

بررسی آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آنتی‌ژن‌های کیست هیداتیک با استفاده از روش ایمونوبلات

دکتر فاطمه غفاری^۱، دکتر عبدالحسین دلیمی‌اصل^۲، دکتر احمد زواران حسینی^۳، فاطمه جالوسیان^۴

چکیده

مقدمه: ایمونوبلات یکی از روش‌های سرولوژی با حساسیت و ویژگی بالا است که برای تشخیص بیماری کیست هیداتیک بکار می‌رود. در این روش سرم بیماران هیداتیدی با زیر واحدهای دو آنتی‌ژن اصلی اکتینوکوکوس گرانولوزوس یعنی آنتی‌ژن ب و آنتی‌ژن ۵ واکنش ایجاد می‌کند و پاسخهای ایجاد شده قابل تجزیه و تحلیل می‌باشند.

روش بررسی: در این بررسی تعداد ۱۰۰ سرم مورد آزمایش قرار گرفتند که ۴۰ مورد مربوط به بیماران هیداتیدی می‌باشد که بیماری آنها توسط عمل جراحی اثبات شده است، ۲۰ مورد مربوط به افراد مبتلا به بیماریهای انگلی به غیر از کیست هیداتیک، ۲۰ مورد مربوط به بیماران مبتلا به بیماریهای غیرانگلی و ۲۰ مورد مربوط به افراد سالم می‌باشد.

نتایج: حساسیت بدست آمده برای سه زیر واحد آنتی‌ژن ب (با وزنهای ملکولی ۱۲، ۱۶ و ۲۰ کیلو دالتون) به ترتیب ۹۲/۵، ۸۴/۵ و ۸۷/۵ درصد و ویژگی برای هر سه زیر واحد ۱۰۰٪ بدست آمد. حساسیت بدست آمده برای دو زیر واحد آنتی‌ژن ۵ (با وزنهای ملکولی ۵۵ و ۶۵ کیلو دالتون)، ۱۰۰٪ و ویژگی به ترتیب ۱۰۰ و ۹۰ درصد می‌باشد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بهترین زیر واحد برای تشخیص کیست هیداتیک، زیر واحد ۵۵ کیلو دالتونی آنتی‌ژن ۵ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کیست هیداتیک، ایمونوبلات، سرولوژی

مقدمه

انگل در میزبانان واسطه به صورت کیستهای بزرگی در اندامهای داخلی مخصوصاً کبد و ریه ظاهر می‌شوند^(۱). این بیماری علامت بالینی خاصی ندارد بنابراین جهت تشخیص بیماری، ارزیابی بالینی آن کافی نیست. برای تشخیص این بیماری بهتر است از چند روش تشخیصی استفاده کرد. این روشها شامل استفاده از رادیوگرافی، اولتراسونوگرافی، توموگرافی، همراه با تکنیک‌های ایمنی‌شناسی می‌باشد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه آنتی‌ژن‌های این انگل تا چند سال پس از بهبود باقی می‌مانند به همین جهت بسیاری از تستهای سرولوژی برای یافتن آنتی‌بادیهای IgE و IgG در سرم بیماران در طی بیماری و حتی پس از عمل جراحی یا درمان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند^(۳،۴). بیش از ۵۰ سال است که تستهای سرولوژی متنوعی برای یافتن

هیداتیدوزیس یک عفونت مشترک بین انسان و حیوانات است. عامل آن سستودی از خانواده تنیده به نام اکتینوکوکوس گرانولوزوس است. میزبان نهایی این انگل سگ و سگ‌سانان و میزبانهای واسط آن دامهایی نظیر گوسفند، گاو و بز هستند. انسان نیز به فرم نوزادی مبتلا می‌شود. اشکال لاروی

۱- استادیار گروه انگل شناسی

۲- استاد گروه انگل شناسی

۳- دانشیار گروه ایمنی شناسی

۴- دانشجوی PhD گروه انگل شناسی

دانشگاه تربیت مدرس - تهران

آنتی‌بادی‌های IgG , IgM , IgA , IgE که در اثر بیماری کیست هیداتیک در بیماران تولید شده بکار می‌رود. از تستهایی که هم حساسیت و هم ویژگی بالایی دارند می‌توان از تست الیزا و ایمونوبلات نام برد^(۴). بطور کلی مفهوم عملی بلات اشاره به تکنیک‌هایی دارد که در آنها باندهای جدا شده پروتئین ، RNA و DNA از ژل به ورقه‌های نازکی مثل کاغذ نیترو سلولز منتقل می‌شود. گرچه استفاده از این تکنیک بعد از الکترو فورز باعث صرف وقت بیشتر و پیچیده‌تر کردن کل آزمایش می‌گردد ولیکن به علت فواید فراوانی که این روش دارد بکاربرد آن بسیار با ارزش است. روشهای مختلفی برای انتقال از ژل به کاغذ نیترو سلولز وجود دارد که متداولترین آنها استفاده از جریان الکتریسته است که این روش انتقال را الکترو ترانسفر می‌نامند. در این روش جریان الکتریکی به صورت عمودی بر سطح باعث حرکت پروتئینها به خارج از ژل و انتقال آنها به کاغذ نیترو سلولز می‌شود. پروتئینها به وسیله نیروی غیر کووالانت محکم به کاغذ نیترو سلولز متصل می‌شوند و نوع واکنش غیر قابل بازگشت می‌باشد. در این روش می‌توان از پلی کلونال و مونوکلونال آنتی‌بادی استفاده نمود. ایمونوبلات روش بسیار مفید و تأیید شده‌ای برای مشخص نمودن آنتی‌ژنهای اختصاصی است. در این روش آنتی‌ژنها تا حدود یک نانوگرم قابل تشخیص می‌باشند. با استفاده از این روش تشخیص واکنش متقاطع بین یک آنتی‌ژن و آنتی‌ژنهای مشابه دیگر امکان‌پذیر می‌گردد^(۵،۶). هدف از این مطالعه، ارزیابی آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده بر علیه آنتی‌ژن‌های مختلف کیست هیداتیک در بدن انسان با استفاده از روش ایمونوبلاتینگ است.

روش بررسی

تهیه آنتی‌ژن: پس از جداسازی مایع کیست هیداتیک، محلول آنتی‌ژنهای نسبتاً خالص را که حاوی آنتی‌ژنهای ۵ و ۵ می‌باشد تهیه گردید^(۷).

تهیه نمونه سرم: برای تهیه سرم مثبت از ۴۰ بیمار مبتلا به کیست هیداتیک که بیماری آنها به وسیله عمل جراحی تأیید شده است، همچنین از ۲۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد سالم، ۲۰ فرد مبتلا

به سایر آلودگیهای انگلی به عنوان گروه شاهد دارای آلودگیهای انگلی غیر از کیست هیداتیک (۳ مورد تینا ساژیناتا، ۴ مورد هایمنولپیس نانا، ۳ مورد فاسیولا هپاتیکا، ۳ مورد آسکاریس، ۳ مورد استرونژیلوئیدس استرکورالیس و ۴ مورد ژیاودیبا) و ۲۰ فرد مبتلا به بیماریهای غیر انگلی به عنوان گروه شاهد بیمار بدون آلودگی انگلی (سرطان کبد، سرطان ریه، سرطان ناحیه شکم، کولیت روده، سرطان خون و عفونتهای باکتریال) نمونه سرم تهیه شد. علت انتخاب این گروهها بررسی واکنشهای متقاطع با آنتی‌ژنهای سایر انگلها و همچنین بررسی واکنشهای متقاطع با سایر بیماریها است که از لحاظ علایم بالینی ممکن است مشابه با علایم کیست هیداتیک می‌باشند است این سرماها تا زمان بررسی در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آزمایش ایمونوبلات: ابتدا آنتی‌ژن نسبتاً خالص با روش SDS-PAGE الکتروفورز شد، پس از پایان الکتروفورز ژل را به دقت از میان دو شیشه الکتروفورز خارج کرده و ۳۰ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد. قطعه‌ای از کاغذ نیترو سلولز که به اندازه ژل می‌باشد را می‌بریم، برای آماده سازی کاغذ نیترو سلولز ابتدا آن را در آب مقطر خیسانده و سپس به مدت ۱ ساعت در بافر انتقال قرار داده و تعداد ۶ عدد کاغذ صافی را به ابعاد بزرگتر از کاغذ نیترو سلولز بریده و در بافر انتقال خیسانیم. سپس یک سطح شیشه‌ای را با متانول تمیز کرده سپس به ترتیب ۳ کاغذ صافی، کاغذ نیترو سلولز، ژل و ۳ کاغذ صافی را طوری بر روی هم می‌چینیم که هیچ حباب هوایی بین آنها تشکیل نگردد. سپس این لایه‌ها را بین دو اسفنج قرار داده و این مجموعه را به داخل تانک وسترن بلات که محتوی بافر انتقال است قرار داده و جریان برق ۸۰-۱۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت برقرار گردید. پس از اتمام مدت انتقال کاغذ نیترو سلولز را در آورده سپس قسمت مربوط به پروتئینهای استاندارد را بریده و در رنگ پونسو S رنگ گردید. پس از اطمینان از انتقال پروتئینها کاغذ نیترو سلولز در محلول بلوکه کننده قرار داده شد. سپس کاغذ را به صورت نوارهایی به قطر ۳ میلیمتر بریده و هر نوار را با سرم بیمار یا شاهد با رقت ۱:۸۰۰ مجاور گردید. سپس کاغذهای نیترو سلولز در مجاورت آنتی‌هیومن IgG کنتروگه با HRP (تهیه شده از شرکت سیگما) با

نتایج بدست آمده برای آزمایش ایمونو بلات در افراد مبتلا به کیست هیداتیک بر حسب موقعیت کیست در جدول (۲) آمده است. بیشترین موارد مثبت برای افراد مبتلا به کیست هیداتیک کبدی و کمترین موارد مثبت برای افراد مبتلا به کیست هیداتیک ریوی بدست آمد.

رقت ۱:۶۰۰۰ قرار داده شد و پس از اتمام زمان انکوباسیون کاغذها در مجاورت سوپرتری DAB ۱ قرار داده شد. پس از ظاهر شدن باندهی قهوه‌ای، نوارها را به داخل ظرف آب مقطر منتقل کرده سپس بین دو کاغذ صافی خشک گردید^(۷).

نتایج

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که شدت و ضعف رنگهای بدست آمده برای هر باند در بیماران مختلف متفاوت می باشد. قویترین باندها در ناحیه ۶۵ و ۵۵ کیلودالتون یعنی ناحیه مربوط به آنتی ژن ۵ مشاهده گردید که برای همه بیماران هیداتیدی مثبت بود (تصویر ۱). سپس مهمترین واکنش در ناحیه زیر ۲۴ کیلو دالتون مشاهده گردید، این ناحیه مربوط به آنتی ژن ب بوده و دارای سه باند ۱۲، ۱۶ و ۲۰ کیلودالتون است که برای ۵۰٪ افراد هر سه باند مثبت بود و ۱۰۰٪ افراد دارای حداقل یک باند مثبت بودند (تصویر ۱). برای سایر باندها نتایج بدست آمده بدین ترتیب می باشد، باند ۱۱۶ کیلودالتون ۳۰٪، ۵۲ کیلودالتون ۴۵٪ و ۶۰ کیلودالتون ۵۰٪ مثبت بوده است. سایر اطلاعات در جدول (۱) آمده است. با استفاده از این روش، افراد سالم و افراد مبتلا به بیماریهای غیرانگلی واکنشی را با آنتی ژنهای کیست هیداتیک نشان ندادند. اما در مورد افراد مبتلا به بیماریهای انگلی در دو مورد از ۲۰ مورد (یک مورد تیزیس و یک مورد فاسیولیازیس) در ناحیه ۶۵ کیلودالتون نتایج مثبت مشاهده گردید (تصویر ۱).

۱- پروتئین های استاندارد

۷-۲- بیماران هیداتیدی

۸- بیمار مبتلا به سرطان کبد

۹- بیمار مبتلا به ژیا ردیا

۱۰- بیمار مبتلا به فاسیولاهپاتیکا

۱۱- بیمار مبتلا به آسکاریس لومبریکوئیدس

۱۲- بیمار مبتلا به تیزاسازینا

۱۳- بیمار مبتلا به استرونزیلوئیدس استر کوراسیس

۱۴- بیمار مبتلا به کرم قلابدار

۱۵- بیمار مبتلا به هایمنوپیس نانا

۱۶- فرد سالم

شکل ۱: نوارهای نیتروسولوز بدست آمده در روش ایمونوبلات برای بیماران هیداتیدی و بیماران غیرهیداتیدی و افراد سالم

جدول ۱: حساسیت و ویژگی بدست آمده و سترن بلات در گروههای مورد مطالعه بر حسب باندهای بدست آمده

باند ۶۵ کیلودالتونی		باند ۵۵ کیلودالتونی		باند ۲۰ کیلودالتونی		باند ۱۶ کیلودالتونی		باند ۱۴ کیلودالتونی		باندهای مثبت مشاهده شده
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۴۰	۱۰۰	۴۰	۱۰۰	۳۵	۸۷/۵	۳۳	۸۴/۵	۳۷	۹۴/۵	افراد مبتلا به کیست هیداتید (۴۰ نفر)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	افراد مبتلا به سایر آلودگیها
۴	۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-	انگلی (۲۰ نفر)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	بیماریهای مبتلا به آلودگیهای غیرانگلی (۴۰ نفر)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	افراد سالم (۴۰ نفر)
حساسیت		حساسیت		حساسیت		حساسیت		حساسیت		
۱۰۰		۱۰۰		۸۷/۵		۸۴/۵		۹۴/۵		
ویژگی		ویژگی		ویژگی		ویژگی		ویژگی		
۹۰		۱۰۰		۱۰۰		۱۰۰		۱۰۰		

جدول ۲: نتایج مثبت بدست آمده از آزمایش و سترن بلات بر حسب باندهای مختلف و موقعیت کیست

باندهای مثبت مشاهده شده		باندهای مثبت مشاهده شده		باندهای مثبت مشاهده شده		باندهای مثبت مشاهده شده		باندهای مثبت مشاهده شده		موقعیت کیست
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۱۹	۹۵	۱۸	۹۰	۱۹	۹۵	۱۹	۹۵	۱۹	۹۵	کیست کبیدی (۲۰ نفر)
۱۰	۸۳	۸	۶۶	۹	۷۵	۱۴	۱۰۰	۱۴	۱۰۰	کیست ریوی (۱۲ نفر)
۸	۱۰۰	۷	۸۷/۵	۷	۸۷/۵	۸	۱۰۰	۸	۱۰۰	کیست در چند اندام (۸ نفر)

بحث

راستگویی و همکاران ۵۹٪، خاربو و همکاران (۱۹۹۷) ۵۰٪، یوپولو و همکاران نیز ۵۰٪ گزارش شده است.

حساسیت بدست آمده برای قطعه ۲۰ کیلودالتونی در مطالعه حاضر ۸۷/۵٪، کانوار و همکاران (۱۹۹۲) ۱۰۰٪، و راستگویی و همکاران (۱۹۹۲) ۵۵٪، خاربو و همکاران (۱۹۹۷) ۵۰٪، سیراکوزانو و همکاران (۱۹۹۱) ۶۳٪ بدست آمده بود.

زیر واحدهای مربوط به آنتی ژن ۵ حساسیت بالایی را در روش ایمونوبلات نشان داده اند. در مطالعه ما قطعات ۵۵ و ۶۵ کیلو دالتونی در تمامی موارد بیماری مثبت بودند یعنی حساسیت آنها ۱۰۰٪ می باشد. در مطالعه پروفیومو و همکاران (۱۹۹۴) مجموع حساسیت بدست آمده برای این دو واحد ۹۴٪ و در مطالعه خاربو و همکاران (۱۹۹۷) ۷۸٪ بدست آمده بود.

در مطالعه کانوار و همکاران (۱۹۹۲) قطعه ۱۱۶ کیلو دالتونی به عنوان مهمترین زیر واحد تشخیصی گزارش شده بود، در حالی که در مطالعه ما فقط ۳۰٪ موارد مثبت را توانسته بود تشخیص دهد. در مطالعه پروفیومو و همکاران (۱۹۹۴) نیز این قطعه اهمیت زیادی را نشان نداده بود.

در مطالعه ایشیما و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از روش ایمونو بلات حساسیت این روش برای هیداتیدوز انسانی ۱۰۰٪ بدست آمده بود.

در مطالعه عبدالحافظ و همکاران (۲۰۰۴) در روش تشخیص هیداتیدوز انسانی با استفاده از روش ایمونو بلات،

حساسیت و ویژگی بالای روش ایمونوبلات در میان تستهای سرولوژی آن را به عنوان تست برتر و متمایز از سایر روشها معرفی نموده و مخصوصا در مناطقی که سایر بیماریهای گرمی مانن سیستمی سرکوزیس اندمیک هستند به عنوان تست انتخابی برگزیده شده است. علت دیگر اهمیت این روش، الگوهای پاسخ آنتی‌بادی به تمام زیر واحدهای آنتی ژنیک قابل بررسی است.

در نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر حساسیت بدست آمده برای قطعه ۱۲ کیلو دالتونی ۹۲/۵٪ بود، در مطالعه کانوار و همکاران (۱۹۹۲) حساسیت بدست آمده برای این قطعه ۱۰۰٪^(۸)، و در مطالعه لگات و همکاران (۱۹۹۲) برای این قطعه حساسیت ۹۰٪^(۹) و در مطالعه یوپولو و همکاران (۱۹۹۶) حساسیت ۸۰٪ بدست آمده بود^(۱۰). در سایر مطالعات حساسیت بدست آمده برای این زیر واحد آنتی ژنی بدین ترتیب می باشد و راستگویی و همکاران (۱۹۹۲) ۶۵٪^(۱۱)، خاربو و همکاران (۱۹۹۷) ۵۸٪^(۱۲)، پروفیومو و همکاران (۱۹۹۴) ۷۲٪^(۱۳) و سیراکوزانو و همکاران (۱۹۹۱) ۵۵٪^(۱۴) بدست آمده بود. در مطالعه حاضر و سایر مطالعات انجام شده برای آنتی ژن ب، بیشترین حساسیت بدست آمده برای قطعه ۱۲ کیلو دالتونی بود بنابراین نقش ایمنی غالب را به این قطعه نسبت می دهند. در مطالعه حاضر حساسیت بدست آمده برای قطعه ۱۶ کیلو دالتونی ۸۲/۵٪ می باشد در مطالعه کانوار و همکاران حساسیت ۱۰۰٪، و

روش قابل تفسیر می‌باشد، بدین ترتیب که اگر چنانچه از آنتی‌ژنهای نسبتاً خالص استفاده شود وجود حداقل چهار باند مثبت نشانه مثبت بودن این تست می‌باشد در حالی که در مواردی که واکنش متقاطع با سرم افراد آلوده به فاسیولا و تینیا ساژیناتا نشان داده شد، واکنش مثبت در یک باند و آن هم در ناحیه ۶۵ کیلو دالتون مشاهده شد.

علت تفاوت‌های بدست آمده در مطالعات مختلف احتمالاً به علت تفاوت در استرینهای اکینو کوکوس گرانولوزوس، خصوصیات بالینی بیماران، موقعیت کیست و حتی تأثیر بعضی از فاکتورها مانند وضعیت بیماران (دارای کیست هیداتیک اولیه یا دارای کیست هیداتیک عود کرده) می‌باشد.

حساسیت بدست آمده برای زیر واحدهای آنتی ژن ب یعنی قطعات ۱۲، ۱۶ و ۲۴ کیلو دالتونی به ترتیب ۶۹٪، ۳۵/۷٪ و ۴۰/۵٪ بدست آمد، که بیشترین حساسیت برای قطعه ۱۲ کیلو دالتونی و کمترین در صد برای قطعه ۱۶ کیلو دالتونی بدست آمده بود. در مطالعه ما نیز بیشترین حساسیت برای قطعه ۱۲ کیلو دالتونی و کمترین در صد برای قطعه ۱۶ کیلو دالتونی بدست آمده بود.

نتیجه گیری

روش ایمونوبلات روش بسیار حساسی برای تشخیص بیماری کیست هیداتیک می‌باشد. نتایج بدست آمده از این

- 6- Craig PS, Rogan MT & Allan JC. *Hydatidosis and cysticercosis larval cestodes*: 209-236, In *Medical Parasitology: A practical approach*. Ed, Gillspy S. H. and Hawkey P. M., IRL-PRESS, Oxford, 1995.
- 7- Dunbar BS. *Protein Blotting : A practical approach*. Ed Oxford University press. 1994.
- 8- Kanwar JR, Vineyak VK. *The significance of free and immun-complexed hydatid specific antigens as immunodiagnostic tool for human hydatidosis*. J. Med. Microbiol, 1992 , 37 :396-403.
- 9- Legatt GR, Yang W, McManus DP. *Serological evaluation of the 12 Kda subunit of antigen B in Echinococcus granulosus cyst fluid by immunoblot analysis* . Trans. Of Roy. Soc. For Trop. Med and Hyg. 1992 , 86: 189-92.
- 10- Iappolo S, Notargiacomo S, Profumpo E, Siracusano A . *Immunological responses to antigen*

منابع

- ۱- غفاری فر فاطمه، دلیمی اصل عبدالحسین، زواران حسینی احمد. « تهیه ساده آنتی‌ژنهای گروه ب اکینو کوکوس گرانولوزوس از مایع کیست هیداتیک گوسفندی ». مجله علوم پزشکی مدرس، دوره ۲ شماره ۲، ص ۱۱۵-۱۱۹، ۱۳۷۹
- 2- Rigano R, Prefumo E, Siracusano A, *New perspective in immunology of Echinococcus granulosus infection*. Parasitologia.1997,39:275-7.
- 3- Finkelman FD, Pearce EJ, Urban JF, Sher A. *Regulation and biological function of helminth – induced cytokine responses* . Immunology Today, 1991, 12: A 62-A 66.
- 4- King CL , Nutman TB. *Regulation of immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis* . Immuno. Parasitol. Today , 1991, 12: 54-8.
- 5- Rogan MT. *Immunological analysis of parasite molecules*. In : Analytical Parasitology, 1996 : 320-361. Rogan M. T. Ed springer. UK.

- B Echinococcus granulosus cyst fluid hydatid patients*. Parasite Immunol. 1996, 18: 571-8.
- 11- Verastegui M, Morop: Guerala A . *Rodrigues T. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis human hydatid disease*. J Clin. Microbiol. 1992 , 30(6): 1557-61.
- 12- Khaebov A, Nahmias J. *Cellular and humoral immune responses of hydatidosis patients to Echinococcus granulosus purified antigens*. Am. J. Trop. Med- Hyg. 1997 , 57 (5) :619-625.
- 13- Profumo E, Ortona E, Rigano R . *Detection of antibodies against Echinococcus granulosus major antigens and their subunits by immunoblotting* . *Trans. of Roy* . 1991 , Soc. for Trop. Med and Hyg. 85: 239-43.
- 14- Siracosano A, Ioppolo S, Nootargiacomo S, Ortona E, Rigano R, Teggi A, Derosa F, Vicari G. *Detection of antibodies against Echinococcus granulosus major antigens and their subunits by immunoblotting*. *Trans of Roy. Soc. For Trop. Med and Hyg*. 1991, 85:239-43.
- 15- Ishiha MMI, Rubinsky EG, Ferreira AW, Hoshino S, Vaz AJ. *Helminth antigens (T. solium, T. crassiceps, Toxocara canis, S. mansoni and Echinococcus granulosus) and cross-reactivities in human infections and immunized animals*. Acta Tropica 89 (1): 73-84 . 2003.
- 16- Nasrieh MA, Abdel-Hafez SK. *Echinococcus granulosus in Jordan*. *Diagnos. Microbiol. Infect. Disease*. 2004 , 48: 117-123.