نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۸۵، زمستان ۱۳۸۸

بررسی آلودگی به *Toxoplasma gondii* در حیوانات مختلف در شهرستان ارومیه به روش PCR و بررسی اختلاف ژنتیکی از طریق RFLP

• **موسی توسلی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)
• **محمد طباطبایی**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
• **شهرام جوادی**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
• **بیژن اسمعیل نژاد**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
• **علی کاظم نیا**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
• **کریم مردانی**
گروه بهداشت مواد غذایی ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
تاریخ دریافت: خردادماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۴۶۲۵۹۸
Email: mtavassoli2000@yahoo.com

چکیده

آلودگی به تک یاخته انگلی *T.gondii* در انسان و حیوانات خونگرم در سراسر دنیا وجود دارد. این تک یاخته می تواند در جنین در حال رشد، موارد نقص سیستم ایمنی مانند مبتلایان به ایدز و افرادی مبتلا به سرطان که تحت درمان شیمی درمانی قرار می گیرند، شیوع یابد. در بین حیوانات اهلی گوسفند و بز به شکل گسترده به *T.gondii* آلوده می شوند. این انگل موجب سقط جنین در گله های گوسفند و بز و ایجاد خسارات اقتصادی مهم می گردد. در این بررسی از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) به منظور تشخیص آلودگی به *T.gondii* با استفاده از ژن B1 استفاده گردید. این ژن در هر شش سویه توکسوپلاسما که تا به حال مشخص شده اند، وجود دارد. نمونه های خون در این بررسی از ۳۷۲ حیوان شامل(۱۴۴ نمونه قلاده سگ، ۷ قلاده گربه، ۱۲۶ راس اسب، ۵۰ راس گاو و ۴۵ راس گوسفند) در شهرستان ارومیه اخذ گردید. در این بررسی از روش Fuents و همکاران ۱۹۹۶ استفاده گردید. بعد از ردیابی محصولات PCR مشخص گردید که ۳ نمونه آلوده به *T.gondii* در بین نمونه های اخذ شده وجود دارد. (۲ نمونه اسب و یک نمونه گوسفند). نمونه های مثبت تحت هضم آنزیمی با آنزیم محدود کننده SacI قرار گرفتند که الگوی برش بعد از هضم آنزیمی محصول PCR کاملا مشابه بود. این نتایج نشان می دهد که سویه های مشابه از *T.gondii* می توانند باعث آلودگی در گوسفند و اسب گردند.

کلمات کلیدی: *Toxoplasma gondii*، حیوانات اهلی، ارومیه، واکنش زنجیره ای پلی مراز، هضم آنزیمی.

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 85 pp: 64-70

Investigation on *Toxoplasma gondii* infection in domestic animals in Urmia by PCR and RFLP

By: Tavassoli M. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, (Corresponding Author; Tel: +989144462598) Tabatabaei M. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University., Javadi Sh. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Esmaeilnejad B1, Kazemnia A Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University and Mardani KDepartment of Health Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University.

Infection by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, is widespread in humans and many other species of warm-blooded animals. It can cause significant morbidity and mortality in the developing fetus and in immunocompromised individuals, including humans with Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS or submitted to cancer chemotherapy. Among livestock, sheep and goat are more widely infected with *T. gondii*. This parasite is a major cause of abortion, with significant economic losses to sheep and goat breeders. We applied the polymerase chain reaction for detection of the pathogenic protozoan *T. gondii* based on its B1 gene. The B1 gene is present and conserved in all six *T. gondii* strains identified to date. For this purpose blood samples were collected from a total of 372 animals (144 dog, 7 cat, 126 horse, 50 cattle and 45 sheep) from Urmia region. In this study, PCR was performed using the previously described primers (Fuentes et al., 1996)(10), which were designed to detect the B1 gene of T. gondii. The targeted B1 gene is highly conserved in all *T. gondii* strains and is multiple copy genes within the *T. gondii* genome. The method used for the characterization of *T. gondii* strains implied digestion with SacI restriction enzyme of the fragments amplified. The results indicated 3 positive samples (2 horse and 1 sheep samples). The 194 bp fragment was generated in all positive samples tested and one RFLP patterns were obtained. The results indicated that the same strain of *T. gondii* has been infected sheep and horse in the study region.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, domestic animals, Urmia, PCR, RFLP

مقدمه

T.gondii یک کوکسیدیای روده‌ای است که انگل اعضای خانواده گربه‌سانان به عنوان میزبان نهایی است و دامنه وسیعی از میزبان های واسطه دارد. عفونت معمولاً در بسیاری از حیوانات خونگرم رخ می‌دهد که انسان را هم شامل می شود. در بسیاری از موارد عفونت بدون علامت است، اما بیماری می‌تواند به شکل حاد نیز اتفاق بیفتد(۹).

در شرایط آزمایشگاهی، گربه بعد از هر بار دریافت کیست های بافتی *T.gondii* معمولاً اووسیست دفع نمی‌کنند. عفونت های توکسوپلاسمایی در انسان و حیوانات از تمام نقاط دنیا گزارش شده است. موارد سرمی مثبت عفونت، با بالا رفتن سن افزایش می یابد و به طور معمول در هر دو جنس مشابه است. نتایج حاصل از بررسی آلودگی به توکسوپلاسما گوندئی در گوسفند و بز در کرمان به ترتیب ۲۴/۷ درصد و ۱۵/۸ درصد گزارش شده است(۴).

هاشمی فشارکی این آلودگی را به ترتیب در گوسفند و بز ۲۴/۵ درصد و ۱۹/۲۵ درصد اعلام نمود(۱۷) و قربانی و همکاران این آلودگی را ۳۲/۵ درصد و ۱۷/۷ درصد در گوسفند و بز در ایران اعلام داشته اند(۱۱). بررسی های مشابه سروپروالانس آلودگی به *T.gondii* را در ۴۴/۸ درصد زنان حامله در ایلام(۳) ۲۰/۱ درصد در اصفهان(۲۰) و ۱۹/۲ درصد در سبزوار(۲۵) گزارش نموده اند.

مطالعات ژنتیکی اخیر ژنوتیپ های توکسوپلاسما را در سه تیپ مشخص قرار می دهد(۱۵) این سه تیپ شامل تیپ‌های I، II و III است. این تقسیم بندی بر اساس خصوصیات آنها در الکتروفورز ایزوآنزیم‌ها، PCR، RFLP و random amplified polymorphism DNA انجام گردیده است (۵،۶،۷، ۱۵، ۱۹، ۳۵، ۳۸)

بیماری زایی *T.gondii* در حیوانات مختلف در سویه های مختلف متفاوت است(۲۲). به عنوان نمونه تیپ I انگل بیماری زایی بیشتری در موش دارد(۳۵) تشخیص ارتباط بین شدت بیماری زایی و نوع بیماری ایجاد شده و سویه انگل در درمان موفق بیماری اهمیت بسیار دارد(۳۶)

آنالیز ژنتیکی سویه ها مشخص نموده است که تکثیر *T.gondii* عمدتاً به شکل کلونال، غیر جنسی و یا تولید مثل جنسی تک والدی است در حالی که تولیدمثل جنسی بین سویه های مختلف به شکل استثنایی در جمعیت های طبیعی دیده می شود(۳۵).

گزارشات مختلف از آنالیز ایزوله های جدا شده از موش و کشت در محیط خارج بدن نشان داده است که تیپ II در بین این ژنوتیپ ها نسبت به بقیه شایع تر است(۷، ۱۸، ۱۹،۲۶، ۲۸، ۳۵). هدف از بررسی حاضر بررسی آلودگی به *T.gondii* با روش PCR و تفریق سویه ها با روش RFLP است.

مواد و روش کار

نمونه های خون از ۵ گونه حیوانی (سگ، گاو، گوسفند، اسب و گربه)

به صورت تصادفی جمع آوری شدند و از ۱۴۴ نمونه قلاده سگ، ۷ قلاده گربه، ۱۲۶ راس اسب، ۵۰ راس گاو و ۴۵ راس گوسفند نمونه گیری به عمل آمد.

برای استخراج DNA از روش ارائه شده توسط Fuents و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد، به این ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه خون با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول لیز کننده (۱۰mM Tris HCl MgCl۲, ۱/۵ mM, ۵۰ mM KCl, ۰/۱ mg gelatin per ml, ۰/۵٪ Tween ۲۰, ۲۰٪ mg proteinase K) مخلوط و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد قرار می گرفت.

سپس برای غیر فعال کردن پروتئیناز K نمونه ها در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار می گرفت. در مرحله بعد نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی به عنوان DNA استخراج شده استفاده می گردید(۱۰).

برای انجام PCR از کیت شرکت سیناژن (PCR Master Kit) استفاده شد و طبق دستور سازنده کیت به این صورت که برای هر نمونه ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی PCR (شامل: PCRbuffer،dNTPS،TaqDNA،polymeraseMgCl۲)، ۲میکرولیتر از پرایمرهای ۵'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-۳' و ۵'-GGAACTGCATCCGTTCATGAG-۳'

مربوط به ژن B۱ *T.gondii*، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده (تقریباً ۱۰ نانوگرم) و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر در لوله های مخصوص PCR با یکدیگر مخلوط می شد. برای هر مرحله یک کنترل منفی و کنترل مثبت هم تهیه می گردید. در کنترل منفی تمام ترکیبات بجز DNA وجود داشت. برای کنترل مثبت ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی، ۶/۵ میکرولیتر از آب مقطر، ۲ میکرولیتر از پرایمرها و DNA همراه کیت اضافه می شد.

سپس میکروتیوب های مخصوص PCR بعد ازسانتریفیوژ مختصر به دستگاه ترموسیکلر منتقل می شدند. تکثیر DNA توسط PCR طبق برنامه زیر انجام می شد: ابتدا نمونه ها در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه دناتوره شده و سپس ۳۰ سیکل حرارتی برای دناتوره کردن، اتصال پرایمرها و تکثیر DNA به ترتیب شامل ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۹۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال می گردید. پس از اتمام سیکل آخر برای ۵ دقیقه عمل توسعه در ۷۲ درجه سانتی گراد ادامه می یافت تا عمل پلیمریزاسیون تکمیل شود.

از آنجائیکه اندازه DNA تکثیر یافته *T.gondii* ۱۹۴ جفت باز بود، غلظت ژل آگارز ۲/۵ درصد در نظر گرفته شد. پس از بارگذاری و انجام الکتروفورز و ارزیابی محصولات PCR، نمونه های مثبت بر اساس برنامه Restriction Mapping BioEdit version۷۰۹۰ تحت تأثیر آنزیم محدودکننده SacI قرار گرفتند. بدین ترتیب که ۸ میکرولیتر از محصول PCR همراه با یک میکرولیتر آنزیم SacI و یک میکرولیتر بافر برای مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس با قرار دادن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد آنزیم غیرفعال شد.

نتایج

بعد از ارزیابی محصولات PCR مشخص گردید که ۳ نمونه آلوده به *T.gondii* در بین نمونه های اخذ شده وجود دارد (شکل ۱-۱) (۲نمونه خون اسب و یک نمونه خون گوسفند). نمونه های مثبت تحت هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده SacI قرار گرفتند. نتایج هضم آنزیمی مشخص نمود که در برش قطعهbp ۱۹۴ با آنزیم Sac۱ باندهای مشابه (۱۱۰ bp و ۸۴ bp) بدست آمد. (شکل۲-۱). لذا با توجه به نتایج و الگوهای برش بدست آمده سه نمونه جدا شده مربوط به یک سویه می باشند.

بحث

روش استاندارد برای تشخیص توکسوپلاسموزیس بر اساس روش سرولوژی است ولی تفسیر نتایج حاصله در مورد افرادی با ضعف سیستم ایمنی، جنین و نوزادان سخت است. در این موارد استفاده از کشت سلول و نیز تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی ویا استفاده از روش های مولکولی مثلPCR برای تائید تشخیص کاربرد دارد(۱۰).

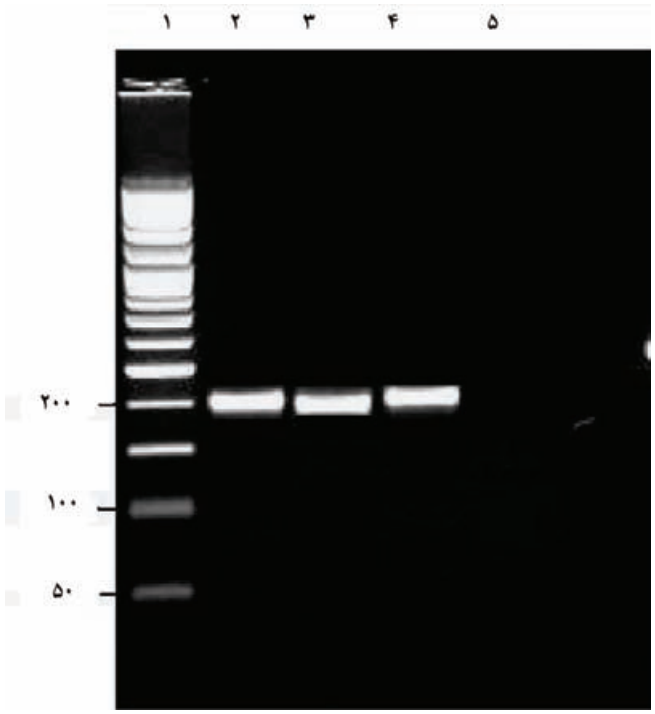
واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) که در آن قطعه ای از DNA ژنوم توکسوپلاسما گوندئی قابل شناسایی است به دلیل حساسیت کافی به اختصاصی بودن آن و نیز حصول سریع نتیجه از سایر روش های تشخیصی فعلی نتایج بهتری دارد و در تشخیص *T.gondii* در بافت ها کاربرد دارند(۳۷).

گزارشات مختلف از مقایسه روش های مختلف تشخیصی و آلودگی به توکسوپلاسما در نقاط مختلف دنیا و ایران با استفاده از روش های مختلف وجود دارد(۳۴،۳۳،۳۲،۱۲،۹،۸،۱).

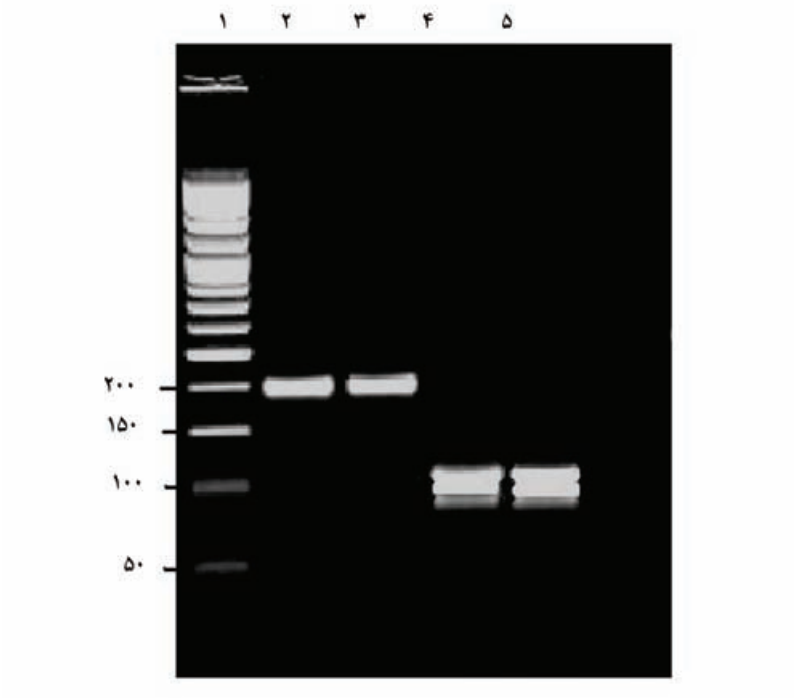
در بین روش های تشخیصی روش PCR که در آن قطعه ای از DNA ژنوم توکسوپلاسما قابل شناسایی است. به دلیل حساسیت کافی و اختصاصی بودن آن و نیز حصول سریع نتیجه از سایر روش های تشخیصی فعلی نتایج بهتری دارد(۱۳).

این روش بویژه در تشخیص زود هنگام توکسوپلاسموز کارآمد می باشد. نمونه خون در دسترس ترین نمونه جهت انجام آزمایش PCR در تشخیص در نمونه های انسانی و دامی می باشد. هر چند تشخیص توکسوپلاسموز از طریق نمونه های خون نتایج گوناگون نشان می دهد. این تفاوت ها به مدت حضور و دوام انگل در خون بستگی دارد. حضور و دوام توکسوپلاسما در خون میزبان به سویه و شکل ورود انگل به بدن نیز بستگی دارد. آلوده سازی حیوان با تاکی زوئیت، برادی زوئیت و اسپوروزوئیت بر روی زمان ورود انگل به خون و میزان دوام آن تاثیر مشهود دارد. به عنوان نمونه در نمونه سرم خون موش هایی که به روش داخل صفاقی به توکسوپلاسما آلوده شده اند، ۱۸ ساعت پس از تزریق انگل با روش PCR قابل تشخیص است(۱۶).

پژوهش حاضر بر اساس بررسی آلودگی به *T.gondii* در حیوانات مختلف با روش PCR و تشخیص سویه های مختلف در منطقه ارومیه انجام پذیرفته است. نتایج نشان دهنده آلودگی سه نمونه (دو نمونه اسب و یک نمونه گوسفند) دارد. نتایج حاصل از هضم آنزیمی نیز نشان داد که هر سه نمونه جدا شده به یک سویه تعلق دارند. دلیل کم بودن تعداد دام های آلوده قابل تشخیص در مقایسه با سایر گزارشات در ایران به



شکل ۱- الکتروفورز نمونه های مثبت در PCR : چاهک شماره ۱ مارکر bp ۵۰، چاهک شماره ۴-۲ سه نمونه مثبت، چاهک شماره ۵ کنترل منفی.



شکل ۲- نتایج هضم آنزیمی با آنزیم SacI : چاهک شماره ۱ مارکر bp ۵۰ ، چاهک شماره ۲ و ۳ نمونه مثبت، چاهک شماره ۴ و ۵ نمونه هضم شده .

دلیل آن است که گزارشات فوق بر اساس جستجوی پادتن توکسوپلاسما در سرم مبتلایان استوار بوده است در حالی که بررسی حاضر بر اساس جستجوی DNA انگل در نمونه های خون صورت گرفته است، حضور انگل در خون عمدتاً در مرحله حاد بیماری و به دلیل حضور تاکی زوئیت ها در خون قابل ردیابی است(۲ ، ۲۷).

در بین روش های تشخیصی روش PCR که در آن قطعه ای از DNA ژنوم توکسوپلاسما قابل شناسایی است. به دلیل حساسیت کافی و اختصاصی بودن آن و نیز حصول سریع نتیجه از سایر روش های تشخیصی فعلی نتایج بهتری دارد(۱۳ ،۱۶).

پرایمرهای مختلف بر اساس ژن های B۱، P۳۰ و ریبوزومال DNA در مطالعات مختلف تا به امروز استفاده شده اند(۱۳،۵، ۳۱). ژن B۱ و ریبوزومال DNA به دلیل تعدد کپی های آنها در ژنوم توکسوپلاسما، آنها را جهت تکثیر در PCR مناسب نموده است(۲۱). ژن B۱ در ژنوم *T.gondii* ۳۵ بار تکرار گردیده است (۵).

استفاده از این ژن مزایای زیادی دارد. در مقایسه پرایمرهای ژن P۳۰ نسبت به ژن B۱کمتر اختصاصی هستند و مشخص گردیده که پرایمرهای ژن P۳۰ ، DNA گونه های نوکاردیا(۲۳) و *Mycobacterium tuberculosis* را هم تکثیر می دهند (۲۴) در حالی که پرایمرهای مربوط به ژن B۱ گونه های مختلف قارچی و باکتریایی را تکثیر نمی نمایند(۲۱).

استفاده از روش PCR بر اساس این ژن نه تنها در تکثیر *T.gondii* ویژگی بالایی دارد بلکه حساسیت زیادی در تشخیص *T.gondii* دارد(۲۱).

در بررسی حاضر از قطعهbp ۱۹۴ ژن B۱ به عنوان هدف در واکنش PCR استفاده شد. این قطعه بوسیله سایر محققین نیز استفاده گردیده است، دلیل استفاده از این قطعه آن است که ثابت گردیده است که زمانی که قطعه ای بزرگتر از bp ۲۰۰ در تکثیر *T.gondii* استفاده می گردد، کارایی پروسه تکثیر کاهش می یابد(۳۰،۲۹).

در مطالعه حاضر از نمونه خون به منظور مشخص نمودن آلودگی به *T.gondii* در حیوانات زنده استفاده شد. Howe و همکاران ۱۹۹۷ نیز به منظور جدا سازی انگل از خون و مایع مغزی نخاعی و سایر بافت های بیماران مبتلا به توکسوپلاسموز استفاده نمودند. آنها در تست PCR از ۷۲ نمونه آزمایش شده در ۶۸ نمونه موفق به جدا سازی *T.gondii* شدند(۱۹).

در بررسی حاضر آلودگی به *T.gondii* DNA در سه نمونه محرز گردید، دلیل این آلودگی پایین را می توان به عدم آلوده بودن نمونه ها ارتباط داد، چون نمونه های خون از حیوانات سالم و بدون داشتن علائم بالینی تهیه شده بوددر حالی که در مطالعه Howe و همکاران در سال ۱۹۹۷ تست PCR بر روی نمونه های حاصل از افراد مبتلا به توکسوپلاسموز انجام شده بود.

نتایج هضم آنزیمی در نمونه های مثبت این بررسی در برش قطعه bp ۱۹۴ با آنزیم SacI یک الگو بدست آمد که مربوط به تیپ I *T.gondii* می باشد(۱۰).

این نتایج نشان میدهد که سویه های مشابه از *T.gondii* می توانند باعث آلودگی گوسفند و اسب گردند. به دلیل اهمیت این انگل در ایجاد عوارض در انسان و ایجاد خسارت اقتصادی در دام ها پیشنهاد می گردد به همراه تست PCR آزمایشات سرولوژی همزمان نیز جهت اخذ و انجام آزمایش تعداد بیشتر نمونه انجام شود. هم چنین بررسی های تکمیلی در ارتباط با آلودگی انسان و سایر حیوانات نیز تا انجام پذیرد تا ژنوتیپ های مختلف انگل بویژه ژنوتیپ های غالب و مشترک بین انسان و حیوان مشخص گردد.

منابع مورد استفاده

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

۲- شریفیان درچه م، دلیمی اصل ع، کاظمی درمنه ب. (۱۳۸۲) تشخیص زودهنگام توکسوپلاسموز تجربی در خون رت به روش PCR. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ۵۸. صفحات ۳۲۳-۳۲۷.

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

4-Bahrieni M., Fasihi Harandi M., Beigzadeh M., Kamyabi H. and Zia-Ali N. (2008) Risk factors analysis associated with seropositivity to *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in southern Iran using modified agglutination test. *Iranian J Parasitol*. 3: 38-43.

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

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

7- Darde´ M., Bouteille L. and Pestre-Alexandre M. (1992) Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78:786–794.

8-Desmont G. and Remington J.S. (1980) Direct agglutination test of Toxoplasma infection: Methods for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 11: 562-568.

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

10-Fuents, E., Rodriguez, M., Domingo, C., Castillo, F., Juncosa,T., Alvar, J. (1996) *Urine sample used for congenital*

130:2407–2412.

24- McHugh T.D., Ramsay A.R.C., James E.A., Mognie R., Gillespie S.H. (1995) Pitfalls of PCR: Misdiagnosis of cerebral nocardia infection (Letter). *Lancet*. 346:1436.

25-Moalaee H., Shirzad E., Namazi M.J. (1999) Seroepidemiology of toxoplasmosis and its eye complication in pregnant women. *Sabzavar University Med Sci J*. 21-23.

26- Mondragon R., Howeb D. K., Dubey J. P. and Sibley L. D. (1998) Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol*. 84:639–641.

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

28- Owen, M. R., and A. J. Trees. (1999) Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. J. Parasitol. 85:382–384.

29- Paabo S. and Wilson A.C. (1988) Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334: 387-388.

30- Paabo S. (1989) Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci* USA. 86: 1939-1943.

31-Ramzan N.N., Loftus E., Burgart L.J, et al. (1997) Diagnosis and monitoring of Whipple disease by polymerase chain reaction. *Ann Intern Med.* 126:520–527.

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

33-Sevinc F. (2000a) The seroprevalence of *Toxoplasma gendii* in goats detected by indirect haemogglotinalion (IHA) and indirect florescents antibody (IFA) tests in the region of konya. *Acta Perrosito logica Turnica*, 24:57-80.

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

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

36- Suzuki Y., Wong S. Y., Grumet F. C., Fessel J., Montoya J. G., Zolopa A. R., Portmore A., Schumacher-Perdreau F., Schrappe M., Koppen S., Ruf B., Brown B. W. and Remington J. S. (1996) Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J. Infect. Dis*. *toxoplamosis dicgnosis by POR*.PP:2368-2371.

11-Ghorbani M., Edrisian Gh. and Assad N. (2004) *Serological survey of toxoplasmosis in northern Iran*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 72:369-371.

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

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

14- Guay J. M., Dubois D. Morency M. J. Gagnon S. Mercier J. and Levesque R. C. (1993) Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31:203–207.

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

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

17- Hashemi-Fesharaki R. (1996) *Seroprevalance of Toxoplasma gondii in cattle, sheep and goats in Iran*. Vet Parasitol. 61:1-3.

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

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

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

21- Jones C. D., Okhravi N., Adamson P., Tasker S. and Lightman, S. (2000) Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA Genes of T. gondii in Aqueous Humor, *IOVS*, 41(3):635-644.

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

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

173:265–268.
37-Voge M., Makell E., John D. (1992) *Medical parasitology*. Saunders Company, California, 166pp.
38-Weiss J.B. (1995) DNA probes and PCR for diognosis of Parsitic infections. *Clin. Microbiol. Rev*. 8:113-130.