

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

منصور حدادیان^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، عبدالحسین دلیمی اصل^۳، شهلا رودبارمحمدی^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 فارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۶/۲۳

دریافت مقاله: ۸۷/۱/۲۶

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی سرواپیدمیولوژیک کیست هیداتید انسانی، با روش الایزا در استان کردستان است. **مواد و روش‌ها:** با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی حجم 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 الایزا آزمایش شد.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد که از مجموع افراد مورد مطالعه، ۲۲ نفر (۱/۱۲ درصد) با آزمون الایزا واکنش مثبت نشان دادند؛ از این افراد، ۱۰ نفر (۰/۹ درصد) از جمعیت شهری، ۱۲ نفر (۱/۴۲ درصد) 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 آلودگی در گروه سنی ۴۰-۳۰ (۱/۵۹ درصد) مشاهده شد. براساس این مطالعه میان درصد آلودگی به کیست هیداتید در میان زنان و مردان اختلاف معنی داری وجود داشت. همچنین اختلاف درصد آلودگی گروه سنی سی تا چهل سال با گروه‌های سنی دیگر معنی دار بود. اما بین درصد آلودگی به کیست هیداتید و جمعیت شهری و روستایی اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق بیشترین درصد آلودگی 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 متمرکزند.

کلیدواژگان: کیست هیداتید، الایزا، سرواپیدمیولوژی، کردستان.

۱- مقدمه

ضمن گسترش جهانی، در بیشتر مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر دنیا انتشار دارد. آلودگی در کشورهای حوزه مدیترانه، روسیه، خاورمیانه، خاور دور، استرالیا، زلاندنو، آمریکا و آفریقا وجود دارد [۴-۶]. این بیماری از تمام استان‌های کشور با بالاترین میزان آلودگی 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]. آلودگی به این انگل

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵

Email: ghafarif@modares.ac.ir

زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد.

۲-۲- روش انجام ELISA

پس از تهیه آنتی‌ژن نسبتاً خالص از آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی که به صورت ذخیره موجود بود [۱۴] ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی‌ژنی که با غلظت ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر در بافر کربنات-بی‌کربنات (۱ مولار و pH=۹/۶) تهیه، و به همه چاهک‌های ظرف پلی‌استیرنی (Polystyrene) اضافه و سپس ظرف به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو ۲۰۰ میکرولیتر محلول مسدود کننده [بافر (Tris Buffered Saline, Tween 20) TBST] همراه با شیر خشک بدون چربی ۱ درصد] به چاهک‌ها اضافه و ظرف به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

پس از شستشو، سرم با رقت ۱:۴۰۰ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشو دوباره و اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌هیومن IgG (Antihuman) کنژوگه با HRP (Horseradish Peroxidase) (Sigma) با رقت ۱:۶۰۰۰، به مدت ۲ ساعت در حرارت اتاق یا ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مجدداً پس از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای تترامیلین بنزیدین (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine: TMB) (شرکت آنوژن) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده یعنی اسید سولفوریک ۱/۲۵ مولار به هر چاهک اضافه شد. میزان جذب نوری (Optical Density: OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه سنجش الایزا (ELISA-Reader) خوانده شد [۱۶،۱۵،۱۱].

برای تعیین سطح حداقل (Cut off) در این تحقیق از تعداد ۱۰ 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 (۰/۱ در صدهزار) از استان هرمزگان گزارش شده است. برای کل کشور میزان متوسط موارد جراحی ۱/۲ 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 [۷-۹]. مناسب‌ترین ایمونوگلوبولین 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 سرولوژیک برای تشخیص هیداتیدوزیس است که داشتن امتیازاتی مانند حساسیت و ویژگی بالا و قابلیت اجرا برای حجم زیادی از نمونه در یک زمان، آن را برای مطالعات سروایدمیولوژیک 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 ۱۳۷۵ و رشد جمعیت در سال ۱۳۸۲ جمعیت کل استان ۱۴۱۴۳۳۹ نفر است که جمعیت شهری آن ۷۴۸۱۵۳ نفر و جمعیت روستایی آن ۶۶۶۱۸۶ نفر بود و با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه رفیعی (Rafiei) و همکاران در خوزستان در سال ۱۳۷۸ میزان شیوع ۱/۸ درصد [۱۲] و افلاکی (Aflaki) و همکاران که میزان شیوع را ۱/۲ درصد [۱۳] گزارش شده بود، حجم نمونه با استفاده از رابطه آماری و دقت ۹۵ درصد، نمونه به‌دست آمد. سپس در هر منطقه متناسب با جمعیت نمونه‌گیری ابتدا به صورت خوشه‌ای و داخل هر خوشه 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	شهری	روستایی	جمع کل	
			+	-
زن*	۸	۹	۱۷	+
	۵۸۸	۴۴۴	۱۰۳۲	-
	۱/۳۶	۲/۰۲	۱/۶۵	درصد
مرد	۲	۳	۵	+
	۵۲۵	۴۰۰	۹۲۵	-
	۰/۳۸	۰/۵۷	۰/۴۵	درصد
جمع کل	۱۰	۱۲	۲۲	+
	۱۱۱۳	۸۴۴	۱۹۵۷	-
	۰/۹	۱/۴۲	۱/۱۲	درصد

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

جدول ۱ درصد آلودگی به کیست هیداتید را با آزمون ELISA در شهرستان‌های استان کردستان به تفکیک جمعیت شهری و روستایی نشان می‌دهد. 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 (۱/۴۲ درصد) بودند. بیشترین میزان آلودگی در شهرستان دیواندره (۱/۸ درصد) و کمترین میزان در شهرستان‌های سقز و سنندج (۰/۷ درصد) مشاهده شد. از نظر آماری اختلاف معنی داری بین نتایج مثبت و منفی در میان دو قشر شهری و روستایی مشاهده نشد (جدول ۱).

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

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

وضعیت شهر	شهری*			روستایی*			جمع کل		
	+	-	درصد	+	-	درصد	+	-	درصد
سنندج	۲	۴۰۸	۰/۴۹	۲	۱۱۶	۱/۷۲	۴	۵۲۴	۰/۷۶
مریوان	۲	۱۰۷	۱/۸۷	۲	۱۶۲	۱/۲۳	۴	۲۶۹	۱/۴۷
سقز	۱	۱۸۱	۰/۵۵	۱	۱۰۶	۰/۹۴	۲	۲۸۷	۰/۷
دیواندره	۱	۳۸	۲/۶۳	۱	۸۰	۱/۲۵	۲	۱۱۸	۱/۶۹
بانه	۱	۸۶	۱/۱۶	۱	۶۸	۱/۴۷	۲	۱۵۴	۱/۳
بیجار	۰	۷۳	۰	۲	۸۱	۲/۴۵	۲	۱۵۴	۱/۳
قروه	۲	۱۵۷	۱/۲۷	۲	۱۴۸	۱/۳۵	۴	۳۰۵	۱/۳۱
کامیاران	۱	۶۳	۱/۵۹	۱	۸۳	۱/۲	۲	۱۴۶	۱/۳۷
جمع کل	۱۰	۱۱۱۳	۰/۹	۱۲	۸۴۴	۱/۴۲	۲۲	۱۹۵۷	۱/۱۲

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

جدول ۳ درصد آلودگی به کیست هیداتید در میان مردان و زنان استان کردستان به تفکیک گروه سنی

رده‌های سنی	زن			مرد			جمع کل		
	+	-	درصد	+	-	درصد	+	-	درصد
کمتر از ۲۰ سال	۲	۲۲۰	۰/۹	۲	۲۰۰	۱	۴	۴۲۰	۰/۹۴
۲۰-۳۰ سال	۵	۲۴۹	۱/۹۶	۱	۲۱۶	۰/۴۶	۶	۴۶۵	۱/۲۷
۳۰-۴۰ سال*	۶	۲۷۰	۲/۱۷	۲	۲۲۵	۰/۸۸	۸	۴۹۵	۱/۵۹
۴۰-۵۰ سال	۲	۱۸۳	۱/۰۸	۰	۱۸۷	۰	۲	۳۷۰	۰/۵۴
بیشتر از ۵۰ سال	۲	۱۱۷	۱/۶۸	۰	۸۳	۰	۲	۲۰۲	۰/۹۹
جمع کل	۱۷	۱۰۳۹	۱/۶	۵	۹۱۱	۰/۵۴	۲۲	۱۹۵۰	۱/۱۲

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

جدول ۲، درصد آلودگی به کیست هیداتید در میان مردان و زنان استان کردستان را نشان می‌دهد. براساس این جدول ۱/۶ درصد از زنان و ۰/۵۳ درصد از مردان به این آزمون واکنش مثبت نشان داده‌اند که این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار بود ($p < 0/023$). این بدین معنی است که زنان در این منطقه بیشتر در معرض آلودگی قرار دارند و آن هم به این دلیل است که اکثر زنان در این منطقه به شغل خانه‌داری و کارهای کشاورزی و دامپروری مشغول هستند.

۴- بحث

در حال حاضر هیداتیدوزیس یکی از مهمترین بیماری‌های انگلی دنیا به شمار می‌رود. این بیماری در هر پنج قاره با گستردگی قابل ملاحظه‌ای مشاهده می‌شود. خسارت‌های بهداشتی و اقتصادی

گاو و گاو میش به ترتیب ۱۱/۱، ۶/۳، ۱۶/۴ 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 آلوده 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 حایز 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 ELISA (Indirect-ELISA و DOT-ELISA, DIG-ELISA) را از نظر حساسیت و ویژگی با هم مقایسه کردند. حساسیت و ویژگی را در Indirect-ELISA به ترتیب ۹۶/۵ درصد و ۹۸/۸ درصد، در DIG-ELISA DOT-ELISA ۹۷/۵ درصد و ۸۰ درصد و در ۹۳/۱ درصد و ۹۵/۴ درصد به دست آوردند [۲۲].

یافته‌های این بررسی درصد نسبتاً بالای آلودگی 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 می‌کند.

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق بیشترین درصد آلودگی در شهرستان دیواندره (۱/۸ درصد) و کمترین درصد آلودگی در شهرستان‌های سنندج 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 متمرکز است و کمترین جمعیت روستایی در شهرستان سقز و سنندج قرار دارد.

ناشی از این بیماری در بیشتر نقاط دنیا به خصوص خاورمیانه، اروپای جنوبی 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 سنندج و دیواندره، درصد آلودگی به کیست هیداتید را به روش IFA (Indirect Fluorescent Antibody) ۳/۷ درصد گزارش کرده بودند (در سنندج ۳/۳ درصد و در دیواندره ۹/۵ درصد) و همین‌طور درصد آلودگی 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 کردند [۱۲].

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

سعید (Saeed) و همکاران (۱۹۹۸-۱۹۹۰) در یک مطالعه اپیدمیولوژیکی در استان اربیل کشور عراق، درصد آلودگی را در انسان ۲ در صدهزار با توجه به جراحی‌های انجام شده، گزارش کرده‌اند. همین محقق آلودگی در گوسفند را ۱۵ درصد، در گاو ۶/۲ درصد و در سگ ۴۹/۵ 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 آلودگی به کیست هیداتید در میزبان‌های واسط در گوسفند، بز،

۵- منابع

[1] Thompson RCA. Biology and systematic of Echinococcus. 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, Ketab 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.). Wallingford, 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 cystic 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, Zavaran 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 Jersey, 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 hudatidosis prevalence in migrotory tribes of ghashghaei. *Natiional congress of zooneous 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, Motamedi 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.