

## BIOCHIMIE DU LIQUIDE HYDATIQUE (*ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*). INFLUENCE DE LA LOCALISATION SUR LA PERMÉABILITÉ DES KYSTES

E. VIDOR\*, M.-A. PIENS\*, M. ABBAS\*\* et A.-F. PETAVY\*

**RÉSUMÉ.** Onze métabolites ont été dosés dans le liquide hydatique de 19 kystes humains ainsi que dans le plasma des patients avant l'intervention chirurgicale. Le dosage des anticorps spécifiques, associés à chacun de ces kystes de localisation et de taille variables, a été assuré par immunofluorescence indirecte sur coupe en congélation de protoscolex.

Les résultats montrent que le sodium ( $132 \pm 5,2$  mmol/l), le chlore ( $92,9 \pm 6,5$  mmol/l) et les bicarbonates ( $22,1 \pm 1,5$  mmol/l) représentent les 3 ions principaux et qu'ils sont en équiconcentration avec le plasma. Le potassium ( $5,4 \pm 0,3$  mmol/l) et le calcium ( $4,7 \pm 0,9$  mmol/l) sont plus concentrés qu'au niveau plasmatique. Le phosphore ( $0,1 \pm 0,03$  mmol/l) l'est 10 fois moins. Le glucose ( $3,4 \pm 0,8$  mmol/l), la créatinine ( $39,3 \pm 7,2$   $\mu$ mol/l) et l'urée ( $4,6 \pm 0,8$  mmol/l) subissent des variations importantes. Le cholestérol ( $0,06 \pm 0,03$  mmol/l) est environ 100 fois moins concentré qu'au niveau plasmatique. Les protéines totales ( $0,34 \pm 0,09$  g/l) sont en très faible quantité.

Les kystes extra-pulmonaires sont associés aux réponses immunes les plus fortes, et aucune corrélation n'est observée entre la taille des kystes et l'intensité des réponses immunes associées. Une différence significative des concentrations relatives en cholestérol (concentration kystique / concentration plasmatique) est observée entre les kystes pulmonaires et extra-pulmonaires (respectivement  $0,0048 \pm 0,0032$  et  $0,018 \pm 0,01$  —  $p < 0,05$ ). Ces derniers sont environ 4 fois plus riches en cholestérol. La taille des kystes et l'intensité des réponses immunes associées n'ont pas d'influence sur ce phénomène. L'hypothèse d'une perméabilité plus importante des kystes extra-pulmonaires est avancée.

**Mots clés :** *Echinococcus granulosus* ; Liquide hydatique ; Biochimie ; Perméabilité.

### Hydatid cyst fluid (*Echinococcus granulosus*) biochemistry. Influence of localization on cyst permeability.

**SUMMARY.** Eleven metabolites were determined in 19 hydatid cyst fluids of variable size and localization, and in patients plasma before surgery. Specific indirect immunofluorescent antibody titration was carried out.

Sodium ( $132 \pm 5,2$  mmol/l), chloride ( $92,9 \pm 6,5$  mmol/l) and bicarbonate ( $22,1 \pm 1,5$  mmol/l) were found at the same concentration than in plasma. Potassium ( $5,4 \pm 0,3$  mmol/l) and calcium levels ( $4,7 \pm 0,9$  mmol/l) were higher than in plasma, and phosphate ( $0,1 \pm 0,03$  mmol/l) decrea-

\* Département de Médecine et d'Hygiène tropicale, 8 avenue Rockefeller, F 69373 Lyon Cedex 08.

\*\* Clinique de pneumophtisiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Constantine, Algérie.

Accepté le 27 septembre 1985.

sed tenfold. Glucose ( $3,4 \pm 0,8$  mmol/l), creatinine ( $39,3 \pm 7,2$   $\mu$ mol/l) and urea nitrogen ( $4,6 \pm 0,8$  mmol/l) showed great variations. Cholesterol levels ( $0,06 \pm 0,03$  mmol/l) were a hundredfold lower than in plasma. Total protein levels ( $0,34 \pm 0,09$  g/l) were found at very low concentrations.

Extra-pulmonary cysts showed significantly higher antibody titers than pulmonary cysts. No correlation was observed between the size of the cysts and the level of the immune response.

Significant difference about the relative cholesterol concentration (cystic concentration / plasmatic concentration) was observed between pulmonary and extra-pulmonary cysts (respectively  $0,0048 \pm 0,0032$  and  $0,018 \pm 0,01$  —  $p < 0,05$ ). No correlation was observed between the size of the cyst, or the corresponding levels of the immune response, and the cholesterol levels. The hypothesis of a greater membrane permeability in extra-pulmonary cyst is discussed.

**Key words :** *Echinococcus granulosus* ; Hydatid cyst fluid ; Biochemistry ; Permeability.

---

## Introduction

La biochimie du liquide hydatique est complexe. Les électrolytes plasmatiques ainsi que l'urée et la créatinine sont présents (G. J. Frayha et R. Haddad, 1980). Le glucose et des marqueurs du métabolisme des glucides sont retrouvés (M. Agosin et coll., 1957 ; L. Mac-Manus et J. D. Smyth, 1978). Le cholestérol représente l'un des composants lipidiques du liquide (G. J. Frayha, 1968). La synthèse de ce métabolite n'a pu être démontrée chez *Echinococcus granulosus* (G. J. Frayha, 1971, 1974 ; G. A. Digenis et coll., 1970). Il est admis que le cholestérol pénètre dans le kyste par diffusion au travers de la membrane (J. M. Bahr et coll., 1979). Parmi les protéines retrouvées dans le liquide, une partie est d'origine parasitaire (M. Agosin et Y. Repetto, 1967) et une autre provient de l'hôte (E. A., Coltorti et V. M. Varela-Diaz, 1972, 1974 ; S. T. Hustead et J. F. Williams, 1977a). Toutes les protéines plasmatiques sont représentées (C. G. Goodchild et E. G. Kagan, 1961).

Les études biochimiques du liquide hydatique humain n'ont pas tenu compte de la localisation des kystes, ni de l'intensité des réponses immunes spécifiques.

Notre étude a été suggérée, par le fait qu'*in vitro* des anticorps spécifiques et du complément augmentent la perméabilité membranaire de *Taenia taeniaeformis* et *Taenia crassiceps* à différents métabolites (glucose, sucrose, méthionine, RNase) (K. D. Murrel, 1971 ; S. T. Hustead et J. F. Williams, 1977b).

Le but de celle-ci est de :

- doser certains constituants biochimiques du liquide hydatique humain.
- d'analyser l'influence de la localisation anatomique, de la taille des kystes, et de l'intensité de la réponse humorale spécifique de l'hôte sur cette composition.

L'analyse porte sur des kystes humains de localisations et de tailles différentes, associés à des réponses humorales spécifiques variées.

## Matériel et méthodes

### 1 - Matériel

Les kystes hydatiques ont été prélevés chirurgicalement chez des malades, tous d'origine algérienne (région de Constantine), dans le même service hospitalier. Aucun traitement anti-parasitaire n'a été administré aux malades avant l'intervention. Les kystes n'étaient ni fissurés, ni rompus, ni surinfectés.

Après ablation, les kystes ont été laissés au repos 5 minutes afin de laisser sédimenter le sable hydatique. Par ponction à l'aiguille, le liquide hydatique a été réparti dans 3 tubes secs (5 ml) et placé à 4° C jusqu'à l'analyse biochimique (délai maximal de 3 heures). Au cours du bilan préopératoire, un dosage plasmatique des métabolites recherchés au niveau du liquide hydatique, ainsi qu'une évaluation du taux des anticorps spécifiques ont été effectués.

### 2 - Procédures analytiques

Les dosages n'ont porté que sur une seule mesure par échantillon. Ils ont été effectués en flux continu (SMA II, Technicon) pour les 9 premiers : le sodium, le potassium et le chlore par photométrie de flamme ; le phosphore par colorimétrie au phosphomolybdate selon la technique de H. Goldenberg et A. Fernandez (1966) ; le calcium par colorimétrie au méthylthymol selon la technique de E. M. Gindler et J. D. King (1972) ; les bicarbonates par colorimétrie au rouge de crésol selon la technique de L. T. Skeggs et H. Hochstrasser (1972) ; L'urée par colorimétrie au diacétyl-monoxime selon la technique de W. H. Marsh et coll. (1965) ; le glucose par colorimétrie à la glucose-oxydase selon la technique de M. Gochman et J. M. Schmitz (1972) ; la créatinine par colorimétrie à l'acide picrique selon la technique de A. L. Chasson et coll. (1961). Le cholestérol total a été dosé par colorimétrie à l' amino-4-antipyrine selon la technique de C. C. Alain et coll. (1974). Les protéines totales sanguines ont été déterminées par la technique du biuret de A. G. Gornall et coll. (1949). Les protéines totales du liquide hydatique ont été dosées par la technique à l'acide trichloracétique de O. Meulemans (1960) adaptée sur ACA III (Dupont de Nemours).

L'évaluation du taux des anticorps spécifiques a été faite par immunofluorescence indirecte sur coupe en congélation de suspension de protoscolex. La technique utilisée a été décrite par P. Ambroise-Thomas (1969). Le titre est donné par la dernière dilution du sérum donnant une fluorescence positive.

### 3 - Analyse des résultats

Nous avons utilisé le test t de Student, l'analyse de variance, et le calcul du coefficient de corrélation pour comparer les variables suivantes :

— les concentrations des métabolites étudiés,

- la localisation anatomique du kyste (pulmonaire, extra-pulmonaire) ;
- La taille du kyste (diamètre en cm) ;
- Le titre des anticorps spécifiques.

## Résultats

Dix-neuf kystes ont été analysés (9 pulmonaires, 4 hépatiques, 5 péritonéaux et 1 myocardique) provenant de 13 malades ; 2 malades étaient porteurs de localisations multiples. Certains dosages n'ont pu être effectués par manque de liquide hydatique.

Les résultats des dosages dans le liquide hydatique figurent dans le *tableau I*.

TABLEAU I. — Concentration de 11 métabolites (mmol/l) dans le liquide hydatique de kystes humains.

Sodium	132 ± 5,2* (17)	Urée	4,6 ± 0,8 (17)
Potassium	5,4 ± 0,3 (17)	Créatinine (μmol/l)	39,3 ± 7,2 (16)
Chlore	92,9 ± 6,5 (17)	Glucose	3,4 ± 0,8 (17)
Calcium	4,7 ± 0,9 (16)	Cholestérol	0,06 ± 0,03 (18)
Phosphore	0,1 ± 0,03 (13)	Protéines totales (g/l)	0,34 ± 0,09 (16)
Bicarbonates	22,1 ± 1,5 (17)		

\* Moyenne des mesures avec intervalle de confiance à 5 %.

( ) Nombre de kystes analysés.

Le sodium, le chlore et les bicarbonates représentent les 3 ions principaux.

Le glucose est retrouvé à des concentrations importantes avec des taux allant de 1,1 à 6,4 mmol/l. Le cholestérol présente de grandes variations (0,01 à 0,24 mmol/l). Les protéines totales sont en faible quantité (0,34 g/l).

Les rapports des concentrations kystiques sur les concentrations plasmatiques des métabolites étudiés sont présentés sur la *figure 1*. Le calcium et le potassium sont plus concentrés dans le liquide hydatique que dans le plasma. Le phosphore l'est 10 fois moins.

La créatinine et le glucose sont en plus faible concentration, mais avec des variations importantes. Le cholestérol est 100 fois moins concentré et les protéines 200 fois moins concentrées dans le liquide hydatique que dans le plasma.

Les réponses immunes spécifiques associées à ces 19 kystes figurent au *tableau II*.

Une différence significative entre les réponses immunes des kystes pulmonaires, extra-pulmonaires et associés est mise en évidence ( $F = 4,22$  ;  $p < 0,05$ ). Les kystes pulmonaires donnent les réponses les plus faibles. Il ne peut être mis en évidence de corrélation significative entre la taille du kyste et l'intensité de la réponse immunitaire spécifique ( $r = -0,05$  ; NS).

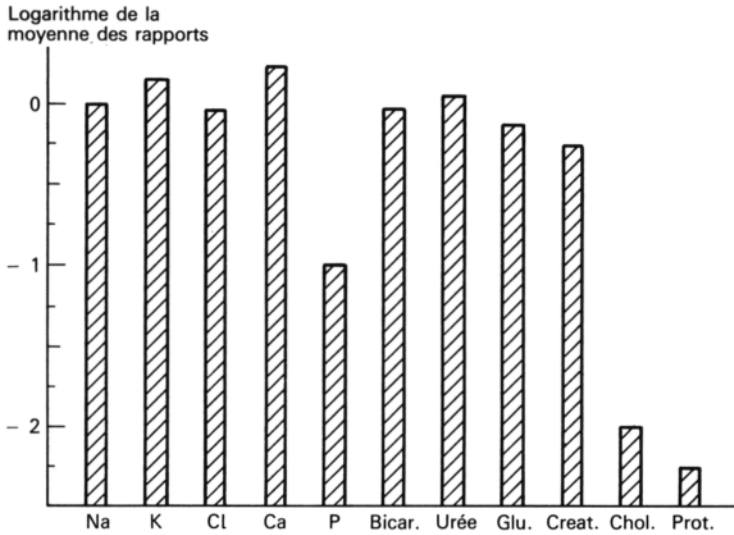


FIG. 1. — Rapports des concentrations kystiques sur les concentrations plasmatiques de 11 métabolites étudiés sur 19 kystes hydatiques humains.

(Bicar : bicarbonates ; Glu : glucose ; Creat : créatinine ; Chol : cholestérol ; Prot : protéines).

TABLEAU II. — Titre des anticorps spécifiques associés à 19 kystes hydatiques humains en fonction de leurs localisations anatomiques et de leurs tailles.

Localisation	Titre des anticorps	Diamètre (cm)
Pulmonaire	1/10	8
	1/10	10
	1/10	9
	1/80	6
	1/20	9
	1/80	6
	1/80	16
Extra-pulmonaire	1/160	7
	1/160	10
	1/160	9
	1/40	8
	1/320	13
Pulmonaire et extra-pulmonaire associées chez un même malade.	1/640	9
	1/640	6
	1/40	7
	1/40	3
	1/40	6
	1/40	15
	1/320	5

— Variance des réponses immunes entre localisations ( $F = 4,22 ; p < 0,05$ ).

— Corrélation entre la taille du kyste et le titre des anticorps ( $r = -0,05 ; NS$ ).

**Influence de la localisation anatomique.** (*tableau III*).

Une différence significative des concentrations relatives en cholestérol (concentration kystique / concentration plasmatique) est notée entre les kystes pulmonaires et extra-pulmonaires ( $t = 2,54$  ;  $p < 0,05$ ). Ces derniers sont les plus riches en cholestérol (environ 4 fois plus). Aucune différence n'est observée pour le calcium, l'urée, le glucose, la créatinine et les protéines totales.

TABLEAU III. — Variation de la concentration relative en cholestérol (Concentration kystique / Concentration plasmatique) du liquide hydatique en fonction de la localisation du kyste.

Localisation	Nombre de kystes	Moyenne des rapports des concentrations	Test t
Pulmonaire	8	$0,0048 \pm 0,0032^*$	2,54**
Extra-pulmonaire	11	$0,018 \pm 0,01$	

\* Moyenne des rapports avec intervalle de confiance à 5 %.

\*\*  $p < 0,05$ .

**Influence de la taille du kyste et de l'intensité de la réponse immune spécifique**

Aucune corrélation significative n'a pu être démontrée entre ces 2 variables et les concentrations en calcium, urée, glucose, créatinine, cholestérol et protéines totales.

**Discussion**

Tous les patients proviennent d'une même région. Une absence de variations dues à plusieurs souches parasitaires en cause est donc admise. Les dosages ne portent que sur une seule détermination par échantillon biologique. On sait que les concentrations plasmatiques des métabolites étudiés subissent des variations chez un même patient. Par conséquent l'estimation des rapports des concentrations kystiques sur les concentrations plasmatiques est imprécise et donne un ordre de grandeur.

Les résultats sont en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature. G. J. Frayha et R. Haddad (1980), travaillant sur des kystes de souris et de moutons, notent que le sodium et le chlore représentent les 2 ions principaux. Ils remarquent une présence de calcium et de potassium à des taux supérieurs aux taux plasmatiques. Le cholestérol est retrouvé à des taux comparables aux nôtres, et les protéines totales (2,7 à 3,1 g/l) sont beaucoup plus concentrées.

La composition en électrolytes du liquide hydatique est proche de celle du plasma (*tableau I*). La richesse en calcium des corpuscules calcaires des protoscolex d'*Echinococcus granulosus* explique vraisemblablement la teneur importante de cet ion dans le liquide. Bien que certains kystes soient associés à des réponses immunes élevées (1/640), aucune variation de concentration du calcium n'est observée.

E. A. Coltorti et V. M. Varela-Diaz (1972) ont montré que les immunoglobulines spécifiques pénètrent dans les membranes et le liquide des kystes. *In vitro* A. I. Kassis et C. E. Tanner (1976) ont montré que les protoscolex peuvent être détruits par lyse complémentaire en présence d'anticorps spécifiques. *In vivo*, le liquide hydatique contient des facteurs du complément mais ceux-ci sont inefficaces car inactivés par des substances d'origine parasitaire (B. Hammerberg et coll., 1977). Les anticorps spécifiques qui pénètrent dans les kystes sont donc inactifs. Ces phénomènes expliquent peut-être l'absence de variations de la teneur en calcium dans les kystes selon l'intensité de la réponse immune associée.

L'urée, la créatinine et le glucose sont des marqueurs du métabolisme de l'azote et des glucides. Ils sont retrouvés à des concentrations légèrement inférieures à celles du plasma, avec des variations importantes. Celles-ci ne semblent liées ni à la localisation des kystes, ni à leur taille, ni à l'intensité des réponses immunes associées. Cette absence de variation peut être expliquée par le fait que ce sont des métabolites qui proviennent à la fois de l'hôte et des protoscolex d'*Echinococcus granulosus*.

Le cholestérol n'est pas synthétisé par *Echinococcus granulosus* (G. J. Frayha, 1974). Il pénètre dans le kyste par passage au travers de la membrane à partir du compartiment plasmatique. La teneur en cholestérol dans celui-ci subit des variations importantes, (valeurs allant de 3,6 à 9,2 mmol/l dans notre série). En effectuant le rapport de la concentration dans le liquide hydatique sur la concentration plasmatique en cholestérol, on observe que les kystes pulmonaires sont moins perméables que les kystes extra-pulmonaires (*tableau III*). La taille du kyste n'intervient pas, ni l'intensité de la réponse immune.

La concentration en protéines totales est faible (0,34 g/l). Elle ne subit aucune variation significative.

Ce sont les kystes extra-pulmonaires qui donnent les réponses immunes spécifiques les plus fortes (*tableau II*). Ce résultat est en accord avec celui trouvé pour le cholestérol. En effet, les kystes extra-pulmonaires semblent les plus perméables. Ceci aboutit à une issue plus importante d'antigènes responsable de la forte réponse immune et à une entrée plus massive de cholestérol à l'intérieur des kystes. M. A. Piens et coll., (1984) ont noté ce phénomène en observant une concentration en flubendazole plus importante dans 14 kystes extra-pulmonaires que dans 4 kystes pulmonaires au cours d'un protocole de traitement médical. P. S. Craig et G. S. Nelson (1984) mettent en évidence des niveaux d'antigènes circulants plus importants chez des porteurs de kystes hépatiques que chez des porteurs de kystes pulmonaires.

La confirmation de ce phénomène, par des études complémentaires, permettrait d'expliquer le meilleur passage des molécules pharmacologiquement actives dans les kystes extra-pulmonaires.

REMERCIEMENTS : Les auteurs remercient les médecins, chirurgiens et anesthésistes qui nous ont permis de réaliser ce travail : le Professeur M. Perrin-Fayolle, et les Docteurs Chambon, Coopéré, Guibert, Hadj, Rochette. Nous remercions également les Docteurs Damour, Manchon et Verdier pour leur aide concernant les dosages biochimiques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. AGOSIN M., REPETTO Y. : Studies on the metabolism of *Echinococcus granulosus* .IX. Protein synthesis in Scolices. *Exp. Parasitol.*, 1967, 21, 195-208.
2. AGOSIN M., VON BRAND T., RIVERA F., MC MAHON M. : Studies on the metabolism of *Echinococcus granulosus* .I. General chemical composition and respiratory reactions. *Exp. Parasitol.*, 1957, 6, 37-51.
3. ALLAIN C. C., POON L. S., CHAN C. S. G., RICHMOND C., FU P. C. : Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, 1974, 20, 470-475.
4. AMBROISE THOMAS P. : Étude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. *Thèse Doctorat ès Sciences Naturelles* (État), Lyon, 1969, n° 531, 645 p.
5. BARR J. M., FRAYHA G. J., HAJJAR J. J. : Mechanism of cholesterol absorption by the hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* (Cestoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, 62A, 485-490.
6. CHASSON A. L., GRADY H. J., STANLEY M. A. : Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1961, 35, 83-88.
7. COLTORTI E. A., VARELA-DIAZ V. M. : Ig G levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *J. Parasitol.*, 1972, 58, 753-756.
8. COLTORTI E. A., VARELA-DIAZ V. M. : *Echinococcus granulosus* : penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes of cysts. *Exp. Parasitol.*, 1974, 35, 225-231.
9. CRAIG P. S., NELSON G. S. : The detection of circulating antigen in human hydatid disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1984, 78, 219-227.
10. DIGENIS G. A., THORSON R. E., KONYALIAN A. : Cholesterol biosynthesis and lipid biochemistry in the scolex of *Echinococcus granulosus*. *J. Pharm. Sci.*, 1970, 59, 676-679.
11. FRAYHA G. J. : A study on the synthesis and absorption of cholesterol in hydatid cysts (*Echinococcus granulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1968, 27, 875-878.
12. FRAYHA G. J. : Comparative metabolism of acetate in the taeniid tapeworms *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis* and *Taenia hydatigena*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1971, 39B, 167-170.
13. FRAYHA G. J. : Synthesis of certain cholesterol precursors by hydatid protoscolices of *Echinococcus granulosus* and cysticerci of *Taenia hydatigena*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1974, 49B, 93-98.
14. FRAYHA G. J., HADDAD R. : Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* (Cestoda). *Int. J. Parasitol.*, 1980, 10, 359-364.
15. GINDLER E. M., KING J. D. : Rapid colorimetric determination of calcium in biologic fluids with methylthymol blue. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1972, 58, 376-382.
16. GOCHMAN M., SCHMITZ J. M. : Application of a new peroxide indicator reaction to the specific, automated determination of glucose with glucose — oxidase. *Clin. Chem.*, 1972, 18, 943-950.
17. GOLDENBERG H., FERNANDEZ A. : Simplified method for the estimation of inorganic phosphorus in body fluids. *Clin. Chem.*, 1966, 12, 871-882.
18. GOODCHILD C. G., KAGAN I. G. : Comparison of proteins in hydatid fluid and serum by means of electrophoresis. *J. Parasitol.*, 1961, 47, 175-180.
19. GORNALL A. G., BARDAWILL C. G., DAVID M. M. : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, 751-766.
20. HAMMERBERG B., MUSOKE A. J., WILLIAMS J. F. : Activation of complement by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.*, 1977, 63, 327-331.
21. HUSTEAD S. T., WILLIAMS J. F. : Permeability studies on taeniid metacestodes : I. Uptake of proteins by larval stages of *Taenia taeniaformis*, *T. crassiceps*, and *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.*, 1977a, 63, 314-321.
22. HUSTEAD S. T., WILLIAMS J. F. : Permeability studies on taeniid metacestodes : II. Antibody-mediated effects on membrane permeability in larvae of *Taenia taeniaformis* and *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.*, 1977b, 63, 322-326.
23. KASSIS A. I., TANNER C. E. : the role of complement in hydatid disease : *in vitro* studies. *Int. J. Parasitol.*, 1976, 6, 25-35.
24. MAC MANUS L., SMYTH J. D. : Differences in the chemical composition and carbohydrate metabolism of *Echinococcus granulosus* (horse and sheep strain) and *E. multilocularis*. *Parasitology*, 1978, 77, 103-109.
25. MARSH W. H., FINGERHUT B., MILLER H. : Automated and manual direct methods for the determination of blood urea. *Clin. Chem.*, 1965, 6, 624-627.
26. MEULEMANS O. : Determination of total protein in spinal fluid with sulphosalicylic acid and trichloroacetic acid. *Clin. Chem. Acta.*, 1960, 5, 757-761.
27. MURREL K. D. : The effect of antibody on the permeability control of larval *Taenia taeniaformis*. *J. Parasitol.*, 1971, 57, 875-880.
28. PIENS M. A., EXCLER J. L., MAISONNEUVE H., PAILLARD B., GARIN J. P. : Flubendazole dans l'hydatidose humaine à *Echinococcus granulosus*. Action préopératoire : étude parasitopharmacologique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1984, 77, 69-80.
29. SKEGGS L. T., HOCHSTRASSER H. : Multiple automated sequential analysis. *Clin. Chem.*, 1972, 16, 918-936.