

شناسایی آنتی ژن اختصاصی کیست هیداتیک توسط روش وسترن بلاتینگ به منظور کاربرد تشخیصی

دکتر شاهین فکور^۱ دکتر بهنام مشکی^۲

۱- استادیار گروه علوم بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی سنندج، سنندج، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن تماس: ۳۲۸۹۴۳۰ Fakours@yahoo.com

۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت بیماری هیداتیدوز در جمعیت‌های انسانی و دامی، بررسی حاضر با هدف شناسایی آنتی ژن تشخیصی کیست هیداتیک با استفاده از روش ایمونوبلاتینگ انجام گرفت.

روش بررسی: بدین منظور بعد از تهیه کیست هیداتیک گوسفندی، چهار نوع آنتی ژن مایع خام، مایع جوشانده، آنتی ژن هموژنیزه پروتواسکولکس و آنتی ژن دیواره کیست هیداتیک تهیه گردید. نمونه‌های سرمی مثبت و عاری از آلودگی در بازرسی کشتار گاهی تهیه شد. الکتروفورز پادگن‌ها توسط روش (SDS-PAGE) با استفاده از سیستم ژل ناپیوسته با ژل جداکننده به غلظت ۱۲٪ و ژل متراکم کننده به غلظت ۵٪ در مجاورت نشاندار با وزن مولکولی مشخص صورت گرفت. در استفاده از روش وسترن بلاتینگ برای شناسایی پادگن اختصاصی، یک ورقه از غشا نیتروسولولز بر روی ژل انتقال یافت و تحت الکتروفورز قرار گرفت. بعد از انتقال پروتئین‌ها به غشا نیتروسولولز از شیر خشک بدون چربی بعنوان بافر مسدودکننده و سپس بترتیب از آنتی بادی اولیه و ثانویه و از سوبسترای دی آمینو بنزیدین جهت مشخص شدن باندهای اختصاصی استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج الگوی الکتروفورتیک چهار آنتی ژن تهیه شده از کیست هیداتیک نشان داد در آنتی ژن خام مایع کیست ۹ باند پروتئینی از ۱۴ تا بیش از ۱۱۶ کیلو دالتون وجود دارد که در بین آنها چهار باند با وزن مولکولی ۱۸، ۲۳، ۴۰ و ۶۴ کیلو دالتون مشخص تر و مشترک با پادگن مایع جوشانده هستند. در الکتروفورز آنتی ژن دیواره ۹ باند از ۱۴ تا بیش از ۱۱۶ کیلو دالتون و در پروتواسکولکس ۱۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی بیشتر از ۳۵ کیلو دالتون وجود داشت.

نتیجه گیری: در ایمونوبلاتینگ آنتی ژن مایع خام یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳۵ و در آنتی ژن دیواره کیست ۳ باند ۳۰، ۳۳ و ۴۶ کیلو دالتون بعنوان آنتی ژنهای اختصاصی شناسایی شدند.

کلید واژه‌ها: کیست هیداتیک، آنتی ژن، وسترن بلاتینگ.

وصول مقاله: ۸۸/۵/۱ اصلاح نهایی: ۸۸/۶/۱۵ پذیرش مقاله: ۸۸/۶/۱۹

غیر مستقیم^۲، ایمونوبلات^۳، رادیو ایمونواسی^۴،

ایمونوالکتروفورز^۵، ایمونوفلورسانت غیر مستقیم^۶ و

لاتکس آگلوتیناسیون^۷ جهت تشخیص موارد هیداتیدوز

مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶-۲). این روشها بر اساس

مقدمه

هیداتیدوز حیوانی و انسانی در کشورهای که دامپروری نشخوارکنندگان رونق دارد از شیوع بیشتری برخوردار است، به طوری که بخش‌های مختلفی از دنیا نظیر خاورمیانه را شامل می‌شود (۱). در حال حاضر

روش‌های متعدد سرمی نظیر: الایزا^۱، هماگلوتیناسیون

2. Indirect Haemagglutination Test (IHT)

3. Immuno Blotting (IB)

4. Radio Immuno Assay (RIA)

5. Immuno Electrophoresis (IE)

6. Indirect Fluorescent Antibody (IFA)

7. Latex Agglutination Test (LA)

1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

هیداتیک از ارزش بالایی در تشخیص افتراقی برخوردارند. زیر واحد ۸ کیلو دالتونی اختصاصی ترین آنها بوده و به تنهایی ۷۸٪ حساسیت دارد. ایمونوبات می‌تواند به عنوان روشی جهت تایید قطعی آلودگی به کیست هیداتیک استفاده شود. خالص سازی آنتی ژن در این آزمون احتمال واکنش متقاطع باسیستی سرکوزیس، لیسمانیازیس، فیلریازیس، توکسوپلاسموزیس و دیگر بیماری‌ها را کاهش می‌دهد (۹). در بررسی حاضر آنتی ژن اختصاصی کیست هیداتیک توسط روش وسترن بلائینگ با هدف تشخیص سرمی بیماری مورد شناسایی قرار گرفت.

روش بررسی

تحقیق حاضر به صورت توصیفی و با هدف شناسایی آنتی ژن اختصاصی در تشخیص کیست هیداتیک طی سه مرحله به شرح زیر انجام پذیرفت:

۱) تهیه آنتی ژن

بعد از انتقال اندام آلوده به کیست هیداتیک به آزمایشگاه مایع کیست استخراج گردید و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵/۰۰۰ دور سانتریفوژ شد تا پرتواسکولکس‌ها جدا شوند (۱). تهیه و استخراج پادگن از دو منبع مایع و پرتواسکولکس به شرح زیر صورت گرفت:

با منشأ مایع کیست هیداتیک دو نوع آنتی ژن تهیه شد و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

- آنتی ژن خام مایع کیست هیداتیک

آنتی ژن خام مایع کیست بعد از دیالیز مایع کیست تهیه گردید.

- آنتی ژن جوشانده مایع

شناسایی آنتی ژن و یا آنتی بادی اختصاصی کیست هیداتیک طراحی شده‌اند ولی در تشخیص این بیماری علاوه بر تنوع و تعدد روشهای موجود نوع آنتی ژن مورد استفاده سبب شده است تا هر روشی از مزایا و معایبی مختص به خود برخوردار باشد. البته باید وجود سوبه‌های مختلف کیست هیداتیک را در مناطق مختلف جغرافیایی در نظر داشت چرا که مسلماً بر نتایج روشهای تشخیص سرمی تأثیرگذار است (۷).

در بین روشهای تشخیص سرمی آلودگی با کیست هیداتیک روش ایمونوبات یکی از آزمونهای انتخابی محسوب می‌شوند. الوت و همکاران از این روش در تشخیص هیداتیدوز ریوی انسان استفاده کردند (۸).

دوئیز نیز استفاده از این روش را با توجه به حساسیت و ویژگی بالای آن در جمعیت‌های انسانی توصیه می‌کند (۶). اگرچه بهره‌گیری از این روش بعد از الکتروفورز باعث صرف وقت بیشتر و پیچیده‌تر کردن آزمایش می‌گردد ولی به علت فواید فراوانی که دارد کاربرد آن بسیار با ارزش است. اهمیت این روش به خاطر تلفیق دو روش حساس جداسازی الکتروفورزی پروتئین‌ها و شناسایی ایمونولوژیکی آنها است. مقدار آنتی ژن در این روش تا حدود یک نانوگرم قابل تشخیص می‌باشد. در استفاده از آنتی ژن ۵ واکنش متقاطع با اکینو کوکوس مولتی لوکولاریس و اکینو کوکوس فولگی و همچنین با سیستی سرکوس سلولوزه و دیگر انگل‌ها دیده می‌شود، در حالی که استفاده از آنتی ژن B علی‌رغم ایمنی زایی پایین، ویژگی بالایی دارد و تنها با اکینو کوکوس مولتی- لوکولاریس و اکینو کوکوس فولگی واکنش متقاطع نشان می‌دهد. باندهای ۸ و ۱۶ کیلو دالتونی که زیر واحدهایی از آنتی ژن B هستند با ویژگی ۱۰۰٪ و حساسیت ۸۰٪ بدون واکنش متقاطع با سرم بیماران غیر

بر اساس روش روگان و همکاران پادگن جوشانده مایع کیست، پس از قرار دادن مایع در حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه شد (۱۰).

-پادگن هموژنیزه پرتواسکولکس

پادگن هموژنیزه پرتواسکولکس با فریز و ذوب کردن و سپس سونیکه کردن پرتواسکولکس و سانتریفوژ نمونه تهیه شد.

- دیواره کیست

پادگن دیواره کیست هیداتیک بعد از جداسازی دیواره و شست و شوی آن در فسفات بافر سالین با هموژنیزه کردن، سونیکاسیون و سانتریفوژ نمونه تهیه گردید. همه نمونه‌ها بعد از تعیین غلظت توسط روش لوری به میزان ۵۰ میکرولیتر در هر میکروتیوب در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده تحت نگهداری قرار گرفت (۱۱).

(۲) تهیه سرم

تهیه سرم با همکاری و مساعدت سازمان دامپزشکی انجام گرفت. در هر بار مراجعه (در مجموع ۱۰-۸ نوبت) قبل از ذبح هر راس گاو، از آن خون‌گیری به عمل آمد و هر نمونه همراه با دام مربوطه شماره گذاری شد و در چرخه کشتار ضمن بازرسی اندام‌های مختلف هر نوع آلودگی ثبت گردید و چنانچه در دو اندام کبد و یا ریه آلودگی به کیست هیداتیک وجود داشت، نمونه سرمی به عنوان سرم مثبت هیداتیک در نظر گرفته شد.

در طی هر بار بازرسی کشتارگاهی، نمونه‌ها با حفظ شماره و نوع آلودگی به آزمایشگاه انتقال یافت و بعد از تهیه سرم، بسته به نوع آلودگی ثبت شد. بدین ترتیب تعداد ۵ نمونه مثبت سرمی هیداتیک و ۵ نمونه سرم منفی و عاری از آلودگی (به عنوان کنترل) تهیه گردید، علاوه بر این نمونه‌های سرمی مثبت از نظر

فاسیولا و دیکروسلیوم جهت بررسی واکنش متقاطع (۵) نمونه) نیز تهیه شد. همه نمونه‌ها به تیوب‌های به حجم یک سانتی‌متر مکعب انتقال یافت و در برودت ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

(۳) تعیین الگوی الکتروفوریک و ایمونوبلاتینگ

برای تعیین الگوی الکتروفوریک آنتی‌ژنهای تهیه شده، نمونه‌ها تحت SDS-PAGE قرار گرفت و در مرحله بعد به منظور شناسایی آنتی‌ژنهای اختصاصی توسط ایمونوبلاتینگ و به شرح ذیل تعیین هویت شدند.

- سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریلامید

ژل الکتروفوریز

جهت الکتروفوریز آنتی‌ژن‌ها از سیستم ژل ناپیوسته با ژل جداکننده به غلظت ۱۲٪ و ژل متراکم‌کننده به غلظت ۵٪ حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS) بر اساس روش لاملی (۱۲)، استفاده شد. پس از اطمینان از انعقاد ژل پلی اکریلامید، نمونه‌های تهیه شده را که با اضافه کردن یک حجم بافر نمونه به مدت ۱۰-۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفته بودند، به میزان ۳۰- ۲۰ میکرولیتر به چاهک‌های ژل متراکم‌کننده منتقل شدند. پس از استقرار صفحات حاوی ژل در تانک مربوطه اقدام به الکتروفوریز نمونه‌ها در ولتاژ ۸۰ و سپس ۱۱۰ ولت در مجاورت نشاندار با وزن مولکولی مشخص گردید. بعد از اتمام الکتروفوریز ژل‌ها با استفاده از کوماسی بلو رنگ آمیزی شد و توسط محلول رنگ بر باندهای پروتئینی آشکار شدند.

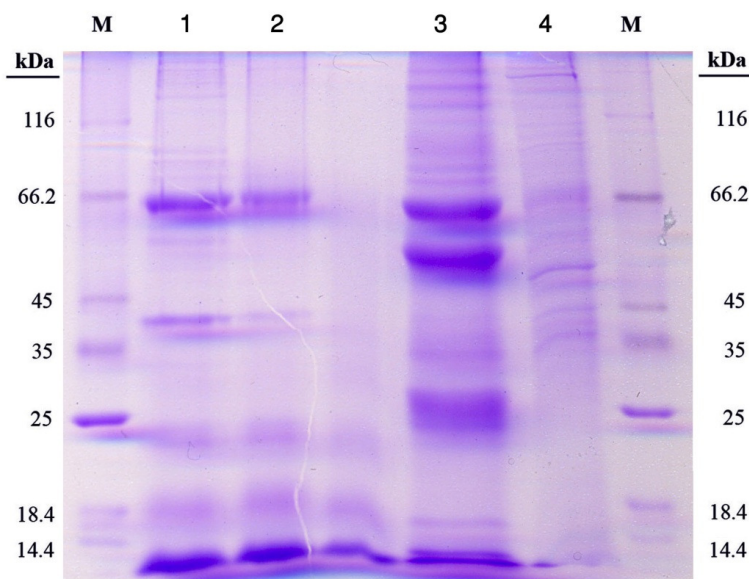
- وسترن بلاتینگ

به منظور شناسایی آنتی‌ژن یا آنتی‌ژنهای اختصاصی، بعد از الکتروفوریز نمونه بر روی ژل پلی اکریلامید یک ورقه از غشا نیتروسولولز به اندازه ژل بریده شد و بر روی ژل انتقال یافت و پس از قرار گرفتن

یافته‌ها

همانطور که در روش کار توضیح داده شد الگوی الکتروفوریتیک آنتی‌ژنهای مایع خام، مایع جوشانده، دیواره و پروتواسکولکس کیست هیداتیک گوسفند توسط روش SDS-PAGE تعیین هویت شد. نتایج این قسمت از بررسی که در تصویر ۱ ملاحظه می‌شود وجود ۹ باند پروتئینی از ۱۴ تا بیش از ۱۱۶ کیلو دالتون را در مایع خام کیست هیداتیک (ستون ۱) نشان می‌دهد که در بین آنها چهار باند با وزن مولکولی ۱۸، ۲۳، ۴۰ و ۶۴ کیلو دالتون مشخص‌تر و مشترک با پادگن مایع جوشانده (ستون ۲) هستند.

چندین لایه کاغذ واتمن در دو طرف آنها، به مدت ۱۲ ساعت در ولتاژ ۳۰ ولت الکتروفورز گردید. بعنوان بلوکینگ بافر (بافر مسدودکننده) از شیر خشک بدون چربی با غلظت ۳٪ در فسفات بافر سالین حاوی ۵٪ توئین ۲۰ استفاده شد. پس از ۳ بار شستشوی غشا آن را بمدت ۱ ساعت در آنتی‌بادی اولیه و بعد از ۳ نوبت شستشو به آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی کونژوگه با پراکسیداز) انتقال داده و از سوبسترای دی‌آمینو بنزیدین به همراه ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰٪ جهت مشخص شدن باندهای مورد نظر استفاده شد و در پایان از کاغذ حاوی باند، اسکن تهیه گردید (۱۲).



تصویر ۱: الگوی الکتروفوریتیک چهار آنتی‌ژن تهیه شده از کیست هیداتیک

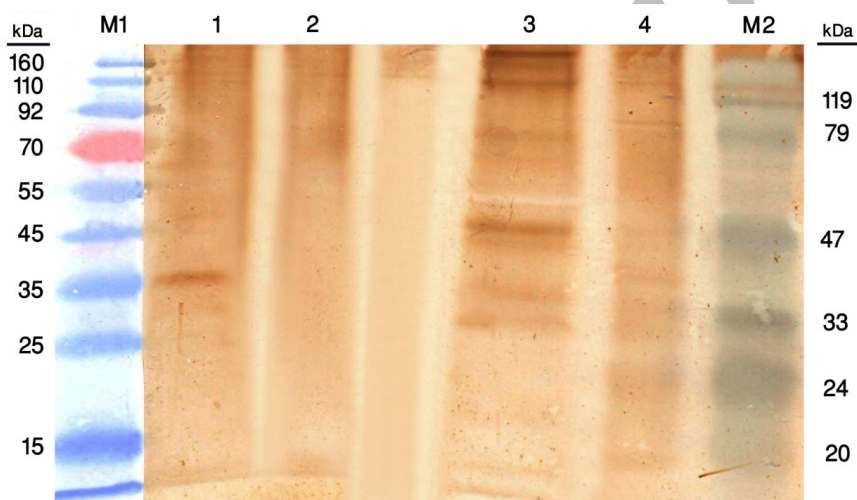
آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در بررسی الگوی الکتروفوریتیک بر اساس تصویر ۱) ستون ۱: آنتی‌ژن خام مایع، ستون ۲: آنتی‌ژن جوشانده مایع، ستون ۳: آنتی‌ژن دیواره، ستون ۴: آنتی‌ژن پروتواسکولکس، M: مارکر پروتئینی (فرمتناز SM0431)

پروتواسکولکس (ستون ۴) ۱۰ باند با وزن مولکولی بیشتر از ۳۵ کیلو دالتون وجود داشت.

در الکتروفورز آنتی‌ژن دیواره (ستون ۳) در محدوده ۱۵ تا ۱۱۶ کیلو دالتون ۷ باند و در

همانگونه که در تصویر ۲ مشاهده می شود در آنتی ژن مایع خام یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳۵ و در آنتی ژن دیواره کیست ۳ باند مشخص ۳۰، ۳۳ و ۴۶ کیلو دالتون شناسایی شده اند.

قابل ذکر است که می توان از آنتی ژن مایع خام کیست بصورت خالص و یا تغلیظ شده استفاده کرد که آنتی ژن تغلیظ شده توسط کیسه دیالیز با نتایج بهتری همراه بود. وسترن بلائینگ آنتی ژنهای مختلف در تصویر ۲ مشاهده می شود. باندهای اختصاصی در آنتی ژن مایع (ستون ۱) و دیواره کیست (ستون ۳) شناسایی شده است.



تصویر ۲: وسترن بلائینگ آنتی ژنهای مختلف کیست هیداتیک آنتی ژنهای اختصاصی در وسترن بلائینگ تصویر ۲) ستون ۱: آنتی ژن خام مایع، ستون ۲: آنتی ژن جوشانده مایع، ستون ۳: آنتی ژن دیواره، ستون ۴: آنتی ژن پروتواسکولکس، M1 و M2: مارکر پروتئینی (فرمتناز SM0671 و SM0441)

اما بیماری هیداتیدوز-اکینو کوکوز بعنوان یک معضل بزرگ بهداشتی در بسیاری از کشورها مطرح می باشد (۱۳). نوعی کیت تشخیصی هیداتیدوز بر اساس وجود آنتی بادی های اختصاصی توسط سیبھی و همکاران طراحی شد که از حساسیت (۹۴/۸۷٪)، ویژگی (۸۵/۷۱٪) و سرعت بالایی برخوردار بوده و برای انجام آن نیازی به تجهیزات خاص نیست (۱۴).

در بررسی حاضر اگرچه در آنتی ژن مایع خام کیست هیداتیک ۹ باند پروتئینی وجود داشت ولی چهار باند با وزن مولکولی ۱۸، ۲۳، ۴۰ و ۶۴ کیلو دالتون

بحث

معمولاً ابتلا به کیست هیداتیک فاقد علائم بالینی مشخصی در میزبان است. عواملی نظیر نوع اندام درگیر با کیست، تعداد و اندازه کیست، محل استقرار کیست در اندام و از طرفی دوره نهفتگی، متغیر از چند ماه تا چند سال از جمله مواردی است که بر لزوم روشهای تشخیص سرمی که از کفایت و کارایی بالایی برخوردار باشند تاکید دارد (۶). مورو و شانتر معتقدند با وجود پیشرفت های زیادی که بخصوص در دهه اخیر در زمینه تشخیص و کنترل کیست هیداتیک انجام گرفته است،

آنتی‌ژنهای مایع است ولی سوارنا و پاریجا در ارزیابی آنتی‌ژنهای مایع، پروتواسکولکس و دیواره کیست هیداتیک برای تشخیص هیداتیدوز انسانی توسط روش الایزا نقطه‌ای استفاده از پادگن پروتواسکولکس و دیواره کیست را هم مناسب دانستند (۶). بر این اساس در تحقیق انجام گرفته دو آنتی‌ژن پروتواسکولکس و دیواره کیست نیز تحت آزمایش قرار گرفت. در مطالعه قربان پور و همکاران نیز با ایجاد آلودگی تجربی به کیست هیداتیک در گوسفند، وجود آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژنهای اختصاصی هیداتیک در سرم و ادرار مشخص گردید (۱۸). در این مورد دوی و پاریجا (۲۰۰۳) هم با هدف جستجوی آنتی‌ژن‌های سرمی هیداتیک نوعی روش سرمی را تحت مطالعه قرار دادند (۱۹). در بررسی حاضر در الکتروفورز پروتواسکولکس ۱۰ باند پروتئینی با وزن مولکولی بیشتر از ۳۵ کیلو دالتون و در آنتی‌ژن دیواره ۱۰ باند از ۱۴ تا بیشتر از ۱۱۶ کیلو دالتون وجود داشت ولی در نتایج ایمونوبلاتینگ فقط در آنتی ژن دیواره کیست هیداتیک ۳ باند ۳۰، ۳۳ و ۴۶ کیلو دالتون تعیین هویت گردید.

نتیجه گیری

جهت ارزیابی دقیق نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود آنتی‌ژنهای اختصاصی شناسایی شده با دو منشا مایع و دیواره کیست هیداتیک بعد از خالص سازی توسط یک روش ایمونوآنزیمی نظیر الایزا مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری و مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنج‌جهد جهت تأمین اعتبار جهت انجام این مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

مشخص تر و باندهای بیش از ۶۶ کیلو دالتون ضعیف تر بودند. سیمسیک و کوروقلو نیز در بررسی مایع کیست هیداتیک ۶ باند با وزن مولکولی ۲۹، ۴۵، ۵۸، ۶۸، ۹۸ و ۱۱۶ کیلو دالتون را شناسایی کردند (۱۵). در این مورد اگر چه اساس استفاده از مایع کیست هیداتیک در تشخیص هیداتیدوز وجود دو آنتی‌ژن تشخیصی شامل آنتی‌ژن B و ۵ است (۱۶). ولی وجود پلی مورفسم بالای که در آنتی‌ژن B وجود دارد و تاکنون حداقل ۱۰۱ ترادف نوکلوتیدی از آن شناسایی شده است استفاده از آن را برای تشخیص هیداتیدوز پیچیده می‌سازد (۱۷) و ممکن است عدم وجود باند مشابهی در بررسی حاضر و گزارش سیمسیک و کوروقلو (۱۵) به همین دلیل باشد.

این محققین در ایمونوبلاتینگ مایع کیست باند ۱۱۶ کیلو دالتون را بعنوان پروتئین اختصاصی در تشخیص هیداتیدوز گوسفند معرفی کردند و در مقایسه با بررسی حاضر باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳۵ کیلو دالتون از آنتی‌ژن مایع خام برای هیداتیدوز گاوی معرفی می‌شود. از طرفی در بررسی مشابهی دو پروتئین ۳۹ و ۴۲ کیلودالتون در مایع کیست هیداتیک گوسفندی را بعنوان پروتئین‌های اختصاصی برای تشخیص بیماری در جمعیت‌های انسانی پیشنهاد کرده‌اند که حاکی از وجود اختلاف پروتئین‌های اختصاصی در میزبان‌های متفاوت دارد، این محققین همچنین بر استفاده از روش وسترن بلاتینگ در پیگیری‌های بعد از عمل جراحی تاکید دارند. البته در حال حاضر ایمونوبلات می‌تواند به عنوان روشی جهت تایید قطعی آلودگی به کیست هیداتیک استفاده شود (۵).

اگرچه یکی از شایعترین منابع آنتی‌ژنی برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد هیداتیک استفاده از

References

1. Abdel-Hafez SK, Kamhawi SA. 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 Young University 1997; 292-316.
2. Verastegui M, Moro P, Guevara A, Rodriguez T, Mirand E, Gilman RH. Enzyme linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. *J Med Microb* 1992; 67: 129-143.
3. Craig PS. Echinococcus granulosus: Immunodiagnosis and vaccination, a perspective. *Parasitologia* 1997; 39: 345-347.
4. Lightowlers MW, Gottstein B. Echinococcosis hydatidosis: antigens immunological and molecular diagnosis. In: R.C.A. Thompson, A. J. Lymbray, (eds) Echinococcosis and Hydatid Disease. Wallingford, UK: CAB International 1995; 355-410.
5. Doiz O, Benito R, Sbihi Y, Osuna A, Clavel A, Gomez-Lus R. Western blot applied to the diagnosis and post-treatment monitoring of human hydatidosis. *Diag Microbiol Infec Dis* 2001; 41: 139-142.
6. Swarna SR, Parija SC. DOT-ELISA for evaluation of hydatid cyst wall, protoscoleces and hydatid cyst fluid antigens in the serodiagnosis of cystic echinococcosis. *Rev Ins Med Trop Sant Paulo* 2008; 50: 233-236.
7. Gatti A, Alvarez AR, Araya D, Mancini S, Herrero E, Santillan G, et al. Ovine echinococcosis. Immunological diagnosis by enzyme immunoassay. *Article* 2007; 143: 112-121.
8. Olut AI, Erguven S, Emri Ozunlu H, Akay H. Diagnostic value of a dot immunobinding assay for human pulmonary hydatidosis. *The Korean J Parasitol* 2005; 43: 15-18.
9. Burgu A. Analysis of fluids of hydatid cysts from sheep by SDS-PAGE, and Determination of specific Antigens in protein structure by western blotting. *Turkish J Vet Animal Science* 2000; 24: 493-500.
10. Rogan MT, Craig PS, Zeyhle E. Evaluation a rapid of Dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. *Trans Roy Soc Tropical Med Hyge* 1991; 85: 773-777.
11. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol chem* 1951; 193: 265-275.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
13. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. *Inter J Infec Dis* 2009; 13: 125-133.
14. Sbihi Y, Gil JR, Alvarez PA, Ourduna A, Rodriguez-Torres A, Osuna A. Development of a dipstick dye immunoassay for diagnosing hydatidosis. *J Clin Lab Anal* 2003; 17: 219-222.
15. Simsek S, Koroglu E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid disease in sheep. *Acta Tropica* 2004; 92: 17-24.
16. Carmena D, Benito A, Eraso E. Antigens for the immunodiagnosis of Echinococcus granulosus infection. *Acta Tropica* 2006; 98: 74-86.
17. Rosenzvit MC, Camicia F, Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM. Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from Echinococcus granulosus. *Parasitol Inter* 2005; S63-S67.
18. Ghorbanpoor M, Razi Jalali MH, Hoghooghi Rad N, Nabavi L, Esmail Zadeh S, Rafiei A, et al. Detection of specific hydatid antigens and antibodies in serum and urine of experimentally infected sheep. *Vet Parasitol* 2006; 142: 91-94.
19. Devi CS, Parija SC. A new serum hydatid antigen detection test for diagnosis of cystic echinococcosis. *Americ J Tropic Med Hyg* 2003; 69: 525-528.