نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۴، بهار ۱۳۹۱

مقایسه روش های کانترایمونوالکتروفورزیس و واکنش زنجیره ای پلی مراز در تشخیص هیداتیدوزیس گوسفند

• **محمد یخچالی** (نویسنده مسئول)
دانشیار گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
• **احمد مرشدی**
دانشیار گروه میکروبیولوژی، بخش ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
• **ملیحه شیر آشیان**
دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه ارومیه
تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: آذر ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۹۹۵۷۲۵۱۳
Email: m.yakhchali@urmia.ac.ir

چکیده

گوسفند به عنوان یکی از مناسب ترین میزبان های هیداتیدوزیس در ایران است و ایران به عنوان یکی از نواحی هیپراندمیک در دنیا مطرح می باشد. در این تحقیق، ارزیابی واکنش پادگنی در مجاورت با آنتی سرم تهیه شده از گوسفند در مقایسه با یافته های کشتارگاهی و مولکولی انجام شد. در مطالعه حاضر برای تهیه پادگن محلول از مایع کیست هیداتید استفاده گردید. خون مورد نیاز برای تهیه سرم از ۱۰۰ راس گوسفند در حین کشتار تهیه شد. یافته های کشتارگاهی در گوسفندان خونگیری شده آلوده به کیست هیداتید ثبت گردید. سپس آزمون کانترایمنو الکتروفورزیس در حضور سرم های شاهد منفی و مثبت انجام شد. استخراج DNA از پرتواسکولکس انجام شد و قطعه bp ۱۲۱۳ از ژن co۱ تکثیر گردید. در مشاهدات کشتارگاهی، ۳۳ درصد گوسفندان آلوده به کیست هیداتید در کبد و ریه بودند. در صورتی که موارد مثبت آلودگی در روش کانترایمنوالکتروفورزیس ۲۹ درصد و در روش مولکولی ۲۸ درصد بود. در مقایسه با یافته های کشتارگاهی، حساسیت و ویژگی آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس به ترتیب ۳۱/۷۹درصد و ۲/۹۲درصد بود. ارزش تشخیصی روش مولکولی با حساسیت ۱۹,۸۵ درصد و ویژگی۹۴.۸ درصد بود. مقایسه یافته های آزمون سرمی به روش کانترایمنوالکتروفورزیس با روش تشخیص مولکولی نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس کمتر بود ولی اختلاف آماری، معنی داری نداشت (P<۰/۰۵). باتوجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس می تواند روش غربالگری مناسبی برای هیداتیدوزیس گوسفندان باشد.

کلمات کلیدی: کیست هیداتید، گوسفند، کانترایمنوالکتروفورزیس، PCR.

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 94 pp: 25-30

Comparison of the validity of CIE and PCR diagnostic methods in determining hydatidosis in sheep.

By: Yakhchali, M, Associate Professor, Department of Pathobiology, Parasitology Division, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author; Tel: +989144463959).Morshedi, A Associate Professor, Immunology Division, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Shirashian, M. General Practitioner of Veterinary Medicine, Urmia, Iran.

Sheep is one of the important hosts for hydatidosis in Iran as a hyperendemic region worldwide. In the present study, the efficacy of counter immuno-electerophoresis (CIE) and PCR tests to detect sheep hydatid cyst infection was carried out. For this, soluble antigen was provided using hydatid cyst fluids (HCFs). Blood sera were taken from a total number of 100 slaughtered sheep. CIE analysis was undertaken using negative and positive controls. DNA was extracted from protoscolices and a 1213bp fragment length of co1 gene amplified. Necropsy findings indicated that lung and liver of slaughtered sheep (33%) was infected with hydatid cyst. While it was 29% in CIE and 28% in PCR test. According to the necropsy findings as a gold standard test, sensitivity and specificity of CIE was 79.31% and 92.2%, respectively. Sensitivity and specifity of PCR test were determined 85.19% and 94.8%, as well. Data analysis showed that there is no significant difference between these two techniques (P<0.05). Based on these results, CIE technique can be considered as a useful method to screen sheep hydatid cyst infection.

Key words: Hydatid cyst, Sheep, CIE, PCR.

مقدمه

بیماری های انگلی یکی از مشکلات عمده بهداشتی و اقتصادی اغلب کشورهای جهان به ویژه کشورهای در حال توسعه به حساب می آیند. بنابراین تشخیص و مبارزه با آنها یکی از بخش های مهم برنامه های توسعه ملی این کشورها است. هیداتیدوزیس یکی از ۴۰۰ بیماری مشترک شناخته شده بین انسان و دام می باشد که به واسطه رشد متاسستود *Echinococcus granulosus* در کبد، ریه و سایر اندام های بدن میزبان های واسط (گاو، گاومیش، گوسفند، بز، خوک، شتر، انسان) بروز می کند. میزبان نهایی *Echinococcus granulosus* گوشتخواران اهلی و وحشی می باشند که در ایران از سگ های گله و سگ های ولگرد، روباه قرمز، شغال طلایی و گرگ از استان های مختلف گزارش شده است (۲۳).

در مناطقی از دنیا که پرورش گوسفند و بز رایج است این انگل نیز وجود دارد. لذا گوسفند به عنوان یک عامل مهم در بقاء و انتشار انگل نقش دارد (۳). از سوی دیگر هیداتیدوزیس هم از نظر بهداشت عمومی به دلیل هزینه های سنگین تشخیص و درمان و عوارض جانبی آن و هم از نظر اقتصادی به دلیل ضبط احشاء آلوده، کاهش تولید شیر، پشم و گوشت حائز اهمیت می باشد (۱).

با توجه به اینکه تهیه نمونه مستقیم از بافت های آلوده میزبان زنده به متاسستود *Echinococcus granulosus* به سادگی میسر نمی باشد و نیز روش تشخیصی مطمئنی برای تشخیص آلودگی به کیست هیداتید وجود ندارد، از روش های سرم شناسی مختلفی به واسطه بروز پاسخ ایمنی مناسب در میزبان و حساسیت بالایی که دارند، استفاده می شود (۴). روش کانتر ایمنوالکتروفورزیس شبیه ژل دیفیوژن است ولی حساسیت بیشتری نسبت به ایمنوالکتروفورزیس دارد (۱۱).

روش های تشخیص ملکولی امکان تشخیص کیست هیداتید را به طور غیرمستقیم فراهم نموده اند (۱۴). از محاسن این روش ها عدم اشتباه در تشخیص بر اثر تغییرپذیری میزبان و محیط می باشد. زیرا روش های ملکولی با حساسیت بالایی که دارند قادر به تکثیر میزان کمی از ژن های انگل می باشند (۲۱). به عنوان مثال، با استفاده از روش PCR می توان به جستجوی DNA تخم انگل، پروتواسکولکس و لایه زایا کیست هیداتید و نیز کرم بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس نمود (۱۲). در این ارتباط تنوع ژنتیکی ژنوم میتوکندریایی (co۱ و nad۱) و ریبوزومی (ITS) *Echinococcus granulosus* بررسی شده است. به طوری که تعیین توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن های ریبوزومی و میتوکندریایی به روش PCR کارآیی قابل توجهی داشته است (۹). در ایران مطالعات کمی در خصوص آنالیز ملکولی DNA هسته ای، ریبوزومی و میتوکندریایی کیست هیداتید صورت گرفته است (۱۸). از جمله در مطالعات ملکولی کیست هیداتید از ناحیه ITS۱ مربوط به ژنوم DNA ریبوزومی و co۱ و nad۱ مربوط به ژنوم DNA میتوکندریایی استفاده گردیده است (۱۳،۶،۴). هدف از این مطالعه ارزیابی و مقایسه روش های کانتر ایمنو الکتروفورزیس و واکنش زنجیره ای پلی مراز در مقایسه با یافته های کشتارگاهی برای تشخیص کیست هیداتید گوسفند بود تا بتوان با استفاده از آن روش تشخیصی مناسبی را پیشنهاد کرد.

مواد و روش کار

جمع آوری کیست هیداتید

برای تهیه نمونه های کیست هیداتید کبد و ریه گوسفند به کشتارگاه شهرستان ارومیه مراجعه گردید. پس از مشاهده و ملامسه، اندام های آلوده به کیست هیداتید جمع آوری و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند.

آماده کردن نمونه برای تهیه پادگن محلول و استخراج DNA

پس از ضد عفونی سطح عضو آلوده به کیست هیداتید، مایع کیست هیداتید جمع آوری و سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور به مدت ۸ دقیقه) انجام شد (۴).

مایع رو به عنوان پادگن جمع آوری شد و به هر نمونه از مایع کیست هیداتید ماده آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید به میزان ۰/۵میلی مول اضافه گردید تا از هضم آنزیمی محتویات پروتینی آن از جمله پادگن ها جلوگیری به عمل آید (۴). به رسوب حاوی پروتواسکولکس انگل اتانول ۷۵درصد اضافه گردید و برای هضم و آزمایش مولکولی نگهداری شدند.

استاندارد کردن غلظت پادگن

برای استاندارد کردن غلظت پادگن از روش غلظت لوله شماره سه مک فارلان استفاده شد. در ۴۰۰ نانومتر، غلظت معادل غلظت لوله شماره ۳ مک فارلان، ا جذب نوری معادل ۱۸۸-۱۸۶ گردید و مقدار نرمال پروتئین پادگن برای این آزمایش ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بود (۱۶،۱۵).

تهیه سرم

۱۰۰ نمونه خون از گوسفندان قبل از کشتار تهیه و علامت گذاری شدند. هر نمونه خون در ۲۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سرم جدا شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

کانترایمنوالکتروفورزیس

بر اساس روش Deka و همکاران (۱۹۹۰) از بافر باربیتال تهیه شده به روش گراندبوک استفاده گردید (pH ۸/۹-۹/۲) (۱۱). برای هر سری از سرم های نمونه که در یک نوبت آزمایش شدند، یک سرم شاهد منفی و یک سرم شاهد مثبت (تهیه شده از بخش انگل شناسی موسسه رازی حصارک) برای کنترل پادگن در نظر گرفته شد.

روش مولکولی

استخراج DNA

هضم اولیه نمونه های حاوی پروتواسکولکس که از کبد و ریه گوسفندان تحت مطالعه تهیه شده بودند، با استفاده از بافر هضم کننده انجام گردید. سپس استخراج DNA از آنها با استفاده از کیت DNG (ساخت شرکت سیناژن) صورت پذیرفت.

روش تکثیر ژن co۱

تکثیر ژن co۱ با استفاده از کیت PCR Master Kit (ساخت شرکت سیناژن) در حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر و در حضور کنترل انجام شد. پرایمرها با استفاده از توالی ژن co۱ *Egranulosus* در بانک ژن و با استفاده از نرم افزار AmplifX ۵ طراحی گردیدند:

'HC-F: ۵'- GCG-TTT-GAA-TGC-TTT-GAG-TG-۳

'HC-R: ۵'- ACA-AGC-CAC-AGG-ACT-CAT-C -۳

محصول PCRدر ژل آگاروز ۵/۱ درصد الکتروفورز گردید. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، اندازه قطعه تکثیر یافته در مقایسه با مارکر مشخص شد.

ارزیابی آماری

برای مقایسه روش های کانترایمنوالکتروفورزیس و واکنش زنجیره ای پلی مراز با یافته های کشتارگاهی از آزمون آماری t با سطح اطمینان ۹۵درصد استفاده گردید (نرم افزار SPSS). حد معنی داری برای این آزمون P<۰/۰۵ بود.

نتایج

از ۱۰۰ نمونه سرم گوسفندی، ۲۹ درصد سرم ها به روش کانترایمنوالکتروفورزیس مثبت بودند. از ۷۱ گوسفند فاقد کیست هیداتید، ۳ مورد سرم مثبت (۲۲/۴ درصد) بودند (جدول ۲). به طوری که چهارده نمونه با رقت ۱/۲، ده نمونه با رقت ۱/۴، چهار نمونه با رقت ۱/۸ و یک نمونه با رقت ۱/۱۶ بودند (جدول ۱). چنانچه سه مورد سرم مثبت و فاقد کیست، مثبت کاذب در نظر گرفته شوند، از این رو حساسیت و ویژگی آزمون به ترتیب ۳۱/۷۹ درصد و ۲/۹۲ درصد است.

در مطالعه مولکولی، برای ژن co۱ در هر نوع دام مبتلا به هیداتیدوزیس باند مشترک bp ۱۲۱۳ بدست آمد (شکل ۱) به طوری که موارد مثبت آلودگی ۲۷ درصد بود (جدول ۲). ارزش تشخیصی روش مولکولی با حساسیت ۱۹/۸۵ درصد و ویژگی ۸/۹۴ درصد بود.

بحث

روش های مختلفی برای تشخیص کیست هیداتید بر اساس جستجوی پادتن ابداع شده است. در این ارتباط می توان به تست ثبوت عامل مکمل، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، لاتکس آگلوتیناسیون و الیزا اشاره نمود (۴). در این مطالعه، یافته های کشتارگاهی به عنوان آزمون استاندارد برای مقایسه واکنش زنجیره ای پلی مراز و آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس در تشخیص کیست هیداتید گوسفند بود. البته از یافته های مولکولی در تشخیص سویه های *Egranulosus* نیز استفاده می شود که از ۱۰ سویه گزارش شده در جهان، ۳ سویه گوسفندی (سویه غالب)، گاومیش و شتر براساس مطالعه توالی نوکلئوتیدی ژن های میتوکندریایی و ریبوزومی از ایران گزارش شده است (۲۱،۲۰،۱۸،۷،۶). به طوری که با توجه به یافته های کشتارگاهی در آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس ۶ درصد گوسفندان و در آزمون مولکولی ۴ درصد گوسفندان به اشتباه آلوده به کیست هیداتید گزارش شدند (مثبت کاذب). علاوه براین، نمونه های سرمی آزمایش شده گوسفندان که در یافته های کشتارگاهی از نظر وجود کیست هیداتید مثبت بودند، همگی در آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس واکنش سرمی مثبت داشتند و نمونه منفی کاذب مشاهده نگردید. علاوه براین، ویژگی آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس برای هیداتیدوزیس که توسط سایر محققین ۸۰ درصد گزارش شده بود، مشابهت داشت (۳، ۲۲). در بررسی گرامی نیا (۱) حساسیت آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس روی هیداتیدوز گوسفند ۸۰ درصد و ویژگی آن ۶۶ درصد بود. Vevategui و همکاران (۲۲) حساسیت آزمون الیزا را با پادگن مایع کیست هیداتید ۱۰۰ درصد و ویژگی آن را ۸۰ درصد اعلام کردند. در تمامی گزارشات مذکور حساسیت آزمون در تشخیص به مراتب بیشتر از ویژگی آنها می باشد. در صورتی که در این مطالعه ویژگی هر دو

آزمون در مقایسه با این گزارشات در تشخیص هیداتیدوزیس بیشتر بود. در مطالعه حاضر موارد سرم مثبت گوسفندان به روش کانترایمنوالکتروفورزیس تا حدودی با گزارش Shapire و همکاران (۱۹) که موارد سرمی مثبت را به روش کانترایمنوالکتروفورزیس برای مایع کیست هیداتید ۲۷درصد گزارش کردند، هم خوانی دارد.

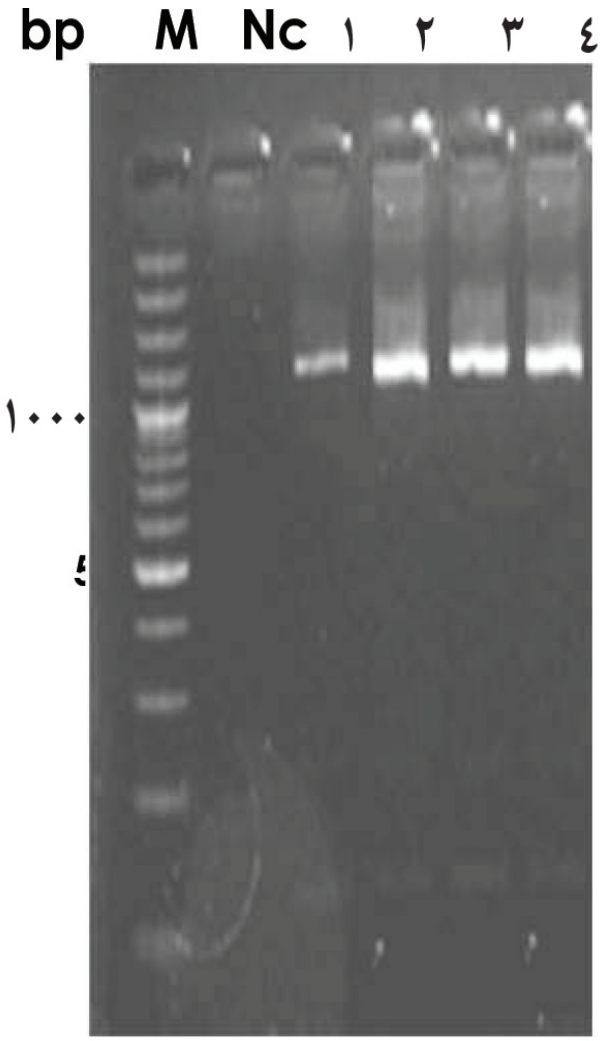
یافته ها در مورد کارایی آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس در سایر بیماری ها قابل توجه است. یخچالی و همکاران (۵) حساسیت آزمون کانترایمنو الکتروفورزیس را در تشخیص سرمی سارکوسیستوزیس گوسفندان ۱۰۰درصد و ویژگی ۸۳ درصد گزارش کردند. Pathak و همکاران (۱۵) از آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس برای تشخیص سیستی سرکوزیس خوکی به عنوان یک روش غربالگری سریع، آسان، حساس و بدون پاسخ منفی کاذب استفاده نمودند. آنان نشان دادند که بین سرم های جمع آوری شده خوک های آلوده به کیست هیداتید و سیستی سرکوس تنیوکولیس واکنش متقاطع وجود نداشت. Aboazakham و Romia (۸) در مطالعه ای بر روی موش هایی که به طور تجربی آلوده به ترشینلا شده بودند از بین روش های الیزا و ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و کانترایمونوالکتروفورزیس، آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس را حساس ترین روش تشخیصی معرفی کردند. لذا در تحقیق حاضر، مشاهده موارد مثبت کاذب می تواند مربوط به واکنش های متقاطع با برخی از عفونت های غیرسستودی و یا پادگن های توموری باشد (۱۷). Chamekh و همکاران (۱۰) بیشترین میزان پروتئین یافت شده به روش کانترایمونوالکتروفورزیس مایع کیست هیداتید را پادگن Arc۵ با وزن مولکولی ۶۰ کیلو دالتون گزارش کرده اند. درمطالعه دیگری که توسط Deka و Gaur (۱۱) با استفاده از روش کانترایمونوالکتروفورزیس برای تشخیص سیستی سرکوزیس تنیا هیداتیژنا در بزهایی که به صورت طبیعی و تجربی آلوده شده بودند صورت گرفت نتایج نشان داد که در یک سیستم مشابه وقتی پادگن های خالص تهیه شده از مایع سیستی سرکوس تنیا هیداتیژنا و غشا سیستی سرکوس به طور مشابه با سرم های هیپرایمن خود مورد آزمایش قرار می گیرند از نظر مدت زمان آزمایش و شدت واکنش با هم اختلاف دارند. در این تحقیق، مقایسه یافته های آزمون سرمی به روش کانترایمنوالکتروفورزیس با روش تشخیص مولکولی نشان داد که گرچه حساسیت و ویژگی آزمون کانترایمنوالکتروفورزیس کمتر از روش

جدول ۱- رقت های مختلف سرمی گوسفندهای آلوده به کیست هیداتید در آزمون کانترایمونوالکتروفورزیس.

رقت های سرم	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶
موارد سرم مثبت آلوده به کیست (درصد)	۱۴	۱۰	۴	۱
موارد سرم مثبت بدون آلودگی به کیست (درصد)	۲	۱	-	-

جدول ۲- موارد مثبت گوسفندان آلوده به کیست هیداتید در آزمون های کانترایمونو الکتروفورزیس و مولکولی در مقایسه با یافته های کشتارگاهی.

آزمون	تعداد نمونه	نوع نمونه	
		آلوده به کیست هیداتید (درصد)	غیر آلوده به کیست هیداتید (درصد)
کانترایمونوالکتروفورزیس	۱۰۰	۱۰	۴
PCR	۱۰۰	۱	-
یافته کشتارگاهی	۱۰۰		



شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن co۱ متاسستود اکینوکوکوس گرانولوزوس از کبد (۱و۲) و ریه گوسفند (۳ و ۴)، کنترل منفی (Nc) و مارکر bp ۱۰۰ (M).

مولکولی بود ولی در آنالیز آماری داده ها اختلاف معنی داری وجود نداشت (P<۰/۰۵). البتــه علــی رغم دقت روش های مولکولــی، هنوز هم این روش تشــخیصی به دلیل مشــکلات تهیه نمونه های بافتــی از دام زنده به ویژه به تعــداد زیاد، نیــاز به تجهیزات و هزینه های آن؛ به عنــوان یک روش میدانی در تشــخیص کیســت هیداتید کار بردی نشــده اســت (۲۰). علاوه بر آن در مقایسه با روش تشخیص مولکولی، روش کانترایمنوالکتروفورزیس از محاسن تکنیکی مختلفی برخوردار اســت. ازجمله قابلیت اجرا در دام زنده، ماندگاری طولانی تر پادگن، سادگی روش، ارزانی و قابلیت انجام تعداد بیشتری واکنش در مدت زمان کوتاه اســت. همچنیــن کانترایمنوالکتروفورزیس به دلیل قابل اجــرا بودن در دمای محیط، در آزمون های میدانی روش کاراتری نســبت به روش های مولکولی می باشد (۲۲). بنابراین با توجه به یافته های این مطالعه، مــی تــوان روش کانترایمنوالکتروفورزیس را برای تشــخیص موارد ســرمی مشکوک و یا آشکار کردن پادتن ضد هیداتیدوزیس در گوسفند به عنوان یک روش غربالگری مناسب توصیه کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وســیله از همکاری آقای آرمن بدلی کارشناس بخش انگل شناسی و آقای فرهاد فرهنگ پژوه کارشــناس آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه مراتب قدردانی و تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

۱- گرامی نیا، احمد (۱۳۷۵) بررســی سرودیاگنوســتیک هیداتیدوز با استفاده از تست ایمنوالکتروفورز در گوسفند در ارومیه، پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

۲-میر هادی، محســن (۱۳۶۱) بررســی میزان حساســیت و اختصاصی بودن آنتی ژن کیســت هیداتید در گوســفندان منطقه ورامیــن، پایان نامه برای اخــذ درجه دکترای دامپزشکی از دانشگاه تهران، شماره ثبت ۱۳۲۷.

۳- یخچالــی، محمد؛ غرقی، بختیار (۱۳۸۵). بررســی میزان شــیوع هیداتیدوزیس در نشخوارکنندگان کشتار شده در شهرستان بانه (استان کردستان) در سال ۱۳۸۰، مجله دامپزشکی ایران، شماره۱۲، صفحه ۹۵ -۸۸.

۴- یخچالــی، م.؛ مرشــدی، ا. (۱۳۹۰). مقایســه ارزش روش های مختلف تشــخیص هیداتیدوزیس در نشخوارکنندگان بزرگ. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۸۷، صفحه ۷۱-۶۴.

۵- یخچالــی، م.؛ مرشــدی، ا.؛ ملکی فــرد، ف. (۱۳۹۰). غربالگری موارد ســرم مثبت سارکوسیســتیس (آپی کمپلکسا: سارکوسیســتیده) (Lankester۱۸۸۲) گوسفند به روش کانترایمونوالکتروفورزیس و مقایسه آن با یافته های کشتارگاهی. مجله پژوهش و سازندگی، شماره۸۹، صفحه ۳۲-۲۸.

6- Amin Pour, A., Hosseini, SH. and Shayan, P. (2011) Comparative genotyping of *Echinococcus granulosus* infecting buffalo in Iran using cox1 gene. *Parasitol. Res.*108:1229–1234.

7- Ahmadi, N. and Dalimi, A. (2006) Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. *Infect. Genet. Evol*. 6: 85–90.

8- Aboazakham, A.A. and Romia, S.A. (1990) Evaluation of immunodiagnostic test in detection of trichinosis in experimentally infection rates. *J. Egyptian Soci. Parasitol*. 20 (2): 573-578.

9- Bowles, J., Blair, D. and MacManus, D.P. (1992) Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol*. 54:165–174.

10- Chamekh, M.; Facon, B.; Dissous, C.; Haqque, A. and Capron, A. (1990) Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope radioimmuno assay for diagnosis of hydatid disease. *J. Immunol. Methods*. 134 (1): 129-137.

11- Deka, D.K. and Gaur, S.N.S. (1990) Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of *Taenia hydatigena* cysticercosis in goats. *Vet. Parasitol*. 37: 223-228.

12- Dyachenko, V., Pantchev, N., Gawlowska, S., Globokar, M.V. and Bauer, Ch. (2008) *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Vet.*

(2008) *Echinococcus granulosus* strain differentiation in Iran based on sequence heterogeneity in the mitochondrial 12s rRNA *gene. J. Helminthol.*4: 1–5.

19- Shapire, S.Z.; Bahr, G.M. and Hira, P.R. (1992) *Helminthes of domesticated animals.* 7th Ed., Baillier and Tindal, London, pp: 119-127.

20- Sharbatkhori, M., Kia, E.B., Fasihi Harandi, M., Jalalizand, N., Zahabiun, F. and Mirhendi, H. (2009) Comparison of five simple methods for DNA extraction from *Echinococcus granulosus* protoscolices for PCR amplification of ribosomal DNA. *Iranian J. Parasitol.* 4(2):54-60.

21- Sharbatkhori, M., Fasihi Harandi, M., Mirhendi, H., Hajialilo, E., Beigom, K. and Kia, E.B. (2011) Sequence analysis of cox1 and nad1 genes in *Echinococcus granulosus* G3 genotype in camels (*Camelus dromedarius*) from central Iran. *Parasitol. Res.* 108:521–27.

22- Vevategui, M., Moro, P., Guevara, A. and Gilman R.H. (1992) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of hydatid disease. *J. Clin. Microbiol.* 30 (6): 1557-1561.

23- Zare-bidaki, M., Mobedi, I., Naddaf, S.R., Kia, E.B., Mahmudi, M., Piazak, N., Nekouie, H., Ahari, S.S., Habibzadeh, Sh. and Siavashi, M.R. (2009) Prevalence of Echinococcus spp. Infection using coproantigen ELISA among canids of Moghan plain, Iran. *Iranian J. Publ. Health*. 38(1); 112-118.

Parasitol. 157(3-4): 244-253.

13- Fasihi Harandi, M., Hobbs, R.P., Adams, P.J., Mobedi, I., Morgan-Ryan, U.M. and Thompson, R.C.A. (2002) Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitol*. 125:367–373.

14- Moro, P.L., Garcia, H.H., Gonzales, A.E, Bonilla, J.J., Verastegui, M. and Gilman, R.H. (2005) Screening for cystic echinococcosis in an endemic region of Peru using portable ultrsonography and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay. *Vet. Parasitol*. 96 (4): 2442-246.

15- Pathak, K.M.L., Gaur, S.N.S. and Garge, S.K. (1984) Countercurrent immunoelectrophoresis, a new technique for the rapid serodiagnosis of porcin cysticercosis. *J. Helminthol.* 58: 321-324.

16- Pagana, T.J. and Pagana, K.D. (2009) *Mosby's Manual of Diagnostic and laboratory Tests*. 4th Ed., Mosby Publisher. pp. 498-499, 559-560.

17- Poretti, D., Felleisen, E., Grimm, F., Pfidter, M., Teuscher, F., Zuercher, C., Reichen, J. and Gottsten, B. (1999) Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *Am. J. Ttro. Med. Hygiene*. 66 (2): 193-198.

18- Rostaminejad, M., Nazemalhosseini Mojarad, E., Nochi, Z., Fasihi Harandi, M. Cheraghipour, K. Mowlavi, G.R. and Zali, M.R.