

Diagnosa Infeksi *Fasciola gigantica* pada Sapi dengan Uji Capture-ELISA untuk Deteksi Antigen dalam Feses

SARWITRI ENDAH ESTUNINGSIH

Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 14 Mei 2006)

ABSTRACT

ESTUNINGSIH, S.E. 2006. Diagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle using capture-ELISA assay for detecting antigen in faeces. *JITV* 11(3): 229-234.

Capture-ELISA assay is a diagnosis for antigen detection in the serum or faeces using polyclonal or monoclonal antibodies. The purpose of this study was to determine the sensitivity and specificity of capture-ELISA assay using polyclonal antibody for diagnosing *Fasciola gigantica* infection in cattle by detecting antigen in the faeces. In this study, faecal samples and livers were collected from 141 cattle slaughtered in the abattoir in Jakarta. From each animal, liver was processed for liver flukes count and the corresponding faecal sample was analysed for coproantigen. The result of capture-ELISA assay for antigen detection showed that from 85 cattle infected with *Fasciola gigantica*, 83 had $OD \geq 0.52$ (range from 0.52-1.39) and 2 cattle had $OD < 0.52$ (range from 0.17-0.51). The sensitivity and specificity of the assay were 97.6% and 92.8% respectively. The assay also able to detect 50 ng/ml of antigen in faecal supernatant. It suggests that this assay will have the advantage over the other methods on its ability to detect the active infection. Collection of faeces, rather than serum, will allow a more cost-effective and adaptable method.

Key Words: *Fasciola gigantica*, Diagnosis, Capture-ELISA, Antigen

ABSTRAK

ESTUNINGSIH, S.E., 2006. Diagnosa infeksi *Fasciola gigantica* pada sapi dengan uji capture-ELISA untuk deteksi antigen dalam feses. *JITV* 11(3): 229-234.

Uji capture-ELISA merupakan uji diagnosa untuk mendeteksi adanya antigen dalam darah ataupun dalam feses dengan menggunakan antibodi poliklonal maupun antibodi monoklonal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sensitifitas dan spesifisitas uji capture-ELISA dengan menggunakan antibodi poliklonal untuk diagnosa infeksi *Fasciola gigantica* pada sapi dengan cara mendeteksi antigen dalam feses. Sampel feses dan hati dikoleksi dari 141 ekor sapi yang dipotong di RPH Jakarta. Dari masing-masing sapi, hati diproses untuk penghitungan jumlah cacing *Fasciola gigantica* dan fesesnya diproses untuk analisa antigen (coproantigen). Hasil dari uji capture-ELISA untuk deteksi antigen menunjukkan bahwa dari 85 ekor sapi yang terinfeksi *Fasciola gigantica*, 83 ekor sapi mempunyai $OD \geq 0,52$ (kisaran OD 0,52-1,39) dan 2 ekor sapi mempunyai $OD < 0,52$ (kisaran OD 0,17-0,51). Sensitifitas dan spesifisitas dari uji capture-ELISA masing-masing adalah 97,6 dan 92,8%. Uji tersebut juga mampu mendeteksi 50 ng/ml antigen dalam supernatan feses. Hal ini menunjukkan kesan bahwa uji tersebut mempunyai keunggulan karena dapat mendeteksi adanya infeksi aktif. Pengambilan sampel feses akan lebih murah dan mudah dilakukan daripada pengambilan sampel darah/serum.

Kata Kunci: *Fasciola gigantica*, Diagnosa, Capture-ELISA, Antigen

PENDAHULUAN

Pada umumnya, diagnosa fasciolosis yang disebabkan oleh infeksi cacing *Fasciola gigantica* dilakukan secara konvensional yaitu dengan melakukan identifikasi telur cacing di dalam feses. Akan tetapi pada penyakit yang akut dan masih dalam periode prepaten, keberadaan cacing tidak dapat diketahui karena telur cacing yang dikeluarkan dalam feses jumlahnya terlalu sedikit sehingga sulit untuk mendeteksinya. Selain itu, pemeriksaan serologi dengan uji ELISA untuk deteksi antibodi terhadap *Fasciola* spp. dengan menggunakan antigen yang spesifik juga telah dilakukan (HILLYER *et al.*, 1992; HILLYER, 1993;

ESTUNINGSIH *et al.*, 2004a). Namun uji tersebut masih memiliki kelemahan, karena titer antibodi yang tinggi hanya bisa untuk menunjukkan bahwa hewan tersebut pernah terinfeksi akan tetapi tidak bisa menunjukkan bahwa hewan tersebut sedang terinfeksi oleh *Fasciola* (infeksi aktif). Selain itu hewan yang telah diobati pun tetap menunjukkan titer yang tinggi terhadap *Fasciola* (ESTUNINGSIH *et al.*, 2004b).

Imunodiagnosis untuk fasciolosis hingga saat ini difokuskan untuk mendeteksi antigen dalam serum maupun dalam feses hewan yang terinfeksi. Uji capture-ELISA dengan menggunakan antibodi monoklonal (Mab ES 78) memberikan hasil yang sangat baik dan spesifik untuk mendeteksi antigen ES

F. hepatica dalam serum dan feses manusia maupun pada hewan yang terinfeksi (ESPINO *et al.*, 1990; CASTRO *et al.*, 1994; DUMENIGO *et al.*, 1996). ALMAZAN *et al.* (2001) melaporkan bahwa antigen ES dalam serum domba dapat terdeteksi pada minggu pertama setelah infeksi dan mengalami penurunan setelah periode prepaten, sedangkan antigen ES dalam feses dapat terdeteksi selama periode prepaten dan setelah periode tersebut antigen masih tetap terdeteksi. Uji *capture*-ELISA untuk deteksi antigen dalam feses memiliki kelebihan dibandingkan dengan uji antibodi-ELISA, karena bisa mendeteksi adanya infeksi aktif selama cacing masih berada di dalam kantong empedu. Selain itu, pengambilan sampel lebih mudah dilakukan karena feses segar masih bisa didapatkan di sekitar kandang atau padang penggembalaan, sehingga tidak diperlukan penanganan khusus terhadap hewannya.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitifitas dan spesifisitas uji *capture*-ELISA dengan menggunakan antibodi poliklonal untuk mendiagnosa infeksi *F. gigantica* pada sapi dengan mendeteksi adanya antigen dalam feses.

MATERI DAN METODE

Sampel

Seratus empat puluh satu feses dan hati sapi dikoleksi dari Rumah Potong Hewan (RPH) Jakarta secara acak sederhana. Sampel-sampel tersebut dibawa ke Laboratorium Parasitologi, Balitvet untuk dilakukan pemeriksaan. Sampel feses diproses untuk deteksi adanya antigen *F. gigantica* dengan uji *capture*-ELISA. Selanjutnya, sampel hati diproses untuk pemeriksaan dan penghitungan jumlah cacing *F. gigantica* seperti yang telah diuraikan oleh ESTUNINGSIH *et al.* (2004a).

Persiapan supernatan feses untuk deteksi antigen

Supernatan feses dipersiapkan mengikuti metode ESPINO *et al.* (1990). Feses dihancurkan dengan menggunakan mortar supaya homogen, kemudian diambil 1 gram dan dilarutkan dalam 2 ml larutan PBST 1%. Larutan feses tersebut diaduk dengan vortek dalam kecepatan tinggi, selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dikoleksi dan disimpan pada suhu -20°C hingga saat digunakan.

Pembuatan antigen

Metode pembuatan antigen ES dari cacing *F. gigantica* sama seperti yang telah diuraikan sebelumnya oleh ESTUNINGSIH *et al.* (2004a). Cacing *F. gigantica* dewasa dikoleksi dari saluran empedu pada hati sapi yang dipotong di RPH. Cacing hati yang masih dalam keadaan hidup ditempatkan dalam kontainer yang berisi

larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 15-20 menit (50 cacing dalam 100 ml PBS). Cacing yang sudah terlihat bersih dipindahkan ke dalam kontainer yang berisi media RPMI yang mengandung antibiotik yang bersuhu 37°C selama 20 menit. Kemudian, semua cacing hati yang masih hidup dan terlihat bersih dipindahkan ke dalam medium RPMI yang baru dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 4-6 jam (2 cacing dalam 1 ml RPMI). Setelah inkubasi, larutan yang sudah mengandung ES antigen disentrifugasi dan supernatannya disimpan dalam suhu -20°C hingga saat digunakan.

Produksi antibodi poliklonal

Antibodi poliklonal diperoleh dari kelinci yang telah diimunisasi dengan antigen ES *F. gigantica*. Dua ekor kelinci diimunisasi dengan 0,5 ml (300 µg/ml) antigen ES yang telah diemulsikan dengan 0,5 ml *Freund's complete adjuvant* secara subkutan. Kemudian, diimunisasi dua kali dengan 0,5 ml (300 µg/ml) antigen ES yang dicampur dengan 0,5 ml *Freund's incomplete adjuvant* secara subkutan dengan interval 1 bulan. Satu bulan setelah imunisasi terakhir dilakukan pengambilan darah untuk dikoleksi serumnya dan diperiksa *level* antibodinya. Setelah kelinci mempunyai *level* antibodi tinggi (OD > 2) darah kelinci diambil sebanyak-banyaknya untuk dipisahkan serumnya dan disimpan di -20°C sampai diperlukan.

Anti-ES *F. gigantica* Ig G antibodi

Presipitasi serum antibodi poliklonal dilakukan dengan menggunakan 50% amonium sulfat untuk memisahkan Ig G. Purifikasi Ig G dilakukan dengan menggunakan kolom protein, selanjutnya dilakukan pencucian kolom (*elute*) dengan glisin dan fraksi Ig G yang keluar dari kolom ditampung dan dikoleksi. Ig G didialisa dengan PBS pada suhu 4°C selama 12 jam. Konsentrasi protein diukur mengikuti prosedur LOWRY *et al.* (1951). Selanjutnya, antibodi Ig G yang sudah diketahui kandungannya dikonjugasi dengan enzim peroksidase dengan metode periodate (WILSON dan NAKANE, 1978).

Standarisasi uji *capture*-ELISA untuk deteksi antigen dalam buffer dan feses

Untuk optimalisasi uji *capture*-ELISA, dilakukan titrasi anti-ES *F. gigantica* Ig G sebagai antigen *capture* dalam beberapa pengenceran (1:400 s/d 1 : 12,800). Titrasi yang sama juga dilakukan terhadap anti-ES *F. gigantica* Ig G yang telah dikonjugasi dengan enzim peroksidase sebagai *secondary antibody*. Dari optimalisasi tersebut diperoleh kombinasi pengenceran

baik untuk *capture* maupun untuk *secondary antibody* masing-masing 1 : 1,600. Selanjutnya, untuk deteksi antigen ES dalam feses dilakukan dengan cara mencampurkan antigen ES dengan konsentrasi yang sudah ditentukan ke dalam larutan feses sapi yang negatif *F. gigantica*. Konsentrasi antigen ES adalah mulai dari 50 µg/ml dengan pengenceran seri sampai 0,012 µg/ml yang dilakukan dengan duplikasi.

Uji *capture*-ELISA untuk deteksi antigen ES *F. gigantica* dalam feses

Cawan ELISA (NUNC, maxisorf) dengan dasar datar dilapisi dengan 100 µl/lubang anti-ES *F. gigantica* Ig G dengan pengenceran 1 : 1,600 dan diinkubasikan pada suhu 4°C semalam. Setelah inkubasi, cawan dicuci sebanyak 3x dengan larutan PBST 1%, kemudian diinkubasi dengan 5% skim milk dalam PBST sebanyak 200 µl/lubang pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya, cawan ELISA dicuci lagi 3x dengan PBST, dan 100 µl supernatan feses tanpa pengenceran dimasukkan ke dalam lubang cawan dan diinkubasikan lagi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setiap sampel dilakukan duplikasi dan setiap cawan ELISA ada kontrol positif dan negatifnya. Setelah dilakukan pencucian 4x dengan PBST, 100 µl yang mengandung 1 : 1,600 anti-ES *F. gigantica* Ig G yang telah dikonjugasi dengan enzim peroksidase dimasukkan ke setiap lubang dan diinkubasikan lagi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian, cawan dicuci lagi 4x dengan PBST dan 100 µl larutan substrat (1 tablet TMB+1 ml DMSO+9 ml fosfat buffer+2 µl H₂O₂ untuk setiap cawan) dimasukkan ke dalam setiap lubang pada cawan ELISA dan ditunggu 10 menit sampai ada perubahan warna. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 25 µl H₂SO₄ ke setiap lubang dan reaksi akan berwarna kekuningan. *Optical Density* (OD) dibaca pada panjang gelombang

450 nm dengan menggunakan mesin baca ELISA (*Multiskan Ex*).

Untuk menentukan nilai *cut-off*, dihitung dari rata-rata OD yang diperoleh dari semua sampel feses sapi yang negatif *F. gigantica* (negatif telur cacing maupun negatif cacing dewasa) ditambah 3x standar deviasi (HILLYER *et al.*, 1992). Nilai rata-rata OD negatif *Fasciola* adalah 0,31 dengan standar deviasi 0,07, sehingga nilai OD positif *F. gigantica* adalah ≥ 0,52.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi antigen ES *F. gigantica* dalam feses dengan uji *capture*-ELISA dengan menggunakan antibodi poliklonal merupakan langkah baru untuk diagnosa fasciolosis di Indonesia. Hasil standarisasi uji *capture*-ELISA dengan menggunakan antibodi poliklonal dipaparkan pada Tabel 1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kombinasi antara anti-ES *F. gigantica* Ig G sebagai antigen *capture* pada pengenceran 1 : 1,600 dan deteksi dengan anti-ES *F. gigantica* Ig G yang telah dikonjugasi dengan enzim peroksidase pada pengenceran 1 : 1,600 memberikan hasil yang optimal (7x perbedaan antara positif dan negatif sampel). Selanjutnya kombinasi tersebut dipakai dalam menguji sampel feses sapi untuk deteksi antigen *F. gigantica* dengan uji *capture*-ELISA.

Hasil uji *capture*-ELISA untuk deteksi antigen *F. gigantica* dalam feses dikelompokkan berdasarkan nilai *cut-off* (OD = 0,52) seperti yang tercantum pada Tabel 2. Jumlah sapi yang positif cacing *F. gigantica* sebanyak 85 ekor, 83 ekor diantaranya mempunyai OD ≥ 0,52 (kisaran OD 0,52-1,39) dan 2 ekor sapi mempunyai OD < 0,52 (kisaran OD 0,17-0,51). Sementara itu, jumlah sapi yang negatif cacing *F. gigantica* adalah 56 ekor dan 4 ekor diantaranya mempunyai OD > 0,52 (kisaran OD 0,54-0,55).

Tabel 1. Hasil standarisasi uji *capture*-ELISA dengan menggunakan antibodi poliklonal

<i>Capture</i> (anti- ES <i>F. gigantica</i> Ig G)	Anti-ES <i>F. gigantica</i> Ig G yang telah dikonjugasi dengan enzim peroksidase					
	1 : 400	1 : 800	1 : 1,600	1 : 3,200	1 : 6,400	1 : 12,800
1 : 400	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 : 800	+++	+++	+++	+++	++	++
1 : 1,600	++	++	++	+	+	+
1 : 3,200	+	-	+	-	-	-
1 : 6,400	-	-	-	-	-	-
1 : 12,800	-	-	-	-	-	-

+++ = OD >1,0
 ++ = OD 0,75-1,0
 + = OD 0,5-0,74
 = OD <0,5

Sensitifitas dan spesifisitas dari uji *capture-ELISA* masing-masing adalah 97,6% (83/85 x 100%) dan 92,8% (52/56 x 100%), sedangkan akurasi dari uji tersebut adalah 95,7% (83 + 52)/141 x 100%). Antara jumlah cacing dan antigen absorbensi yang terdeteksi pada feses mempunyai korelasi yang positif ($R^2=0,4384$) seperti yang terlihat pada Gambar 1. Adapun pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa uji *capture-ELISA* sangat efektif dan sensitif dalam mendeteksi antigen ES dalam feses pada dosis tertentu dan dapat mendeteksi 50 ng/ml antigen ES dalam supernatan feses (di atas nilai *cut-off*).

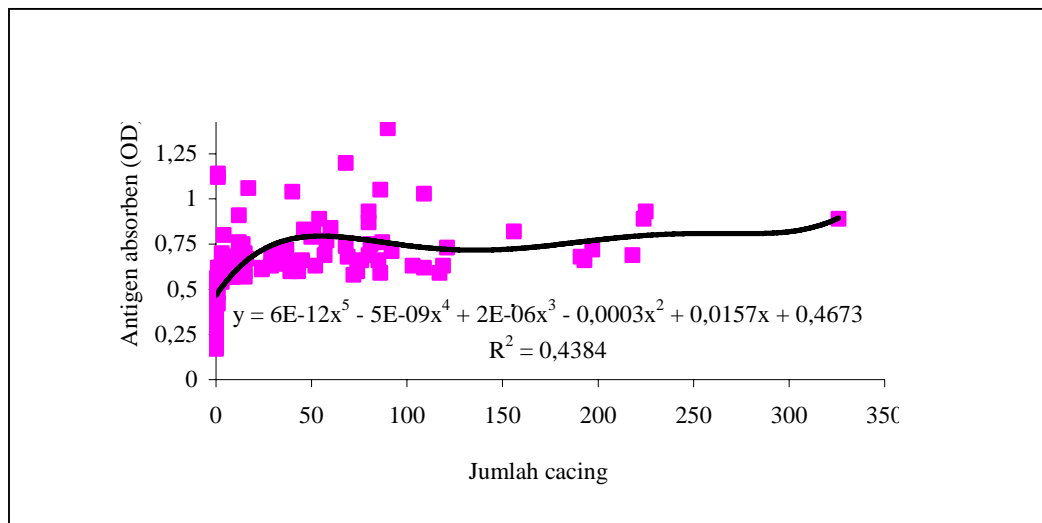
Sensitifitas dan spesifisitas uji *capture-ELISA* untuk deteksi antigen ES *F. gigantica* dalam feses sapi pada penelitian ini masing-masing adalah 97,6; 92,8 dan 95,7% dari total sampel yang diperiksa menunjukkan positif *F. gigantica*. Hasil ini sedikit berbeda dengan hasil yang dilaporkan oleh SANCHEZ-ANDRADE *et al.* (2000) dalam mendiagnosa infeksi alami *F. hepatica* pada sapi dengan *sandwich ELISA*. Sensitifitas dan

spesifisitas dari uji tersebut masing-masing adalah 94,4 dan 100%, serta 37,3% dari total sampel yang diperiksa menunjukkan positif *F. hepatica*. Spesifisitas yang sangat tinggi tersebut kemungkinan disebabkan karena positif palsu yang diperolehnya sangat rendah sehingga menyebabkan uji tersebut sangat spesifik.

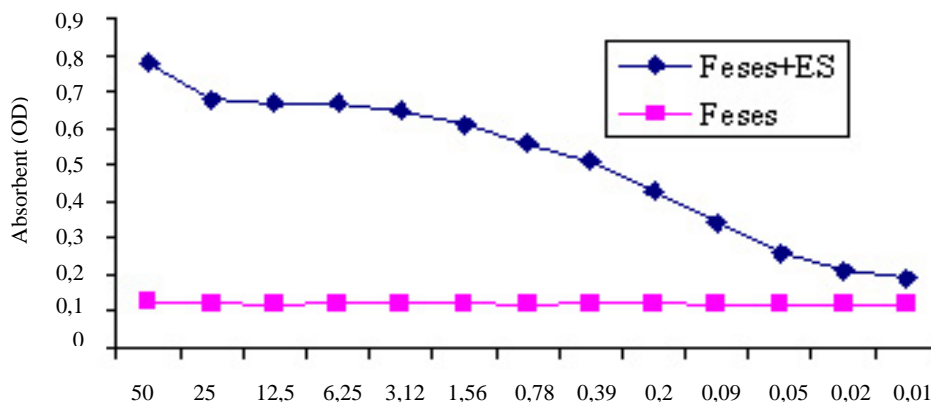
Demikian pula antara antigen ES dalam feses dengan jumlah cacing yang ditemukan dalam hati sapi menunjukkan adanya korelasi yang positif (44%) (Gambar 1). Di sini terlihat jumlah cacing yang meningkat, kuantitas antigen ES dalam feses juga meningkat yang ditandai dengan tingginya antigen absorbensi yang terbaca pada cawan ELISA. Hasil ini sesuai dengan hasil yang dilaporkan oleh DUMENIGO *et al.* (1996) bahwa ada korelasi positif antara jumlah cacing dengan konsentrasi antigen dalam feses pada 100 ekor sapi yang dipotong di RPH. Selanjutnya, ABDEL-RAHMAN *et al.* (1998) juga melaporkan adanya korelasi yang kuat antara nilai OD pada feses dengan jumlah cacing dalam hati.

Tabel 2. Jumlah sapi yang positif ($OD \geq 0,52$) dan negatif ($OD < 0,52$) terhadap cacing *F. gigantica*

Antigen dalam feses	Positif cacing <i>F. gigantica</i>	Negatif cacing <i>F. gigantica</i>	Jumlah
$OD \geq 0,52$	83	4	87
$OD < 0,52$	2	52	54
Jumlah	85	56	141



Gambar 1. Korelasi antara jumlah cacing dengan antigen absorbensi



Gambar 2. Deteksi antigen dalam supernatan feses sapi negatif *F. gigantica* dengan dan tanpa penambahan antigen ES *F. gigantica*

Uji *capture*-ELISA bisa untuk mendeteksi kuantitas antigen yang terdapat dalam feses. Pada penelitian ini antigen ES *F. gigantica* hanya terdeteksi 50 ng/ml dalam supernatan feses dan hasil ini lebih rendah dari yang dilaporkan oleh ESPINO dan FINLAY (1994) yaitu 15 ng/ml antigen dalam feses manusia dan ABDEL-RAHMAN *et al.* (1998) yang mampu mendeteksi 300 pg coproantigen/ml dalam supernatan feses sapi. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan karena antibodi *capture* yang digunakan berbeda. Pada penelitian ini antibodi poliklonal dipakai untuk *capture*, sedangkan kedua penulis tersebut menggunakan antibodi monoklonal untuk *capture*.

Dalam mendiagnosa fasciolosis diperlukan suatu uji yang mempunyai sensitifitas dan spesifisitas tinggi, di samping itu diperlukan juga kecepatan waktu untuk mendiagnosa. Diagnosa fasciolosis dengan uji *capture*-ELISA dalam penelitian ini mempunyai sensitifitas dan spesifisitas tinggi dibandingkan dengan uji sebelumnya dengan antibodi-ELISA atau identifikasi telur cacing dalam feses. ESTUNINGSIH *et al.* (2004a) melaporkan bahwa diagnosa *F. gigantica* dengan uji antibodi-ELISA mempunyai sensitifitas 91% dan spesifisitasnya 88%, sedangkan identifikasi telur cacing dalam feses sensitifitas dan spesifisitasnya masing-masing adalah 87 dan 100%. Meskipun spesifisitas dari identifikasi telur cacing 100% tetapi sensitifitasnya rendah dan metode ini hanya bisa untuk mendeteksi infeksi paten.

Uji *capture*-ELISA untuk deteksi antigen dalam feses mempunyai beberapa keunggulan, disamping mempunyai sensitifitas dan spesifisitas tinggi, uji tersebut juga bisa untuk mendeteksi adanya infeksi aktif *F. gigantica* baik pada sapi maupun domba (ESTUNINGSIH *et al.*, 2004b), sehingga pengobatan bisa difokuskan hanya terhadap hewan yang terinfeksi saja. Selain itu, untuk pengambilan sampel feses pada hewan

di lapang akan lebih mudah dilakukan dibandingkan pengambilan darah/serum yang memerlukan keahlian.

KESIMPULAN

Dari hasil yang telah diuraikan di atas bisa diambil kesimpulan bahwa uji *capture*-ELISA dengan antibodi poliklonal untuk deteksi antigen ES *F. gigantica* dalam feses mempunyai sensitifitas 97,6% dan spesifisitas 92,8%. Disamping itu uji tersebut juga mampu mendeteksi 50 ng/ml antigen ES *F. gigantica* dalam feses. Diagnosa fasciolosis dengan uji *capture*-ELISA dengan antibodi poliklonal untuk deteksi antigen dalam feses merupakan diagnosa yang lebih tepat, akurat dan mudah dilakukan, sehingga diharapkan bisa diterapkan di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada *Department for International Development* yang telah memberi dana untuk penelitian ini, dan kepada Drh. Adin Priadi yang telah membantu dalam pembuatan konjugat. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Drs. Gatot Adiwinata, saudara Suharyanta dan Sudrajat yang telah membantu dalam pengambilan sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- ABDEL-RAHMAN, S.M., K. O'REILLY and J.B. MALONE. 1998. Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28-kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 59: 533-537.

- ALMAZAN, C., G. AVILA, H. QUIROZ, F. IBARRA and P. OCHOA. 2001. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 97: 101-112.
- CASTRO, J., B. DUMENIGO and A. ESPINO. 1994. Deteccion de coproantigenos para evaluar infeccion activa por *Fasciola hepatica* en ganado bovino. *Parasitol. al Dia.* 18: 33-38.
- DUMENIGO, B.E., A.M. ESPINO and C.M. FINLAY. 1996. Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle faeces by a monoclonal-based sandwich immunoassay. *Res. Vet. Sci.* 60: 278-279.
- ESPINO, A.M., R. MARCET and C.M. FINLAY. 1990. Detection of circulating excretory-secretory antigens in human fasciolosis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2637-2640.
- ESPINO, A.M. and C.M. FINLAY. 1994. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory-secretory antigens in humans with fasciolosis. *J. Clin. Microbiol.* 32: 190-193.
- ESTUNINGSIH, S.E., S. WIDJAJANTI dan G. ADIWINATA. 2004a. Perbandingan antara Uji ELISA-Antibodi dan pemeriksaan telur cacing untuk mendeteksi infeksi *Fasciola gigantica* pada Sapi. *JITV* 9: 55-60.
- ESTUNINGSIH, S.E., S. WIDJAJANTI, G. ADIWINATA and D. PIEDRAFITA. 2004b. Detection of coproantigens by sandwich ELISA in sheep experimentally infected with *Fasciola gigantica*. *Trop. Biomed. Supplement*: 51-56.
- HILLYER, G.V., J. SOLER DE GALANES, J. RODRIGUEZ, J. BJORLAND, M. SILVA DE LAGRAVA, S.R. GUZMAN and R.T. BRYAN. 1992. Use of the falcon assay screening test- enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 603-609.
- HILLYER, G.V. 1993. Serological diagnosis of *Fasciola hepatica*. *Parasitol. al Dia.* 17: 130-136.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- SANCHEZ-ANDRADE, R., A. PAZ-SILVA, J. SUAREZ, R. PANADERO, P. DIEZ-BANOS and P. MORRONGO. 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet. Par.* 93: 39-46.
- WILSON, M.B. and P.K. NAKANE. 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. *In: Immunofluorescence and Related Staining Techniques.* Elsevier. KNAPP, W., K. HOLUBAR and G. WICKS (Eds.). Amsterdam. pp. 215-224.