Archive of SID

ارزیابی آنتی‌ژن‌های کیست هیداتیک در تشخیص هیداتیدوز به روش الایزای نقطه‌ای

الهام هوشمند[1*]، محمد داداش‌بیکی[1]

چکیده

الایزای نقطه‌ای یکی از روشهای تشخیص کیست هیداتیک است که حساسیت و ویژگی بالایی دارد. در این تحقیق، پنج آنتی‌ژن مختلف برای تشخیص کیست هیداتیک به روش الایزای نقطه‌ای با هم مقایسه شدند. این آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌ژن هموژنیزه پرتواسکولکس (HPA) ، آنتی‌ژن دیواره داخلی کیست (HLA) و آنتی-ژنهای مایع کیست شامل: آنتی‌ژن خام (CHFA)، آنتی‌ژن جوشانده (BAB) و آنتی‌ژن اتوکلاوه (AAB) بودند. برای انجام آزمون ابتدا آنتی‌ژن‌ها بر روی غشاء نیتروسلولز قرار داده شدند، سپس مرحله مسدودسازی با سرم آلبومین گاوی ۳٪ به مدت یک ساعت انجام گرفت. پس از شستشو با فسفات بافر سالین، غشاء برای یک ساعت در آنتی‌بادی اولیه (سرم مشخص از نظر آلودگی) و بعد از شستشوی مجدد با PBS، در آنتی-بادی ثانویه (آنتی‌بادی گونژوکه با پراکسیداز) قرار گرفت. برای قرائت نتایج که با رنگی شدن محل استقرار آنتی‌ژن مشخص می‌شد، از سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB) استفاده گردید. نتایج بررسی حاضر نشان داد حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن‌ها به ترتیب در مایع خام (۵۴/۸٪ و ۳۹/۱٪)، در مایع جوشانده (۵۴/۸٪ و ۵۶/۵٪)، در مایع اتوکلاو شده (۴۵/۲٪ و ۶۷/۴٪)، در پروتواسکولکس (۷۸/۶٪ و ۳۰/۴٪) و در دیواره (۵۷/۱٪ و ۵۰٪) می‌باشد. در این بررسی دو آنتی‌ژن هموژنیزه پروتواسکولکس و مایع اتوکلاو شده به ترتیب بالاترین حساسیت و ویژگی را نشان دادند. برای افزایش دقت در تشخیص هیداتیدوز بهتر است ابتدا نمونه‌های سرمی با یک آزمون با حساسیت بالا آزمایش شوند و سپس از آزمونی استفاده شود که دارای ویژگی بالاتری باشد.

واژگان کلیدی: الایزای نقطه‌ای، کیست هیداتیک، آنتی‌ژن

مقدمه

آلودگی به کیست هیداتیک در اثر ابتلا به مرحله نوزادی سستودی از خانواده تنیده به نام اکینوکوکوس ایجاد می‌شود. این بیماری یکی از مهمترین عفونتهای انگلی زئونوز بشمار آمده و روشهای مختلف سرمی جهت تشخیص این آلودگی روز به روز در حال توسعه و پیشرفت است. Parija (۱۹۹۸) الایزای نقطه‌ای را آزمون مناسبی جهت استفاده میدانی (مزرعه) دانسته و در شرایط آزمایشگاهی خاصی که تجهیزات و امکانات در سطح بالایی وجود ندارد، آن را کاربردی می‌داند.

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت
*-نویسنده مسئول el_hooshmand@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه حاصل نیز به راحتی با چشم غیر مسلح قابل قرائت بوده و نیاز به تجربه چندانی ندارد(۱۵). Wang و همکاران (۲۰۰۲) تشخیص آنتی‌ژن به روش الایزای نقطه‌ای سریع را که در عرض ۱۰ دقیقه انجام می‌شود، یک تست بالینی مفید برای تشخیص تفریقی کیستها در حین جراحی عنوان کردند(۲۲). محققان مختلفی حساسیت و ویژگی این آزمون را در تشخیص هیداتیدوز بررسی کرده‌اند، ولی تاکنون حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن‌های مختلف در این روش مقایسه نشده است. بنابراین در تحقیق حاضر سعی شده تا پاسخ‌دهی آنتی‌ژن‌های مختلف با روش الایزای نقطه‌ای در مهمترین میزبان واسط انگل در ایران (گوسفند) مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

۱-تهیه نمونه‌های سرمی: جمعا ۱۷۳ نمونه خون به روش نمونه‌گیری تصادفی از گوسفندان آماده کشتار تهیه شد. پس از کشتار این گوسفندان، لاشه و اندامهای داخلی آنها، از نظر وجود کیست هیداتیک و آلودگیهای انگلی دیگر نظیر فاسیولا، دیکروسلیوم و سایر آلودگیها بررسی شده و هر نمونه خون بر اساس شماره لاشه جهت تهیه سرم به آزمایشگاه ارسال گردید. سرمهای بدست آمده از نمونه‌های خون با ذکر شماره در فریزر$^{\circ}$c۲۰- قرار داده شد.

۲ – تهیه آنتی‌ژن: برای تهیه آنتی‌ژن تعدادی کبد آلوده گوسفند به کیست هیداتیک از کشتارگاه تهیه شد و پرتواسکولکسها با استفاده از سانتریفوژ جدا شدند (۳)، دیواره داخلی کیست نیز از سایر لایه‌ها جدا گردید. تهیه آنتی‌ژن‌ها از سه منبع مایع، پرتواسکولکس و دیواره داخلی کیست به شرح زیر انجام گرفت:

الف- آنتی‌ژن مایع کیست هیداتیک (Hydatid Fluid Antigen: HFA) با منشا مایع کیست هیداتیک سه نوع آنتی‌ژن تهیه و مورد استفاده قرار گرفت:

۱- الف- آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک (Crude hydatid Fluid Antigen: CHFA)

ابتدا مایع کیست توسط سرنگ ۵ سی‌سی تخلیه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵/۰۰۰ دور در $^{\circ}$c٤ سانتریفوژ شد، مایع رویی حاصله از سانتریفوژ برداشته شده و بعد از دیالیز، در داخل لوله‌های اپندورف درفریزر $^{\circ}$c۷۰- قرار گرفت تا به همین صورت در آزمایش نهائی استفاده گردد(۱۲).

۲- الف- آنتی‌ژن اتوکلاو مایع (Autoclaved Antigen B: AAB)

این آنتی‌ژن با استفاده از روش Njeruh و Gathuma(۱۹۸۹) تهیه شد. مایع خام کیست هیداتیک، در فشار ۱/٦٦ اتمسفر و حرارت $^{\circ}$c۱۱۰ به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شده و سپس سانتریفوژ نمونه در ۱۵/۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و در ٤ درجه سانتیگراد انجام شد. مایع رویی حاصل از سانتریفوژ به عنوان آنتی‌ژن اتوکلاوه مایع(AAB) در داخل لوله‌های اپندورف در فریزر $^{\circ}$c۷۰- قرار گرفت تا در آزمایش نهائی استفاده گردد(۱۳).

۳- الف- آنتی‌ژن جوشانده مایع (Boiled Antigen B: BAB)

آنتی‌ژن جوشانده مایع مطابق با روش Rogan و همکاران(۱۹۹۱) تهیه گردید. برای تهیه این آنتی‌ژن، مایع خام کیست هیداتیک، در حمام آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد، بعد از سانتریفوژ مایع رویی به عنوان آنتی‌ژن جوشانده مایع (BAB) در داخل لوله‌های اپندورف در فریزر $^{\circ}$c۷۰- قرار گرفت تا در آزمایش نهائی استفاده گردد(۱٦).

ب- آنتی‌ژن هموژنیزه پرتواسکولکس (Homogenated Protoscoleses Antigen: HPA) آنتی‌ژن هموژنیزه پرتواسکولکس با فریز و ذوب کردن مکرر پروتواسکولکسها همراه با سونیکه کردن آنها و سپس سانتریفوژ نمونه تهیه شد(٤).

ج- آنتی‌ژن دیواره (Hydatid Layer : HLA Antigen)

آنتی‌ژن لایه داخلی کیست هیداتیک بعد از جدا

www.SID.ir

Archive of SID

ساختن آن از دیواره کیست با هموژنیزاسیون دستی این لایه در فسفات بافرسالین (PBS, PH=7/4) و سانتریفوژ آن در ۱۵/۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه در ٤°c پس از استخراج مایع رویی تهیه گردید. لازم به ذکر است که همه نمونه‌ها بعد از تعیین غلظت پروتئین با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر میکروتیوب، جهت انجام مراحل بعدی در فریزر ۲۰°c – نگهداری شد.

۳ – آزمون الایزای نقطه ای:

جهت انجام آزمون الایزای نقطه‌ای غشاء نیترو سلولز به اندازه ۱ در ۱ سانتی‌متر بریده و در داخل چاهکهای پلیتهای ٢٤ خانه‌ای قرار داده شدند. با استفاده از سمپلر، ۱ میکرولیتر از هر آنتی‌ژن همراه با آنتی‌ژن‌های بدنی فاسیولا و دیکروسلیوم و کنترل منفی شامل آنتی‌ژن آیمریا تنلا بر روی هر گوشه کاغذ انتقال یافت. مرحله مسدود سازی با سرم آلبومین گاوی (BSA) ۳٪ در محلول فسفات بافر سالین حاوی ۰/۵٪ توئین ۲۰ به مدت یک ساعت انجام گرفت. پس از سه بار شستشو غشاء با فسفات بافرسالین (PBS, PH=7/4) و در کنار یخ، آن را به مدت یک ساعت در آنتی‌بادی اولیه (نمونه‌های سرمی) قرار داده و بعد از ۳ نوبت شستشو با PBS، به آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی گونژوکه با پراکسیداز، ساخت سیگما) انتقال یافت. پس از گذشت یک ساعت و شستشوی کامل غشاء، جهت مشخص شدن لکه در محل واکنش از سوبسترای دی آمینو بنزیدین استفاده گردید.

نتایج

از مجموع ۱۷۳ نمونه خون جمع‌آوری شده، ۱۳۰ سرم مناسب به دست آمد. زیرا یک سری از نمونه‌های خون همولیز شده و سرمی که از آنها استخراج شد، کدر بوده و قابل استفاده در آزمایش نبودند. از این ۱۳۰سرم، ٨٤ سرم مربوط به گوسفندان آلوده با کیست هیداتیک بوده (سرم مثبت) و ٣٦ سرم مربوط به گوسفندانی بود که فاقد آلودگی به کیست هیداتیک ماکروسکوپی بودند (سرم منفی). نتایج الایزای نقطه‌ای ٨٤ سرم مثبت در رابطه با ٥ آنتی‌ژن استخراج شده از کیست هیداتیک در جدول شماره ۱ و نتایج الایزای نقطه‌ای ٣٦ سرم منفی در رابطه با این ٥ آنتی‌ژن در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول شماره ۱ – نتایج آزمون الایزای نقطه‌ای ۸۴ سرم مثبت با آنتی‌ژن‌های مختلف در تشخیص کیست هیداتیک

نتیجه آزمایش	CHFA	BAB	AAB	HPA	HLA
مثبت	۴۶	۴۶	۳۸	۶۶	۴۸
منفی	۳۸	۳۸	۴۶	۱۸	۳۶

جدول شماره ۲ - نتایج آزمون الایزای نقطه‌ای ۴۶ سرم منفی با آنتی‌ژن‌های مختلف در تشخیص کیست هیداتیک

نتیجه آزمایش	CHFA	BAB	AAB	HPA	HLA
مثبت	۲۸	۲۰	۱۵	۳۲	۲۳
منفی	۱۸	۲۶	۳۱	۱۴	۲۳

بحث

در حال حاضر روشهای متعدد سرم شناسی جهت تشخیص هیداتیدوز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روشها بر اساس شناسایی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی اختصاصی کیست هیداتیک طراحی شده‌اند، ولی در تشخیص این بیماری علاوه بر تنوع و تعدد روشهای موجود، نوع آنتی‌ژن مورد استفاده با هدف جستجوی آنتی‌بادی در سرم بیمار، سبب شده است تا هر روشی از مزایا و معایبی مختص به خود برخوردار باشد (٦).

در بررسی حاضر از آنتی‌ژن‌های مختلفی شامل: آنتی‌ژن خام مایع کیست (CHFA)، آنتی‌ژن جوشانده مایع (BAB) و آنتی‌ژن اتوکلاوه مایع کیست (AAB) که همگی دارای منشا مایع کیست بودند، همچنین از دو آنتی‌ژن هموژنیزه پرتواسکولکس (HPA) و آنتی‌ژن

www.SID.ir

Archive of SID

دیواره (HLA) برای تشخیص موارد آلودگی به کیست هیداتیک در گوسفند به روش الایزای نقطه‌ای استفاده شد که خلاصه نتایج به دست آمده در جداول شماره ۱و ۲ نشان داده شده است.

Pappas و همکاران (۱۹۸٦) حساسیت ۹٦٪ و ویژگی ۹۸٪ را برای روش الایزای نقطه‌ای گزارش کرده و تاکید کردند که این روش سریع و اقتصادی است و با مقدار بسیار ناچیزی از آنتی‌ژن و نمونه سرمی قابل انجام است(۱٤). Rogan و همکاران (۱۹۹۱) حساسیت ۹٤٪ و ویژگی ۹۰/۵٪ را برای این آزمون به عنوان یک روش مزرعه‌ای (فیلد) گزارش کردند (۱٦). Romia و همکاران (۱۹۹۲) حساسیت و ویژگی این روش را به ترتیب ۸۸/۹٪ و ۹٦/۹٪ اعلام کرده و معتقدند که این روش یک آزمون غربالگری مناسب می‌باشد، ولی برای تشخیص آنتی‌ژن‌های جاری در خون از حساسیت کمی برخوردار است (۵۵/٦٪) که می‌تواند به علت حجم کم این آنتی‌ژن‌ها در خون و یا فقدان آنتی‌ژن آزاد در سرم در اثر اتصال با آنتی‌بادی و ایجاد کمپلکس آنتی‌ژن آنتی‌بادی باشد (۱۷).

Mcvie و همکاران (۱۹۹۷) حساسیت ۷٤٪ و ویژگی ۸۸٪ را برای روش الایزای نقطه‌ای در تشخیص آنتی‌ژن B باند شده به مالتوز و حساسیت ۹۳٪ و ویژگی ٦۵٪ را برای آنتی‌ژن B خام نشان دادند(۱۱). Sbihi و همکاران (۲۰۰۰) حساسیت ۹۵٪، و ویژگی ۱۰۰٪ (۱۸) و حدیقی و همکاران (۲۰۰۳) حساسیت ۹۷/۱٪ و ویژگی ۹۷/۳٪ را برای این روش گزارش کردند(۷). سیاوشی و همکاران (۲۰۰٤) در مقایسه ای که بین دو روش الایزای نقطه‌ای و ساندویچ الایزا در تشخیص هیداتیدوز انسانی انجام دادند، با استفاده از آنتی‌ژن خام مایع، حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۸/۷۵٪ را برای الایزای نقطه‌ای و حساسیت ۹۲/۲۲٪ و ویژگی ۹۸/۷۵٪ برای ساندویچ الایزا نشان دادند. آنها از بین این دو آزمون، الایزای نقطه‌ای را به دلیل کفایت بیشتر و انجام ساده‌تر توصیه کردند(۲۰). Shuklal و همکاران (۲۰۰۸) معتقدند که حساسیت و ویژگی الایزای نقطه‌ای در تشخیص کیستهای مغزی مشابه الایزا است و بر آن ارجحیت دارد، روش بسیار ساده، ارزان و مقرون به صرفه است، از طرفی در انجام آن نیازی به تجهیزات خاص آزمایشگاهی نمی‌باشد (۱۹). دلیمی اصل (۱۳۷۸) حساسیت آزمون الایزای نقطه‌ای را با استفاده از آنتی‌ژن B، ۱۰۰٪ و ویژگی آن را ۹۹٪ (۱) و جالوسیان (۱۳۷۹) حساسیت الایزای نقطه‌ای را ۱۰۰٪ و ویژگی آن را ۹۷/۵٪ گزارش کرده است(۲).

تاکنون حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن‌های مختلف با این روش مطالعه نشده است و این تحقیق اولین کار در این زمینه می‌باشد. تنها کار در این زمینه مربوط به Swarna و همکاران (۲۰۰۸) است که در آن ۳ آنتی‌ژن بررسی شده است. بر اساس این تحقیق، حساسیت آنتی‌ژن‌های دیواره کیست، پروتواسکولکس و مایع کیست به ترتیب ۹٦/٦٦٪ ، ۸٦/٦٦٪ و ۹۳/۳۳٪ و ویژگی هر ۳ آنتی‌ژن ۷۰٪ بدست آمد(۲۱).

در بررسی حاضر حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن‌های مورد استفاده به ترتیب درCHFA (۵٤/۸٪ و ۳۹/۱٪)، در BAB (۵٤/۸٪ و ۵٦/۵٪) در AAB (٤۵/۲٪ و ٦۷/٤٪)، در HPA (۷۸/٦٪ و ۳۰/٤٪) و در HLA (۵۷/۱٪ و ۵۰٪) تعیین گردید. مشترک بودن برخی آنتی‌ژن‌های کیست هیداتیک با سایر آلودگیهای انگلی، همچنین وجود برخی پروتئینها با منشاء میزبان و برخی آنتی‌ژن‌های غیر اختصاصی در مایع کیست هیداتیک میتواند باعث واکنشهای متقاطع در نتایج آزمونها و پاسخ مثبت کاذب گردد.

در بین آنتی‌ژن‌های مورد استفاده آنتی‌ژن اتوکلاو شده و آنتی‌ژن پروتواسکولکس به‌ترتیب بیشترین (٦۷/٤٪) و کمترین (۳۰/٤٪) ویژگی را نشان دادند. از طرفی واکنش متقاطع در ۷ نمونه که آلودگی به فاسیولا داشتند، دیده شد. این موضوع میتواند در اثر مشترک بودن برخی آنتی‌ژن‌ها بین فاسیولا و انکوسفر یا در اثر آلودگی به انکوسفر اکینوکوکوس باشد که هنوز فرصتی

www.SID.ir

Archive of SID

برای تشکیل کیست پیدا نکرده است و در تحقیقات مشابه از جمله تحقیقات حدیقی و همکاران (۲۰۰۳) و سیاوشی و همکاران (۲۰۰۵) نیز گزارش شده است. عواملی نظیر محل کیست و کامل و سالم بودن کیست در پیدایش پاسخ منفی کاذب موثرند. به طور کلی کیستهای کبدی پاسخ ایمنی بیشتری را نسبت به سایر اندامهای مبتلا ایجاد می‌کنند و کیستهای ریوی باعث حساسیت کمتری در تشخیص می‌شوند. کیستهای کاملا سالم کمترین واکنش ایمنی را موجب میشوند و افراد مبتلا به این نوع کیستها از نظر سرمی منفی خواهند بود. کیستهای مسن و یا کلسیفیه شده منجر به منفی شدن پاسخ آزمونهای سرمی میشوند. کیستهای موجود در مغز و طحال مانند کیستهای ریوی با تحریک ایمنی کمتری همراه هستند، از طرفی سوراخ یا پاره شدن کیست موجب تحریک دستگاه ایمنی و افزایش ترشح آنتی‌بادیها می‌شود (۸ و ۱۰).

در انتخاب یک روش تشخیصی باید به مواردی از جمله حساسیت و ویژگی آزمون، سهولت دسترسی به آن، هزینه‌های مربوط به آزمایش و موارد مثبت و منفی کاذب توجه داشت. موضوعاتی از قبیل تنوع در به کارگیری آزمون، کیفیت آنتی‌ژن، مشخصات جمعیت بیمار و ابتلا به سایر بیماریها باعث پیدایش تغییراتی درحساسیت و ویژگی آزمون می‌شود. بعضی آزمونها نظیر الایزا، لاتکس آگلوتیناسیون، ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم در تشخیص آنتی‌بادیهای ضد اکینوکوکوس از حساسیت بالایی برخوردار هستند. یک نمونه ممکن است با یک آزمون منفی و با روش دیگر مثبت تلقی گردد. پس برای افزایش حساسیت باید از چندین روش تشخیصی استفاده کرد(۵). حدیقی و همکاران (۲۰۰۳) معتقدند که این روش دارای بقای طولانی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی که اصل مهمی در تشخیص درمانگاهی در آزمایشگاه و مطالعه میدانی است، میباشد و در مقایسه با سایر روشها مزایای زیادی دارد که از جمله میتوان به قابلیت نگهداری آنتی‌ژن‌ها بعد از آماده‌سازی برای مدتی طولانی اشاره کرد. تعداد زیادی نمونه در مدت کوتاهی قابل آزمایش است. به دستگاه خاصی نیاز ندارد، بنابراین در مطالعه میدانی قابل اجراست. انکوباسیونها در دمای اتاق انجام میشود و در کل این روش، یک روش اختصاصی برای تشخیص سرمی هیداتیک انسانی است و پتانسیل بالائی برای استفاده میدانی و آزمایشگاه دارد(۷).

طبق نتایج این تحقیق، آنتی‌ژن مایع اتوکلاو شده بالاترین ویژگی (٦٧/٤٪) و آنتی‌ژن هموژنیزه پروتواسکولکس بالاترین حساسیت (٧٨/٦٪) را نشان دادند. به نظر میرسد برای افزایش دقت در تشخیص موارد هیداتیدوز، بهتر است ابتدا نمونه‌های سرمی با یک آزمون با حساسیت بالا آزمایش شوند و سپس از آنتی‌ژن‌های با ویژگی بالا نظیر آنتی‌ژن B که یک پروتئین مقاوم به حرارت است و در AAB وجود دارد، استفاده شود.

منابع

۱- جالوسیان، ف (۱۳۷۹): راه‌اندازی و ارزیابی روش DIG-ELISA برای تشخیص سرولوژیک هیداتیدوزیس و مقایسه آن با روش Dot-ELISA. پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس.

۲- دلیمی اصل، ع(۱۳۷۸): راه‌اندازی و ارزیابی آزمایش الایزای نقطه‌ای برای تشخیص هیداتیدوزیس انسانی. مجله دانشور ۲٤: صفحه ۳۷-٤۲

3- Abdel-Hafez, S. K., Kamhawi, S. A., (1997): Cystic echinococcosis in the Levant countries (Jordan, Palestinian Autonomy, Israel, Syria and Lebanon). In F.L. Andersen, H. Ouhelli & M. Kachani. (eds.) Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco. Provo, UT: Brigham Yound university: 292-316

www.SID.ir

Archive of SID

4- Allan, J. C., Craig, P. S., (1989): Coproantigens in gut tape worm infection. Hymenolepis diminuta in rats. Parasitol. Res. 76: 68-73

Biava, M. F., DOA, A., Fortier, B., (2001): Laboratory Diagnosis of Cystic Hydatic Disease. World J. Surgery. 25, 1: 4-10

5- Carmena, D., Benito, A., Eraso, E., (2006): Antigens for the immunodiagnosis of Echinococcus granulosus infection: An update. Acta Trop, 98(1):74-86

6- Hadighi, R., Mirhadi, F., Rokni, M. B., (2003): Evaluation of a dot-ELISA for the serodiagnosis of human hydatid disease. Pak. J. Med. Sci. 19, 4: 268-271

7- Kittelber, R., Reichel, M. P., Jenner, and J., (2002): Evaluation of three enzyme- linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of serum antibodies in sheep infected with Echinococcus granulosus. Vet. Parasitol. 110: 57-76

8- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. I., Randall, R. J., (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biolog. chem. 193: 265-275

9- Malgorzata, P., Stefaniak, J., (2001): Comparision of the dot immunobinding assay and two enzyme-linked immune sorbent assay kits for the diagnosis of liver cystic echinococcusis. Hepatol. Res. 21: 14-26

10- Mcvie, A., Ersfeld, K., Rogan, M. T., (1997): Expression and immunological charactrisation of Echinococcus granulosus recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. Acta. Trop. 67: 19-35

11- Moosa, R. A., Abdel-Hafez, S. K., (1994): Serodiagnosis and seroepidemiology of human unilocular hydatidosis in Jordan. Parasitol. Res. 80: 664-671

12- Njeruh, F. M., Gathuma, J. M., (1989): Diagnosis of human hydatid disease in surgically confirmed cases by the use of indirect haemagglutination test based on thermostable lipoprotein and on unfractionated hydatid cyst fluid. Ann. Trop. Med. Parasitol. 83: 229-303

13- Pappas, M. G., Schantz, P. M., Cannon, L. T.Sr., Wahlquist, S. P., (1986): Dot-ELISA for the rapid serodiagnosis of human hydatid disease. Diagn. Immunol. 4, 6: 271-6

14- Parija, S. C., (1998): A review of some sample immunoassays in the serodiagnosis of cystic hydatid disease. Acta. Trop. 70: 17-24

15- Rogan, M. T., Craig, P. S., Zeyhle, E., (1991): Evaluation a rapid of Dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 85: 773-777

16- Romia, S. A., Youssef, M. E., Handoussa, A. E., (1992): Dot-ELISA as a diagnostic test in hydatid disease. J. Egypt. Soc. Parasitol. 22: 603-610

17- Sbihi, Y., Rmigui, and A., (2000): Comparative sensitivity of six serological tests and diagnostic value of ELISA using purified andtigen in hydatisosis. J. Clin. Lab. Anal. 15: 14-18

18- Shuklal, N., Husain, N., Agarwal, G. G., Husain, M., (2008): Utility of cysticercus fasciolaris antigen in Dot ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis . Indian J. Med. Sci. 62, 6: 222-227

19- Siavashi, M. R., taherkhani, H., Rezaei, K., (2005): Comparision of Dot-ELISA and sandwich ELISA Diagnosis tests in Detection of Human Hydatidosis. Iranian Biomed. J. 9: 91-94

20- Swarna, S. R., Parija, S. C., (2008): Dot-Elisa for evaluation of hydatid cyst wall, protoscoleces and hydatid cyst fluid antigens in the serodiagnosis of cystic echinococcosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 50(4):233-6

21- Wang, Y., Bradshaw, H., Rogan, M.T., Craig, P.S., (2002): Rapid dot-ELISA for the detection of specific antigens in the cyst fluid from human cases of cystic echinococcosis. Ann. Trop. Med. Parasitol. 96(7): 691-694

www.SID.ir