Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 8:28 +0330 on Sunday September 24th 2017

مقاله پژوهشی

مقایسه حساسیت روشهای ELISA و DIG-ELISA در تشخیص سرولوژیک توکسوپلاسموزیس انسانی

دکتر عبدالحسین دلیمی اصل *، کاوس صلح جو ** ، دکتر فاطمه غفاری فر ***

چکیده:

یکی از متداولترین آلودگیهای انگلی انسان و سایر مهره داران خونگرم آلودگی با تو کسوپلاسما گوندیی است. روش های سرولوژیک از مهمترین تکنیکهای تشخیصی توکسوپلاسموزیس بشمار می آیند .هدف از انجام این تحقیق مقایسه حساسیت های روش های الایزا و دیگ الایزا در تشخیص توکسوپلاسموزیس انسانی است .

در این تحقیق ۶۸ نمونه سرم انسانی شامل۴۸ نمونه مثبت و۲۰ نمونه منفی بادو روش الایزا و دیگ الایزا مورد آزمایش قرار گرفتند. در روشDIG- ELISA (Diffusion in Gel- ELISA) ، بر حسب اندازه قطر هاله واکنش رقت سرمی ۱:۱۰۰ بعنوان cut off انتخاب گردید. در این رقت میانگین هاله واکنش ۶/۰۸ میلی متر بوده است. در روش الایزا رقت سرمی ۱:۲۰۰ بعنوان cut off انتخاب گردید در این رقت OD آزمایش معادل ۰/۷۳۵ بوده است.

در تشخیص توکسوپلاسموزیس انسانی حساسیت و ویژگی آزمایش با روش دیگ الایزا به ترتیب ۹۳/۳۷٪ و ۱۰۰٪ و با روش الایزا به ترتیب ۹۱/۶۶٪ و ۸۵ ٪ برآورد گردید.

مقایسه نتایج حاصل از این دو روش نشان داد که روش دیگ الایزا در مقایسه با روش الایزا ، از حساسیت و ویژگی بالایی جهت تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس برخوردار است.

کلیدواژه ها: الایزا / تشخیص سرولوژیک / توکسوپلاسموزیس انسانی / دیگ الایزا

مقدمه :

یکی از متداولترین آلودگیهای انگلی انسان و سایر مهره داران خونگرم ، آلودگی با توکسوپلاسما گوندیی است . آلودگی با این تک یاخته گسترش جهانی داشته و تخمین زده می شود که بیش از ۵۰۰ میلیون نفر از مردم در سرتاسر دنیا به این انگل آلوده هستند (۱).

از مهمترین روشهای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس، تکنیکهای سرولوژیکی است و روش دیگ الایزا روشی است سرولوژیکی که همچون روش الایزا از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است و توسط محققین مختلف جهت تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس انسانی و دامی بکار گرفته شده است(۴-۲). در روش دیگ الایزا ، سنجش آنتی بادی بستگی به قدرت آنها در تشکیل شیب غلظت در ژلی دارد که بر روی یک سطح پلاستیکی کوت شده است و واکنش آنتی ژن- آنتی بادی با اتصال آنتی بادی متصل به آنزیم به کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی مشخص می‌شود و

* استاد گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

** دستیار گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

*** استادیار گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 8:28 +0330 on Sunday September 24th 2017

واکنش آنزیم- سوبسترا با تولید یک واکنش رنگی در ژل حاوی سوبسترا ظاهر می شود .

از این روش برای تشخیص توکسوپلاسموزیس انسانی بصورت محدود وکم استفاده شده است. لذا هدف از مطالعه حاضر، تعیین و مقایسه حساسیت دو روش الایزا و دیگ الایزا در تشخیص سرولوژیک توکسوپلاسموزیس انسانی می باشد.

روش کار:

در این مطالعه ۶۸ نمونه سرم انسانی از آزمایشگاه تشخیص طبی سازمان انتقال خون در تهران جمع آوری گردید سرم ها با استفاده از روش Dye test به عنوان آزمایش طلائی مورد آزمایش قرار گرفتند .از این تعداد نمونه ۲۰ سرم منفی و ۴۸ نمونه سرم مثبت تشخیص داده شد.

برای تهیه آنتی ژن محلول جهت انجام آزمایشات دیگ الایزا و الایزا از تاکی زوئیت های زنده توکسوپلاسما گوندیی که از مایع صفاق موش ها گرفته شده بود، استفاده گردید. این موشها قبلا بصورت داخل صفاقی با سویه حادRH به میزان ۲۰۰ هزار تاکی زوییت آلوده شده بودند. پس ازخالص سازی تاکی زوئیت ها ، از روش انجماد و ذوب متوالی محلول آنتی ژن تهیه و به روش برادفورد پروتئین سنجی گردید (۵) . سپس کلیه سرم ها به دو روش ELISA با رقت ۱:۲۰۰ و دیگ الایزا با رقتهای ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ مورد آزمایش قرار گرفتند. مقدار آنتی ژن مصرفی پس از آزمایش های مکرر و تعیین شرایط اپتیمم در روش الایزا به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر و در روش دیگ الایزا ، ۲۰ میکروگرم درمیلی لیترتعیین گردید.

دیگ الایزا با استفاده از روش توصیف شده بوسیله Cursons در سال ۱۹۸۲ (۲) با مختصری تغییرات بصورت زیر انجام شد:

۱- ابتدا پلیت ها ی پلی استیرنی به قطر ۸ سانتی متری را انتخاب و با الکل متانول شستشو داده شد تا سطح داخل پلیت ها به خوبی تمیز شود.

۲- کوت کردن آنتی ژن در پلیت ها : پس از خشک شدن پلیت ها، ۲۰ میلی لیتر از آنتی ژن محلول با غلظت پروتئینی ۲۰ میکرو گرم در میلی لیتر درون هر پلیت ریخته شد و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از این مدت پلیت ها با آب مقطر یکبار شستشو داده شد.

۳- اضافه کردن بلوکر BSA (۰/۵ درصدی): به هر پلیت ۲۰ میلی لیتر بلوکر افزوده شد و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از این مدت پلیت ها یکبار با آب مقطر شستشو داده شد و سپس روی کاغذ خشک کن بر گردانیده شد تا همه قطرات آب خارج گردد و پلیت خوب خشک شود.

۴- اضافه کردن نوبل آگار(یک درصدی): ابتدا نوبل آگار یک درصد تهیه گردید. پس از اینکه نوبل آگار تا دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خنک شد مقدار ۰/۷۵ میلی لیتر BSAبه آن اضافه شد. سپس پلیت ها روی سطح صافی گذاشته شد و در هر پلیت مقدار ۲۵ میلی لیتر نوبل آگار ریخته شد. (بهتر است پلیت ها را ۱۵-۱۰ دقیقه در یخچال قرار داد تا ژل به خوبی ببندد). سپس۶ حفره در هر پلیت ژل پانچ گردید.

۵- سرم ها دررقت های مورد نظر (۱:۱ ،۱:۱۰ و۱:۱۰۰) با سرم فیزیولوژی تهیه و در هر حفره ۲۵ لاندا ریخته شد و ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

۶- پس از طی زمان انکوباسیون ، ژل از درون پلیت برداشته شد. سپس پلیتها سه بار با بافر و دو بار با آب مقطر شستشو داده شد.

۷- اضافه کردن کونژوگه: کونژوگه بکار رفته از نوع آنتی هیومن IgG کونژوگه شده با HRP تهیه شده از شرکت سیگما بوده است. ابتدا کونژوگه با رقت مناسب۱:۱۰۰۰۰ برای سرم انسانی همراه باBSA ۰/۲ درصد با بافر PBS تهیه شد و به هر پلیت ۲۵ میلی لیتر اضافه گردید. سپس پلیتها ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی شیکر انکوبه گردید .

۸- پس از طی زمان انکوباسیون پلیتها راخالی کرده و ۵ بار مانند مرحله ۶ شستشو گردید سپس پلیت ها روی کاغذ خشک کن برگردانیده شد تا خوب خشک شود.

۹- آماده سازی ژل آگاروز یک درصد حاوی سوبسترای OPD ۰/۳ درصد(W/V) و هیدروژن پراکسید ۵٪ (V/V) در بافر سیترات ـ فسفات: برای این منظور ابتدا آگاروز یک درصد با بافر سیترات ـ فسفات تهیه شد.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 8:28 +0330 on Sunday September 24th 2017

برای سه پلیت بدین صورت عمل گردید که ۰/۷۵گرم آگاروز به ۷۵ میلی لیتر بافر سیترات ـ فسفات اضافه شد و حرارت داده شده تا بجوشد و شفاف شود و بطور کامل آگاروز در بافر حل گردد. سپس مقدار ۲۲/۵ میلی گرم OPD در ۵ میلی لیتر بافر سیترات ـ فسفات حل و به آن ۳۷ لاندا هیدروژن پراکسید افزوده شد. پس از اینکه آگاروز تا دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خنک شد، محلول سوبسترا به آن اضافه و خوب مخلوط گردید. سپس پلیت ها روی سطح صاف ودرجایی دور از نور قرار داده شد و به هرپلیت ۲۵ میلی لیتر آگاروز حاوی سوبسترا افزوده شد و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه ساکن گذاشته شد تا ژل ببندد و هاله واکنش آشکار گردد.

نکته مهم اینست که درهنگام ریختن آگاروز در پلیتها نبایستی پلیتها تکان بخورد چون در غیر این صورت هاله واکنش نامنظم و از حالت دایره ای خارج می شود.

۱۰- پس از ۲۰ دقیقه قطر هاله هر واکنش که بصورت هاله زرد متمایل به قهوه ای رنگ تشکیل شده بود با خط کش اندازه گیری شد. هاله واکنش تا چند ساعت (۲-۱ساعت) پس از تشکیل ثابت بوده و پس از آن رنگ قهوه ای در تمام ژل پخش می شود و امکان اندازه گیری هاله ها از دست می رود.

آزمایش الایزا: برای انجام تست الایزا از روش Crowther استفاده شد(۶).

برای تعیین میزان اعتبار تستها(Validity) از شاخصهای حساسیت ، ویژگی ، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی استفاده شد. بدین ترتیب که در هر رقت سرمی برای تست های الایزا و دیگ الایزا این شاخص ها با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه و نتایج حاصله با هم مقایسه گردید.

نتایج :

اطلاعات مربوط به آزمایش دیگ الایزا در رقتهای ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ در جدول ۱ نشان داده شده است. بطوریکه هاله ایجاد شده در رقتهای ۱:۱ ،۱:۱۰ و۱:۱۰۰ به ترتیب ۱۵/۳ میلی متر ، ۱۱/۲۹ میلی متر و ۶/۰۸ میلی متر بوده است.

جدول ۱: اندازه قطر هاله واکنش در رقت های سرمی ۱:۱، ۱:۱۰و۱:۱۰۰ در آزمایش دیگ الایزا

رقت سرم	نوع سرم	کوچکترین قطر (میلی متر)	بزرگترین قطر (میلی متر)	میانگین قطر (میلی متر)	انحراف معیار (میلی متر)
۱:۱	مثبت	۱۳	۲۰	۱۵/۳	۱/۸۶
	منفی	۷	۱۵	۱۰/۷۲	۲/۳۸
۱:۱۰	مثبت	۸	۱۷	۱۱/۲۹	۲/۱۳
	منفی	۳	۹	۵/۱۵	۱/۶۴
۱:۱۰۰	مثبت	۳/۵	۱۰	۶/۰۸	۱/۳۷
	منفی	۰	۴	۰/۸۵	۱/۲۶

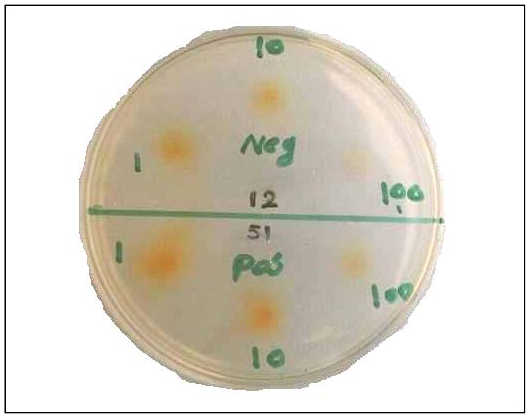
با توجه به اطلاعات جدول ۲ ویژگی و ارزش اخباری مثبت این تست در تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس درانسان برای سه رقت ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ صددرصد بوده است در حالیکه حساسیت این روش با افزایش رقت افزایش می یابد . بطوریکه حساسیت تست در رقت ۱:۱ دارای کمترین مقدار یعنی ۱۰٪، در رقت۱:۱۰، ۶۴/۵۸٪ و در رقت ۱:۱۰۰ دارای بیشترین حساسیت یا ۹۳/۳۷٪ بوده است. از طرفی ارزش اخباری منفی در رقت ۱:۱، ۱:۱۰و۱:۱۰۰ به ترتیب ۵۲/۶۳٪ و۵۴/۴۰٪ و ۸۶/۹۵٪ برآورد گردید. این نتایج نشان می دهد که حساسیت ، ویژگی ، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی آزمایش دیگ الایزا برای سرم انسانی در رقت ۱:۱۰۰ بیشترین مقدار می باشد.

جدول ۲: حساسیت ، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی آزمایش های دیگ الایزا و الایزا

آزمایش	رقت	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	ارزش اخباری مثبت (درصد)	ارزش اخباری منفی (درصد)
DIG-ELISA	۱:۱	۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۲/۶۳
DIG-ELISA	۱:۱۰	۶۴/۵۸	۱۰۰	۱۰۰	۵۴/۴۰
DIG-ELISA	۱:۱۰۰	۹۳/۳۷	۱۰۰	۱۰۰	۸۶/۹۵
ELISA	۱:۲۰۰	۹۱/۶۶	۸۵	۹۳/۶۰	۸۰/۹۵

همچنین آنالیز آماری و مقایسه نتایج بدست آمده از آزمون دیگ الایزا برای سرم های مثبت و منفی انسانی در رقت های۱:۱۰،۱:۱و۱:۱۰۰ نشان می دهد که در هر سه رقت بین قطر هاله های سرم های منفی و مثبت اختلاف معنی داری وجود دارد($P<0/05$)(شکل ۱).

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 8:28 +0330 on Sunday September 24th 2017



شکل ۱ : هاله های تشکیل شده در سه رقت ۱:۱ ،۱:۱۰ ، ۱:۱۰۰ برای تشخیص سرم های مثبت و منفی توکسوپلاسموزیس انسانی در آزمایش دیگ الایزا

با توجه به مطالب مذکور ، رقت ۱:۱۰۰ بعنوان معیاری جهت تعیین cut off این تست تعیین شد . مقدار قطر هاله در این رقت ۴/۶۵ میلی متر بوده است .

مقدار cut off تعیین شده برای تست الایزا رقت سرمی ۱:۲۰۰ برابر با OD=۰/۷۳۵ بوده است. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی تست الایزا در رقت ۱:۲۰۰ جهت تشخیص توکسوپلاسموزیس انسانی به ترتیب ۹۱/۶۶٪ ، ۸۵٪، ۹۳/۶٪ و۸۰/۹۵٪ محاسبه گردید.

بحث:

دیگ الایزا بعنوان یک تست حساس تاکنون برای تشخیص آلودگیهای مختلف انگلی توسط محققین مختلف بکار گرفته شده است .کومار و همکاران۸۰ بیمار مالاریایی را با روشهای الایزا ، IFA و الایزا بررسی کردند و ارتباط خوبی بین این سه روش از نظر حساسیت و اعتبار بدست آوردند(۷) . کاستیلا و همکاران روش دیگ الیزا را برای تشخیص بیماری شاگاس استفاده نمودند و نتایج این روش را با روشIHA مقایسه کردند و ارتباط بالایی را بین نتایج این دو روش سرولوژیک بدست آوردند(۸). باتیستا-گارفیاس و همکاران روش دیگ الیزا را برای تشخیص فاسیولیازیس گوسفندی ارزیابی کردند و نتایج این روش را با روشIHA مقایسه نمودند و حساسیت و ویژگی روش دیگ الیزا را ۱۰۰ درصد بدست آوردند(۹). دماتیس و همکاران روش دیگ الایزا را برای تشخیص آنتی بادی علیه کرم اکینوکوکوس گرانولوزوس استفاده کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که حساسیت و ویژگی این روش در تشخیص بیماری هیداتید با دیگر روشهای سرولوژیکی یکسان است(۱۰). رکیوجو و همکاران روش دیگ الیزا را برای تشخیص بیماری شاگاس ارزیابی کردند و با روشهایIFA ، IHA وCFT مقایسه نمودند و دریافتند که ضریب همبستگی بالایی بین این روشهای سرولوژیکی وجود دارد و روش دیگ الیزا می تواند روش جایگزین برای غربالگری عفونتهای شاگاسی در تحقیقات سرواپیدمیولوژیکی باشد(۱۱). گومز و همکاران روش دیگ الیزا را جهت تشخیص اونکوسرکیازیس بکار گرفتند و حساسیت و ویژگی این روش را به ترتیب۱۰۰٪ و۹۶٪ بدست آوردند(۱۲). ایبارا و همکاران سه روش دیگ الایزا ، دات الایزا و الایزای غیر مستقیم را در تشخیص فاسیولیازیس گاوی بکار بردند و حساسیت و ویژگی این روشها را به ترتیب(۹۷/۵٪ و۸۰٪) ، (۹۳/۱٪ و۹۵/۴٪) و (۹۶/۵٪ و ۹۸/۸٪) بدست آوردند(۱۳).

کورسونس روش دیگ الایزا را برای تشخیص توکسوپلاسموزیس انسانی بکار برد و نتایج آن را با روشهای IFA وIHA مقایسه نمود. در مطالعه ایشان نتایج بسیار خوبی بدست آمد. لذا ادعا نمود که روش دیگ الایزا می تواند جایگزین مناسبی برای IFA و IHA باشد(۲). اگلا و نیلسون روش دیگ الایزا را برای تشخیص گاوها و خوکهای آلوده به عفونت توکسوپلاسموزیس بکار بردند و نتایج حاصل از این روش را با روشهایIFA و الایزا مقایسه کردند. در این مطالعه بین نتایج این روشها توافق بسیار خوبی مشاهده شد(۳).

اگلا و نیلسون برای تشخیص توکسوپلاسموزیس گوسفندی از روش دیگ الایزا استفاده و نتایج آن را با روش IFA ارزیابی نمودند. این بررسی نشان داد که ارتباط نزدیکی بین نتایج این دو روش وجود دارد(۴).

در مطالعه کورسونس در سال ۱۹۸۲ جهت تشخیص توکسوپلاسموزیس انسانی با روش دیگ الایزا با رقت ۱:۱ قطر هاله ای برابر با ۰/۵±۱۷میلی متر بدست آمد. کورسونس پیشنهاد نمود که با این قطر هاله بایستی چنین سرمی حتماً از نظر وجود IgM اختصاصی علیه توکسوپلاسما و بروز مرحله حاد بیماری چک شود(۲). در این تحقیق نیز در رقت ۱:۱ برای سرم های مثبت انسانی قطر هاله واکنش ۱۷/۸۸ میلی متر بدست آمد که از نظر اندازه با قطر حاصله در مطالعه کورسونس اختلاف بسیار

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 8:28 +0330 on Sunday September 24th 2017

جزئی دارد لذا همانند کورسونس پیشنهاد می شود که جهت تشخیص توکسوپلاسموزیس حاد ، در صورت استفاده از سرم های رقیق نشده و مشاهده قطرهای واکنش مساوی یا بیشتر از ۱۷/۵۰ میلی متر، سرم ها بایستی از نظر وجود IgM اختصاصی علیه توکسوپلاسما آزمایش و یا در هفته دوم تا چهارم پس از نمونه گیری اول ، مجددا آزمایش شوند. نکته قابل توجه اینکه در آزمایشهای انجام شده در مطاله حاضر غلظت آنتی ژن ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در آزمایشهای کورسونس ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است لذا می توان نتیجه گرفت که غلظت آنتی ژن بیش از ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر تاثیری در نتیجه آزمایش و قطر هاله واکنش ندارد. درتحقیق حاضر مشخص شد که در رقت مساوی یا بیشتر از ۱:۲۰۰ بعضی از سرم های مثبت ، هاله ای ایجاد نمی کنند و این باعث افزایش موارد منفی کاذب و در نتیجه کاهش حساسیت تست می گردد. این در حالی است که در رقت ۱:۱۰۰ همه سرم های مثبت دارای هاله واضح و اکثر سرم های منفی فاقد هاله بوده اند و چون ویژگی و حساسیت در این رقت بالاتر از دیگر رقتها بود لذا بعنوان رقت سرمی cut off انتخاب گردید.

مقایسه دو تست الایزا و دیگ الایزا از نظر حساسیت و ویژگی نشان می دهد که روش دیگ الایزا با روش الایزا برابری می کند. در عین حال گرچه روش الایزا در آزمایشگاههای مجهز برای تشخیص آنتی بادیهای ضد توکسوپلاسمایی مناسب است اما روش دیگ الایزا بخاطر ساده بودن، اقتصادی بودن ، عدم نیاز به دستگاههای گرانقیمت همچون ELISA- Reader ، قابلیت استاندارد شدن و تنوع پذیری و استفاده از غلظتهای مختلف آنتی ژن می تواند جایگزین مناسبی برای روشهای متداول سرولوژیکی جهت تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس بویژه در تحقیقات سرواپیدمیولوژیکی باشد.

منابع :

1. Dubey JP. Toxoplasmosis,p.303-318.InL. in : Balows CA, Sussman M , (eds). Toply &Wilsons microbiology and microbial infection. Vol 5. New York: Arnold ,1998.
2. Cursons RT. DIG-ELISA for the serologic diagnosis of Toxoplasmosis. Am J Clin Pathol 1982 ;77(4):459-61.
3. Uggla A , Nilsson LA. A solide phase Immunoassay (DIG-ELISA) as a serodiagnostic tool in bovine and porcine Toxoplasma gondii infection. Dev Stand 1985; 62:37-42.
4. Uggla A, Nilsson LA. Evaluation of a solide-phase immunoassay(DIG-LISA) for the serodiagnosis of ovine toxoplasmosis. Vet Immunopathol 1987; 14(4): 309-18.
5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.
6. Crowther JR. ELISA theory and practice. New Jersey: Human Press, 1995.
7. Kumar GS, Mak JW, Lam PL, et al. Diffusion-in-gel enzyme linked immunosorbent assay, ELISA and IFA test in the detection of malaria antibodies Southeast Asian. J Trop Med Public Health 1987; 18(4):502-6.
8. Castilla MM, Santos GM, Guzman BC, et al. A new method for diagnosis of chagas disease: diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay. J Parasitol 1988; 74(5):805-9.
9. Bautista-Garfias CR, Loprz-Arellano ME, Sanchez AA. A new method for serodiagnosis of sheep fascioliasis using helminth excretory-secretory products. Parasitol Res 1989 ; 76: 135-137.
10. Demattis S . Quantitive determination of anti-hydatid antibodies by ELISA without a colorimetric reading. Int J Parasitol 1989; 19:229.
11. Requejo HI. Diffusion-in-gel enzyme-linked Immunosorbent assay (DIG-ELISA) for chagas disease serodiagnosis. Braz J Biol Res 1991 ; 24(5):471-83.
12. Gomez PA, Pariagua SJF, Rivas ARA , et al. Successful application of the DIG-ELISA in Onchocerciasis. Trans Ray Soc Trop Med Hyg 1985 ; 79:159.
13. Ibarra F, et al. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiolgy of bovine fascioliosis.Vet Parasitol 1998; 77:229-236.