Archive of SID

نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۸۵، زمستان ۱۳۸۸

ارزیابی آنتی ژنیسیته مایع کیست هیداتیک و پروتواسکولکس به روش ایمنودیفیوژن دوبعدی

• **خسرو حضرتی تپه**
دانشیار انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)
• **احد محمدی**
کارشناس اداره دامپزشکی استان آذربایجان غربی
• **افشین برازش**
کارشناس ارشد انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۳۴۳۳۱۳۴
Email: hazrati_tappeh@yahoo.co.nz

چکیده

روش هـای تشـخیصی مختلفی برای کیسـت هیداتیک در دسـترس اسـت. بـرای طراحی کیت های سـرولوژیکی بر مبنـای ردیابی پادکنی، وجود پادتن مناسـب و کافی بر علیه کیسـت هیداتید مورد نیاز می باشـد. در دو گروه مسـتقل، پادگن های مایع کیسـت و پروتواسـکولکس ها از نمونه های گوسـفندی جهت تولید پادتن پلی کلونال در خرگوش ها استفاده گردید. تزریقات در پنج مرحله به صورت داخل و زیر جلدی انجام گرفت و جهت مقایسـه خاصیت آنتی ژنیسـیتی در دو گروه و تعیین تیتر، تست دوبل ایمینو دیفیوژن طراحی گردید. حداقل پادتن بدسـت آمده در هر دو گروه، مربوط به نمونه بعد از تزریق اول (رقت ۱/۱) و بیشـترین آن پس از تزریق چهارم بدسـت آمد (رقت ۱/۱۶). میانگین تیتر در همه آزمون های گروه اول، ۱۱/۲۰ و در گروه دوم ۹/۲۰ بدسـت آمد. با توجه به نتایج مبنی بر بالا بودن قدرت آنتی ژنیسـیته پروتواسـکولکس از مایع کیست، می توان در تحقیقاتی نظیر مطالعات مولکولی، از پادتن علیه پروتواسکولکس های انگلی بهره جست و یا پس از خالص سازی و کونژوگاسیون آن با آنزیم مناسب، در جهت طراحی کیت های الایزای تشخیصی سریع، گام برداشت.

کلمات کلیدی: مایع کیست هیداتیک، پروتواسکولکس، آنتی ژنیسیتی، پادتن پلی کلونال، ایمنودیفیوژن دوبل

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 85 pp: 16-21

Evaluation of antigenicity of hydatic cyst and its protoscolexes by designing a new double immunodiffusion test

By: KH Hazrati tape, Ph.D, Associate Professor of Parasitology & Mycology Dept, Uramia University of Medical Sciences, (Corresponding Author; Tel: +989143433134) A Mohammadi, DVM, Expert of Veterinary Office of West Azerbaijan, A Barazesh, M.Sc, of Parasitology & Mycology Dept, Bushehr University of Medical Sciences.

There are various methods to diagnosis of hydatic cyst. Serological methods based on tracing special antigens have high sensitivity, but the first need to design the kits based on serological methods is having enough amount of appropriate antibody against hydatic cyst antigens. Hydatic cyst antigens and parasite protoscolexes prepared from sheep liver samples were injected to rabbits to obtain polyclonal antibodies. Injections were done five times both subcutaneously and intracutanously. We designed a double immunodiffusion test to compare antigenicity of two antigen groups as well as measurement of generated antibody levels. The least level obtained in both groups was from the first (dilution 1/1), and the highest level was from the last prepared sample after injection (dilution 1/16). Furthermore, mean generated antibody level in all examinations obtained 11/20 for the first group and 9/20 for the second group. By comparing the results of the studied groups, it could be concluded that antigenicity of protoscolexes are more than hydatic cyst fluid. So the antibodies against parasite protoscolexes could be used in investigations including molecular studies, and after purification and conjugation with appropriate enzyme, it also could be used to design rapid diagnostic ELISA kits

Key words: Hydatic Cyst Fluid, Antigenicity, Protoscolexes, Polyclonal antibody, Double Immunodiffusion

مقدمه

کیست هیداتیک (Hydatid Cyst) یکی از بیماری های انگلی مشترک بین انسان و حیوانات محسوب می گردد (۵، ۶). آلودگی به کیست هیداتیک دارای انتشار جهانی بوده (۱) و سالیانه خسارات اقتصادی فراوانی از نظر آلودگی دام ها به کشورهای مختلف جهان وارد می سازد و از سوی دیگر، ابتلای انسانی آن مخاطرات جدی برای سلامتی انسانها ایجاد نموده و در مواردی خطر مرگ نیز به دنبال دارد (۷). در ارزیابی تشخیصی این بیماری از روش های سرولوژیکی استفاده می شود. اساس تست های سرولوژیکی بر مبنای ردیابی پادتن های تولید شده در بدن میزبان بوده و تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله: محل آناتومیک کیست، بارور بودن آن، سن بیمار و وجود پادتن های در گردش خون می باشند که بطور طبیعی در افراد دارای نقص ایمنی، حساسیت و ویژگی پایین تری خواهد داشت(۲).

امروزه از روش های جدیدتر مانند ردیابی پادگن کیست در تشخیص بیماری استفاده می کنند(۲) که برای این منظور نیاز به پادتن مناسب و کافی بر علیه کیست می باشد تا بتوان اولین قدم را در طراحی کیت های سرولوژیکی با قدرت تشخیص پادگنی بالا برداشت. لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا پادتن پلی کلونال بر علیه مایع کیست و همچنین پروتواسکولکس های انگلی را تولید نموده، خاصیت آنتی ژنیسیته و تیتر پادتن تولیدی را با استفاده از طراحی تست ایمنودیفیوژن دو بعدی مقایسه نماییم.

مواد و روش‌ها

تهیه پادگن

در این مطالعه بنیادی کاربردی، ابتدا تعدادی نمونه های کبد گوسفند آلوده به کیست هیداتیک از کشتارگاه ارومیه جمع آوری و به آزمایشگاه تحقیقاتی انگل شناسی دانشکده پزشکی منتقل شده و از نظر بارور و غیربارور بودن مورد آزمایش قرار گرفت.

مایع کیست های بارور جمع آوری و به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ چرخش در دقیقه سانتریفیوژ، و مایع صاف شده رویی برداشت گردید و جذب آن در طوج موج ۴۵۰ نانومتر قرائت و میزان پروتئین آن محاسبه شد.

رسوب حاصله به همراه لایه زایای کیست ها چندین بار با دور ۲۵۰۰ چرخش در دقیقه به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد تا عاری از پادگن مایع کیست گردد. سپس در یک هاون چینی خرد و برای چندین روز پیاپی پس از انجماد و آب کردن، این عمل تکرار گردید. در نهایت در یک ارلن حاوی دانه های شیشه ای کاملاً مخلوط گردید تا پادگن ها آزاد شوند. محلول حاصله سانتریفوژ و مایع رویی به عنوان پادگن پروتواسکولکس برداشت و میزان پروتئین آن اندازه گیری شد.

برای استاندارد سازی غلظت پادگن ها و برابر نمودن میزان پروتئین شان، از سرم فیزیولوژی فنیکه جهت کاهش و کیسه سلوفان جهت افزایش غلظت پروتئین استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

ایمونیزاسیون خرگوش

در دو گروه مستقل از هم (هر گروه متشکل از سه خرگوش) مبادرت به تولید پادتن پلی کلونال علیه مایع کیست هیداتیک (گروه ۱) و پروتواسکولکس ها (گروه ۲) گردید. تزریقات در ۵ مرحله به فواصل ۲ هفته از هم به صورت داخل و زیر جلدی انجام شد تا ایمونیزاسیون کامل صورت گیرد. تزریق اول به میزان ۰/۲ میلی لیتر با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق های یادآور بعدی به مقدار ۰/۵ میلی لیتر بدون استفاده از ادجوانت انجام شد.

مقایسه خاصیت آنتی ژنیسیته دو گروه آنتی ژن

قبل از شروع ایمونیزاسیون و حدود ۱۵ روز پس از هر تزریق (بلافاصله قبل از تزریق بعدی)، از هر کدام از خرگوش ها خونگیری بعمل آمد و تولید پادتن و تعیین تیتر آن و مقایسه ایمنی زایی دو نوع پادگن بکار رفته در دو گروه مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور تست دوبل ایمنودیفیوژن طراحی گردید.

در حفره مرکزی محلول پادگن و در حفره های کناری نمونه های سرمی با رقت‌های مختلف اضافه گردید. در انتها نمونه‌ها با رنگ کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی شدند.

نتایج

در این تحقیق جمعاً ۳۶ نمونه سرمی که ۱۸ نمونه آن مربوط به گروه اول (۳ نمونه کنترل منفی، ۱۵ نمونه آنتی سرم خرگوش بر ضد پادگن مایع کیست) و ۱۸ نمونه هم مربوط به گروه دوم (۳ نمونه کنترل منفی، ۱۵ نمونه آنتی سرم خرگوش بر ضد پادگن پروتواسکولکس) بود، توسط تست دوبل ایمنودیفیوژن تعیین تیتر گردید، حداقل رقت بدست آمده در هر دو گروه مربوط به نمونه بعد از تزریق اول بود و بیشترین تولید پادتن پس از تزریق چهارم بدست آمد (جداول ۲و۱).

شکل یک، تصویری از تست دوبل ایمنودیفیوژن طراحی شده را نشان می دهد که در حفره مرکزی آن پادگن مورد نظر و در حفرات کناری، نمونه سرمی بعد از چهارمین تزریق خرگوش سوم از گروه دو با رقت‌های مختلف کوت گردیده‌اند. حفره A مربوط به نمونه سرمی با ضریب رقت یک و حفرات B، C، D و E، بترتیب به نمونه های سرمی با ضریب رقت ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶، و بالاخره حفره F مربوط به نمونه با ضریب رقت ۱/۳۲ بوده که در تمامی تست‌های انجام شده منفی گزارش گردید.

بحث

کیست هیداتیک یک بیماری سیکلوزئونوز می باشد و قادر است انسان را به شدت مبتلا ساخته و همچنین سبب آلودگی چهارپایان اهلی شود (۸).

بر اساس مطالعات انجام شده در ایران، آلودگی به کیست هیداتیک به میزان ۱۱/۲ درصد هزار نفر در سال می باشد (۳). امروزه با استفاده از روش های مختلف تشخیصی نظیر رادیوگرافی ساده، سونوگرافی، سی تی اسکن و ام آر آی در اغلب موارد می توان بیماری را تشخیص داد، ولی با توجه به محدودیت در استفاده از این روش ها، و از سوی دیگر عدم قدرت تشخیصی کیست های چند حفره ای و یا ضایعات توپر، کماکان آزمایش های سرولوژیک در تشخیص کیست هیداتیک اهمیت داشته و مورد استفاده قرار می گیرند (۲، ۵). اغلب آزمایش های سرولوژیکی مرسوم بر اساس جستجوی پادتن در بدن بوده و بخصوص حساسیت این روش های سرولوژیک در تشخیص کیست های خارج کبدی، کمتر می باشد (۹،۱۰).

با استفاده از روش های بر مبنای ردیابی پادگن، میزان حساسیت و اختصاصی بودن تست های سرولوژیک افزایش می یابد (۱۱،۱۲،۱۳)، زیرا که سطح پادگن فرد یا نمونه مورد نظر با تعداد انگل موجود در آن مطابقت دارد. پس سیستم های پادگن یک جایگزین مطلوبی برای سیستم های تشخیص پادتن می باشند. مخصوصاً در بیمارانی که دارای نقص ایمنی بوده و سیستم پاسخ دهی بدن آنها سرکوب شده است. الایزا بعنوان یک ابزار تشخیصی سرولوژیکی بالقوه ای برای اغلب بیماری های عفونی مورد استفاده قرار می گیرد و دارای حساسیت بالایی می باشد و اولین قدم در این راستا، تولید پادتن مناسب در یک حیوان بر علیه پادگن های انگلی می باشد.

جهت ایمن سازی حیوان از مایع و همچنین پروتواسکولکس های کیست های بارور کبد گوسفندان آلوده بعنوان پادگن استفاده گردید که کاملاً در شرایط استریل و بدور از هر گونه آلودگی مبادرت به انجام این عمل گردید و جهت تحریک هر چه بیشتر سیستم ایمنی حیوان و افزایش تیتر پادتن تولیدی، تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق های بعدی بدون ادجوانت انجام گرفت (۱۴، ۱۵).

برای اثبات تولید پادتن از روش سرولوژیکی ایمنودیفیوژن دوبعدی استفاده شد، که روشی بسیار ساده و کامل در ایمنی شناسی است و یکی از مزایای مهم آن حرکت کردن پادگن و پادتن بطور طبیعی و با مکانیسم نفوذ بسوی هم می باشد که موجب سادگی و کم هزینه بودن آن گشته است (۱۶).

در تمامی آزمون ها برای سرم های کنترل منفی، نتایج منفی بدست آمد که نشانگر صحت و دقت در آزمایش می باشد. برای مشاهده بهتر خط رسوبی و تایید واکنش، تمامی نمونه ها با رنگ کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی شدند.

با مقایسه نتایج بدست آمده در دو گروه مطالعه، می توان چنین نتیجه گرفت که قدرت آنتی ژنیسیته پروتواسکولکس به مراتب بیشتر از مایع کیست هیداتیک می باشد. نتیجه بدست آمده تحت شرایط فوق و با روش ایمنودیفیوژن دو بعدی حائز اهمیت می باشد چون برخی مطالعاتی که در این زمینه انجام گرفته نشانگر بالا بودن خاصیت آنتی ژنیسیته مایع کیست بوده است(۱۷).

لذا با دقت و تامل در شیوه کاری محققین مختلف می توان چنین تفسیر کرد که عوامل مختلفی نظیر جنس و گونه حیوان و نوع بافت آلوده به کیست که پادگن از آن تهیه می شود، سویه انگل، جنس و گونه حیوانی که پادتن در آن تولید می شود، تکنیک مورد استفاده و میزان دقت و رعایت اصول کار می توانند در نتیجه تحقیق موثر باشند. در گوسفندان علی رغم گاوها، اکثر کیست ها بارور بوده و از نظر آنتی ژنیسیته قوی هستند (۱۸) که این اختلاف در قدرت آنتی ژنیسیته می تواند بین مایع کیست هیداتیک و پروتواسکولکس دو گونه نیز صادق باشد (۱۹). کیست های موجود در بافت کبد قدرت آنتی ژنیسیته بیشتری نسبت به

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مقادیر تعیین تیتر پادتن تولیدی در گروه ۱ (خرگوش های ایمن شده با پادگن مایع کیست هیداتیک)، با استفاده از طراحی تست دوبل ایمنودیفیوژن

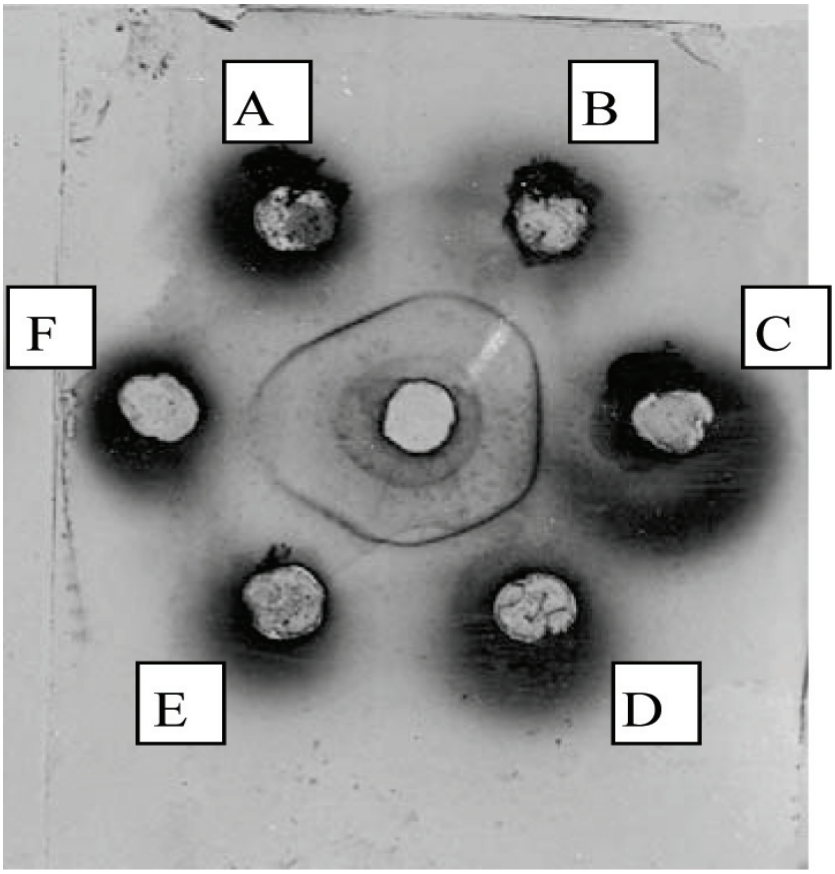
نمونه سرمی بعد از تزریق / رقت سرمی	خرگوش اول						خرگوش دوم						خرگوش سوم					
	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۰	۱	۲	۳	۴	۵
۱	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+/−	+	+	+	+
۱/۲	−	−	+	+	+/−	+/−	−	−	+/−	+/−	+	+/−	−	−	−	+	+	+
۱/۴	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
۱/۸	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
۱/۱۶	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
۱/۳۲	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

جدول ۲- مقادیر تعیین تیتر پادتن تولیدی در گروه ۲ (خرگوش های ایمن شده با پادگن پروتواسکولکس)، با استفاده از طراحی تست دوبل ایمنودیفیوژن

نمونه سرمی بعد از تزریق / رقت سرمی	خرگوش اول						خرگوش دوم						خرگوش سوم					
	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۰	۱	۲	۳	۴	۵
۱	−	+/−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
۱/۲	−	−	+/−	+/−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+
۱/۴	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	+/−	+	+
۱/۸	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+/−	+/−	−	−	−	−	−	+
۱/۱۶	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+/−	−	−	−	−	+	−
۱/۳۲	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تست دوبل ایمنودیفیوژن برای نمونه سرمی بعد از چهارمین تزریق خرگوش سوم از گروه دو با رقت های مختلف

جدول ۳- مقایسه میانگین تیتر پادتن تولیدی در گروه اول و دوم مطالعه

شماره تزریقات / تیتر آنتی بادی	قبل از تزریق	تزریق اول	تزریق دوم	تزریق سوم	تزریق چهارم	تزریق پنجم	میانگین کل
گروه اول (پادگن مایع کیست)	۰	۲/۳	۲/۳	۵/۱۲	۱/۳	۲/۳	۱۱/۲۰
گروه دوم (پادگن پروتواسکولکس)	۰	۱	۲/۳	۱/۳	۱/۱۲	۱/۶	۹/۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

کیســت های موجود در ریه دارند (۱۸). و از طرفی طبیعی اســت که هر سویه از انگل، کیست هایی با خواص پادگن منحصر به آن سویه را تولید خواهــد کرد. وجود ارتبــاط فیلوژنی بین حیوانی کــه پادگن از آن تهیه شده با حیوانی که پادتن در آن تولید شده است، ممکن است باعث عدم تحریک و یا کاهش تحریک سیستم ایمنی شود (۱۶).

در تکنیــک ایمنوالکتروفــورز کــه بر اســاس ایجــاد میــدان الکتریکی می باشــد، ذرات کوچکتر با بار بیشــتر، ســریع تر حرکت می کنند و لذا پادگن های موجود در مایع کیست هیداتیک که محلول تر و کوچکتر هستند، ســریع تر حرکت کرده و قدرت آنتی ژنیســیته آن را بالاتر نشان خواهند داد (۴).

روش EITB (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blotting) که بر اســاس واکنش آنزیمی صورت می گیرد، روشی بسیار دقیق و با حساســیت و ویژگی بالا می باشد (۲۰). مکانیسم تکنیک های رسوبی نظیر ایمنودیفیوژن، بر مبنای نفوذ پادگن و پادتن در ژل و واکنش آنها با هم می باشد لذا این فرصت را برای تمامی پادگن ها و پادتن های موجود در نمونه ها فراهم می کند که بســوی هم حرکت کرده و واکنش دهند(۲۰).

پــس بــا در نظر گرفتن موارد فوق و تحت شــرایط این تحقیق، می توان چنین نتیجه گیری کرد که قدرت آنتی ژنیســیته پروتواسکولکس از مایع کیست هیداتید بیشــتر بوده لذا پیشنهاد می شود در کارهای تحقیقاتی که حساسیت و ویژگی بالایی را می طلبد، نظیر واکسیناسیون و مطالعات مولکولی، از پروتواســکولکس های انگلی به عنوان پادگن اســتفاده گردد و پادتن بدســت آمده می تواند پس از تخلیص و کونژوگاســیون با آنزیم مناســب، در جهــت طراحی کیت های الایزای تشــخیصی ســریع مورد استفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

۱- اقلیــدی م. ا. (۱۳۷۶) بررســی توزیــع فراوانی کیســت هیداتید در دام های کشتارگاه اقلید در طول سال های ۷۵-۷۲. دومین کنگره سراسری بیماری های انگلی در ایران. تهران ۳۰-۲۷ مهر.

۲- نــژاد رحیم ر. قره باغی ن. سیســتانی زاده م. منتظــری و. میابی ز. (۱۳۸۴) بررســی مقایسه ای حساســیت آزمایش های ســرولوژیکی و روش های تصویر برداری در تشــخیص کیســت هیداتیک. مجله پزشــکی ارومیه، سال شانزدهم، شماره ۴، ص ۲۴۴-۲۴۱.

۳- اســلامی ع. (۱۳۶۹) اکینوکوکوزیس و هیداتیدوز در ایران، سمینار بازآموزی کیســت هیداتیک و بیماری های ناشی از آن، کاشــان، کتابچه خلاصه مقالات، ص ۸۱-۷۹.

۴- حاجیانــی ب. بررســی سرودیاگنوســتیک هیداتیدوز با اســتفاده از تســت ایمونوالکتروفــورز در بــز در ارومیــه، جهت دریافت درجه دکترای دامپزشــکی، دانشگاه ارومیه. شماره ثبت: ۳۶۲.

5- Douglas and Benett. S. (2005) Echinococcosis (*hydatid cyst disease*). In: Mandell, Editors. Principles and practice of Infectious diseases King C HChurchill Livingstone Press, Philadelphia. 6th Ed : 2963-2964.

6- Eckert Sd and Deplazes P.D. (2004) Epidemiological and clinical aspects of echinococcosis a zoonosis of increasing concern, Clin *Microbiol Rev*. 17(1): 107-135.

7- Dalimi, A. Motamedi, G. Hosseini M. (2002) Echinococcosis/ hydatidosis in western Iran. *Veterinary Parasitology*. 105(2): 161-71.

8- Soulsby EJL (1982) *Helminths/Arthropods and Protozoa of domensticated animals* Bailliere Tindall, London, pp:118-786.

9- Markell, E. K John, D. T Kvotoski W. A (1999) *Medical parasitology* W B Saunders Press, Philadelphia. 8th Ed, 253-260.

10- Sielaff T. Curty, S. A Dana K. (2005) *Schwartz's principles of Surge* McGraw-Hill Press, 8th Ed, 1159-1164.

11- MC Contreras, Gallo, S. Salinas, P. Sapunar, J. Sandoval, L. Solis F. (1994) Evaluation of ELISA IgG test using a purified in the diagnosis of human hydatidosis, *Bol Chil Parasitol*, 49(1-2): 24-30.

12- Kaur M. Mahajan RC. Malla N. (1999) Diagnosis accuracy of Rapid ELISA for human hydatidosis, *Ind J Med Res*, 110: 18-21.

13- Y Sbihi, Rmiqui A. (2001) Comparative sensitivity of six serologic tests and diagnostic value of ELISA using purified antigen in hydatidosis, *J Clin Lab Anal*, 15(1): 14-18.

14- Halliday, LC. Artwohl JE (2000) Physiologic and behavioral assessment of rabbits immunized with Freund's completed Adjuvant *Con Topics*, 39:8.

15- Stills, MQ (1991) Uses of Freund's complete Adjuvant HF Gnfg Bailey Lab Animal, 4: 25.

16- Alan J (1987) *Immunochemistry in practice*, TH Pobin Blackwell scientific publications, pp: 30-34 & 131-137.

17- Kagan, I. Norman L (1961) Antigenic analysis of Echinococcus antigens by agar Diffusion Techniques *Am J Trop Med Hyg*, 10: 727-734.

18- Musiani, P. Pianteli, M. Lauriola, L. Arru, E. Pozzvoli R. (1978) *Echinococcus granulosus*; specific quantification of the two most Immunoteactive antigens in hydatid fluids. *J Clin Path Bl*, pp: 475-478.

19- Hazrati KH. Tappeh, A. Vner, M. (1998) Ozced Application of the new methods in diagnosis of cystic Echinococcosis. IXth international congress of parasitology, Tokyo, Japan. pp: 24-28.

20- Verastegui, M. Moro, P. Guevara, A. Rodriguez, T. Miranda, E. and Gilman R.H. (1992) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. J Clin Microbiol June; 30(6): 1557–1561.

www.SID.ir