

Kajian Titer Antibodi Pada *Yolk* dari Ayam yang Diimunisasi Dengan Antigen Ekskretori/Sekretori Stadium L₃ *Ascaridia galli*

(Evaluation of antibody titre in yolk from immunized chickens with excretory/secretory antigen of L₃ stage of *Ascaridia galli*)

Darmawi¹, Ummu Balqis¹, Risa Tiuria², Muhammad Hambal¹, Samadi³

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

ABSTRACT The purpose of the present study was to trigger humoral immunity of chickens egg yolk exposed to excretory/secretory released in vitro by L₃ stage of *Ascaridia galli*. Amount of 6 head chickens were divided into two groups. First group, the chickens were not immunized. Second group, the chickens were immunized with excretory/secretory. Active immunizations with excretory/secretory antigen were applied intra muscularly of chickens with an initial dose of 80 µg. The immunizations were repeated three times with dose of each 60 µg with an interval of one week. The

first immunizations were excretory/secretory antigen mixed with Freund Adjuvant Complete and subsequently mixed with Freund Adjuvant Incomplete. Antibody response in yolk was detected at weekly intervals by enzyme linked immunosorbant assay (ELISA). The result showed that antibody in yolk was begun detect with ELISA increased at two weeks after immunization, This study has shown that the excretory/secretory released in vitro by L₃ stage *A. galli* is capable of stimulating humoral immunity by mean of producing IgY in yolk.

Key words: *Ascaridia galli*, excretory/secretory antigen, antibody

2008 Agripet : Vol (8) No. 1: 21-26

PENDAHULUAN

Respons kekebalan ayam dipicu oleh pemaparan antigen yang strukturnya dikenali oleh sistem kekebalan sebagai sesuatu benda asing (*non-self*) yang dapat membentuk antibodi. Pada ayam petelur, pembentukan antibodi karena pemaparan antigen selain didistribusikan di dalam serum juga didepositkan di dalam kuning telur sebagai imunoglobulin *yolk* (IgY). Antigen dapat disuguhkan kepada sistem kekebalan sebagai kompleks multiantigen (partikulat) misalnya: bakteri, virus, parasit, dan partikel artifisial atau sebagai antigen tunggal misalnya protein dan polisakarida (Leenaars dan Hendriksen, 2005). Hanly *et al.* (1995) menyatakan bahwa sistem kekebalan daptan (antigen-spesifik) memiliki efisiensi dan spesifisitas yang tinggi, tetapi memiliki respons yang lebih lambat daripada sistem kekebalan bawaan (*innate unspecific*).

Ekskretori/sekretori cacing nematoda dapat berperan sebagai antigen karena bersifat

sebagai pemicu tanggapan kebal inang definitif. Pemaparan antigen ke dalam tubuh induk akan menghasilkan antibodi di dalam telur dengan spesifisitas antibodi yang tinggi terhadap antigen yang telah disuntikkan (Rollier *et al.*, 2000). Antibodi induk yang ditransfer secara pasif oleh induk kepada anaknya yang berfungsi sebagai pertahanan terhadap benda asing manakala sistem imun anak belum sempurna. Mekanisme transfer IgY dari serum ke dalam kuning telur berlangsung seperti proses transfer antibodi lintas plasenta pada mamalia. IgY yang telah diproduksi oleh limfosit B akan mengalir dalam pembuluh darah ke seluruh bagian tubuh termasuk ke dalam ovarium. IgY didepositkan melalui jaringan arteri kecil *ovarium-oosit* ke dalam kuning telur sebagai bahan perlindungan bagi embrio yang akan berkembang (Carlander, 2002).

Rollier *et al.* (2000) menyatakan bahwa untuk memicu pembentukan IgY itik Pekin (*Anas domesticus*) terhadap *Hepadnavirus* dapat dilakukan imunisasi awal pada minggu ke-4, 7, dan 10 dengan 100 µg,

Corresponding author: d_darmawi@yahoo.com

dan *booster* pada minggu ke-28 umur ayam dengan 200 µg antigen protein amplop virus Hepatitis B secara intra muskular. Carlander (2002) menyatakan bahwa 1 µg antigen sudah dapat memicu pembentukan IgY, namun ayam yang diinjeksi 4 kali dengan 25 – 100 µg antigen dapat menghasilkan IgY yang lebih banyak yaitu 40 – 100 mg setiap butir telur ayam yang diuji dengan teknik *enzyme linked immunosorbant assay* (ELISA).

Schmidt *et al.* (1989) telah memproduksi IgY anti-virus distemper terhadap anjing untuk kepentingan imunokimia. IgY dapat berperan lebih baik dibanding antibodi mamalia dalam imunodiagnostik, pencegahan dan pengobatan terhadap patogen pada infeksi gastrointestinal (Szabo *et al.*, 1998). Penyakit infeksius enterik yang disebabkan oleh mikroba pada manusia dan hewan dapat diobati melalui pemberian IgY spesifik secara oral sebagai imunisasi pasif (Mine dan Kovacs-Nolan, 2002).

Penelitian ini fokus pada evaluasi sifat imunogenik ekskretori/sekretori L₃ *A. galli* sebagai pemicu respons imunitas ayam petelur, khususnya respons humoral yang berimplikasi kepada terbentuknya IgY di dalam kuning telur. Antibodi anti-ekskretori/sekretori L₃ *A. galli* di dalam kuning telur dideteksi dengan uji ELISA. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui titer antibodi pada kuning telur dari ayam yang diimunisasi dengan antigen ekskretori/sekretori L₃ *A. galli*.

MATERI DAN METODE

Rancangan Penelitian

Antigen yang dibutuhkan untuk imunisasi ayam petelur diperoleh dari ekskretori/sekretori stadium L₃ *A. galli*. Kuantitas protein antigen diestimasi mengikuti metode Bradford. Enam ekor ayam petelur jenis *Hysex Brown* dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama, ayam tidak diimunisasi. Kelompok kedua, ayam diimunisasi secara intramuskular dengan antigen ekskretori/sekretori L₃ *A. galli* mengikuti metode Camenisch *et al.* (1999). Titer antibodi yang terbentuk diuji setiap minggu secara kuantitatif dengan metode ELISA mulai pada minggu pertama sebelum imunisasi dan berakhir pada minggu ke-10 pascaimunisasi.

Preparasi Antigen Ekskretori/Sekretori L₃ *A. galli*

Larva *A. galli* diinkubasi dalam sumur *cell culture plate*, masing-masing sumur diisi 25 – 50 larva dalam 5 ml medium *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Sigma-Aldrich), pH 6,8, tanpa merah fenol yang ditambahkan 100 unit ml⁻¹ penisilin G, 100 µg ml⁻¹ streptomisin, 5 µg ml⁻¹ gentamisin, dan 0,25 µg ml⁻¹ kanamisin dalam inkubator CO₂ selama 3 hari. Campuran medium dengan ekskretori/sekretori L₃ *A. galli* disentrifus pada 1000 gr dengan temperatur 4°C selama 10 menit. Supernatan disaring dengan membran filter 0,45 µm Minisart® (Sartorius), ditampung ke dalam tabung vivaspin 30.000 MWCO dan disentrifus pada 1000 g dengan temperatur 4°C selama 10 menit. Filtrat dicuci dengan larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dan disentrifus kembali 3 menit. Filtrat diambil dan dijadikan sebagai bahan antigen ekskretori/sekretori L₃ *A. galli* (Hintz *et al.*, 1998).

Teknik Imunisasi

Semua ayam dipastikan bebas dari infeksi cacing melalui pemeriksaan telur tiap gram tinja. Ayam dipelihara secara individual dalam kandang baterai yang diberi pakan komersial dan air minum secara *ad libitum*. Dua belas ekor ayam *HySex Brown* berumur 24 minggu digunakan sebagai ayam percobaan. Tiga ekor ayam digunakan sebagai kontrol, sedangkan sembilan ekor lainnya diimunisasi dengan ekskretori/sekretori larva *A. galli*.

Imunisasi dilakukan empat kali dalam interval waktu satu minggu setiap imunisasi. Teknik yang digunakan adalah suntikan pertama 80 µg ekskretori/sekretori larva *A. galli* dalam emulsi *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) yang diikuti dengan tiga kali suntikan *booster* (60 µg/imunisasi) dalam emulsi *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) (Camenisch *et al.*, 1999). Uji ELISA pada sampel kuning telur dari tiga ekor ayam yang diimunisasi dilakukan mulai minggu pertama sampai minggu ke-10 pascaimunisasi.

Uji Spesifisitas IgY Secara Kuantitatif: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

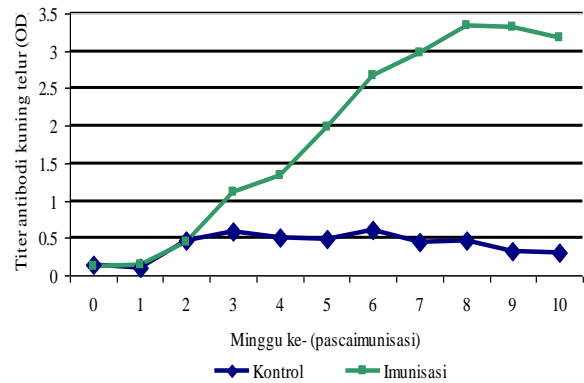
Uji ELISA dilakukan terhadap antibodi kuning telur. Sumur pada plat ELISA dilapisi dengan 100 µl antigen. Konsentrasi larutan yang digunakan adalah pengenceran 400 kali

antigen ekskretori/sekretori larva *A. galli* dalam 0,1 M NaHCO₃, pH 9,5. Plat diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 4⁰C. Plat dicuci sebanyak 3 kali dengan 0,15 M NaCl, 0,02 M NaHPO₄, 0,01% Tween 20, pH 7,2 (PBS-T) yang khusus digunakan sebagai larutan pencuci dalam ELISA. Sebanyak 100 µl sampel antibodi yang diencerkan 200 kali yang telah dilarutkan dalam PBS-T ditambahkan ke setiap lubang dari plat yang dibuat duplikat. Plate diinkubasikan selama satu sampai dua jam pada suhu ruangan di atas *shaker*. Plate dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan PBS-T. Sebanyak 100 µl antibodi yang telah dilabel (*IgY conjugate HRP*, anti-chicken) dimasukkan ke dalam lubang plat dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu ruangan di atas *shaker*, dan ditambahkan substrat peroksidase, ABTS, dan sitrat buffer. Plate dibaca dengan *ELISA Reader* panjang gelombang 415 nm (Yadav *et al.*, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Spesifisitas IgY Secara Kuantitatif: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Hasil titrasi menunjukkan bahwa konsentrasi antigen adalah pada pengenceran 1: 400, konsentrasi antiserum adalah pada pengenceran 1 : 200, dan konsentrasi konjugat adalah pada konsentrasi 1 : 1000. Pada uji ELISA diketahui bahwa konsentrasi optimum cairan ekskretori/sekretori larva *A. galli* yang dibutuhkan adalah 0,15 µg dalam setiap sumur ELISA. Gambar 1 menunjukkan titer antibodi di dalam kuning telur. Dibandingkan dengan kelompok ayam yang tidak diimunisasi, titer antibodi *optical density* (OD) ayam yang diimunisasi dengan ekskretori/sekretori larva *A. galli* mulai meningkat pada minggu kedua, dan mencapai puncaknya pada minggu kedelapan dan kesembilan pascaimunisasi. Titer antibodi mulai menurun pada minggu ke-10 pascaimunisasi. Antigen ekskretori/sekretori L₃ *A. galli* yang digunakan pada penelitian ini merupakan imunogen yang baik karena terbukti dapat menggerak sistem imunitas ayam petelur yang berimplikasi pada meningkatnya titer IgY di dalam kuning telur pada uji ELISA (Gambar 1).



Gambar 1. Titer antibodi di dalam kuning telur ayam

Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan Soejoedono *et al.* (2005) bahwa pemaparan antigen ke dalam tubuh induk ayam akan menghasilkan antibodi spesifik terhadap antigen yang disuntikkan. Ayam petelur yang diimunisasi dengan *Streptococcus mutans*, *Salmonella enteritidis*, dan *Escherichia coli* menunjukkan serum dan ekstraksi kuning telur positif mengandung IgY terhadap bakteri tersebut dua minggu pascaimunisasi. Imunisasi dengan antigen ekskretori/sekretori dapat melindungi hewan percobaan dari serangan *Dictyocaulus vivivarus* (McKeand, 1995). Ekskretori/sekretori yang merupakan komponen imunogenik telah digunakan untuk memicu pembentukan antibodi monoklonal terhadap *Onchocerca gibsoni* (Harnet *et al.*, 1997). Green (1996) membuktikan bahwa ekskretori/sekretori cacing nematoda dapat dikenal oleh antibodi pada hewan terinfeksi. Tiuria *et al.* (2003) menyatakan pula bahwa ekskretori/sekretori *A. galli* dapat merangsang mekanisme pertahanan mukosa usus halus ayam petelur.

Antigen yang dipaparkan kepada ayam dapat menggerak pelepasan interleukin (IL-4 dan IL-5) oleh sel T helper-2 (Th-2). IL-4 dapat membangkitkan sel B menjadi sel plasma pembentuk antibodi (Roitt dan Delves 2001). Molekul imunoglobulin diproduksi oleh sel limfosit B, dimana sel limfosit B mengalami pematangan dalam *bursa Fabricius* ayam. Sel limfosit B terdiri dari dua bentuk molekul yang berbeda, molekul pertama sebagai reseptor permukaan (untuk mengikat antigen) dan molekul lainnya sebagai antibodi yang disekresikan ke dalam cairan ekstraseluler. Mekanisme transfer IgY dari serum ke dalam

kuning telur sama seperti proses kelangsungan transfer antibodi lintas plasenta pada mamalia. IgY akan mengalir ke dalam pembuluh darah dan beredar ke seluruh bagian tubuh termasuk ke dalam ovarium. IgY didepositkan melalui jaringan arteri kecil ovarium-oosit ke dalam kuning telur sebagai bahan perlindungan bagi embrio ayam untuk berkembang (Carlander, 2002). Antibodi yang disekresikan dapat berfungsi sebagai media yang mengikat antigen melalui *binding site* yang spesifik, sekaligus merupakan jembatan yang menghubungkan antigen dengan sel-sel imun atau mengaktifkan komplemen (Roitt dan Delves, 2001).

Harnett *et al.* (1997) membuktikan bahwa aplikasi 300 µg ekskretori/sekretori *Ochocerca gibsoni* jantan dewasa yang diimunisasikan 50 µg setiap hari selama 6 hari berturut-turut dapat memicu respons humoral hewan percobaan. Imunisasi pertama dan kedua antigen diemulsikan FCA dan IFA berturut-turut. Sedangkan pada 4 kali *booster* selanjutnya digunakan PBS. Menurut Yoshihara *et al.* (1993) cairan tubuh cacing *Ascaris suum* betina dewasa dapat digunakan sebagai antigen untuk mendiagnosa ascariosis pada babi melalui uji ELISA. Terbukti bahwa reaksi spesifik terjadi antara cairan tubuh cacing dengan antibodi di dalam serum babi yang diinfeksi. Fraksi protein 105 kDa dari cairan tubuh cacing dewasa bereaksi sangat spesifik dengan IgG di dalam serum babi yang diinfeksi dengan *A. suum*. Pada uji ELISA diketahui juga bahwa konsentrasi optimum cairan tubuh cacing yang dibutuhkan adalah 0,25 µg dalam setiap sumur ELISA. Reaksi silang hanya ditemukan antara antigen dan serum babi yang diinfeksi dengan *Metastrongylus apri*.

Produksi sistein proteinase rekombinan dari Trematoda *Clonorchis sinensis* menurut Nagano (2004) menunjukkan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi dengan uji ELISA untuk diagnosa clonorchiosis pada manusia. Sensitifitas ELISA dengan antigen rekombinan dan ekstrak kasar cacing *C. sinensis* dewasa berturut-turut 96 dan 88%. Sedangkan spesifisitas ELISA dengan antigen rekombinan dan ekstrak kasar cacing *C. sinensis* dewasa berturut-turut 96,2 dan 100%. Analisa *western blotting* dari serum pasien yang menderita clonorchiosis bereaksi kuat dengan protein

rekombinan, tetapi bereaksi lemah dengan protein rekombinan *S. japonicum*. Uji *immunostaining* membuktikan bahwa cysteine proteinase *C. sinensis* berlokasi pada sel-sel epitel intestinal cacing dewasa dan pada telur intrauterin. Perkiraan asam amino sekuens enzim tersebut identik dengan cathepsin L dari *Paragonimus westermani*, *Schistosoma japonicum*, dan *Fasciola hepatica*.

Rangsangan pembentukan antibodi dapat dilakukan melalui teknik imunisasi dengan cara menginjektikan antigen dan adjuvant secara subkutan, intramuskular, atau secara oral dalam interval waktu tertentu. Schade *et al.* (1999) merekomendasikan bahwa untuk produksi IgY pada ayam petelur dosis antigen yang akan digunakan adalah 10 – 100 µg dalam emulsi FCA untuk memicu reaksi lokal pada jaringan subkutan atau intramuskular. Frekuensi vaksinasi dilakukan dua sampai tiga kali *booster* dalam interval waktu 4 – 8 minggu sebelum masa ayam bertelur. Teknik imunisasi pada ayam yang dilakukan Camenisch *et al.* (1999) untuk memicu terbentuknya IgY *anti human hypoxia-inducible factor 1* (anti-HIF-1α) dalam kuning telur ayam adalah dengan menyuntikkan 80 µg antigen fusi protein plasmid bakteri yang mengekspresikan HIF-1α dengan glutathione S-transferase yang diresuspensi dengan 500 µl PBS dan dicampur dengan 500 µl CFA pada otot dada. *Booster* dilakukan dua kali dengan cara menyuntikkan 60 µg antigen yang dicampur dengan IFA pada minggu ke-2 dan 4.

IgY yang didepositkan ke dalam kuning telur bervariasi kuantitasnya, tergantung pada jenis antigen dan jenis ayam yang digunakan. Haak-Frendscho (1994) melaporkan bahwa ayam petelur *White Leghorn* yang diinjeksi pada beberapa lokasi *subcutan* dengan 20 – 500 µg antigen yang dicampur dengan FCA dan diikuti 2-3 kali *booster* dapat menghasilkan 90 – 100 mg IgY, 1 -10% (1 -10 mg) diantaranya adalah IgY spesifik dalam setiap butir telur. Rollier *et al.* (2000) membuktikan bahwa dalam setiap butir telur yang dihasilkan oleh ayam yang diimunisasi dengan antigen *Hepadnavirus* ditemukan 60 – 100 mg IgY spesifik terhadap antigen virus tersebut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan ekskretori/sekretori stadium L₃ *A. galli* bersifat imunogenik yang dapat memicu respons imunitas humoral ayam petelur yang ditandai dengan peningkatan titer antibodi di dalam *yolk*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada DP3M Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Bersaing. Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada Kosasih, Sulaeman, dan Yono atas bantuan teknis yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R. H. and Gassmann, M., 1999. General Applicability of Chicken Egg Yolk Antibodies: the Performance of IgY Immunoglobulins Raised Against the Hypoxia-inducible Factor 1 α . *J. FASEB*. 13: 81-88.
- Carlander, D., 2002. Avian IgY Antibody: in vitro and in vivo. Dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Green, R.S., 1996. Antibody Responses of Grazing Alpacas (*Lama pacos*) in New Zealand to Intestinal Nematodes. *Int. J. for Parasitol.* 26(4): 429 – 435.
- Haak-Frendscho, M., 1994. Why IgY? Chicken Polyclonal Antibody, an Appealing Alternative. *Promega Notes Magazine* (46): 11.
- Hanly, W.C., Artwohl, J.E. and Bennett, B.T., 1995. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR News* 37:93.
- Harnett, W., MacDonald, M., Preece, G., Patterson, M. and Parkhouse, M.E., 1997. Production of Monoclonal Antibodies Against Excretory-Secretory Products of Adult Male *Onchocerca gibsoni*. *J. of Parasitol.* 83(2): 316 – 319.
- Hintz, M., Schares, G., Taubert, A., Geyer R., Zahner, H., Stirn, S. and Conraths, F.J., 1998. Juvenile Female *Listomosoides sigmodontis* Produce an Excretory-Secretory Antigen (Juv-p120) Highly Modified with Dimethylaminoethanol. *J. of Parasitol.* 171: 265-271.
- Leenaars, M. and Hendriksen, C.F.M., 2005. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations, *ILAR J.* 46: 269 - 279.
- McKeand, J.B., Knox, D.P., Duncan, J.L. and Kennedy, M.W., 1995. Protective Immunisation of Guinea Pigs Against *Dictyocaulus viviparus* Using Excretory/Secretory Product of Adult Parasites. *Int. J. for Parasitol.* 25: 93 – 104.
- Mine, Y. and Kovacs-Nolan, J., 2002. Chicken Egg Yolk Antibodies as Therapeutics in Enteric Infectious Disease: A Review. *J. Med. Food* 5: 159 – 169.
- Nagano, 2004. Molecular Expression of a Cysteine Proteinase of *Clonorchis sinensis* and Its Application to an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Immunodiagnosis of Clonorchiasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Am. for Microbiol.* 11(2): 411 - 416 <http://cdli.asm.org/cgi/content/full/11/2/411> (01-03-2005)
- Roitt, I.M. and Delves, P.J., 2001. *Roitt's Essential Immunology*. Tenth Edition, Blackwell Science Ltd. Osney Mead Oxford OX2 OEL.
- Rollier, C., Charollois, C., Jamrd, C., Trepo, C. and Cova, L., 2000. Maternally Transferred Antibodies from DNA-Immunized Avians Protect Offspring Against Hepadnavirus Infection. *J. of Virol.* 74(10): 4908 – 4911.
- Schade, R., Henklein, P. and Hlinak, A., 1999. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. The Report And Recommendations of ECVAM Workshop 21^{1,2}. Reprinted with Minor Amend-ments from ATLA 24: 925 - 934.

- Schmidt, P., Wiedemann, V., Kühlmann, R., Wanke, R., Linckh, E. and Lösch, U., 1989. Production of Antibodies to Canine Distemper Virus in Chicken Eggs for Immunochemistry. *J. of Vet. Med. B* 36: 661 – 668.
- Soejoedono, R.D., Wibawan, I.W.T. dan Hayati, Z., 2005. Pemanfaatan Telur Ayam Sebagai Pabrik Biologis: Produksi "Yolk Immunoglobulin" (IgY) Anti Plaque dan Diare dengan Titik Berat pada Anti Streptococcus mutans, Escherichia coli dan Salmonella enteritidis. Laporan Riset Unggulan Terpadu, Kementrian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia.
- Szabo, C.S., Bardos, L., Losonczy, S. and Kachesz, K., 1998. Isolation of Antibodies from Chicken and Quail Eggs. Presented at INABIS '98 – 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada, December 7–16th. <http://www.mcmaster.ca/inabis98/immunology/-szabo0509/index.html> (20-11-06)
- Tiuria, R., Ridwan, Y. and Murtini, S., 2003. Study of Bioactive Substance from *Ascaridia galli* Adult Worm that Stimulate Intestinal Mucosal Defense Mechanism in Chicken for Medical Purpose. Proceeding of the Seminar on Science and Technology, Indonesia-Toray Science Foundation, Jakarta.
- Yadav, S.C, Saini, M., Raina, O.K., Nambi, P.A., Jadav, K. and Sriveny, D., 2005. *Fasciola gigantica* Cathepsin-L Cysteine Proteinase in the Detection of Early Experimental Fasciolosis in Ruminants. http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j_436_005-1466-8.html.html (21-02-2006)
- Yoshihara, S., Oya, T., Furuya, T. and Goto, N., 1993. Use of Body Fluid of Adult Female *Ascaris suum* as an Antigen in the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Diagnosis of Swine Ascariasis. *J. of Helminthol.* 67: 279 – 286.