

## HİDATİK ANTİJENLER

## Hydatid Antigens

Süleyman YAZAR<sup>1</sup>, Nazmiye ALTINTAŞ<sup>2</sup>, İzzet ŞAHİN<sup>3</sup>

**Özet:** Karnivorların ince barsağında bulunan *Echinococcus* ların özellikle larval evreleri (metasestod) hakkındaki ilk bilgiler Hippocrate (MÖ 460-347) zamanına dayanmaktadır. Özellikle serolojik tanıya kullanılmak üzere protoskoleksler, kist sıvısı ve kist membranları gibi parazitin değişik yapılarının antijenik özellikleri üzerine karşılaştırmalı olarak araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmada; tanı, tedavi ve prognoz izlenmesinde ve aşı çalışmalarında temel oluşturan hidatik antijenler literatür ışığında gözden geçirilmiş, söz konusu çalışmalarda kullanılmak üzere daha fonksiyonel antijenlerin belirlenmesi gerekliliği vurgulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antijenler, Ekinokokkozis

**Abstract:** The first information about larval stage of *Echinococcus* sp. (metacestode) which lives in the small intestine of carnivorous animals dates back to Hippocrates era (BC 460-347). Comparative studies have been made on the antigenic properties of different structures of parasites including protoscolex, hydatid fluid and cyst membrane for serologic diagnosis. In this study, the hydatid antigens used for diagnosis, treatment and vaccination purposes are reviewed.

**Key Words:** Antigens, Echinococcosis

Bu güne kadar taksonomik olarak doğrulanmış dört *Echinococcus* türünün (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus*, *E. vogeli*) olduğu kabul edilmiş, beşinci tür olarak ileri sürülen *E. cruzi*'nin *E. oligarthrus* ile aynı olduğu gösterilmiştir (1).

İnsanda en sık hastalık yapan iki tür *E. granulosus* ve *E. multilocularis* olup, *E. granulosus*'un oluşturduğu hastalığa Cystic Echinococcosis (CE), *E. multilocularis*'in oluşturduğu hastalığa ise Alveolar Echinococcosis (AE) adı verilmektedir.

CE, karnivorların ince barsağında bulunan *E. granulosus*'un larval (metasestod) formunun neden olduğu zoonotik bir enfeksiyondur. Karnivorların

dışkılarıyla atılan *E. granulosus* yumurtaları insanlarda ve doğal ara konak olan koyun, keçi, sığır gibi değişik türden hayvanlarda enfeksiyona sebep olmaktadır. Hastalık başta karaciğer olmak üzere, akciğer, böbrek, dalak, beyin, kemik, kalp gibi hemen her organa yerleşmektedir (2).

Günümüzde enfeksiyonun tanısında kullanılan serolojik tanı yöntemlerinde parazitin değişik evrim şekillerinin farklı yapılarına ait antijenler kullanılmaktadır (2).

*E. granulosus*'un değişik hayat evrelerindeki antijenlerde farklılıkların olduğu bildirilmiştir (3). *E. granulosus* ve *E. multilocularis* ekstraksiyonu ile elde edilen tüm vücut antijenlerinin incelenmesinde, erişkin parazit antijenlerinin özelliklerinin kist sıvısında, protoskolekslerde hatta kist membranlarında bile bulunmadığı belirlenmiştir (4). Metasestod formun antijenleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaktadır. Protoskoleksler, kist sıvısı ve kist membranları serolojik tanı yöntemlerinde antijen kaynağı olarak

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi 38039 KAYSERİ  
Parazitoloji. Öğr.Gör.Dr.<sup>1</sup>, Prof.Dr.<sup>3</sup>  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İZMİR  
Parazitoloji. Prof.Dr.<sup>2</sup>

Geliş tarihi: 3 Nisan 1999

eskiden beri kullanılmıŒı ve bunların antijenik özellikleri üzerine karşılaŒtırmalı olarak araŒtırmalar yapılmıŒtır. Bu materyallerin hepsinin multiple antijenik bileŒimler içerdėđi, antijenik bileŒimlerden bazılarının antijen kaynaklarının hepsinde bulunmasına rağmen, bazılarının ise bir kısım yapılara özgül olduğu gösterilmiŒtir (5-12).

Birçok antijen *Echinococcus* türleri için spesifik değildir. Bazı *Echinococcus* antijenlerinin sadece diğer sestod enfeksiyonlarında değil, aynı zamanda trematod ve nematod enfeksiyonlarında da çapraz reaksiyon verdikleri gösterilmiŒtir(5,13,14). Diğer paraziter hastalıklarla çapraz reaksiyon veren bu ortak antijenler, CE'in tanısında spesifitenin düşmesinden sorumludurlar. Spesifitenin düşmesine neden olan laminar membran, kist sıvısı ve protoskoleks'lerde bulunduğu belirlenen nonspesifik antijenlerden bir diğeri de P1 kan grubu aktivitesidir. Bu nedenle CE'li hastalar yüksek P1 aktivitesine sahiptirler. Fakat diğer bazı paraziter hastalıklarda da bu aktivite olduğundan tanıda çapraz reaksiyon verebilmektedir (15). Ayrıca bazı malign tümörlerde de yüksek anti-P1 aktivitesi yine çapraz reaksiyon sorumlusu olarak kabul edilmektedir (16,17). Kagan, kist hidatik sıvısında bulunan insan protein componentleriyle reaksiyona giren otoantikörlerin da yalancı pozitifliklere neden olduğunu bildirmiŒtir (18).

CE tanısında en çok kullanılan antijen kist sıvısıdır. Kist sıvısının bir antijen karıŒımı olduğđ, birden çok protein ve karbonhidrat fraksiyonu içerdėđi, bu fraksiyonların da protein ve karbonhidrat metabolizması sonucu oluştuğları belirlenmiŒtir. Değişik ara konaklardan elde edilen kist sıvılarının antijenik özelliklerinin de farklı olduğđ, fertil olmayan kist sıvılarında antijenik aktivitenin yetersiz kalabileceği, kist dokularına ait ekstraktan elde edilen antijenin daha duyarlı olduğđ bildirilmiŒtir (14). Yaşarol (18) yaptığı bir çalışmada, insan, koyun ve sığır karaciğer kist sıvılarının kimyasal, biyokimyasal ve fizyopatolojik analizlerini yapmıŒ ve yoğunluk ile pH değerlerinin birbirine çok yakın olduğunu fakat Œeker ve albumin değerlerinde az da olsa farklılıklar bulunduğunu belirtmiŒtir.

CE'in serolojik tanısında antijen kaynağı olarak kullanılan koyun hidatik kist sıvısı antijenik yönden oldukça zengin bir yapıya sahiptir. Immundiffüzyon ve immunelektroforez ile yapılan çalışmalarda, hidatik sıvı içinde, parazitin kendisine ait antijenik componentleri çok az oranda içerdėđi, kistin bulunduğu konak antijenlerin proteinlerinin ise daha fazla oranda bulunduğu ortaya çıkarılmıŒtır (9,19). Immunelektroforez ile parazit orijinli en az 10 antijen belirlenmiŒtir (5,20,21,22). CE'de kist duvar yapıları globulinlerin geçiŒini engelleyemediği için konak globulinleri kist içine girebilmektedir. Kist sıvısı içerisinde bulunan bu globulinlerin, konakta yeterli düzeyde antikor oluşmasına engel olup, kistin uzun süre canlı kalmasında etkili oldukları düşünölmüŒtür (23-25).

Kagan ve Norman (26,27), agar-jel diffüzyon yöntemiyle yaptıkları çalışmalarda hidatik sıvının antijen olarak kullanılması ile 23 presipitasyon çizgisi elde edildiğini, bunlardan dördünün parazit kaynaklı, altısının kistin bulunduğu konak kaynaklı ve 13'ünün de kaynağı belirlenememiŒ componentler olduğunu tanımlamıŒlardır. Gel-diffüzyon yöntemi ile koyun hidatik sıvı antijeninde 10 componentten üçünün parazit kaynaklı olduğđ (28); bir başka çalışmada aynı antijenin immunelektroforetik analizini yapan Chordi ve Kagan ise absorpsiyon metodu ile 19 componentten 10'unun koyun konak serum proteinleri olduklarını bildirmişlerdir (22). Pozzuoli ve arkadaşları (29), koyun hidatik sıvısını polimerize koyun serumu ile absorbe ettikten sonra tavşanlara vererek bađışıklamıŒlar ve tavşan serumlarını kullanarak hidatik sıvıdan immunelektroforez yöntemi ile beŒ antijenik fraksiyon ayırt ettiklerini bildirmişlerdir.

Antijenlerin bir kısmının diğer helmintlerde de bulunması ve kist sıvısında konak antijenlerinin bulunması nedeniyle tüm kist sıvısının kullanıldığı serolojik tanı yöntemlerinde spesifikliğin düştüğü bilinmektedir. Bunun önüne geçebilmek için de antijeni saflaŒtırdıktan sonra kullanmak gerekmektedir. Hidatik antijenlerin çoğunun yapısı ve spesifikliği tam olarak açıklanamamıŒtır (30,31). İki tanesi saflaŒtırılmıŒ ve kimyasal özellikleri

üzerinde çalışılmıştır. Bunlardan biri ısıya dayanıksız bir lipoprotein olan antijen 5, diğeri ise ısıya dayanıklı, yine bir lipoprotein olan antijen B'dir (20,32).

Pozzuoli ve arkadaşları (33), kist sıvısı antijenlerini kromatografi ile ayırmışlar ve Chordi ile Kagan gibi antijen-4 ve 5 olarak tanımladıkları iki major antijen tespit ettiklerini, bu antijenlerin Oriol ve arkadaşları tarafından bulunan antijen-A ve antijen-B ile aynı kromatografik özellikleri gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Antijen 5: İlk kez Capron ve arkadaşları tarafından immunoelektroforez ile at kist sıvısından izole edilmiş ve CE tanısındaki değeri üzerinde durulmuştur. Antijen 5 çimlenme zarında, protoskolekslerin parankiminde ve çıkartı sisteminde bulunur. "Arc 5" adı da verilen bu antijenin tanıdaki önemi birçok araştırmacı tarafından vurgulanmışsa da *E.multilocularis* ve *E.vogeli* ile enfekte hasta serumlarında bu antijene karşı antikor geliştiği, *Taenia hydatigena*'nın sistiserkus sıvıları içinde de bu antijenin bulunduğu saptanmıştır (12, 34-41).

Antijen 5'in *E.granulosus*'dan başka *E.multilocularis* ve *T. hidatigena* kist sıvısı içinde de saptanabildiği, IE ile yapılan çalışmalarda multiple miyeloma ve cysticercosis olgularında çapraz reaksiyonlar elde edilebildiği de bildirilmiştir (37).

Bout ve arkadaşları (42), yaptıkları çalışmada Antijen 5'in ısıya dayanıklı ve yaklaşık 60.000 dalton molekül ağırlığına sahip lipoprotein yapıda bir molekül olduğunu bildirmelerine rağmen, moleküler ağırlığının kullanılan saflaştırma yöntemine bağlı olarak 60.000-400.000 dalton arasında değişebileceği ve polimerik yapıya sahip olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Antijen 5'in Oriol ve arkadaşlarının tanımladığı Antijen A ve diğer bazı araştırmacıların tanımladığı Antijen 4 ile benzer hatta aynı olabileceği de ileri sürülmektedir (33,43,44).

Dottorini ve Tossi (7), yaptıkları kromatografik analizlerde: antijen 5'in moleküler ağırlığının 100-

300 kDa. olduğunu, 560C ye kadar ısıya dayanabildiğini, pH 4-7 arasında çalışabildiğini hatta IHA testinde eritrositlere tutunabildiğini saptamışlardır.

Antijen B: İlk kez Oriol ve arkadaşları tarafından tanımlanan antijen B, 100 °C de 15 dakika ısıtmaya dayanıklı bir lipoproteindir. Bu antijen kist sıvısı kaynatıldıktan sonra antijenik özelliğini koruyan en önemli antijenik bileşimdir. Moleküler ağırlığı 120.000 dalton civarında olduğu tahmin edilen antijen B üç ayrı komponentten oluşmuştur ve kist sıvısında çok daha immunojenik ve spesifik olan antijen 5'e oranla 10 kat daha yoğun olarak bulunmaktadır (45).

Yapılan bir çalışmada CE'li farklı konaklardan alınan kist sıvısının antijen konsantrasyonları karşılaştırılmış, insan ve koyun kistlerinde sığır ve domuz kistlerine, karaciğer kistlerinde ise akciğer kistlerine oranla daha fazla antijenik protein olduğu, ayrıca en yüksek antijen konsantrasyonuna koyun karaciğer kistlerinin sahip olduğu saptanmıştır (45). Kagan ve arkadaşlarının (26) yaptığı bir araştırmaya göre protoskoleksler, kist membranları ve kist sıvısı serolojik testler için antijenik özellikleri bakımından denenmiş ve kist sıvısının serolojik testler için en uygun antijenik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Verastegui ve arkadaşları (46) tarafından CE'li hasta serumlarında Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) ile 8,16,21 kDa antijen bandlarının tanısız değer taşıdığı bildirilmiştir. Bir veya daha fazla bandın varlığında sensitivitenin %65 ve spesifitenin %100 olduğu, 41 (% 58) serum örneğinde üç bandın birden görüldüğü, 8 kDa bandının pulmoner kistli hastalarda en fazla rastlanan band olduğu fakat bu bandın cysticercosisli hasta serumları ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır. 16 kDa ve 21 kDa bandlarının hepatik kistli hastalarda daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Leggatt ve arkadaşlarının (47) çalışmasında 38 kDa componentin sadece diğer sestod, nematod ve trematod'lara karşı oluşmuş antikorlarla değil, normal kontrol serumlarıyla da çapraz reaksiyon

verdiği bildirilmiştir. Bu geniş reaktivitenin Shepherd ve McManus (31) tarafından tanımlandığı ve Lightowers ve arkadaşları (48) tarafından da onaylandığı gibi, antijenin fosforilkolin (PC) epitopuna bağlı gelişmiş olabileceği düşünülmektedir.

Kanwar ve arkadaşları (49), cerrahi olarak kanıtlanmış 20 CE'li insan serumu ile yaptıkları Western blot analizinde 16, 24, 38, 45 ve 58 kDa polipeptidlerinin bütün serumlarda reaksiyon verdiği gibi başka enfeksiyonu olanların serumlarının da birçoğu ile reaksiyon verdiklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 8 ve 116 kDa polipeptidlerinin bütün CE'li serumlarla reaksiyon vermesine rağmen, diğer parazitik enfeksiyonluların, viral hepatitlilerin veya sağlıklı insanların serumu ile reaksiyon vermediği ve CE tanısında 8 ve 116 kDa antijenlerine karşı oluşan antikorların belirlenmesinin tek spesifik onaylayıcı yöntem olduğu, spesifite ve sensitivitenin %100 olduğu belirtilmiştir.

Shambesh ve arkadaşları (50), 1995 yılında Libya'da yaptıkları çalışmada deve, at, koyun, insan hidatik kist sıvılarında 100 kDa ve 130 kDa'luk antijenlerin varlığını, fakat sadece deve ve at orijinli olanların kuvvetli antijenik yapıya sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu moleküllerin büyük olasılıkla Shapiro ve arkadaşlarının (51) koyun hidatik kist sıvısında tanımladıkları 110-120 kDa, 150 kDa antijenleri ile Kanwar ve arkadaşlarının (49) koyun, keçi, domuz ve insan kist sıvılarında tanımladıkları 116 kDa'luk antijenlerle aynı olduğunu bildirmişlerdir.

Yazar, Sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel elektroforesis (SDS-PAGE) ile yapmış olduğu bir çalışmada koyun kist sıvısında 12, 38, 116 kDa molekül ağırlığındaki antijenleri saptamış ve western blot ile devam ettirdiği çalışmada CE olduğu operasyonla kanıtlanmış 150 hastanın %86.0'sinin 12 kDa, %42.7'sinin 38 kDa, %96.0'ının ise 116 kDa antijenine karşı reaksiyon verdiğini saptamıştır (2).

Gerek CE gerekse AE'in serolojik tanısının daha

spesifik ve sensitif yöntemlerle yapılabilmesi, tedavi ve prognozunun daha sağlıklı bir şekilde izlenebilmesi ve bu alanda sürdürülen aşı çalışmalarından daha olumlu sonuçların alınabilmesi için SDS-PAGE, monoklonal antikor tekniği ve rekombinant DNA teknikleri gibi ileri tekniklerin de kullanımı ile daha fonksiyonel antijenlerin belirlenmesi gerekliliğine inanmaktayız.

## KAYNAKLAR

1. Rausch RL, D'Alessandro A, Ohbayashi M. The taxonomic status of *Echinococcus cruzi* Brumpt and Joyeux, 1924 (Cestoda: Taenidea) from an agouti (Rodentia: Dasyproctidae) in Brazil. *J Parasitol* 1984; 70: 295-302.
2. Yazar S. Cystic Echinococcosis (CE)'in tanısında SDS-PAGE ve Western Blot yönteminin diğer serolojik tanı yöntemleri ile karşılaştırılması. (Doktora tezi), Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı 1998, İzmir.
3. Todoroff T, Dimitroff A, Christoff L. Immunantwort bei der kinder-echinococose. *Medizin Monatsschrift* 1976; 30: 59-63.
4. Kagan IG, Norman L, Allain DS. Studies on echinococcosis: Serology of crude and fractionated antigens prepared from *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*. *Am J Trop Med Hyg* 1960; 9: 248-261.
5. Biguet J, Capron A, Tran VKP, d'Haussy R. Etude immunoelectrophoretique comparee des antigenes de divers helminths. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 1962; 254: 3600-3602.
6. Dottorini S, Tossi C. E. *granulosus*: Comparison between antigens in scolices and hydatid fluid. *Int J Parasitol* 1978; 8: 259-265.
7. Dottorini S, Tossi C. E. *granulosus*: Characterization of the main antigenic component (Arc 5) of hydatid fluid. *Exp Parasitol* 1977; 43: 307-314.
8. Eckert J, Gemmell MA, Matyas Z, Soulsby E.J.L. Guidelines for surveillance, prevention and control of Echinococcosis. WHO. VPH/81 1984; 28.

9. Kagan IG. Serodiagnosis of hydatid disease. *Immunology of parasitic infections*. Blackwell scientific publ. 1976; pp 130-142.
10. Kagan IG, Agosin M. Echinococcus antigens. *Bull WHO* 1968; 39: 13-24.
11. Rombert PC, de Azevedo JF. Estudo comparativo de varios antigenos hidaticos. *Anios de Instituto de Higiene e Medicina Tropical* 1975; 2: 273-279.
12. Varela-Diaz VM, Coltorti EA, Rickard MD, Torres JM. Comparative antigenic characterization of *E. granulosus* and *Taenia hydatigena* cyst fluids by immunoelectrophoresis. *Research in Veterinary Science* 1977; 23: 213-216.
13. Benex J. Communautés antigeniques entre *T. saginata* et *E. granulosus*. *Bull Soc Path Exot* 1972; 65: 563-569.
14. Vural S. Hidatik kist, *T. saginata* ve *H. nana* arasındaki antijenik münasebetler. 17. Milli Türk Tıp Kongresi 1964; ss 51-59.
15. Ben Ismail R, Carme B, Niel G, Gentilini M. Non-specific serological reactions with *Echinococcus granulosus* antigens: Role of anti-P1 antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 26: 239-245.
16. Kilejian A, Sauer K, Schawe CW. Host-parasite relationships in Echinococcosis. VIII. Infrared spectra and chemical composition of the hydatid cyst. *Exp Parasitol* 1962; 12: 377-392.
17. Russi S, Siracusano A, Vicari G. Isolation and characterization of a blood P1 active carbohydrate antigen of *E. granulosus* cyst membrane. *J Immunol* 1974; 112: 1061-1069.
18. Ya'arol A. Kist hidatik sıvısının fiziko-şimik analizi. *Vet Araş Der* 1961; 4: 1-8.
19. Kagan IG. A review of Serological tests for the Diagnosis of Hydatid Disease. *Bull WHO* 1968; 39: 25-37.
20. Capron A, Vernes A, Biguet J. Le diagnostic immunoelectrophoretique de l'hydatidose. In : Coudert J (ed) *Le kyste hydatique du foie*. *J Lyonnaises d'Hydatidologie SIMEP Lyon* 1967; 27-40.
21. Castagnari L, Pozzuoli R. Studio elettroforetico e immunoelettroforetico del liquido idatideo. *Annali Sclavo* 1969; 11: 99-107.
22. Chordi A, Kagan IG. Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. *J Parasitol* 1965; 51: 63-71.
23. Coltorti EA, Varela-Diaz VM. IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *J Parasitol* 1972; 58: 753-756.
24. Varela-Diaz VM, Coltorti EA. Further evidence of the passage of host immunoglobulins into hydatid cysts. *J Parasitol* 1972; 58: 1015-1016.
25. Varela-Diaz VM, Coltorti EA. The presence of host immunoglobulins in hydatid cyst membranes. *J Parasitol* 1973; 59: 484-488.
26. Kagan IG, Norman L. Antigenic analysis of *Echinococcus* antigens by agar diffusion techniques. *Am J Trop Med Hyg* 1961; 10: 727-734.
27. Kagan IG, Norman L. The isolation and characterisation of the host antigens in hydatid fluid of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg* 1963; 12: 346-357.
28. Norman L, Kagan IG, Chordi A. Further studies on the analysis of sheep hydatid fluid by agar-gel methods. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13: 816-821.
29. Pozzuoli R, Musiani P, Arru E, Piantelli M, Mazzarella R. *Echinococcus granulosus*: Isolation and characterization of sheep hydatid fluid antigens. *Exp Parasitol* 1972; 32: 45-55.
30. Di Felice G, Pini C, Afferni C, Vicari G. Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 20: 133-142.
31. Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 25: 143-154.
32. Oriol R, Williams JF, Perez Esandi MV, Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of *E. granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg* 1971; 20: 569-574.
33. Pozzuoli R, Piantelli M, Perucci C, Arru E, Musiani P. Isolation of the most

- immunoreactive antigens of *E. granulosus* from sheep hydatid fluid. *J Immunol* 1975; 115: 1459-1463.
34. Capron A, Yarzabal LA, Vernes A, Fruit J. Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine. *Pathologie Biologie* 1970; 18: 357-365.
35. Facon B, Chamekh M, Dissous C, Capron A. Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45: 233-240.
36. Qilici M, Assadouran Y, Ranque P. Le diagnostic immunologique de l'hydatidose. *Medicine Tropicale* 1971; 31: 207-213.
37. Varela-Diaz VM, Coltorti EA, d'Alessandro A. Immunoelectrophoresis tests showing *E. granulosus* arc 5 in human cases of *E. vogeli* and cysticercosis-multiple myeloma. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 554-557.
38. Varela-Diaz VM, Coltorti EA, Prezioso U et al. Evaluation of three immunodiagnostic tests for human hydatid disease. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24: 312-319.
39. Varela-Diaz VM, Eckert J, Rausch RL, Coltorti EA. Detection of the *E. granulosus* diagnostic arc 5 in sera from patients with surgically-confirmed *E. multilocularis* infection. *Z Parasitoelectrophoresis test. Am J Trop Med Hyg* 1977; 23: 662-666.
40. Wattre P, Capron M, Bekhti A, Capron A. Diagnostic immunologique de l'hydatidose, 139 observations. *Nouv. Presse Med* 1980; 9: 305-309.
41. Yarzabal LA, Bout DT, Naouira FR, Capron AR. Further observations on the specificity of antigen 5 of *E. granulosus*. *J parasitol* 1977; 63: 495-499.
42. Bout D, Fruit J, Capron A. Purification d'un antigène spécifique de liquide hydatique. *Ann d'Immunologie* 1974; 125C: 775-778.
43. Lauriola L, Piantelli M, Pozzuoli R, Arru E, Musiani P. *E. granulosus*: Preparation of monospecific antisera against antigens in sheep hydatid fluid. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, I. Abt Orig A* 1978; 240: 251-257.
44. Pozzuoli R, Musiani P, Arru E, Patrona X, Piantelli M. *E. granulosus*: Evaluation of purified antigens immunoreactivity. *Exp Parasitol* 1974; 32: 45-55.
45. Musiani P, Piantelli M, Lauriola L, Arru E, Pozzuoli R. *Echinococcus granulosus*: Specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. *J Clin Path* 1978; 31: 475-478.
46. Verastagui M, Moro P, Guevara A et al. Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot Test for Diagnosis of Human Hydatid Disease. *J Clin Micr* 1992; 30: 1557-1561.
47. Leggatt GR, Yang W, McManus DP. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 189-192.
48. Lightowers MW, Liu D, Haralambous A, Rickard MD. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 37: 171-182.
49. Kanwar JR, Kaushik SP, Sawhney IMS et al. Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. *J Med Mic* 1992; 36: 46-51.
50. Shambesh MK, Craig PS, Gusbi AM, Eghtuish EF, Wen H. Immunoblot evaluation of the 100 and 130 kDa antigens in camel hydatid cyst fluid for the serodiagnosis of human cystic echinococcosis in Libya. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 276-279.
51. Shapiro SZ, Bahr GM, Hira PR. Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86: 503-509.