جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

# تعیین کمترین عیار سرمی با ارزش جهت تشخیص توکسوپلاسموز گوسفند در روشهای الایزا، ایمونوفلورسنت و وسترت بلات

دکتر احمد مرشدی[1]* دکتر علیرضا محمودیان[1] دکتر احمد آواز[2]

دریافت مقاله: ۲۸ اردیبهشت ماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۴ آذرماه ۱۳۸۳

**هدف:** تعیین کمترین عیار با ارزش آنتی بادی ضدتوکسو پلاسماگوندی آی در تشخیص آلودگی گوسفند، در الایزای غیرمستقیم و IFA، با استفاده از آنتی ژن محلول SAG-1 در وسترن بلات، به عنوان یک پروتئین مشخص کننده عفونت.

**حیوانات:** یکصدوده رأس گوسفند بومی بالغ از ۱۴ گله در اطراف ارومیه.

**روش:** جدا نمودن سرم و تعیین آخر رقت مثبت هرسرم با آزمونهای IFA، والایزا انجام شد وآخرین رقت مثبت هرسرم با آنتی ژن محلول SAG-1 در وسترن بلات، جهت تعیین کمترین عیار با ارزش در IFA والایزا مورد بررسی قرارگرفت. در IFA، لکه‌های آنتی ژن با استفاده از تاکی زوئیت انگل تهیه ورقت‌های ۲۰:۱ تا ۶۴۰:۱ سرم روی آن ریخته وسپس در معرض کنژوگه فلورسئین قرارگرفت وآخرین رقت مثبت ثبت‌گردید. در الایزا پلیت با $10^5$ تاکی زوئیت در هر حفره پوشش دارگردید ورقت‌های ۵۰:۱ و ۱۰۰:۱ سرم روی آن ریخته و تحت تاثیر کنژوگه پراکسیداز قرارگرفت وفعالیت آنزیمی هر حفره در ۴۹۲ نانومتر ثبت‌گردید. نمونه‌های سرم که SAV آنها مساوی یا بزرگتر از ۲/۵ برابر SAV سرمهای کنترل منفی بود، مثبت در نظرگرفته‌شد. وسترن بلات با استفاده از آنتی ژن محلول کامل و SAG-1 تجارتی و تأثیرآخرین رقت مثبت از هرسرم روی آن انجام‌شد. جهت مریی‌شدن واکنش هرسرم با باند ۳۰ کیلودالتون، نوارها را در کنژوگه پراکسیداز گذاشته و مریی‌شدن باند مورد بررسی قرارگرفت. داده‌های به‌دست‌آمده از ۱۱۰ سرم با IFA والایزا به منظور تعیین درصد همخوانی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت.

**تجزیه و تحلیل آماری:** ازآزمون آماری مربع کای جهت پی بردن به اختلاف معنادار بین نتایج الایزا و IFA استفاده‌شد.

**نتایج:** از ۱۱۰ نمونه‌سرم، ۲۴ مورد (۲۱/۸درصد) با هر دو تست الایزا و IFA مثبت شدند. تمامی ۲۴ موردسرم مثبت با هردوآزمون، در وسترن بلات واکنش مریی قوی با باند SAG-1 نشان دادند. پنج مورد که الایزا مثبت (عیار ۵۰:۱) و IFA منفی بوده ونیز ۲ مورد IFA مثبت (عیار ۲۰:۱) که الایزا منفی بودند، در وسترن بلات نیز واکنش مریی مشاهده نگردید.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های الایزا و IFA و نتایج وسترن بلات میزان آلودگی گوسفندان بالغ به توکسو پلاسموز ۲۱/۸درصد به‌دست‌آمد. در این مطالعه همچنین نشان داده‌شد که بین داده‌های به‌دست‌آمده از الایزا و IFA ۹۲/۷درصد همخوانی وجود دارد. کمترین عیار با ارزش جهت تشخیص آلودگی با توکسو پلاسماگوندی آی در IFA ۴۰:۱ و در الایزا ۱۰۰:۱ به دست‌آمد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۲۳-۲۱۹.

**واژه‌های کلیدی:** توکسو پلاسماگوندی آی، آزمون IFA، الایزا.

توکسوپلاسما گوندی آی یک انگل درون یاخته‌ای است که انسان و دامهای اهلی را مبتلا می‌کند. از بین دامهای اهلی گوسفند و بز به این عفونت حساس

۱) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.
*) نویسنده مسؤول: Ahmad-Morshedi@yahoo.com

**Determination of the lowest valuable titer (Cut-off titer) of antitoxoplasma antibodies for detection of Toxoplasmosis in sheep by ELISA and IFA tests**

**Morshedi, A.,[1] Mahmoodian,A.,[1] Awaz, A.[2]**

*[1]Department of Pathobiology Faculty of Veterinary Medicine University of Urmia, Urmia- Iran. [2]Graduated from Faculty of Veterinary Medicine University of Urmia- Urmia, Iran.*

**Objective:** To investigate 1) the cut-off titers of antitoxoplasma antibodies through in IgG- ELISA and IFA tests and 2) application of IgG- ELISA rather than IFA test for diagnosis of toxoplasmosis (Toxoplasma gondii) in mature sheep.

**Animals:** One hundred and ten Iranian mature sheep.

**Procedure:** The serum samples were examined to determine the final positive dilution of antitoxoplasma antibody by IgG-ELISA and IFA tests. For this purpose, immunoreactivity of the final positive dilution of each serum with to SAG-1 antigen was determined by western blot analysis. The ELISA microplate coated with 105 tachyzoites/ well, was incubated with diluted sheep sera. After adding of substrate, enzymatic activity was measured at 492 nm. Samples with higher absorbance values (= 2.5 times greater than these values of negative controls) designated as positive.The data obtained from 110 sera with IFA and ELISA was compared with each other to determine the percentage of agreement between them.

**Statistical analysis:** Using a chi-square test to show the significant differences between results of IFA and ELISA. Furthermore, these results were compared to determine the percentage of agreement between them.

**Results:** 24 out of 110 serum samples were concordant positive (21.8%) and 79 cases (70.9%) were concordant negative in both IFA and ELISA. All positive samples exhibited strong reactivity to SAG-1 (30 KD band). Among 110 serum samples, five discordant ELISA- positive and two discordant IFA- positive sera had no reactivity with SAG-1 band in WB. Moreover, there is 92.7% coincidence between results of ELISA and IFA tests.

**Conclusion:** In this study the lowest valuable titer, for detection of Toxoplasmosis in sheep, was obtained as 1:40 and 1:100 in the IFA and ELISA tests, respectively. Furthermore, immunoreactivity of serum dilutions to SAG-1antigen in the WB proved to be a useful tool for setting of optimum cut-off titers in the IFA and ELISA tests. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,3:219-223,2005.***

**Keywords:** Toxoplasma gondii, IFAT, IgG-ELISA.

**Corresponding author's email:** Ahmad Morshedi@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



بوده و موجب سقط جنین در این حیوان می‌گردد(۵). بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که میزان سقط جنین توکسوپلاسمایی در گله‌های گوسفند با توجه به شرایط آب و هوایی بین ۳ تا ۳۰ درصد متغیر است(۱۳). در مطالعه‌ای که در شهرستان گرگان انجام شد خطر قابل انتساب به سقط جنین توکسوپلاسمایی در میش‌ها ۳ درصد گزارش شد(۲). آزمونهای سرم شناسی آگلوتی نیشن مستقیم اصلاح شده، IHA(Indirect Hemagglutination) و Dye test جهت اندازه‌گیری عیار کلی آنتی بادیها، و آزمونهای IFA(Indirect Flourescent Antibody) و الایزای غیرمستقیم جهت یافتن عیار آنتی بادیهای از نوع IgM و IgG ضد توکسوپلاسما، به‌طور جداگانه در سرم، به کار رفته‌اند(۲۳،۲۰،۱۰). پروتئین SAG-1 (Surface Antigen G1) معروف به پروتئین ۳۰(P30) که به طور اختصاصی توسط مرحله تاکی زوئیت انگل ساخته می‌شود یک آنتی ژن سطحی و بارز این انگل است(۸). این آنتی ژن ایمونودامینانت بوده و بر ضد آن آنتی بادی اختصاصی در بدن ساخته می‌شود که می‌توان با جست‌وجوی آن در سرم جهت تشخیص عفونت توکسوپلاسما استفاده نمود(۱۴). SAG-1 یک آنتی ژن محلول بوده و می‌توان آن را در آزمونهای وسترن بلات، IHA، و نیز الایزای غیرمستقیم به کار برد. هدف مطالعه حاضر تعیین کمترین عیار با ارزش IgG در آزمونهای IFA و الایزا با استفاده از واکنش پذیری رقت‌های سرمی با باند SAG-1 در وسترن بلات، و تعیین فراوانی آلودگی گوسفندان به توکسوپلاسما گوندی‌ای بود.

## مواد و روش کار

**۱- آنتی ژن:** از شکل تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی‌آی (ساخت انستیتو پاستور ایران) در آزمون IFA جهت تهیه لکه‌های آنتی ژنی و در الایزا جهت پوشش‌دار کردن میکروپلیت استفاده شد.

**۲- آنتی ژن محلول کامل:** شکل تاکی زوئیت انگل را ۱۵ بار در ۷۰- درجه انجماد وذوب نموده و پس از سانتریفوژ در ۶۰۰۰ دور به مدت ۲۵ دقیقه، از مایع رویی به عنوان آنتی ژن محلول (حاوی ۱۰ میلی‌گرم پروتئین در میلی لیتر) در وسترن بلات استفاده شد.

**۳- کنژوگه فلورسئین:** سرم خرگوشی ضد IgG گوسفند نشان‌دار شده با ایزوتیوسیانات سدیم، (Biox-diagnostics, Belgium).

۴- سرم مثبت و منفی رفرنس (شاهد)، شامل ۳ نمونه سرم منفی تجارتی (svanova Biothec) باضافه ۵ نمونه سرم منفی محلی و یک نمونه سرم مثبت (از مؤسسه سرم سازی رازی اخذ گردید).

۵- پروتئین‌های مارکر با وزن ملکولی مشخص که به ترتیب با وزن ملکولی ۹۲، ۴۷، ۴۳، ۳۰، ۲۱ و ۱۴ کیلودالتون بودند(sigma, 2000).

**۶- معرفهای الایزا:** شامل بافر گلیسین، بافر توئین، کنژوگه پراکسیداز (سرم خرگوشی ضد IgG گوسفند)، (sheep IgG antiserum, peroxidase conjugate-Rabbit anti)، بافر سوبسترا، کروموژن، (ارتوفنیلن دی آمین، OPD)، محلول متوقف کننده (اسیدسولفوریک نرمال)، سرم شاهد منفی، ساخت شرکت (Svanova Biothec, Sweden).

۷- آنتی ژن SAG-1 توکسوپلاسما گوندی‌آی، در فلاکن یک میلی لیتری، حاوی ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر، و آنتی بادی منوکلونال ضد SAG-1 جهت استفاده در وسترن بلات (Biox diagnostics- Belgium).

## روش کار

**نمونه برداری:** جمعاً ۱۱۰ نمونه سرم گوسفند بالغ به طور تصادفی (allocation Random) از ۱۴ گله از اطراف ارومیه جمع آوری و تا هنگام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد. این سرمها با آزمونهای الایزا، IFA و وسترن بلات مورد ارزیابی سرم شناسی قرار گرفتند.

**آماده کردن پلیت الایزا:** میکروپلیت ته صاف براساس روش (etal, 1980 Mineo) با $10^5$ تاکی زوئیت در هر حفره (در حجم ۱۰۰ میکرولیتر) در بافر کربنات- بی کربنات پوشش‌دار گردید(۹) پس از یک ساعت انکوبه در ۳۷ درجه و یک شب در یخچال، جهت فیکسه شدن تاکی زوئیت‌ها در پلیت به هر حفره ۱۰۰ میلی لیتر بافر PBS حاوی ۰/۵ درصد گلوتار آلدئید اضافه و بعد از سه دقیقه، ۳ بار شسته شد. جهت مسدود کردن فضای بین تاکی زوئیت‌ها به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلبومین گاوی ۱ درصد در بافر PBS ریخته و یک شب در ۴ درجه گذاشته و سه بار شسته شد. پرکردن فضای بین تاکی زوئیت‌ها به وسیله آلبومین مانع از چسبیدن آنتی بادیهای غیر اختصاصی به پلیت شده و از واکنشهای کاذب جلوگیری می‌کند(۴).

**آزمون الایزا:** از هر یک از سرمهای نمونه و نیز سرم مثبت و منفی رفرنس رقت‌های ۵۰:۱ و ۱۰۰:۱ به حجم ۱۰۰ میکرولیتر در داخل حفرات پلیت تهیه، پس از قرار دادن یک ساعت در ۳۷ درجه و ۳ بار شستن، ۱۰۰ میکرولیتر کنژوگه پراکسید از ۲۵:۱ به هر حفره افزوده و مجدداً به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه گذاشته و ۳ بار شسته شد. آنگاه به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا (کروموژن) ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در جای تاریک گذاشته و به محض مشاهده تغییر رنگ، ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر حفره اضافه و SAV(Specterophotomer Absorbance Value) حفرات توسط دستگاه فتومتر (Wellscan) در ۴۹۲ نانومتر خوانده و ثبت گردید. در این مطالعه کلیه سرمهایی که SAV آنها مساوی یا بزرگتر از ۲/۵ برابر SAV سرم شاهد منفی بود به عنوان مثبت در نظر گرفته شدند(۱۱).

**آزمون IFA:** با استفاه از شکل تاکی زوئیت انگل لکه‌های آنتی ژنی ۱۰ میکرولیتر روی اسلاید گذاشته و پس از خشک شدن با اتانول ثابت گردید. از نمونه‌های سرمی و نیز سرم شاهد منفی و مثبت رقت‌های ۲۰:۱ تا ۶۴۰:۱ تهیه و از هر رقت ۲۰ میکرولیتر روی لکه‌ها ریخته و پس از ۳۰ دقیقه انکوبه در اتاقک مرطوب ۳۷ درجه، ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در ظرف بافر آب کشی و خشک گردید. در این مرحله روی هر لکه آنتی ژنی ۲۰ میکرولیتر سرم کنژوگه فلورسئین با رقت ۲۵:۱ (حاوی اوانس بلو به نسبت ۱۰۰۰:۱) ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه مرطوب انکوبه و ۴ بار به مدت ۵ دقیقه در ظرف بافر آب کشی شده پس از خشک شدن روی هر لام یک قطره بافر گلیسیرین دار چکانده و با لامل پوشانده شد. آخرین رقتی از سرم که در واکنش با لکه آنتی ژن تعداد زیادی انگل توکسوپلاسما با حاشیه سبز درخشان در میکروسکپ فلورسانس نشان داد عیار پادتن در نظر گرفته شد(۶).

**آزمون ایمونوبلات:** برای تعیین کمترین عیار با ارزش (Cut-off titer) آنتی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



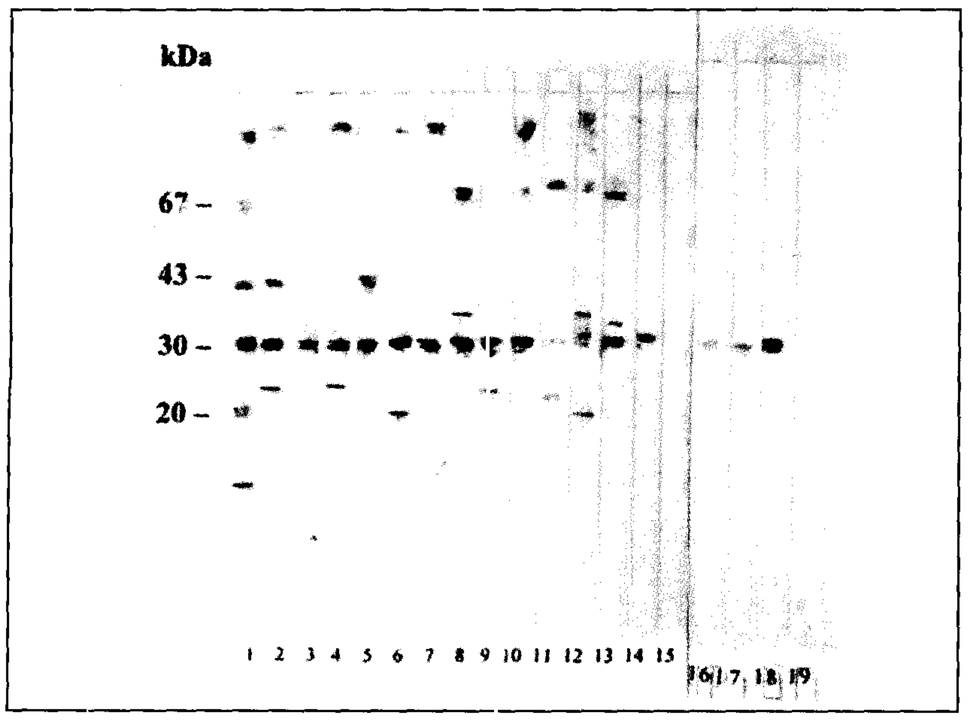
توکسوپلاسما گوندی‌آی در IFA و الایزا، و با استفاده از آنتی ژن محلول کامل و SAG-1 تجارتی (به عنوان شاهد) و بر اساس روش Sharma انجام شد (۱۵). ۵ میلی لیتر آنتی ژن محلول، حاوی ۱۰ میلی گرم پروتئین در میلی لیتر با یک میلی لیتر SDS(Sodium dodeoyl sulfate) ۴ درصد مخلوط (جهت دادن بار منفی به پروتئین) و با سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتر به داخل هر یک از حفرات تعبیه شده روی صفحه ژل پلی آکریلامید (SDS-PAGE) ۱۵ درصد در الکتروفورز عمودی ریخته شد. ضمناً دو حفره ژل به آنتی ژن SAG-1 تجارتی و یک حفره نیز به پروتئین‌های مارکر، جهت مشخص نمودن وزن ملکولی باندهای به‌دست آمده از آنتی ژن محلول، اختصاص یافت و به مدت ۶۰ دقیقه در ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز باندهای آنتی ژنی روی ژل بر اساس روش (Towbin) به روی ورق نیتروسلولز انتقال داده شد (۱۸). بدین ترتیب که صفحه ژل را روی فیلتر کاغذی در کاست محافظ قرار داده و ورق نیتروسلولز را که قبلاً در ترانسفر بافر مرطوب شده بود، روی ژل چسبانده و مجدداً با فیلتر کاغذی پوشانده شد و پس از محکم کردن کاست محافظ آن را در تانک الکتروترانسفر قرار داده و با جریان ۲۵ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شد. سپس ورق نیتروسلولز جهت اشباع جایگاه‌های باقیمانده اتصال پروتئین به‌منظور کاهش اتصال ایمونوگلوبولین‌های غیراختصاصی به آن به مدت یک ساعت در بافر توئین حاوی ۵ درصد شیر بدون چربی گذاشته شد و سه بار شسته شد. پس از خشک شدن، ورقه نیتروسلولز به صورت ۱۰ نوار باریک شماره دار بریده شد. هر یک نوار نیتروسلولز برای تست یک رقت از یک نمونه سرم به کار رفت. ضمناً یک نوار از باند SAG-1 و یک نوار از آنتی ژن محلول کامل و یک نوار پروتئین مارکر جهت مریی شدن باندهایشان با رنگ کوماسی بلو به مدت ۲۰ دقیقه رنگ و سپس با آب مقطر آب کشی گردید. آنگاه از آخرین رقت مثبت هر سرم نمونه و نیز یک رقت پائین‌تر از آن در آزمونهای IFA والایزا به طور جداگانه روی نوارهای نیتروسلولز ریخته و به مدت ۱/۵ ساعت در حرارت اتاق گذاشته، سپس سه بار با بافر توئین آب کشی شد. ضمناً سرم شاهد مثبت و شاهد منفی نیز، هم با نوار آنتی ژن محلول و هم با نوار حاوی باند SAG-1 مورد آزمایش قرار گرفت. پس از کمی خشک شدن تمامی نوارها در یک پلیت بزرگ حاوی کنژوگه پراکسیداز ۲۵:۱ به مدت یک ساعت در حرارت اتاق قرار داده شد. پس از این مدت نوارها را ۵ بار با بافر توئین شسته و روی آنها محلول سوبسترا (کروموژن - دی آمینوبنزیدین ۰/۲ میلی گرم/ میلی لیتر) اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در جای تاریک گذاشته شد. نوارها بلافاصله یکبار با بافر تریس - سالین جهت جلوگیری از توسعه رنگ آب کشی و جهت خشک شدن لای فیلتر کاغذی قرار گرفتند. در این مرحله باندهایی که با کروموژن رنگ گرفته و مریی شده بودند، مثبت در نظر گرفته شدند.

## نتایج

از ۱۱۰ نمونه سرم، ۲۴ مورد (۲۱/۸ درصد) با هر دو تست الایزا و IFA مثبت شدند و ۷۹ مورد (۷۱ درصد) با هر دو تست جواب منفی نشان دادند. بنابراین با توجه به نتایج سازگار دو تست الایزا و IFA، ۹۲/۷ درصد همخوانی بین آنها مشاهده گردید. از طرفی ۵ نمونه که الایزا مثبت و IFA منفی بوده و نیز ۲ مورد IFA مثبت که پاسخ الایزا منفی داشتند و به ترتیب دارای عیار ۱:۵۰ در الایزا و عیار ۱:۲۰ در IFA بودند، در وسترن بلات با باند SAG-1 (۳۰ کیلودالتون) واکنش مریی نشان ندادند و با سایر باندها نیز واکنش ضعیفی داشتند (جدول ۱). در مقابل تمام ۲۴ مورد مثبت با هر دو تست در وسترن بلات نیز واکنش مریی قوی، با باند SAG-1 نشان دادند. برخی از این سرمها علاوه بر واکنش با باند SAG-1 با ۲ تا ۴ باند آنتی ژنی دیگر نیز واکنش مثبت داشتند که نشان دهنده واکنش تقاطعی بین برخی از آنتی ژنهای توکسوپلاسما با آنتی بادیهای حاصل از سایر آلودگیهای انگلی است. الکتروفورز آنتی ژن محلول کامل پس از رنگ آمیزی روی بلات بین ۱۰ تا ۱۲ باند کاملاً مریی ظاهر نمودند. پروتئین مارکر دارای ۶ باند بود، که به ترتیب وزن ملکولی ۹۲، ۶۷، ۴۳، ۳۰، ۲۱ و ۱۴ کیلودالتون را داشتند. باند SAG-1 در ردیف پروتئین ۳۰ کیلودالتون مارکر قرار داشت. سه سرم شاهد منفی و ۵ نمونه از سرمهای منفی در الایزا و IFA که جهت مقایسه مورد آزمون ایمونوبلات قرار گرفتند با هیچ یک از باندهای آنتی ژنی واکنش نشان ندادند. بالاترین میانگین SAV سرمهای الایزا مثبت ۱/۸۴۰ و پائین‌ترین میانگین آنها ۱/۳۲۵ به دست آمد (جدول ۱). میانگین SAV سرمهای شاهد منفی ۰/۵۱۰ بود. بنابراین تمامی سرمهایی که SAV آنها مساوی یا بزرگتر از ۱/۲۷۵ بود، مثبت در نظر گرفته شدند، (۰/۵۱۰×۲/۵=۱/۲۷۵).

## بحث

در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۵ در ارومیه روی ۴۰۰ گوسفند و ۱۰۰ بز با آزمون لاتکس آگلوتی نیشن انجام شد، شیوع آلودگی با توکسوپلاسما گوندی‌آی را در گوسفند ۲۵ درصد و در بز ۲۰ درصد اعلام کردند (۷). بررسی‌های انجام شده روی آزمون لاتکس توکسوپلاسما نشان داد که این روش در مقایسه با سایر روشها، از




**تصویر ۱-** وسترن بلات از آنتی ژنهای پروتئینی محلول توکسوپلاسما گوندی‌آی روی نوارهای نیتروسلولز، و واکنش آنها با سرمهای مثبت و منفی در تست الایزا و IFA. شکل چپ - نوار ۱: پروتئین مارکر - نوار ۲ تا ۱۰ و ۱۳: مربوط به سرم‌های مثبت در الایزا و IFA با عیار ۱:۴۰ و بالاتر، (باند مثبت قوی در ایمونوبلات). نوار ۱۱ و ۱۲: مربوط به سرمهای الایزا مثبت و IFA منفی (باند مثبت ضعیف در ایمونوبلات). نوار ۱۴: آنتی بادی منوکلونال ضد SAG-1 (شاهد مثبت). نوار ۱۵: سرم شاهد منفی تجارتی (فاقد هرگونه باند رسوبی). باندهای مثبت در ردیف پروتئین ۳۰ کیلودالتون (SAG-1) قرار دارند. شکل راست - نوار ۱ تا ۵: سرمهای شاهد منفی محلی، نوار ۶ تا ۸ سرم شاهد منفی تجارتی نوار ۹ و ۱۰: مربوط به سرمهای الایزا منفی و IFA مثبت با تیتر ۱:۲۰، (باند مثبت خیلی ضعیف در ایمونوبلات). نوار ۱۱: سرم شاهد مثبت محلی، نوار ۱۲: سرم نمونه الایزا منفی و IFA منفی (فاقد هرگونه باند در ایمونوبلات).

**جدول ۱**- نتایج سرم شناسی به‌دست آمده از الایزا IFA و وسترن بلات روی سرم ۱۱۰ گوسفند بالغ.

| نوع آزمون / تعداد نمونه | نتایج الایزا | | | نتایج IFA | | آخرین رقت مثبت سرم در IFA | واکنش در وسترن بلات |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | میانگین SAV | تعداد مثبت | تعداد منفی | تعداد مثبت | تعداد منفی | | |
| ۴ | ۱/۸۴۰ | ۴ | ۰ | ۴ | ۰ | ۱:۸۰ تا ۱:۶۴۰ | **مثبت قوی** |
| ۳ | ۱/۷۱۲ | ۳ | ۰ | ۳ | ۰ | ۱:۸۰ | مثبت قوی |
| ۱۰ | ۱/۶۲۰ | ۱۰ | ۰ | ۱۰ | ۰ | ۱:۴۰ تا ۱:۶۴۰ | **مثبت قوی** |
| ۷ | ۱/۵۱۲ | ۷ | ۰ | ۷ | ۰ | ۱:۴۰ تا ۱:۱۶۰ | مثبت قوی تا متوسط |
| ۵ | ۱/۳۲۵ | ۵ | ۰ | ۰ | ۵ | - | **منفی تا مثبت خیلی ضعیف** |
| ۲ | ۰/۹۹۵ | ۰ | ۲ | ۲ | ۰ | ۱:۲۰ | منفی |
| ۷۹ | ۰/۷۴۴ | ۰ | ۷۹ | ۰ | ۷۹ | - | **منفی** |
| جمع ۱۱۰ | - | ۲۹ | ۸۱ | ۲۶ | ۸۴ | - | - |

دقت و حساسیت کمتری برخوردار است (۱۹،۲۱). در یک بررسی با آزمون آگلوتی نیشن مستقیم اصلاح شده روی سرم گوسفندان مازندران، نشان داده شد که این آزمون در ۹۶ درصد موارد با آزمون IFA همخوانی دارد (۱)، لکن نظر به این که در این آزمون به منظور بالا بردن حساسیت تست، سرم تحت تاثیر ۲-مرکاپتواتانل قرار می‌گیرد، این روش کمتر مورد توجه بوده است (۲۲). آزمون رنگی سابین (DT) که در ۹۹ درصد موارد با آزمون IFA همخوانی نشان داده (۲۰،۱۷) به علت نیاز به آنتی ژن زنده استفاده از آن با مشکلاتی مواجه بوده است. آزمون IFA به میزان گسترده‌ای، چه به منظور تشخیص موارد درمانگاهی، یعنی شکل حاد توکسوپلاسموز و جستجوی IgM در سرم (۱۲) و چه به منظور آزمون غربالی و جست‌وجوی موارد مزمن و تعیین شیوع سرمی با اندازه گیری IgG در سرم، کاربرد پیدا نموده است (۱۲،۲۰). مشکل روش IFA مشاهده طولانی مدت لامها در میکروسکپ فلورسانس در آزمونهای غربالی روی سرم حیوانات می‌باشد. آزمون الایزای غیرمستقیم نیز همانند IFA هم جهت جست‌وجوی آنتی بادی IgM در تشخیص توکسوپلاسموز حاد (۱۰) و هم در اندازه‌گیری آنتی بادی IgG، می‌تواند به عنوان یک تست غربالی در تعیین عفونت‌های مزمن با توکسوپلاسما گوندی آی مورد استفاده قرار گیرد (۱۱،۲۳).

نظر به این که در تحقیقات قبلی دیگران روی تعیین کمترین عیار با ارزش سرم (Cut- off titer) که بتواند معیار آلودگی با توکسوپلاسما در نظر گرفته شود رقت‌های متفاوتی نظیر ۱:۱۶، ۱:۲۰ و یا ۱:۶۴ را برای IFA و رقت‌های ۱:۶۴ و ۱:۱۰۰ را برای الایزا گزارش کرده‌اند (۳،۱۶،۲۰). در مطالعه حاضر سعی بر این شد که ضمن تعیین کمترین عیار با ارزش در IFA و الایزا جهت پی بردن به عفونت با توکسوپلاسما گوندی‌آی، میزان شیوع آلودگی گوسفندان به این انگل را در ارومیه به‌دست آوریم.

در این تحقیق چون تمامی نمونه‌های سرم مثبت سازگار در هر دو آزمون، چه با عیار بالا و یا پایین همیشه باند ۳۰ کیلودالتون را شناسایی کردند و بعضی نمونه‌ها سایر باندهای آنتی ژنی را نیز شناسایی کردند و از طرفی تمامی سرمهای منفی سازگار با هر دو آزمون، در وسترن بلات نیز با SAG-1 واکنش منفی داشتند، لکن بعضی از آنها با سایر اپی توپها (باندها) واکنش مریی نشان دادند. این یافته‌ها می‌تواند واکنش تقاطعی بین آنتی ژنهای مشترک توکسوپلاسما گوندی‌آی با سایر انگل‌های آپی کمپلکس را نشان دهد. نمونه‌های سرم مثبت IFA و الایزا که با یکدیگر همخوانی نداشتند دارای تیتر پایین آنتی بادی (۱:۴۰> در IFA و ۱:۱۰۰> در الایزا) در سرم بودند و در وسترن بلات نیز با باند SAG-1 واکنش نشان ندادند، ولی بعضی از آنها با سایر اپی توپها واکنش مریی داشتند. عیار پایین آنتی بادی مثبت در سرم می‌تواند مربوط به عفونتهای پنهانی با توکسوپلاسما باشد و یا ممکن است واکنش تقاطعی با سایر کوکسیدین‌ها را نشان دهد.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان فراوانی حیوانات سرم مثبت با آزمونهای مختلف سرم شناسی می‌تواند تفاوتهایی با یکدیگر داشته باشند، به طوری که میزان آلودگی در گوسفند با الایزا ۲۶/۳ درصد و با IFA ۲۳/۶ درصد در ارومیه به‌دست آمد. لکن با استفاده از آزمون آماری مربع کای در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت آماری معنی‌دار بین نتایج الایزا و IFA مشاهده نگردید. از این رو از الایزا IgG- می‌توان به عنوان یک آزمون غربالی در تعیین موارد آلودگی با توکسوپلاسما گوندی‌آی استفاده نمود.

در این تحقیق کمترین عیار با ارزش آنتی توکسوپلاسمای سرم که بتواند معیار آلودگی در گوسفند در نظر گرفته شود. در IFA ۱:۴۰ و در الایزا ۱:۱۰۰ به‌دست آمد. نتایج این مطالعه هم چنین نشان داد که واکنش مثبت نمونه‌های سرم با باند 1-SAG در وسترن بلات می‌تواند یک ابزار مفید و معیاری برای تعیین کمترین عیار با ارزش در آزمونهای رایج سرم شناسی در تشخیص موارد آلودگی با توکسوپلاسما گوندی‌آی و تعیین فراوانی شیوع موارد سرم مثبت با آزمونهای غربالی از جمله IFA و الایزا باشد.

## References


۱. رزمی، غ؛ رهبری، ص (۱۳۷۹): مقایسه روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده با روشهای ایمونوفلورسنت غیرمستقیم و تست رنگی (DT) در تشخیص توکسوپلاسموزیس گوسفندان، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دانشگاه شیراز، دوره دوم، شماره اول، صفحه: ۱۹-۱۲.

۲. رزمی، غ؛ رهبری، ص. (۱۳۸۰): بررسی سقط جنین توکسوپلاسمایی در یکی از گوسفندداریهای شهرستان گرگان، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره دوم، شماره اول - صفحه: ۳۹ - ۳۲.

3. Ahmed, B.A., Gaafar, S.M. anf Kanetz, C.L. (1983): Relationship of Toxoplasma infections to other diseases. Veterinary Parasitology 12: 199-203.

4. Caponi, L., Migliorini, P. (1999): Antibody usage in the Lab., springer, Lab. Manual, London, PP: 35-50.

5. Dudey, J. P., Miller, S., Powell, E. C., and Anderson,

W .R. (1986): Epizootiologic investigations on a sheep farm with toxoplasma gondii- induced abortions, J of American Vet, Med Association, 188(2), 155-158.

6. Ghorbani, M., Edrissian, Gh. H., and Assad, N. (1978): Serological survey of toxoplasmosis in the northern part of Iran, using IFA technique, Transactions of the Royal society of Tropical Medicine and Hygeine. 72(4): 369-371.
7. Hashemi-Fesharaki, R. (1996): Seroprevalence of Toxoplasma gondii in cattle, sheep and goats in Iran. Veterinary Parasitology, 61: 1-3.
8. Manger, I. D., Hehl, A. B., and Boothroyd, J. C. (1998): The surface of Toxoplasma tachyzoites is dominated, by a family of Glycosylphosphatidylinositol antigen related to SAG-1. Infection and Immunity 66, 2237-44.
9. Mineo, J. R., Camargo, M. E., and Perreira, A.W. (1980): ELISA for antibodies to T.gondii polysaccharides in Toxoplasmosis. Infect. Immun, 27:283.
10. Naot, Y., Remington, J. S. (1980): An ELISA for detection of IgM antibodies to T.gondii, use for diagnosis of acute aquired toxoplasmosis J. Infect. Dis. 142: 757-766.
11. Payne, R. A., Joynson, D. M., and Wilsmore, Ag. (1988): ELISA for measurment of specific antibodies in experimentally induced Ovine toxoplasmosis. J. Epidemiol Infect, 100: 205-212.
12. Remington, J. S., Miller, M. J. (1966): 19S and 7S antitoxoplasma antibodies in the diagnosis of acute toxoplasmosis. Proc. Soc. Exp. Boil. Med., 121: 357-363.
13. Robert, H. (1991): Veterinary obstetric and genital disease. David and charles Inc. North pomfert, Vermont, USA, PP: 200.
14. Rodrigues, C., Afchain, D., Capron, A., and Santoro, F. (1985): Major surface protein of Toxoplasma gondii (P30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. European Journal of Immunology, 15: 747-9.
15. Sharma, S.D., Mullenax, J., and Araujo, F. G. (1983): Westernblot analysis of the antigens to T.gondii recognized by human IgM and IgG antibodies,J. Immunol, 131:977-983.
16. Silva, N. M., Lorenco, E. V., and Mineo, J. R. (2002): Optimization of cut- off titers in T. gondii specific ELISA and IFAT in sera using Immunoreactivity to SAG-1 antigen as a molecular marker of infection. The Veterinary Journal, 163: 94-98.
17. Suzuki, k., Suto, T., and Fugita, J. (1965): Serological diagnosis of toxoplasmosis by the IFA test . the National Institute of animal health quarterly. 5: 73-75.
18. Towbin, H., staehelin, T., and Gorden, J.(1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and source applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76, 4350-6.
19. Trees, A. J., Crozier, S. J. (1989): Serodiagnosis of ovine toxoplasmosis and assessment of the latex agglutination test and value of IgM specific titres after experimental infection. Research in Veterinary Science. 46: 67-72.
20. Walton, B. C, Benchoff, B. M., and Brooks, W. H. (1966): Comparison of the IFA test and Dye test for detection of antibodies to T. gondii, Am. J. Trop. Med. Hyg, 15: 149-152.
21. Walls, S. W., Remington, J. S. (1983): Evaluation of a latex agglutination method for toxoplasmosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 1: 265-271.
22. Wilson, M., ware. D. A., and Juranek, D. D. (1990): Serological aspect of toxoplas-msis. J. of Amrican Vet. Med. Association. 196: 277-280.
23. Woodward, B. C. (1982): Evaluation of an ELISA specific for IgG as a screening test for detecting anti-toxoplasma antibodies. J.clin. Mirobiol, 16: 367-372.