بررسی تخم تریکوسترنژیلوس های جدا شده از گوسفندان منطقه اصفهان به روش *PCR-RFLP*

نادر پسته چیان[۱]، مهدی بقایی[۲]، حسینعلی یوسفی[۳]

خلاصه

سابقه و هدف: تریکوسترنژیلوس یکی از انگلهای مشترک انسان و دام است که آلودگی به آن معضلی اقتصادی و بهداشتی قلمداد می‌گردد. لذا در این مطالعه، تخم کرم گونه‌های مختلف تریکوستنرنژیلوس جدا شده از مدفوع گوسفندان منطقه اصفهان به روش *PCR-RFLP* و با استفاده از قطعه *rDNA-ITS2* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: مطالعه به روش توصیفی بر روی محتویات دستگاه گوارش ۷۰ راس گوسفند کشتار شده در کشتارگاههای شهر اصفهان و خوراسگان انجام پذیرفت. تخمهای انگل با روش مستقیم و فلوتاسیون جدا و تخم کرم گونه‌های تریکوسترنژیلوس براساس شاخصهای ریخت شناسی، شناسایی و جمع‌آوری شدند، سپس با روش *PCR-RFLP* مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه ژنوتیپی *DNA* ژنومی تخم کرمها، استخراج شد و واکنش *PCR* با پرایمراختصاصی قطعه *rDNA-ITS2* انجام گرفت. محصول *PCR* هر ایزوله توسط آنزیمهای محدودکننده *RsaI - HinfI - DraI* هضم و بر روی ژل آگارزالکتروفورز شد و از آنها عکس تهیه گردید.

یافته‌ها: با توجه به تشابه مرفولوژی تخم گونه‌های مختلف تریکوسترنژیلوس در زیر میکرسکوپ تشخیص افتراقی آنها امکان پذیر نمی باشد، لذا تشخیص با استفاده از الگوی ژنوتیپی تخم کرمها به روش *PCR-RFLP* انجام پذیرفت. اندازه محصول *PCR* و *DNA* استخراج شده از تخم کرمها یکسان و حدود ۳۳۰ نوکلئوتید بود ولی الگوی *PCR-RFLP* گونه‌ها با یکدیگر متفاوت بود. پس از هضم محصول *PCR* آنها با آنزیم *RsaI* دو قطعه حدود ۱۳۸ و ۱۹۰ نوکلئوتیدی مشاهده شد. محصول *Trichostrungylus PCR* به دست آمده، با آنزیم *DraI* هضم نشد، اما سه گونه *T.vitrinus T.aziei* و *T.colubrifornois* هضم شدند و دو قطعه حدود ۱۱۰ و ۲۱۵ نوکلئوتیدی در *T.axei* و *T.colubriformis* رؤیت گردید که الگویی مشابه همدیگر داشتند. اما *T.vitrinus* واجد دو قطعه حدود ۱٤۵ و ۱۸۵ نوکلئوتیدی بود. از بین چهار گونه فوق تنها محصول *PCR* تریکوسترنژیلوس *Colubriformis* با آنزیم *HinfI* هضم شد و دو قطعه حدود ۹۰ و ۲۳۸ نوکلئوتیدی روی ژل اگارز مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به تنوع گونه‌های انگلی و عدم تشخیص افتراقی آنها به روش میکروسکوپی پیشنهاد می‌شود با استفاده از پرایمرها و آنزیمهای محدودکننده مختلف، از روش *PCR* در تشخیص گونه‌های انگلی مورد نظر استفاده شود.

واژگان کلیدی: تاکسونومی، ایران، تریکوسترنژیلیوس، *RFLP*، *PCR*، *ITS2*، *rDNA*، *DraI*، *HinfI*، *RsaI*

۱- استادیار، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی

۲- دانشیار، عضو هیأت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی

۳- مربی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی

تاریخ دریافت مقاله: ۸٤/۱/۳۱

تاریخ تایید مقاله: ۸٤/۱۰/۱۰

پاسخگو: دکتر نادر پسته چیان

✍ اصفهان، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی

مقدمه

نماتودهای تریکوسترنژیلوس عامل بیماری تریکوسترونژیلیازیز و انگل مهره‌داران، انسان و عمدتاً دامها و نشخوارکنندگان اهلی و وحشی می‌باشند و گسترشی جهانی دارند (۲۰،۲۱،۲۵). آلودگیهای شدید در انسان باعث ایجاد کم‌خونی، لاغری، اختلالات روده‌ای و اسهال مزمن می‌شوند. آلودگی انسانی از کشورهای زیادی همچون ایران، انگلستان، روسیه، عراق، آلمان، هند، چین و رومانی گزارش شده است (۲۱،۲۲). در ایران تریکوسترنژیلیازیس به خصوص در مناطق روستایی اصفهان، عشایر بختیاری، مناطق کوهستانی آذربایجان، استانهای شمالی، آبادان، تهران، کرمانشاه، بوشهر، بندرعباس و کازرون با درصد آلودگی بین ۰/۵ تا ۸۰ درصد گزارش شده است (۱۹،۲۲،۲۳،۲٤). تاکنون ۱۱ گونه تریکوسترنژیلوس در دامها شناسایی شده است که ۷ گونه آن بین انسان و حیوانات گیاهخوار، مشترک بوده است. آلودگی در حیوانات، از نقطه نظر دامپزشکی اهمیت خاصی دارد طوری که بعضی از گونه‌ها مثل تریکوسترنژیلوس کولبریفورمیس و هموئکوس کونتورتوس شدیداً بیماریزا و حتی کشنده می‌باشند. این انگل با کاهش رشد دام و محصولات دامی (شیر، گوشت و پشم) باعث خسارتهای اقتصادی فراوان می‌شود (۲۵،۲٦،۲۷). در مناطق روستایی که دامداری به شکل سنتی رواج دارد به دلیل

Archive of SID

www.SID.ir

بعضی آداب و رسوم خاص و انجام رفتارهای غیربهداشتی رایج، مجاورت محل نگهداری دامها با محل زندگی انسان، استفاده از کودهای انسانی و حیوانی در مزارع، عدم دفع صحیح فضولات دام و انسان و مهاجرت مداوم دامها به مراتع (بطوریکه بیش از ٤٥ درصد سطح خاک ایران محل تردد دامهای عشایر می‌باشد) آلودگی خاک با تخم انگل بسیار زیاد است. لذا از آلودگی به این انگل، یک بیماری زئونوز با خطرات بالقوه انتقال و استقرار در مناطق آندمیک است که به دلیل مشکلات کنترل و درمان بیماریهای مشترک انسان و دام، بعنوان یک معضل بهداشتی و اقتصادی قلمداد می‌شود. با توجه به اینکه انجام هرگونه تحقیقات بیولوژیک روی میکروارگانیسمها باید بر پایه تشخیص و طبقه بندی صحیح استوار باشد، مطالعات سیستماتیک درباره این گروه از کرمها لازم و حائز اهمیت فراوان است. عفونت همزمان با بیش از یک گونه نماتود و شباهت تخم انواع آنها (به غیر از جنس نماتودیروس *Nematodirus*) افتراق آنها از یکدیگر را غیرممکن می‌سازد. انگلها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی، اثرات پاتولوژیک روی میزبان، نوع میزبان و یا ناحیه جغرافیایی شناسایی می‌شوند که غالباً جهت تعیین هویت دقیق آنها کافی نیست (۲۷، ۱٦، ۸، ٦، ٥، ٤، ۳). با ورود روشهای مولکولی به عرصه علوم بیولوژی در سالهای اخیر بسیاری از مشکلات تاکسونومیستها در تعیین هویت انگلها و انجام مطالعات سیستماتیک با حساسیت و اختصاصیت بالا، برطرف شده است. این تکنولوژی بعنوان یک ابزار طبقه بندی خصوصاً مواقعی که از نظر وجود شاخصهای ریخت‌شناسی محدودیت وجود دارد، نمونه با کیفیت مناسب در دسترس نیست و یا کلید تشخیصی جهت تعیین گونه وجود ندارد، کاربرد خوبی دارد. با انتخاب ژن و مارکر ژنتیکی مناسب که توانایی تشخیص اختصاصی در حد گونه را داشته باشد می‌توانیم بر بسیاری از محدودیتهای روشهای سنتی در تعیین هویت دقیق انگلها فائق آییم (۱۱، ۱۰، ۹). مطالعات نشان می‌دهند که قطعه *rDNA-ITS2* بعنوان یک مارکر ژنتیکی مناسب در تشخیص بسیاری از گونه‌های انگلی (۱،۱۷،۱۸) و بخصوص گونه نماتودهای استرونژیلیده و تریکوسترنژیلیده کاربرد دارد (۱۵، ۱٤، ۱۳، ۱۲، ۷). فنآوری *Restriction fragment length polymorphism(RFLP)* عبارت است از تجزیه *DNA* استخراج شده به وسیله یک یا چند اندونوکلئاز محدودالاثر (۱۸،۸). شناسایی دقیق گونه‌ها از نظر اختصاصی بودن میزبان، بیماریزایی، اقدامات درمانی و ایجاد مقاومت در برابر داروها، بعنوان اولین قدم در انجام مطالعات اپیدمیولوژی و برنامه های کنترل و پیشگیری و تشخیص و درمان حائز اهمیت می باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی بر روی محتویات دستگاه گوارش ۷۰ راس گوسفند کشتار شده در کشتارگاههای شهر اصفهان و خوراسگان طی سال ۱۳۸٤ انجام شد. محتویات روده کوچک هر راس دام بطور مجزا داخل ظرفهای پلاستیکی نیم لیتری ریخته شده و به آزمایشگاه انگل شناسی منتقل گردید. تخمها به روش مستقیم تشخیص و فلوتاسیون (محلول آب نمک اشباع) جدا و تغلیظ گشتند و تخم کرمهای تریکوستزنژیلوس بر اساس شاخصهای ریخت‌شناسی و کلیدهای تشخیصی، در حد جنس شناسایی شدند (٤، ٥، ٦، ۱۸، ۲۲، ۳).

این تخم کرمها پس از شسته شدن با بافر *PBS* حداقل پنج بار فریز و ذوب شدند. سپس به آنها *SDS* و *Proteinase K* اضافه شد و *DNA* ژنومی با روش *Phenol/Chloroform* استخراج و با *QIAamp Tissue Kit spin columns (QIAGEN)* خالص‌سازی گردید. واکنش *PCR* شامل ۱۰۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲۵ میلی مولار *dNTP*، یک واحد آنزیم *Taq DNA polymeras*، ۲ میلی مولار *MgCl2*، بافر مخصوص *PCR* و آب مقطر تا حجم ۵۰ میکرولیتر بود که با شرایط و پارامترهای ذیل انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. آنگاه مراحل *Denaturation* با دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، *Annealing* با دمای ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و *Extention* با دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۰ بار تکرار شدند. نمونه‌ها بعد از مراحل فوق نیز به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه قرار گرفتند، با پرایمرهای رفت: *(NC1:5-`ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT-3`)* و پرایمر برگشت: *(NC2:5-`TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3`)* تعداد ۳۳۰ نوکلئوتید از ژن *ITS2* ایجاد شد. محصول *PCR* در کنار مارکر وزنی روی ژل اگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نوار *DNA* با دستگاه *Transilluminator* با طول موج *UV* مشاهده و از آن عکس تهیه گردید. محصول *PCR* هر نمونه بطور جداگانه با هر یک از آنزیمهای *DraI,HinfI* و *RsaI* در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ ساعت هضم گردید و سپس روی ژل اگارز ۳ درصد الکتروفورز شد و مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مقایسه ریخت شناسی بین میانگین اندازه طول و عرض تخم کرمهای جدا شده از گوسفندان از آزمون *T.test* استفاده شد.

نتایج

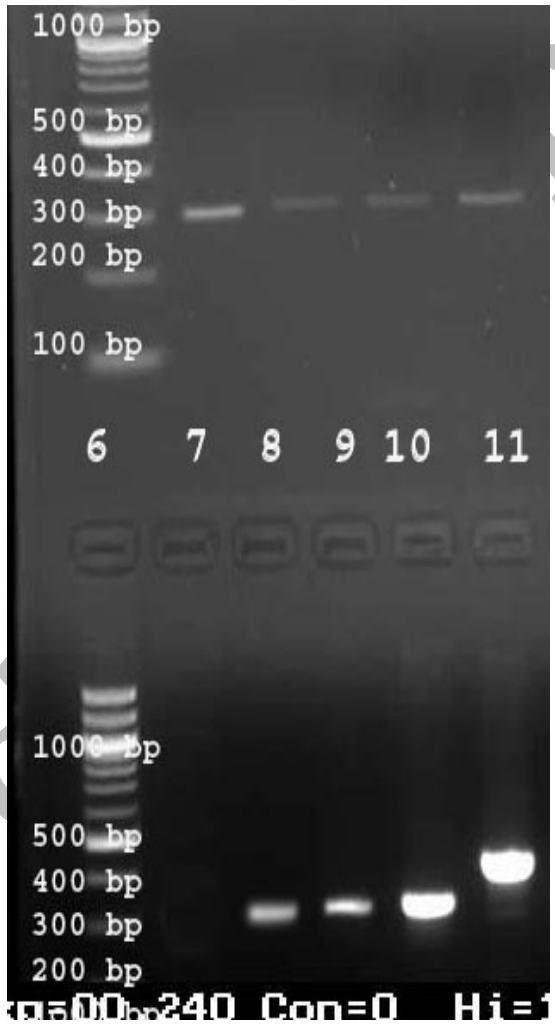
Archive of SID

www.SID.ir

نـتایج ریخـت شناسی: بر اساس خصوصیات مرفولوژی، تخـم کـرم گونـه هـای انگـل از یکدیگر قابل تفکیک نمی باشد بنابرایـن، مقایسـه بیـن میانگیـن انـدازه شاخصهای طول وعرض تخمهای تریکوسترنژیلوس جدا شده از گوسفند هیچگونه اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

نـتایج بررسـی ژنوتیپی با روش *RFLP-PCR*: در بررسی حاضر تـنها بـر اسـاس الگـوی ژنوتیپی تخم تریکوسترنژیلوسها با روش *RFLP-PCR* چهارگونـه تریکوسـترنژیلوس *T.vitrinus* *T.axei* , *T.probulurus, colubriformis* شناسایی شدند.

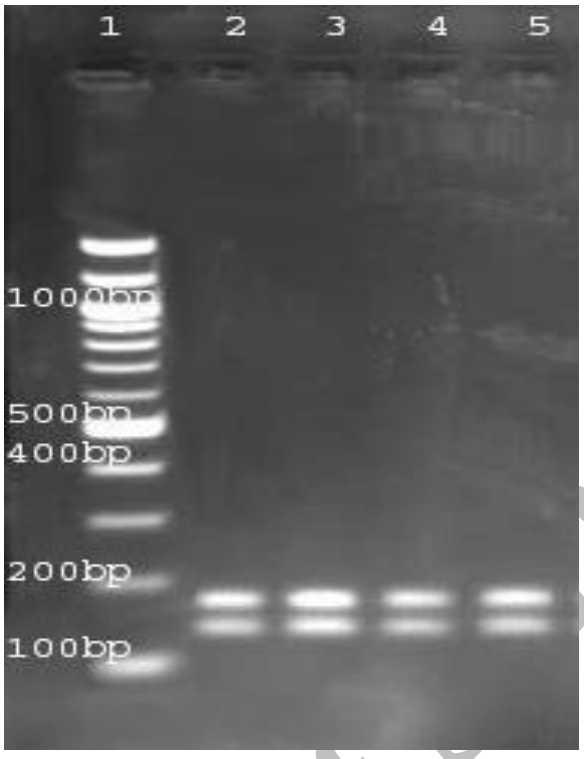
محصول *PCR* تخم تریکوسترنژیلوسها بعد از الکتروفورز روی ژل آگـارز ۲ درصـد الگویی یکسان و حدود *330bp* نشان دادند، در کنترل منفی نوار *DNA* دیده نشد در حالیکه در محصول *PCR* کنـترل مثبـت، *DNA* تخـم کرم نکاتور آمریکانوس باندی حـدود *450bp* و همونکـوس کونـتورتوس، تریکوسـترنژیلوس ویتریـنوس و آنکیلوستوم دئودنال استاندارد باندی حدود *330bp* را نشان دادند (شکل شماره ۱).



تصویرشماره ۱- مقایسه الگوی محصولات *PCR* قطعه *rDNA-ITS2* ایزوله‌های تخم تریکوسترنژیلوس روی ژل آگارز ۲درصد. شماره۱، ٦ شناساگر مولکولی، شماره ۲ *Trichostrongylus.axei*، شماره ۳ *T.viterinus*، شماره ٤ *T.colubriformis*، شماره ٥ *T. probolurus*، شماره ۷ کنترل منفی، شماره ۸ تا۱۱ کنترل مثبت، شماره ۸ *T.viterinus* ، شماره ۹ *Haemonchus contortus* ، شماره۱۰ *Ancylostoma duodenale*، شماره۱۱ *Necator americanous*

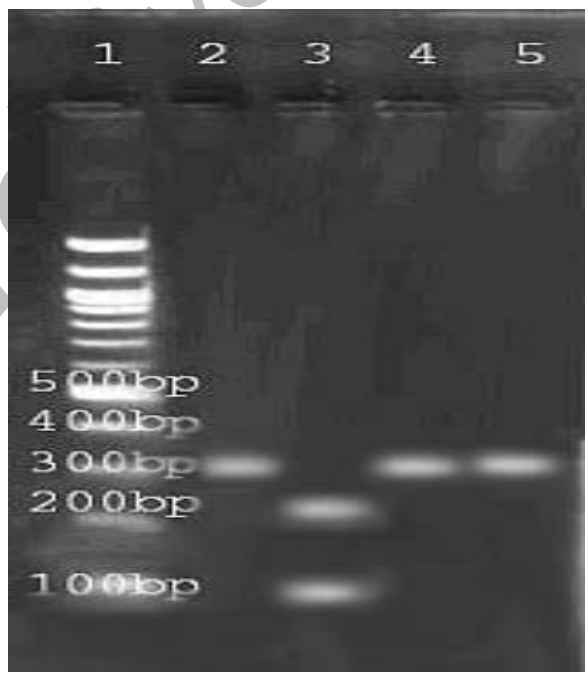
محصـول *PCR* تخـم تریکوسترنژیلوسها با آنزیم *RsaI* هضـم شـد و در هـر چهارگونـه دو قطعـه حـدود ۱۳۸ و ۱۹۰ نوکلئوتیدی روی ژل اگارز مشاهده گردید (شکل شماره۲).

www.SID.ir



تصویرشماره ۲- الگوی محصولات*PCR-RFLP* قطعه *rDNA-ITS2* ایزوله‌های تخم تریکوسترنژیلوس برش داده شده با آنزیم *RsaI*، شماره ۱ شناساگر مولکولی، شماره۲ *Tricostrongylus axei*، شماره ۳ *T.viterinus*، شماره ٤ *T. colubriformis*، شماره ٥ *T. probolurus*

محصـول *PCR* تخم تریکوسترنژیلوسها با آنزیم *HinfI* هضـم شـد و تـنها در محصـول *PCR* تریکوسـترنژیلوس *Colubriformis* دو قطعه حدود ۹۰ و ۲۳۸ نوکلئوتیدی روی ژل مشاهده شد (شکل شماره۳)



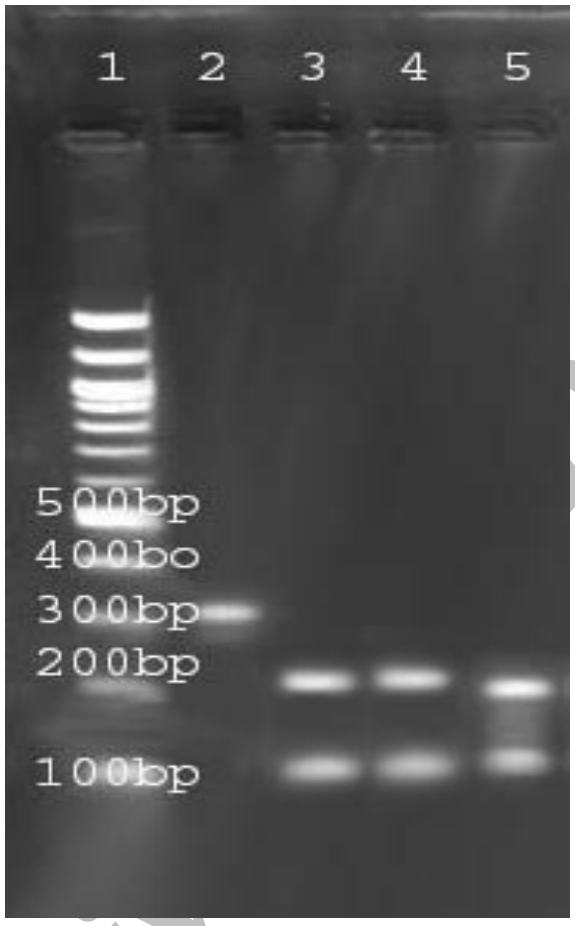
تصویرشماره ۳- الگوی محصولات*PCR-RFLP* قطعه *rDNA-ITS2* ایزوله‌های تخم تریکوسترنژیلوس برش داده شده با آنزیم *HinfI*، شماره ۱ شناساگر مولکولی، شماره ۲ *T. probolurus*، شماره ۳ *T. colubriformis*، شماره ٤ *T.axei*، شماره ٥ *T.viterinus*

محصـول *PCR* تخـم تریکوسترنژیلوسها با آنزیم *Dra1* واکـنش داده، محصول *PCR* تخم تریکوسترنژیلوس پروبولوروس بـا آنـزیم *Dra1* هضـم نشد، اما سه گونه دیگر هضم شدند و دو قطعـه حـدود ۱۱۰ و ۲۱۵ نوکلئوتـید از هضـم محصـول *PCR*

Archive of SID

www.SID.ir

گونـه‌های *T.axei* و *T.colubriformis* روی ژل مشاهده گردید کـه نشـان مـی‌دهد الگوی مشابه همدیگر دارند. از هضم محصول *PCR* گونـه *T.vitrinus* دو قطعـه حدود ۱٤٥ و ۱۸٥ نوکلئوتید روی ژل اگارز رؤیت شد (شکل شماره٤).



تصویرشماره ٤- الگوی محصولات*PCR-RFLP* قطعه *rDNA-ITS2* ایزوله‌های تخم تریکوسترنژیلوس برش داده شده با آنزیم *DraI*، شماره ۱ شناساگر مولکولی، شماره ۲ *T. probolurus*، شماره ۳ *T. colubriformis*، شماره ٤ *T.axei*، شماره ٥ *T.viterinus*

بحث

در ایـن مطالعـه تخـم کرم تریکوسترنژیلوس گوسفندان، جـدا شـده از مدفـوع دامهـای مـنطقه اصـفهان را کـه از نظـر ریخـت شناسـی کـاملا شـبیه یکدیگر بودند، را بر اساس الگوی ژنوتیپـی، بـا روش *RFLP-PCR* تعیین گونه شدند. بعد از تکثیر قطعـه *rDNA-ITS2* با پرایمرهای فوق هیچگونه اختلافی از نظر انـدازه آمپلـیکون، بیـن هر چهار گونه تریکوسترنژیوس شناسایی شـده در ایـن بررسی دیده نشد. اندازه محصول *PCR* حدود۳۳۰ بـاز بـود، این نتایج مبین آن است که تکنیک *PCR* با استفاده از پرایمـرهای فـوق‌الذکـر بـه تنهایـی قـادر بـه تفکیک گونه های تریکوسـترنژیلوس از یکدیگـر نیسـت و بـه نوعـی مؤیـد نـتایج تحقیقات *Gasser* و همکاران و مطالعات بقایی روی کرمهای بالغ ایـن جنس می‌باشد (۲۷، ۱٤، ۱۳). الگوی الکتروفورزی حاصل از هضـم محصـول *PCR* بـا آنـزیمهای محدودکننـده *RsaI,HinfI,DraI*، گونه‌های تریکوسترنژیلوس منطقه اصفهان را از یکدیگـر تفکـیک مـی‌کند. با توجه به مطالعات سایر محققین و بررسـی حاضـر بـه نظر می رسد که قطعه *rDNA-ITS2* به علت داشتن نواحی حفاظت شده وسیع (بخشی اززئوم که در طول زمان کمـتر دچـار تغیـیرات شده است) همچنین استفاده از پرایمرهای عمومـی *NC1* و *NC2* که اختصاصی ناحیه *ITS* می باشند جهت شناسایی گونه‌های تریکوسترنژیلوس منطقه اصفهان مناسب باشد.

نتایج حاصل از تأثیر آنزیمهای محدودکننده روی ایزوله‌های منطقه اصفهان مشابه مطالعات *Gasser* و همکاران که روی ایزوله‌های کرمی و تخم کرم دامهای مناطقی از اروپا و استرالیا انجام گرفت، می‌باشد (۱۳،۱٤). بنابراین صرفنظر از نتایج مربوط به الگوی *RFLP* مربوط به گونه *T.probulurus* که به نظر می‌رسد قبلا مطالعه‌ای توسط آنها روی این گونه صورت نگرفته است، با مقایسه الگوی بدست آمده، هیچ تفاوتی بین الگوی

Archive of SID

www.SID.ir

RFLP گونه‌های گزارش شده توسط Gasser و همکاران با الگوی RFLP ایزوله‌های منطقه اصفهان وجود ندارد. مطالعه ژنوتیپی روی تخم نماتودهای تریکوسترنژیلوس نمونه‌های مدفوع با تکنیک RFLP-PCR برای اولین بار در ایران انجام گرفت و گونه T.probolurus برای اولین بار با RFLP-PCR تعیین مشخصات گردید. در این بررسی ایزوله‌های تخمهای چهار گونه تریکوسترنژیلوس با روش RFLP-PCR درمنطقه اصفهان شناسایی و تائید گردیدند (۲۷).

نتیجه‌گیری

کاربرد این روش در مطالعات آینده روی ایزوله‌های انسانی (تعیین گونه ازروی تخم تریکوسترنژیلوسهای دفع شده در نمونه مدفوع یا لاروهای حاصله از محیط کشت) همچنین در مواقعی که از نظر وجود کلیدهای تشخیصی محدودیتی وجود دارد (تشخیص کرمهای ماده تریکوسترنژیلید از یکدیگر و یا تشخیص تخم و لارو و یا شناسایی ایزوله‌هایی که ناقص بوده) و یا شاخصهای ریخت‌شناسی کافی جهت تعیین دقیق گونه نداشته باشند، نیز ثمربخش خواهد بود. همچنین بعنوان یک ابزار مهم جهت رفع ابهامات موجود در انجام مطالعات اپیدمیولوژی (چرخه زندگی والگوی انتقال آلودگی به انسان وسایرمهره داران) کاربرد خواهد داشت.

تقدیر و تشکر

از آقایان دکتر ایرج موبدی استاد محترم انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و دکتر شاهرخ رنجبر بهادری استادیار محترم انگل شناسی دانشگاه آزاد جهت راهنمایی‌های ارزنده و تایید تشخیص ریخت شناسی نمونه‌های مبهم، همچنین از آقای دکتر Ton Polderman رئیس گروه انگل شناسی دانشگاه LUMC کشور هلند به جهت در اختیار گذاشتن DNA استاندارد تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Gasser R. ***Genomic and genetic research on bursate nematodes.Significance , implications and prospects.*** *Int J Parasitol. 2000; 30: 509–534.*

2. Chilton N. ***Common secondary structures for the second internal transcribed spacer pre-rRNA of two subfamilies of trichostrongylid nematodes.*** *Int J Parasitol. 1998; 28: 1765-1773.*

3. Anderson RC. ***CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates.*** *CAB , international university press, Cambridge.1989.*

4. Yamaguti S. ***Systema Helminthum,The Nematodes of vertebrates.*** *interscience publishers, New York. 1961.*

5. Durette-Desset MC. ***CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates.*** *Keys to the genera of the superfamily Trichostrongyloidea , 1983: 1-68.*

6. Gibbon L. ***A key for the identification of genera of the nematode family Trichostrongylidae****. Journal of Helminthology. 1982; 56:185-233.*

7. Hoste H. ***Lack of intraspecific variation in the second internal transcribed spacer (ITS-2) of Trichostrongylus colubriformis ribosomal DNA.*** *Int J Parasitol. 1993; 23: 1069–1071.*

8. Kennedy MW. ***Parasitic Nematodes, Molecular Biology****. CABI publishing, 2001;53-71.*

9. McManus DP. ***Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics.*** *Int J Parasitol. 1996; 26: 687–704.*

10. Andrew RH. ***Multilocus enzyme electrophoresis a valuable technique for providing answeres to problems in parasite systematics.*** *Int J Parasitol. 1999; 29: 213- 253.*

11. Gaseer RB. ***PCR-based technology in veterinary parasitology.*** *Vet . Parasitol. 1999 ; 84: 229–258.*

12. Warwick NG. ***Extensive DNA polymorphism with in and between two strain of Trichostrongylus colubriformis .*** *Int J Parasitol. 1994; 24: 719 -725.*

13. Gaseer RB. ***Species identification of trichostrongyle nematodes by PCR-linked RFLP.*** *Int J Parasitol, 1994;24: 291–293.*

14. Newton LA. ***Genetic markers for strongylid nematodes of livestock defined by PCR-based restriction analysis of spacer rDNA.*** *Acta Trop. 1998; 69: 1–15.*

15. Hoste H. ***Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of Trichostrongylus*** *(Nematoda: Trichostrongylidae). Int J Parasitol.1995; 25: 75–80.*

16. Skerjabin KI. ***Strongylata.Keys to parasitic nematodes****. E.J.Brill,New York. 1952; 3.*

17. Gasser RB. ***Molecular taxonomic,diagnostic and genetic studies of parasitic helminthes.*** *Int J Parasitol, 2001; 31: 860-864.*

18. Anderson T. ***Population biology of parasitic nematodes :Applications of genetic markers.*** *Adv parasitol. 1998; 41: 220-273.*

19. Ghadirian H. ***Present status of trichostrongyliasis in iran.*** *Am J Trop Med. 1975; 24: 935-941.*

20. Soulsby E. ***Helminths, Arthropods and Protozoa of domestica animal.*** *Billieve Tindall edition, 1982.*

21. Beaver PC. ***Clinical parasitology.*** *9th edtion: Philadelphia, Lea and Febiger:1984:289-291.*

22. Markel EK. ***Medical parasitology.*** *8th edition. New York: Churchil livingstone: 1998.*

Archive of SID

www.SID.ir

23. Ghadirian E. ***Socio-agricultural factors and parasitic infections in the Caspian littoral region of Iran.*** *Trop Geogr Med. 1979; 31:485-491.*
24. Ghadirian E. ***A Human infection with Trichostrongylus capricola in Iran.*** *Am J Trop Med Hyg, 1974; 23:1002-1003.*

۲۵. اسلامی علی. **کرم شناسی دامپزشکی**. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۷٦، جلد دوم: نماتودهاوآکانتوسفالها: ۳۰۷- ٤۲٦.

۲٦. موبدی ایرج. **مطالعه تاکسونومیک انگلهای کرمی دستگاه نشتخوارکنندگان در استان اذربایجان شرقی**. طرح تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۰.

۲۷. بقایی مهدی. **تعیین گونه نماتودهای تریکوسترنژیلوس با تکنیک** RFLP-PCR **دراصفهان**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ، تابستان ۱۳۸٤: سال ۲۳، شماره۷۷. صفحات٤۲-٤۸.

۲۸. محمودزاده ع. در ترجمه **کاربرد روشهای مولکولی در انگل شناسی تحلیلی**، میشل، تی روگن. دانشگاه بقیه ا لله (عج)، ۱۳۷۹، ۷۸-۹۵

۲۹. قدیریان اسماعیل، **درس سیستماتیک کرمها**. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۲ (جلداول: تریکوسترنژیلوئیده ا).

Archive of SID

www.SID.ir