



## ARAŞTIRMA

2006: 20 (5): 337 - 340  
http://www.fusabil.org.

Sami ŞİMŞEK  
Armağan Erdem ÜTÜK  
Ergün KÖROĞLU

Fırat Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Parazitoloji Anabilim Dalı  
Elazığ-TÜRKİYE

### Hidatik Kist Sıvısından Antijen B (Agb)'nin Kısmi Purifikasyonu ve Koyun Hidatidosisinin Tanısındaki Etkinliği

Bu çalışma, koyun ham kist sıvısı antijeni ile kısmi purifiye kist sıvısı antijeninin (AgB) antijenik özelliklerinin SDS-PAGE ile araştırılması ve koyun hidatidosisinin tanısında ELISA'nın sensitivite ve spesifitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Koyun ham hidatik kist sıvısının SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığı 8 ile 205 kDa arasında değişen 15 farklı polipeptid bandı tespit edilirken, kısmi purifiye antijenin elektroforezi neticesinde moleküler ağırlığı 16 ile 68 kDa arasında değişen 6 farklı polipeptid bandı belirlenmiş olup her iki antijende de en belirgin bandın 66 kDa'luk band olduğu dikkati çekmiştir. Ayrıca kısmi purifiye kist sıvısı antijeninin elektroforezinde AgB'nin düşük moleküler ağırlıklı (16, 24, 29 kDa) 3 subuniti elde edilmiştir.

Elde edilen her iki antijenin koyun hidatidosisinin tanısındaki etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan ELISA testi neticesinde kısmi purifiye kist sıvısı antijeninin (AgB) sensitivitesi %91.6, spesifitesi %77.1 olarak belirlenmiş; ham kist sıvısı antijeni için ise bu oranların sırasıyla %79.1 ve %60.4 olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hidatik Kist, Antijen B, Purifikasyon, ELISA, Koyun.

#### Partially Purification of Antigen B (Agb) From Hydatid Cyst Fluid and Diagnostic Effectiveness In Sheep Hydatidosis

This study was undertaken to investigate antigenic characteristics of crude sheep cyst fluid antigen (cAg) and partially purified cyst fluid antigen (AgB) of sheep by using SDS-PAGE method, to evaluate the sensitivity and specificity of ELISA for the diagnosis of sheep hydatidosis.

A total of 15 different polypeptide bands were detected that molecular weights varying between 8 and 205 kDa in SDS-PAGE analysis of cAg while six different polypeptide bands were obtained between 16 and 68 kDa at the electrophoretic analysis of AgB. At the electrophoretic analysis of both cAg and AgB the 66 kDa band was evaluated as the most distinct band. Besides, three different subunit of Antigen B (16, 24, 29 kDa) were obtained at SDS-PAGE analysis of AgB.

Diagnostic effectiveness of both antigens at sheep hydatidosis were detected by using of ELISA. As a results, sensitivity of AgB was calculated as 91.6% while specificity was 77.1%. However, these rates were 97.1% and 60.4% for cAg, respectively.

**Key Words:** Hydatid Cyst, Antigen B, Purification, ELISA, Sheep.

Geliş Tarihi : 06.05.2006  
Kabul Tarihi : 26.08.2006

#### Giriş

*Echinococcus granulosus*'un erişkinleri köpek, kurt, çakal ve diğer kanidelerin ince bağırsaklarında, larvası olan hidatik kist ise koyun, keçi, sığır, domuz ve diğer birçok evcil ve yabani memelide ayrıca insanlarda başta karaciğer ve akciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularda bulunmaktadır (1).

Echinococcosis, hem insan hem de evcil hayvanları etkileyen dünyadaki en önemli zoonozlardan birisi olup, özellikle az gelişmiş ülkelerde kırsal bölgelerdeki populasyonlarda, insan ve hayvanlarda oldukça sık rastlanmaktadır (2). Klinik bulguların yeterince belirgin olmaması ve parazitolojik yoklamaların spesifik sonuçlar vermemesi nedeniyle ara konaklardaki teşhisinde sıkıntılar ortaya çıkmaktadır. Özellikle yeni oluşmakta olan kistlerin radyodiagnostik yöntemlerle tespiti güç olmaktadır. Hastalığın erken tanısı şüphesiz ki tedavideki başarı oranını da artırmaktadır (3).

Hidatidosiste serolojik tanı diğer parazit hastalıklarında olduğu gibi konağın parazite karşı göstermiş olduğu hücresel ve humoral immün yanıtı ortaya koyma esasına dayanmaktadır. Serolojik testlerin sensitivite ve spesifiteleri, kullanılan antijenin cinsi ve hazırlama şekli, değişik pozitiflik kriterleri, kistin canlılığı ve lokalizasyonu, parazitin suşu gibi birçok nedene bağlıdır (4).

#### Yazışma Adresi

Sami ŞİMŞEK  
Fırat Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Parazitoloji Anabilim Dalı  
23119  
Elazığ -TÜRKİYE  
ssimsek@firat.edu.tr

*Echinococcus granulosus*'un değişik yaşam evrelerinin farlı antijenik yanıtlar verdiği, hidatik antijenlerin genel kaynağının ise kist sıvısı, kist membranı ve protoskoleksler olduğu bilinmektedir (5). Günümuze kadar kist sıvısı içerisinde iki farlı antijenik yapı belirlenmiş olup bunların ısıya dayanıksız bir lipoprotein olan antijen 5 ve ısıya dayanıklı bir protein olan antijen B olduğu bildirilmiştir (6, 7).

Antijen 5 ilk defa Capron ve ark. (8) tarafından immunoelktroforez metoduyla at kist sıvısından elde edilmiş ve hidatidosisin tanısında değeri üzerinde durulmuş, ayrıca antijen 5'in çimlenme zarında, protoskolekslerin parankiminde ve bunların salgılarında bulunduğu tespit edilmiştir. Antijen 5, parazitin hidatik sıvısında ve kistin somatik dokularında bulunan 10 veya daha fazla antijenden biri olup, immunoelktroforetik çalışmalar bu antijene karşı oluşmuş antikoların hastanın serumunda bulunmasının hidatidosisin tanısında kesin bir kriter olduğunu göstermiştir (8). Bu antijene aynı zamanda *Taenia hydatigena* sistiserkleri içindeki sıvıda da rastlandığı ve bu nedenle cysticercosis ile çapraz reaksiyona neden olduğu bildirilmiştir (9). İkinci önemli hidatik antijen Oriol ve ark (7) tarafından tanımlanan, lipoprotein yapıda, ısıya dayanıklı ve moleküler ağırlığı 12000 dalton olan antijen B'dir. Bu antijen, kist sıvısı kaynatıldıktan sonra geriye kalan en önemli antijenik bileşimdir (7). Kist membranının geçirgenliği antijen B için antijen 5'e göre 10 kat daha fazladır (5). Klasik elktroforetik yöntemler içerisinde modifiye edilmiş jel sistemleri olmasına rağmen sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elktroforez (SDS-PAGE) bunların en popüler olanlarından biridir. Yöntemin en önemli zellilerinden birisi çok sayıda protein karışımlarının analizine olanak sağlamasıdır (10).

Burgu ve ark (11), koyun hidatik kist sıvısının SDS-PAGE ile analizinde moleküler ağırlığı 8 ile 200 kDa arasında değişen dokuz farlı spesifik protein bandı elde etmişlerdir. şimşek ve Köroğlu (12) ise aynı yöntemle koyun kist sıvısında 29, 45, 58, 68, 98 ve 116 kDa moleküler ağırlığında altı farlı polipeptit bandı tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada Kanwar ve ark (13), koyun hidatik kist sıvısında SDS-PAGE yöntemiyle moleküler ağırlığı 8-116 kDa arasında değişen 15 farlı fraksiyon belirlenmişler ve bunlar içerisinde en belirgin olanının 66 kDa'luk band olduğunu bildirmişlerdir. Sepherd ve McManus (14), 12 ve 16 kDa'luk polipeptidlerin, Maddison ve ark. (15) ise 8 kDa'luk polipeptidin hidatik kist için spesifik olduğunu bildirmişlerdir.

Hidatidosisin tanısında kullanılan ELISA yöntemi, yüksek duyarlılıklılı olup, çok az miktarda serumun yeterli olması, kesin kantitatif ölçmeyi sağlaması ve kısa zamanda çok sayıda numunenin işlenmesine imkan sağlaması bakımından rutin kullanıma uygun, duyarlı, özgül ve ekonomik bir yöntemdir (16). Yong ve ark. (17), koyun hidatik kist sıvısından hazırladıkları antijeni kullanarak, hidatik kistle doğal enfekte altı yaşındaki 45 koyunun nekropsisi sonucu elde ettikleri serumları ELISA ile test etmişler ve 41 koyunda pozitif sonuç elde etmişlerdir. Force ve ark. (18), hidatidosisin tanısında karşılaştırmalı olarak çalıştıkları 8 serolojik test içerisinde

ELISA yönteminin %94 ile en sensitiv, %99 ile en spesifik test olduğunu saptamışlardır. şimşek ve Köroğlu (12) ise koyun ham kist sıvısı antijenini koyun hidatidosisinin tanısında kullanmışlar ve ELISA'nın %60 sensitiviteye ve %94 spesifiteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. İbrahim ve ark (19) koyun ham kist sıvısı antijeni, kısmi purifiye kist sıvısı antijeni (AgB) ve rekombinant AgB'yi kullanarak ELISA testini uygulamışlar ve bu antijenlerin koyun hidatidosisinin tanısındaki yerini araştırmışlardır. Neticede sensitivite oranlarının ham kist sıvısı antijeni için %32, kısmi purifiye AgB için %88 ve rekombinant AgB için ise %28 olduğunu belirlemişler, spesifite oranlarının ise sırasıyla %90, %95 ve %95 olarak şekillendiğini ifade etmişlerdir.

Bu alışma ile hidatidosisin serolojik tanısında kullanılacak kist sıvısı antijeninin kısmi purifikasyonunun yapılması, antijenik bantların SDS-PAGE ile gösterilmesi amaçlanmış, ayrıca elde edilen antijenlerin sensitivite ve spesifite oranlarının ELISA kullanılarak belirlenmesi hedeflenmiştir.

### Gereç ve Yöntem

**Ham kist sıvısı antijeninin hazırlanması:** Koyun karaciğerinden elde edilen fertil hidatik kist sıvısı 5000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek protoskoleks ve diğer partiküllerin okmesi sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra elde edilen supernatant 0.45µl'lik filtreden geçirilmiş ve 12 saat PBS'ye karşı +4°C'de diyaliz edilerek tuz konsantrasyonu düşürülmüştür. Daha sonra porsiyonlara ayrılarak kullanıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır (12).

**Kısmi Purifiye Antijenin (AgB) hazırlanması:** Hidatik kist sıvısından Antijen B bakımından zengin antijen koyun karaciğerinden elde edilen hidatik kist sıvısından hazırlanmıştır. Hidatik kist sıvısı 5000 g'de 10 dakika santrifüj edilen protoskoleks ve diğer partiküllerin okmesi sağlanmıştır. Elde edilen 100 ml supernatant hem antijen 5 hem de antijen B'yi içermektedir. Bu supernatant 1 gece +4°C'de 0.005 M acetat buffer (pH=5.0)'da diyaliz edilmiş, daha sonra +4°C'de 15000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant atılıp alta kalan pellet toplanmış ve 10 ml 0.2 M fosfat buffer (pH=8.0)'da çözdürülmüştür. Bu solüsyon 15 dakika su banyosunda tutulduktan sonra +4°C'de 20000 g'de 1 saat süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet atılmış ve Antijen B'den zengin supernatant porsiyonlara ayrılıp kullanıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır (20).

**Polipeptid analizi:** Ham hidatik kist sıvısı antijeni (cAg) ve Antijen B (AgB)'den zengin kısmi purifiye kist sıvısı antijeni %12'lik seperasyon ve %3.9'luk stok jel sisteminde reducing şartlarda SDS-PAGE yöntemiyle elktroforeze tabi tutulmuştur. Seperasyon amaciyla her bir antijen fraksiyonundan 20 µl alınıp 3 µl 6X SDS rnek buffer (7 ml 4X Tris-Cl/SDS (pH=6.8), 0.93 gr dithiothreitol, 1 gr SDS, 1.2 mg bromphenol blue, 3 ml glycerol) ile karıştırılarak ikişer kuyucuğa yüklenmiştir. Ayrışan proteinlerin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla da bir kuyucuğa moleküler ağırlık markeri (Oncogene Research Product Prestained Protein Molecular Weight Markers, Cat No: MW03) konulmuştur. Örnekler 200 V sabit akımda proteinler jelin alt kısmına

ulaşana kadar seperasyona tabi tutulmuştur. Bu sürenin sonunda jel 15 dk fizkasyon solusyonunda (%10 glacial asetik asit, %20 methanol ve %70 distile su) bekletilmiş ve takiben %5 coomassie mavisi (5 ml %1 coomassie blue, 20 ml %95 methanol, 5 ml glacial asetik asit, 20 ml distile su) ile bir gece boyanıp bantlar belli olana kadar açma solusyonunda (3 kısım methanol, 1 kısım glacial asetik asit, 6 kısım distile su) bekletilmiştir. Bantlar tamamen ortaya çıkınca jelin görüntüsü alınmıştır.

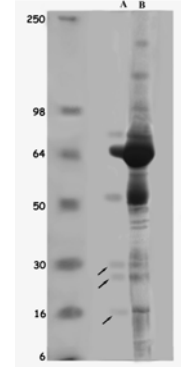
**ELISA'nın Uygulanışı:** Bu test, Şimşek ve Köroğlu (12)'nin bildirdiği şekilde yapılmıştır. Antijenlerin optimum dilusyonu 0.05 M karbonat/bikarbonat tamponu ile yapılmış ve ELISA pleytinin (Linbro EIA mikrotitration plate 96 flat bottom Lot No: 805202) her bir kuyucuğuna 100 µl konularak bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Bloklama işlemi için 1X PBS ile sulandırılmış %5'lik yağsız süt tozu kullanılmıştır. Serumlar 1/200, konjugat (anti-sheep IgG peroxidase conjugate, Sigma Immunochemicals Cat. No: A3415) ise 1/7500 oranında sulandırılmış, yıkama ve sulandırma işlemleri için ise %0.02 Tween-20 içeren PBS kullanılmıştır. Substrat ve 15 dakika sonra durdurma solusyonu eklenen pleyt, ELISA okuyucusunda (Medispec ESR 200 ELISA Reader) 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Sonuçlar absorbans değerleri olarak alınmış, negatif kontrollerin absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması +2 standart sapma (X+2SD) değerinin (eşik değer=cut-off) üstü pozitif olarak kabul edilmiştir.

**ELISA'nın Standardizasyonu:** Testi standardize etmek amacıyla antijen, serum ve sekonder antikorun (anti-sheep) optimal çalışma dilusyonu ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla bilinen pozitif ve negatif serum örneklerinin seri dilusyonları yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan 48 adet pozitif serum örneği mezbahada kesim takip edilerek, karaciğer, akciğer veya her ikisinde birden belirgin hidatik kistlerin görüldüğü ve diğer organlarında başka bir parazitolojik ve patolojik durumun olmadığı koyunlardan alınmıştır. Aynı şekilde, 48 negatif örnek de mezbahada kesim takip edilerek elde edilmiş, özellikle 1 yaşından küçük ve organlarında hidatik kist ve başka paraziter oluşum görülmeyen kuzulardan alınmıştır. Testin sensitivite ve spesifitesi pozitif ve negatif örneklerin cut-off değerlerine göre hesaplanmıştır.

### Bulgular

Koyun ham hidatik kist sıvısının SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığı 8 ile 205 kDa arasında değişen 15 farklı polipeptid bantı tespit edilmiş, bunlar içerisinde en belirgin olanın 66 kDa'luk bant olduğu gösterilmiştir (Şekil 1B). Kısmi purifiye antijenin elektroforezi neticesinde ise moleküler ağırlığı 16 ile 68 kDa arasında değişen 6 farklı polipeptid bantı belirlenmiş olup en belirgin bantın ham kist sıvısı antijeninde olduğu gibi 66 kDa'luk bant olduğu belirlenmiştir (Şekil 1,A). Ayrıca kısmi purifiye kist sıvısı antijeninin elektororezinde Antijen B'nin düşük moleküler ağırlıklı (16, 24, 29 kDa) 3 subuniti elde edilmiştir. Elde edilen her iki antijenin koyun hidatidosisinin tanısındaki etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan ELISA testi neticesinde kısmi purifiye kist sıvısı antijeninin (AgB)

sensitivitesi %91.6, spesifitesi %77.1 olarak belirlenmiş; ham kist sıvısı antijeni (cAg) için ise bu oranların sırasıyla %79.1 ve %60.4 olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 1. Koyun kısmi purifiye (A) ve ham (B) kist sıvısı antijenlerinin SDS-PAGE ile elektroforetik analizi neticesinde elde edilen bantların görünümü**

### Tartışma

*Echinococcus granulosus*'un değişik yaşam evrelerinin farklı antijenik yanıtlar verdiği, hidatik antijenlerin genel kaynağının ise kist sıvısı, kist membranı ve protoskoleksler olduğu bilinmektedir. Hidatidosisli farklı konaklardan alınan kist sıvılarının antijen konsantrasyonları karşılaştırıldığında, insan ve koyun kistlerinde, sığır ve domuz kistlerine, karaciğer kistlerinde ise akciğer kistlerine oranla daha fazla antijenik protein olduğu, ayrıca en yüksek antijen konsantrasyonuna koyun karaciğer kistlerinin sahip olduğu saptanmıştır (5). Hidatik kist sıvısı içerisinde konağa ait komponentlerin bulunması nedeniyle hidatidosisin tanısında kullanılan serolojik testlerde yanlış pozitif reaksiyonlar şekillenmektedir. Serolojik testlerin tanısıl gücünü (spesifitesini) artırmak amacıyla purifiye antijenler veya konak komponentlerini minimum düzeyde içeren kist sıvısı antijenleri kullanılmaktadır (16). Bu çalışmada kullanılan her iki antijen de koyun karaciğerinden elde edilen fertil hidatik kistlerden hazırlanmıştır.

Burgu ve ark. (11), koyun koyun hidatik kist sıvısının SDS-PAGE ile analizinde moleküler ağırlığı 8 ile 200 kDa arasında değişen 9 spesifik protein bantı elde etmişlerdir. Bu çalışmada da ham kist sıvısı antijeninin separasyonu sonucu 8 ile 205 kDa aralığında 15 farklı protein bantı elde edilmiştir. Kanwar ve ark. (13), aynı yöntemle koyun hidatik kist sıvısını ayırtmışlar ve moleküler ağırlığı 8 ile 116 kDa arasında değişen 15 farklı protein bantı belirlemişler ve en belirgin bantın 66 kDa'luk bant olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan her iki antijenle de 66 kDa'luk bant en belirgin bant olarak göze çarpmıştır.

Sepherd ve McManus (15), 12 ve 16 kDa'luk polipeptidlerin, Madison ve ark (16) ise 8 kDa'luk polipeptidlerin hidatik kist için spesifik olduğunu bildirmişlerdir. İbrahim ve ark (19) ise kısmen purifiye ettikleri kist sıvısı antijeninde 8, 12 ve 24 kDa ağırlığındaki proteinleri elde etmişler ve koyun hidatidosisinin tanısında kullan-

mıřlardır. Bu alıřmada Antijen B'nin 3 subunitinden (8, 16 ve 21 kDa) 8 kDa olan bant kısmi purifiye kist sıvısı antijeninde elde edilemezken, tespit edilen 16, 24 ve 29 kDa'luk bantların 16 ve 21 kDa'luk polipeptidler ile benzer olabileceđi dűřünűlműřtür. Bunlardan 8 kDa'luk polipeptid ham kist sıvısı antijeninde gösterilmesine rađmen küçük molekűler ađırlıđı nedeniyle purifikasyon ařamasında elimine olduđu dűřünűlműřtür. Bununla birlikte ham kist sıvısındaki yüksek molekűler ađırlıklı diđer polipeptidler purifikasyon ařamasında elimine edilerek antijenin sensitivitesi artırılmıřtır.

Hidatidosisin tanısında kullanılan ELISA yöntemi, kısa zamanda çok sayıda örneğin işlenmesine olanak sağlaması, duyarlı, özgűl ve ekonomik bir yöntem olması nedeniyle tercih edilmektedir (17). Yapılan değişik çalışmalar koyun hidatidosisinin tanısında ELISA yönteminin sensitivitesinin %60 ile %94 arasında, spesifitesinin ise %94 ile %99 arasında (12, 18, 19)

### Kaynaklar

- Güralp N. Helminoloji. İkinci baskı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakűltesi Yayınları. No: 368, Ankara, 1981.
- Rickard MD, Lightowers MW. Immunodiagnosis of Hidatid Disease. In: Thompson RCA (Editor). The Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease. George Allen and Unwin, London: 1986, 217-249.
- Hira PR, Bahr GM, Shweiki HM, Behbehani K. An enzyme-linked immunosorbent assay using an arc 5 antigen for the diagnosis of cystic hydatid diseases. *Ann Trop Med Parasitol* 1990; 84: 157-162.
- Mattosian RM. The immunological diagnosis of human hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 71:101-104.
- Musiani P, Piantelli M, Lauriola L, Arru E, Pozzuoli R. *Echinococcus granulosus* specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. *J Clin Pathol* 1978; 31:475-478.
- Altıntaş N. *Echinococcus* sp. ve Kist hidatiğin immunolojisi. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (*Echinococcosis*). Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:10, Ege Üniv. Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 1991, 89-95.
- Oriol C, Oriol R. Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24: 96-100.
- Capron A, Yarzabal LA, Vernes A, Fruit J. Le diagnostic immunologique de l'echinococcosse humaine. *Pathologie Biologie* 1970; 18: 357-365.
- Varela-Diaz VM, Coltorti EA, Rickard MA, Torres JM. Comparative antigenic characterization of *Echinococcus granulosus* and *Taenia hydatigena* cyst fluids by immunoelectrophoresis. *Res Vet Sci* 1997; 23: 213-216.
- Bulut H, Doymaz MZ. Blottlama Teknikleri ve Mikrobiyolojide Kullanımı. In: Durmaz R (Editor). *Uygulamalı Molekűler Mikrobiyoloji*, 2. baskı, 2001, 123-137.
- Burgu A, Doğanay A, Güven B, Sarımehtemetoğlu HO, Kalınbacak F. Analysis of fluids of hydatid cysts from sheep by SDS-PAGE and determination of specific antigens in protein structure by Western Blotting. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 463-500.
- Şimřek S, Kűrođlu E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid diseases in sheep. *Acta Tropica* 2004; 92:17-24.
- Kanwar JR, Kaushik SP, Sawhney IM, Kamboj MS, Mehta SK, Vinayak VK. Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. *J Med Microbiol* 1992; 36:46-51.
- Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 25: 143-154.
- Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang VC. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40:377-383.
- Altař K. İnsan Hidatidozunun Tanımında ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)'nın Deđerı. Doentlik Tezi, İstanbul: İ.Ü. Cerrahpařa Tıp Fakűltesi Mikrobiyoloji, Parazitoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kűrsűsű, 1981.
- Yong WK, Heath DD. Comparison of cestode antigens in an Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* infections in sheep. *Res Vet Sci* 1984; 36: 24-31.
- Force L, Torres JM, Carillo A, Busca J. Evaluation of serological tests in the diagnosis of human Echinococcosis and follow-up. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 473-480.
- Ibrahim MM, Rafiei A, Dar FK, Azwai SM, Carter SD, Craig PS. Serodiagnosis of cystic echinococcosis in naturally infected camels. *Parasitology*, 2002; 125: 245-251.
- Oriol R, Williams JF, Perez-Esandi MV, Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg* 1971; 20: 569-574