

مقایسه‌ی نتیجه‌ی طراحی الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی ضد توکسوپلازما گوندی با نتیجه‌ی الایزای تجاری به منظور تشخیص آنتی‌بادی ضد نئوسپورا کانینوم

رضی اله جعفری جوزانی^{۱*}، احمد نعمت الهی^۲، صابر اسمعیلی^۳

۱- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.

۲- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.

۳- دانشجو، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.

چکیده

نئوسپورا کانینوم تک یاخته‌ی داخل سلولی اجباری است که به‌لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی و بیولوژیکی شبیه به توکسوپلازما گوندی می‌باشد. شباهت آنتی ژن‌های این دو انگل توسط محققان نشان داده شده است. در این مطالعه نتایج یک الایزای خانگی برای تشخیص آنتی‌بادی ضد توکسوپلازما گوندی در سرم گاوها با نتایج یک الایزای تجاری برای تشخیص آنتی‌بادی ضد نئوسپورا کانینوم در سرم همان گاوها توسط محاسبه‌ی آماره‌ی کاپا مقایسه شد. توافق بین دو آزمایش ۰/۶۵ محاسبه شد که حاکی از یک توافق قوی بین نتایج دو آزمایش می‌باشد. بر این اساس وجود واکنش متقاطع بین آنتی‌بادی‌های دو انگل در این آزمایش‌ها محتمل است. لذا استفاده از الایزای تجاری به منظور تشخیص آنتی‌بادی ضد نئوسپورا کانینوم باید با احتیاط بیشتری صورت گیرد و این امکان وجود دارد که تشخیص مستقیم انگل در کنار تشخیص غیرمستقیم آن (الایزا)، جنبه‌های نامطلوب مشاهده شده این روش را مرتفع سازد.

واژه‌های کلیدی: نئوسپورا کانینوم، توکسوپلازما گوندی، الایزا

مقدمه

الایزا، تکنیک آنتی‌بادی فلوروسانت غیر مستقیم، آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم و ایمونوبات است (۶). در این میان انواع آزمایش‌های الایزا به‌عنوان آزمون غربال‌گری برای مطالعه‌ی تعداد زیادی از نمونه‌های سرمی به شکل هم‌زمان به‌کار می‌رود که دلیل آن صرفه‌جویی در هزینه و زمان است (۲۰). به نظر می‌رسد نتایج آزمون سرم‌شناسی جهت تشخیص نئوسپورا کانینوم ارتباط بسیار نزدیکی با نتایج آزمایش‌ها برای تشخیص توکسوپلازما گوندی دارد که دلیل آن وجود برخی آنتی‌ژن‌های مشابه در سطح این انگل است (۱۵). در واقع وجود این آنتی‌ژن‌های مشابه، امکان واکنش متقاطع بین آنتی‌بادی‌های نئوسپورا کانینوم و توکسوپلازما گوندی را فراهم می‌سازد (۵، ۱۳ و ۲۵).

هدف از این مطالعه، مقایسه‌ی نتایج یک الایزای غیرمستقیم خانگی برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلازما گوندی با نتایج یک الایزای تجاری به منظور

نئوسپورا کانینوم تک یاخته‌ی داخل سلولی اجباری است که دارای خصوصیات مورفولوژیکی و بیولوژیکی شبیه به توکسوپلازما گوندی می‌باشد. هر دو بیماری توکسوپلاسموزیس و نئوسپوروزیس از نظر اقتصادی، مهم و با اثرات شدید بر صنعت دامپروری بوده و دارای گسترش جهانی هستند و می‌توانند باعث سقط جنین در گاوها شوند (۸، ۹، ۱۹ و ۳۲). نئوسپورا کانینوم یکی از عوامل اصلی سقط جنین و آنسفالیت در گاو است که باعث خسارت‌های اقتصادی در گاوها می‌شود که دلیل آن سقط جنین و کاهش کارایی دستگاه تناسلی و باروری است (۳ و ۳۰). اما اهمیت توکسوپلازما گوندی در گاو بسیار کمتر از نئوسپورا کانینوم بوده به شکلی که موجب سقط جنین نمی‌گردد (۲۶).

برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد نئوسپورا کانینوم تعدادی از روش‌های سرم‌شناسی وجود دارد که شامل



تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد *نئوسپورا کانینوم* در تعداد مشخصی نمونه‌ی سرمی می‌باشد.

مواد و روش کار

با توجه به میزان شیوع ۱۰ درصد *نئوسپوروزیس* در منطقه (تحت چاپ)، با احتساب سطح اطمینان ۹۵ درصد و درصد خطای ۱۰ درصد، تعداد نمونه ۱۳۶ محاسبه گردید (۳۱). بنابراین نمونه‌های خونی از ۱۳۶ گاو از گاو‌داری‌های اطراف تبریز تهیه شده و در شرایط مناسب به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت استخراج سرم، نمونه‌های خون در ۱۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سرم‌های مربوطه تهیه شدند. تمامی نمونه‌های سرمی به میکروتیوپ انتقال یافت و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از لیز تاکی زوایت‌های توکسوپلازما گوندی (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، دو رأس گاو توسط این ترکیب پروتئینی (یکصد میکروگرم در هر نوبت) همراه با ادجوانت کامل (در نوبت اول) و سپس ادجوانت ناقص (نوبت دوم و سوم) در فواصل زمانی پانزده روزه ایمن شدند. سرم به‌دست آمده از این گاو‌ها پس از انجام آزمون حلقه (Ring Test)، به عنوان کنترل مثبت در طراحی الایزا، مورد استفاده قرار گرفت.

به عنوان کنترل منفی از چهار نمونه سرم جنین گاو (Sigma, USA) در ابتدای مطالعه و پس از راه اندازی، از چهل نمونه‌ی سرمی با واکنش منفی (با جذب نوری اندک) استفاده شد.

در الایزای غیرمستقیم تجاری جهت تشخیص آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم*، تمامی نمونه‌های سرمی اخذ شده با کیت تجاری (IDEXX, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده جهت تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد *نئوسپورا کانینوم* مورد آزمایش قرار گرفتند.

در الایزای غیرمستقیم خانگی جهت تشخیص آنتی‌بادی ضد توکسوپلازما گوندی، نمونه‌های سرمی برای تشخیص

آنتی‌بادی ضد توکسوپلازما گوندی آزمایش شدند. از پروتئین‌های تاکی زوایت لیز شده‌ی توکسوپلازما گوندی (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) به‌عنوان آنتی‌ژن در کف حفره‌های پلیت الایزا استفاده شد. پروتئین‌های تاکی زوایت توکسوپلازما گوندی با استفاده از کوتینگ بافر (Coating buffer) در کف پلیت الایزا (Maxisorb, Nunc, Denmark) ریخته شد و جهت تثبیت آن در طول شب (Overnight) در دمای یخچال ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد، پس از آن ۳ مرتبه با محلول شستشو Buffer (۰.۰۵٪ PBS Tween) شسته شدند. سپس ۳۰۰ میکرولیتر شیر بدون چربی (Skim milk) به هر گوده اضافه شد و ۲ ساعت در دمای اتاق گرم‌خانه گذاری شد. پس از آن گوده‌ها دوباره با محلول شستشو، ۳ مرتبه‌ی دیگر شسته شده و ۱۰۰ میکرولیتر سرم (کنترل مثبت، منفی یا نمونه) با رقت ۱ به ۸۰ به هر یک از گوده‌ها اضافه شد و به‌مدت ۳ ساعت در دمای اتاق گرم‌خانه گذاری گردید. بعد از آن یک‌بار دیگر، ۳ مرتبه با محلول شستشو شسته شد و بعد از آن به هر یک از گوده‌ها ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه (سرم بز ضد گاو و پیوند شده با HRP (Komabiotech, S.Korea) با رقت ۱ به ۳۰۰۰ اضافه گردید و در دمای اتاق به‌مدت ۱ ساعت انکوبه شد و بعد از ۳ بار شستشو سوبسترای TMB (Sigma, USA) با رقت مناسب تهیه گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر به هر گوده اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفت و بعد از آن سود ۲ نرمال به عنوان متوقف کننده‌ی واکنش به میزان ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس نتایج توسط دستگاه قرائت الایزا (DANA IRAN, ۳۲۰۰) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

در نهایت نتایج هر دو الایزا توسط آزمون بررسی توافقی مثبت (آماره کاپا) و در نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ مورد مقایسه قرار گرفت. تفسیر آماره کاپا به صورت زیر انجام شد: آماره کاپا بین صفر (شانس) و یک (توافق کامل) متغیر می‌باشد، تفسیر آن طبق نظری است که توسط Landis و Koch ارائه شده است. بدین صورت که مقادیر بین صفر و

جستجوی پاستورلا مولتوسیدا/ در ضایعات ریوی گوسفند در کشتارگاه کاشان

عزیزاله ابراهیمی^{۱*}، محدثه حلاجی فر^۲، سعید عطایی^۳، شراره لطفعلیان^۴

- ۱- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.
۲- دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.
۳- استادیار، بخش کنترل کیفی، انستیتو رازی تهران، حصارک کرج، کرج - ایران.
۴- کارشناس آزمایشگاه، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.

چکیده

هدف مطالعه‌ی حاضر ارزیابی رخداد پاستورلا مولتوسیدا/ در نمونه‌های ریوی گوسفندان مبتلا به پنومونی در کشتارگاه کاشان است که از مناطق خشک نواحی مجاور به این کشتارگاه منتقل می‌شدند. جمعاً ۵۰۰ نمونه ریوی مبتلا به پنومونی نمونه‌گیری و باکتری پاستورلا مولتوسیدا/ در این نمونه‌ها مورد جستجوی باکتریولوژیک قرار گرفت. تنها ۳ مورد پاستورلا مولتوسیدا/ مورد تأیید نهایی قرار گرفت. ظاهراً پنومونی پاستورلایی ناشی از پاستورلا مولتوسیدا/ اهمیت چندانی در منطقه‌ی مورد مطالعه ندارد.
واژه‌های کلیدی: پاستورلا مولتوسیدا/، پنومونی، گوسفند، ایران

مقدمه

و مدیریتی متغیر است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی میزان حضور پاستورلا مولتوسیدا/ در ضایعات ریوی مشکوک به پاستورلوز گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه کاشان است. منشأ این گوسفندان، شهرستان کاشان و مناطق اطراف آن که از جمله مناطق خشک ایران می‌باشند بوده است.

مواد و روش کار

در طی مهر تا دی ماه ۱۳۸۷ با مراجعه‌ی هفتگی به کشتارگاه کاشان، ۵۰۰ نمونه ریوی از گوسفندان بالغ کشتار شده با ضایعات پنومونی مشکوک به پاستورلوز (قوام سفت قرمز تا خاکستری در لب‌های قدامی - شکمی ریوی) انتخاب گردید (۲). با به‌کارگیری روش‌های آسپتیک، سطح ریویها برش داده شد و با فرو بردن سواب استریل در داخل ضایعه و چرخاندن آن نمونه‌برداری انجام شد.
نمونه‌های سواب در داخل محیط انتقال استوارت (Stuart's transport medium) قرار گرفته و در مجاورت سرما به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده‌ی

پاستورلا مولتوسیدا/ (*Pasteurella multocida*) گروه بزرگ و ناهمگون از باکتری‌هایی می‌باشد که همگی به‌عنوان پاتوژن‌های مهم حیوانی شناخته می‌شوند. این باکتری‌ها گسترش زیادی داشته و در دستگاه تنفس حیوانات و پرندگان مختلف یافت می‌شوند. جهت مطالعه‌ی دقیق‌تر، این باکتری‌ها را به زیر گونه‌هایی تقسیم می‌نمایند (۵). بسیاری از این زیر گونه‌ها در همه گیری‌های بیماری‌های تنفسی گوسفند، بز و پرندگان دخیل بوده‌اند (۹ و ۱۰).

فاکتورهای استرس‌زای زیادی از جمله بیماری‌های ویروسی، مایکوپلاسمایی، همچنین شلوعی و حمل و نقل با کاهش دادن سطح ایمنی دام منجر به تهاجم این سوش‌ها به بافت‌های عمقی تر دستگاه تنفس و ایجاد برونکوپنومونی می‌گردند (۱). Okoli نشان داده است که میزان بارندگی، رطوبت نسبی و متوسط درجه حرارت منطقه در میزان شیوع این برونکوپنومونی‌ها تأثیر گذارند (۸). ولی به‌طور کلی میزان شیوع بیماری در مناطق مختلف بسته به عوامل آب و هوایی



دامپزشکی دانشگاه شهر کرد انتقال می‌یافت.

در آزمایشگاه نمونه‌های سواب بر سطح پلیت حاوی ژلوز خون‌دار کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله‌ی بعد پلیت‌ها از نظر رشد کلنی‌های مشکوک به پاستورلا مولتوسیدا که به رنگ خاکستری یا متمایل به زرد و بدون همولیز می‌باشند؛ بررسی شدند. در صورت وجود کلنی‌های مورد اشاره یک کلنی از سطح ژلوز برداشت و از آن کشت خالص تهیه می‌شد (۶ و ۷).

با انجام آزمایش‌های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز و اکسیداز، نمونه‌هایی که گرم منفی بوده و آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز مثبت داشتند در محیط ژلوز سه قندی آهن‌دار (TSI) و نیز محیط آب‌گوشت تریپتون (Trypton broth) جهت آزمایش تولید اندول، تلقیح و گرمخانه‌گذاری گردید. سپس واکنش پاستورلا بر سطح محیط سه قندی بررسی (سطح و عمق زرد بدون تولید گاز) و از کشت آب‌گوشت تریپتون موارد مشکوک به پاستورلا در لوله‌ی حاوی ژلوز استات سرب (Lead acetate agar) جهت تعیین توان تولید گاز H_2S و پلیت حاوی مک‌کانکی آگار (McConkey agar) و نیز محیط‌های آب‌گوشت نیترات و اوره تلقیح شده و آزمایش تولید اندول نیز انجام شد (۶ و ۷).

نتایج و بحث

از میان ۵۰۰ نمونه‌ی ریه با ضایعات مشکوک به پاستورلوز که مورد آزمایش‌های باکتریولوژی و بیوشیمیایی قرار گرفتند؛ تنها نتایج آزمایش‌های مربوط به سه نمونه (۰/۶ درصد) مؤید جداسازی پاستورلا مولتوسیدا بود. درک صحیح شیوع پاستورلا مولتوسیدا در هر منطقه‌ای قطعاً در برنامه‌های کنترل و پیشگیری پنومونی پاستورلایی گوسفند حائز اهمیت است. مروری بر مقالات اخیر در این زمینه نشان می‌دهد که این باکتری در مناطق حاره و تحت حاره از عوامل مطرح پنومونی پاستورلایی گوسفند محسوب می‌شود (۷). برخلاف منهیمیا همولیتیکا (*Manheimia hemolytica*) که

غالباً در مناطق معتدل شایع است (۴).

از طرفی در گوسفند برخلاف گونه‌های دیگر ارتباطی بین عوامل استرس‌زا و میزان جداسازی پاستورلا مولتوسیدا از دستگاه تنفس دیده نشده است (۳). منطقه‌ی کاشان و نواحی هم‌جوار آن از نظر شرایط آب و هوایی جزء مناطق خشک با میزان بارش کمتر از ۳۰۰ میلی‌متر در سال طبقه‌بندی می‌گردد و انتظار می‌رود که باکتری مورد مطالعه به میزان قابل توجهی از پنومونی‌های مشکوک به پاستورلوز جدا گردد ولی در بررسی حاضر جداسازی تنها سه مورد پاستورلا مولتوسیدا (۰/۶ درصد) مورد تأیید قرار گرفت که در مقایسه با گزارش‌های مشابه خارج از کشور بسیار پایین‌تر است (۷). ممکن است بتوان دلایل این اختلاف را در ارتباط با درمان‌های آنتی‌بیوتیکی که در کشور ما متداول است و یا در حضور همزمان باکتری‌های دیگر و مخفی ماندن پاستورلا در ضایعات ریوی و یا مزمن بودن ضایعات ریوی و تقویت رشد باکتری‌های دیگر دانست.

در نهایت با توجه به بررسی حاضر شاید بتوان گفت که در پنومونی‌های گوسفندان منطقه‌ی مورد مطالعه، نقش پاستورلا مولتوسیدا ناچیز است.

منابع

- 1- Alghamdi, G.M; Ames, T.R; Baker, J.C; Walker, R; Chase, C.C; Frank, G.H. and Maheswaran, S.K; Serotyping of *Manheimia* [*Pasteurella*] *haemolytica* isolated from the upper midwest United States. J. Vet. Diagn. Invest; 2000; 12: 576- 578.
- 2- Caswell, J.L. and Williams, K.J; Respiratory system. In Maxie M.G, editor. Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals. 5th ed; Elsevier. 2007; pp: 623.
- 3- De Alwis, M.C.L; Hemorrhagic septicaemia. Australian Centre for International

In Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals, 8th Ed.; Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, New York; 1988; pp: 104-116.

- Agricultural Research (ACIAR); Monograph; 1999; 57: 141.
- 4- Gilmour, N.J.L. and Gilmour, J.S; Pasteurellosis of sheep. In Pasteurella and Pasteurellosis. London: Academic Press; 1989; pp: 223-262.
 - 5- Hunt, M.L; Adler, B. and Townsend, K.M; The molecular biology of Pasteurella multocida. Vet. Microbiol; 2000; 72: 3-25.
 - 6- Koneman, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C.J.R; Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed; Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997; pp: 1307, 1371.
 - 7- Odugbo, M.O; Odama, L.E; Umoh, J.U. and Lamorde, A.G; Pasteurella multocida pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies. Small Rumin. Res; 2006; 66: 273-277.
 - 8- Okoli, I.C; Incidence and modulating effects of environmental factors on trypanosomosis, peste des petit ruminants (PPR) and bronchopneumonia of West African dwarf goats in Imo state, Nigeria. LRRD; 2003; 15(9):
 - 9- Sisasy, T. and Zerihun, A; Diversity of Mannheimia haemolytica and Pasteurella trehalosi serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the highlands of Wollo, north east Ethiopia. Vet. Res. Communications; 2003; 27: 3-14.
 - 10- Timoney, J.F; Gillespie, J.H; Scott, F.W. and Barlough, J.E; The Genus Pasteurella.



Investigation of *Pasteurella multocida* in sheep pneumonic lesions of Kashan abattoir

Ebrahimi, A.¹; Halajifar, M.²; Ataei, S.³; Lotfalian, S.⁴

1- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.

2- Graduated student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University-Iran.

3- Assistant professor, Department of Quality Control, Razi institute, Karaj-Iran.

4- Lab technician, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.

Summary

The aim of the present study was to evaluate the occurrence of *Pasteurella multocida* in sheep pneumonic lesions in Kashan abattoir originating from Kashan district that is arid area in central Iran. A total of 500 pneumonic lungs were sampled at slaughter and investigated bacteriologically for *Pasteurella multocida* isolates. Only 3 isolates of *P. multocida* were confirmed. We concluded that pneumonic pasteurellosis due to *Pasteurella multocida* is not so important in the studied district.

Keywords: *Pasteurella multocida*, pneumonia, Sheep, Iran

توافق محکم بین این دو آزمایش است.

بحث

برخی مطالعات نشان دهنده‌ی واکنش‌های متقاطع بین آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های *نئوسپورا کانینوم* و *توکسوپلاسما گوندی* است (۴، ۱۰، ۱۶، ۲۳، ۲۴، ۲۵ و ۲۷). در مقابل، برخی مطالعات دیگر نشان دهنده‌ی عدم وقوع این واکنش‌های متقاطع می‌باشند (۷، ۱۷ و ۳۳). به هر حال تعداد کمی از آنتی‌ژن‌ها با واکنش متقاطع تا به امروز گزارش شده است. واکنش متقاطع پروتئاز ۴۲ کیلودالتونی *توکسوپلاسما گوندی* با *نئوسپورا کانینوم*، هیدرولاز تری‌فسفات *توکسوپلاسما گوندی* با *نئوسپورا کانینوم* اثبات شده است (۱ و ۲). آنتی‌ژن دیگر BAG۵ *توکسوپلاسما گوندی* است که از آنتی‌ژن‌های اختصاصی برادی‌زویت این انگل است که با برادی‌زویت *نئوسپورا کانینوم* واکنش متقاطع دارد (۲۴). از طرف دیگر تداخل در ایمنی ایجاد شده هنوز مورد مناقشه است. البته مورد دیگری که همچنان مبهم است آنتی‌ژن‌هایی است که از لحاظ ایجاد ایمنی بر دیگران غلبه داشته باشند. در حقیقت آنچه‌که در به نتیجه رسیدن آزمایش‌های تشخیصی برای اثبات حضور آنتی‌بادی ضد یک پاتوژن دارای اهمیت زیادی می‌باشند، این دسته از آنتی‌بادی‌ها هستند که با غلظت بالای

۰/۲ معادل توافق جزئی، بین ۰/۲۱ و ۰/۴ معادل توافق اندک، بین ۰/۴۱ و ۰/۶ معادل توافق متوسط، بین ۰/۶۱ و ۰/۸ معادل توافق محکم و بین ۰/۸۱ تا یک معادل توافق بسیار کامل می‌باشد (۱۸).

نتایج

جهت برقراری حد آستانه‌ی پاسخ سرمی مثبت و منفی، میانگین جذب نوری (OD) کنترل‌های منفی و نمونه‌های با پاسخ منفی به علاوه‌ی سه برابر انحراف معیار که معادل ۰/۳۶ جذب نوری بود، در نظر گرفته شد (۳۱).

بر این مبنا نتایج الایزای تجاری برای *نئوسپورا کانینوم* حاکی از آن است که ۲۴ مورد پاسخ مثبت وجود دارد (۱۷/۶ درصد) در حالی‌که این میزان در الایزای خانگی برای *توکسوپلاسما گوندی* برای همان سرم‌ها عدد ۲۵ (۱۸/۳ درصد) می‌باشد. در این حالت شانزده مورد مشترک پاسخ مثبت در هر دو آزمون مشاهده شد (جدول شماره ۱).

مقدار آماره کاپا حاصل از مقایسه نتایج الایزای غیرمستقیم خانگی برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد *توکسوپلاسما گوندی* با نتایج حاصل از یک الایزای غیرمستقیم تجاری به منظور تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد *نئوسپورا کانینوم* در این دو آزمایش تشخیصی ۰/۶۵۱ بود که نشان دهنده‌ی یک

جدول شماره ۱- مقایسه‌ی فراوانی موارد مثبت و منفی در الایزای خانگی و مقایسه‌ی آن با الایزای تجاری

جمع	الایزای خانگی برای <i>توکسوپلاسما گوندی</i>		تعداد	درصد در الایزای تجاری	موارد منفی
	مثبت	منفی			
۱۱۲	۹	۱۰۳	۹	۸/۰۴	۱۰۰
۸۲/۳۵	۳۶/۱۰	۹۲/۷۹	۳۶/۱۰	درصد در الایزای خانگی	۸۲/۳۵
۲۴	۱۶	۸	۱۶	۶۶/۶۷	۱۰۰
۱۷/۶۴	۶۴/۱۰	۷/۲۱	۶۴/۱۰	درصد در الایزای خانگی	۱۷/۶۴
۱۳۶	۲۵	۱۱۱	۲۵	درصد در الایزای تجاری	۱۳۶
۱۰۰	۱۸/۳۸	۸۱/۶۱	۱۸/۳۸	درصد در الایزای خانگی	۱۰۰
جمع	۱۸/۳۸	۸۱/۶۱	۱۸/۳۸	درصد در تعداد کل	۱۰۰

ضد آنتی‌ژن مورد نظر توسط لنفوسیت‌ها ایجاد می‌شوند. در یک مطالعه‌ی دیگر مشخص گردید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد پروتئین PDI که یک پروتئین مشترک در بین تک یاخته‌هایی همچون لیشمانیا، توکسوپلازما گوندی و پلاسمودیوم فالسیپاروم است بر روی رشد *نئوسپورا کانینوم* در محیط کشت دارای اثرات بازدارنده است (۲۲).

مطالعه‌ی Higa و همکاران نشان داد که واکنش متقاطع موجب عدم تفکیک عفونت با *نئوسپورا* از عفونت با توکسوپلازما در سگ می‌گردد (۱۱). وجود واکنش متقاطع بین آنتی‌بادی‌های ضد *نئوسپورا* و توکسوپلازما و حتی سارکوسیسیت موجب کاهش ویژگی آزمایش در تشخیص *نئوسپوروزیس* گاو نیز می‌گردد. در مطالعه‌ی Sonda و همکاران مشخص شد بین یکی از پروتئین‌های اصلی و سطحی تاکی زوایت *نئوسپورا کانینوم* و توکسوپلازما گوندی ارتباط بسیار نزدیکی وجود دارد (۲۹). در تحقیق دیگری پژوهشگران با تخلیص یکی از پروتئین‌های اختصاصی *نئوسپورا کانینوم* به نام P38 اقدام به راه اندازی یک الایزا نمودند. در همین مطالعه بود که مشخص شد این آنتی‌ژن واکنش متقاطعی با آنتی‌ژن‌های توکسوپلازما گوندی ندارد و می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌ژن اختصاصی در طراحی الایزا به‌کار رود. در همین راستا مشخص شد که می‌توان از این آنتی‌ژن به خوبی در سگ نیز برای مشخص نمودن حیوانات سرم مثبت استفاده نمود. در حقیقت این پروتئین یک آنتی‌ژن ایمنی‌زای غالب محسوب می‌گردد (۱۲ و ۲۸). در مطالعه‌ی حاضر با وجود این‌که از جزئیات آنتی‌ژن استفاده شده در کف حفره‌های الایزای تجاری برای *نئوسپورا کانینوم* اطلاعی در دسترس نیست و این مورد توسط کارخانه‌ی سازنده نیز اعلام نشده است. توافق موجود بین الایزای خانگی توکسوپلازما گوندی و الایزای تجاری *نئوسپورا کانینوم* این احتمال را مطرح می‌کند که شرکت سازنده از کل تاکی زوایت انگل *نئوسپورا* در کف حفره‌های الایزا استفاده کرده باشد. کما این‌که پروتکل ساخت خانگی این شکل از الایزای

غیرمستقیم توسط چندین محقق اعلام شده است (۲۶). در واقع این مقدار بالای آماره کاپا احتمال بروز واکنش‌های متقاطع در طی تشخیص *نئوسپوروزیس* را در کیت تجاری نشان می‌دهد که می‌تواند به دلیل وجود آنتی‌ژن‌های مشابه بین *نئوسپورا کانینوم* و توکسوپلازما گوندی باشد.

بر اساس این مشاهدات به نظر می‌رسد که بیماری از اهمیت زیادی در منطقه برخوردار باشد و از سوی دیگر استفاده از پروتئین‌های اختصاصی *نئوسپورا کانینوم* در طراحی آزمایش‌های سرولوژیک دارای اهمیت فوق العاده‌ای است به شکلی که از اختلاط نتایج مثبت سرمی ناشی از دو انگل توکسوپلازما گوندی و *نئوسپورا کانینوم* جلوگیری می‌نماید. به‌کارگیری روش‌هایی که به تشخیص مستقیم انگل در نمونه‌ی خون یا بافت می‌پردازد همچون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، راه دیگری است؛ اما ضرورت وجود امکانات ویژه و افراد متخصص از محدودیت‌های این دسته از آزمایش‌ها می‌باشد.

گرچه این امر کمتر در مورد پروتئین‌های سطحی انگل مشاهده شده است؛ اما مطالعه‌ی Sonda و همکاران نشان داد که پروتئین سطحی SAG-۱ بین دو انگل *نئوسپورا کانینوم* و توکسوپلازما گوندی شباهت زیادی داشته و می‌تواند موجب پاسخ‌های متقاطع گردد (۲۹).

واکنش متقاطع فقط در غلظت‌های کم با آنتی‌ژن‌های هترولوگوس (Heterologous) رخ می‌دهد (۲۱). Howe و همکارانش دو پروتئین سطحی ۳۵ و ۲۹ کیلو دالتونی را از *نئوسپورا کانینوم* شناسایی کردند که مشابه SAG-۱ توکسوپلازما گوندی بودند (۱۴). در کل به نظر می‌رسد استفاده از کیت‌های تجاری به منظور تشخیص آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* باید با احتیاط بیشتری انجام شود و در صورت امکان از آزمایش‌هایی که پاتوژن را به‌طور مستقیم مورد شناسایی قرار می‌دهند همچون بافت شناسی، ایمنی بافت شناسی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در کنار کیت‌های تجاری (الایزا) موجود بهره برد.

- 7- Björkman, C; Lunden, A; Holmdahl, J; Barber, J; Trees, A.J. and Uggla, A; Neospora caninum in dogs: Detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasit. Immunol*; 1999;16: 643-648.
- 8- Dubey, J.P; Neosporosis-The first decade of research. *Int. J. Parasitol*; 1999; 29: 1485-1488.
- 9- Dubey, J.P; Abbitt, B; Topper, M.J. and Edwards, J.F; Hydrocephalus associated with Neospora caninum infection in an aborted bovine fetus. *J. Comp. Pathol*; 1998; 118: 169-173.
- 10-Dubey, J.P and Beattie, C.P; *Txoplasmosis of Animals and Man*; CRC Press; Boca Raton, FL; 1998; pp: 34-56.
- 11-Higa, A.C; Machado, R.Z; Tinuccicosta, M; Domingues, L.M. and Malheiros, E.B; Evaluation of Cross-reactivity of Toxoplasma gondii and Neospora caninum Antigens in Dogs Sera. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*; 2000; 9(2); 91-95.
- 12-Hosseiniadjad, M; Hosseini, F; Mosharraf, M; Shahbaz, S; Mahzounieh, M. and Schares, G; Development of an indirect ELISA test using an affinity purified surface antigen (P38) for sero-diagnosis of canine Neospora caninum infection. *Vet. Parasitol*; 2010; 171: 337-342.
- 13-Houshuang, Z; Compaore, M.K.A; Lee, E; Liao, M; Zhang, G; Sugimoto, C; Fujisaki, K; Nishikawa, Y. and Xuan, X; Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between Neospora caninum and Toxoplasma gondii,

منابع

- 1- Ahn, H.J; Song, K.J; Son, E.S; Shin, J.C. and Nam, H. W; Protease activity and host cell binding of the 42-kDa rhoptry protein from Toxoplasma gondii after secretion. *Biochem. Biophysic. Res. Communic*; 2001; 187: 630-635.
- 2- Asai, T; Howe, D.K; Nakajima, K; Nozaki, T; Takeuchi, T. and Sibley, L.D; Neospora caninum; tachyzoites express a potent Type-I nucleoside triphosphate hydrolase, but lack nucleoside diphosphate hydrolase activity. *Experiment. Parasitol*; 1998; 90: 277-285.
- 3- Barling, K.S; McMeill, J.W; Thompson, J.A; Paschal, J.C; McCollum, F.T; Craig, F. and Adams, T.M; Association of serologic status for Neospora caninum with post weaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc*; 2000; 217:1356-1360.
- 4- Bjerkas, I; Jenkins, M.C. and Dubey, J.P; Identification and characterization of Neospora caninum tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*; 1994; 1: 214-221.
- 5- Björkman, C; Holmdahl, O.J.M. and Uggla, A; An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to Neospora caninum in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol*; 1997; 68; 251-260.
- 6- Björkman, C. and Uggla A; Serological diagnosis of Neospora caninum infection. *Int. J. Parasitol*; 1999; 29 :1531-1536.



- Focant, C. and Losson, B; Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Vet. Parasitol*; 2004; 123: 25-32.
- 21-Latif, B.M. and Jakubek, E; Determination of the specificities of monoclonal and polyclonal antibodies to *Neospora*, *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* by Fluorescent Antibody Test (FAT). *Trop. Biomed*; 2008; 25(3): 225-231.
- 22-Liao, M; Xuan, X; Huang, X; Shirafuji, H; Fukumoto, S; Hitata, H; Suzuki, H. and Fujisaki, K; Identification and characterization of cross-reactive antigens from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. J*; 2005; 130: 481-488.
- 23-Lindsay, D.S; Lenz, S.D; Dykstra, C.C; Blagburn, B.L. and Dubey, J.P; Vaccination of mice with *Neospora caninum*: response to oral challenge with *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol*; 1998; 84: 311-315.
- 24-McAllister, M.M; Parmley, S.F; Weiss, L.M; Weich, V.I. and McGuire, A.M; An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *J. Parasitol*; 1996; 82: 354-355.
- 25-Nishikawa, Y; Claveria, F.G; Fujisaki, K. and Nagaswa. H; Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni* and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. *Mol. Biochem. Parasitol*; 2007; 151(2): 205-212.
- 14-Howe, D.K; Crawford, A.C; Lindsay, D.S. and Sibley, L.D; The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. and immun*; 1998; 66: 5322-5328.
- 15-Howe, D.K. and Sibley, L.D; Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Internation. J. parasitol*; 1999; 29: 1489-1496.
- 16-Kasper, L.H. and Khan, I.A; Antigen-specific CD8 cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect. and immun*; 1998; 66: 1554-1560.
- 17-Lally, N.C; Jenkins, M.C. and Dubey, J.P; Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzymelinked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*; 1996; 3: 275-279.
- 18-Landis, J.R. and Koch, G.G; The measurement of observer agreement for categorical data. *Biomet*; 1977; 33: 159-174.
- 19-Lapointe, J.M; Duignan, P.J; Barr, B.C; Petrich, A.K; Macpherson, D.W; Gulland, F.M. and Dubey, J.P; Meningoencephalitis associated with an unidentified apicomplexan protozoan in a Pacific harbor seal. *J. Parasitol*; 2003; 89: 859-862.
- 20-Lasri, S; DeMeerschman, F; Rettigner, C;

- Trends Parasitol; 2005; 21: 558-561.
- 33-Yu, j; Xia, Z; Liu, Q; Liu, J; Ding, J. and Zhang, W; Seroepidemiology of Neospora caninum and Toxoplasma gondii in cattle and water buffaloes (Bubalus bubalis) in the People's Republic of China. Vet. Parasitol; 2007; 143: 79-85.
- J. Vet. Med. Sci; 2002; 64:161-164.
- 26-Ortega-mora, L.M; Gottstein, B; Conraths, F.J. and Buxton, D; Protozoal Abortion Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control; CABI; 2007; pp: 445-450.
- 27-Pinheiro, A.M; Costa, M.F; Paule, B; Vale, V; Ribeiro, M; Nascimento, I; Schaer, R.E; Almeida, M.A.O; Meyer, R. and Freire, S.M; Serologic immunoreactivity to Neospora caninum antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. Vet. Parasitol; 2005; 130: 73-79.
- 28-Schares, G; Rauser, M; Söndgen, P; Rehberg, P; Bärwald, A; Dubey, J.P; Edelhofer, R. and Conraths, F.J; Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. Int. J. Parasitol; 2000; 30 (10): 1123-1130
- 29-Sonda, S; Fuchs, N; Connolly, B; Fernandez; Gottstein, B. and Hemphill, A; The major 36 KDa Neospora caninum surface protein is closely related to the major Toxoplasma gondii surface antigen. Mol. and Biochem. Parasitol; 1988; 97(1-2): 97-108.
- 30-Thilsted, J.P. and Dubey, J.P; Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J. Vet. Diag. Invest; 1989; 1: 205-209.
- 31-Thrusfield, M; Veterinary Epidemiology. Blackwell Science London, 1995; pp: 182.
- 32-Trees, A.J. and Williams, D.J; Endogenous and exogenous transplacental infection in Neospora caninum and Toxoplasma gondii.

Comparison results of a domestic indirect ELISA for detection of antibodies *Toxoplasma Gondelii* to the results of a commercial ELISA for detection of antibodies *Neospora Caninum*

Jafari Jozani, R.^{1*}; Nematollahi, A²; Esmacili, S.³

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

2- Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

3- Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

Summery

Neospora Caninum is an obligatory intracellular parasite that has similar morphological and biological characteristics to *Toxoplasma Gondelii*. The researchers have shown similarity between antigens of these parasites. In this study the results of a domestic ELISA for detection of antibodies in cow's sera to *Toxoplasma gondelii* was compared to the results of a commercial ELISA for detection of antibodies in same sera to *Neospora caninum* via calculation of kappa statistic. The agreement between the tests was equivalent to 0.65 that shows a substantial agreement. Based on these observations, the existence of cross reaction among antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondelii* is possible. So, using the commercial ELISA for detection of antibodies to *Neospora caninum* should be done with more precaution and direct diagnosis of the parasite, beside the indirect tests such as ELISA, might overcome the unsatisfactory aspects of ELISA in this study.

Keywords: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondelii*, ELISA, kappa statistic, cross-reaction