DOI 10.22092/VJ.2018.110830.1317 شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

ارزیابی واریته تخفیف حدت یافته رازی توکسوپلاسما در تشخیص آلودگی به توکسوپلاسما در گوسفندان با روش آگلوتیناسیون مستقیم

• الهه السادات موسوی

گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامی واحد شیراز

• مهدی نام آوری (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی ، شیراز ،ایران

تاریخ دریافت: ۰۹-۰۳-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۵-۱۰-۱۳۹۶

Email: namavari@yahoo.com

چکیده

توکسوپلاسموسیس از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که عامل آن توکسوپلاسما گوندیی *(Toxoplasma gondii)*، یک انگل داخل سلولی اجباری، می‌باشد. توکسوپلاسموسیس (Toxoplasmosis) یکی از علل عمده سقط در گوسفند است. روش‌های گوناگونی نظیر کشت انگل، روش‌های سرولوژیکی و مولکولی جهت بررسی نمونه ها از نظر آلودگی به عفونت توکسوپلاسمایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از این مطالعه ارزیابی واریته تخفیف حدت یافته رازی توکسوپلاسما در تشخیص آلودگی به توکسوپلاسما با استفاده از روش سرولوژیک در مقایسه با روش مولکولی می‌باشد. برای دستیابی به این هدف نمونه‌های خون از ۱۸۴ راس گوسفند از دامداری‌های شمال استان فارس که دارای سابقه سقط طی یک سال گذشته بودند، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها برای تشخیص آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما گوندیی با روش مولکولی و کیت تجاری الیزا و تست آگلوتیناسیون بررسی شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که ۲۱ درصد گوسفندان مورد آزمایش با روش الیزا و ۲۴ درصد با تست آگلوتیناسیون مستقیم مثبت شدند. تفاوت روش آگلوتیناسیون با کیت تجاری الیزا طبق آزمون مک نمار معنی دار نبوده و از نظر آزمون کاپا نیز توافق دو روش خیلی خوب بود ، با این وجود، نتایج PCR برای همه نمونه‌ها منفی شد. آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم جهت تشخیص آلودگی توکسوپلاسما در گوسفندها تستی ساده، سریع و از لحاظ اقتصادی به‌صرفه است. نتایج این مطالعه اثبات می‌کند علی رغم کاهش حدت واریته توکسوپلاسما ارزش تشخیصی آن همچنان پابرجاست و می‌توان از آن برای استفاده در روش‌های سرولوژیک جهت تشخیص آلودگی به توکسوپلاسما استفاده نمود.

کلمات کلیدی: توکسوپلاسما گوندیی، آزمایشات سرولوژیک، آگلوتیناسیون مستقیم، PCR، گوسفند

Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 86-92

Use of Razi variety of *Toxoplasma gondii* in serological diagnosis of Toxoplasma infection in compare with molecular test

By: Mousavi, E.S., Islamic Azad University Shiraz Branch, Department of Biochemistry; Namavari, M., (Corresponding Author), Research, Education and Extention Organization (AREEO), Razi Vaccine & Serum Research Institute, Shiraz, Iran.

Received: 2017-05-30 **Accepted: 2018-01-15**

Email: namavari@yahoo.com

Toxoplasmosis is the most common parasitic zoonosis world-wide, which caused by the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmosis is the main cause of abortion in sheep. There are different ways for the diagnosis of toxoplasma infection such as cell culture, serological and molecular tests. The aim of this study was the evaluation of variety of *T. gondii* which produced in Shiraz, Razi Institute for the diagnosis of toxoplasmosis by direct agglutination test in compare with ELISA and molecular test. Blood samples were collected from 184 ewes with a history of abortion in north of Fars province, Iran. Samples were investigated with molecular and serological (consist of ELISA and direct agglutination test) assays for detection of toxoplasmosis. Results showed that the rate of positive sera by use of commercial kit and agglutination test were 21% and 24% respectively. The McNamara analysis showed no significant difference between agglutination and ELISA tests and the results of Kappa analysis showed a very good agreement between of these two serological assays. Nevertheless, all samples were negative by molecular assay. The direct agglutination test was showed to be an appropriate, simple, fast and economical test for toxoplasmosis diagnosis in sheep. In conclusion, the results of present study confirmed despite the attenuation of virulence of Razi variety of *Toxoplasma gondii* it could be suitable for serological diagnosis of toxoplasmosis.

Keyword: *Toxoplasma gondii*, Serological test, Direct agglutination, PCR, Sheep

مقدمه

توکسوپلاسما گوندیی یکی از رایج‌ترین عوامل آلودگی مشترک انسان و دام در جهان یعنی عامل بیماری توکسوپلاسموزیس می‌باشد. توکسوپلاسما گوندیی یک تک یاخته اجباری درون سلولی از شاخه اپی کمپلکسا می‌باشد. این تک یاخته قادر به آلوده‌سازی انواع بافت‌ها در بدن انواع جانوران خونگرم از جمله انسان، حیوانات اهلی و وحشی می‌باشد که از این نظر به عنوان یکی از موفق‌ترین تک یاخته های انگلی دنیا معرفی می‌شود (۷).

آلودگی ناشی از توکسوپلاسما سالانه خسارات هنگفتی بر اثر سقط جنین دام‌ها، مرگ و میر انسان‌ها و عوارض ایجاد شده در افراد آلوده و هزینه‌های درمان و غیره به اقتصاد کشور و مردم وارد می‌کند. یکی از بزرگ‌ترین مشکلاتی که بیماری ناشی از این انگل در صنعت پرورش گوسفند ایجاد می‌کند، سقط جنین است.

راه اصلی عفونت در انسان، مصرف گوشت آلوده خام و نیم پز حیواناتی مثل گوسفند می‌باشد (۱۵). شیوع آلودگی به انگل توکسوپلاسما گوندیی در انسان بسته به مناطق مختلف آب و هوایی متفاوت می‌باشد به طوری که در کشور ایران در مناطق شمالی بالای ۷۰ درصد، در مناطق گرم و خشک در حد ۳۹ درصد و در مناطق گرم و مرطوب ۳۵ درصد گزارش شده است (۲، ۱۷)؛ همچنین شیوع آلودگی در گوسفند ۳۳ درصد گزارش شده است. (۱۷). در مطالعات انجام گرفته بر روی میزبانان واسط شیوع توکسوپلاسموسیس در گوسفند از بقیه بالاتر می‌باشد از این‌رو تشخیص و آگاهی از وضعیت الودگی در گوسفند نقش مهمی در کنترل و پیشگیری آلودگی در انسان وگسترش آلودگی دارد (۱۷)

روش‌های تشخیص مولکولی و روش‌های سرولوژیك مانند آگلوتیناسیون مستقیم، ایمونوفلورسانس و الیزا از روش‌های بسیار خوب تشخیصی برای توکسوپلاسما گوندیی محسوب می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی ارزش تشخیصی وریته‌ای جدیدی از توکسوپلاسما گوندیی، برای تشخیص سرولوژیکی توکسوپلاسموزیس در مقایسه با کیت تجاری الیزا وروش مولکولی در گوسفند می‌باشد. شایان ذکر است که این واریته در موسسه رازی تولید شده است وکاهش حدت این واریته و قدرت ایمنی زایی ان در مطالعات پیشین نشان داده شده است (۱). به عبارت دیگر در این مطالعه بررسی می کنیم که ایا تخفیف حدت واریته جدید توکسوپلاسما روی آنتی ژنهای تشخیصی آن تاثیر داشته است یا نه ؟

مواد و روش‌ها

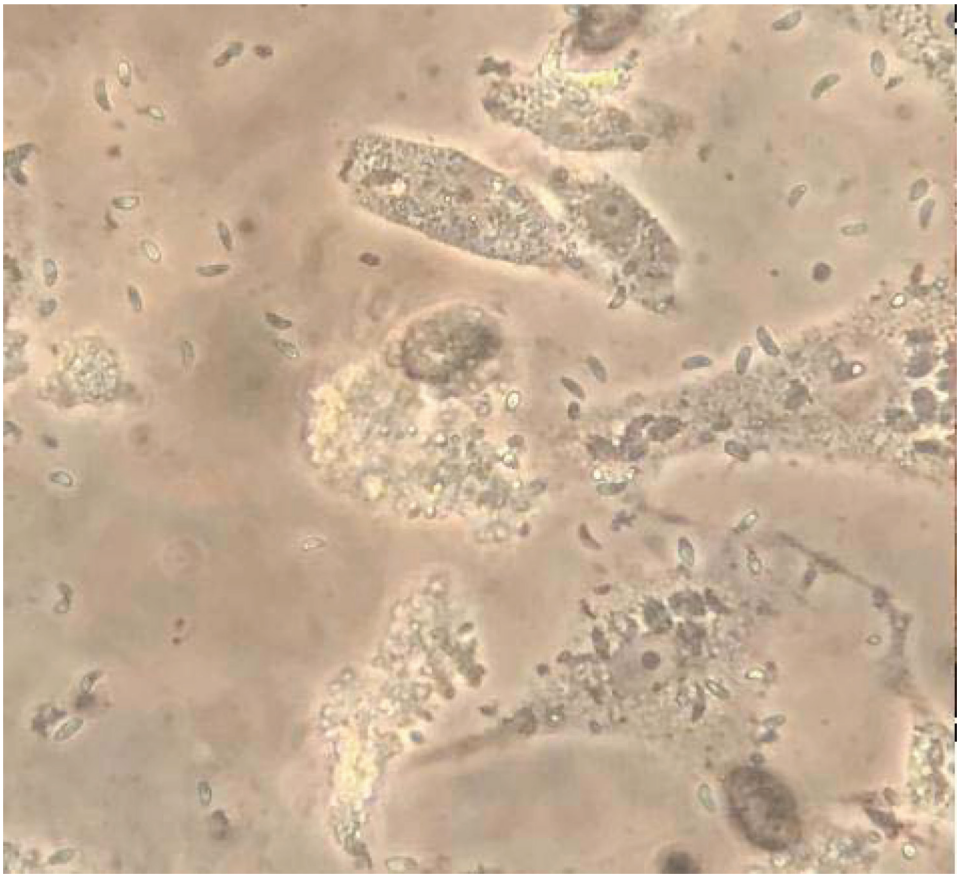
در این بررسی تعداد ۱۸۴ نمونه خون گوسفندهای ماده با سابقه سقط از دامداری‌های شمال استان فارس جمع‌آوری گردید. خون‌گیری با استفاده از ونوجکت و سرنگ استریل از سیاهرگ گردنی حیوانات انجام

گرفت و شماره‌گذاری شدند. نمونه‌ها سریعا به آزمایشگاه منتقل شده نمونه‌ها دوقسمت شدند یک نمونه خون کامل جهت آزمایش مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و قسمت دیگر جهت تشکیل لخته به مدت یك ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن نمونه‌ها با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ شده و سرم جدا گردید. سرم حاصله به میکروتیوب‌های استریل منتقل شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت تهیه آنتی‌ژن برای انجام آزمایشات سرولوژیکی، واریته تخفیف حدت یافته توکسوپلاسما گوندیی و سویه RH به روش دوبئی و همکاران (۱۹۸۸)، بر روی رده سلولی Vero، کشت داده شدند. به این صورت که تاکی‌زوئیت‌ها به همراه محیط کشت DMEM، حاوی ۲ درصد سرم جنین گوساله به فلاسک کشت سلولی اضافه گردیدند. آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰,۰۰۰ U/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml)و ضدقارچ آمفوتریسین (۲۵µg, In vitrogen; USA) نیز اضافه شد و فلاسک‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. تاکی‌زوئیت‌های آزاد شده جمع‌آوری شده، بعد از سانتریفیوژ و شمارش، با فرمالین ۴ درصد کشته شدند.

آزمایش الیزا طبق دستورالعمل شرکت سازنده (ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species) انجام گرفت.

برای انجام آزمایش آگلوتیناسیون از سرم‌ها رقت‌های مختلف (۱:۱۰، ۱:۲۰ ، ۱:۴۰ و ۱:۸۰) تهیه شد. سپس به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر سرم و ۲۵ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول (۲ME) اضافه گردید. برای جدا شدن پیوندهای دی‌سولفیدی، پلیت‌ها به مدت ۵ دقیقه در محیط قرار گرفتند. پس از آن به هر چاهك ۵۰ میکرولیتر (که محتوی ۶×۱۰^{۵} تاکی‌زوئیت است) از آنتی‌ژن توکسوپلاسماگوندیی تخفیف حدت یافته اضافه شده و ۲۴ ساعت درانکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. روز بعد نتایج قرائت گردید. رقت ۱:۲۰ به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شد .این رقت براساس بررسی اولیه و بیشترین توافق موارد مثبت و منفی نتایج



شکل ۱- توکسوپلاسماگوندیی رها شده از سلول vero :تاکی زوئیت های توکسوپلاسماگوندیی شبیه دانه‌های برنج رها شده از سلول vero بزرگنمایی ×۱۰۰

بین روش اگلوتیناسیون و کیت تجاری الیزا تعیین گردید. در هر پلیت تعداد ۴۶ (برای هر نمونه دو چاهک) نمونه سرم به همراه یك نمونه شاهد مثبت و یك نمونه منفی مورد آزمایش قرار گرفت. در صورتی که کف چاهک کاملاً پوشیده از رسوب می‌شد، به عنوان مورد مثبت در نظر گرفته می‌شد. برای سویه RH نیز به همین ترتیب عمل شد (۵).

به طور همزمان، با استفاده از کیت استخراج DNA (CinnaGen Inc)، ژنوم از نمونه‌های خون جداسازی گردید و آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای Tox1: 5'-CGGAAATAGAAAGCCAT-'GAGGCACTCC– fluorescein-3 و Tox2: 5'-ACGGGCGAG-'TAGCCCTGAGGAGAT–ph-3 مربوط به ژن B1 توکسوپلاسما گوندی انجام پذیرفت (۴).

ارزیابی آماری

نتایج حاصل توسط دو روش آنالیز آماری کاپا (Kappa Test) و مك نمار (McNemar) مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

نتایج کشت سلولی

پس از سه روز از اضافه شدن تاکی‌زوئیت‌ها به رده سلولی Vero تخریب سلولی مشاهده گردید که به دلیل رشد انگل در سلول بود. بعد از تخریب ۸۰ درصد سلول، تاکی‌زوئیت‌های رها شده که به شکل دانه برنج بودند، جمع‌آوری شدند (شکل ۱).

نتایج آزمایشات سرولوژیکی

نتایج آزمایش الیزا با کیت تجاری

بر اساس آزمایش الیزا که توسط کیت تجاری الیزا بر روی ۱۸۴ نمونه سرم گوسفند انجام گرفت، تعداد ۳۸ رأس از گوسفندها از نظر آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسماگوندیی مثبت و ۱۴۶ رأس نیز منفی تشخیص داده شدند (شکل ۲) (جدول ۱).

نتایج آزمایش آگلوتیناسیون

بر اساس آزمایش آگلوتیناسیون بر روی ۱۸۴ نمونه سرم گوسفند، تعداد ۴۴ رأس از گوسفندها از نظر آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما گوندیی مثبت، و ۱۴۰رأس نیز منفی تشخیص داده شدند (شکل ۳) (جدول ۱).

نتایج مقایسه دو روش سرولوژیکی

بر اساس روش آماری آزمون کاپا دو روش مذکور دارای توافق خیلی خوب در تشخیص آلودگی بودند و در ضمن در آزمون مك نمار نیز دو روش فوق‌الذکر در تشخیص موارد مثبت بیماری تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (دامنه اطمینان ۹۵ درصد).

حساسیت و ویژگی

همچنین مشخص شد که حساسیت روش آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی‌ژن تخفیف حدت یافته توکسوپلاسما گوندیی ۸۶/۳۶ درصد و ویژگی این روش ۹۵/۸۹ درصد در مقایسه بانتایج کیت استاندارد الیزا می‌باشد.

نتایج آزمایش مولکولی PCR

برای تمام۱۸۴ نمونه خون آزمایش مولکولی طبق روش ارائه شده انجام گردید. نتیجه ی آزمایش PCR همه‌ی نمونه ها منفی بود.

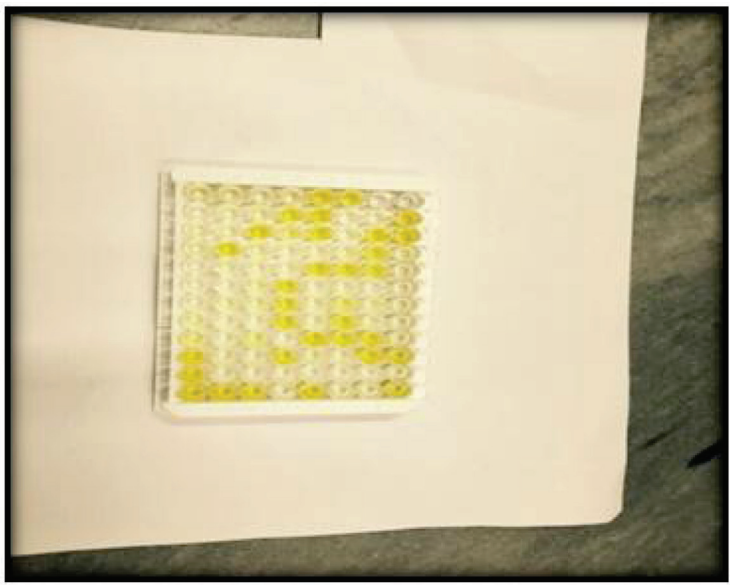
بحث

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی خاصیت آنتی‌ژنی واریته ایرانی توکسوپلاسما گوندی در تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما گوندی با روش آگلوتیناسیون بود. این واریته در مطالعات پیشین طی پاساژهای متوالی در موسسه رازی شیراز تولید شده بود و خاصیت ایمنی‌زایی خوبی را بروز داده بود (۱). از انجایی که حدت این واریته کاملا کاهش یافته است لازم بود بررسی شود که آیا این کاهش حدت روی ارزش تشخیصی این واریته تاثیر دارد یا نه.

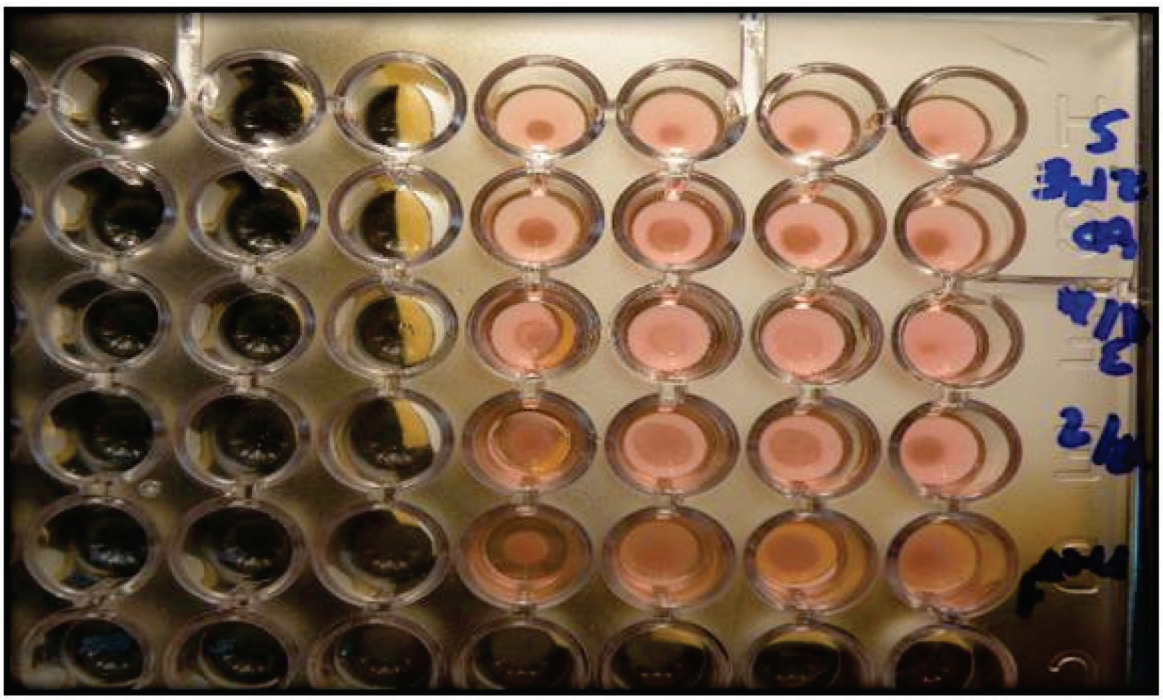
برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که ارجحیت با روشی می‌باشد که در کنار سریع بودن فرآیند، ارزان قیمت نیز باشد. استفاده از تست‌های سرولوژیکی روش رایج تشخیص آلودگی به توکسوپلاسما محسوب می‌شود (۲۱)، و روش آگلوتیناسیون به عنوان روشی سریع و آسان محسوب می‌گردد که برای گوسفند حساسیت

جدول ۱- نمونه‌های مثبت و منفی دو روش سورولوژیک مورد استفاده

روش مورد استفاده / نمونه	آگلوتیناسیون اصلاح شده (درصد)	الایزای غیر مستقیم (درصد)
نمونه های مثبت	۴۴(۲۴ درصد)	۳۸ (۲۱ درصد)
نمونه های منفی	۱۴۰(۷۶ درصد)	۱۴۶ (۷۹ درصد)
جمع کل	۱۸۴	۱۸۴



شکل ۲- نتایج آزمون الیزا. آزمایش الیزا برای همه نمونه‌ها با استفاده از کیت تجاری و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت



شکل ۳- پاسخ مثبت و منفی تست آگلوتیناسیون. دو ردیف بالا مربوط به سرم منفی با رقت‌های مختلف و دو ردیف پایین سرم مثبت، ردیف آخر رقت مختلف آنتی‌ژن با سرم مثبت می‌باشد.

بالایی را داراست (۱۸). در طی دو دهه اخیر روش آگلوتیناسیون قابلیت خود را به عنوان یك تست حساس، اختصاصی، ساده، سریع و ارزان نشان داده است (۹). این تست نیاز به هیچ‌گونه دستگاه گران قیمت نداشته، روشی ساده دارد و به راحتی در هر آزمایشگاه ساده‌ای قابل انجام است. مقدار آنتی‌ژن لازم نیز در غالب آزمایشاتی که از روش آگلوتیناسیون استفاده می‌کنند به ازای هر چاهک ۵۰ میکرولیتر می‌باشد (۶).

با توجه به مطالب بیان شده در این مطالعه برای ارزیابی روش آگلوتیناسیون، از روش الیزا برای مقایسه استفاده گردید که نتایج رضایت‌بخشی به دست آمد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش آگلوتیناسیون با استفاده از واریته تخفیف حدت یافته در شناسایی میزان آلودگی به توکسوپلاسما گوندی به خوبی با روش الیزای غیر مستقیم که با استفاده از کیت تجاری انجام شده بود رقابت می‌کند.

بر اساس روش آماری آزمون کاپا دو روش مذکور دارای توافق مناسبی در تشخیص آلودگی بودند و در ضمن در آزمون مك نمار نیز دو روش فوق‌الذکر در تشخیص موارد مثبت بیماری تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. نتایج نشان داد که دو روش در ۳۸ مورد مثبت دارای توافق و در ۱۴۰ مورد منفی نیز دارای تطابق بودند. همچنین حساسیت روش آگلوتیناسیون در این مطالعه ۸۶,۳۶ درصد به دست آمد، ویژگی این روش نیز ۹۵,۸۹ درصد ارزیابی گردید، که نشان‌دهنده مناسب بودن این روش به عنوان یک روش تشخیصی می‌باشد، همچنین در مطالعات قبلی مشخص شده که حساسیت این روش برای گوسفند بالای ۸۵ درصد می‌باشد (۱۴، ۱۹). از سوی دیگر طبق نتایج آماری مک‌نمار، بین نتایج دو روش به کار رفته تفاوت معناداری دیده نشد و با توجه به اینکه روش الیزا به عنوان روشی مرجع با حساسیت بالا برای بررسی سرولوژیکی توکسوپلاسما گوندی به کار می‌رود، می‌توان روش آگلوتیناسیون را نیز به عنوان روش تشخیصی بسیار مناسبی برای این تک‌یاخته معرفی نمود.

نتایج این مطالعه نشان داد که تخفیف حدت این واریته توکسوپلاسما در ارزش تشخیصی ان تاثیر معنی‌داری ندارد این یافته مشابه مطالعه‌ای است که در مورد نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت‌یافته، در آزمایشگاه ملی نئوسپورا در مؤسسه رازی شعبه شیراز انجام گرفته است در آن مطالعه نیز واریته تخفیف حدت‌یافته نئوسپورا ارزش تشخیصی خود را حفظ کرد بطوری‌که در ان بررسی نیز روش آگلوتیناسیون با واریته تخفیف حدت یافته نئوسپورا کنینوم به عنوان روشی مناسب در مقایسه با روش الیزا معرفی گردید. (۲۰).

نتایج مطالعات پیشین نشان‌دهنده شیوع ۲۰ تا ۳۵ درصدی آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما گوندیی در گوسفندان استان فارس است. (۱۷)، این موضوع نشان‌دهنده شیوع بالای آلودگی به این تک‌یاخته در دام‌های کشور ایران می‌باشد؛ که این موضوع لزوم یک روش تشخیصی سریع را نشان می‌دهد.

شناسایی آنتی‌بادی تولید شده برعلیه توکسوپلاسما گوندیی در سرم، یکی از روش‌های رایج تشخیص توکسوپلاسموزیس می‌باشد. وجود برخی مشکلات از جمله پایداری متفاوت ایمنوگلوبولین‌های قابل شناسایی توسط آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در این روش‌ها، بروز نتیجه مثبت کاذب ناشی از آنتی‌بادی‌های طبیعی، تفسیر نتایج این آزمایشات را با مشکل مواجه می‌کند. اکثر این مشکلات به دلیل نوع آنتی‌ژن به کار رفته جهت تشخیص سرولوژیکی می‌باشد (۱۳، ۱۶). با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز استفاده از تاکی‌زوئیت تخفیف حدت یافته توکسوپلاسما گوندیی به روش انجام شده در این مطالعه، می‌توان این تاکی‌زوئیت‌ها را به عنوان آنتی‌ژنی مناسب برای تشخیص‌های سرولوژیکی معرفی نمود.

در این مطالعه روش سرولوژیکی آگلوتیناسیون در مقایسه با کیت تجاری الیزا و روش PCR انجام گرفت. نتایج مولکولی برای همه نمونه‌ها منفی شد. مطالعات گونیم و همکاران (۲۰۱۰)، نیز نتایجی مشابه با نتایج این مطالعه به دست آورد. همچنین کورناکا و همکاران (۲۰۱۶)، آزمایش سرولوژیکی الیزا و آگلوتیناسیون را با PCR مورد مقایسه قرار دادند، که با وجود مثبت شدن حدود ۸۸٪ از نمونه‌ها از نظر سرولوژی، فقط ۱۸,۶٪ برای PCR مثبت ارزیابی شدند. به علاوه، لوپتاکووا و همکاران (۲۰۱۵)، نیز نمونه‌های سرم مثبت گوسفند را مورد ارزیابی مولکولی قرار دادند و تنها در ۵ نمونه خون از ۲۵ گوسفند سرم مثبت، DNA توکسوپلاسما گوندیی را مشاهده نمودند. معمولا تشخیص توکسوپلاسموسیس با روش‌های سرولوژیکی انجام می‌گیرد و مثبت شدن این روش‌ها لزوما به معنی حضور ژنوم انگل در همه بافت‌ها و اندام میزبان نمی‌باشد (۲۲)؛ از طرفی هومان و همکاران (۲۰۰۰)، پیشنهاد داده‌اند که بدست آمدن نتایج منفی در PCR می‌تواند به دلیل حضور DNA میزبان و خطا در پروسه کار، بخصوص در استخراج DNA باشد. این موضوع نیز حائز اهمیت است که پرایمرهای به کار رفته در آزمایشات تشخیصی مولکولی برای توکسوپلاسما گوندیی، معمولا به طور ویژه آنتی‌ژن‌های خاصی مثل ژن B۱ یا ITS-۱ و ... را شناسایی می‌کنند (۳، ۱۰). با توجه به تغییر تک‌یاخته از نظر مورفولوژیکی این احتمال وجود دارد که برخی از آنتی‌ژن‌های سطحی آن تغییر یافته و قابلیت تشخیص با پرایمرهای موجود را از دست داده باشند.

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که واریته تخفیف حدت‌یافته توکسوپلاسما علی رغم توانایی ایجاد پاسخ ایمنی و بیماری‌زایی کم (۱) همچنان نیز ارزش تشخیصی خود را برای استفاده در تست‌های سرولوژیک حفظ کرده است و تخفیف حدت تک‌یاخته تغییری در خواص آنتی‌ژنی آن بوجود نیاورده است..

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۲-۸۴-۱۸-۹۱۱۱۶ تأمین گردیده است و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل اجرایی ان انجام گرفته است.

منابع مورد استفاده

1. Abasi, A. 2016. Evaluation of the immunogenicity of the experimental vaccine prepared from variety of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. MSc thesis, Islamic Azad University Branch Jahrom. Iran

2. Bahrami, A.M. Jafarian, M., Ali rahmi, H., Mohammadi, M.,

Cheragh Afrooz, S., Havasi, Z. Shaddel, M., 2013 Seroepidemiological Study of Toxoplasmosis in sheep, Ilam, Iran 2013. *Journal of veterinary clinical research* .4, 263-268 (In Farsi)

3. Calderaro A1, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, Dettori G, Chezzi C.2006. Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii. Acta Biomed.* 2:75-80

4. Costa, M., Poutas, C., Ernault, P., Foulet, F., Cordonnier, C., and Beretagne, S. 2000. Real-Time PCR for diagnosis and follow-up of Toxoplasma reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.*38: 2929-2932

5. Desmonts G, Remington JS. 1980. Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology,* 11:562–568.

6. Dubey J. P., and Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of animal and man. CRC press, Inc. Bocaraton, Floirda, U.S.A.

7. Dubey JP., Tiao N., Gebreyes WA. and. Jones JL.2012. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Ethiopia. *Epidemiol. Infect.* 140:1935-1938

8. Ghoneim NH1, Shalaby SI, Hassanain NA, Zeedan GS, Soliman YA, Abdalhamed AM. 2010.Comparative study between serological and molecular methods for diagnosis of toxoplasmosis in women and small ruminants in Egypt. *Foodborne Pathog Dis.* 71:17-22.

9. Gustavo Antonio Cola, João Luis Garcia, Letícia da Costa, Bruno Ruffolo, Italmar Teodorico Navarro, Roberta Lemos Freire. 2009. Comparison of the indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in rats. Semina: Ciências Agrárias. 31:717.

10. Homan,W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J. and Verschueren, H., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol*. 30:69-75.

11. Kornacka A1, Cybulska A1, Bień J1, Goździk K1, Moskwa B. 2016. The usefulness of direct agglutination test, enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in wild animals. *Vet Parasitol.* 15: 85-89.

12. Luptakova L., Benova K., Rencko A., Petrovova E. 2015. DNA detection of *Toxoplasma gondii* in sheep milk and blood samples in relation to phase of infection. *Vet Parasitol.* 208:250-253

13. Lisandra A. Suzuki, Rosangela J, Rocha and Claudio L. Rossi. 2001. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Med Microbiol.* 50: 62-70.

14. Mainar-Jaime RC, Barberan M. 2007. Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. *Veterinary Parasitology*. 148:122–129.

15. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's. 2009. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchhill Livingston Elsevier.

16. Montoya, J. G. 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J, infect. Dis*. 185 suppl 1: 573-82.

17. Mostafavi, S.N. , Jalali-Monfared, L. 2012 Toxoplasmosis Epidemiology in Iran: A Systematic Review. *Journal of Isfahan Medical School*. 30, 176, 1-15 (In Farsi)

18. Oncel T, Vural G, Babur C, Kilic S. 2005. Detection of *Toxoplasma gondii* seropositivity in sheep in Yalova by Sabin Feldman dye test and latex agglutination test. *Turkiye Parazitol Derg*. 29:10–2

19. Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MA. 2008. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*. 153:359–362.

20. Tavanai, H. R. 2016. Assessment of agglutination test for diagnosis of neosporsis by Iranian *Neospora caninum* variety. MSc thesis, Islamic Azad University Branch Jahrom, Jahrom, Iran.

21. Tenter, A. M., A. R. Heckeroth., Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii* from animals to humans. *In t s parasitol*. 30: 1217-58.

22. Zewdu E., Sisay Tessema T., Tilahun G., Cox E., Goddeeris B., Dorny P.2015. Comparison of agglutination test, microscopy and nPCR for diagnosis of *Toxoplasma gondii* isolated from sheep and goat of Central Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*. 19:117-129.