مقاله پژوهشی
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
جلد سوم، شماره چهارم، پاییز ۱۳۸۳

ارزیابی روش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی توکسوپلاسما برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی

سیدحسین عبداللهی[۱*]، عباس محمودزاده[۲]، مهران بهادران[۳]

دریافت:۱۳۸۳/۲/۱۹ بازنگری: ۱۳۸۳/۷/۲۲ پذیرش: ۱۳۸۳/۹/۱۰

خلاصه

سابقه وهدف: با توجه به گزارش‌های قبلی، به نظر می‌رسد آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی (E/SA) توکسوپلاسما گوندی نشانگرهای مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس با روش‌های سرولوژی باشند. در مطالعات قبلی معمولاً مایع رویی کشت سلولی توکسوپلاسما یا محیط کشت RPMI-1640 که تاکی‌زوئیت‌های تک یاخته در آن انکوبه شده بودند، به عنوان ترکیب حاوی E/SA استفاده شده‌اند. این مطالعه به منظور ارزیابی روش الایزا با استفاده از مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلاسما (یکی از ترکیبات حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی توکسوپلاسما) به عنوان آنتی‌ژن، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی که ۳ روز قبل به طریق تزریق داخل صفاقی با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما آلوده شده بود، کشیده شد و با دور g×۷۵۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید سپس رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) (ترکیب حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی) از مایع رویی آن تهیه شد.۴۰ سر موش صحرایی نر با سن ۱۰-۷ هفته و غیرآلوده به توکسوپلاسما (Dye - Test منفی) انتخاب و به هر کدام ۴×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما از طریق داخل صفاقی تزریق گردید. به منظور انتخاب نمونه سرم مناسب از مراحل سیر آلودگی، سرم روزهای ۸، ۱۵، ۲۲ و ۶۰ بعد از آلودگی موش‌های صحرایی تهیه شد در مرحله بعد نمونه‌های سرم روزهای فوق مربوط به۱۰ سر از آن‌ها به روش dye-test و سرم روزهای ۱۵ و ۶۰ تمام حیوانات بعد از آلودگی نیز به عنوان نمونه‌های مناسب هم به روش dye-test و هم به روش الایزا با استفاده از ترکیب حاوی E/SA تهیه شده به طریق مورد نظر در این مطالعه، آزمایش شدند.

یافته‌ها: با توجه به نتایج آزمایش سرم روزهای مختلف موش‌های صحرایی آلوده، سرم روز ۱۵ و۶۰ به عنوان نمونه‌های مناسب انتخاب شدند تحت شرایط مورد نظر در این بررسی، Cut-off تست الایزا با ۹۹٪ اطمینان برابر ۰/۳۳ تعیین گردید که میزان جذب نوری تمام نمونه سرم‌های روزهای ۱۵ و ۶۰ آلودگی و هم‌چنین دو مورد از سرم‌های منفی بالاتر از آن بدست آمد. ویژگی و حساسیت آزمون نیز به ترتیب ۹۵٪ و ۱۰۰٪ تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش الایزا تحت شرایط مورد نظر در این مطالعه و با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلاسما، آزمون نسبتاً مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در مدل حیوانی مورد مطالعه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسموزیس، الایزا، آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی، توکسوپلاسما گوندی

۱*- استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
تلفن: ۰۳۴۱-۵۲۳۴۰۰۳، فاکس: ۰۳۴۱-۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: habdollahi38@yahoo.com
۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... تهران
۳- کارشناس ارشد انگل‌شناسی، عضو هیأت علمی گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

مقدمه

توکسوپلاسموزیس[1] بیماری شایع در سراسر دنیا است که در اثر آلودگی با تک یاخته توکسوپلاسماگوندی[2] متعلق به خانواده اپی‌کمپلکسا[3] بروز می‌کند. انسان از طریق اکتسابی و مادرزادی به این بیماری مبتلا می‌شود. آلودگی درافراد با سیستم ایمنی سالم معمولاً بدون علامت یا همراه با علایم خفیف می‌باشد ولی برای کودکانی که در دوران جنینی آلوده شده‌اند (مادرزادی) و افراد دچار نقص ایمنی ممکن است عوارض شدید و حتی مرگ را به دنبال داشته باشد [۲،۹،۱۱].

تشخیص سریع و دقیق توکسوپلاسموزیس دارای اهمیت زیادی می‌باشد زیرا با تشخیص به موقع و درمان مناسب، عوارض ناشی از این بیماری به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند. اگرچه تلقیح نمونه به حیوان حساس، کشت سلولی و مشاهده انگل در برش‌های بافتی یا گسترش تهیه شده از مایعات بدن برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از حساسیت و ویژگی مناسب برخودار می باشند اما به دلیل نیاز به امکانات خاص، صرف زمان نسبتا زیاد برای مشخص شدن نتیجه آزمایش و خطر آلودگی افراد و محیط کار (به دلیل کار با انگل زنده) معمولاً در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مورد استفاده قرار نمی‌گیرند [۱۰،۱۲،۱۹].

تعیین آنتی‌بادی تولید شده علیه توکسوپلاسما در سرم افراد، روش رایج تشخیص توکسوپلاسموزیس است. آزمایش‌های موجود برای این منظور با استفاده از آنتی‌ژن‌های غشایی یا سیتوپلاسمی انگل طراحی شده‌اند. وجود برخی مشکلات از جمله پایداری متفاوت ایمنوگلبولین‌های قابل شناسایی توسط این آنتی‌ژن‌ها، بروز مثبت کاذب در اثر وجود فاکتور روماتوئیدی و آنتی‌بادی‌های طبیعی، تفسیر نتایج این آزمایش‌ها را مشکل می‌کند و گاهی اعلام نظر قطعی در این رابطه غیر ممکن می‌باشد [۶،۱۵].

جهت برطرف شدن مشکلات فوق، بررسی‌های زیادی به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلاسما به عنوان آنتی‌ژن جهت استفاده در سنجش‌های ایمنی طراحی شده برای تشخیص توکسوپلاسموزیس صورت گرفته است. در این رابطه توجه پژوهشگران به آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی (E/SA)[4] انگل جلب شده است. محمودزاده و همکاران(۱۹۹۹) گزارش کردند که روش الایزا نقطه‌ای[5] با استفاده از مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده با سویه RH توکسوپلاسماگوندی دارای ارزش تشخیصی بالایی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی می‌باشد [۱]. مطالعات کازابون و همکاران[6] (۱۹۹۴) نشان داد که برخی از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلاسما و آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آن‌ها تنها زمان خاصی از دوره توکسوپلاسموزیس، در سرم قابل شناسایی می‌باشند هم‌چنین نوع، میزان و زمان قابل شناسایی بودن ایمنوگلبولین‌های IgE, IgM, IgA, IgG تولید شده علیه این آنتی‌ژن‌ها در سرم موش‌های آلوده به سویه‌های مختلف توکسوپلاسما متفاوت می‌باشد [۴]. الساندر و همکاران[7] (۲۰۰۲) گزارش کردند که ترکیب دفعی - ترشحی ۹۷کیلودالتونی از تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما، تولید IgM, IgG را در فاز حاد توکسوپلاسموزیس تحریک می‌کند ولی در مرحله مزمن تنها IgG را شناسایی می‌کند؛ بنابراین به عنوان یک مارکر مناسب برای استفاده در آزمون‌های تشخیصی قابل بررسی می‌باشد [۳]. یاماموتو و همکاران[8] (۱۹۹۸) گزارش کردند که ترکیبات آنتی‌ژنی مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلاسما گوندی، ایمونوگلبولین‌های IgG، IgM IgA، علیه توکسوپلاسما در سرم انسان را شناسایی می‌کنند و به عنوان مارکر برای استفاده در روش‌های سرولوژی به منظور تشخیص توکسوپلاسموزیس قابل بررسی می‌باشند [۱۹].

باتوجه به خصوصیات گزارش شده از E/SA این آنتی‌ژن‌ها نشانگرهای مناسبی برای استفاده در تست‌های سرولوژی جهت بهبود ارزش تشخیصی این روش‌ها برای تشخیص توکسوپلاسموزیس به نظر می‌رسند [۵،۹،۱۱]. بنابراین از آنجایی که مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلاسما به عنوان یکی از ترکیبات حاوی E/SA گزارش شده است، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی روش الایزا

1 - Toxoplasmosis
2- Toxoplasma gondii
3- Apicomlexa

4- Excreted / Secreted Antigens
5- Dot-ELISA
6- Cazabon et al
7- Alessander et al
8- Yamamoto et al

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

به عنوان یک آزمون حساس و قابل انجام در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) این ترکیب، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی صورت گرفت.

مواد وروش‌ها

۱- تهیه آنتی‌ژن

مایع صفاق موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی که سه روز قبل با تاکی‌زوئیت‌های سویه RH توکسوپلاسما گوندی (10^6 تاکی‌زوئیت در هر میلی‌لیتر) به روش تزریق داخل صفاقی آلوده شده بودند، خارج و با دور g×۷۵۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به عنوان ترکیب حاوی E/SA جدا شد.

برای تهیه رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) پس از تعیین مقدار سولفات آمونیوم مورد نیاز (۱۶۴ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیترترکیب حاوی پروتئین مورد نظر در صفر درجه سانتیگراد)، ترکیب حاوی E/SA در دمای مناسب قرار داده و در حالی که به وسیله همزن مغناطیسی دائما مخلوط می‌شد، نمک تدریجاً به آن اضافه گردید بعد از افزودن سولفات آمونیوم تعیین شده به ظرف حاوی مایع صفاق موش آلوده، محلول به مدت یک شب در یخچال قرارداده شد. پس از آن به مدت نیم ساعت با دور g×۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید سپس مایع رویی آن خارج و رسوب به مدت ۲۴ساعت در مقابل بافرتریس اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار با PH=۷/۴ دیالیز (کیسه دیالیز با $cut\text{-}off<10^{KD}$ تهیه شده از شرکت بیوژن ایران) و با قرار دادن کیسه دیالیز در مقابل جریان شدید هوا (کولرگازی) تغلیظ و به روش برادفورد، میزان پروتئین آن محاسبه گردید [۱،۱۳،۱۹].

۲- تهیه نمونه های سرم

موش‌های صحرایی نر با ۱۰-۷ هفته سن برای این منظور انتخاب شدند [۸] برای اطمینان از عدم آلودگی قبلی آن‌ها به توکسوپلاسما گوندی از حدقه چشمشان خون‌گیری و سرم آن‌ها به روش رنگ سنجی[1] (تست طلایی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس) به صورت سریال رقت و تک رقتی آزمایش گردید. به طور خلاصه سریال رقت دو برابر از سرم مورد نظر درحفره‌های میکروپلیت مناسب تهیه و به هر حفره حاوی سرم،۵۰ میکرولیتر کمپلمان و ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سرم فیزیولوژی حاوی ۷۲×۱۰^۵ تاکی‌زویت‌توکسوپلاسما در میلی‌لیتر اضافه و میکروپلیت به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه قرارداده شد. پس از آن ۲۵میکرولیتر از محلول رنگ متیلن بلو به تمام حفره‌ها اضافه و پس از یک ساعت انکوبه در ۳۷درجه، میکروپلیت ۱۰ دقیقه در حرارت اطاق قرار گرفت. در پایان به کمک میکروسکوپ اینورت تعداد ۱۰۰ تاکی‌زوئیت از هر حفره شمرده و تعداد رنگ گرفته‌ها تعیین گردید. رقتی از سرم که ۵۰٪ تاکی‌زوئیت‌ها رنگ گرفته بودند (رقت نهایی)[2] انتخاب و با کنترل (در این مطالعه رقت ۱به ۲۵۶) مقایسه شد. در روش تک رقت، تنها سرم رقیق نشده به کار می‌رفت و بقیه موارد با روش سریال رقت یکسان بود [۱۲].

۴۰ سر از موش‌های صحرایی که سرم آن‌ها از نظر وجود آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما منفی بود (نقطه پایان تیتراسیون سرم آن‌ها با روش رنگ‌سنجی به طریق سریال رقت کمتراز ۱ به ۳۲ و به طریق تک رقت حداقل ۹۵٪ تاکی‌زوئیت‌ها رنگ گرفته بودند) انتخاب و به هر کدام ۴×۱۰^۶ تاکی‌زوئیت سویه RH توکسوپلاسما به طریق داخل صفاقی تزریق گردید [۱۵]. به منظور انتخاب نمونه‌های مناسب سرم از مراحل آلودگی، روزهای ۸، ۱۵، ۲۲ و ۶۰ مانند مرحله قبل از موش‌های صحرایی خونگیری و سرم آن‌ها جدا گردید. در مرحله بعد ۱۰ سر از موش‌های صحرایی آلوده شده به طور تصادفی انتخاب و نمونه‌های سرم روزهای فوق مربوط به آن‌ها با روش رنگ‌سنجی آزمایش شد سپس سرم روزهای ۱۵ و ۶۰ تمام موش‌ها به عنوان نمونه‌های مناسب به روش رنگ‌سنجی آزمایش شدند [۱۲،۱۶]. نمونه سرم‌های قبل ازآلودگی موش‌ها به عنوان نمونه‌های منفی در نظرگرفته شد.

برای اثبات بروز توکسوپلاسموزیس در موش‌ها به دنبال تلقیح تاکی‌زوئیت‌ها و تایید نتایج تست رنگ‌سنجی(عدم آلودگی موش‌ها به توکسوپلاسما قبل از دریافت تاکی‌زوئیت‌ها

1- Dye-test

2- End-point

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

و مثبت بودن نمونه سرم‌های تهیه شده بعد از آلودگی)، سوسپانسیون مغز تمام موش‌های آلوده شده و ۱۰سر از موش‌های غیر آلوده (علاوه بر ۴۰ سر موش انتخاب شده جهت مطالعه) از طریق داخل صفاقی به موش سفید کوچک آزمایشگاهی تلقیح گردید [۷،۹].

۳- طراحی الایزا

الف :تعیین رقت مناسب کونژوگه

این قسمت در قالب الایزای مستقیم انجام شد. به طور خلاصه در یک میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای مخصوص الایزا، سریال رقت دو برابر از کونژوگه (Rabbite-AntiRat نشاندار شده با پراکسیداز، ساخته شرکت DAKO دانمارک)، و سرم تهیه شد (کونژوگه در جهت عمودی و سرم در جهت افقی حفره‌های میکروپلیت رقیق شدند) به طوری که هر رقت از کونژوگه با تمام رقت‌های سرم سنجیده شود. پس از پایان مراحل آزمایش، میزان جذب نوری حفرهای پلیت با اسپکتروفتومتر چند کانالی (ساخت شرکت Moller – Wede آلمان) در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد.

ب – تعیین رقت مناسب آنتی‌ژن

این مرحله در قالب الایزای غیرمستقیم صورت گرفت. به طور خلاصه در یک میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای مخصوص الایزا سریال رقت دو برابر از سرم و آنتی‌ژن تهیه شد (سرم در جهت عمودی و آنتی‌ژن در جهت افقی میکروپلیت رقیق شدند) به طوری که هر کدام از رقت‌های سرم با تمام رقت‌های آنتی‌ژن مقایسه شوند. در پایان مراحل آزمایش، میزان جذب نوری حفره‌های پلیت با اسپکتروفتومتر چند کانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین گردید.

ج ـ تعیین رقت مناسب سرم

برای این منظور سه نمونه سرم منفی و سه نمونه سرم مثبت با رقت بالا، متوسط و پایین انتخاب و در قالب الایزای غیر مستقیم آزمایش شدند به طور خلاصه میزان مناسب از آنتی‌ژن به دیواره تمام حفره‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص الایزا متصل و سریال رقت دو برابر و دوتایی (در دو ستون کنار هم) از سرم‌های مورد نظر در جهت عمودی این حفره‌های تهیه گردید در پایان میزان جذب نوری حفره‌های پلیت با استفاده از اسپکتروفتومتر چند کانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد.

د ـ تعیین Cut-off تست

در این قسمت تمام سرم‌های منفی با رقت مناسب آنتی‌ژن، سرم و کونژوگه (به دست آمده از مراحل قبل) به صورت دوتایی در قالب الایزا غیرمستقیم به صورت تک رقتی آزمایش شدند، پس از تعیین میزان جذب نوری حفره‌های پلیت با اسپکتروفتومتر چندکانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر، میانگین رقت‌های دوتایی نمونه‌ها محاسبه و نمودار فراوانی آنها رسم گردید هم‌چنین میانگین و انحراف ازمعیار میانگین‌ها نیز محاسبه شد [۵].

۴ ـ انجام الایزا

در این مرحله پس از تعیین رقت مناسب گونژوگه رقت مناسب آنتی‌ژن [(رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش آلوده شده با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما)]، رقت مناسب سرم (سرم موش‌های آلوده شده با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما)، cut-off تست محاسبه و نمونه‌های سرم مورد نظر(سرم‌های منفی، سرم روزهای ۱۵و ۶۰) به روش الایزای غیرمستقیم به صورت تک رقتی آزمایش شدند [۵،۱۳] و با توجه به نتایج حاصل، ویژگی و حساسیت روش مذکور برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی از روابط زیر محاسبه گردید (مثبت و منفی کاذب و حقیقی سرم‌ها بر اساس مقایسه نتایج تست رنگ‌سنجی با نتایج روش الایزا تعیین شده است).

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{مثبت حقیقی + منفی کاذب}} \times ۱۰۰$$

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{منفی حقیقی + مثبت کاذب}} \times ۱۰۰$$

نتایج

تهیه نمونه‌های سرم مناسب

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

نتایج آزمایش رنگ سنجی سرم موش‌های صحرایی که به طور تصادفی به منظور تعیین نمونه سرم‌های مناسب از مراحل سیرتوکسوپلاسموزیس انتخاب شدند (۱۰ سر). درجدول ۱ آمده است. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که عیار آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما درسرم این موش‌ها در اوایل آلودگی (تا روز۲۲) سیر صعودی داشته ولی در نمونه سرم‌های تهیه شده از روز ۶۰ آلودگی مساوی یا کمتر از روز ۲۲ می‌باشد. اختلاف عیار آنتی‌بادی درنمونه‌های سرم این دو روز با p<۰/۰۱ معنی‌دار بود. هم‌چنین گرچه عیار آنتی‌بادی از روز هشتم آلودگی قابل شناسایی بود ولی تاروز ۱۵ به میزان مناسب افزایش یافت (باتوجه به سرم کنترل). این افزایش باp<۰/۰۰۵ معنی‌دار بود. بنا براین سرم روز۱۵ به عنوان سرم اوایل آلودگی وسرم روز ۶۰ به عنوان سرم مرحله مزمن انتخاب شدند.

در صفاق تمام موش‌های سفیدکوچک آزمایشگاهی که سوسپانسیون مغز موش‌های آلوده شده با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما را از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کرده بودند و رقت End-point سرم آن‌ها مساوی یا بیشتر از ۱به ۲۵۶ (رقت پیشنهادی کنترل مثبت) بود تاکی زوئیت مشاهده گردید ولی در صفاق موش‌هایی که با سوسپانسیون مغز موش‌هایی که سرم آن‌ها باروش رنگ سنجی از نظر وجود آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما منفی بودتاکی‌زوئیت مشاهده نشد.

طراحی الایزا

الف ـ تعیین رقت مناسب کونژوگه، آنتی ژن و سرم

با در نظر گرفتن عوامل زیر در جدول تعیین عیار برای هر مورد

Plateau-height: حفره هایی که در آن‌ها زیادی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی وجود داشت به عبارت دیگر با تغییر رقت آنتی‌ژن و یا سرم، میزان جذب نوری در آن‌ها تغییر پیدا نکرد.

Backgrond plate: میزان جذب نوری ناشی از واکنش‌های غیر اختصاصی و بدون ارتباط با فعالیت آنزیم

End-point: آخرین رقتی از آنتی‌ژن یا سرم که میزان جذب نوری آن بالاتر از Backgrond می‌باشد.

و تحت شرایط این مطالعه رقت کونژوگه۱به ۴۰۰۰، رقت مناسب آنتی‌ژن۱به۳۲ (حاوی ۶/۲۵ میکروگرم پروتئین در میلی‌لیتر ترکیب حاوی آنتی‌ژن) و رقت مناسب سرم (آنتی‌بادی)۱به۲۰۰ بدست آمد.

ب ـ تعیین Cut-off تست

میانگین وانحراف معیار میزان جذب نوری نمونه سرم‌های منفی به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۱۸ بدست آمد و با توجه به این که منحنی فراوانی OD سرم‌های منفی کشیدگی به سمت راست داشت با ۹۹٪ اطمینان Cut-off تست عبارت است از:

Cut-off= μ+3SD =۰/۱۸+۰/۱۵=۰/۳۳

انجام الایزا

نتایج آزمایش نمونه‌های سرم روز ۱۵آلودگی، روز ۶۰ آلودگی و سرم‌های منفی به روش الایزا با رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده با توکسوپلاسما به ترتیب در جداول۲، ۳ و ۴ آمده است (حین مراحل خون‌گیری ۴ سر از موش‌های صحرایی مردند بنابراین نمونه‌های سرم آن‌ها از مطالعه حذف شدند). بررسی داده‌های فوق نشان می‌دهد که میزان جذب نوری(OD) [1] تمام نمونه سرم‌های روز ۱۵آلودگی ، روز ۶۰ آلودگی و دو مورد از سرم‌های منفی بیشتر از cut-off تست می‌باشد در نتیجه با توجه به نتایج آزمایش نمونه‌های سرم موش‌ها به روش رنگ‌سنجی، تحت شرایط مورد نظر در این بررسی، حساسیت و ویژگی تست الایزا-غیرمستقیم به روش تک رقتی برای تشخیص آلودگی به توکسوپلاسما (وجود آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما در سرم) در مدل حیوانی مورد مطالعه به شرح ذیل می‌باشد.

$$\text{حساسیت} = \frac{۳۶}{۳۶+۰} \times ۱۰۰ = ٪۱۰۰$$

$$\text{ویژگی} = \frac{۳۶}{۳۶+۲} \times ۱۰۰ = ٪۹۵$$

1- Optical density

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

جدول ۱:تغییرات رقت نهایی (End point) در آزمایش Dye – Test نمونه‌های سرم ده سراز موش‌های صحرایی آلوده شده به توکسوپلاسما

رقت End point نمونه‌های سرم					
آلودگی / شماره حیوان	قبل از آلودگی	بعد از آلودگی			
		روز ۸	روز ۱۵	روز۲۲	روز ۶۰
۳	۱:۴ *	۱:۱۲۸	۱:۵۱۲	۱:۱۰۲۴	۱:۵۱۲
۵	۱:۴	۱:۶۴	۱:۲۵۶	۱:۵۱۲	۱:۲۵۶
۸	۱:۱۶	۱:۶۴	۱:۵۱۲	۱:۱۰۲۴	۱:۵۱۲
۱۴	۱:۴	۱:۱۲۸	۱:۵۱۲	۱:۲۰۴۸	۱:۵۱۲
۹	۱:۴	۱:۶۴	۱:۲۵۶	۱:۵۱۲	۱:۲۵۶
۲۱	۱:۱۶	۱:۶۴	۱:۲۵۶	۱:۵۱۲	۱:۵۱۲
۱۷	۱:۴	۱:۶۴	۱:۲۵۶	۱:۵۱۲	۱:۵۱۲
۱۹	۱:۴	۱:۶۴	۱:۲۵۶	۱:۵۱۲	۱:۵۱۲
۲۳	۱:۱۶	۱:۱۲۸	۱:۵۱۲	۱:۲۰۴۸	۱:۵۱۲
۱۵	۱:۱۶	۱:۶۴	۱:۵۱۲	۱:۱۰۲۴	۱:۲۵۶

**** اعداد داخل جدول رقت نهایی سرم می‌باشند.***

افزایش رقت نهایی سرم‌های روز ۸ بعد از آلودگی نسبت به قبل از آلودگی و سرم‌های روز ۱۵ بعداز آلودگی نسبت به روز ۸ با $p<0/001$ معنی‌دار می‌باشد.

افزایش رقت نهایی سرم‌های روز ۲۲ بعداز آلودگی نسبت به روز ۱۵ با $p<0/005$ معنی‌دار می‌باشد

اختلاف رقت نهایی سرم‌های روز ۶۰ بعد از آلودگی نسبت به روز۲۲با $p<0/01$ معنی دار است

جدول ۲: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم‌های روز ۱۵ (موش‌های صحرایی آلوده شده با توکسوپلاسما) به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلاسما.

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۲/۰۲	۱۵	۱/۸۰	۲۹	۱/۴۰
۲	۲/۰۱	۱۶	۱/۹۲	۳۰	۱/۶۳
۳	۱/۰۹	۱۷	۱/۸۸	۳۱	۰/۹۸
۴	۲/۱۱	۱۸	۱/۹۹	۳۲	۱/۶۴
۵	۱/۹۵	۱۹	۲/۰۱	۳۳	۱/۵۵
۶	۱/۹۴	۲۰	۱/۹۹	۳۴	۱/۹۵
۷	۱/۸۵	۲۱	۲/۰۰	۳۵	۱/۹۹
۸	۱/۷۷	۲۲	۱/۹۸	۳۶	۲/۰۰
۹	۲/۱۴	۲۳	۰/۹۲	۳۷	۰/۱۴
۱۰	۲/۰۱	۲۴	۱/۶۳	۳۸	۰/۱۵
۱۱	۱/۹۷	۲۵	۱/۴۶	۳۹	۰/۱۴
۱۲	۱/۸۹	۲۶	۱/۲۸	۴۰	۰/۱۳
۱۳	۱/۸۵	۲۷	۱/۶۹	۴۱	۰/۱۵
۱۴	۱/۸۴	۲۸	۱/۴۴	۴۲	۰/۱۲

شماره‌های ۳۷، ۳۸ و ۳۹ سرم منفی و شماره‌های ۴۰، ۴۱ و ۴۲بدون آنتی‌ژن بوده‌اند (کنترل منفی)

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

جدول ۳: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم روز ٦٠ موش‌های صحرایی آلوده شده با توکسوپلاسما به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلاسما.

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۱/۱۷	۱۵	۱/۹۴	۲۹	۱/۳۹
۲	۳۵/۱	۱۶	۱/۷۷	۳۰	۱/۶۲
۳	۰/۹۰	۱۷	۱/۷۹	۳۱	۱/۷۸
۴	۱/۹۲	۱۸	۱/۷۸	۳۲	۱/۸۹
۵	۱/۸۲	۱۹	۱/۷۷	۳۳	۱/۸۸
۶	۱/۸۳	۲۰	۱/۶۴	۳۴	۱/۶۴
۷	۱/۷۷	۲۱	۱/۸۵	۳۵	۱/۶۹
۸	۱/۶۸	۲۲	۱/۶۲	۳۶	۱/۶۸
۹	۱/۵۶	۲۳	۱/۲۴	۳۷	۰/۱۳
۱۰	۱/۲۷	۲۴	۲/۰۴	۳۸	۰/۱۶
۱۱	۱/۳۷	۲۵	۱/۵۷	۳۹	۰/۱۷
۱۲	۱/۱۶	۲۶	۱/۶۵	۴۰	۰/۱۴
۱۳	۱/۸۸	۲۷	۱/۶۵	۴۱	۰/۱۵
۱۴	۱/۹۲	۲۸	۱/۶۸	۴۲	۰/۱۲

شماره‌های۳۷، ۳۸ و ۳۹ سرم منفی و شماره‌های ٤٠، ٤١ و ٤٢ بدون آنتی‌ژن بوده‌اند(کنترل منفی)

جدول٤: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم منفی موش‌های صحرایی آلوده شده با توکسوپلاسما به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلاسما.

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۰/۲۹	۱۴	۰/۲۵	۲۷	۰/۲۲
۲	۰/۳۴	۱۵	۰/۱۶	۲۸	۰/۱۵
۳	۰/۱۸	۱۶	۰/۳۵	۲۹	۰/۱۵
۴	۰/۱۸	۱۷	۰/۱۶	۳۰	۰/۲۳
۵	۰/۲۶	۱۸	۰/۱۴	۳۱	۰/۱۸
۶	۰/۱۲	۱۹	۰/۱۴	۳۲	۰/۱۵
۷	۰/۲۵	۲۰	۰/۲۶	۳۳	۰/۱۸
۸	۰/۱۶	۲۱	۰/۱۵	۳۴	۰/۱۲
۹	۰/۱۵	۲۲	۰/۲۱	۳۵	۰/۱۷
۱۰	۰/۱۳	۲۳	۰/۱۸	۳۶	۰/۱۴
۱۱	۱/۳۷	۲۴	۰/۱۴	۳۷	۰/۱۷
۱۲	۰/۱۴	۲۵	۰/۱۸	۳۸	۰/۱۷
۱۳	۰/۳۲	۲۶	۰/۱۵	۳۹	۰/۱۴

شماره‌های ۳۷، ۳۸ و ۳۹ بدون آنتی‌ژن بوده‌اند(کنترل منفی)

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

بحث

نتایج مطالعات انجام شده به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلاسما به عنوان نشانگر مناسب جهت بهبود ارزش تشخیصی روش‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس نشان می‌دهد که آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما در این رابطه از اهمیت خاص برخودار می‌باشند [۱۱،۱۹].

در مطالعات قبلی معمولا از مایع رویی کشت سلولی توکسوپلاسما و یا محیط کشت RPMI-1640 که تاکی‌زوئیت‌های تک یاخته در آن انکوبه شده بودند به عنوان ترکیب حاوی E/SA استفاده شده است .اگرچه آنتی‌ژن‌های تهیه شده با این روش‌ها از خلوص بیشتری برخودار هستند ولی انجام آن‌ها نسبتاً مشکل و نیاز مند شرایط و امکانات خاص می‌باشد [۱۸،۱۹].

یاماموتو در سال ۱۹۹۸ گزارش کرد مایع صفاق موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی که از طریق تزریق داخل صفاقی با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما آلوده شده بودند با سرم‌های انسانی حاوی آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما واکنش نشان می‌دهد [۱۹]. داده‌های جداول ۲، ۳ و ۴ (نتایج آزمایش نمونه سرم‌های منفی و روزهای ۱۵و۶۰ بعد از آلودگی) این مطالعه نیز این مطلب رادر رابطه با سرم موش‌ها نشان می‌دهد. این محقق هم‌چنین رسوب سولفات آمونیوم اشباع ۸۰-۳۰ درصد از این ترکیبات را به روش الایزا نقطه‌ای با نمونه سرم‌های فوق آزمایش و گزارش نمود که رسوب سولفات آمونیوم اشباع ۴۰-۳۰ درصد حاوی ترکیبات آنتی‌ژنیک بیشتری نسبت به بقیه اجزاء می‌باشند؛ بنابراین به نظر می‌رسد با تلقیح تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما از طریق داخل صفاقی به موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی می‌توان مایع صفاق آن‌ها را به عنوان ترکیب حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی به کار برد. تهیه آنتی‌ژن‌های مذکور از این طریق نسبت به روش‌های دیگرآسانتر و ارزانتر خواهد بود و با استفاده از روش‌های تخلیص از جمله رسوب با سولفات آمونیوم اشباع، می‌توان آغشتگی E/SA تهیه شده رانیز بر طرف نمود.

درسال ۱۹۸۷ یاسوهیروسوزکی[1] گزارش کرد که آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آنتی‌ژن‌های گردشی توکسوپلاسما از روز دهم آلودگی در سرم قابل شناسایی بوده و تا روز هفدهم به بالاترین میزان می‌رسند [۱۷]. کازابون و همکاران (۱۹۹۴) این آنتی‌بادی‌ها را از روز ۱۵-۱۳بعداز آلودگی شناسایی کردند؛ بنابراین هفته دوم آلودگی را زمان مناسب برای تهیه نمونه سرم از اوایل الودگی به توکسوپلاسموزیس برای مطالعه در رابطه با آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی پیشنهاد کردند [۴]. در مطالعه حاضر (جدول ۱) آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما در سرم موش‌ها در روز هشتم قابل شناسایی بود، تاروز ۲۲سیر صعودی داشت ولی درروز ۶۰ ثابت بود یا کاهش پیدا کرد این موضوع بروز توکسوپلاسموزیس حاد بدنبال تلقیح تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما در اوایل آلودگی و تغییر فازسیر بیماری در روز ۶۰ را در مدل حیوانی مورد مطالعه نشان می‌دهد [۱۴،۱۸].

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که برخی از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلاسما تنها در زمان خاصی از دوره بیماری در سرم قابل شناسایی می‌باشند هم‌چنین آنتی‌بادی‌های تولید شد علیه اجزاء مختلف این آنتی‌ژن‌ها از نظر نوع و زمان قابل شناسایی در سرم مراحل توکسوپلاسموزیس متفاوتند [۳،۹]؛ بنابراین در مطالعه حاضر به منظور بررسی این موضوع که آیا با روش الایزا تحت شرایط مورد نظر می‌توان این تفاوت را نشان داد سرم روز ۱۵به عنوان نمونه سرم اوایل آلودگی و سرم روز ۶۰ به عنوان نمونه سرم فاز مزمن انتخاب و آزمایش شدند [۹،۱۴].

یافته‌های این مطالعه (جداول ۲و۳) نشان می‌دهد که رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلاسما حاوی ترکیبات آنتی‌ژنیکی می‌باشد که هم با سرم حاوی آنتی‌بادی تولید شده در اوایل ابتلا به توکسوپلاسموزیس (روز ۱۵) و هم با سرم مرحله مزمن (روز ۶۰) این بیماری واکنش می‌دهند. به عبارت دیگر روش پیشنهادی در این مطالعه وجود آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما رادر سرم مدل حیوانی مورد مطالعه تعیین

1 – Yasahiro susuki

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

می‌کند اما سرم روزهای مختلف را از این نظر تفکیک نمی‌نماید.

در بین تکنیک های قابل استفاده برای تشخیص توکسوپلاسموزیس با به کارگیری E/SA،روش الایزا مناسب‌تر به نظر می‌رسد زیرا روش‌هایی مثل ایمنوبلاتینگ و رادیوایمنواسی گرچه از ارزش تشخیصی مناسب برخوردار می‌باشند ولی به خاطر پیچدگی روش اجرا، به کارگیر آن در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقدور نمی باشد. با توجه به پایین بودن مقدار آنتی‌ژن‌های دفعی– ترشحی در واحد حجم ترکیب حاوی این آنتی‌ژن‌ها، در تست‌هایی مانند IHA، لاتکس آگلوتیناسیون ، عمل ثابت شدن آنتی ژن بر روی گلبول‌های قرمز یاذرات لاتکس ممکن است به خوبی صورت نگیرد. حساسیت الایزا نسبتاً بالاست به طوری که با ۵-۱ نانوگرم از آنتی‌ژن نیز واکنش صورت می‌گیرد این موضوع در رابطه با آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی با توجه به کم بودن نسبی میزان آن‌ها در ترکیب کامل نمونه حاوی آنتی‌ژن اهمیت بیشتری دارد [۵،۱۸].

از یافته‌های این مطالعه استنباط می‌شود که روش الایزا با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلاسما (به عنوان آنتی‌ژن)، روش مناسب (ویژگی و حساسیت نسبتاً بالا) برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی به نظر می‌رسد؛ بنابراین موضوع در رابطه با آلودگی انسانی و هم‌چنین میزان محافظت کنندگی این ترکیبات در برابر آلودگی به توکسوپلاسما در دست مطالعه می‌باشد.

منابع

[۱] محمودزاده ع، عبداللهی ح، دلیمی ع، زواران ا: ارزیابی Dot-ELISA بااستفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس. مجله علوم پزشکی مدرس، ۱۳۷۹، دوره ۳، شماره یک، صفحات:۵۳-۴۷.

[2] Allain JP, Palmer CR, Pearson G: Epidemiological study of latent and recent infection by Toxoplasma gondii in pregnant women from a regional population in the U.K. *J Infect Dis.*, 1998; 36(2): 189-96.

[3] Carla A, Almedia R, Susa M Jose R : Detection of antibodies to the 97KD of toxoplasma gondii in sample of human serum. Mem. Inst. Oswwaldo Cruz, Rio de Janeiro., 2002; 97(7): 1009-1013.

[4] Cazabon P, Bessieres MH, Seguela JP: Kintics study and characterization of target excreted secreted antigens of immunoglobulin G, M.A and E antibadies from mice infected with different strains of toxoplasma gondii. parasitol. Res., 1994; 80(1):58-63.

[5] Crowther JR: ELISA: Theory and practice. 8th edition, Humana press, Totowa, New jersey, 1996.

[6] Dao A, Azzouz N, Eloundou N, ga C, Dubremetz JF, Schwarz RT, Frotier B: Unspecific reactivity of IgM directed against the low-molecular-weight antigen of Toxoplasma gondii. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 2003; 22(7): 418-21.

[7] Daryani A, Hosseini AZ, Dalimi A : Immune responses against excreted / secreted antigens of Toxoplasma gondii tachyzoites in the murine model. *Vet Parasitol*., 2003; 113(2):123-34.

[8] Dubey JP, Frenkel JK : Toxoplasmosis of rats: A review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol.*, 1998; 77(1): 1-32.

[9] Edward KM, David TJ: Medical parasitology. 8th edition, W.B Saunders company, 1999; 5th chapter, pp: 161-171.

[10] Fuentes I, Rodricuez M, et al: Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol.*,1996; 34(10): 2368-71.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

[11] Garcia L.S: Diagnostic medical parasitology. 4th edition, ASM Press, Washington, 2001; chapter 6, pp: 132-204.

[12] Gulie DJ and Richard EH: Toxoplasmosis in: Medical parasitology. A practical approch. Cllespie SH., Hawkey PM. Oxfored university, 1996; pp: 33-59.

[13] Johnstons A., Thorpe R: Immunochemistry in practice. 3th edition, Blackwell science, London, 1996; chapter 1, pp: 1-33

[14] Jenum PA, Stray-p B, Gundersen AG: Improved diagnosis of primary Toxoplasma gondii infection in early pragnancy by determination of anti Toxoplasma immunoglobolin G- avidity. *J Clin Microbiol.,* 1997; 35(8): 1972-7.

[15] liesenfeld O, Cynthia P, Jose GM, Raj G, Judih l: False positive results in immunoglobulin M(IgM) toxoplasma antibody tests and importanc of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol.,* 1998; 35(1): 174-178.

[16] Reiter-Owona I, Peterson E, Joynson D, Aspock H, Dade ML, et al: The past and present role of the Sabin-Feldman dye-test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. Bulletin WHO. 1999; 77(11): 929-934.

[17] Susuki Y, Kobayashi A: Presence of high concentration of circulating Toxoplasma antigens during acute Toxoplasma infection in athymic nude mice. Immun., 1987; 55(4): 1017-18.

[18] Wilson M, McAuuley JB: Laboratory diagnosis of toxoplasmosis. *Clinics Laboratory Medicine*, 1991; 11(4): 923-38.

[19] Yamamoto YL, Mineo JR, Meneghiss CS, Kawaraba YM: Detection in human sera of IgM, IgG and IgA to excreted – secreted antigens toxoplasma gondii by use of Dot-ELISA and immunoblot assay. *Ann Trop Med Parasitol.,* 1998; 92(1): 23-30.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]

Evaluation of ELISA Method Using the Excreted / Secreted Antigens of Toxoplasma for Toxoplasmosis Serodiagnosis in Rat

SH. Abdollahi PhD[1*], **A.Mahmoudzadeh** PhD[2], **M. Bahadoran** MSc[3]

1 Assistant Professor, Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

2- Associated Professor, Dept. of Micribiology, Faculty of Medicine, Baghiatallah University, Tehran, Iran

3- Academic Member, Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Background: Many studies have reported that Toxoplasma gondii excreted/secreted antigens (E/SA) appear to be a suitable marker for toxoplasmosis serodiagnosis. Most of those studies have used E/SA obtained from supernatent of toxoplasma cell culture, or by incubating tachyzoites in cell free media (RPMI- 1640). The present study, evaluated the ELISA method, using the components of peritoneal fluid of infected mice (as another source of E/SA), for toxoplasmosis diagnosis in rat.

Materials and Methods: Peritoneal fluids of infected mice by interaperitoneal inoculation (IP) with toxoplasma tachyzoits were collected after 3 days of infection and centrifuged at 750×g for 15 min, then the supernatant was precipitated with ammonium solphate soulution (30% saturated)

Forty noninfected (male) rats (7-10 weeks old) were injected with 4×10^6 toxoplasma tachyzoits IP and their serum samples were collected at 8, 15, 22 and 60 days after the infection. Then 10 samples from each day were tested by Dye- test. The sera of 15 and 60 days after infection of all animals were selected as suitable samples. Then the sera of these days were tested by the dye-test and ELISA using E/SA.

Results: The cut-off point of ELISA with 99% confidence was found to be 0.33 and optical density (OD) of all the sera samples of 15 and 60 days after infection and 2 negative sera were over than test cut-off. Moreover, sensitivity and specificity of the method were determined to be 100% and 95%, respectively.

Conclusion: Our findings showed that ELISA in the condition of using ammonium sulphate precipitation has a good enough sensitivity and specificity for toxoplasmosis diagnosis in rat.

Key words: Toxoplasmosis, Excreted/Secreted Antigens, ELISA, Toxoplasma Gondii

Corresponding author Tel: (0391) 5234003, Fax:(0391)5225209, E-mail:habdollahi38@yahoo.com

Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, 2004, 3(4):232-242

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1383.3.4.3.0]