View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Research Repository Portal of Medilam

تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه ژیاردیا لامبلیا در خرگوش

افشین برازش [1*]، دکتر جعفر مجیدی [1]، دکتر اسماعیل فلاح [1]، دکتر رسول جمالی [1]، اردوان قازانچائی [1]، جلال عبدالعلی زاده [2]

۱– گروه ایمنی و انگل شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۲– مرکز تحقیقات کاربردی و داروئی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت:۸۵/۳/۱۳ تاریخ پذیرش:۸۵/۱۲/۵

چکیده

مقدمه: ژیاردیا لامبلیا یکی از شایع‌ترین تک یاخته‌های روده‌ای انسان در سراسر جهان می‌باشد. تشخیص آن عمدتاً از طریق مشاهده مستقیم صورت می‌گیرد ولی روشهای مبتنی بر *ELISA*، *IFA*، بعنوان تکنیکهای برتر، کاربردهای تحقیقاتی و اپیدمیولوژیکی دارد. برای طراحی تستهای قدرتمند با قدرت تشخیصی بالا نظیر دیپ استیک و یا کیت‌های تشخیصی سریع، اولین قدم تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال می‌باشد. لذا بر آن شدیم تا آنتی‌بادی پلی کلونال بر ضد ژیاردیا را در خرگوش تولید نماییم.

مواد و روش‌ها: با استفاده از روش تغییر یافته گرادیان دو مرحله‌ای سوکروز، کیست‌ها خالص‌سازی شدند و غلظت آن‌ها به تعداد *1×106/ml* در *PBS* رسانده شد و به خرگوش در چندین مرحله به فاصله سه هفته تزریق شد. تزریق مرحله اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور با استفاده از ادجوانت ناقص فروند و تزریق‌های بعدی بدون استفاده از ادجوانت بصورت عضلانی- جلدی صورت گرفت. پس از ایمونیزاسیون خرگوش، برای اثبات تولید آنتی‌بادی پلی کلونال ضد ژیاردیا و تعیین تیتر آن، تست *IFA* و *ELISA* طراحی گردید.

یافته های پژوهش: نتایج بدست آمده در هر دو روش، بیانگر ایمن شدن خرگوش بود و با میزان □□۱۰۶ انگل و رقت سرمی ۱/۱۰۰ و با رقت ۱/۲۰ *Goaet anti rabbit IgG* کونژوگه با *FITC* در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسانس، جواب کاملا قابل قبولی گرفته شد. در الایزا هم در تیترهای با میزان *۱۰۵/ml* انگل و رقتهای کونژوگه ۱/۵۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰، و سرمی ۱/۱۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰، بهترین جوابها گرفته شد.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به اهمیت تشخیص آنتی ژن‌های ژیاردیایی در نمونه‌های مختلف و بالینی، تولید آنتی‌بادی پلی کلونال ضد *G.Lamblia* با تیتر بالا قدم اول و مهمی در راستای طراحی کیت‌های *IFA* و الایزای مستقیم با هدف تشخیص مستقیم آنتی‌ژن‌های ژیاردیا به شمار می‌رود که می‌توان در مراحل بعدی نسبت به خالص‌سازی آنتی‌بادی تولیدی و کونژوگه نمودن آن با آنزیم اقدام نمود.

واژه های کلیدی : تولید ، آنتی بادی پلی کلونال ، ژیاردیا لامبلیا

* **نویسنده مسئول:** گروه ایمنی و انگل شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

Email: afshinbarazesh@yahoo.com

مقدمه

ژیاردیا لامبلیا (دئودنالیس) یکی ازپاتوژن‌های تک‌یاخته‌ای مهم است که در طبقه بندی جزو تاژک داران روده ای قرار می‌گیرد (۱). این انگل انتشار جهانی داشته، شیوع آن حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا تخمین زده می شود (۲). در مرور ۳۰۰ بررسی انجام گرفته در زمینه انگل های روده ای انسان درایران در نیم قرن گذشته، ژیاردیا در کنار آنتامبا هیستولیتیکا، شایع ترین تک یاخته های بیماریزا بوده اند (۳). مهمترین راه انتقال آن توسط آب آلوده بوده ولی انتقال فرد به فرد و انتقال از راه غذا نیز اهمیت دارد (۵ ، ٤). مهمترین علایم بیماری به ترتیب شیوع شامل: اسهال، نفخ شکم، دفع مدفوع چرب و بد بو، کرامپ های شکمی، تهوع، بی اشتهائی، کاهش وزن، استفراغ، تب، کهیر و یبوست می باشند (۷ ، ٦). گر چه بیماری خوش خیم است، در بعضی افراد بویژه بچه ها و خانم‌های باردار ممکن است بیماری شدید با کاهش مایعات بدن و نیاز به بستری شدن ایجاد کند (۸ ، ٦) . اسهال مزمن ناشی از ژیاردیا خودبخود یا با درمان بهبود می یابد ولی بویژه در بچه ها با کاهش وزن، علایم شبیه اسپرو، استئاتوره و سوءجذب ویتامین ب ۱۲، ویتامین آ، پروتئین دی، گزیلوز و آهن همراه است (۱۰، ۹). گاهی عدم تحمل لاکتوز وجود دارد. نظرات در مورد تأثیر ژیاردیازیس مزمن در رشد کودکان هنوز مورد بحث است(۸). روش تشخیص معمول ژیاردیازیس، آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع برای یافتن انگل می باشد (۱۱). حساسیت این روش حتی با آزمایش چند نوبته مدفوع فقط ۷۰-۵۰٪ می‌باشد (۱۲،۱۳). در بیماران با ژیاردیازیس مزمن، حساسیت این روش ممکن است پایین تر هم باشد (۱۱)، زیرا کیست ها بطور متناوب دفع شده و تعداد آنها در سطح پایینی می باشد. آزمایش آسپیراسیون مایع دئودنوم و یا ژژنوم و بیوپسی از روده باریک ممکن است که دارای حساسیت بیشتری باشند (١٤) ولی پرهزینه بوده و یک روش تهاجمی می باشد و بخاطر همین بندرت استفاده می شوند. امروزه تشخیص های آنتی ژنی روش های بهتری را ارائه می دهند، زیرا تصور می شود سطح بیشتر آنتی ژن موجود در فرد یا نمونه مورد نظر اثبات می کند که مقدار انگل موجود در شخص بیمار یا نمونه آلوده نیز بیشتر است . لذا تشخیص ژیاردیا با روش های دیگری نظیر ایمنوفلئورسانس یا الایزا با درصد بالایی از حساسیت صورت می گیرد (۱۵) و در اینجا متد الایزا با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال جایگاهی ویژه و حساسیت بالایی دارد (١٦). پس با توجه به اهمیت حضور انگل در منابع آبی و نیز مواد غذایی و سبزیجات و از طرفی اتخاذ یک روش کلینیکی با قدرت تشخیص بالا به هدف فراهم نمودن زمینه برای طراحی ابزارهایی نظیر دیپ استیک و یا کیت های تشخیصی سریع، در جهت تشخیص قطعی و لزوم تحقیقات بیشتر اپیدمیولوژیکی، بر آن شدیم تا آنتی بادی پلی کلونال را بر ضد ژیاردیا در خرگوش تهیه نمائیم.

مواد و روش ها

نمونه های مدفوع از ۱۰۰ بیمار مختلف جمع‌آوری گردیده و با روش های میکروسکوپی، مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌های مثبتی که دارای مقادیر فراوان فرم کیستی انگل بودند، جهت خالص سازی کیست مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه های فوق الذکر در ۵ برابر حجم خود با آب مقطر حل شده و بصورت سوسپانسیونی یکنواخت و همگن در آورده شد. پس از عبور دادن سوسپانسیون از ۳ لایه تنزیب، مایع در لوله‌های آزمایش مدرج مخروطی ریخته شده و با روش گرادیان تغییر یافته دو مرحله ای سوکروز تحت خالص سازی قرار گرفت (۱۷) . و در نهایت غلظت

آن جهت تزریق به حیوان برابر *ml* /۱۰٦ × ۱ انگل در *PBS* تنظیم شد.

برای تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه کیست ژیاردیا از خرگوش استفاده شد و تزریق در چندین مرحله بفواصل ۱، ۳، ۲، ۲ و ٤ هفته بصورت عضلانی – داخل جلدی انجام شد تا ایمونیزاسیون کامل صورت گیرد. تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور بعدی با استفاده از ادجوانت ناقص فروند و تزریق های دیگر بدون استفاده از ادجوانت انجام شد.

حدود یک هفته پس از تزریق چهارم، جهت اثبات ایمن شدن خرگوش و همچنین برای تعیین تیتر آن، طراحی کیت الایزای غیر مستقیم و همچنین *IFA* صورت گرفت. که در الایزا با استفاده از انگل که در رقتهای ۱۰۳ ، ۱۰٤ و ۱۰۵ انگل در یک میلی لیتر *PBS* به ته پلیت کوت شدند ، رقتهای مختلفی از سرم خرگوش ایمن (۱/۱۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰) اضافه و سپس آنتی‌بادی ضد آنتی بادی خرگوش کونژوگه شده با آنزیم، (با رقت ۱/۵۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰) افزوده شد. و پس از افزودن سوبسترای خاص آنزیم یعنی ترا متیل بنزیدین *(TMB)* و توقف واکنش با اسید سولفوریک ۱ نرمال و خواندن جذب *(OD)* در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ٤۵۰ نانومتر، تیتر محصول تولید شده مشخص گردید .

در *IFA* هم به همین ترتیب، انگل‌ها (با مقادیر*PBS/ml*۱۰۶-۱۰۴) در چاهک های لام *ANA* کوت شده، رقتهای مختلفی از سرم خرگوش ایمن (۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰) اضافه و سپس آنتی بادی ضد آنتی بادی خرگوش کونژوگه شده با *(FITC)* با رقت ۱/۱۰ و ۱/۲۰ افزوده شد و در نهایت نتیجه عمل در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسنت، از نظر وجود تشعشعات ایمنوفلئورسانس بررسی گردید.

جدول شماره ۱ : تعیین تیتر آنتی بادی تولیدی با استفاده از طراحی تست *IFA*

میزان انگل در *PBS* ۱*ml*	$۱۰^۴$								$۱۰^۵$								$۱۰^۶$							
رقت کونژوگه	۱/۲۰				۱/۱۰				۱/۲۰				۱/۱۰				۱/۲۰				۱/۱۰			
رقت سرمی	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰
نتایج	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+۳	+۱	-	-	-	-	+۳	+۴

یافته‌های پژوهش

۱- خالص سازی کیست:

از سوسپانسیون نهایی بدست آمده، لام مستقیم تهیه و به روش میکروسکوپی مطالعه شد و همچنین جهت تعیین میزان کیستهای باز یافتی ، از لام نئوبار استفاده گردید . نتیجه عمل دست یافتن به سوسپانسیونی از کیستهای سالم و تقریبا یکدست و بدون آلودگی بود که میزان ریکاوری آن هم حدود ۰۱۰٤ ۵-۱ کیست از دو گرم مدفوع بود .

۲- تعیین تیتر آنتی بادی تولیدی :

الف- *IFA*

در این تست در تیتر های با میزان ۱۰۶ /µλ انگل و رقت کونژوگه ۱/۲۰ و رقت سرمی ۱/۱۰۰ جواب ایده آل گرفته شد. جزئیات آن در جدول شماره (۱) آمده است:

ب-*ELISA*

بدین منظور کیت الایزا طراحی گردید ، همانطور که در جدول شماره (۲) آمده است ، در تیتر های با میزان ۱۰۵/ml و رقتهای کونژوگه ۱/۵۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ ، و سرمی ۱/۱۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰، بهترین جوابها گرفته شد و جذب نوری *(OD)* آن بالای یک بود *(OD≥1)* .

جدول شماره ۲ : تعیین تیتر آنتی بادی تولیدی با استفاده از طراحی تست *ELISA*

میزان انگل در PBS ۱ml	$۱۰^۵$				$۱۰^۴$				$۱۰^۳$			
رقت کونژوگه	۱/۵۰۰۰		۱/۱۰۰۰۰		۱/۵۰۰۰		۱/۱۰۰۰۰		۱/۵۰۰۰		۱/۱۰۰۰۰	
رقت سرمی	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰
جذب نوری(*OD*)	۱/۲۰۷	۱/۰۵۸	۱/۰۲۷	۰/۷۲۹	۰/۶۲۱	۰/۴۳۱	۰/۴۷۳	۰/۳۱۹	۰/۳۵۲	۰/۲۳۱	۰/۱۹۸	۰/۲۲۲

بحث و نتیجه گیری

ژیاردیا از شایع ترین تک یاخته های بیماریزای روده ای انسان در ایران و جهان به شمار می رود و شیوع آن حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا تخمین زده می شود (۲ و۱). انتقال آن از طریق فرم کیستی انگل صورت گرفته و مهمترین راه انتقال توسط آبهای آلوده می باشد (۵ ، ٤). سیر تکاملی آن ساده است و به این جهت شیوع آن در مراکز پرورشی و مهد کودکها بسیار بالاست (۵). بطور معمول روشی که برای تشخیص ژیاردیازیس بکار می رود، استفاده از آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع می‌باشد (۱۱). حساسیت این روش حدود ۷۰-۵۰٪ بوده و در موارد مزمن بیماری، پایین تر هم می باشد (۱۲،۱۳) . روش‌های بیوپسی و آسپیراسیون روده باریک می تواند حساسیت تشخیص انگل را بهبود بخشد، اما روشی تهاجمی بوده و بندرت استفاده می‌شوند (۱٤). تشخیص آنتی ژنی از تشخیص بر اساس آنتی‌بادی خیلی اختصاصی تر است. اساسا یک تشخیص آنتی ژنی وسیله بهتری را برای تشخیص ارائه می کند،

زیرا که سطح آنتی ژنی فرد یا نمونه موردنظر با تعداد انگل موجود در آن مطابقت دارد، پس سیستمهای آنتی‌ژنی یک جایگزین مطلوبی برای سیستمهای تشخیص آنتی بادی می‌باشند، مخصوصاً در بیمارانی که دارای نقص ایمنی بوده و سیستم پاسخ دهی بدن آنها سرکوب شده است.

روش های مرسوم برای تشخیص آنتی ژن شامل: ژل دیفیوژن، تست کانتر ایمنوالکتروفورز و ایمنوفلوئورسنت آنتی بادی تست می‌باشند (۱۸). جدای از مشکلات عملی در آزمایشگاهها ،

حساسیت و ویژگی متغیر اغلب تست های بالا از فاکتور های محدود کننده استفاده از آنها می باشد . الایزا بعنوان یک ابزار تشخیصی سرولوژیکی باالقوه‌ای برای اغلب بیماریهای عفونی مورد استفاده قرار می گیرد و دارای حساسیت بالایی می‌باشد و اولین قدم در این راستا، تولید آنتی بادی مناسب در یک حیوان بر علیه آنتی ژنهای انگل ژیاردیا می باشد (۱۶). جهت ایمن سازی حیوان از کیست های خالص شده ژیاردیا بعنوان آنتی ژن استفاده گردید . در روش های منتشر شده در ایزولاسیون کیست های تک یاخته ها از مواد شیمیایی نظیر فرمالین، یودین، اتر یا جیوه استفاده گردیده است که خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیست ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و روش‌های دیگری نظیر گرادیان سوکروز یا پرکول هم باعث بدست آمدن سوسپانسیونی از کیست های حاوی مواد زاید مدفوعی می شود (۱۹،۲۰). در این مطالعه کیست ها طی روش‌های مختلفی مورد خالص سازی قرار گرفتند و در نهایت با روش گرادیان تغییر یافته دو مرحله ای سوکروز، سوسپانسیونی از کیست های سالم و تقریبا یکدست و بدون آلودگی بدست آمد(۱۷) .

جهت تحریک هر چه بیشتر سیستم ایمنی حیوان و افزایش تیتر آنتی بادی تولیدی، تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور بعدی با ادجوانت ناقص و تزریق‌های بعدی بدون ادجوانت انجام گرفت (۲۱،۲۲) .

ساده ترین روش برای اثبات پیشرفت تولید آنتی بادی پلی کلونال روش الایزای غیر مستقیم است . اغلب آنتی ژن ها و آنتی بادی ها وقتی که بطور مستقیم به فاز جامد متصل می‌شوند، براحتی می توانند بوسیله این روش تشخیص داده شوند. در این روش برای جلوگیری از جذب پروتئین ها به میکرو پلیت ها و برای جلوگیری از بروز واکنش های غیر اختصاصی، از میکروپلیت های پلی استیرنی بعنوان فاز جامد استفاده شد ، در غیر اینصورت و برای اجتناب از این امر می‌بایستی از آنتی ژن خالص(تخلیص شده) استفاده می شد که این کار مستلزم صرف هزینه و زمان بسیار زیادی می باشد. در مورد کوتینگ ***(Coating)*** انگل ها با رعایت دما و ***PH*** بافر و استفاده از مسدودکننده ***T*** / ***PBS*** ۰.۵ ٪ ، این مراحل با دقت تمام انجام شد و نتایج مطلوبی بدست آمد. نتایج بدست آمده از بررسی الایزا حاکی از خوب ایمن شدن حیوان می باشد و جذب نوری ***(OD)*** بالای یک با تیتر سرمی ۱/۲۰۰۰ و رقت کونژوگه تا ۱/۱۰۰۰۰ بدست آمد. نتایج حاصل از تست ***IFA*** هم نشان دهنده تولید آنتی بادی با تیتر مناسب می باشد.

از آنجائیکه تشخیص آنتی ژن های ژیاردیایی در نمونه‌های مدفوعی و منابع آبی و نیز مواد غذایی و سبزیجات از اهمیت خاصی برخوردار است و از طرفی جهت اتخاذ یک روش کلینیکی با قدرت تشخیصی بالا و به منظور فراهم نمودن زمینه برای طراحی ابزارهایی نظیر دیپ استیک و یا کیت های تشخیصی قطعی و لزوم تحقیقات بیشتر اپیدمیولوژیکی، تولید آنتی بادی پلی کلونال با تیتر بالا گام اول و مهمی بشمار می‌آید چرا که پس از تولید و خالص سازی آن و کونژوگاسیون با آنزیم، می‌تـــوان در راستـای طراحی کیت الایزای مستقیم آنتی‌ژن‌های انگلی اقدام نمود .

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر، بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات کاربردی و داروئی تبریز می باشد، لذا نگارندگان مراتب قدردانی خویش را از زحمات مدیریت و کارشناسان آن مرکز اعلام می دارند.

References :

1- Adam RD. Biology of Giardia lamblia. *Clin Microbiol Rev. 2001 Jul; 14(3): 447-75. Review.*

2- Heyworth mf .Giardia infections . In: paradise lj et al, editors. *Enteric infections and immunity newyork: plenum press, 1996; 227-38*

۳- کیا عشرت بیگم، هوشیار حسین، موبدی ایرج. بررسی گزارشات انگلهای روده ای انسان در ایران در نیم قرن گذشته. خلاصه مقالات ارائه شده در دومین کنگره سراسری بیماریهای انگلی ایران، تهران، ۱۳۷٦، ص ۱۳۷

4- Kappus KD, Lundgren RG, Juranek DD, Roberts JM, Spencer HC. Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. *Am J Trop Med Hyg 1994; 50:705-13.*

5- Gilman RH, Brown KH, Visvesvara GS, et al. Epidemiology and serology of Giardia lamblia in a developing country: Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hug. 1985; 79:469–73.*

6- R. A. Shaw; M. B. Stevens. The reactive arthritis of giardiasis. A case report. . *JAMA. 1987; 258: 2734-2735.*

7- C. A. Clyne; G. M. Eli opoulos. Fever and urticaria in acute giardiasis. Arch Intern *Med. 1989; 149:939-940.*

8- Fathing MJG, Mata L, Urrutia JJ Kronmal RA. 1986. "Natural history of Giardia infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth." Am J *Clin Nutr 43:395-405.*

9- Lengerich EJ, Addiss DG, Juranek DD. Severe giardiasis in the United States. Clin *Infect Dis 1994;18:760-3.*

10- Hjelt K, Paerregaard A, Krasilnikoff A. Giardiasis causing chronic diarrhea in sub-urban Copenhagen:Incidence, physical growth, clinical symptoms and small intestinal abnormality. *Acta Pediatr 1992; 81: 881-886.*

11- Rosoff JD, Stibbs HH. Isolation and identification of Giardia lamblia specific stool antigen (GSA65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology 23:905-910, 1986.*

12- J. A. Burke. Giardiasis in childhood. *Am J Dis Child. 1975; 129:1304-1310.*

13- Burke, J. A. 1977. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 7:373-391.*

14- Sun T. The diagnosis of giardiasis. *Am J Surg Pathol. 1980 Jun; 4(3): 265–271.*

15- Wittner, M., S. Maayan, W. Farrer, and H. B. Tanowitz. 1983.Diagnosis of giardiasis by two methods: immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Arch. Pathol. Lab.Med. 107:524-527.*

16- Duque-Beltran, Sofia et al. Detection of Giardia duodenalis antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Dec 2002, vol.97, no.8, p.1165-1168.*

۱۷- برازش، افشین. ابداع روشی ساده و اقتصادی در جداسازی و تخلیص کیست ژیاردیا. خلاصه مقالات چهارمین کنگره ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی ، تهران . (۱۳۸٤) ؛ صفحهٔ ۸٦

۱۸ – صائبی ، اسماعیل . بیماریهای انگلی در ایران ، جلد تک یاختگان ، انتشارات آییژ. ۱۳۸٤ . صفحات ۹۷ – ۷۹.

19- Blagg W, Schlogel EL, Mansour NS (1955) A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces.Am *J Trop Med Hyg.1955 Jan;4(1):23-8*

20- Walderich, B., L. Mueller, R. Bracha, J. Knobloch, and G. D. Burchard. 1997. A new method for isolation and differentiation of native Entamoeba histolytica and E. dispar cysts from fecal samples. *Parasitol. Res. 83:719-721.*

21- Halliday LC , Artwohl JE.(2000). Physiologic and Behavioral Assessent of Rabbits Immunized with Freund's completed Adjuvant. *Cont. Topics, 39(5),8.*

22- Stills HF, Bailey MQ.(1991).Use of Freund's complete Adjuvant. *Lab. Animal, 4,25.*