شده و به مدت ۱۰ دقیقه داخل ظرف حاوی رنگ کوماسی بلو ۵٪ قرار می‌گرفت. به منظور رنگ‌بری اسلایدها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول رنگ‌بر قرار داده شده و نهایتاً اسلایدها از نظر خطوط رسوبی مورد بررسی قرار گرفته، نمونه‌های مثبت شده به صورت خطوط رسوبی در بین حفره‌ها مشاهده می‌شد (۶). برای خشک کردن ژل، اسلایدها به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزمایشگاه قرار داده می‌شد. اسلایدها در ورقه‌های آلومینیومی نگهداری گردیدند.




**تصویر ۳-۱: روش کانترایمنوالکتروفورز روی اسلاید ژل آگاروز ۱ درصد جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های گردشی *فاسیولا ژیگانتیکا* در سرم گاو**



**تصویر ۴-۱: نتایج آزمایش کانترایمنوالکتروفورز ۸ نمونه سرم گاوان آلوده و غیرآلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا***

برای محاسبه حساسیت از فرمول زیر استفاده گردید:

$$SE = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

برای محاسبه ویژگی از فرمول زیر استفاده گردید:

$$SP = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

**TP (True positive)** یا مثبت واقعی، گاوهای آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* می‌باشد که پاسخ آزمایش آن‌ها نیز مثبت می‌باشد.

**TN (True negative)** یا منفی واقعی، گاوهای غیر آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* می‌باشد که پاسخ آزمایش آن‌ها منفی می‌باشد (۱۲).

**FP (False positive)** یا مثبت کاذب، گاوهای غیر آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* می‌باشد که پاسخ آزمایش آن‌ها مثبت می‌باشد.

**FN (negative False)** یا منفی کاذب، گاوان غیر آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* می‌باشد که پاسخ آزمایش نیز در آن‌ها منفی می‌باشد(۱۲).

## نتایج

در این مطالعه که بر روی ۴۰ نمونه سرم گاو آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* و ۲۰ نمونه سرم غیرآلوده، جمع‌آوری شده از کشتارگاه شهر اهواز انجام گرفت، کانترایمونوالکتروفورز ۴۰ نمونه سرم آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* در ۳۶ نمونه مثبت و در تمام ۲۰ نمونه سرم غیرآلوده منفی بود. حساسیت و ویژگی تست کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص دام‌های آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* به ترتیب ۹۰ و ۱۰۰ درصد محاسبه گردید.

**جدول ۴-۱: نتیجه کانترایمنوالکتروفورز، جهت جستجوی آنتی‌ژن *فاسیولا ژیگانتیکا* در ۶۰ نمونه سرم گاوی**

| حضور انگل در کبد | نتایج کانترایمونوالکتروفورز | | |
|---|---|---|---|
| | مثبت | منفی | جمع |
| سرم مثبت | ۳۶ | ۴ | ۴۰ |
| سرم منفی | - | ۲۰ | ۲۰ |
| **جمع** | ۳۶ | ۲۴ | ۶۰ |

## بحث و نتیجه‌گیری

*فاسیولا ژیگانتیکا* کرم متداول کبد گوسفند، بز، گاو، گاومیش و دیگر علف خواران اهلی و وحشی در آفریقا و آسیا می‌باشد (۲). فاسیولوز یکی از مهمترین بیماری‌های انگلی نشخوارکنندگان اهلی در سرتاسر جهان است (۲)، که از نظر اقتصادی و کاهش فرآورده‌های دامی موجب خسارت قابل توجهی می‌شود (۱).

تشخیص متداول فاسیولوز بر مبنای مشاهده حضور تخم انگل در مدفوع است که در مراحل پیشرفته بیماری پس از بالغ شدن انگل در کبد امکان‌پذیر می‌شود که در این مرحله انگل ضایعات زیادی نیز به کبد وارد ساخته و خسارات اقتصادی زیادی را باعث شده است. در صورتی که با روش‌های سرولوژی بتوان بیماری را تشخیص داد امکان تشخیص بیماری در مراحل اولیه بیماری فراهم می‌شود و سریع‌تر می‌توان اقدام به درمان نمود و از وارد آمدن خسارات بیشتر جلوگیری کرد (۱).

تشخیص سرولوژیک فاسیولوز به طور معمول با تشخیص وجود پادتن ضد انگل در سرم خون صورت می‌گیرد که لازمه آن گذشت حدود ۲ هفته از آغاز آلودگی است اما در صورتی که بتوان با تأیید وجود آنتی‌ژن انگل در سرم خون به تشخیص رسید، امکان تشخیص آلودگی در روزهای اولیه آلودگی وجود خواهد داشت و به طبع با انجام درمان بیماری در مراحل اولیه، از خسارات ناشی از بیماری به نحو بهتری می‌توان جلوگیری نمود. مطالعه حاضر جهت ارزیابی کانترایمونوالکتروفورز به منظور جستجوی آنتی‌ژن *فاسیولا ژیگانتیکا* در سرم گاو صورت گرفت، که بررسی منابع نشان داد ظاهراً تاکنون این مهم صورت نگرفته است.

اما از این روش برای جستجوی آنتی‌بادی ضد *فاسیولا* به کرات بهره‌گیری شده است که در ادامه به مواردی از آن‌ها اشاره می‌شود. در مطالعات آرافا و همکاران (۱۹۹۹) آزمایش کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص زود هنگام فاسیولوز با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی *فاسیولا ژیگانتیکا* ارزیابی شده است حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۳۸/۷ و ۱۰۰ درصد گزارش گردیده است (۶).

ساروپ و همکاران (۱۹۸۷) از سه آزمایش :

AGPT (Agar Gel Precipitation test)
CIEP (Counterimmunoelectrophoresis)
IHA (Indirect haemagglutination)

جهت ارزیابی تشخیص آلودگی *فاسیولا ژیگانتیکا*در گاومیش استفاده نموده‌اند که حساسیت روش‌های مذکور به ترتیب ۵۷/۴، ۶۸/۳۷، ۷۶/۰۶ درصد محاسبه شده‌است (۱۹).

مطالعه حاضر برای اولین بار به منظور ارزیابی روش کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص آنتی-ژن‌های در گردش *فاسیولا ژیگانتیکا* در گاوان آلوده صورت گرفت. البته در یک مطالعه نیز از کانترایمونوالکتروفورز برای جستجوی آنتی‌ژن بهره‌گیری شده است ولی نه در سرم بلکه در مدفوع و آن بررسی مطالعه یوسف و همکاران (۱۹۹۱) است که با بررسی حضور کوپرآنتی‌ژن‌های *فاسیولا ژیگانتیکا* در نمونه‌های مدفوع انسانی وجود خط رسوبی را در کانترایمونوالکتروفورز نشان داده-اند و اعلام نموده‌اند می‌توان از این روش نیز برای تشخیص فاسیولوز بهره‌گیری نمود اما آن را ارزیابی ننموده‌اند (۲۲).

در مطالعات متعددی نیز از سایر روش‌های سرولوژیک از جمله الایزا و دات الایزا جهت جستجوی آنتی‌بادی ضد *فاسیولا* مورد ارزیابی قرارگرفته‌اند که در ادامه به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود.

دلیمی و همکاران (۲۰۰۳) از آنتی‌ژن‌های *فاسیولا ژیگانتیکای* بالغ جهت تشخیص فاسیولوز انسانی با استفاده از دات الایزا استفاده نموده‌اند که

حساسیت و ویژگی آن به به ترتیب ۹۴/۲۳ و ۹۹/۳۶ درصد اعلام نموده‌اند (۸).

پیوپان و همکاران (۲۰۰۳) آنتی‌ژن دفعی – ترشحی، ۲۷ کیلودالتونی *فاسیولا ژیگانتیکای* بالغ را با تست دات الایزا ارزیابی نموده و حساسیت و ویژگی آن را به ترتیب ۹۸/۲ و ۱۰۰ درصد گزارش کرده‌اند (۱۳).

مونتاکان و همکاران (۲۰۰۱) روش الایزا و AGPT جهت تشخیص فاسیولوز گاوی را با هم مقایسه کرده‌اند و اعلام نموده‌اند که در هر دو روش اگرچه حساسیت بالاست ولی ویژگی پایین است که این امر ممکن است ناشی از واکنش متقاطع با سایر آلودگی‌های انگلی باشد (۲۱).

موذنی و شارماگائو (۱۳۸۶) آزمایش با الایزا آنتی-ژن‌های خام *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* را با هم مقایسه نموده‌اند و اعلام کرده‌اند تفاوت‌های موجود بین مواد آنتی‌ژنیک *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* در حدی نیست که مانع از واکنش متقاطع بین دو گونه‌ی انگل در آزمایش الایزا شود و تحقیقات بیشتری برای شناسایی، جداسازی و تخلیص مواد آنتی‌ژنیک این انگل‌ها را توصیه نموده‌اند (۳).

ایبارا و همکاران (۱۹۹۸) از سه روش دات الایزا، الایزای غیرمستقیم، (Diffusion-in-gel-DIG(enzyme linked immunosorbent. الایزا جهت تشخیص فاسیولوز در گاو استفاده کرده‌اند که الایزای غیرمستقیم با حساسیت و ویژگی به ترتیب، ۹۶/۵ و ۹۸/۸ درصد بهتر از بقیه روش‌ها بوده است (۱۲).

آواد و همکاران (۲۰۰۹) استفاده از آنتی‌ژن‌های مختلف *فاسیولا ژیگانتیکا* روش الایزای غیرمستقیم را ارزیابی نموده‌اند که طبق این مطالعه ایشان آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی جهت تشخیص آنتی‌بادی‌ها با بهترین نتایج همراه بوده است (۷).

در برخی مطالعات نیز مشابه مطالعه حاضر به جستجوی آنتی‌ژن *فاسیولای* سرم پرداخته شده است اما نه با روش CIEP بلکه با سایر روش‌های سرمی از جمله الایزا، که به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود.

گوبادیا وفاگبمی (۱۹۹۶) در آلودگی تجربی و طبیعی گوسفندان با استفاده از الایزا آنتی‌ژن‌های-گردشی *فاسیولا ژیگانتیکا* را شناسایی کرده‌اند که با استفاده از این روش احتمال مثبت بودن تست در یک هفته بعد از آلودگی ۸۲/۵ درصد گزارش شده است (۱۱).

ولوزومای و همکاران (۲۰۰۳) تهیه آنتی‌بادی بر ضد آنتی‌ژن خالص شده ۴۵ کیلودالتونی *فاسیولا ژیگانتیکا*، آنتی‌ژن مذکور را در سرم گوساله‌های آلوده به شکل تجربی نشان داده‌اند (۲۰).

در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی آزمایش کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص دام‌های آلوده به *فاسیولا ژیگانتیکا* به ترتیب ۹۰ و ۱۰۰ درصد محاسبه گردید. باید توجه داشت که آزمایشاتی که بر مبنای تشخیص آنتی‌بادی هستند اغلب به دلیل واکنش متقاطع ویژگی پایینی دارند اما روش‌های مبتنی بر تشخیص آنتی‌ژن از ویژگی بالاتری برخوردار هستند، لذا در بررسی حاضر ویژگی CIEP، ۱۰۰ درصد برآورد شده است. در مجموع با توجه به ویژگی بالا و حساسیت قابل قبول CIEP استفاده از این روش در تشخیص فاسیولوز توصیه می‌گردد.

آلودگی *فاسیولا ژیگانتیکا* در گاو و گاومیش-های کشتار شده در ایران در سال‌های مختلف از ۹۱-۱۷ درصد متفاوت گزارش شده است (۱) که نشان می‌دهد خسارات زیادی در اثر این بیماری به صنعت دامپروری کشور وارد می‌شود که با توجه به نتایج مطالعه حاضر با تشخیص بیماری در اوایل عفونت به کمک CIEP که روشی سریع، آسان و ارزان است (۱۵، ۱۴،۱۰) می‌تواند جهت تشخیص

به موقع و درمان سریع بیماری مورد توجه قرار گیرد و از خسارات ناشی از آن جلوگیری نمود.

## منابع


۱- اسلامی، ع .۱۳۷۷. کرم‌شناسی دامپزشکی. جلد اول (ترماتودا)، انتشارات دانشگاه تهران. صفحات ۸۶-۴۵.

۲- ذوقی، ا .۱۳۷۶. بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان، تالیف اچ. استیل و جیمز. جلد سوم، چاپ اول. انتشارات علمی و فرهنگی تهران. صفحات۱۶۷-۱۳۸ .

۳- مؤذنی، م و شارماگائوی، ش .۱۳۸۶. مقایسه آنتی‌ژن‌های خام فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا به وسیله آزمایش-الیزا. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره ۱۱، صفحات ۵-۱.

۴– نیک اختر، ر. ۱۳۸۸. انگیزه نگهداری سگ. www.qcqats.com.

5- Anderson, N., Luong, T.T., Vo, N.G., Bui, K.L., Smooker, P. M., Spithill, T., 1999. The sensitivity and specificity of two methods for detecting Fasciola infections in cattle. Veterinary Parasitology. 83: 15–24.

6- Arafa, M.S., Abaza, S. M., El-Shewy, K. A., Mohareb, E.W., El-Moamly, A., 1999. Detection of Fasciola-specific excretory/ secretory (E/S) protein fraction band (49.5 kDa) and its utilization in diagnosis of early fascioliasis using different diagnostic techniques.Veterinary Parasitology. 58 (3): 235-246.

7- Awad, W. S., Ibrahim, A.K., Salib, F. A., 2009. using indirect ELISA to assess different antigens for the serodiagnosis of Fasciola gigantic infection in cattle, sheep and dokeys. Veterinary Parasitology.63: 1-13.

8- Dalimi, A., Hadighi, R., Madani. R., 2004. Partially purified fraction (PPF) antigen from adult Fasciola gigantica for the serodiagnosis of human fascioliasis using Dot-ELISA technique. Annals of Saudi Medicine. 24(1): 18-20.

9- Fagbemi, B.O., Obarisiagbo, I.O., Mbuh. J. V.,2000. Detection of circulating antigen in sera of Fasciola gigantic infected cattle with antibodies reactive with a Fasciola-specific 88-kDa antigen. Veterinary Parasitology. 58( 3): 235-246.

10- Fascioliasis, F.A .,2006. Eight cases of Lifermann and Vincendeau, P. Dauchy Medical Malpractice Infection. Clinical and microbiological features. 36(1):42-6.

11- Guobadia, E. E and., Fagbemi. B. O., 1996. Detection of circulating Fasciola gigantica antigen in experimental and natural infections of sheep with fasciolosis. Veterinary Parasitology. 15: 29-39.

12- Ibarra, F., Montenegro, N., 1998. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. Veterinary Parasitology. 77: 229-23.

13- Intapan, P. M., Maleewong, W., Nateeworanart, S., Wongkham,C., Pipitgool, V., Sukolapong, V Sangmaneedet, S., 2003. Immunodiagnosis of human Fasciola gigantic adult worm with the molecular mass of 27 KDa by a Dot - ELISA. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 34:717-713.

14-.Kreder, T., Bozic, B., 2002. Counterimmunoelectrophoresis: fast, easy and cost-effective method for the detection of autoantibodies to intracellular antigens. Clinical chemistry and laboratory Medicine. 40(4):428-9.

15- Mikhail, E.M., Farid, Z., Youssef, F.G ., Mansour, N. S.,1990. Counterimmunoelectrophoresis for the rapid and specific diagnosis of acute

fascioliasis and schistosomiasis .Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 84(3): 400-1.
16- Molina, E.C ., Skerratt, L.F., 2005.Cellular and buffaloes infected with a single dose of Fasciola gigantica . Veterinary Parasitology. 131: 157-163.
17- Oldham ,G ., Williams, L.,1985. Cell mediated immunity to liver fluke antigens during experimental Fasciola hepatica infection of cattle. Parasite Immunology. 7: 503–516.
18- Paz-Silva, A., Hillyer,G.V., Sanchez, R., Rodriguez, J.R., et al .,2004. Isolation, identification and expression of a Fasciola hepatica cDNA encoding a 2/9 KDa recombinant protein for the diagnosis of bovine fasciolosis. Parasitology Research. 95: 129-135.
19- Swarup, D., Pachauri, S.P., Sharma, B., Bandhopadhyay, S.K .,1987. Serodiagnosis of Fasciola gigantica infection in buffaloes. Veterinary Parasitology, 01; 24(1-2): 67-74.
20- Velusamy, B., Singh , B.P., Sharma, R.L .,Chandra, D.,2003. Detection of circulating 54 kDa antigen in sera of bovine calves experimentally infected with F. gigantica . VeterinaryParasitology.119:187-195.
21- Vongpakorn, M., Waikagul, J., Dekumyoy, P.C.,Tasanee, R., Pongponratn, E., 2001. Comparison of ELISA and GPAT in Diagnosis of Bovine Fasciolosis Using Excretory- Secretory Antigen. Tropical Medicine and Parasitology: 24:1-7.
22- Youssef, F.G., mansour, N.S., Aziz, A.G., 1991. Early diagnosis of human Fascioliasis by the detection copro-antigens using counterimmunoelectrophoresis. Transactions of the Royal society of tropical medicine and Hygiene. 85(3): 383-384.