

سرواپیدمیولوژی هیداتیدوزیس انسانی در استان کردستان با روش ELISA در سال ۱۳۸۵

منصور حدادیان^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، عبدالحسین دلیمی اصل^۳، شهرلا رودبار محمدی^۴

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- استادیار، گروه قارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۱/۲۶
پذیرش مقاله: ۸۷/۶/۲۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی سرواپیدمیولوژیک کیست هیداتید انسانی، با روش الیزا در در استان کردستان است.
مواد و روش‌ها: با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی جسم نمونه ۱۹۷۹ نفر به دست آمد. روش کار بدین ترتیب بود که ابتدا از تمام افراد مورد مطالعه پس از تکمیل پرسشنامه، نمونه خون گرفته شد و سرم تمام افراد در رقت ۱:۴۰۰ با آزمون الیزا آزمایش شد.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد که از مجموع افراد مورد مطالعه، ۲۲ نفر (۱۲ درصد) با آزمون الیزا واکنش مثبت نشان دادند؛ از این افراد، ۱۰ نفر (۰/۹) از جمعیت شهری، ۱۲ نفر (۱/۴۲) از جمعیت روستایی بودند. همچنین ۱/۶۵ درصد زنان و ۰/۴۵ درصد مردان جمعیت تحت مطالعه با این روش مثبت بودند و بیشترین درصد آلوودگی در گروه سنی ۱۵-۵۹ (۱۵/۵۹) درصد مشاهده شد. براساس این مطالعه میان درصد آلوودگی به کیست هیداتید در میان زنان و مردان اختلاف معنی داری وجود داشت. همچنین اختلاف درصد آلوودگی گروه سنی سی تا چهل سال با گروههای سنی دیگر معنی دار بود. اما بین درصد آلوودگی به کیست هیداتید و جمعیت شهری و روستایی اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق بیشترین درصد آلوودگی در شهرستان دیواندره (۱/۶۹ درصد) به دست آمد. علت این اختلاف این است که بیشترین جمعیت روستایی استان که به امر کشاورزی و دامداری مشغول هستند در این شهرستان متقر کنند.

کلیدواژگان: کیست هیداتید، الیزا، سرواپیدمیولوژی، کردستان.

۱- مقدمه

ضمون گسترش جهانی، در بیشتر مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر دنیا انتشار دارد. آلوودگی در کشورهای حوزه مدیترانه، روسیه، خاورمیانه، خاور دور، استرالیا، زلاندنو، آمریکا و آفریقا وجود دارد [۶-۴]. این بیماری از تمام استان‌های کشور با بالاترین میزان آلوودگی در انسان (۴/۵ در صدهزار) از استان خراسان و

هیداتیدوزیس (Hydatidosis) یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است [۱]. این بیماری در بیشتر نقاط جهان به ویژه در کشورهایی که در آن‌ها دامپروری رایج است، شایع است. این امر سالیانه زیان‌های بهداشتی و اقتصادی زیادی را به دنبال می‌آورد [۲، ۳]. آلوودگی به این انگل

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱
Email:ghafarif@modares.ac.ir

زمان آزمایش در فریزر -20°C درجه سانتی گراد منجمد شد.

۲-۲- روشهنجام ELISA

پس از تهیه آتسی ژن نسبتاً خالص از آزمایشگاه گروه انگلشناسی که به صورت ذخیره موجود بود [۱۴] $100\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی ژنی که با غلظت $10\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر در میلی لیتر در بافر کربنات-بیکربنات ($1\text{ Molar and pH}=9/6$) تهیه، و به همه چاهکهای ظرف پلی استیرن (Polystyrene) اضافه و سپس ظرف به مدت یک شب در 4°C درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از شستشو $200\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر محلول مسدود کننده [باfer Tris Buffered Saline, Tween 20] (TBST) همراه با شیر خشک بدون چربی 1 Dr. C. به چاهکها اضافه و ظرف به مدت ۱ ساعت در 37°C درجه سانتی گراد انکوبه شد.

پس از شستشو، سرم با رقت $1:400$ به میزان $100\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۱ ساعت در 37°C درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از شستشو دوباره و اضافه کردن $100\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر آنتی هیومن IgG (Antihuman IgG) (Sigma) (Horseradish Peroxidase) (HRP) کثروگه با $1:6000$ رقت، به مدت ۲ ساعت در حرارت اتاق یا ۱ ساعت در 37°C درجه سانتی گراد انکوبه شد. مجدداً پس از شستشو $100\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر سوبسترای تترامیلن بنزیدین (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine: TMB) آنژن (با غلظت $1\text{ }\text{mg}/\text{ml}$ در میلی لیتر به هر چاهک اضافه و مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن $50\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر محلول متوقف کننده یعنی اسید سولفوریک $1/25$ مولار به هر چاهک اضافه شد. میزان جذب نوری (Optical Density: OD) در طول موج 450 nm با دستگاه سنجش الایزا (ELISA-Reader) خوانده شد [۱۵, ۱۶].

برای تعیین سطح حداقل (Cut off) در این تحقیق از تعداد 10 نمونه سرم افرادی استفاده شد که قطعاً فاقد بیماری کیست هیداتید بودند، برای این افراد آزمایش ELISA گذاشته شد سپس از میزان جذب این نمونه‌ها میانگین و انحراف معیار محاسبه شد؛ سپس میانگین به اضافه سه برابر انحراف معیار به عنوان سطح حداقل تعیین شد.

کمترین آن ($0/10$ در صدهزار) از استان هرمزگان گزارش شده است. برای کل کشور میزان متوسط موارد جراحی $1/2$ در صدهزار تعیین شده است [۵].

به علت پراکنده بودن اندامهای آلوده در بدن و نبودن یک راه تشخیص قطعی، روش‌های ایمونولوژیک در تشخیص بسیار مفید هستند [۹-۷]. مناسب‌ترین ایمونولوگیولین برای آشکارسازی بیماری هیداتیدوزیس IgG است زیرا سطح آن در خون حتی تا مدت‌ها پس از جراحی یا درمان دارویی بالا است [۱۰, ۹].

الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) یکی از روش‌های سرولولژیک برای تشخیص هیداتیدوزیس است که داشتن امتیازاتی مانند حساسیت و ویژگی بالا و قابلیت اجرا برای حجم زیادی از نمونه دریک زمان، آن را برای مطالعات سرواپیدمیولوژیک مناسب می‌کند [۱۱].

هدف از این مطالعه بررسی وضعیت آلودگی کیست هیداتید در انسان، در استان کردستان است. در این مطالعه از روش ELISA برای تعیین میزان آلودگی ساکنان استان کردستان در مناطق شهری و روستایی به کیست هیداتید استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مطالعه جمعیت‌شناسی و نحوه نمونه‌گیری

بر طبق آخرین سرشماری نفوس در سال 1375 و رشد جمعیت در سال 1382 جمعیت کل استان 1414339 نفر است که جمعیت شهری آن 748153 نفر و جمعیت روستایی آن 666186 نفر بود و با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه رفیعی (Rafieei) و همکاران در خوزستان در سال 1378 میزان شیوع $1/8$ درصد [۱۲] و افلاکی (Aflaki) و همکاران که میزان شیوع را $1/2$ درصد [۱۳] گزارش شده بود، حجم نمونه با استفاده از رابطه آماری و دقت 95 درصد، 1979 نمونه به دست آمد. سپس در هر منطقه متناسب با جمعیت نمونه گیری ابتدا به صورت خوش‌های و داخل هر خوش به صورت تصادفی ساده انجام شد. از افراد تحت مطالعه پس از تکمیل پرسشنامه خون گرفته شد و سرم افراد برای آزمایش ELISA جمع‌آوری و تا

۳- نتایج

جدول ۲ درصد آلودگی به کیست هیداتید در میان مردان و زنان استان کردستان به تفکیک جمعیت شهری و روستایی

				استان		
جمع کل	روستایی	شهری				
۱۷	۹	۸	+	زن*	مرد	
۱۰۳۲	۴۴۴	۵۸۸	-			
۱/۶۵	۲/۰۲	۱/۳۶	درصد			
۵	۳	۲	+			
۹۲۵	۴۰۰	۵۲۵	-	جمع کل		
۰/۴۵	۰/۵۷	۰/۳۸	درصد			
۲۲	۱۲	۱۰	+			
۱۹۵۷	۸۴۴	۱۱۱۳	-			
۱/۱۲	۱/۴۲	۰/۹	درصد			

* اختلاف آماری میان درصد ابتلا به کیست هیداتید در دو جنس با استفاده از آزمون مجذور کای (Chi-square) معنی دار است.

جدول ۳ درصد آلودگی به کیست هیداتید را در استان کردستان به تفکیک گروه سنی با آزمون ELISA نشان می دهد. کمترین درصد آلودگی در گروه سنی ۵۰-۴۰ سال (۰/۵۴) درصد و بیشترین درصد آلودگی در گروه سنی ۴۰-۳۰ سال (۱/۵۹) درصد مشاهده می شود.

جدول ۴ درصد آلودگی به کیست هیداتید در میان مردان و زنان استان کردستان به تفکیک گروه سنی

		جمع کل		مرد		زن		رده های سنی	
درصد	-	+	درصد	-	+	درصد	-	+	
۰/۹۶	۴۲۰	۴	۱	۲۰۰	۲	۰/۹	۲۲۰	۲	کمتر از ۲۰ سال
۱/۷۷	۴۶۵	۶	۰/۴۶	۲۱۶	۱	۱/۹۶	۲۴۹	۵	۲۰-۳۰
۱/۰۹	۴۹۵	۸	۰/۸۸	۲۲۵	۲	۲/۱۷	۲۷۰	۶	۳۰-۴۰
۰/۵۴	۳۷۰	۲	۰	۱۸۷	۰	۱/۰۸	۱۸۳	۲	۴۰-۵۰
۰/۹۹	۲۰۲	۲	۰	۸۳	۰	۱/۶۸	۱۱۷	۲	بیشتر از ۵۰ سال
۱/۱۲	۱۹۵۰	۲۲	۰/۵۴	۹۱۱	۵	۱/۶	۱۰۳۹	۱۷	جمع کل

* بین درصد آلودگی در گروه های سنی مختلف، اختلاف آماری معنی داری مشاهده شد.

۴- بحث

در حال حاضر هیداتیدوزیس یکی از مهمترین بیماری های انگلی دنیا به شمار می رود. این بیماری در هر پنج قاره با گستردگی قابل ملاحظه ای مشاهده می شود. خسارت های بهداشتی و اقتصادی

جدول ۱ درصد آلودگی به کیست هیداتید را با آزمون ELISA در شهرستان های استان کردستان به تفکیک جمعیت شهری و روستایی نشان می دهد. از مجموع ۱۹۷۹ نفری که با این آزمون آزمایش شدند، ۲۲ نفر (۱/۱۲ درصد) به این آزمون واکنش مثبت نشان دادند که ۱۰ نفر جمعیت شهری (۰/۹ درصد) و ۱۲ نفر جمعیت روستایی (۰/۴۲ درصد) بودند. بیشترین میزان آلودگی در شهرستان دیواندره (۱/۸ درصد) و کمترین میزان در شهرستان های سقز و سنتندج (۰/۷ درصد) مشاهده شد. از نظر آماری اختلاف معنی داری بین نتایج مشبّت و منفی در میان دو قشر شهری و روستایی مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱ درصد آلودگی به کیست هیداتید در شهرستان های استان کردستان به تفکیک جمعیت شهری و روستایی

شهر	وضعیت		شهري*		روستایي*		جمع کل		درصد
	-	+	-	+	-	+	-	+	
سنندج	۰/۷۶	۵۲۴	۴	۱/۷۲	۱۱۶	۲	۰/۴۹	۴۰۸	۲
مریوان	۱/۴۷	۲۶۹	۴	۱/۲۳	۱۶۲	۲	۱/۸۷	۱۰۷	۲
سقز	۰/۷	۲۸۷	۲	۰/۹۴	۱۰۶	۱	۰/۰۵	۱۸۱	۱
دیواندره	۱/۶۹	۱۱۸	۲	۱/۲۵	۸۰	۱	۲/۶۳	۳۸	۱
بانه	۱/۳	۱۵۴	۲	۱/۴۷	۶۸	۱	۱/۱۶	۸۶	۱
بیجار	۱/۳	۱۵۴	۲	۲/۴۵	۸۱	۲	۰	۷۳	۰
قروه	۱/۳۱	۳۰۵	۴	۱/۳۵	۱۴۸	۲	۱/۲۷	۱۵۷	۲
کامیاران	۱/۳۷	۱۴۶	۲	۱/۲	۸۳	۱	۱/۵۹	۶۳	۱
جمع کل	۱/۱۲	۱۹۵۷	۲۲	۱/۴۲	۸۴۴	۱۲	۰/۹	۱۱۱۳	۱۰

* اختلاف آلودگی درصد ابتلا به کیست هیداتید در میان جمعیت شهری و روستایی از نظر آماری معنی دار نیست.

جدول ۲، درصد آلودگی به کیست هیداتید در میان مردان و زنان استان کردستان را نشان می دهد. براساس این جدول ۱/۶ درصد از زنان و ۰/۵۳ درصد از مردان به این آزمون واکنش مثبت نشان داده اند که این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار بود ($p < 0.023$). این بدین معنی است که زن ها در این منطقه بیشتر در معرض آلودگی قرار دارند و آن هم به این دلیل است که اکثر زنان در این منطقه به شغل خانه داری و کارهای کشاورزی و دامپروری مشغول هستند.

گاو و گاو میش به ترتیب ۱۱/۱، ۶/۳، ۶/۴ و ۱۲/۴ درصد و در میزبان‌های نهایی، سگ، شغال طلایی، روباه قرمز و گرگ به ترتیب ۱۹/۱، ۲/۳، ۵ و ۰ درصد را در غرب کشور گزارش کرد، در همین مطالعه میزان سگ‌های آلوه در استان کردستان ۱۱/۴ درصد به دست آمده بود [۲۰].

در سال ۱۹۷۵ برای اولین بار توسط فاراگ (Farag) آزمون ELISA برای تشخیص کیست هیداتید به کار رفت. از خصوصیات حائز اهمیت این روش این است که از یک نوع آنتی‌بادی نشاندار می‌توان در بسیاری از آزمایش‌ها استفاده کرد. ELISA یک روش کمی است و OD حاصل از رنگ ایجاد شده پس از اضافه کردن سوبسترا با دستگاه قرائت‌گر نتایج، قابل اندازه‌گیری است [۲۱].

در سال ۱۹۹۸ ایبارا (Ibarra) و همکاران سه روش (Indirect-ELISA و DOT-ELISA و DIG-ELISA) ELISA از نظر حساسیت و ویژگی با هم مقایسه کردند. حساسیت و ویژگی را در Indirect-ELISA به ترتیب ۹۷/۵ درصد و ۹۸/۸ درصد، در DIG-ELISA ۹۷/۵ درصد و ۸۰ درصد و در DOT-ELISA ۹۳/۱ درصد و ۹۵/۴ درصد به دست آورdenد [۲۲].

یافته‌های این بررسی درصد نسبتاً بالای آلوهگی را در زنان نشان می‌دهد؛ این امر شاید به علت نداشتن آگاهی کافی و آموزش ناقص در شناخت چرخه زندگی انگل و همین‌طور پرداختن زنان به شغل خانه‌داری است که اکثریت زنان را شامل می‌شود.

براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق بیشترین درصد آلوهگی در شهرستان دیواندره (۱/۸ درصد) و کمترین درصد آلوهگی در شهرستان‌های سنتنج و سقز (۰/۷ درصد) گزارش شده است. علت این اختلاف این است که بیشترین جمعیت روستایی استان که به امر کشاورزی و دامداری مشغول هستند در شهرستان دیواندره متوجه است و کمترین جمعیت روستایی در شهرستان سقز و سنتنج قرار دارد.

ناشی از این بیماری در بیشتر نقاط دنیا به خصوص خاورمیانه، اروپا، چین و مرکزی، چین و آفریقا غیر قابل چشم‌پوشی است. در کشور ما نیز هیداتیدوزیس دامی و انسانی شیوع چشمگیری دارد. در این بیماری که انسان میزبان واسط است، تشخیص مراحل لاروی انگل اغلب با استفاده از روش‌های سرولوژیک امکان‌پذیر است.

تحقیق حاضر، اولین تحقیق سرواپیدمیولوژی بیماری کیست هیداتید انسانی در کل استان کردستان است. در سال ۱۳۸۴ اخلاقی (Akhlaghi) و همکاران در روستاهای شهرهای سنتنج و دیواندره، درصد آلوهگی به کیست هیداتید را به روش (Indirect Fluorescent Antibody) IFA ۳/۷ درصد ۹/۵ گزارش کرده بودند (در سنتنج ۳/۳ درصد و در دیواندره ۵۱/۹ درصد درصد) و همین‌طور درصد آلوهگی را در گوسفند ۵۱/۹ درصد و در گاو ۸/۲ درصد گزارش کرده‌اند [۱۷].

رفیعی و همکاران (۱۳۷۸) در یک بررسی، میزان شیوع کیست هیداتید انسانی را در استان خوزستان با روش ELISA ۱/۸ درصد گزارش کرده‌اند [۱۲].

کفashیان (Kaffashian) و همکاران (۱۳۷۵) در یک بررسی شیوع بیماری کیست هیداتید را در یک هزار نفر از عشایر کوچ رو ایل قشقایی فارس ۵ درصد گزارش کرده‌اند [۱۸].

سعید (Saeed) و همکاران (۱۹۹۰-۱۹۹۸) در یک مطالعه اپیدمیولوژیکی در استان اربیل کشور عراق، درصد آلوهگی را در انسان ۲ در صدهزار با توجه به جراحی‌های انجام شده، گزارش کرده‌اند. همین محقق آلوهگی در گوسفند را ۱۵ درصد، در گاو ۷/۲ درصد و در سگ ۴/۵ درصد گزارش کرده‌اند [۱۹].

افلاکی و همکاران (۱۳۸۱) در یک مطالعه اپیدمیولوژیکی در استان ایلام، میزان شیوع کیست هیداتید انسانی را ۱/۲ درصد گزارش کرده‌اند [۱۳].

در سال ۲۰۰۲ دلیمی (Dalimi) و همکاران در بررسی آلوهگی به کیست هیداتید در میزبان‌های واسط در گوسفند، بز،

۵- منابع

- [1] Thompson RCA. Biology and systematic of Echinococcosis. In: Echinococcus and hydatid disease, Thompson RCA(ed.), Lymbery AJ(ed.).

- Walingford, CBA International, 1995; p: 1-50.
[2] Schantz PM. Parasitic zoonoses in perspective. Int J Parasitol 1991; 21(2): 161-70.

- [3] Todorov T, Boeva V. Human Echinococcosis in Bulgaria: a comparative epidemiological analysis. *Bull World Health Organ* 1999; 77(2): 110-8.
- [4] Eslami A. Veterinary helminthology. Vol.2, Tehran, Tehran University press, 1374; p: 551-3. (Persian)
- [5] Mobedi I, Dalimi Asl A. Epidemiology of hydatid cyst in the world and Iran. Tehran, Katab azargan press, 1382; p: 138-44. (Persian)
- [6] Scantz PM, Chai J, Echert A, Craig PS. Epidemiology and control of hydatid disease. Thompson RCA(ed.), lymbery AY(ed.). Walingford, CBA International, UK, 1995; p.232-74
- [7] Heath DD. Immunology of Echinococcus infections. In: The biology of Echinococcus and hydatid disease. Thompson RCA(ed.), AJ Lymbery(ed.). CAB International, Wallingford, UK,1995; p. 183-232.
- [8] Cox FEG. Immunology in modern parasitology, 2nd ed. Cox F.E.G, editor. London: Blackwell, 1993.p.193-219.
- [9] Craig PS, Rogan MT, Allan JE. Hydatidosis and cysticercosis-larva cestodes. In: Medical parasitology, a practical approach. Gillespy SH, Hawkey PM(eds.). Oxford, IRL-Press, 1995; p: 209-36.
- [10] Rogan MT. Immunological analysis of parasite molecules. In: Analytical parasitology. Rogan MT (ed.). UK: Springer, 1996; p.320-91.
- [11] Simsek S, Koroglu E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid diseases in sheep. *Acta Trop* 2004; 92(1): 17-24.
- [12] Rafiei A, Craig PS, Maraghi SA. Seroepidemiological survey of human cysitic echinococcosis in Iran. XXth International Congress of Hydatidology, 2001; 193(8-9).
- [13] Aflaki A, Ghafarifar F, Dalimi Asl A. Seroepidemiological survey of human hydatidosis using Dot-ELISA in Ilam Province (Western part of Iran). *Modares J Med Sci* 2005; 8(1): 1-6. (Persian)
- [14] Ghafarifar F, Dalimi Asl A, Zavarzan Hosseini A. A simple method for preparation of hydatid cyst B-group antigen. *Modares J Med Sci* 2000-1; 3(2): 115-19. (Persian)
- [15] Crowther JR. ELISA Theory and practice. New Jersy, Human press, 1995; p:1-218.
- [16] Ghafarifar F, Dalimi Asl A, Jalosian F. Evaluation of DIG-ELISA for diagnosis of human hydatidosis. *Modares J Med Sci* 2001-2; 4(2): 137-55. (Persian)
- [17] Akhlaghi L, Massoud J, Housaini A. Observation on Hydatid Cyst Infection in Kordestan Province (West of Iran) using Epidemiological and Seroepidemiological Criteria. *Iranian J Publ Health* 2005; 34(4): 73-5.
- [18] kaffashian F, hayati A, Saber Firouzi M, Ghaderi A. Survey of hydatidosis prevalence in migratory tribes of ghashghaei. National congress of zoonoses in Iran, The third, 1375; p: 249-87. (Persian)
- [19] Saeed I, Kapel C, Saida LA, Willingham L, Nansen P. Epidemiology of Echinococcus granulosus in Arbil province, northern Iraq, 1990-1998. *J Helminthol* 2000; 74(1): 83-8.
- [20] Dalimi A, Motamed G, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, Ghaffari Far F. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasito* 2002; 105(2): 161-71.
- [21] Farag H, Bout D, Capron A. Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay

- (E.L.I.S.A.). Biomedicine 1975; 23(7): 276-8.
- [22] Ibarra F, Montenegro N, Vera Y, Boulard C, Quiroz H, Flores J, Ochoa P. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fascioliosis. Vet Parasitol 1998; 77(4): 229-36.