نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۶، پاییز ۱۳۹۱

شناسائی سویه *Toxoplasma gondii* در انسان و موش در شهرستان ارومیه به روش PCR–RFLP

• **موسی توسلی** (نویسنده مسئول)
استاد انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
• **محمد قربانزادگان**
دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
• **بیژن اسمعیل نژاد خیاوی**
دانشجوی دکترای تخصصی (Ph.D) انگل شناسی دامپزشکی دانشگاه ارومیه
• **کریم مردانی**
دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
• **سیامند حسین زاده**
دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه
تاریخ دریافت: مهر ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: آذر ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۴۶۲۵۹۸
Email: mtavassoli2000@yahoo.com

چکیده

T.gondii **یک کوکسیدیای روده ای است و آلودگی به آن در انسان و حیوانات خونگرم در سراسر دنیا وجود دارد.این تک یاخته می تواند سبب واگیری شدید و تلفات در جنین در حال رشد، موارد نقص سیستم ایمنی مانند مبتلایان به ایدز و افرادی مبتلا به سرطان که تحت شیمی درمانی قرار دارند، شود. هم چنین موجب سقط جنین در گوسفند و بز و ایجاد خسارات اقتصادی مهم می گردد. در این بررسی از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR)به منظور تشخیص آلودگی به *T.gondii* با استفاده از ژن B 1 استفاده گردید.این ژن در هر سه سویه توکسوپلاسما که تا به حال مشخص شده اند، وجود دارد.نمونه های خون در این بررسی از ۲۶ نفر از افراد مشکوک به توکسو پلاسما از آزمایشگاه های انسانی و نمونه های بافت از قلب و مغز ۵۴ قطعه موش خانگی در شهرستان ارومیه اخذ گردید. در این بررسی برای استخراج DNA از روش Fuentes و همکاران ۱۹۹۶ برای نمونه های خون انسان و از روش Sambrook و همکاران ۱۹۸۹ برای نمونه های بافت مغز و قلب موش استفاده شد.بعد از ردیابی محصولات PCR مشخص گردید که ۱۹ نمونه آلوده به توکسوپلاسما گوندئی در بین نمونه های اخذ شده وجود دارد (۷ نمونه انسان و ۱۲ نمونه موش).نمونه های مثبت تحت هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده AluI قرار گرفتند که الگوی برش بعد از هضم آنزیمی محصول PCR کاملاً مشابه بود که مربوط به تیپ *T.gondii* I می باشد. این نتایج نشان می دهد که سویه مشابه از *T.gondii* می توانند باعث آلودگی در انسان و موش گردد.**

کلمات کلیدی: ***T.gondii*** **، انسان، موش، ارومیه، واکنش زنجیره ای پلی مراز، هضم آنزیمی**

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 96 pp: 29-34

Identification of *Toxoplasma gondii* strain in human and mouse in Urmia by PCR-RFLP

By: M. Tavasoli, Professor of Veterinary Faculty. Urmia University, (Corresponding Author; Tel: +989144462598), Ghorhbanzadegan M. Veterinary Faculty, Urmia University, Esmailnejad B. PhD. Student of Veterinary Faculty Urmia University, Mardani K. and Hosseinzadeh S. Veterinary Faculty Urmia University.

Infection by *Toxoplasma gondii* is widespread inhumans and many other species of warm-blooded animals. It can cause significant morbidity and mortality in the developing fetus and in immunocompromised individuals, including humans with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) or submitted to cancer chemotherapy. Among livestock, sheep and goat are more widely infected with *T. gondii*. This parasite is a major cause of abortion, with significant economic losses to sheep and goat breeders. We applied the polymerase chain reaction (PCR) for detection of the pathogenic protozoan *T. gondii* based on its B1 gene. The B1 gene is present and conserved in all six *T. gondii* strains identified to date. For this purpose 26 suspected human's blood samples and 54 mice brain and heart were collected from Urmia. In this study, PCR was performed using the previously described primers (Homanet al 2000), which were designed to detect the B1 gene of T. gondii. The targeted B1 gene is highly conserved in all *T. gondii* strains and is multiple copy genes within the *T. gondii* genome. The method used for the characterization of *T. gondii* strains implied digestion with AluIrestriction enzyme of the fragments amplified. The results indicated 19 positive samples (7 human and 12 mouse samples). The 529bp fragment was generated in all positive samples tested and one RFLP patterns were obtained. The results indicated that the same strain of *T. gondii* can infect human and mouse in surveyed region.

Key words: Toxoplasma gondii, Human,mouse ,Urmia, PCR-RFLP

مقدمه

T.gondii یـک انگل درون سلولی اجباری است که طیف وسیعی از حیوانـات خونگـرم و انسان را آلوده می کند(۹).گربـه میزبان نهایی توکسوپلاسمـا گوندئی اسـت و به علت اینکه تنهـا میزبان دفع کننده اوئوسیسـت توکسوپلاسمـا در محیـط اسـت نقش مهمـی در چرخه زندگـی ایـن انگل دارد.استفـاده از آب و غذای آلوده بـه اوئوسیست و گوشـت خام(خوب پخته نشده)حـاوی کیست و بلع اوئوسیست به طور تصادفی از محیط اطراف سبـب آلودگی به *T.gondii* در انسان و دام مـی گردد.آلودگی بـه این انگل در انسان در بعضـی موارد سبب سقط و یـا علایم کلینیکی شدیدی در جنین، نـوزاد و افراد با ضعف سیستم ایمنـی شود (۹). اما در اکثر موارد با علائم شدیدی همراه نیست (۱۱). یافتـه هـای اپیدمیولوژیکی نشـان می دهند که خـوردن آب و غذای آلـوده به اوئوسیست مهمترین راه انتقال توکسوپلاسما به انسان و سایر میزبان های واسط است (۲۴،۴).

واکنـش سرمی با بالا رفتن سن افزایـش می یابد و به طور معمول در هـر دو جنس مشابه است(۱).بررسی هـای مشابه سرمی آلودگی به *T.gondii* را در۴۴/۸ درصـد زنان حامله در ایلام (۳) ۲۱/۱ درصد در اصفهان (۲۰) و ۱۹/۲ درصد در سبزوار (۲۶) گزارش نموده اند .مطالعات ژنتیکـی اخیر ژنوتیپ های توکسوپلاسمـا را در سه تیپ مشخص قرار مـی دهـد(۱۵). این سه تیـپ شامل تیپ هـای I، II و III است. این تقسیم بندی بر اساس خصوصیات آنها در الکتروفورز ایزوآنزیم ها، PCR-RFLP وRAPD (Random Amplified Polymorphism) DNA انجـام گردیده اسـت.(۶، ۷، ۸، ۱۵، ۲۱، ۳۳، ۳۶). بیماری زایی سویه هـای مختلـف *T.gondii* در حیوانات گوناگـون، متفاوت است (۲۲). تشخیـص ارتبـاط بین شدت بیماری زایی و نـوع بیماری ایجاد شـده و سویه انگـل در درمان موفق بیماری اهمیـت بسیار دارد (۳۴). آنالیز ژنتیکی سویه ها مشخص نموده است که تکثیر *T.gondii* عمدتاً به شکل کلونال،غیرجنسی و یا تولیدمثل جنسی تک والدی است (۳۳). گزارش هـای مختلف از آنالیز سویه های جدا شده از موش و کشت در محیـط خارج بدن نشان داده است که تیـپ II در بین این ژنوتیپ ها نسبـت به بقیه شایع تر اسـت (۸، ۱۷،۱۸،۲۶،۲۷،۳۲). هدف ازبررسی حاضر بررسی آلودگی به توکسوپلاسما گوندئی در انسان و موش خانگی با روش PCR و تفریق سویه ها با روشRFLP است.

مواد و روش کار

نمونه ها

نمونـه های خـون از ۱۹ زن و ۷ مرد (جمعـاً ۲۶ نفر) در محدوده سنی ۱۱ تا ۳۸ سال با نتایج سرمی مثبت از نظر آلودگی به *T.gondii* (۱۶ نفرIgG مثبت و۱۰ نفر IgGوIgM مثبت) از خرداد ماه سال ۸۹ تـا آبان ماه سـال ۸۹ از آزمایشگاه های انسانـی تهیه شد و نمونه های مـوش از بافت قلب و مغز ۵۴ قطعه موش خانگی به صورت تصادفی در محدوده زمانی فوق جمع آوری گردید.

روش استخراج DNA

برای استخـراج DNA از نمونه های خـون از روش ارائه شده توسط Fuentes و همکـاران (۱۰) و از نمونه های بافت از روش ارائه شده توسط Sambrook و همکاران استفاده شد(۳۰).

روش انجام PCR

برای انجام PCR از کیت شرکت سیناژن (PCR Master Kit) طبق دستور کارخانه سازنده بایک جفت پرایمر

"۵-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-۳'

و

۵'- CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT -۳'

بـرای تکثیر قطعه ۵۲۹ جفت باز از ژن مربوط به ژن B۱ *T.gondii* استفـاده شد(۱۷). واکنـش PCR و برنامه دمایی آن مطابق روش توصیف شده توسـط Homan و همکاران انجام گرفـت (۱۷). محصول PCR با استفـاده از ژل آگـارز ۲ درصدالکتروفـورز شد. محصـولات PCR بدست آمـده طبق دستور کارخانه سازنده تحت تأثیـر آنزیم محدودکننده AluI (سیناژن، ایران) مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند.

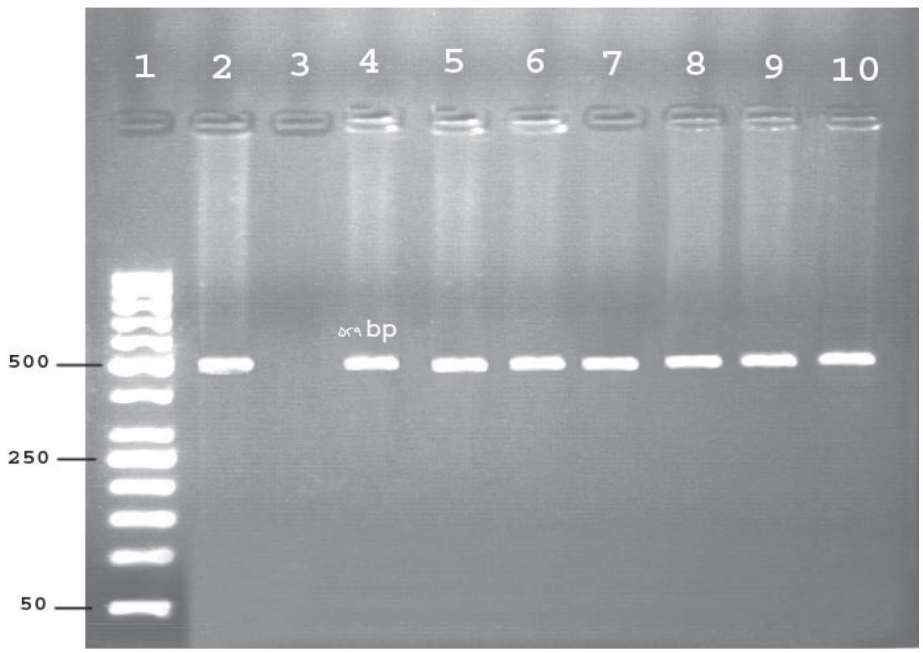
نتایج

بعـد از ردیابی محصولات PCR مشخص گردید که ۱۹ نمونه آلوده به *T.gondii* در بین نمونه هـای اخذ شده وجود دارد (۷ نمونه خون انسان و ۱۲ نمونه بافت قلب و مغز موش) (شکل ۱). نمونه های مثبت انسانی در PCR متعلـق به ۱۰ نمونه ی سرمـی IgM و IgG مثبت بود. نمونه های مثبت تحت هضـم آنزیمی با آنزیم محدودکننده AluI قرار گرفتند. نتایج هضـم آنزیمی مشخـص نمود که در برش قطعـه ۵۲۹ bp با آنزیم AluI باندهـای مشابه (۳۶۴ bp، ۸۷ bp و ۷۸ bp) بدست آمد (شکل ۲). لذا با توجـه به نتایج و الگوهای بـرش بدست آمده ۱۹ نمونه جدا شده مربوط به یک سویه می باشند.

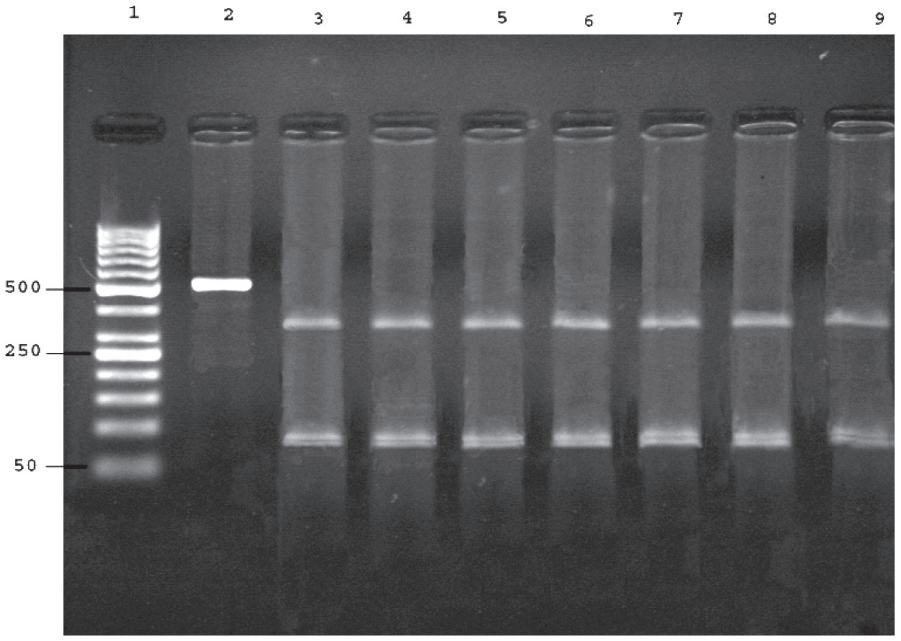
بحث

مشاهـده تیتـر بـالا رونـده در افـراد دارای ایمنـی طبیعـی، یعنی آزمایش هـای متوالی سرمـی، تشخیـص توکسوپلاسمـوز را امکان پذیر می سازد هر چند تفسیر نتایج حاصله در مورد افراد با ضعف سیستم ایمنی؛ جنیـن و نـوزادان سخت است. در این مورد استفـاده از کشت سلول و نیز تلقیـح به حیوانـات آزمایشگاهی و یا استفـاده از روش های مولکولی مثل PCR بـرای تایید تشخیص کاربرد دارد(۱۰). PCR که در آن قطعه ای از DNA ژنـوم *T.gondii* قابل شناسایـی است به دلیل حساسیت کافی و اختصاصی بودن آن و نیز حصول سریع نتیجه از سایر روش های تشخیصی فعلی نتایج بهتری دارد و در تشخیص *T.gondii* در بافت ها کاربرد دارند (۳۵،۱۳).

گزارش های مختلف از مقایسه روش های مختلف تشخیصی و آلودگی بـه توکسوپلاسمـا در نقاط مختلف دنیـا و ایران با استفـاده از روش های مختلـف وجـود دارد (۳۲،۳۱،۲۹،۱۲،۹،۲)روش PCR بویژه در تشخیص زود هنگـام توکسوپلاسموز کارآمد می باشد. نمونه خون در دسترس ترین نمونه جهت انجام آزمایش PCR در تشخیص در نمونه های انسانی و دامی می باشد. هر چند تشخیص توکسوپلاسموز از طریق نمونه های خون نتایج



شکل ۱- چاهک شماره ۱ مارکر bp ۵۰، چاهک شماره ۲ کنترل مثبت، چاهک شماره ۳ کنترل منفی و چاهک شماره ۱۰-۴ نمونه های مثبت (bp ۵۲۹)



شکل ۲- نتایج هضم آنزیمی با آنزیم چاهک شماره ۱ مارکر bp ۵۰،چاهک شماره۲ نمونه مثبت هضم نشده و چاهک شماره ۹-۳ نمونه های هضم شده(bp ۳۶۴، bp ۸۷ و bp ۷۸)

گوناگون نشان می دهد. این تفاوت ها به مدت حضور و دوام انگل در خون بستگـی دارد. حضور و دوام توکسوپلاسما در خون میزبان به سویه و شکل ورود انگـل به بدن نیز بستگـی دارد. آلوده سازی حیـوان با تاکی زوئیت، برادی زوئیت و اسپوروزوئیت بر روی زمان ورود انگل به خون و میزان دوام آن تاثیر مشهود دارد. به عنوان نمونه در نمونه سرم موش هایی که به روش داخـل صفاقی بـه توکسوپلاسما آلوده شده اند، ۱۸ ساعـت پس از تزریق انگـل با روش PCR قابل تشخیص است (۱۶).تشخیص توکسوپلاسموز در انسان، امـروزه در مبتلایان به ایدز و دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان اهمیـت زیاد یافته است. امـا نتایج PCR آنها متفاوت بوده است. علت این موضوع مشخص نبودن زمان دقیق آلوده شدن بیماران است. پژوهش حاضر بـه منظور بررسی آلودگی بـه *T.gondii* در انسان و موش با روش PCR و تشخیـص سویه های مختلف در منطقه ارومیه انجام پذیرفته است. نتایج نشـان دهنده آلودگی ۱۹ نمونـه (۷ نمونه خون انسـان و ۱۲ نمونه بافت قلـب و مغز موش) است. نتایـج حاصل از هضم آنزیمی نیـز نشان داد که هـر ۱۹ نمونه جـدا شده به یک سویـه تعلق دارند. علت کـم بودن تعداد نمونه های آلوده انسانی قابل تشخیص در بررسی حاضر در مقایسه با سایر گـزارش هـای سرولوژیک در ایـران میتواند به دلیل استفـاده از دو روش تشخیصـی مختلـف و نقـاط ضعفـی همچـون پایین بـودن حساسیت و اختصاصیـت، ثبـتِ نتایج مثبت و منفی کـاذب در روش های سرولوژیکی باشـد(۵). پرایمرهایِ مختلف بر اساس ژن هـای B ۱، P ۳۰ و ریبوزومال DNA در مطالعـات مختلف تـا به امروز استفاده شده اند (۱۳،۶). ژن B ۱ و ریبوزومـال DNA به دلیل تعدد کپی های آنهـا در ژنوم توکسوپلاسما آنهـا را جهت تکثیر در PCR مناسب نمـوده است(۲۱). ژن B ۱ در ژنوم *T.gondii* ۳۵ بار تکرار گردیده است (۱۴،۶). استفاده از این ژن مزایای زیـادی دارد. در مقایسـه پرایمرهـای ژن P ۳۰ نسبت بـه ژن B ۱ کمتر اختصاصی هستنـد و مشخص گردیده که پرایمرهـای ژن P، DNA ۳۰ گونـه های نوکاردیـا (۲۳) و *Mycobacterium tuberculosis* را هم تکثیـر می دهند(۲۵) درحالی که پرایمرهای مربوط به ژن B ۱ گونه های مختلـف قارچی و باکتریایـی را تکثیر نمی نماینـد(۲۱). استفاده از روش PCR براساس ژن B ۱ ویژگی بالا و حساسیت زیادی در تکثیر و تشخیص *T.gondii* دارد(۲۱).

در بررسی حاضر از قطعه bp ۵۲۹ ژن B ۱ به عنوان هدف در واکنش PCR استفـاده شد. این قطعه بوسیله سایر محققیـن نیز استفاده گردیده اسـت(۱۱). دلیل استفـاده از این قطعه آن است که ۳۰۰-۲۰۰ بار در ژنوم *T.gondii* تکـرار شده و نیز بیشترین حساسیت را درPCR ژن B ۱ دارد (۱۱).

در مطالعـه حاضر از نمونه خـون به منظور مشخـص نمودن آلودگی بـه *T.gondii* در انسـان استفاده شد. Howe و همکـاران ۱۹۹۷ نیز به منظـور جدا سـازی انگل از خـون و مایع مغزی نخاعی بیمـاران مبتلا به توکسوپلاسموز استفـاده نمودند. آنها در تست PCR از ۷۲ نمونه آزمایش شده در ۶۸ نمونه موفق به جدا سازی *T.gondii* شدند(۱۹).

توسلـی و همکـاران (۱۳۸۸) در بررسـی آلودگی بـه *T.gondii* در حیوانـات مختلـف در شهرستان ارومیـه آلودگی به یک سویـه را گزارش نمودند(۱).

نتایـج هضم آنزیمـی در نمونه های مثبت ایـن بررسی در برش قطعه bp ۵۲۹ بـا آنزیـم AluI یـک الگو به دست آمـد که مربوط بـه تیپ I

T.gondii می باشد(۱۰). این نتایج نشان می دهد که سویه های مشابه از *T.gondii* مـی توانند باعث آلودگی انسان و موش گردند. به دلیل اهمیت ایـن انگل در ایجاد عوارض در انسـان و ایجاد خسارات اقتصادی در دام ها پیشنهاد می گردد به همراه تست PCR آزمایشات سرولوژی با تعداد بیشتر نمونه انجـام شود. هم چنین بررسی های تکمیلـی مانند تعیین توالی ژن B ۱ توکسوپلاسماهـای جدا شده از انسان و سایر حیوانات نیز انجام پذیرد تا ژنوتیپ های مختلف انگل بویژه ژنوتیپ های غالب و مشترک بین انسان و حیوان مشخص گردد

منابع مورد استفاده

۱- توسلـی م،اسمعیل نژاد ب، طباطبایی م، جوادی ش، کاظم نیا ع، مردانی ک. (۱۳۸۸) بررسی آلودگی به *T.gondii* در حیوانات مختلف در شهرستان ارومیه بـه روش PCR و بررسـی اختلاف ژنتیکی از طریـق RFLP. نشریه دامپزشکی پژوهش و سازندگی، .شماره۵۸، صفحات:۶۶- ۶۱.

۲- رزمی، غ و رهبـری ص (۱۳۷۳) مقایسه روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شـده (D.A) با روش هـای غیرفلورسنت غیرمستقیـم (IFAT) و تست رنگی (D.T) در تشخیص توکسوپلاسموز گوسفندان. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، شماره ۱، صفحات:۱۷-۱۲.

3-Abdi J.,Shojaee S., Mirzaee A. and Keshavarz H. (2008) Seroprevalance of toxoplasmosis in pregnant women in Ilam province, Iran. *Iranian J Parasitol*. 3(2): 34-37

4-Asthana, S. P., C. N. L. Macpherson, S. H. Weiss, R. Stephens, R. N. Sharma, and J. P. Dubby. (2006) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and cats in Geranda ,*West Indies* . *J Parasitol* 92: 644-645.

5-Bhopale G.M., Naik S.R. (2000) Approach to diagnosis of toxoplasmosis.*The Ind.Pract*. 53(2): 141-149

6- Burg J.L., Grover C.M., Poueletty P. and Boothroyd J.C. 1989 Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii,* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 27: 1787-1792

7- Cristina N., Darde´ M. L., Boudin C., Tavernier., Pestre-Alexandre M. and mbroise-Thomas P. (1995) A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitol. Res.* 81:32-37

8-Darde´ M., Bouteille L. and Pestre-Alexandre M (1992) Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78:786-974

9- Dubey J.P. and Beattie C.P (1988) *Toxoplasmosis of Animal and Man.* CRC Press, Boca Raton, FL.

10-Fuents E., Rodriguez M., Domingo C., Castillo F., JuncosaT., Alvar J. (1996) Urine Sample Used for Congenital Toxoplamosis diagnosis by PCR. *J. Clin.Microbiol*.PP: 2368-2371

11- Garcia J.L., Gennari S.M., Machado R.Z., Navarro I.T. (2006) *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *J. Parasitol.* 113:267-271

12- Green E.C. (1998) *Internal medicine and neurology of small animal medicine*, infectious diseases of the dogs and cats.2nd ., pp:493-503.(W.B. Saunders Company, USA).

13- Greg S.J., Vitali G.S., David J.D. and Gwendolyn L.G. (1996) Comparison of cell culture, mouse inoculation and PCR for detection of *Toxoplasma gondii* .Effects of storge conditions on sensitivity. *J. Clin.Microbiol*. 34:1572-1575.

14-Grigg M.E. and Boothroyd J.C. (2001) Rapid Identification of Virulent Type I Strains of the Protozoan Pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis at the B1Gene.*J.Clin.Microbiol*.39:398-403

15-Guo Z. G. and Johnson A. M. (1995)Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strain by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction.Parasitol. 111: 127-132.

16- Hafid J., Guichard D., Flori P., Bouriet T., Raberin H., Genin C. and TranM.S.R (2000) Detection of *Toxoplasma gondii* by polymeras chain reaction in sera of actually infected mice. *J. Parasitol.* 86:857-859

17-Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J. (2000) Identification of a 200 to 300 fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii* ,and its use for diagnostic and quantitivePCR. *Int J Parasitology* 30: 69-75.

18- Howe D.K. and Sibeley L.D. (1995) *Toxoplasma gondii* Comprise Three Clonal lineage:Corrolation of parasite genotype with humen disease. *J. In fect. Dis*. 172: 1561-1566.

19-Howe D. K., Honore S., Derouin F. and Sibley L. D. (1997) Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol*. 35: 1411-1414

20-Jalayer T. and Alameh T. (1997) *Seroprevalance of congenital toxoplasmosis in neonastal born in Isfehan*. Second congress of Parasitology in Tehran(Iran). P. 23.

21-Jones C. D., Okhravi N., Adamson P., Tasker S. andLightman, S. (2000) Comparison of PCR Detection Methods for B1,P 30 and 18S rDNA Genes of *T. gondii* in Aqueous Humor, IOVS, 41(3): 635-644.

22- Johnson A. M. (1997) Speculation on possible life cycle for the clonal lineages in the genus Toxoplasma.*Parasitol.Today* 13: 393-397

23-Kasper L.H., Crabb J.H., Pfefferkorn E.R., (1993) Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoab-

Coloning :a Laboratory Manual, second ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

31-Sevinsc F. (2000a) The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats detected by indirect haemoglotination (IHA) and indirect florescent antibody (IFA) tests in the region of konya. *Acta Paositologica Turnica,* 24: 57-80.

32-Sevinc F. (2000b) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in stray dogs detected by the Dyetests, indirect fluorescence antibody test and Modified agglutination tests in konya. *ActaparasitologicaTurnica*. 24: 61-64.

33-Sibley L. D. and Boothroyd J. C. (1992) Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*-359: 82-85.

34- Suzuki Y., Wong S. Y., Grumet F. C., Fessel J., Montoya J. G., Zolopa A. R., Portmore A., Schumacher-Perdreau F., Schrappe M., Koppen S., Ruf B., Brown B. W. and Remington J. S. (1996) Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J. Infect. Dis.* 173:265-268.

35-Voge M .Makell E. John D. (1992) *Medical Parasitology*. Sunders Company ,California , 166 pp.

36 -Weiss J.B. (1995) DNA Probes and PCR for diognosis of Parsitic infections. *Clin. Microbiol. Rev*. 8: 113-130

sorption with a monoclonal antibody.*J Immunol*. 130: 2407-2412

24- Mead P.S., Slutsker L., Dietz V.,McCaig L.F., Shapiro C., GriffinP.M andTauxe R.V. (1999) Food-related illness and death in the United States.Emerg. *Infect. Dis*. 5:607-625.

25- McHugh T.D., Ramsay A.R.C., James E.A., Mognie R., Gillespie S.H. (1995) Pitfalls of PCR: misdiagnosis of cerebral nocardia infection (Letter). *Lancet*. 346: 14-36

26- Moalaee H., Shirzad E., Namazi M.J. (1999) Seroepidemiologyof toxoplasmosis and its eye complication in pregnant women. SabzavarUniversity *Med Sci J*. 21-23

27-Nguyen T.D., Kesei M.D.E., Bigaignon G., Hoet P., Pazzaglia G. and Lamments M. (1996) Detection of *Toxoplesma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine and brains of infected mice. Clininical and Diagnosis Lab Immunol.3: 635-639.

28- Ramzan N.N., Loftus E. and Burgart LJ. (1997) Diagnosis and monitoring of Whipple disease by polymerase chain reaction. *Ann Intern Med.* 126: 520-527.

29- Romanelli P., Freine, R., VidottoMannana E.R., Ogawa I., Palma D., Garcia J.L. and Navarro I.T. (2006) Prevalence of *Toxoplesma gondii* in sheep and dog from Guaropauva forms, Panana States Brazil. *Res Vet Science*.82(2): 202-207.

30-Sambrook,J.,Fritshc, E.F., Maniatis, T., (1989) *Molecular*