

بررسی تخم تریکوسترنزیلوس 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: تریکوسترنزیلوس 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 تریکوسترنزیلوس 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 تریکوسترنزیلوس 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 آگارز الکتروفورز شد و از آنها عکس تهیه گردید.

یافته‌ها: با توجه به تشابه مرفولوژی تخم گونه‌های مختلف تریکوسترنزیلوس در زیر میکروسکوپ تشخیص افتراقی آنها امکان پذیر نمی‌باشد، 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 *Trichostrongylus PCR* به دست آمده، با آنزیم *DraI* هضم نشد، اما سه گونه *T. vitrinus*، *T. colubriformis* و *T. colubriformis* 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 ۱۴۵ و ۱۸۵ نوکلئوتیدی بود. از بین چهار گونه فوق تنها محصول PCR تریکوسترنزیلوس *Colubriformis* با آنزیم *HinfI* هضم شد و دو قطعه حدود ۹۰ و ۲۳۸ نوکلئوتیدی روی ژل آگارز 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، تریکوسترنزیلوس، *RsaI*، *HinfI*، *DraI*، *rDNA*، *ITS2*، *PCR*، *RFLP*.

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: ۸۴/۱/۳۱

پاسخگو: دکتر نادر پسته چیان تاریخ تایید مقاله: ۸۴/۱۰/۱۰

اصفهان، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی

مقدمه

آبادان، تهران، کرمانشاه، بوشهر، بندرعباس و کازرون با درصد آلودگی بین ۰/۵ تا ۸۰ درصد گزارش شده است (۱۹،۲۲،۲۳،۲۴). تاکنون ۱۱ گونه تریکوسترنزیلوس 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 تریکوسترنزیلوس کولبریفورمیس و همونکوس کوتورتوس 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،۲۶،۲۷). در مناطق روستایی که دامداری به شکل سنتی رواج دارد به دلیل

نماتودهای تریکوسترنزیلوس عامل بیماری تریکوسترونزیلیازیز 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 تریکوسترنزیلیازیز به خصوص در مناطق روستایی اصفهان، عشایر بختیاری، مناطق کوهستانی آذربایجان، استانهای شمالی،

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی بر روی محتویات دستگاه گوارش ۷۰ راس گوسفند کشتار شده در کشتارگاههای شهر اصفهان و خوراسگان طی سال ۱۳۸۴ 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 تریکوسترنزیلوس بر اساس شاخصهای ریخت شناسی و کلیدهای تشخیصی، در حد جنس شناسایی شدند (۴، ۵، ۶، 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*) خالص سازی گردید. واکنش *PCR* شامل ۱۰۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲۵ میلی مولار *dNTP* یک واحد آنزیم *Taq DNA polymerase*، 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 آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم پروماید 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 *RsaI* و *DraI*، *HinfI* در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ ساعت هضم گردید و سپس روی ژل آگارز 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

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 ۴۵ درصد سطح خاک ایران محل تردد دامهای عشایر می باشد) 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 می شود. 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 می سازد. انگلها بر اساس خصوصیات ریخت شناسی، اثرات پاتولوژیک روی میزبان، نوع میزبان و یا ناحیه جغرافیایی شناسایی می شوند که غالباً جهت تعیین هویت دقیق آنها کافی نیست (۲۷، ۱۶، ۸، ۶، ۵، ۴، 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 ریخت شناسی 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 می توانیم بر بسیاری از محدودیتهای روشهای سنتی در تعیین هویت دقیق انگلها فائق آییم (۱۱، ۱۰، ۹). مطالعات نشان می دهند که قطعه *rDNA-ITS2* بعنوان یک مارکر ژنتیکی مناسب در تشخیص بسیاری از گونه های انگلی (۱۸، ۱۷، ۱) و بخصوص گونه نماتودهای استروژنیلیده و تریکوسترنزیلیده کاربرد دارد (۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۲، ۷). فنآوری *Restriction fragment length polymorphism (RFLP)* عبارت است از تجزیه *DNA* استخراج شده به وسیله یک یا چند اندونوکلاز محدودالایتر (۸، ۱۸). 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.

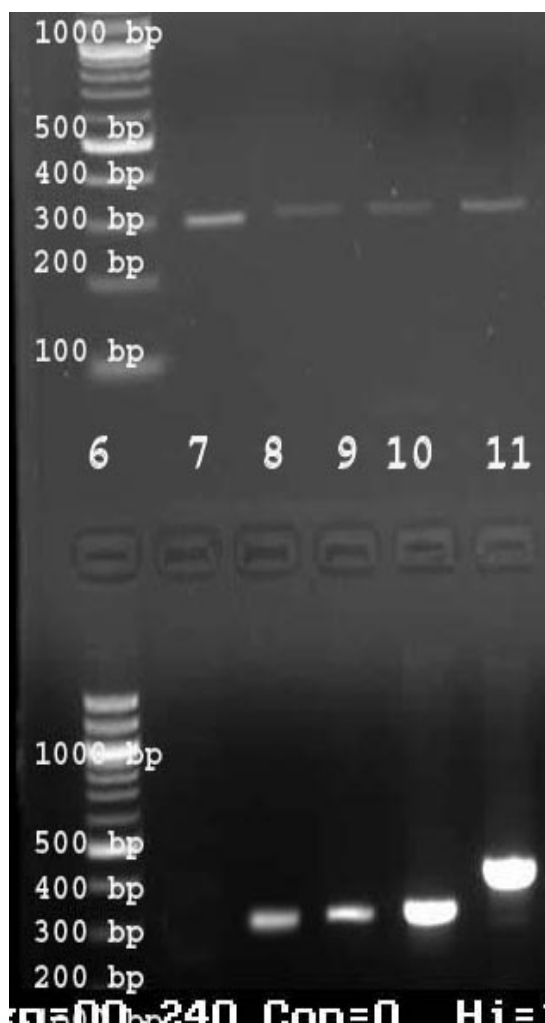
نتایج ریخت شناسی: بر اساس خصوصیات مورفولوژی، تخم کرم گونه های انگل از یکدیگر قابل تفکیک نمی باشد بنابراین، مقایسه بین میانگین اندازه شاخصهای طول و عرض تخمهای تریکوسترنزیلوس جدا شده از گوسفند هیچگونه اختلاف معنی داری نشان نداد.

نتایج بررسی ژنوتیپی با روش *RFLP-PCR*: در بررسی حاضر تنها بر اساس الگوی ژنوتیپی تخم تریکوسترنزیلوسها با روش *RFLP-PCR* چهارگونه تریکوسترنزیلوس *T. vitrinus*، *T. probolurus*، *T. colubriformis*، *T. axei* شناسایی شدند.

محصول *PCR* تخم تریکوسترنزیلوسها بعد از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد الگوی یکسان و حدود *330bp* نشان دادند، در کنترل منفی نوار *DNA* دیده نشد در حالیکه در محصول *PCR* کنترل مثبت، *DNA* تخم کرم نکاتور آمریکانوس باندی حدود *450bp* و همونکوس کونتورتوس، تریکوسترنزیلوس ویترینوس و آنکیلوستوم دئودنال استاندارد باندی حدود *330bp* را نشان دادند (شکل شماره ۱).

نتایج بررسی ژنوتیپی با روش *RFLP-PCR*: در بررسی حاضر تنها بر اساس الگوی ژنوتیپی تخم تریکوسترنزیلوسها با روش *RFLP-PCR* چهارگونه تریکوسترنزیلوس *T. vitrinus*، *T. probolurus*، *T. colubriformis*، *T. axei* شناسایی شدند.

محصول *PCR* تخم تریکوسترنزیلوسها بعد از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد الگوی یکسان و حدود *330bp* نشان دادند، در کنترل منفی نوار *DNA* دیده نشد در حالیکه در محصول *PCR* کنترل مثبت، *DNA* تخم کرم نکاتور آمریکانوس باندی حدود *450bp* و همونکوس کونتورتوس، تریکوسترنزیلوس ویترینوس و آنکیلوستوم دئودنال استاندارد باندی حدود *330bp* را نشان دادند (شکل شماره ۱).



تصویر شماره ۱- مقایسه الگوی محصولات *PCR* قطعه *rDNA-ITS2* ایزوله های تخم تریکوسترنزیلوس روی ژل آگارز ۲ درصد. شماره ۱، ۶ شناساگر مولکولی، شماره ۲ *Trichostrongylus axei*، شماره ۳ *T. vitrinus*، شماره ۴ *T. colubriformis*، شماره ۵ *T. probolurus*، شماره ۷ کنترل منفی، شماره ۸ تا ۱۱ کنترل مثبت، شماره ۸ *T. vitrinus*، شماره ۹ *Haemonchus contortus*، شماره ۱۰ *Ancylostoma duodenale*، شماره ۱۱ *Necator americanus*.

نوکلئوتیدی روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل شماره ۲).

محصول *PCR* تخم تریکوسترنزیلوسها با آنزیم *RsaI*

هضم شد و در هر چهارگونه دو قطعه حدود ۱۳۸ و ۱۹۰



تصویر شماره ۲- الگوی محصولات PCR-RFLP قطعه *rDNA-ITS2* ایزوله‌های تخم تریکوسترنزیلوس برش داده شده با آنزیم *RsaI*، شماره ۱ شناساگر مولکولی، شماره ۲ *Tricostrongylus axei*، شماره ۳ *T. viterinus*، شماره ۴ *T. colubriformis*، شماره ۵ *T. probolurus*

محصول *PCR* تخم تریکوسترنزیلوسها با آنزیم *HinfI* مشاهده شد (شکل شماره ۳)

محصول *PCR* تخم تریکوسترنزیلوسها با آنزیم *HinfI* مشاهده شد و تنها در محصول *PCR* تریکوسترنزیلوس



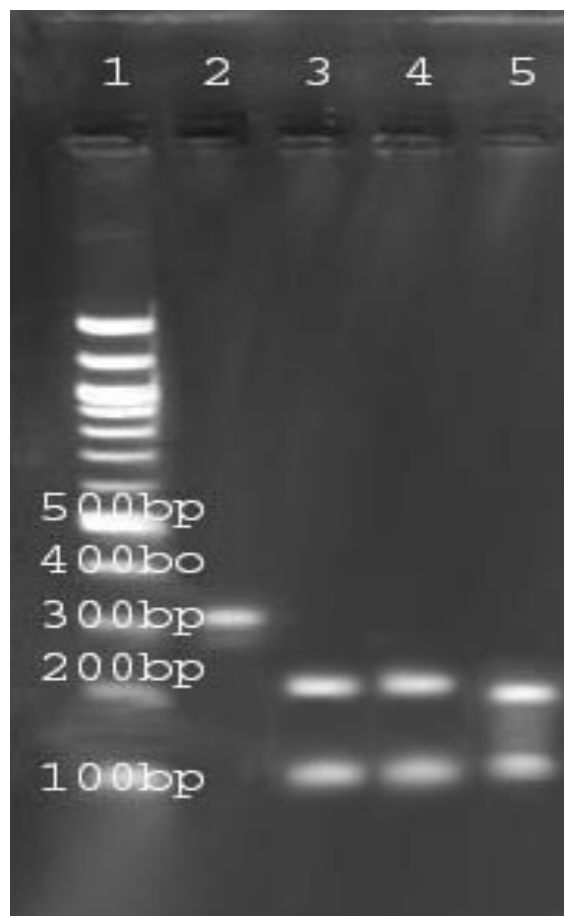
تصویر شماره ۳- الگوی محصولات PCR-RFLP قطعه *rDNA-ITS2* ایزوله‌های تخم تریکوسترنزیلوس برش داده شده با آنزیم *HinfI*، شماره ۱ شناساگر مولکولی، شماره ۲ *T. probolurus*، شماره ۳ *T. colubriformis*، شماره ۴ *T. axei*، شماره ۵ *T. viterinus*

با آنزیم *DraI* هضم نشد، اما سه گونه دیگر هضم شدند و دو قطعه حدود ۱۱۰ و ۲۱۵ نوکلئوتید از هضم محصول *PCR*

محصول *PCR* تخم تریکوسترنزیلوسها با آنزیم *DraI* واکنش داده، محصول *PCR* تخم تریکوسترنزیلوس پروبولوروس

PCR گونه *T.vitrinus* دو قطعه حدود ۱۴۵ و ۱۸۵ نوکلئوتید روی ژل آگارز رؤیت شد (شکل شماره ۴).

گونه‌های *T.colubriformis* و *T.axei* روی ژل مشاهده گردید که نشان می‌دهد الگوی مشابه همدیگر دارند. از هضم محصول



تصویر شماره ۴- الگوی محصولات PCR-RFLP قطعه *rDNA-ITS2* ایزوله‌های تخم تریکوسترنزیلوس برش داده شده با آنزیم *DraI*، شماره ۱ شناساگر مولکولی، شماره ۲ *T. probolurus*، شماره ۳ *T. colubriformis*، شماره ۴ *T. axei*، شماره ۵ *T. viterinus*

بحث
در این مطالعه تخم کرم تریکوسترنزیلوس گوسفندان، جدا شده از مدفوع دامهای منطقه اصفهان را که از نظر ریخت شناسی کاملاً شبیه یکدیگر بودند، را بر اساس الگوی ژنوتیپی، با روش *RFLP-PCR* تعیین گونه شدند. بعد از تکثیر قطعه *rDNA-ITS2* با پرایمرهای فوق هیچگونه اختلافی از نظر اندازه آمپلیکون، بین هر چهار گونه تریکوسترنزیلوس شناسایی شده در این بررسی دیده نشد. اندازه محصول *PCR* حدود ۳۳۰ باز بود، این نتایج مبین آن است که تکنیک *PCR* با استفاده از پرایمرهای فوق‌الذکر به تنهایی قادر به تفکیک گونه‌های تریکوسترنزیلوس از یکدیگر نیست و به نوعی مؤید نتایج تحقیقات *Gasser* و همکاران و مطالعات بقایی روی کرمهای بالغ این جنس می‌باشد (۲۷، ۱۴، ۱۳). الگوی الکتروفورزی حاصل از هضم محصول *PCR* با آنزیمهای محدودکننده

گونه‌های *RsaI, HinfI, DraI* تریکوسترنزیلوس منطقه اصفهان را از یکدیگر تفکیک می‌کند. با توجه به مطالعات سایر محققین و بررسی حاضر به نظر می‌رسد که قطعه *rDNA-ITS2* به علت داشتن نواحی حفاظت شده وسیع (بخشی از ژنوم که در طول زمان کمتر دچار تغییرات شده است) همچنین استفاده از پرایمرهای عمومی *NC1* و *NC2* که اختصاصی ناحیه *ITS* می‌باشند جهت شناسایی گونه‌های تریکوسترنزیلوس 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 (۱۴، ۱۳). بنابراین صرفنظر از نتایج مربوط به الگوی *RFLP* مربوط به گونه *T. probolurus* که به نظر می‌رسد قبلاً مطالعه‌ای توسط آنها روی این گونه صورت نگرفته است، با مقایسه الگوی بدست آمده، هیچ تفاوتی بین الگوی

در این مطالعه تخم کرم تریکوسترنزیلوس گوسفندان، جدا شده از مدفوع دامهای منطقه اصفهان را که از نظر ریخت شناسی کاملاً شبیه یکدیگر بودند، را بر اساس الگوی ژنوتیپی، با روش *RFLP-PCR* تعیین گونه شدند. بعد از تکثیر قطعه *rDNA-ITS2* با پرایمرهای فوق هیچگونه اختلافی از نظر اندازه آمپلیکون، بین هر چهار گونه تریکوسترنزیلوس شناسایی شده در این بررسی دیده نشد. اندازه محصول *PCR* حدود ۳۳۰ باز بود، این نتایج مبین آن است که تکنیک *PCR* با استفاده از پرایمرهای فوق‌الذکر به تنهایی قادر به تفکیک گونه‌های تریکوسترنزیلوس از یکدیگر نیست و به نوعی مؤید نتایج تحقیقات *Gasser* و همکاران و مطالعات بقایی روی کرمهای بالغ این جنس می‌باشد (۲۷، ۱۴، ۱۳). الگوی الکتروفورزی حاصل از هضم محصول *PCR* با آنزیمهای محدودکننده

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 و سایر مهره 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.

RFLP گونه‌های گزارش شده توسط *Gasser* و همکاران با الگوی *RFLP* ایزوله‌های منطقه اصفهان وجود ندارد. مطالعه ژنوتیپی روی تخم نماتودهای تریکوسترنزیلوس 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 تریکوسترنزیلوس با روش *RFLP-PCR* در منطقه اصفهان شناسایی و تایید گردیدند (۲۷).

نتیجه‌گیری

کاربرد این روش در مطالعات آینده روی ایزوله‌های انسانی (تعیین گونه از روی تخم تریکوسترنزیلوسهای 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 تریکوسترنزیلید از یکدیگر و یا تشخیص

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 answers 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 edition: Philadelphia, Lea and Febiger: 1984: 289-291.
22. Markel EK. **Medical parasitology.** 8th edition. New York: Churchil livingstone: 1998.

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. ۱۳۷۶، جلد دوم: نماتودها و آکانتوسفالها: ۳۰۷-۴۲۶.
۲۶. 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 تریکوسترنزیلوس با تکنیک RFLP-PCR در اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان، تابستان ۱۳۸۴: سال ۲۳، شماره ۷۷. صفحات ۴۲-۴۸.
۲۸. محمودزاده ع. در ترجمه کاربرد روشهای مولکولی در انگل شناسی تحلیلی، میشل، تی روگن. دانشگاه بقیه الله (عج)، ۱۳۷۹، ۷۸-۹۵.
۲۹. قدیریان اسماعیل، درس سیستماتیک کرمها. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۲ (جلد اول: تریکوسترنزیلوئیده ا).