تشخیص سرمی سارکوسیستوزیس گاومیش با آزمایش ELISA و مقایسه آن با روش هضم عضلانی

دکتر حسین حمیدی نجات[1] دکتر لیلی نبوی[1]* دکتر غلامحسین خواجه[2] دکتر مسعود قربانپور نجف آبادی[1] دکتر محمد راضی جلالی[2] دکتر عبد الرحمن راسخ[3]

دریافت مقاله: ۲۸ شهریورماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۴ آذرماه ۱۳۸۳

هدف: تشخیص سرمی سارکوسیستوزیس گاومیش با آزمایش الایزا و مقایسه آن با روش هضم عضلانی.

طرح: مطالعه مقطعی.

حیوانات: ۳۰۰ رأس گاومیش کشتارشده در کشتارگاه اهواز.

روش: خونگیری از گاومیش‌ها بصورت تصادفی وسپس ردیابی لاشه گاومیش‌ها و پس از آن بازرسی کامل لاشه از نظر وجود کیست و نمونه‌گیری از عضله مری جهت روش هضم عضلانی. سپس طراحی روش الایزا و مقایسه آن با روش هضم عضله و نهایتاً تعیین حساسیت و ویژگی روش الایزا.

تجزیه و تحلیل آماری: حساسیت و ویژگی الایزا با استفاده از جدول فراوانی موارد مثبت ومنفی واقعی وکاذب محاسبه گردید و بوسیله روش مک نمار (Mc nemar) درصد جوابهای مثبت مورد مقایسه قرارگرفت.

نتایج: آنتی بادی اختصاصی ضدسارکوسیستیس درآزمایش الایزا با استفاده از آنتی ژن برادی زوئیت سارکوسیستیس فوزی فورمیس (Sarcocystis fusiformis) در ۱۶۳ رأس (۵۴/۳ درصد) مورد تشخیص قرارگرفت در حالیکه درآزمایش هضم عضله با پپسین، ۱۷۱ رأس (۵۷ درصد) مثبت تشخیص داده شدند و کیست ماکروسکوپی نیز در ۶۰ رأس از گاومیش‌ها (۲۰ درصد) دیده شد. درصد جوابهای مثبت در مشاهدات کشتارگاهی در مقایسه با روشهای هضم عضلانی و الایزا اختلاف معنی داری داشت($p<0/01$)، در حالی‌که مقایسه درصد موارد مثبت در دو روش هضم عضله و الایزا اختلاف معنی داری را از خود نشان نداد ($p>0/05$). در نهایت حساسیت و ویژگی الایزا در مقایسه با هضم عضله بترتیب ۹۷ درصد و ۹۰/۵ درصد محاسبه گردید.

نتیجه گیری: روش الایزا با حساسیت و ویژگی بالا یک روش مناسب برای بررسی‌های اپیدمیولوژیک می‌باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۷۶-۲۷۳.

واژه‌های کلیدی: گاومیش، سارکوسیستیس فوزی فورمیس، سارکوسیستوزیس، الایزا، اپیدمیولوژی.

انواع انگلهای جنس سارکوسیستیس از شیوع قابل ملاحظه ای در حیوانات مختلف مخصوصاً نشخوارکنندگان برخوردار بوده که می توانند بعنوان یک عامل مهم کاهش تولید در حیوانات بشمار آیند (۷). این انگل از کوکسیدیاهایی است که انتشار جهانی داشته و در سیر تکاملی خود دارای دو میزبان است که میزبان اصلی از گوشتخواران و میزبان واسط از علفخواران و یا همه چیزخواران می‌باشد که بوسیله اسپوروسیست دفع شده از مدفوع

۱) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.
۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.
۳) گروه آمار دانشکده علوم ریاضی و کامپیوتر دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.
*) نویسنده مسؤول: L_nabavi@hotmail.com

Serodiagnosis of sarcocystosis in water buffalo (Bubalus bubalis) by ELISA test and its comparison with digestion method

Hamidinejat,H.,[1] Nabavi,L.,[1] Khadjeh, G. H.,[2] Ghorbanpoor, M.,[1] Razi Jalali,M.,[2] Rasekh,A.[3]

[1]Department of Pathobiology,Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahid Chamran Ahwaz,Ahwaz-Iran. [2]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,University of Shahid Chamran Ahwaz, Ahwaz-Iran. [3]Dpartment of Statistical Sciences, Faculty of Mathematics and Computer, University of Shahid Chamran Ahwaz, Ahwaz-Iran.

Objective: To compare the ELISA test with digestion method for dignosis sarcocystosis in water buffalo and estimate its sensitivity and specificity.

Design: Cross sectional study.

Animals: Three hundred slaughtered water buffaloes in Ahwaz abattoir.

Procedure: Blood and oesophageal muscles were examined. Oesophageal muscles were examined for sarcocystis by both macroscopic and microscopic (digestion method) examination.Then the ELISA test were designed and compared with digestion method.Finally its sensitivity and specificity were determined.

Statistical analysis: Sensitivity , specificity and 95% confidence intervals were determined by comparing the results obtained by the ELISA assay and digestion method. Mc nemar test were used for comparing the percentage of positive cases and their correlation.

Results: While specific anti-sarcocytis antibodies were detected in 54.3% of cases macroscpic and microscopic infection were 20% and 57%, respectively. Furthermore, while the positive results of the macroscopic examination significantly differed from those values of the digestion and ELISA methods($P<0.01$), no differences were observed between the positive results of the microscopic infection (digestion method) and the ELISA test ($P>0.05$).

Conclusion: ELISA test providing an effective and reliable means for detecting sarcocystosis in naturally infected water buffaloes. Its simplicity and ease of performance makes it particulary suitable for using in large-scale epidemiological surveys of livestock. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,3:273-276,2005.***

Keywords: buffalo, sarcocystosis, ELISA, epidemiology.

Corresponding author's email:L_nabavi@hotmail.com

میزبان اصلی آلوده می‌گردد (۱۴، ۸). آلودگی در میزبان واسط معمولاً به روشهای هیستولوژیک، تهیه گسترش از عضله و نیز هضم عضله جهت تشخیص مرونت، برادی زوئیت و یا کیست تشخیص داده می‌شود. Dubey و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش نمودند که روش هضمی یک روش بسیار حساس حتی جهت تشخیص آلودگی‌های خفیف می‌باشد (۷). این در حالی می‌باشد که روش هضم عضلانی با تمام مزایا، بدلیل قابلیت انجام پس از کشتار و سختی آن، جهت مطالعات غربالگری و اپیدمیولوژیک در سطح وسیع مناسب نمی‌باشد. تا کنون بررسی‌های مختلف ایمونوسرولوژیک نظیر ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، هماگلوتیناسیون، آگلوتیناسیون مستقیم، ایمونوبلات، الایزا و دات الایزا جهت ردیابی آنتی بادی‌های اختصاصی ضد سارکوسیستیس در حیوانات مختلف صورت گرفته است (۲۱، ۲۰، ۱۸، ۱۷، ۱۰، ۷، ۶، ۵). در این مطالعه تشخیص سرمی سارکوسیستوزیس گاومیش به روش الایزا با استفاده از آنتی ژن برادی زوئیت سارکوسیستیس فوزی فورمیس و مقایسه آن با روش هضم عضلانی و نهایتاً محاسبه حساسیت و ویژگی الایزا جهت تعیین اعتبار آن برای بررسیهای وسیع اپیدمیولوژیک مورد بررسی قرارگرفته است.

مواد و روش کار

نمونه برداری - در فاصله مهر ۱۳۸۲ تا پایان اسفند ۱۳۸۲ از تعداد ۳۰۰ رأس گاومیش در کشتارگاه اهواز خونگیری بعمل آمد و سرم آن در ۲۰- درجه سانتی گراد جهت آزمایش الایزا نگهداری گردید. هریک از گاومیش‌ها ردیابی شده و پس ازکشتار و پوست کنی، عضلات مختلف آن از نظر وجود آلودگی ماکروسکوپی به دقت مورد بازرسی قرار گرفته و سپس حداقل ۵۰ گرم از عضله مری جهت انجام روش هضم عضلانی بوسیله پپسین برداشت و برای مشاهده برادی زوئیت‌ها مورد مطالعه میکروسکوپی قرار می‌گرفت (۷).

روش هضم عضلانی- عضلات نمونه گیری شده از هر گاومیش در ۱۰ برابر حجم از محلول پپسین ۱ درصد و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به مدت ۱۲ الی ۲۴ ساعت قرار داده شده و سپس عضله هضم شده توسط میکروسکوپ نوری جهت ردیابی برادی زوئیتها مورد بررسی قرار می‌گرفت (۷).

تهیه آنتی‌ژن- پس از جداسازی کیستهای نسبتاًدرشت سارکوسیستیس فوزی فورمیس، کیستها جهت آزادسازی برادی زوئیت‌ها در بافر فسفات (۷/۲ =PH) لـه شده و سپس ۶ مرتبه عمل ذوب و انجماد صورت گرفت. محلول به‌دست آمده ۲ بار و هر بار بمدت ۲۰ ثانیه سونیکه گردیده و پس از آن با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی به عنوان آنتی ژن محلول برداشته شد و نهایتاً غلظت پروتئین آن به روش کوماسی بلواندازه گیری گردید. (۱۸، ۷).

روش آزمایش الایزا- جهت آشکار سازی آنتی بادی، صفحات مخصوص آزمایش حاوی ۹۶ حفره با ۱/۵ میکروگرم آنتی ژن رقیق شده در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر بی کربنات پوشیده شده، پس ازاین مرحله عمل مسدود کردن با بافر بلوکینگ (۵ درصد شیرپس چرخ در بافرفسفات محتوی ۰/۰۵ توئین (tween))

جدول ۱- توزیع فراوانی سارکوسیستیس براساس روشهای ماکروسکوپی، هضمی و آزمایش الایزا

روش آزمایش	تعداد نمونه	تعداد موارد مثبت
مشاهده ماکروسکوپی	۳۰۰	۶۰ (٪۲۰)
هضم عضلانی	۳۰۰	۱۷۱ (٪۵۷)
الایزا	۳۰۰	۱۶۳ (٪۵۴/۳)

بمدت ۲ ساعت صورت می‌گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سرم‌های مورد آزمایش با رقت ۱ به ۱۰۰ در بافر فسفات در هر حفره ریخته شده، یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می‌شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر سرم کونژوگه پراکسیداز ضد IgG گاو با رقت ۱ به ۳۰۰ در حفره‌ها ریخته شده و پس از یک ساعت قرار گرفتن در ۳۷ درجه سانتیگراد و نهایتاً ریختن ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای حاوی کروموژن (بافر سیترات با PH معادل ۵/۵) در هر حفره، قرائت جذب بر روی قرائت کننده الایزا با صافی جذب ۴۰۵ نانومتری صورت می‌گرفت. بین هریک از مراحل فوق ۳ بار شستشو با بافر فسفات حاوی توئین صورت می‌گرفت.

جذب نوری ۵۰ نمونه سرم گاومیش هایی که در روش هضمی و مشاهدات ماکروسکوپی فاقد هرگونه برادی زوئیت و یا کیست بودند بروش الایزا قرائت و پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار، با اضافه کردن ۲ برابر انحراف معیار به میانگین مذکور، میزان cut-off تست محاسبه گردید (۱۹، ۱۸).

پس از طراحی الایزا، ۳۰۰ نمونه سرم گاومیش بررسی شد و حساسیت و ویژگی روش الایزا محاسبه گردید. در ضمن درصد آلودگی روشهای مشاهدات کشتارگاهی، هضم عضلانی و الایزا مورد مقایسه قرار گرفته و به منظور مقایسه درصد جوابهای مثبت در روشهای مذکور از آزمون آماری مک نمار (Mc Nemar) استفاده گردید.

نتایج

میانگین جذب نوری در تعداد ۵۰ نمونه که از نظر وجود کیست و برادی زوئیت در روش هضمی منفی بودند، ۰/۰۱۹±۰/۱۵۴ به‌دست آمد که با در نظر گرفتن ۲ انحراف معیار ($\bar{X}$+ 2SD)، میزان cut-off در این روش برابر ۰/۱۹۲ محاسبه گردید.

در این مطالعه و با روش الایزا نمونه‌های سرمی با جذب بالای ۰/۱۹۲ مثبت تلقی گردید که بر این اساس میزان آلودگی بروش الایزا ۵۴/۳ درصد بوده درحالی‌که درصد آلودگی گاومیش‌های مورد مطالعه بر اساس مشاهدات کشتارگاهی و هضم عضلانی بترتیب ۲۰٪ و ۵۷ درصد بوده است (جدول ۱).

درصد جوابهای مثبت در مشاهدات کشتارگاهی در مقایسه با هضم عضلانی و الایزا بر اساس آزمون آماری مک نمار اختلاف معنی داری داشت ($p<0/01$) درحالی‌که اختلاف درصد جوابهای مثبت در روشهای هضم عضلانی و الایزا بر

جدول۲- مقایسه نتایج دو روش هضم عضلانی و الایزا در تشخیص آلودگی به سارکوسیستوزیس گاومیش در نمونه‌های تحت مطالعه.

		وضعیت آلودگی در روش هضم عضلانی		
		آلوده (مثبت)	غیرآلوده (منفی)	جمع
نتایج آزمون الایزا	مثبت	۱۵۸	۵	۱۶۳
	منفی	۱۳	۱۲۴	۱۳۷
	جمع	۱۷۱	۱۲۹	۳۰۰

حساسیت= ۹۷ درصد، ویژگی= ۹۰/۵ درصد

اساس آزمون مک نمار اختلاف معنی داری نشان نداد ($p>0/05$).

حساسیت روش الایزا نسبت به هضم عضلانی (حساسیت معادل ۱۰۰ درصد)، ۹۷ درصد (۰/۹۹ - ۰/۹۴ با حدود اطمینان ۹۵ درصد) و ویژگی آن نسبت به روش هضم عضلانی (ویژگی معادل ۱۰۰ درصد)، ۹۰/۵ درصد (۰/۹۲ - ۰/۸۸ با حدود اطمینان ۹۵ درصد) محاسبه گردید (جدول ۲)

بحث

روشهای معمول تشخیص سارکوسیستیس برای مطالعات غربالگری در سطح وسیع و نیز در دام زنده امکانپذیر نمی باشند(۷). جهت رفع این معضل می توان از روشهای سرولوژیک استفاده نمود. علیرغم موفقیتهای بدست آمده، اعتبار این روشها در ارتباط با تشخیص آلودگی طبیعی کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۱۹). در این بین روش الایزا بعنوان یک روش معتبر، ساده و نسبتاً ارزان مطرح می باشد و این در حالیست که بر اساس جستجوهای صورت گرفته گزارشی در ارتباط با روش الایزا در تشخیص سارکوسیستوزیس گاومیش مشاهده نشده است.

در این بررسی جهت جداسازی موارد مثبت و منفی بر اساس قرائت جذب نوری در روش الایزا و نیز حذف مواردی که حاصل واکنش متقاطع می باشند، میانگین جذب نوری در ۵۰ نمونه سرم منفی با ۲ انحراف معیار برابر ۰/۱۹۲ محاسبه و بعنوان cut-off آزمایش در نظر گرفته شد. جهت تعیین off-cut الایزا در تشخیص سارکوسیستوزیس گاو، Savini و همکاران در سال ۱۹۹۷ از میانگین جذب نوری با ۲ انحراف معیار و Shi و Zhao در سال ۱۹۸۷ از میانگین جذب نوری با ۱/۹۶ انحراف معیار استفاده نمودند (۱۹، ۱۸).

مطالعه حاضر ارتباط مناسبی را بین آزمایش الایزا و روش هضمی در تشخیص سارکوسیستوزیس گاومیش مشخص نمود که با نتایج سایر محققین تقریباً همخوانی داشته است.

راضی جلالی و همکاران در سال ۱۳۸۱ میزان آلودگی به روش مشاهده کشتارگاهی در کشتارگاه اهواز را ۱۸/۶ درصد و به روش dob smear، ۵۳/۵ درصد گزارش نموده‌اند (۲). در بررسیهای صورت گرفته دیگر بر روی گاومیش، در عراق ۱۵/۶ درصد در روش مشاهده کشتارگاهی، ۹۳/۳ درصد و ۸۸/۶ درصد در روشهای هضم عضلانی و ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم (۱۳)، در فیلیپین ۶۵ درصد براساس روش dob smear(۴) و در ویتنام ۷۹ درصد (۱۱) در مطالعه بافت شناسی، آلوده به انگل سارکوسیستیس بودند. در ضمن در مطالعات انجام شده در سایر کشورها آلودگی به انگل سارکوسیستیس در گاو به شرح ذیل می باشد:

مغولستان: ۹۰ درصد (dob smear) (۹)، الجزایر: ۶۴/۵ درصد (ایمونوفلورسانس غیر مستقیم) (۱۶)، سریلانکا: ۶۹/۳ درصد (الایزا) (۱۲)، و چین ۷۹/۲۵ درصد (الایزا) و ۷۷/۳۶ درصد (هضم عضلانی) (۱۹).

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این بررسی فراوانی سارکوسیستیس در مشاهده کشتارگاهی ۲۰ درصد و در روش هضمی و الایزا بترتیب ۵۷ درصد و ۵۴/۳ درصد بوده است که نشان دهنده آلودگی نسبتاً بالای گاومیش‌ها می‌باشد، ضمن اینکه بین درصد جوابهای مثبت در مشاهدات کشتارگاهی و دو روش الایزا و هضم عضله اختلاف معنی داری مشاهده شد($P< 0/01$) در حالیکه بین درصد جوابهای مثبت در الایزا و هضم عضله اختلاف معنی داری دیده نشد ($P> 0/05$)، که بیانگر همبستگی بسیار خوب در تشخیص موارد مثبت بین دو روش فوق می‌باشد.

Shi و Zhao در سال ۱۹۸۷ نیز هیچ گونه تفاوت معنی داری ($P< 0/05$) را بین دو روش الایزا و هضم عضلانی در تشخیص موارد مثبت مشاهده ننمودند (۱۹). وجود اختلاف معنی دار بین مشاهدات ماکروسکوپی در مقیسه با الایزا و هضم عضله احتمالاً به این دلیل است که برخی از گاومیش‌های آلوده هنوز به مرحله تشکیل کیست نرسیده‌اند و در بسیاری نیز کیست هنوز در حال سپری کردن مراحل میکروسکوپی می‌باشد.

در این مطالعه حساسیت و ویژگی الایزا با استفاده از آنتی ژن برادی زوئیت بترتیب ۹۷ و ۹۰/۵ درصد محاسبه گردید. در ۵ مورد نمونه‌ها از نظر هضمی منفی و در روش الایزا مثبت بودند. احتمالاً این امر مربوط به گاومیش‌هایی است که آلودگی آنها در مراحل اولیه، یعنی مرحله تشکیل مروزوئیت‌ها می‌باشد و هنوز به مرحله تشکیل کیست و برادی زوئیت نرسیده‌اند. این در حالیست که بر اساس مطالعات صورت گرفته به روش الایزا و ایمنوفلورسانس غیر مستقیم بر عدم وجود واکنش متقاطع، بین سارکوسیستیس و سایر انگلهای این خانواده از جمله نئوسپورا و توکسوپلاسما تأکید شده است (۲۱، ۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۳، ۱۰).

Savini و همکاران در سال ۱۹۹۷ حساسیت و ویژگی الایزا در تشخیص سارکوسیستوزیس گاو با استفاده از آنتی ژن برادی زوئیت را بترتیب ۹۵ درصد و ۸۴ درصد و با استفاده از آنتی ژن مروزوئیت را بترتیب ۹۸ درصد و ۹۷ درصد گزارش نموده‌اند (۱۸).

به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان می دهد که روش الایزا با توجه به حساسیت و ویژگی بالایی که دارد و نیز جهت سهولت کار و صرفه جویی در زمان، یک روش بسیار مناسب برای تشخیص سارکوسیستوزیس در گاومیش و احتمالاً سایر حیوانات می‌باشد و می توان آنرا بعنوان یک روش معتبر جهت بررسی های اپیدمیولوژیک پیشنهاد نمود.

References

۱. دلیمی اصل، ع .، خدا شناس، م .، نوری، ع .، مروتی، ح . (۱۳۷۸): مطالعه ریخت شناسی و فراریزبینی کیست سارکوسیستیس جدا شده از گاومیشهای خوزستان . پژوهش و سازندگی، شماره ۴۳، صفحه: ۴۹ - ۴۷.

۲. راضی جلالی، م .، خضرائی نیا، پ .، حدادزاده، ح، ر .، طاهری، م . (۱۳۸۰): بررسی فراوانی آلودگی به سارکوسیست در گاومیشهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز . مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه اهواز، سال چهارم، شماره ششم، صفحه: ۶۶- ۵۸.

3. Astrid,M.T. (1988): Comparison of Dot-ELISA, ELISA and IFAT for detection of IgG antibodies to Sarcocystis muris in experimentally infected and immunized mice. Vet Parasitol . 29: 89-104,1988.

4. Claveria, F .G., Cruz, M. J., Lim, R. S. (2000): Sarcocystis spp. Infection in Philippine water buffaloes (Bubalus bubalis) . Southeast Asian J Trop Med Public Health . 31:44-47,2000.

5. Durate, P. C., Daft, B. M., Conrad, P. A., Packham, A. E., Saville, W .J., Mackay, R. J., Barr, B. c., Wilson, W. D., Ng, T., Reed, S. M., Gardner, I. A . (2004) : Evaluation and comparison of an indirect flurescent antibody test for detection of antibodies to Sarcocystis neurona, using serum and cerebrospinal fluid of naturally and experimentally infected and vaccinated horses . J Parasitol. 90(2):379-386,2004.

6. Dubey, J. P., Mitchell, S. M., Morrow, J. K., Rhyan, J. C., Stewart, L. M., Granstrom, D. E., Romand, S., Saville, W. J., Lindsay, D. S . (2003): Prevalence of antibodies to Neospora caninum, Sarcocystis neurona, and Toxoplasma gondii in wild horses from central wyoming . J Parasitol . 89(4):716-720,2003.

7. Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (1989): Sarcocystosis of Animal and Man. CRC press Boca Raton, FL, pp:1-215.

8. Fayer, R., Johnson, A. J. (1973): Development of Sarcocystis fusiformis in calves infected with sporocysts from dogs. J Parasitol. 59:1135-1137,1973.

9 Fukuyo, M., Battsetseg, G., Byambaa, B. (2002): Prevalence of sarcocystis infection in meat-producing animals in Mongolia . Southeast Asian J Trop Med Public Health. 33(3): 490-495, 2002.

10. Habeeb, Y. S., Selim, M. A., Ali, M. S., Mahmoud, L. A., Abde Hadi, A. M , Shafei, A. (1996): Serological diagnosis of exteraintestinal sarcocystosis. J. Egypt . Soc. Parasitol . 26(2): 393-400, 1996.

11. Houng, L.T. (1999): Prevalence of Sarcocystis spp. In water buffaloes in Vietnam. Vet Parasitol. 86 (1): 33-39, 1999.

12. Kalubowila, D. G., Udagama-Randeniya, P. V., Perera, N. A., Rajapakse, R. P. (2004): Seroprevalence of Sarcocystis spp. In cattle and buffaloes from the wet and dry zones of Sri Lanka:a preliminary study . J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 51(2):89-93,2004.

13. Latif, B. M. A., Al-Delemi, J. K., Mohammed, B. S., Al-Bayati, S. M., Al-Amiry, A. M. (1999): Prevalence of Sarcocystis spp. In meat-producing animals in Iraq . Vet Parasitol. 84:85-90,1999.

14. Levine, N. D., Tadros, W. (1980): Named species and hosts of Sarcocystis (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). Syst. Parasitol . 2:42-60,1980.

15. Morsy, T. A., Abdel Mawla, M. M., Salama, M. M., Hamdi, K. N. (1994): Assessment of intact sarcocystis cystozoites as an ELISA antigen. J. Egypt. Soc. Parasitol. 24(1): 85-91,1994.

16. Nedjary, M. (2003): The occurrence of animal sarcocystosis in Algeria. Berl Munch Tierarzti Wochens Chr. 116 (3-4):139-141, 2003.

17. Savini, G., Dunsmore, J. D., Robertson, I. D. (1994): Evaluation of serological test system for the diagnosis of Sarcocystis cruzi infection in cattle using S. cruzi merozoite antigen. Vet Parasitol. 51 (3-4): 181-189, 1994.

18. Savini, G., Robertson, I. D., Dunsmore, J. D. (1997): Sensetivities and Specificifities of two ELISA tests for detecting infection with Sarcocystis in cattle of Western Australia. Prev. Vet. Med. 32 (1-2) :35-40, 1997.

19. Shi, L. Z., Zhao, H. Y. (1987): Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of antibodies against Sarcocystis spp. In naturally infected cattle in China. Vet Parasitol. 24 (3-4):185-194,1987.

20. Svobodova, V., Nevole, M. (1992): Diagnosis of sarcocystosis in sheep using the indirect fluorescence test and ELISA. Vet Med (Praha). 37(2):109-112, 1992.

21. Svobodova,V., Nevole, M. (1991): Use of ELISA for the diagnostics of ovine sarcocystosis. Folia Parasitol (Praha). 38 (4): 303-308, 1991.