نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۳، تابستان ۱۳۹۳

بررسی آلودگی به کیست هیداتید به روش الایزا در گاومیش‌های کشتار شده در کشتارگاه شهرستان ارومیه

• **فرزاد قبله (نویسنده مسئول)**
کارشناس پژوهشی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام جهاد کشاورزی
• **محمدرضا طراوتی**
استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
• **ناصر حریقی**
کارشناس سازمان انتقال خون استان آذربایجان غربی
• **علیرضا آذروندی**
عضو هیئت علمی‌مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام جهاد کشاورزی
تاریخ دریافت: بهمن‌ماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: مردادماه ۱۳۹۲
f_gh45@yahoo.com

چکیده

کیســت هیداتید یک بیماری انگلی مشــترک بین انســان و حیوان است. سگ ســانان میزبان اصلی و گوسفند، بز و انسان میزبان واســط هســتند. در میان میزبانان واسط گوسفند مناســب ترین میزبان بوده و در انتشار انگل نقش مهمتری دارد. جهت کنترل این بیماری داشتن اطلاعات درست از همه‌گیری شناسی بیماری لازم و ضروری است. این مهم بدون داشتن روش تشــخیص مناســب امکان پذیر نیست. لذا در بررســی اخیر جهت تشخیص کیســت هیداتید همانند سایر نقاط دنیا تســت الایزا مورد اســتفاده قرار گرفت. ابتدا از ۳۸۴ راس گاومیشــهای شهرســتان ارومیه خون گیری بعمل آمد. ســپس ســرم نمونه‌های خون جدا شــده و توسط روش الایزا آزمایش شدند. آنتی ژن مورد نیاز در تست الیزا را نیز، از مایع کیست هیداتید بارور گاومیش‌های کشــتار شده در کشتارگاه شهرســتان ارومیه، جداسازی و تخلیص شد. بر اساس نتایج بدست آمده، ۲۵٪ نمونه‌ها ســرم مثبت تشــخیص داده شد. تست الایزا در مقایســه با سایر تستها ی تشخیص، علاوه بر مقرون به صرفه بودن، دارای حساسیت و ویژگی بالایی است.

کلمات کلیدی: سرواپیدمیولوژی، کیست هیداتید، الایزا، گاومیش، شهرستان ارومیه

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 103 pp: 60-64

A serological investigation of hydatidosis using ELISA on buffalos in Urmia Azarbaijan Province

By: Ghebleh, F.; (Corresponding Author) Taravati, M.R.; Harighi, N.; Azarandi, A.R.
Azarbaijan Province Ministry Of Jahad – Agriculture, Iran
Email: f_gh45@yahoo.com
Received: January 2012 Accepted: July 2014

Hydatid cyst is a world wide and zoonotic disease between human and animal. In this study 384 buffalos were used for blood sampling according to cocran formula. In compliance with ELISA kit to study the samples, the needed antigen was removed from the fertile hydatid cysts and purified according to Oriol and Rogan method. Then reliability of the conjugate (Biodesign company) required density of antigen and blood serum were checked. Finally the blood sera from the buffallos chosen were tested with prepared Elisa Test. The results were %25 positive. This study indicated that,Elisa in the level of 1/400 serum dilution showed 95% sensitivity and 98% specificity. So the ELISA test can be suitable method in the diagnosis of Hydatid Cysts infection.

Key words: Serological – Hydatidosis –Elisa – Buffalo –Urmia

مقدمه

کیست هیداتید جزء بیماریهای مشترک بین انسان و دام است. عامل ان سستودی از خانواده تنی ایده و جنس اکینوکوکوس به نام *Echinococcus granulosus* می‌باشد. میزبان نهایی این انگل از گروه سگ سانان می‌باشدکه در صورت آلوده بودن میزبان نهایی بندهای حاوی تخم یا تخم‌های انگل را توسط مدفوع به خارج دفع می‌کند.در صورت بلع این تخم توسط میزبان‌های واسط (کلیه پستانداران، منهای گوشتخواران از جمله انسان،گوسفند، بز، گاو) به متاسستود کیست هیداتید در اندام‌های مختلف آنها تبدیل خواهد شد (۱).

شناسایی و تشخیص این انگل از نظر بهداشت عمومی در جوامع انسانی و همچنین خسارات اقتصادی وارده به جمعیت دامی‌اهمیت دارد. با توجه به اینکه انگل این بیماری در میزبان واسط رشد کند و علائم مشخصی ندارد، در سال‌های اخیر با پیشرفت‌های روز افزون و کشف واکنش‌های مختلف دفاعی بدن در مقابل عوامل خارجی، روش‌های سرم شنا سی در تشخیص و در نتیجه درمان بیماری‌های انگلی کاربرد وسیع تری پیدا کرد (۱۳ و ۱۴) از روش‌های مختلف سرم شناسی به منظور تشخیص این بیماری‌ها استفاده می‌شود نظیر آزمایش داخل پوستی کازونی IHA–IFA– ایمنو الکتروفورز و الایزا. تکنیک الایزا بعلت حساسیت و ویژگی بالائی که دارد در آشکار سازی پادگن‌های اختصاصی این بیماری روش مناسب برای بررسی‌های اپیدمیولوژیک می‌باشد (۱). بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک مختلفی در کنیا، ایتالیا، آرژانتین، اسپانیا و تونس به روش الایزا به عنوان تست تشخیصی انجام گرفته است (۱۷، ۲۷ و ۲۸). آنتی ژن را می‌توان از منابع مختلف آنتی ژنتیک تهیه کرد (پروتواسکولکس، غشاء کیست، آنتی ژن‌های موجود در مایع کیست هیداتید). مایع کیست هیداتید براحتی در دسترس است و حاوی ترکیبات پروتئینی مختلفی می‌باشد. مایع کیست هیداتید در تست‌ها نتایج متغیری از مثبت کاذب تا منفی کاذب ایجاد می‌کند. برای رفع این مشکل محققین مواد زائد را از آنتی ژن‌های مایع کیست هیداتید جدا کردند تا ویژگی ارزیابی سرمشناسی آن اصلاح شود (۵ و ۹). از تصفیه مایع کیست هیداتید دو ترکیب لیپوپروتئینی شامل آنتی ژن‌های گروه ۵ و گروه ب جدا شدند. آنتی ژن گروه ۵ دارای موارد مثبت کاذب با سایر گونه‌های اکینو کوکوس و سیستی سرکوس می‌باشد. بنابر این آنتی ژن ب مایع کیست هیداتید، به عنوان آنتی ژن در تست الایزا در تشخیص کیست هیداتید مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳، ۱۵، ۲۱ و ۲۳).

روش کار

۱-تهیه آنتی ژن ب از مایع کیست هیداتید

آنتی ژن ب مورد نیاز در این آزمایش بر اساس روش Oriol و همکاران (۲۳) Rogan و همکاران (۲۵) از مایع کیست هیداتید بارور گاومیش تهیه گردید. بر طبق این روش میزان پروتئین تام مایع کیست هیداتید(۱/۱۰۰۰ رقیق شده) میکرو گرم درهر میلی لیتر ۱۰ محاسبه شد.

۲-طراحی تست الایزا

جهت طراحی تست الایزا،بعد از جداسازی آنتی ژن ب از مایع کیست هیداتید، ابتدا صلاحیت (تعیین صحت، صحه گذاری، کونژوگه – غلظت اولیه آنتی ژن، رقت مناسب کونژوگه و سرم تعیین شد. سپس جهت بدست آوردن غلظت دقیق سرم و آنتی ژن و کونژوگه، جدول کنترل و مشاهده (چکر بورد) تهیه گردید. (رقت‌های مختلف آنتی ژن در مقابل رقت‌های مختلف مخلوط(پولد) سرم‌های مثبت و مخلوط (پولد) سرمهای منفی مورد آزمایش قرار گرفت). جهت تعیین cut off نیز از فرمول میانگین نمونه‌های منفی به اضافه سه انحراف معیار استفاده شد. بر اساس این فرمول ۰/۷ محاسبه گردید.

(از ۵۰ نمونه پانل منفی ۴۹ نمونه منفی و از ۲۰ نمونه پانل مثبت ۱۹ نمونه مثبت تشخیص داده شد) حساسیت و ویژگی تست، به ترتیب ۹۵٪ و ۹۸٪ تعیین گردید.

۳- تعیین اندازه نمونه و روش مطالعه

با توجه به اینکه درصد شیوع بیماری در این جمعیت مشخص نبود. درصد مورد انتظار بیماری ۵۰٪ در نظر گرفته شد و تعداد نمونه موردنیاز

جهت این بررسی توسط فرمول ککران با ضریب اطمینان ۹۵٪، ۳۵۴ نمونه محاسبه گردید. در این مطالعه تعداد ۳۸۴ نمونه اخذ گردید. طبق روش آماری تهیه نمونه در این طرح (نمونه برداری ساده طبقه بندی شده)،حومه شهرستان ارومیه را به چهار منطقه تقسیم گردید. (۱-منطقه سیلوانا ۲-منطقه نازلو ۳-منطقه دیزج دول ۴-منطقه انزل) سپس اسامی‌روستاهای هر منطقه را بر روی کاغذ نوشته و داخل کیسه ریخته، از هر منطقه چهار روستا، و از هر روستا ۲۴ راس گاومیش به صورت تصادفی انتخاب گردید..و در کشتارگاه از گاومیش‌های مربوط به روستاهای مشخص شده در بالا خون گیری به عمل آمد.در مجموع ۳۸۴ نمونه خون از گاومیش‌ها با دامنه سنی ۱ تا ۲ سال تهیه و بعد از خون گیری و جداسازی سرم، توسط تست الایزا مورد آزمایش قرار گرفتند.

۴- مطالعه نمونه‌ها

جهت مطالعه نمونه‌ها، ابتدا غلظت ۱/۲۰۰۰ آنتی ژن توسط بافر کربنات تهیه گردید. ۱۰۰ میکرو لیتر از این غلظت به همه چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد و ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. سپس پلیت را سه مرتبه با محلول (wash buffer) شستشو داده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۵٪ شیر خشک به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. بعد از این مدت سه بار پلیت را با محلول W.B شستشه و ۱۰۰ میکرولیتر سرم با رقت ۱/۴۰۰ به چاهک‌ها اضافه گردید. بعد به مدت یک ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار میدهیم.دوباره سه مرتبه شستشو داده، ۱۰۰ میکرو لیتر سرم کونژوگه با غلظت ۱/۳۰۰۰۰(توسط PBS تهیه شده است) به چاهکها اضافه میکنیم.یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کرده، بعد از سه مرتبه شستشو بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر محلول TMB به حفره‌ها اضافه می‌کنیم. ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک نگهداری کرده، بعد از این مدت محلول Stop Solution بمقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌ها اضافه میکنیم.در این مرحله دستگاه الایزا را بر روی طول موج ۴۵۰ نانومتر تنظیم کرده پلیتها را قرائت میکنیم.نتایج بدست آمده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

بحث

بیماری هیداتیدوز انتشار جهانی دارد و سالانه خسارتهای اقتصادی و بهداشتی فراوانی در کشورهای مختلف جهان ایجاد می‌کند. معمولاً آلودگی دامها به هیداتیدوز منجربه کاهش قابل ملاحظه‌ای در محصولات دامی(گوشت، شیر، پشم) می‌شود. علاوه بر این اندام‌های آلوده دام‌های مبتلا در کشتارگاه‌ها ضبط و معدوم می‌شود. میزان خسارت ناشی از ضبط و معدوم ساختن اندام‌های آلوده در جهان بالغ بر میلیون‌ها دلار می‌باشد.

گزارش اداره کل دامپزشکی استان آذربایجان غربی در شهرستان ارومیه طی ۹ ماهه سال ۱۳۸۳ از ۵۸۸۹ گاومیش کشتار شده ۱۴۵ مورد (۴٪) کبد مبتلا به کیست هیداتید ضبط شده است.

در مدرس هند از ۹۰۶ راس گاومیش نر کشتارشده ۳۱۹ راس

جدول ۱: نتا یج آزمون الایزا در گاومیش‌های مناطق چهارگانه در اطراف شهرستان ارومیه

مناطق	روستاهای انتخابی	تعداد نمونه‌ها		نمونه‌های مثبت	درصد	نمونه‌های منفی	درصد
		نر	ماده				
سیلوانا	راژان	۱۲	۱۲	۶	٪۲۵	۱۸	٪۷۵
	موانا	۱۲	۱۲	۵	٪۲۰/۸	۱۹	٪۷۹/۲
	گردوان	۱۲	۱۲	۵	٪۲۰/۸	۱۹	٪۷۹/۲
	امبه	۱۲	۱۲	۵	٪۲۰/۸	۱۹	٪۷۹/۲
نازلو	امام کندی	۱۲	۱۲	۷	٪۲۹/۱	۱۷	٪۷۰/۹
	عمرآباد	۱۲	۱۲	۶	٪۲۵	۱۸	٪۷۵
	ممکان	۱۲	۱۲	۵	٪۲۰/۸	۱۹	٪۷۹/۲
	گنچین	۱۲	۱۲	۷	٪۲۹/۱	۱۷	٪۷۰/۹
دیزج دول	جبل جیران	۱۲	۱۲	۹	٪۳۷/۵	۱۵	٪۶۲/۵
	دولاما	۱۲	۱۲	۶	٪۲۵	۱۸	٪۷۵
	عیسی لو	۱۲	۱۲	۵	٪۲۰/۸	۱۹	٪۷۹/۲
	دیزج	۱۲	۱۲	۷	٪۲۹/۱	۱۷	٪۷۰/۹
انزل	قوشچی	۱۲	۱۲	۴	٪۱۶/۶	۲۰	٪۸۳/۴
	قولنجی	۱۲	۱۲	۶	٪۲۵	۱۸	٪۷۵
	باری	۱۲	۱۲	۶	٪۲۵	۱۸	٪۷۵
	جبل کندی	۱۲	۱۲	۷	٪۲۹/۱	۱۷	٪۷۰/۹
	جمع	۱۹۲	۱۹۲	۹۶	٪۲۵	۲۸۸	٪۷۵

(۳۵/۲٪) و از ۵۹۳ راس گاومیش ماده کشتار شده ۱۹۸ راس (۳۳/۴٪) به کیست هیداتیت آلوده بودند(۳). در بنگلادش از مجموع ۳۷۵۲ راس گاومیش کشتار شده، (۴۵/۲٪) دام‌ها مبتلا به کیست هیداتید بودند (۳). از مجموع ۱۳۷۹راس گاومیش بالغ و ۲۰۱ راس گوساله آزمایش شده در کشتارگاه فیصل آباد پاکستان به ترتیب ۴۹٪ و ۵/۵٪ به کیست هیداتید آلوده بودند(۳). از ۲۴۵۱ راس گاومیش کشتار شده در هندوستان ۵۸۴ (۲۲/۴٪) کبد از کبدهای الوده حذف شدند. بررسی میزان آلودگی گاومیش‌های کشتاری، به کیست هیداتید در گاومیشهای ذبح شده در کشتارگاه صنعتی تبریز، از ۷۲۲ راس گاومیش ۶۰ راس (۸/۳٪) به عنوان دام آلوده شناسائی شد (۳).

روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای تشخیص کیست هیداتید وجود دارد. ولی در جمعیت‌های دامی‌مناسب ترین راه تشخیص، استفاده از روش‌های سرم شناسی به خصوص تست الایزا می‌باشد. روش الایزا دارای حساسیت و ویژگی بالائی است. و معمولا در اکثر نقاط دنیا برای انسان و دام مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس نتایج مطالعات غفاری‌فر تست الایزا در میان سایر تست‌های سرولوژیکی کاربردی‌تر می‌باشد. بر اساس مطالعات Njeruh و همکاران (۱۹۸۶)، Rogan و همکاران (۱۹۹۱) آنتی ژن ب موجود در مایع کیست هیداتید، بهترین انتخاب جهت تحقیقات اپیدمیولوژیک می‌باشد.

در مطالعه حاضر نیز آنتی ژن ب، طبق روش ارائه شده توسط Oriel Rogan، سلامی و شهاب از مایع خام کیست هیداتید بارور استخراج گردید و در تست الایزا مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج حاصل از تست الایزا، توسط کامپیوتر با استفاده از نرم افزار آماری Spss با روش GLM، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، مقایسه درصد آلودگی در دام‌های نر (۲۱/۳۵) با دامهای ماده (۲۸/۶۵) اختلاف معنی داری وجود دارد.(P<۰/۰۱). علت درصد بالای آلودگی در ماده گاومیشها می‌تواند به دلیل بالا بودن میانگین سنی گاومیش‌های ماده نسبت به گاومیش‌های نر و در نتیجه افزایش خطر ابتلاء گاومیش‌های ماده به بیماری باشد. (در منطقه تحت مطالعه گاومیش‌های نر در سن کمتر از ۲ سال کشتار می‌شوند). بنابر این نتیجه می‌گیریم، با وجود داشتن اختلاف معنی دار، شیوع این آلودگی ارتباطی با جنس حیوان ندارد.

در بررسی ارتباط مناطق مختلف با شیوع بیماری(میانگین درصد مثبت در سیلوانا ۲۱/۸۷ در نازلو ۲۶/۰۴ در دیزج دول ۲۸/۱۲ در انزل۲۳/۹۵) از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

بنابر این مطالعه برای کاهش درصد آلودگی به کیست هیداتید، یک بررسی منظم از وضعیت شیوع بیماری در جمعیت دامی‌منطقه، جهت برنامه ریزی پیشگیرانه لازم و ضروری می‌باشد.

منابع مورد استفاده

۱ – اسلامی‌علی، پاییز سال ۱۳۷۶: کتاب کرم شناسی دامپزشکی جلد دوم سستودها

۲ – حریقی ناصر، ۱۳۷۷: ساخت کیت الیزا جهت اندازه گیری انتی بادی‌های ضدهاری در انسان و دام، پایان نامه دوره دکترای دامپزشکی، دانشگاه ازاد اسلامی‌واحد ارومیه، شماره پایان نامه ۳۵۵

۳ – دلیمی‌اصل عبدالحسین، سلامی‌شهاب، مدنی رسول، ۱۳۷۸: راه اندازی و ارزیابی ازمایش الیزای نقطه‌ای برای تشخیص هیداتیدوزیس انسانی، فصلنامه علمی– پژوهشی دانشگاه شاهد سال ششم – شماره ۲۴ – ص ۳۸ – ۴۲

۴ – دلیمی‌اصل عبدالحسین، موبدی ایرج، ۱۳۷۳: اپیدمیولوژی کیست هیداتید در جهان و ایران. تهران، انتشارات مقدم

۵ – غفاری فر فاطمه، دلیمی‌اصل عبدالحسین، حسینی زواران احمد. پاییز و زمستان ۱۳۷۹: تهیه ساده آنتی ژنهای گروه ب اکینوکوکوس گرانولوزوس از مایع کیست هیداتید گوسفندی و ارزیابی آن با روش الایزای نقطه‌ای، مجله علوم پزشکی مدرس دوره ۳، شماره ۲: : ۱۱۵ تا ۱۱۹

۶ – غفاری فر فاطمه. دلیمی‌اصل عبدالحسین. حسینی زواران احمد. زمستان ۱۳۷۸: ارزیابی پادگن‌های گروه ب جهت تشخیص کیست هیداتید انسانی با روش الیزا. فصلنامه پژوهش و سازندگی شماره ۴۵. ص ۸۵ – ۸۳

۷ – قربانی خانی، داود، دلیمی‌اصل عبدالحسین، بهار ۱۳۷۹: ارزیابی قدرت روشهای الیزای نقطه‌ای ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و هماگلوتیناسیون غیر مستقیم در تشخیص کیستهای هیداتید کبدی و ریوی انسان،فصلنامه علمی‌پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کاشان. شماره۱۳، ص۴۲-۳۶

۸ – صاکی عارف، ۵ لغایت ۷ اسفند سال ۱۳۷۶: بررسی میزان آلودگی گاومیش‌های کشتاری به کیست هیداتید در کشتارگاه اهواز، مجموعه مقالات اولین همایش پژوهش بیماریهای گاومیش کشور، ص ۵۰

۹ – معتمدی غلامرضا، شهلا پور علی اصغر، دلیمی‌اصل عبدالحسین، حق نظری جواد، عطایی کچویی سعید، پاییز ۱۳۷۸: تهیه آنتی ژن خام هیداتید و ارزیابی کاربرد آن در آزمایش سرمی‌هماگلوتیناسیون غیر مستقیم گزارش نهایی ۱۴۲ / گ ن ناشر دفتر طرح و برنامه ریزی و هماهنگی امور پژوهشی – اداره نیاز سنجی و توسعه یافته‌های تحقیقاتی

10- A. Lacona, C. Pini and G.Vicari, Enzyme-Linked Immunosorbent assay (Elisa) in the serodigrosis of hydatid disease Am.j. trop. Med. Hyg., 29(1), 1980, pp. 95-102.

11- A. Siracusano, S. Loppolo, S. Notargiacomo, E. Ortona, Rigano, A. Teggi, F. Derosa and G. Vicari, Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* major antigens and their subunits by Medicine and Hygiene (1991) 85, 239-243

12- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of mi gram croquantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding Analytical biochemistry 72:248-254

13- Babba H., Messedi A., Masmoudi S., 1994. Diagnosis of human hydatidosis comparison between imagery and six serologic techniques. Am.J. Trop. Med. Hyg. 50(1) 64-68

14- Bchir A., Laruuze B., Soltani M., Hamdi A., 1991. Echotomographic and serological population – based study of hydatidosis central Tunisia.actatropica.vol 49: 149-153

15-Catty D, Raykundalia C. I mmunoassays.In: Harlow DL, editor. Antibodies,a laboratory manual. IRL press, Oxford, 1989:553-612

16-G.Mistrello, M.Gentili.,P.falagiani. , D.Roncarolo, G.Rive.,M. Tinelli. Dot Immunobinding assay as a new diagnostic test for human hydatid disease. Immunology letter, 47 (1995) 79-85.

17-Icona A., Pini C. and Vican G.: Enzyme – likedimmunosorbant assay (ELISA) in the serodiagnosis of hydatid disease.Am. J. Trop. Med. Hyge., 29:25,1980

18-Irving G.Kagan and losiNorman.Antigenic analysis of Echinococcus Antigens by agar diffusion techniques. Department of Health Education, and Welfare, United States public health service, Communicable Disease Center , Atlanta, Geogia. 727

19-Jiangl, went H, Itoa. Immunodiagnostic differentiation of alveolar and cyctic echinococcosis using ELISA test with 18-kd antigen extracted from Echninococcus protoscoleces. Trans. Rsoc. Trop. Med. Hyge 2002 May-jun ; 95(3): 285-288

20-J.F.Williams, MiguelaV.PerezEsandi and R.oriol, Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the Immunodiagnisis of human infection vol. 20, no. 4.575-579

21-Marion M.Bradford. A Rapid and sensitive Method for the Quantities of protein utilizing the principle of protein- Dye Binding Analytical Biochemistry 72.248-254 (1976).

22-NjeruhFM.GathumaJM.Tumboth-Oeri AG.Diagnisis of human hydatidosis in Kenya.An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) based on athermostable antigen. Med J. 1986; 63:318-321

23- Oriol R., William J.F., Esand M.V.P. and Priolc., 1971. Purification antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. AM.J. TROP. Med. Hyg. 20:569-574

24- Riyad. Moosa. Sami. K.Abdel-Hafez serodiagnosis and seroepidemiology of human unilocularhydatidosis in jirden 22 febuary 1994. Pp.665-671

25- Rogan M.T., Craig P.S, Zeyhle E., et al. 1991. Evaluation of a rapid dot ELTSA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. Transations of the royal society of tropical medicine and hygiene (1991) 85, 773-777.

26- Siracusano A., Teggi A., Quintier F., Notargacomo S.,: Cellular immune responses of hydatid patients to *echinocoddus granulosus* antigen. Clin. Exp. Immunol., 72: 400-405, 1988

27- Verastegui M., Moro P., Guevara A., 1992. Enzyme Linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. Journal of clinical microbiology ,bol. 30 No. 6: 1557 - 1561

28- Wattal C., Malla N., Ahmad Khan I. and Agarwal S.C., 1986. Comparative evaluation of enzyme linked immunosorbant assay for the diagnosis of pulmonary echinococcosis. Journal of clinical microbiology.Vol 24 No. 1: 40 – 46.