✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۵، تابستان ۱۳۸۱

ارزیابی روش DIG-ELISA جهت تشخیص سرولوژیکی توکسوپلاسموزیس تجربی در رت

● کاوس صلح جو، دانشجوی phD انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس - تهران
● عبدالحسین دلیمی اصل، استاد دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس - تهران
● فاطمه غفاری فر، استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۱

چکیده

در این تحقیق روش DIG-ELISA (Diffiusion in Gel-ELISA) جهت تشخیص سرولوژیکی بیماری توکسوپلاسموزیس تجربی در رت ارزیابی و با روش‌های استاندارد مورد مقایسه قرار گرفت. برای این منظور ۶۰ عدد سرم رت آلوده به دو روش DIG-ELISA و ELISA تحت آزمایش قرار گرفتند. در روش دیگ الایزا رقت سرمی ۱:۱۰۰ بعنوان Cut off انتخاب گردید. در این رقت قطر هاله ۳/۵۴ میلی متر بود. ارزیابی نتایج حاصل از این دو روش نشان داد که روش دیگ الایزا در مقایسه با روش الایزا از حساسیت و ویژگی بالایی جهت تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس برخوردار است. حساسیت و ویژگی این روش با رقت سرمی ۱:۱۰۰ به ترتیب ۹۵٪ و ۱۰۰٪ بوده است. همچنین در این تحقیق مشخص شد که استفاده از غلظتهای مختلف پادگن جهت کوت کردن پلیت‌ها و مقدار کونژوگه مصرفی تأثیری در اندازه قطر هاله واکنش ندارد. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که روش دیگ الایزا بخاطر ساده بودن، عدم نیاز به دستگاههای خاص و گران قیمت، تنوع پذیری و قابلیت استاندارد شدن بصورت کیت آزمایشگاهی، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس می‌تواند بسیار مفید و مقرون به صرفه باشد.

کلمات کلیدی: توکسوپلاسموزیس، دیگ الایزا، تشخیص سرولوژیک، رت.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 55 PP: 60-64

Evaluation of DIG-ELISA for serodiagnosis of experimental Toxoplasmosis in Rat

By: Solhjoo K. PhD student. Dalimi A.Professor and Chaffari Far F. Assistant Professor Department of Parasitology, Medical Sciences Faculty, Tarbit Modarres University, P. O. Box: 14115-111, Tehran, I.R. Iran.

In the present study, DIG-ELISA (Diffusion In Gel-ELISA) was evaluated for serodiagnosis of experimental toxoplasmosis in rat. 60 infected rat serum samples were tested using ELISA and DIG_ELISA techniques. In DIG-ELISA, according to the diameter of reaction zone in the gel, 1:100 serum dilution was selected as a cut off. In this dilution the diameter was 3.54 mm. The results indicated that, DIG-ELISA in comparison with ELISA has high sensitivity and specificity for diagnosis of toxoplasmosis. The sensitivity and specificity of the test in 1:100 serum dilution, were 95% and 100% respectively. The results showed, using different concentrations of antigens for coating the plates as well as different concentrations of conjugated-antibody have not affected the diameter of reaction zone. In addition, DIG-ELISA was found fast and economical for toxoplasmosis serodiagnosis.

Key words: Toxoplasmosis. DIG-ELISA, serodiagnosis, rat

مقدمه

یکی از متداولترین آلودگیهای انگلی انسان و جانوران خونگرم، آلودگی با *Toxoplasma gondii* (توکسوپلاسموزیس) است. آلودگی با این تک یاخته گسترش جهانی داشته و تقریباً یک سوم از مردم دنیا در معرض این انگل هستند و تخمین زده می‌شود که بیش از ۵۰۰ میلیون نفر از مردم در سرتاسر دنیا به این انگل آلوده باشند (۷).

از مهمترین روشهای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس، تکنیکهای سرولوژیکی است. دیگ الایزا روشی است سرولوژیکی که توسط برخی محققین جهت تشخیص بیماریهای انگلی (۳، ۶، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۶) باکتریائی (۱۰، ۱۴، ۱۷) و ویروسی (۱۲) و همچنین بیماری توکسوپلاسموزیس انسانی و دامی (۱، ۱۸، ۱۹) بکارگرفته شده است و همه محققین بر این نکته اتفاق نظر دارند که این روش حساس، دارای قابلیت تنوع پذیری، ساده و از نظر اقتصادی نیز به مقرون به صرفه است و امکان انجام آن در هر آزمایشگاهی با کمترین امکانات وجود دارد.

هدف از انجام این تحقیق ارزیابی روش دیگ الایزا برای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس تجربی در رت و مقایسه حساسیت و ویژگی آن با روش الایزا بوده است.

مواد و روشها

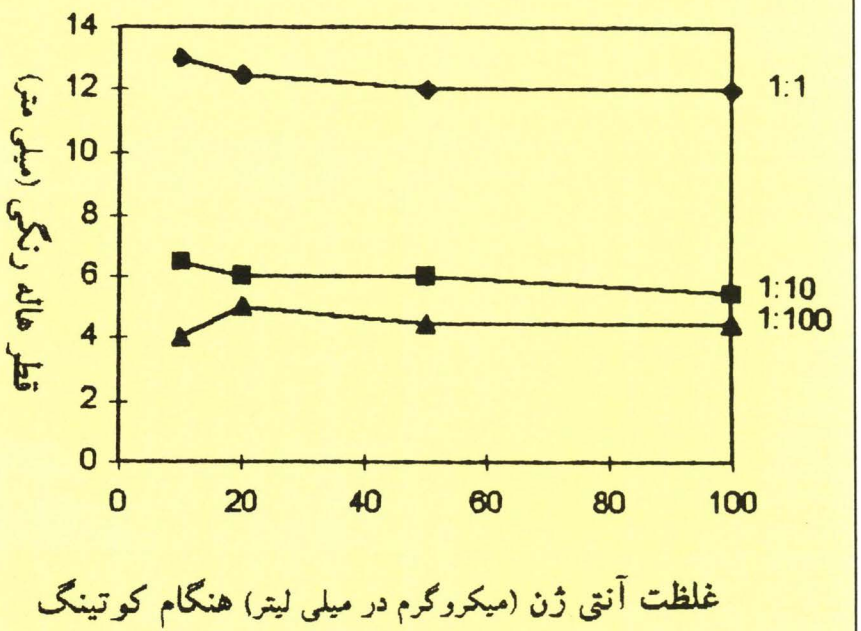
انگل

در این تحقیق از سویه RH *T. gondii* گوندیی استفاده شد. برای نگهداری این سویه ۲۰۰ هزار تاکی‌زوئیت در حجم ۰/۵ میلی لیتر به‌صورت داخل صفاقی به موش سفید آزمایشگاهی تلقیح و هر ۳ تا ۴ روز انگل پاساژ داده می‌شد.

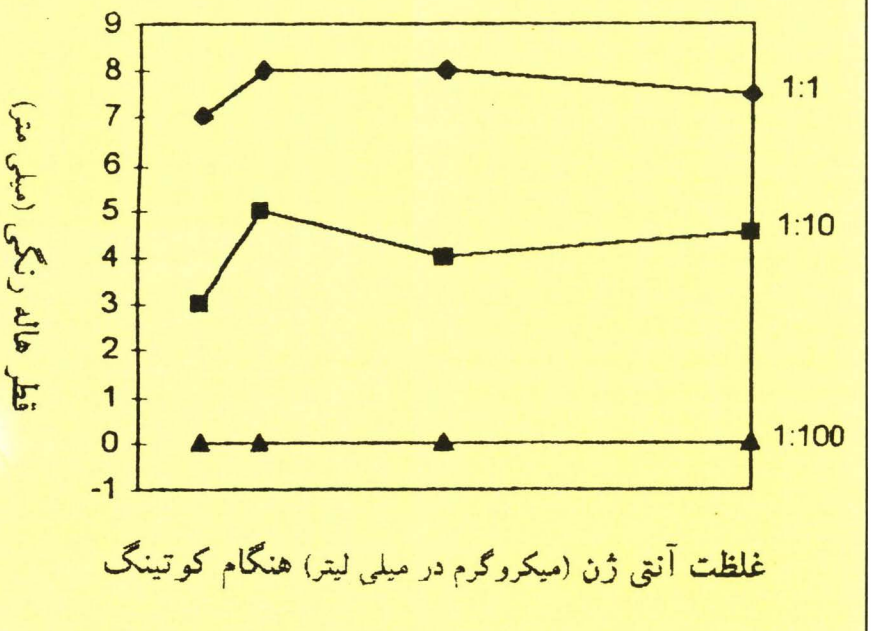
حیوانات تحت آزمایش

تعداد ۶۰ سر رت به‌عنوان حیوانات تحت آزمایش در نظر گرفته شد رت‌ها به دو دسته ۳۰ تایی (۳۰ سر

نمودار (۱) تأثیر غلظت پادگن استفاده شده برای کوت کردن پتری دیشها - برای سرم مثبت رت غلظت پادگن (میکروگرم در میلی لیتر) هنگام کوتینگ



نمودار (۲) تأثیر غلظت پادگن استفاده شده برای کوت کردن پتری دیشها - برای سرم منفی رت تصویر هاله‌های واکنش بر روی ژل در دیگ الایزا غلظت پادگن (میکروگرم در میلی لیتر) هنگام کوتینگ



گروه مورد و ۳۰ سر گروه شاهد) تقسیم شدند. جهت تهیه سرم‌های مثبت ۲۰۰ هزار تاکی‌زوئیت به‌طور داخل صفاقی به هر رت در گروه مورد تلقیح و سه هفته بعد خونگیری انجام و سرم‌های مثبت جمع آوری شد. از گروه شاهد نیز برای تهیه سرم منفی خونگیری انجام شد. کلیه سرم‌های جمع آوری شده ابتدا به روش Dye Test (بعنوان تست طلایی) مورد آزمایش قرار گرفتند.

آنتی‌ژن

برای تهیه پادگن محلول از روش انجماد و ذوب متوالی تاکی‌زوئیت‌ها استفاده گردید و پروتئین سنجی به روش برادفورد انجام شد (۲). سپس کلیه سرم‌ها به دو روش ELISA با رقت توصیه شده ۱:۲۰۰ و دیگ الایزا با رقتهای ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ مورد آزمایش قرار گرفتند. مقدار پادگن مصرفی پس از آزمایش‌های مکرر و تعیین شرایط اپتیمم برای روش الایزا به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر و برای روش دیگ الایزا ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید.

آزمایش دیگ الایزا

دیگ الایزا با استفاده از روش توصیف شده بوسیله Cursons در سال ۱۹۸۲ (۵) با مختصری تغییرات بصورت زیر انجام شد:

۱- ابتدا پلیت‌های پلی استیرنی به قطر ۸ سانتی‌متری را انتخاب و با الکل متانول شستشو داده شد تا سطح داخل پلیت‌ها به خوبی تمیز شود.

۲- کوت کردن پادگن در پلیت‌ها: پس از خشک شدن پلیت‌ها، ۲۰ میلی لیتر از پادگن محلول با غلظت پروتئینی ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درون هر پلیت ریخته شد و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از این مدت پلیت‌ها با آب مقطر یکبار شستشو داده شد.

۳- اضافه کرده بلوکر BSA (۰/۵ درصدی): به هر پلیت ۲۰ میلی لیتر بلوکر افزوده شد و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از این مدت پلیت‌ها یکبار با آب شستشو داده شد و سپس روی کاغذ خشک کن برگردانیده شد تا همه قطرات آب خارج گردد و پلیت خوب خشک شود.

۴- اضافه کردن نوبل آگار (یک درصدی): ابتدا نوبل آگار یک درصدی حاوی BSA ۰/۲ درصدی تهیه گردید. پس از اینکه نوبل آگار تا دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خنک شد مقدار ۰/۷۵ میلی لیتر BSA به آن اضافه شد. سپس پلیت‌ها روی سطح صافی گذاشته شد و در هر پلیت مقدار ۲۵ میلی لیتر نوبل آگار ریخته شد. بهتر است پلیت‌ها را ۱۰-۱۵ دقیقه در یخچال قرار داد تا ژل به خوبی ببندد. سپس ۶ حفره در هر پلیت ژل پانچ گردید.

۵- سرم‌ها در رقت‌های مورد نظر (۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰) با سرم فیزیولوژی تهیه و در هر حفره ۲۵ لاندا ریخته شد و ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

۶- پس از طی زمان انکوباسیون، ژل از درون پلیت برداشته شد. سپس پلیت‌ها سه بار با بافر و دوبار با آب مقطر شستشو داده شد.

۷- اضافه کردن کونژوگه: کونژوگه بکار رفته از نوع آنتی هیومن IgG کونژوگه شده با HRP تهیه شده از شرکت سیگما بوده است. ابتدا کونژوگه با رقت مناسب ۱:۱۰۰۰۰ برای سرم انسانی همراه با BSA ۰/۲ درصدی

جدول شماره ۱- تأثیر غلظت پادگن استفاده شده برای کوت کردن پتری دیشها - برای سرم مثبت رت

	رقت سرم		
قطر هاله (میلی متر) غلظت آنتی‌ژن (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۱:۱	۱۰:۱۰	۱:۱۰۰
۱۰۰	۱۲	۵/۵	۴/۵
۵۰	۱۲	۶	۴/۵
۲۰	۱۲/۵	۶	۵
۱۰	۱۳	۶/۵	۴

جدول شماره ۲- تأثیر غلظت پادگن استفاده شده برای کوت کردن پتری دیشها - برای سرم منفی رت

	رقت سرم		
قطر هاله (میلی متر) غلظت آنتی‌ژن (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۱:۱	۱۰:۱۰	۱:۱۰۰
۱۰۰	۷/۵	۴/۵	۰
۵۰	۸	۴	۰
۲۰	۸	۵	۰
۱۰	۷	۳	۰

جدول ۳ - اندازه قطر هاله واکنش در رقت‌های سرمی ۱:۱ و ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ در روش دیگ الایزا برای تشخیص توکسوپلاسموزیس تجربی رت

رقت	سرم	کوچکترین قطر(mm)	بزرگترین قطر(mm)	میانگین قطر(mm)	انحراف معیار(mm)
۱:۱	مثبت	۱۴	۲۶	۱۸/۲۱	۳/۶۹
	منفی	۸	۱۷	۱۳/۱۵	۲/۶۹
۱:۱۰	مثبت	۸	۱۷	۱۲	۲/۱۱
	منفی	۳/۵	۱۱	۶/۱۵	۲/۰۳۸
۱:۱۰۰	مثبت	۳	۱۳	۶/۶۷	۲/۲۰
	منفی	۰	۲	/۸۱	/۹

با بافر PBS تهیه شد و به هر پلیت ۲۵ میلی لیتر اضافه گردید. سپس پلیتها ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی شیکر انکوبه گردید.

۸- پس از طی زمان انکوباسیون پلیتها را خالی کرده و ۵ بار مانند مرحله ۶ شستشو گردید سپس پلیت‌ها روی کاغذ خشک کن بر گردانیده شد تا خوب خشک شود.

۹- آماده سازی ژل آگاروز یک درصدی حاوی سوبسترای OPD ۰/۳ درصدی (W/V) و هیدروژن پراکسید ۰/۵٪ درصدی (V/V) در بافر سیترات - فسفات: برای این منظور ابتدا آگاروز یک درصد با بافر سیترات - فسفات تهیه شد. برای سه پلیت بدین صورت عمل گردید که ۰/۷۵ گرم آگاروز به ۷۵ میلی لیتر بافر سیترات - فسفات اضافه شد و حرارت داده شده تا بجوشد و شفاف شود و بطور کامل آگاروز در بافر حل گردد. سپس مقدار ۲۲/۵ میلی گرم OPD در ۵ میلی لیتر بافر سیترات - فسفات حل و به آن ۳۷ لاندا هیدروژن پراکسید افزوده شد. پس از اینکه آگاروز تا دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خنک شد، محلول سوبسترا به آن اضافه و خوب مخلوط گردید. سپس پلیت‌ها روی سطح صاف و در جایی دور از نور قرار داده شد و به هر پلیت ۲۵ میلی لیتر آگاروز حاوی سوبسترا افزوده شد و به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه ساکن گذاشته شد تا ژل ببندد و هاله واکنش آشکار گردد. نکته مهم این است که در هنگام ریختن آگاروز در پلیتها نبایستی پلیتها تکان بخورد چون در غیر این صورت هاله واکنش نامنظم و از حالت دایره‌ای خارج شود.

۱۰- پس از ۲۰ دقیقه قطر هاله هر واکنش که بصورت هاله زرد متمایل به قهوه‌ای رنگ تشکیل شده بود با خط کش اندازه گیری شد. هاله واکنش تا چند ساعت (۲ - ۱ ساعت) پس از تشکیل ثابت بوده و پس از آن رنگ قهوه‌ای در تمام ژل پخش می‌شود و امکان اندازه‌گیری هاله‌ها از دست می‌رود.

آزمایش الایزا: برای انجام تست الایزا از روش Crowther استفاده شد (۴).

برای تعیین میزان اعتبار تست‌ها از شاخص‌های حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی استفاده شد. بدین ترتیب که در هر رقت سرمی برای تست‌های الایزا و دیگ الایزا این شاخص‌ها با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه و نتایج حاصله با هم مقایسه گردید.

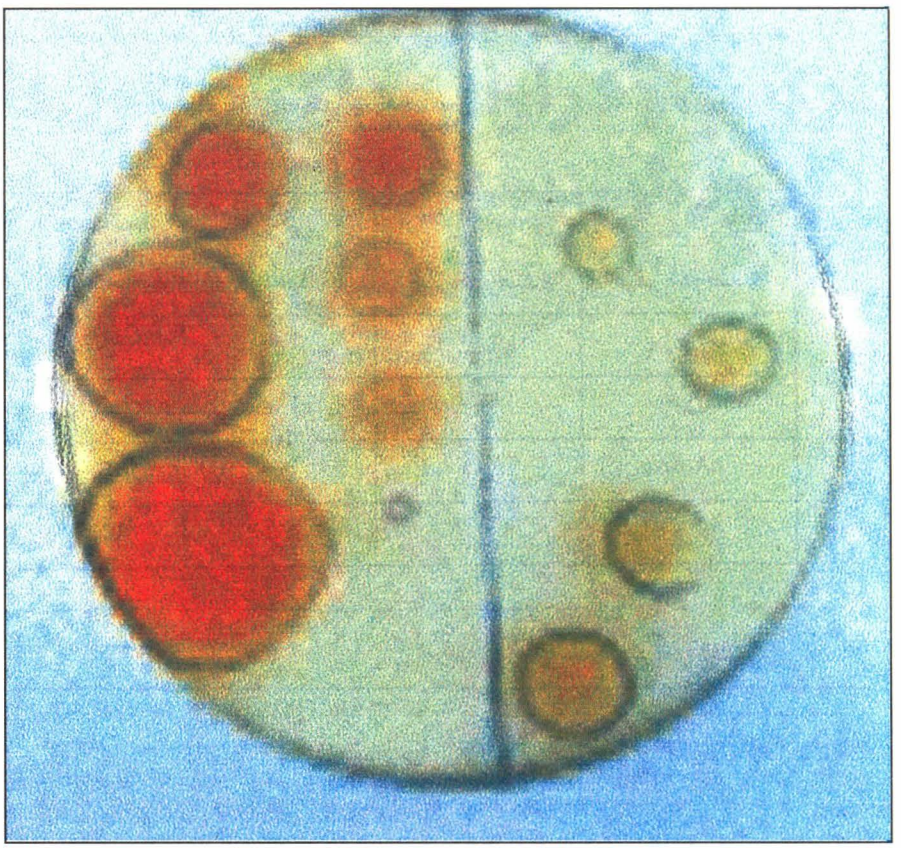
نتایج

نتایج مربوط به تاثیر غلظت پادگن استفاده شده برای کوت کردن پتری دیش‌ها. با توجه به نتایج جدول شماره ۱- در مورد نمونه‌های سرم مثبت رت‌ها و جدول شماره ۲- در مورد نمونه‌های سرم منفی رت‌ها مشخص شد که استفاده از غلظت‌های مختلف پادگنی برای کوت کردن پلیت‌ها (۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرگرم در هر میلی لیتر) تغییرات زیادی در اندازه قطر هاله‌های واکنش ایجاد نمی‌کند. بطوریکه دامنه تغییرات قطر هاله‌ها برای سرم مثبت در چهار غلظت پادگنی در رقتهای سرمی ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ به ترتیب ۱۲-۱۳ میلی متر. ۵/۵-۶/۵ میلی متر و ۴-۵ میلی متر و دامنه تغییرات قطر هاله‌ها برای سرم منفی در چهار غلظت پادگنی در رقتهای ۱:۱ و ۱:۱۰ به ترتیب ۷-۸ میلی متر و ۳-۵ میلی متر بوده است. در رقت ۱:۱۰۰ برای سرم منفی هیچ هاله‌ای تشکیل نشد. با توجه به نتایج بدست آمده از غلظت‌های مختلفی آنتی‌ژن (۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر بهترین غلظت انتخاب گردید.

نتایج مربوط به تاثیر مقدار کونژوگه در شدت رنگ و اندازه هاله واکنش برای این منظور از دو رقت ۱:۴۰۰۰ و ۱:۱۰۰۰ گه کونژوگه رت. جهت انجام آزمایش سرم رت به روش دیگ الایزا استفاده شد و مشخص شد که اندازه قطر هاله واکنش در رقتهای مختلف سرمی تغییر نمی‌کند اما شدت رنگ هاله تشکیل شده متفاوت بوده و با کاهش رقت کونژوگه رنگ هاله‌ها پر رنگ‌تر می‌شد. رقت کونژوگه بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده (داکو) ۱:۴۰۰۰ بوده است.

نتایج مربوط به ارزیابی روش DIG-ELISA در تشخیص توکسوپلاسموزیس در نمونه‌های سرم رت:

جدول شماره ۳- اطلاعات مربوط به قطر هاله واکنش حاصل از انجام روش دیگ الایزا در رقتهای ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ را نشان می‌دهد. از طرفی طبق جدول شماره ۴ ویژگی و ارزش اخباری مثبت این روش در تشخیص توکسوپلاسموزیس در رت برای ۳ رقت سرمی ۱:۱، ۱:۱۰، ۱:۱۰۰ صد در صد بوده است. حساسیت این روش با ازدیاد رقت سرمی افزایش می‌یابد بطوریکه حساسیت این روش در رقت ۱:۱ در کمترین حد (۱۵/۷۸٪)، در رقت ۱:۱۰ مقدار آن ۳۵٪ و در رقت ۱:۱۰۰ بیشترین حد (۹۵٪) و ارزش اخباری منفی در رقت ۱:۱ و ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ به ترتیب ۳۸/۰۹٪، ۵۰٪ و ۸۸/۸۸٪ محاسبه گردید. این نتایج نشان می‌دهد که



تصویر شماره ۱- تصویر هاله‌های واکنش بر روی ژل در دیک الایزا غلظت آنتی‌ژن (میکروگرم در میلی لیتر) هنگام کوتینگ

بهترین حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی روش دیگ الایزا برای سرم رت در رقت ۱:۱۰۰ است.

همچنین در آنالیز آماری (T-student) و مقایسه نتایج بدست آمده از آزمون DIG-ELISA برای سرم مثبت و منفی رت در رقت‌های ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ بین اندازه قطر هاله‌های سرم‌های منفی و مثبت اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p< ۰/۰۵$). با توجه به نتایج فوق رقت ۱:۱۰۰ به‌عنوان Cut off این روش تعیین شد. اندازه هاله در این رقت ۳/۵۴ میلی متر بدست آمد. بنابراین می‌توان توصیه کرد در رقت ۱:۱۰۰ سرم رت. چنانچه هاله واکنش کمتر از ۳/۵۴ میلی متر باشد. از نظر نوکسوپلاسموزیس منفی است و چنانچه هاله واکنش بیش از ۳/۵۴ میلی متر باشد بایستی نمونه سرمی از نظر وجود آنتی پادتنهای اختصاصی از نوع IgM مورد بررسی قرار گیرد.

بحث

در این تحقیق نتایج حاصل از آزمایش دیگ الایزا با غلظت‌های مختلفی پادگنی نشان داد که غلظت پادگن تأثیری در قطر هاله واکنش ندارد که این مطلب با نتایج تحقیقی که Elving و همکاران (۸) جهت راه اندازی و بهینه سازی روش دیگ الایزا در سال ۱۹۸۰ انجام دادند. مطابقت دارد. لذا غلظت مناسب پادگن برای کوت کردن پلیت‌ها ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که مقدار کونژوگه هیچ تاثیری در اندازه قطر هاله واکنش ندارد اما در شدت رنگ هاله واکنش موثر است و این مطلب با نتایج تحقیقات انجام شده توسط Elving و همکاران (۸) یکسان است. همچنین در این تحقیق مشخص شد که با افزایش رقت سرم، حساسیت آزمایش کاهش می‌یابد. بطوریکه در رقت ۱:۲۰۰ بعضی سرم‌های مثبت هاله‌ای را ایجاد نمی‌کنند، در حالیکه در این تست عدم وجود هاله واکنش به معنای سرم منفی است و این مسئله باعث افزایش منفی کاذب و در نتیجه باعث کاهش حساسیت تست می‌گردد. این در حالی است که در رقت ۱:۱۰۰ هیچ یک از سرم‌های مثبت فاقد هاله نبوده‌اند و بر عکس اکثر سرم‌های منفی فاقد هاله بوده‌اند و چون ویژگی و حساسیت در این رقت بالاتر از دیگر رقت‌ها بود لذا بعنوان رقت سرمی جهت تعیین Cut off انتخاب گردید.

جهت ارزیابی و مقایسه روش دیگ الیزا با روشهای سرولوژیکی متداول در تشخیص بیماریهای انگلی تا کنون تحقیقاتی توسط برخی محققین انجام شده است (۳، ۶، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۶). در سال ۱۹۸۲ Cursons (۵) روش دیگ الیزا را برای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس انسانی به کار برد و نتایج آن را با روشهای IHA و IFA مقایسه نمود و حساسیت و ویژگی خوبی را در مقایسه با دو تست دیگر به دست آورد. وی غلظت پادگن جهت کوت کردن در پلیت‌ها را ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و زمان انتشار را ۱۶ ساعت انتخاب نمود. وی همچنین به این نتیجه رسید که اندازه قطر هاله واکنش با غلظت پادتن بادی نمونه سرمی رقیق نشده، رابطه مستقیمی دارد. در سال ۱۹۸۵، Uggla و Nilsson (۱۸) روش دیگ الیزا را برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در گاوها و خوکها به کار بردند و نتایج حاصل از تحقیق را با روشهای IFA و ELISA مقایسه کردند نتایج این دو روش در اکثر موارد موافق هم بوده است. همین محققین در سال ۱۹۸۷ روش دیگ الیزا را برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در گوسفند بکار بردند و با روش IFA مقایسه کردند و به نتایج خوبی دست یافتند (۱۹).

مقایسه دو تست الایزا و دیگ الایزا از نظر حساسیت و ویژگی نشان می‌دهد که روش دیگ الایزا با روش الایزا برابری می‌کند در عین حال گر چه روش الایزا رایج در آزمایشگاهها برای تشخیص پادتن‌های ضد توکسوپلاسمایی مناسب است اما روش دیگ الایزا می‌تواند به‌خاطر امتیازات زیر بخصوص در آزمایشگاههایی که از امکانات کافی برخوردار نیستند ترجیح داده شود. این امتیازها عبارتند از: الف) ساده بودن: در این روش کافی است فقط از دو رقت سرمی استفاده کرد و نتیجه نهایی با اندازه‌گیری ساده قطر هاله واکنش ثبت نمود. ب) اقتصادی بودن: از پتری دیش به‌عنوان فاز جامد استفاده می‌شود بر حسب تعداد نمونه‌های آزمایش می‌توان در اندازه کوچک و یا بزرگ استفاده کرد علاوه بر این به دستگاههای گرانقیمت همچون ELISA-Reader و میکروسکوپ ایمونوفلوئورسانس نیاز نیست. ج) قابلیت استاندارد شدن: محلولها و پادگن محلول و سرم‌های کنترل را می‌توان از قبل تهیه کرد. همچنین می‌توان پلیت‌ها را پس از کوت کردن پادگن و افزودن بلوکر و ریختن ژل و پانچ کردن در یخچال نگهداری کرد و در روزهای بعد از آن استفاده نمود که این مطلب نشان می‌دهد که این تست قابلیت استاندارد شدن و تهیه آن بصورت کیتهای آزمایشگاهی را دارد (د) تنوع‌پذیری: در این تست می‌توان غلظت‌های مختلف پادگنی را بکار برد. ه) تکرارپذیری: تکرار پذیری این روش بسیار خوب ارزیابی شد. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که روش دیگ الایزا برای تشخیص توکسوپلاسموزیس می‌تواند بسیار مفید و مقرون به صرفه باشد.

منابع مورد استفاده

1- Bautista-Garfias, C.R., Loprz-Arellano, M.E., and Sanchez-Albarran, A., 1989. A. new method for serodiagnosis of sheep fascioliasis using helminth excretory-secretory products. Parasitol. Res. 79: 135-137.

2- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ana. biochem. 72: 248-254.

3- Castilla, M.M., Santos, G.M., Guzman, B.C., and Bautista, G.C.R., 1988. A new method for diagnosis of chagas disease: Diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay. J. Parasitol. 74(5):

جدول ۴ - حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش‌اخباری منفی روش‌های دیگر الایزا و الایزا برای تشخیص توکسوپلاسموزیس تجربی رت غلظت پادگن (میکروگرم در میلی لیتر) هنگام کوتینگ

آزمایش	عنوان رقت	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	ارزش اخباری مثبت(درصد)	ارزش اخباری منفی(درصد)
DIG-ELISA	۱:۱	۱۵/۷۸	۱۰۰	۱۰۰	۳۸/۰۹
DIG-ELISA	۱:۱۰	۳۵	۱۰۰	۱۰۰	۵۰
DIG-ELISA	۱:۱۰۰	۹۵	۱۰۰	۱۰۰	۸۸/۸۸
ELISA	۱:۲۰۰	۹۵	۷۵	۹۰/۴۷	۸۵/۷۱

805-809.

4- Crowther J. R., 1995, ELISA theory and practice. Ed. Human Press. New Jersey.

5- Cursons, R.T.M., 1982. DIG-ELISA for the serologic diagnosis of toxoplasmosis. Am. J. Clin. Path. 77(4): 459-461.

6- Demattis, S., 1989. Quantitive determination of anti-hydatid antibodies by ELISA without a colorimetric reading. int. J. parasitol. 19: 229.

7- Dubey, J. P. 1998. Toxoplamosis, p. 303-318. In L. Collier, A. Balows, and M. Sussman (eds), Toply & Wilsons Microbiology and microbial Infection, Vol: 5. Arnold Co-Published in the USA by Oxford University press, Inc. New York.

8- Elving, H. Lange, S. and Nygren, H. 1980. Diffusion in gel enzyme linked Immunosorbent assay (DIG-ELISA): Optimal conditions for quantitation of antibodies J. Immunol. Methods, 39: 247-256.

9- Gomez-Priego, A., Pariagua-Solis, J. F. Rivas-Alcala, R. A. and Rufres-Meza, M. T. 1985. Successful application of the DIG-ELISA in Onchocercasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg. 79:159.

10- Gunnarsson, H. and Svedhem, A., 1998. The usefulness of Diffusion-in-gel ELISA in clinical practice as illustrate by a *Campylobacter jejuni* outbreak. J. Immmunol. Methods. 215(1-2): 135-144.

11- Ibarra, F. et al. 1998. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiolgy of bovine fascioliosis Vet. Parasitol. 77: 229-236.

12- Jeansson, S., Elwing, H. Nygren, H., and Oloffsson, S., 1982. Evaluation of solublized Herpes simplex virus membrane antigen in diffusion in gel enzyme-linked Immunosorbent assay (DIG-ELISA). J. Virol. Methods. 4(3): 167-176.

13- Kumar, G. S., Mak, J. W., Lam, P.L., Tan., M. A. and Lim, P. K., 1987. Diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA and IFA test in the detection of malarial antibodies. Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health. 18(4): 502-506.

14- Lange, S., Gunnarsson, H. Larson, P., and Nygren, H. 1981. Diffusion-in-gel enzyme-linked Immunosorbent Assay (DIG-EIISA) for detection of antibodies to *Yersinia enterocolitica* Acta. Pathol. Microbiol. Scand 89(2): 63-69.

15- Nilsson, L. A., and Uggla, A., 1992. *Schistosoma mansoni* antibodies in tissue specimens demonsterated by a diffusion-in-gel ELISA technique. Vet. Parasitol. 45(1-2): 78-80.

16- Requejo, H. I. 1991. Diffusion-in-gel enzyme-linked Immunosorbent assay DIG-ELISA) for chagas disease serodiagnosis. Braz. J. Biol. Res. 24(5): 471-483.

17- Svedhem, A., Gunnarsson, H., and Kaijser, B., 1983. Diffusion-in-gel enzyme-linked Immunosorbent assay for routine detection of IgG and IgM antibodies to *Campylobacter jejuni*. J. Infect. Dis. 488(1): 82-92.

18- Uggla, A., and Nilsson. L. A., 1985. A solide phase Immunoassay (DIG-ELISA) as a serodiagnostic tool in bovine and porcine *Toxoplasma gondii* infection. Dev. Stand. 62: 37-42.

19 - Uggla, A., and Nilsson, L. A., 1987. Evaluation of a solide-phase immunoassay (DIG-ELISA) for the serodiagnosis of ovine Toxoplasmosis. Vet. Immunopath. 14(4): 309-318.