

ارزیابی روش کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص آنتی‌ژن‌های پیکری گردشی فاسیولا ژیگانتیکا در سرم گاو

وجیهه خدادادیان^{1*}، امین حسنونند²، محمدحسین راضی جلالی³، مسعود قربانپور نجف آبادی⁴

(تاریخ دریافت: 91/3/5؛ تاریخ پذیرش: 91/4/1)

چکیده

تشخیص سرولوژیک فاسیولوز یا براساس جستجوی پادتن ضد انگل یا بر پایه جستجوی پادگن انگل در سرم انجام می‌شود. در صورت جستجوی پادگن تشخیص زود هنگام بیماری امکان‌پذیر می‌گردد. با روش کانترایمونوالکتروفورز می‌توان در کمتر از 3 ساعت وجود پادتن یا پادگن را مورد بررسی قرار داد. به منظور ارزیابی این روش جهت جستجوی پادگن فاسیولا ژیگانتیکا در گاو مطالعه حاضر صورت گرفت. برای این منظور تعدادی کبد گاو آلوده به فاسیولا ژیگانتیکا از کشتارگاه تهیه شد و از انگل‌های جمع‌آوری شده، پادگن‌های پیکری به روش اولدهام و ویلیامز تهیه گردید. پادگن‌های مذکور جهت ایمن‌سازی و تولید سرم هیپرایمون به 2 قطعه خرگوش تزریق گردید. جهت جمع‌آوری نمونه‌های مثبت و منفی، کبد گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز از نظر آلودگی به فاسیولا ژیگانتیکا مورد بررسی قرار گرفت و 40 نمونه خون از گاوهای آلوده و 20 نمونه خون از گاوهای غیرآلوده اخذ گردید و نمونه‌های سرم، از نظر حضور پادگن‌های گردشی فاسیولا ژیگانتیکا به روش کانترایمونوالکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. از 40 نمونه سرم گاوهای آلوده در کانترایمونوالکتروفورز 36 نمونه مثبت بودند و 20 نمونه سرم گاوهای غیرآلوده همگی منفی بودند. حساسیت و ویژگی این تست به ترتیب 90 و 100 درصد محاسبه گردید. با توجه به حساسیت و ویژگی قابل قبول و سرعت بالای این روش، می‌توان از آن به جهت تشخیص زود هنگام آلودگی به فاسیولا ژیگانتیکا بهره جست.

کلمات کلیدی: کانترایمونوالکتروفورز، فاسیولا ژیگانتیکا، گاو.

1 - کارشناس ارشد انگل شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

2 - دانشجوی دکترای داروشناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

3 - استادیار انگل شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

4 - استاد میکروبی شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*: مسئول مکاتبات؛ پست الکترونیکی: khodadadianvajihe@yahoo.com

مقدمه

یکی از مشکلات اصلی و عمده‌ی بهداشتی کشور که سال‌ها است به صورت یک معضل، بخشی از منابع انسانی و مالی کشور را به خود اختصاص داده و هراز چندگاه به صورت بحران جدی در استان‌های مختلف و در قالب بیماری‌های نوپدید و باز پدید مطرح می‌شوند، بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان می‌باشند. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت از میان 1709 عامل بیماری‌زا، 832 عامل، از حیوانات به انسان منتقل می‌شود و همچنین از میان 156 بیماری نوپدید شناخته شده در انسان، 114 مورد آن از حیوانات به انسان منتقل می‌گردند (4).

آلودگی کبد حیوانات اهلی به فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا انتشار جهانی دارد و باعث بیماری فاسیولوزیس می‌گردد که از نظر اقتصادی موجب خسارات قابل توجهی می‌شود. خساراتی که به صورت مستقیم و غیرمستقیم زیان‌های زیادی به صنعت دامپروری کشور وارد می‌کند قابل توجه است. ابتلا به فاسیولا موجب تلفات، ضبط لاشه‌ها، ضبط کبدهای آلوده، کاهش وزن، کاهش پشم، کاهش باروری، مرگ‌زودرس جنین، کاهش شیر و غیره می‌شود (1، 16، 18).

با توجه به این که روش‌های معمول تشخیص آلودگی عمدتاً پس از استقرار کرم در مجاری صفراوی و با آزمایش مدفوع و دیدن تخم امکان تشخیص را فراهم می‌سازند، توسعه روش‌هایی جهت تشخیص سریع و درمان به موقع ضروری به نظر می‌رسد. بررسی فعلی تلاشی است جهت تشخیص زودرس آلودگی به فاسیولا ژیگانتیکا با روش کانترایمونوالکتروفورز، که با توجه به زئونوز بودن بیماری در صورت داشتن حساسیت و ویژگی مورد قبول، قابل ارزیابی در پزشکی نیز خواهد بود.

روش بررسی

جمع‌آوری انگل:

تعدادی کبد گاو آلوده به فاسیولا ژیگانتیکا از کشتارگاه تهیه و به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل گردیدند. تعداد 30 انگل بالغ جهت تهیه آنتی‌ژن-های پیکری جدا شد، برای این کار کبدهای آلوده در داخل ظروف مناسب به قطعات 1 سانتی‌متر برش داده شد و خوب مخلوط گردید، انگل‌های خارج شده از مجاری و پارانشیم کبد، جدا گردید و برای مرحله‌ی بعد آماده شد (5).

تهیه آنتی‌ژن‌های پیکری از انگل بالغ

فاسیولا ژیگانتیکا:

از انگل‌های جمع‌آوری شده طبق روش اولدهام و ویلیامز (1985) آنتی‌ژن‌های پیکری تهیه گردید. برای این منظور انگل‌های جمع‌آوری شده، 3 بار با PBS شستشو شد و کاملاً آبکشی گردید، سپس انگل‌ها، خشک شد و به مدت 24 ساعت در فریز 70- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. انگل‌های خشک شده در هاون به صورت پودر در آورده شد. پودر حاصل در PBS هموژن شده و با مخلوط کن برقی به مدت 15 دقیقه مخلوط و به مدت 24 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری گردید. پس از این مدت مایع رویی برداشته شده، داخل لوله‌های استریل ریخته شد و رسوب با دور 3000 و به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع حاصل از سانتریفیوژ با فیلتر 0/2 میکرونی و سرنگ 20 سی‌سی در زیر هود آزمایشگاهی و در کنار شعله، داخل لوله‌های استریل فیلتر شده، سرانجام مایع فیلتر شده تا هنگام استفاده در فریزر 20- نگهداری گردید میزان پروتئین به روش براد-فورد اندازه‌گیری گردید. (17).

ایمن سازی خرگوش:

تعداد دو قطعه خرگوش سالم از نظر ظاهری جهت ایمن سازی و تولید سرم هیپرایمون طبق روش فاگیمی و همکاران (1995) بکار گرفته شد. خرگوش‌ها به مدت یک هفته برای سازگاری با محیط در داخل قفس در اتاق شستشوی آزمایشگاه انگل‌شناسی نگهداری شدند. جهت ایمن کردن، 0/5 سی‌سی ادجوانت کامل فروند با 1/5 سی‌سی آنتی‌ژن خام تهیه شده از فاسیولا ژینگانتیکا مخلوط شده (وبه طور کلی میزان آنتی‌ژن تزریقی به هر خرگوش 9 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) پشت عضله‌ی ران خرگوش‌ها تزریق گردید. به فاصله‌ی دو هفته تزریق دوم آنتی‌ژن به میزان 1/5 سی‌سی همراه با 0/5 سی‌سی ادجوانت ناقص فروند صورت گرفت (9).

جمع آوری سرم هیپرایمون (فوق ایمن):

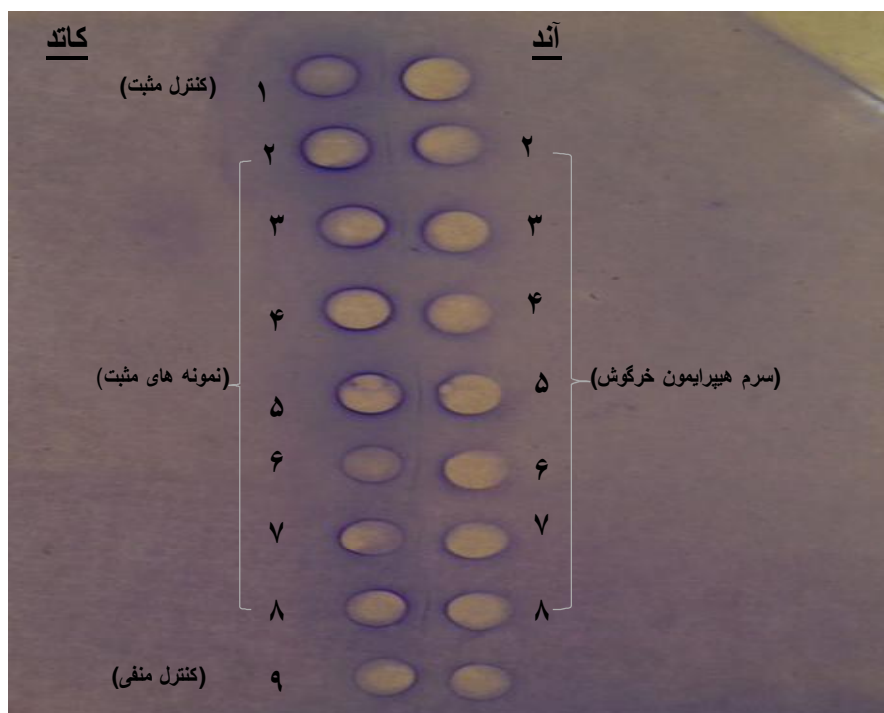
4 هفته بعد از تزریق دوم از قلب خرگوش‌ها خونگیری بعمل آمد و سرم آن‌ها به وسیله‌ی سانتریفیوژ با دور 2000 به مدت 30 دقیقه جداسازی و در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جمع آوری سرم گاوهای آلوده و غیر آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا:

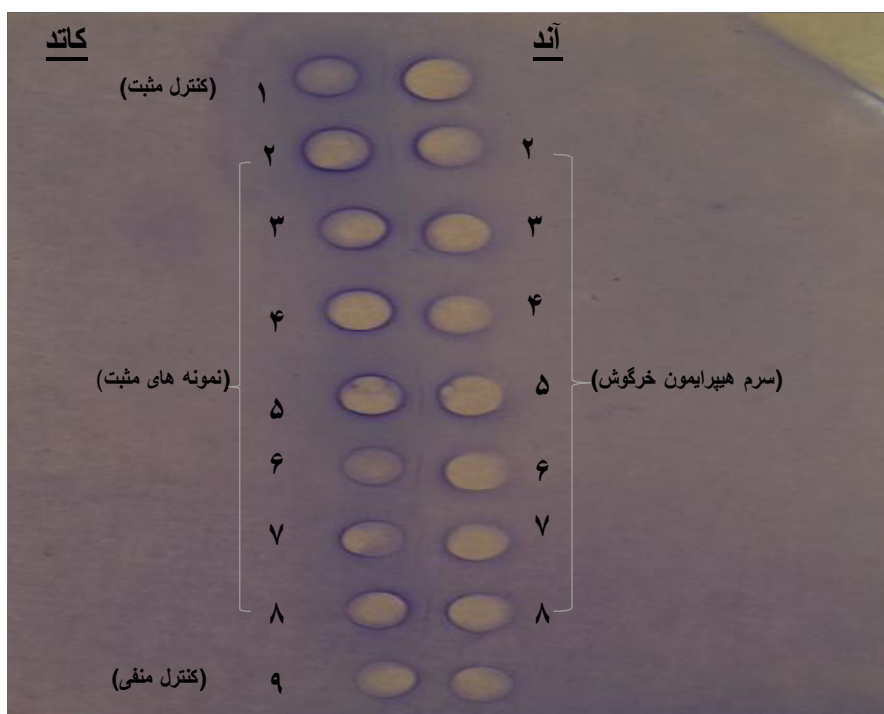
نمونه‌های کبد و سرم از گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز جمع‌آوری گردید و کبدها از نظر آلودگی به فاسیولا ژینگانتیکا مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع تعداد 40 نمونه سرم از گاوهایی که آلودگی آن‌ها محرز شده و 20 نمونه سرم از گاوهای غیر آلوده جمع‌آوری گردید. سرم نمونه‌های آلوده و غیر آلوده توسط سانتریفیوژ جدا و در میکروتیوب‌های استریل و در دمای 20- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

انجام کانتر ایمونوالکتروفورز:

جهت انجام کانتر ایمونوالکتروفورز مطابق روش آرافا و همکاران (1999) تعداد 40 نمونه سرم گاو آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا و 20 نمونه سرم غیر آلوده بکار رفت. در هر اسلاید مطابق تصویر 3-1 تعداد 9 زوج حفره وجود داشت که در تمام حفرات یک طرف مقدار 10 میکرولیتر سرم هیپرایمون (فوق ایمن) خرگوش و در طرف مقابل مقدار 10 میکرولیتر از سرم‌های شاهد و نمونه‌های مورد مطالعه ریخته شد. اسلایدهای آماده طوری داخل تانک قرار گرفت که سرم هیپرایمون (فوق ایمن) خرگوش در سمت آند و سرم‌های مورد بررسی (جهت جستجوی آنتی‌ژن) در سمت کاتد تانک قرار گیرند. برای برقراری جریان الکتریسته، دو طرف ژل توسط دو قطعه کاغذ آغشته به بافر به محفظه‌های آندی و کاتدی بافر متصل می‌گردید. الکتروفورز با جریان 50 میلی‌آمپر به مدت 2 ساعت انجام می‌شد، بعد از 2 ساعت جریان الکتریسته قطع می‌گردید. به منظور شستشو اسلاید ژل با زاویه‌ی 45 درجه به مدت 24 ساعت در ظرف محتوی بوراکس به طوری که در محلول غوطه‌ور گردد، قرار داده می‌شد. به منظور رنگ-آمیزی اسلاید به آرامی برداشته شده و به مدت 10 دقیقه داخل ظرف حاوی رنگ کوماسی بلو 5% قرار می‌گرفت. به منظور رنگ‌بری اسلایدها به مدت 30 دقیقه در محلول رنگ‌بر قرار داده شده و نهایتاً اسلایدها از نظر خطوط رسوبی مورد بررسی قرار گرفته، نمونه‌های مثبت شده به صورت خطوط رسوبی در بین حفره‌ها مشاهده می‌شد (6). برای خشک کردن ژل، اسلایدها به مدت 24 ساعت در هوای آزمایشگاه قرار داده می‌شد. اسلایدها در ورقه‌های آلومینیومی نگهداری گردیدند.



تصویر 3-1: روش کانترایمنوالکتروفورز روی اسلاید ژل آگاروز 1 درصد جهت تشخیص آنتی ژن های گردشی فاسیولا ژیگانتیکا در سرم گاو



تصویر 4-1: نتایج آزمایش کانترایمنوالکتروفورز 8 نمونه سرم گاوان آلوده و غیر آلوده به فاسیولا ژیگانتیکا

برای محاسبه حساسیت از فرمول زیر استفاده

گردید:

$$SE = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

FN (negative False) یا منفی کاذب، گاوآن غیر آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا می باشد که پاسخ آزمایش نیز در آن ها منفی می باشد (12).

برای محاسبه ویژگی از فرمول زیر استفاده گردید:

$$SP = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

نتایج

در این مطالعه که بر روی 40 نمونه سرم گاو آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا و 20 نمونه سرم غیر آلوده، جمع آوری شده از کشتارگاه شهر اهواز انجام گرفت، کانتر ایمونوالکتروفورز 40 نمونه سرم آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا در 36 نمونه مثبت و در تمام 20 نمونه سرم غیر آلوده منفی بود. حساسیت و ویژگی تست کانتر ایمونوالکتروفورز جهت تشخیص دام های آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا به ترتیب 90 و 100 درصد محاسبه گردید.

TP (True positive) یا مثبت واقعی، گاوهای

آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا می باشد که پاسخ آزمایش آن ها نیز مثبت می باشد.

TN (True negative) یا منفی واقعی،

گاوهای غیر آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا می باشد که پاسخ آزمایش آن ها منفی می باشد (12).

FP (False positive) یا مثبت کاذب، گاوهای

غیر آلوده به فاسیولا ژینگانتیکا می باشد که پاسخ آزمایش آن ها مثبت می باشد.

جدول 4-1: نتیجه کانتر ایمونوالکتروفورز، جهت جستجوی آنتی ژن فاسیولا ژینگانتیکا در 60 نمونه سرم گاوی

نتایج کانتر ایمونوالکتروفورز

حضور انگل در کبد	مثبت	منفی	جمع
سرم مثبت	36	4	40
سرم منفی	-	20	20
جمع	36	24	60

بحث و نتیجه گیری

فاسیولا ژینگانتیکا کرم متداول کبد گوسفند، بز، گاو، گاو میش و دیگر علف خواران اهلی و وحشی در آفریقا و آسیا می باشد (2). فاسیولوز یکی از مهمترین بیماری های انگلی نشخوارکنندگان اهلی در سرتاسر جهان است (2)، که از نظر اقتصادی و

کاهش فرآورده های دامی موجب خسارت قابل توجهی می شود (1). تشخیص متداول فاسیولوز بر مبنای مشاهده حضور تخم انگل در مدفوع است که در مراحل پیشرفته بیماری پس از بالغ شدن انگل در کبد امکان پذیر می شود که در این مرحله انگل

مذکور به ترتیب 57/4، 68/37، 76/06 درصد محاسبه شده است (19).

مطالعه حاضر برای اولین بار به منظور ارزیابی روش کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص آنتی-ژن‌های در گردش فاسیولا ژینگانتیکا در گاوان آلوده صورت گرفت. البته در یک مطالعه نیز از کانترایمونوالکتروفورز برای جستجوی آنتی‌ژن بهره‌گیری شده است ولی نه در سرم بلکه در مدفوع و آن بررسی مطالعه یوسف و همکاران (1991) است که با بررسی حضور کوپرآنتی‌ژن‌های فاسیولا ژینگانتیکا در نمونه‌های مدفوع انسانی وجود خط رسوبی را در کانترایمونوالکتروفورز نشان داده‌اند و اعلام نموده‌اند می‌توان از این روش نیز برای تشخیص فاسیولوز بهره‌گیری نمود اما آن را ارزیابی نموده‌اند (22).

در مطالعات متعددی نیز از سایر روش‌های سرولوژیک از جمله الایزا و دات الایزا جهت جستجوی آنتی‌بادی ضد فاسیولا مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند که در ادامه به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود.

دلیمی و همکاران (2003) از آنتی‌ژن‌های فاسیولا ژینگانتیکای بالغ جهت تشخیص فاسیولوز انسانی با استفاده از دات الایزا استفاده نموده‌اند که حساسیت و ویژگی آن به ترتیب 94/23 و 99/36 درصد اعلام نموده‌اند (8).

پیوپان و همکاران (2003) آنتی‌ژن دفعی - ترشچی، 27 کیلودالتونی فاسیولا ژینگانتیکای بالغ را با تست دات الایزا ارزیابی نموده و حساسیت و ویژگی آن را به ترتیب 98/2 و 100 درصد گزارش کرده‌اند (13).

مونتاکان و همکاران (2001) روش الایزا و AGPT جهت تشخیص فاسیولوز گاوی را با هم مقایسه کرده‌اند و اعلام نموده‌اند که در هر دو روش اگرچه حساسیت بالاست ولی ویژگی پایین

ضایعات زیادی نیز به کبد وارد ساخته و خسارات اقتصادی زیادی را باعث شده است. در صورتی که با روش‌های سرولوژی بتوان بیماری را تشخیص داد امکان تشخیص بیماری در مراحل اولیه بیماری فراهم می‌شود و سریع‌تر می‌توان اقدام به درمان نمود و از وارد آمدن خسارات بیشتر جلوگیری کرد (1).

تشخیص سرولوژیک فاسیولوز به طور معمول با تشخیص وجود پادتن ضد انگل در سرم خون صورت می‌گیرد که لازمه آن گذشت حدود 2 هفته از آغاز آلودگی است اما در صورتی که بتوان با تأیید وجود آنتی‌ژن انگل در سرم خون به تشخیص رسید، امکان تشخیص آلودگی در روزهای اولیه آلودگی وجود خواهد داشت و به طبع با انجام درمان بیماری در مراحل اولیه، از خسارات ناشی از بیماری به نحو بهتری می‌توان جلوگیری نمود. مطالعه حاضر جهت ارزیابی کانترایمونوالکتروفورز به منظور جستجوی آنتی‌ژن فاسیولا ژینگانتیکا در سرم گاو صورت گرفت، که بررسی منابع نشان داد ظاهراً تاکنون این مهم صورت نگرفته است.

اما از این روش برای جستجوی آنتی‌بادی ضد فاسیولا به کرات بهره‌گیری شده است که در ادامه به مواردی از آن‌ها اشاره می‌شود. در مطالعات آرافا و همکاران (1999) آزمایش کانترایمونوالکتروفورز جهت تشخیص زود هنگام فاسیولوز با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشچی فاسیولا ژینگانتیکا ارزیابی شده است حساسیت و ویژگی آن به ترتیب 38/7 و 100 درصد گزارش گردیده است (6).

ساروپ و همکاران (1987) از سه آزمایش :

AGPT (Agar Gel Precipitation test)
CIEP (Counterimmunoelectrophoresis)
IHA (Indirect haemagglutination)

جهت ارزیابی تشخیص آلودگی فاسیولا ژینگانتیکادر گاو میش استفاده نموده‌اند که حساسیت روش‌های

گردشی فاسیولا ژیگانتیکا را شناسایی کرده‌اند که با استفاده از این روش احتمال مثبت بودن تست در یک هفته بعد از آلودگی 82/5 درصد گزارش شده است (11).

ولوزومای و همکاران (2003) تهیه آنتی‌بادی بر ضد آنتی‌ژن خالص شده 45 کیلودالتونی فاسیولا ژیگانتیکا، آنتی‌ژن مذکور را در سرم گوساله‌های آلوده به شکل تجربی نشان داده‌اند (20).

در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی آزمایش کانترایمنوالکتروفورز جهت تشخیص دام‌های آلوده به فاسیولا ژیگانتیکا به ترتیب 90 و 100 درصد محاسبه گردید. باید توجه داشت که آزمایشاتی که بر مبنای تشخیص آنتی‌بادی هستند اغلب به دلیل واکنش متقاطع ویژگی پایینی دارند اما روش‌های مبتنی بر تشخیص آنتی‌ژن از ویژگی بالاتری برخوردار هستند، لذا در بررسی حاضر ویژگی CIEP، 100 درصد برآورد شده است. در مجموع با توجه به ویژگی بالا و حساسیت قابل قبول CIEP استفاده از این روش در تشخیص فاسیولوز توصیه می‌گردد.

آلودگی فاسیولا ژیگانتیکا در گاو و گاو میش - های کشتار شده در ایران در سال‌های مختلف از 91-17 درصد متفاوت گزارش شده است (1) که نشان می‌دهد خسارات زیادی در اثر این بیماری به صنعت دامپروری کشور وارد می‌شود که با توجه به نتایج مطالعه حاضر با تشخیص بیماری در اوایل عفونت به کمک CIEP که روشی سریع، آسان و ارزان است (15، 14، 10) می‌تواند جهت تشخیص به موقع و درمان سریع بیماری مورد توجه قرار گیرد و از خسارات ناشی از آن جلوگیری نمود.

است که این امر ممکن است ناشی از واکنش متقاطع با سایر آلودگی‌های انگلی باشد (21).

مودنی و شارماگائو (1386) آزمایش با الایزا آنتی-ژن‌های خام فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا را با هم مقایسه نموده‌اند و اعلام کرده‌اند تفاوت‌های موجود بین مواد آنتی‌ژنیک فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا در حدی نیست که مانع از واکنش متقاطع بین دو گونه‌ی انگل در آزمایش الایزا شود و تحقیقات بیشتری برای شناسایی، جداسازی و تخلیص مواد آنتی‌ژنیک این انگل‌ها را توصیه نموده‌اند (3).

ایبارا و همکاران (1998) از سه روش دات الایزا، الایزای غیرمستقیم، (-Diffusion-in-gel-DIG(enzyme linked immunosorbent. الایزا جهت تشخیص فاسیولوز در گاو استفاده کرده‌اند که الایزای غیرمستقیم با حساسیت و ویژگی به ترتیب، 96/5 و 98/8 درصد بهتر از بقیه روش‌ها بوده است (12).

آواد و همکاران (2009) استفاده از آنتی‌ژن‌های مختلف فاسیولا ژیگانتیکا روش الایزای غیرمستقیم را ارزیابی نموده‌اند که طبق این مطالعه ایشان آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشچی جهت تشخیص آنتی‌بادی‌ها با بهترین نتایج همراه بوده است (7).

در برخی مطالعات نیز مشابه مطالعه حاضر به جستجوی آنتی‌ژن فاسیولای سرم پرداخته شده است اما نه با روش CIEP بلکه با سایر روش‌های سرمی از جمله الایزا، که به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود.

گوبادیا و فاگبمی (1996) در آلودگی تجربی و طبیعی گوسفندان با استفاده از الایزا آنتی‌ژن‌های-

منابع

- 1- اسلامی، ع. 1377. کرم‌شناسی دامپزشکی. جلد اول (ترماتودا)، انتشارات دانشگاه تهران. صفحات 45-86.
- 2- ذوقی، ا. 1376. بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان، تالیف اچ. استیل و جیمز. جلد سوم، چاپ اول. انتشارات علمی و فرهنگی تهران. صفحات 167-138.
- 3- مؤذنی، م و شارماگائوی، ش. 1386. مقایسه آنتی‌ژن‌های خام فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا به وسیله آزمایش- الیزا. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره 11، صفحات 5-1.
- 4- نیک اختر، ر. 1388. انگیزه نگهداری سگ. www.qcqa.com.
- 5- Anderson, N., Luong, T.T., Vo, N.G., Bui, K.L., Smooker, P. M., Spithill, T., 1999. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*. 83: 15-24.
- 6- Arafa, M.S., Abaza, S. M., El-Shewy, K. A., Mohareb, E.W., El-Moamly, A., 1999. Detection of *Fasciola*-specific excretory/ secretory (E/S) protein fraction band (49.5 kDa) and its utilization in diagnosis of early fascioliasis using different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*. 58 (3): 235-246.
- 7- Awad, W. S., Ibrahim, A.K., Salib, F. A., 2009. using indirect ELISA to assess different antigens for the serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle, sheep and dokeys. *Veterinary Parasitology*. 63: 1-13.
- 8- Dalimi, A., Hadighi, R., Madani. R., 2004. Partially purified fraction (PPF) antigen from adult *Fasciola gigantica* for the serodiagnosis of human fascioliasis using Dot-ELISA technique. *Annals of Saudi Medicine*. 24(1): 18-20.
- 9- Fagbemi, B.O., Obarisiagbo, I.O., Mbu. J. V., 2000. Detection of circulating antigen in sera of *Fasciola gigantica* infected cattle with antibodies reactive with a *Fasciola*-specific 88-kDa antigen. *Veterinary Parasitology*. 58(3): 235-246.
- 10- Fascioliasis, F.A ., 2006. Eight cases of Lifermann and Vincendeau, P. Dauchy Medical Malpractice Infection. *Clinical and microbiological features*. 36(1):42-6.
- 11- Guobadia, E. E and., Fagbemi. B. O., 1996. Detection of circulating *Fasciola gigantica* antigen in experimental and natural infections of sheep with fasciolosis. *Veterinary Parasitology*. 15: 29-39.
- 12- Ibarra, F., Montenegro, N., 1998. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Veterinary Parasitology*. 77: 229-23.
- 13- Intapan, P. M., Maleewong, W., Nateeworanart, S., Wongkham, C., Pipitgool, V., Sukolapong, V Sangmaneedet, S., 2003. Immunodiagnosis of human *Fasciola gigantica* adult worm with the molecular mass of 27 KDa by a Dot - ELISA. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 34:717-713.
- 14- Kreder, T., Bozic, B., 2002. Counterimmunoelectrophoresis: fast, easy and cost-effective method for the detection of autoantibodies to intracellular antigens. *Clinical chemistry and laboratory Medicine*. 40(4):428-9.
- 15- Mikhail, E.M., Farid, Z., Youssef, F.G ., Mansour, N. S., 1990. Counterimmunoelectrophoresis for the rapid and specific diagnosis of acute fascioliasis and schistosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84(3): 400-1.
- 16- Molina, E.C ., Skerratt, L.F., 2005. Cellular and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica* . *Veterinary Parasitology*. 131: 157-163.

- 17- Oldham ,G ., Williams, L.,1985. Cell mediated immunity to liver fluke antigens during experimental *Fasciola hepatica* infection of cattle. *Parasite Immunology*. 7: 503–516.
- 18- Paz-Silva, A., Hillyer,G.V., Sanchez, R., Rodriguez, J.R., et al .,2004. Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2/9 KDa recombinant protein for the diagnosis of bovine fasciolosis. *Parasitology Research*. 95: 129-135.
- 19- Swarup, D., Pachauri, S.P., Sharma, B., Bandhopadhyay, S.K .,1987. Serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 01; 24(1-2): 67-74.
- 20- Velusamy, B., Singh, B.P., Sharma, R.L .,Chandra, D.,2003. Detection of circulating 54 kDa antigen in sera of bovine calves experimentally infected with *F. gigantica* . *VeterinaryParasitology*.119:187-195.
- 21- Vongpakorn, M., Waikagul, J., Dekumyoy, P.C.,Tasanee, R., Pongponratn, E., 2001. Comparison of ELISA and GPAT in Diagnosis of Bovine Fasciolosis Using Excretory- Secretory Antigen. *Tropical Medicine and Parasitology*: 24:1-7.
- 22- Youssef, F.G., mansour, N.S., Aziz, A.G., 1991. Early diagnosis of human Fascioliasis by the detection copro-antigens using counterimmunoelectrophoresis. *Transactions of the Royal society of tropical medicine and Hygiene*. 85(3): 383-384

