Archive of SID

تشخیص سرولوژیکی آمیبیازیس به روش الایزا در انسان

ناهید آرین پور Ph.D.☆♦، مهاپاترا ت.م. M.D.★

☆گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش

★گروه انگل‌شناسی، انستیتو علوم پزشکی، دانشگاه‌بنارس، هند

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۴۱۸۵/۶۱۱، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، گروه میکروب‌شناسی

چکیده

* **هدف:** بررسی توان آنتی‌ژن تام (کرود) انتامیبا هیستولیتیکا و فراکشنهای آن (FI، FII و FIII) در تعیین ارزش آنتی‌بادیهای ضد آمیب به روش الایزا.

* **مواد و روشها:** سویه NIH:۲۰۰ انتامیبا هیستولیتیکا بطریق اگزنیک کشت داده شد و آنتی‌ژنهای آن به روش کروماتوگرافی به سه جزء اصلی تجزیه شد (FI، FII و FIII). هر یک از این اجزاء خود بعنوان یک آنتی‌ژن جهت تشخیص آنتی‌بادی در موارد آمیبیازیس حاد (۲۵ مورد) شامل آبسه آمیبی کبد (۱۵ نفر)، دیسانتری حاد روده‌ای (۱۰نفر) وگروه‌کنترل (۱۰نفر) از طریق تست الایزا مقایسه گردیدند.

* **یافته‌ها:** آنتی‌ژن کرود و فراکشن FI استفاده بیشتری در تستهای سرولوژیکی برای تشخیص آنتی‌بادیهای ضدآمیب دارند. در حالیکه، توانائی تشخیص آنتی‌بادی آنتی‌ژنهای FII و FIII کمتر است و آنتی‌ژنهای مناسبی برای شناسائی آنتی‌بادیهای ضدآمیب نیستند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت تست الایزا با استفاده از این آنتی‌ژنها کاهش می‌یابد. اما در مواردیکه از آنتی‌ژن FI استفاده شده است حساسیت تست الایزا بسیار بالا بود.

* **نتیجه‌گیری:** در آمیبیازیس مهاجم روده‌ای و خارج روده‌ای تحریک سیستم ایمنی هومورال با تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژنهای آمیب همراه است. شناسائی آنتی‌بادیهای موجود در سرم افراد تحت مطالعه وگروه‌کنترل با استفاده از انتامیبا هیستولیتیکابه روش الایزا انجام شد و مشاهده شد که الایزا با استفاده از فراکشن آنتی‌ژن FI بمیزان ۱۰۰-۹۰درصد اختصاصی است.

گل واژگان: تشخیص سرولوژیکی، آمیبیازیس، الایزا، انسان

نشریه پزشکی باخته، سال پنجم، تابستان ۸۲، شمارهٔ ۱۸، صفحات ۹۵-۹۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

انتامیبا هیستولیتیکا تک یاخته بالقوه بیماریزا برای انسان است که در قسمتهای انتهائی روده بزرگ مستقر می‌شود. این آمیب حدود ۵۰۰ میلیون نفر را در سراسر دنیا آلوده ساخته است (۶). انتامیبا هیستولیتیکا مسئول سالیانه ۱۰۰/۰۰۰-۵۰/۰۰۰ مورد مرگ و میر ناشی از آمیبیازیس مهاجم درکشورهای در حال توسعه است که ممکن است با تهاجم به روده یا سدهای بافتی میزبان پیامدهای پاتولوژیکی آن نظیر کولیت آمیبی یا آبسه آمیبی کبد، ریه و سایر اعضاء بدن و حتی مرگ را به دنبال داشته باشد (۱۲).

تقابل ویرولانس انتامیبا هیستولیتیکا و سیستم ایمنی میزبان جهت پیامدهای کلینیکی بیماری شرح داده شده است. در مبتلایان به آمیبیازیس مهاجم آنتی‌بادی ضدآمیب در سرم تولید می‌شود (۸). در ۵۰درصد مبتلایان به دیسانتری آمیبی و ۱۰۰درصد بیماران دارای آبسه کبدی آنتی‌بادیهای در گردش تولید می‌شود. آنتی‌بادیهای ضدآمیب برای سالها پس از درمان موفقیت‌آمیز آبسه آمیبی کبد باقی می‌مانند (۱۴). آنتی‌بادی ضدآمیب در سرم دافعین کیست و مبتلایان به هپاتیت غیرآمیبی کبد و افراد سالم شناسائی نشده است (۱۳). به منظور تشخیص سرولوژیکی آمیبیازیس مهاجم، تست الایزا به کار گرفته شد (۹). الایزا به مراتب بهتر از روش بررسی میکروسکوپی است. این تست سرولوژیکی جهت شناسائی آنتی‌بادی ضد آمیب در تشخیص سرولوژیک و نیز بررسیهای اپیدمیولوژیک کاربرد دارد (۴). عموماً تستهای سرولوژیکی با استفاده از آنتی‌ژن به دست آمده از سلول کامل الایز شده انتامیبا هیستولیتیکا (آنتی‌ژن کرود) انجام می‌شود. آنتی‌ژن کرود حاوی مواد آنتی‌ژنیک با ویژگی متفاوت است (۱۰). این مطالعه به منظور بررسی ویژگی آنتی‌ژن کرود و فراکشنهای به دست آمده از آن و نیز کارآئی آنها در رابطه با تستهای سرولوژیکی انجام شد.

مواد و روشها

تست الایزا به منظور شناسائی آنتی‌بادیهای ضد آمیب در مبتلایان به آمیبیازیس انجام شد.

* نمونه

نمونه‌های تحت مطالعه شامل گروههای آمیبیازیس خارج روده‌ای (آبسه آمیبی کبد) و روده‌ای (دیسانتری) بود.

گروه اول ۱۵ بیمار مبتلا به آبسه آمیبی کبد که بر اساس علائم کلینیکی (درد شدید پایدار گاهی همراه با تب، کبد بزرگ و حساس بایا بدون آمیبیازیس روده‌ای) و یافته‌های پاراکلینیکی (اولتراسونوگرافی و مشاهده حفره آبسه و آسپیراسیون قهوه‌ای رنگ محتویات آبسه) و بررسیهای پارازیتولوژیکی (آزمایش مدفوع و محتویات آبسه و کشت آنها) تشخیص داده شده بودند و در بخش گاستروانترولوژی بیمارستان وابسته به دانشگاه بنارس ـ هندوستان بستری بودند. گروه دوم شامل ۱۰ بیمار مبتلا به آمیبیازیس مهاجم روده‌ای بود که به علت دیسانتری به بیمارستان مراجعه کرده بودند. بیماری آنها براساس علائم بالینی (دیسانتری همراه با مقادیر متفاوت بلغم خونی، دفعات دفع بین ۳ تا ۱۰ بار در روز واحساس ناراحتی در زیر شکم که مدت بیماری آنها بین ۱ تا ۷ روز وگاهی بیشتر متغیر بود) و شواهد پارازیتولوژیکی (مشاهده تروفوزوئیت هماتوفاژ انگل) مشخص شده بود. گروه کنترل شامل ۱۰ فرد سالم، از نظر آلودگیهای انگلی، که فاقد تروفوزوئیت و کیست انگل در بررسی مستقیم مدفوع و پس از اعمال روشهای تغلیظی بودند و هیچگونه علامتی دال بر عفونت آمیبی نداشتند.

* آنتی‌ژن

انتامیبا هیستولیتیکا سویه ۲۰۰ :NIH به طور اگزنیک در محیط TPS-1کشت داده شد. با اولتراسونیکاسیون عصاره انگل به نام آنتی‌ژن کرود تهیه گردید. مقداری از این آنتی‌ژن به روش کروماتوگرافی به سه جزء تجزیه شد. ۲۰۰ میکرولیتراز هر یک از آنتی‌ژنهای FI، FII و FIII و آنتی‌ژن کرود در رقت مناسب جهت پوشاندن سطح حفرات میکروپلیتهای پلی‌استرین الایزا: (Cooke Microtitre M29 AR Dynatech Laboratories, Sussex,U.K.-) استفاده شدند. سوبسترای بکار رفته OPD: (O-Phenylene Diamine Dihydrochloride, pH 3.7) وکانژوگه استفاده شده: (Horse Radish Peroxidase antihuman immunoglobulin. Sigma, USA) بود. مقدار پروتئین در رقت بکار رفته به روش Lowry تعیین شد (۱۱).

آنتی‌بادی ـ سرم تهیه شده از خون افراد تحت مطالعه بطور پیاپی رقیق شد و رقتهای ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ بدست آمده مورد استفاده قرار گرفت.

* تعیین میزان Cut-Off

بر اساس آنالیز مقدار O.D گروه کنترل، Cut-Off محاسبه گردید و معادل میانگین آن + ۲SD (انحراف معیار) می‌باشد (2). در هر نمونه که O.D بیش از مقدار Cut-Off بود مثبت درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس روشهای فوق‌الذکر، میزان Cut-Off معادل ۰/۴۷۴ تعیین گردید. براین اساس وقتی آنتی‌ژن کرود برای شناسائی آنتی‌بادی استفاده شد، در گروه اول ۱۴ مورد از ۱۵ مورد مبتلا به آبسه آمیبی کبد، از نظر وجود آنتی‌بادی، مثبت بودند. بجز در یک مورد که آنتی‌بادی در رقت پائین (۱:۲۰۰) شناسائی شد، در مابقی موارد قادر به تشخیص آنتی‌بادی در رقتهای بالاتر بود. ۴ مورد در رقت ۱:۱۶۰۰، ۱ مورد در رقت ۱:۳۲۰۰، ۴ مورد در رقت ۱:۶۴۰۰ و ۴ مورد در رقت ۱:۱۲۸۰۰ شناسائی شدند. میانگین O.D هر رقت ثبت و در جدول ۱ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: کارایی آنتی ژن کروه در شناسایی آنتی بادی در موارد آمیبیازیس

گروه تحت کنترل	تعداد کل	موارد مثبت	درصد مثبت	تیتر سرمهای مثبت					
				۱:۲۰۰	۱:۴۰۰	۱:۸۰۰	۱:۱۶۰۰	۱:۳۲۰۰	۱:۶۴۰۰	۱:۱۲۸۰۰
آبسه آمیبی کبد	۱۵	۱۴	۹۳/۳۳	۱	–	–	۴	۱	۴	۴
				(۰/۵۵۱)◇			(۰/۵۲۱)◇	(۰/۶۵۵)◇	(۰/۶۲۹)◇	(۰/۶۶۱)◇
دیسانتری	۱۰	۷	۷۰/۰۰	–	۲	–	–	۲	۲	۱
					(۰/۶۲۴)◇			(۰/۶۲۹)◇	(۰/۵۸۵)◇	(۰/۷۵۴)◇
گروه کنترل	۱۰	۰	–							

مقدار Cut off: ۰/۲۷۴ ◇ میانگین O.D

در مبتلایان به دیسانتری آمیبی، در ۷ مورد از ۱۰ مورد آنتی‌بادی شناسائی شد. در ۲ مورد که آنتی‌بادی در رقت ۱:۴۰۰، ۲ مورد در رقت ۱:۳۲۰۰ و ۲ مورد دیگر در رقت ۱:۶۴۰۰ و فقط یک مورد در رقت ۱:۱۲۸۰۰ شناسائی شدند. میانگین O.D ۰/۶۲۴ بود. در گروه کنترل، آنتی‌بادی در هیچیک تشخیص داده نشد.

با استفاده از آنتی‌ژن فراکشن I (FI)، آنتی‌بادی در ۱۴ مورد از ۱۵ مورد مبتلا به آبسه آمیبی کبد شناسائی شد. در ۳ مورد آنتی‌بادی در رقت ۱:۱۲۸۰۰ (میانگین O.D = ۰/۶۴۲) و در ۴ مورد آنتی‌بادی در رقت ۱:۶۴۰۰ (میانگین O.D = ۰/۶۸۵)، ۲ مورد در رقت ۱:۳۲۰۰ (میانگین O.D = ۰/۶۴۰) و ۳ مورد آنتی‌بادی در رقت ۱:۱۶۰۰ با میانگین O.D ۰/۵۳۶ شناسائی گردید. فقط در ۱ مورد آنتی‌بادی در رقت ۱:۸۰۰ تشخیص داده شد. بااستفاده از همین آنتی‌ژن برای شناسائی آنتی‌بادی درگروه دوم (آمیبیازیس روده‌ای)، ۳ مورد در رقت ۱:۱۲۸۰۰ و ۱ مورد در هر یک از رقتهای ۱:۳۲۰۰ و ۱:۶۴۰۰ مثبت بودند. کمترین رقتی که وجود آنتی‌بادی را نشان داد رقت ۱:۱۶۰۰ بود (۲ مورد). میانگین O.D مربوط به هر رقت در جدول ۲ آمده است. آنتی‌بادی در هیچیک از افراد گروه کنترل تشخیص داده نشد. با استفاده از فراکشن II (FII) جهت تشخیص آنتی‌بادی در مبتلایان به آبسه آمیبی کبد، آنتی‌بادی در ۹ مورد از ۱۵ مورد شناسائی شد (جدول ۳). ۲ مورد در بالاترین رقت یعنی ۱:۱۲۸۰۰ و ۳ مورد در رقت ۱:۳۲۰۰، O.D بدست آمده در هر مورد بترتیب ۰/۵۸۶ و ۰/۷۳۴ بود. ۲ مورد مثبت در هر یک از رقتهای ۱:۸۰۰ و ۱:۴۰۰ با میانگین O.D ۰/۴۸۳ و ۰/۵۰۶ مشاهده شد. در مبتلایان به دیسانتری آمیبی، آنتی‌بادی در ۵ مورد تشخیص داده شد. کمترین رقت ۱:۴۰۰ و بیشترین رقتی که آنتی‌بادی را نشان داد ۱:۳۲۰۰ بود. میانگین O.D در رقت ۱:۴۰۰ (۱ مورد) ۰/۵۷۲، در رقت ۱:۸۰۰ (۱ مورد) ۰/۵۸۲، در رقت ۱:۱۶۰۰ (۲ مورد) ۰/۵۵۳ و در رقت ۱:۳۲۰۰ (۱ مورد) ۰/۴۷۶ ثبت شد. حداکثر موارد مثبت ۲ مورد در رقت ۱:۱۶۰۰ بود. در هیچ رقتی آنتی‌بادی در بین گروه کنترل بدست نیامد.

با بکارگیری آنتی‌ژن FIII بمنظور شناسائی آنتی‌بادی در مبتلایان به آبسه آمیبی کبد، در رقت ۱:۱۲۸۰۰ یک مورد با میانگین O.D معادل ۰/۵۸۹، ۱ مورد در رقت ۱:۶۴۰۰ (O.D معادل ۰/۴۸۲) شناسائی شد. طبق جدول ۴، از ۵ مورد مثبت باقیمانده، ۲ مورد در ۱:۳۲۰۰، ۱ مورد در ۱:۱۶۰۰ و ۲ مورد در رقت ۱:۸۰۰ مثبت شدند.

میانگین O.D به ترتیب ۰/۵۹۶، ۰/۴۸۶ و ۰/۵۲۰ بود. از ۱۰ بیمار گروه دیسانتری، به کمک این آنتی‌ژن، آنتی‌بادی در ۵ مورد (۱ مورد در ۱:۱۲۸۰۰، ۱ مورد در رقت ۱:۳۲۰۰، ۲ مورد در رقت ۱:۱۶۰۰ و ۱ مورد در رقت ۱:۸۰۰) شناسائی شد. O.D در بالاترین رقت و نیز در رقت ۱:۳۲۰۰ میانگینی معادل ۰/۴۸۶ و میانگین O.D در رقت ۱:۱۶۰۰ معادل ۰/۵۴۶ بود. ۰/۵۱۲ مقدار میانگین O.D در رقت ۱:۸۰۰ است.

جدول ۲: کارایی آنتی ژن FII در شناسایی آنتی بادی در موارد آمیبیازیس

گروه تحت مطالعه	تعداد کل	موارد مثبت	درصد مثبت	تیتر سرمهای مثبت					
				۱:۲۰۰	۱:۴۰۰	۱:۸۰۰	۱:۱۶۰۰	۱:۳۲۰۰	۱:۶۴۰۰	۱:۱۲۸۰۰
آبسه آمیبی کبد	۱۵	۱۴	۹۳/۳۳	۱	–	۱	۳	۲	۲	۳
				(۰/۵۲۲)◇		(۰/۶۲۲)◇	(۰/۵۳۶)◇	(۰/۶۴۰)◇	(۰/۶۸۵)◇	(۰/۶۲۲)◇
دیسانتری حاد	۱۰	۷	۷۰/۰۰	–	–	–	۲	۱	۱	۳
							(۰/۶۳۴)◇	(۰/۵۲۳)◇	(۰/۵۲۶)◇	(۰/۶۳۲)◇
گروه کنترل	۱۰	۰	–							

مقدار Cut off: ۰/۲۷۴ ◇ میانگین O.D

جدول ۳: کارایی آنتی ژن FII در شناسایی آنتی بادی در موارد آمیبیازیس

گروه تحت مطالعه	تعداد کل	موارد مثبت	درصد مثبت	تیتر سرمهای مثبت					
				۱:۲۰۰	۱:۴۰۰	۱:۸۰۰	۱:۱۶۰۰	۱:۳۲۰۰	۱:۶۴۰۰	۱:۱۲۸۰۰
آبسه امیبی کبد	۱۵	۹	۶۰/۰۰		۲	۲	–	۳	–	۲
دیسانتری حاد	۱۰	۵	۵۰/۰۰	–	۱	۱	۲	۱	–	–
					(۰/۵۷۲)◇	(۰/۵۸۲)◇	(۰/۵۵۳)◇	(۰/۴۷۶)◇		
گروه کنترل	۱۰	۰	–							

مقدار Cut off: ۰/۲۷۴ ◇ میانگین O.D

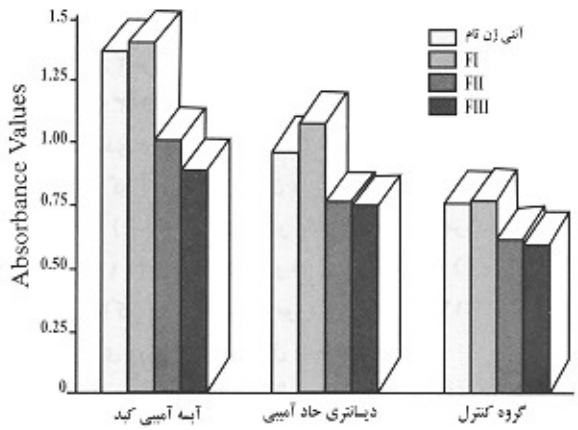
www.SID.ir

Archive of SID

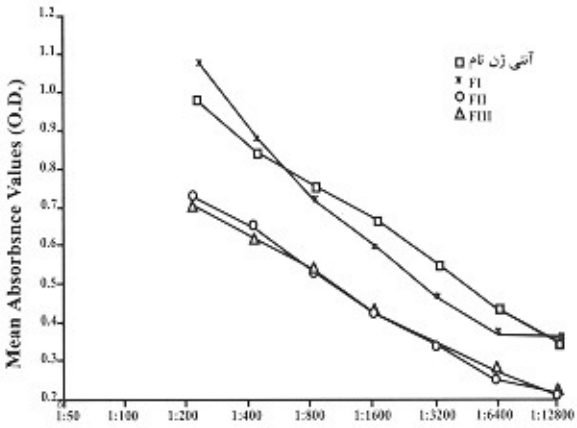
جدول ۴: کارایی آنتی ژن FIII در شناسایی آنتی بادی در موارد آمیبیازیس

گروه تحت مطالعه	تعداد کل	موارد مثبت	درصد مثبت	تیتر سرمهای مثبت					
				۱:۲۰۰	۱:۴۰۰	۱:۸۰۰	۱:۱۶۰۰	۱:۳۲۰۰	۱:۶۴۰۰	۱:۱۲۸۰۰
آبسه آمیبی کبد	۱۵	۷	۴۶/۶۶	-	-	۲	۱	۲	۱	۱
دیسانتری حاد	۱۰	۵	۵۰/۰۰	-	-	۱	۲	۱	-	۱
						(۰/۵۱۲)*	(۰/۵۲۶)*	(۰/۴۸۶)¤		(۰/۴۸۶)¤
گروه کنترل	۱۰	۰	-							

مقدار Cut off: ۰/۲۷۲ * میانگین O.D



نمودار ۱: میانگین O.D آنتی ژنهای آمیب در موارد دیسانتری آمیبی



نمودار ۲: توان آنتی ژنهای انتامیبا هیستولیتیکا در شناسایی آنتی بادیهای ضد آمیب در موارد آمیبیازیس حاد

بحث

از میان تستهای سرولوژیکی متعدد، الایزا برای این مطالعه گزیده شد. در رابطه با مبتلایان به آبسه آمیبی کبد مشاهده شد که با استفاده از آنتی‌ژن کرود و FI، آنتی‌بادی در ۹۳/۳۳درصد موارد شناسائی شد. این در حالیست که این آنتی‌ژنها قادر به شناسائی موارد مثبت بیشتری در رقتهای بالاتر با O.D بالاتر بودند. این نتیجه با نتایج دیگران (۷) که درصد موارد مثبت را ۱۰۰-۸۰درصد اعلام داشتند مطابقت دارد. ممکن است یک بیماری که فاقد آنتی‌بادی بوده جزء افرادی باشد که پاسخ ضعیف می‌دهند (Low Responder). با توجه به اینکه در این مطالعه میزان Cut-Off بالاتر از گزارش دیگران بوده ممکن است این مورد منفی گزارش گردیده باشد (۳).

آنتی‌ژن کرود و FI قادر به شناسائی آنتی‌بادی در ۷۰درصد مبتلایان به دیسانتری آمیبی بودند. Ganguly وهمکارانش (۵) موفق به شناسائی آنتی‌بادی بمیزان ۸۷/۵ درصد شدند. در حالیکه، Agarwal و همکارانش (۱) در مبتلایان به دیسانتری با استفاده از آنتی‌ژن کرود و FI ۶۲/۹۶درصد را گزارش کردند. مجدداً مشاهده می‌شود که آنتی‌ژنهای کرود و FI قادر به شناسائی آنتی‌بادی با O.D بالاتری است. مقایسه بین FI و کرود مبین آن است که FI توانائی بیشتری در شناسائی آنتی‌بادی در رقتهای بالاتر دارد. پس آنتی‌ژن بهتری برای تشخیص سرولوژیکی عفونت است اما، به دلیل اینکه تهیه این فراکشن نیاز به زمان بیشتری دارد و پر زحمت است لذا، استفاده از آنتی‌ژن کرود در تشخیص سرولوژیکی آمیبیازیس ترجیح داده می‌شود.

علت کاهش موارد مثبت به ۵۰درصد با استفاده از آنتی‌ژنهای FII و FIII می‌تواند آنتی‌ژنیسیته ضعیف این آنتی‌ژنها و بالابودن مقدار Cut-Off در این مطالعه باشد.

هیچ مورد مثبتی در رابطه با گروه کنترل بدست نیامد. این افراد به علت عدم ابتلاء فاقد آنتی‌بادی بودند. در این بررسی، تست الایزا ۱۰۰درصد اختصاصی بود. هیچ مورد مثبت کاذب با هیچیک از آنتی‌ژنها بدست نیامد.

این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از آنتی‌ژن کرود و فراکشن I (FI)، الایزایک تست تشخیصی با حساسیت کاملاً بالا جهت شناسائی آنتی‌بادی ضدآمیب است و ویژگی ۱۰۰-۹۰ در صد است. توان FII و FIII در تشخیص سرولوژیکی ضعیف است. با استفاده از این آنتی‌ژنها حساسیت تست به حدود ۴۰درصد کاهش می‌یابد.

References

1. Agarwal SS, Sharma P, Das Pradeep, Ahmad J, Dutta GP: Miro-enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of amoebiasis. Ind J Med Res 1981; 74: 219-225

2. Arianpour N: Antigens Immunogens of Entamoeba histolyticaand their role if any in protection against amoebiasis. PhD thesis submitted in 1992 to department of Microbiology,Institute of Medical

www.SID.ir

Archive of SID

Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi, India
3. Baveja UK, Warhurst DC, Vollar A: Enzyme linked immunosorbent assay in amoebiasis. Ind J Med Res 1984; 80: 528-531
4. Evangelopoulos A, Legakis N, Vakalis N: Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. Parasitol Int 2001; 50(3):185-189
5. Ganguly NK, Mahajan RC, Gill NJ, Koshy A: Kinetics of lymphocytes sub-population and their function in cases of amoebic liver abscess. Trans R Trop Med Hyg 1981; 75: 807-810
6. Hooshyar H, Rezian M, Kazemi B, Haghighi A: Differentiation of Entamoeba histolytica and E. dispar by PCR-RFLP. Yakhteh Medical Journal. 2002; 4(13):,11-15
7. Irshad M, Gandhi BM, Tandon BN: An improved ELISA technique to detect amoebic antibody in blood. Ann Natl Acad Med Sci 1986; 22(1): 18-20
8. Jarillo-luna RA, Campos-Rodriguez R, Tsutsumi V: Entamoeba histolytica: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Exp Parasitol 2002; 101(1): 40-56
9. lee J, Park SJ, Yong TS: Serodiagnosis of amoebiasis using a recombinant protein fragment of the 29 KDa surface antigen of Entamoeba histolytica. Int J Parasitol 2000; 30(14): 1487-1491
10. Lotter H, Erich Mannweiler, Michael Schreiberand, Egbert Tannich: Sensitive and specific diagnosis of invasive amoebiasis by using a recombinant surface protein 1992: 3163-3167
11. Lowry CH, Rosenbrough NJ, Parr AL, Randall RJ: Protein measurement with folic phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265
12. Pillai DR, Kain KC: Recent development in amoebiasis: Gal/GalNAc lectins of Entamoeba histolytica and E. dispar Microbes Infect. 2000; 2(14): 1775-83
13. Singh K, Vohra H, Vinayak VK, Ganguly NK: Partial characterization of 36-KDa antigen of Entamoeba histolytica and its recognition by sera from patients with amoebiasis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000; 27(1): 23-30
14. Valenzuela O, Ramos F, Moran P, Gonzales E, Valadez A, Gomez A, Melendro EI, Ramiro M, Munoz O, Ximenez C: Persistence of secretory antiamoebic antibodies in patients with past invasive intestinal or hepatic amoebiasis. Parasitol Res 2001; 87(10): 849-52

www.SID.ir