مجله انجمن بهداشت ، سال بیست و پنجم ، شماره ۲ - ۱ ، ۱۳۷۵

تهیه آنتی ژن آگلوتیناسیون مستقیم و ارزشیابی آن در تشخیص توکسوپلاسموز

اصغرکنعانی نوتاش [۱] ، دکترمهدی قربانی [۱] ، دکترغلامحسین ادریسیان [۱]

واژه های کلیدی : *توکسوپلاسموز ، تشخیص آزمایشگاهی ، آگلوتیناسیون مستقیم ، آنتی ژن*

چکیده

روش آگلوتیناسیون مستقیم در بررسی های سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسموز در میزبان های مختلف کاربرد وسیعی دارد ، زیرا روشی نسبتاً حساس ، آسان و قابل استفاده در آزمایشگاه های غیرمجهز و صحرائی می باشد.

به منظور ارزشیابی این روش در تشخیص توکسوپلاسموز ، پس از تهیه آنتی ژن اختصاصی آن در واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت ، مطالعات زیر انجام گرفت.

سرم خون ۲۵۱ بیمار مشکوک به توکسوپلاسموز از نظر پادتن های توکسوپلاسما به دو روش ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم و آگلوتیناسیون مستقیم مورد آزمایش قرار گرفت و حساسیت و ویژگی این دو روش محاسبه شد که به ترتیب ۸۳/۲ و ۷۶/۴ درصد بود (با احتساب حداقل عیار در هر دو تست ۱/۱۰۰).

برای مقایسه روش آگلوتیناسیون مستقیم با روش پارازیتولوژی ، ۳۱ عدد موش سفید کوچک آزمایشگاهی با توکسوپلاسما گوندی ای آلوده گردید ، پس از گذشت ۶ تا ۸ هفته پلاسمای خون موش های مورد وشاهد (۱۰ موش) از نظر پادتن های توکسوپلاسما به روش آگلوتیناسیون مستقیم و مغز آنها از نظر وجود کیست نسجی مورد آزمایش قرار گرفت. فقط موش های مورد، از نظر پادتن توکسوپلاسما با عیارهای ۱/۵۴۰< مثبت بوده و در مطالعه میکروسکپی مغز آنها ، کیست نسجی انگل دیده شد.

در مجموع ۲۹۳ نمونه سرم خون نشخوارکنندگان (۱۸۳ راس گوسفند ، ۱۶ راس بز ، ۹۴ راس گاو) از کشتارگاه های زیاران و اسلام شهر تهیه و از نظر وجود پادتن های توکسوپلاسما به روش آگلوتیناسیون مستقیم مورد آزمایش قرار گرفت. موارد مثبت در گوسفندان ۳۱/۱ درصد ، در بزها ۲۵ درصد و در گاوها ۳۴ درصد با عیارهای ۱/۴۰< بود.

۱- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی ، دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران ، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵.

سرآغاز

توکسوپلاسما گوندی ای تک یاخته ای است که انتشار جهانی دارد. میزبان نهایی این انگل گربه و گربه سانان است. انسان و سایر پستانداران و پرندگان میزبانان واسط این تک یاخته محسوب می شوند. طبق بررسی های انجام گرفته به روش سرولوژی در آمریکای مرکزی میـــزان آلـــودگی در ۵ سال اول زندگی ۳۰٪ و در جمعیت ۲۵ ساله ها۷۰٪ تعیین گردیده است (۷). میزان موارد مثبت سرولوژی در فرانسه ۸۵٪ می باشد (۱۶). بررسی های سرولوژی انجام شده در سال های ۷۷-۱۹۷۶ در نواحی کوهستانی شمال غرب وجنوب غربی ایران میزان آلودگی را در ماکو و ارومیه ۲۳/۲٪ ، درسردشت ۶/۳٪ و درایذه ۹/۳٪ نشان داده است (۹). میزان آلودگی در ساکنین سواحل دریای خزر در کل جمعیت تحت بررسی ۵۵/۷٪ بـــوده وآلودگی با ازدیاد سن افزایش یافته و درسن ۲۰ سالگی به بیش از ۶۰ درصد رسیده است (۱۰).

بررسی سال ۱۳۶۹ در کازرون میزان آلودگی را ۳۹/۶ درصد (۱) و مطالعه سال ۱۳۷۲ در شهرری درصد آلودگی را۶۸/۳۱ نشان داده است (۲). بررسی سرولوژی انجام گرفته در خوزستان میزان آلودگی را در بیماران مشکوک به توکسوپلاسموز ۷۲/۳٪ و در افراد ظاهراً سالم ۴۹/۶٪ نشان می دهد(۱۲).

برای تشخیص توکسوپلاسموز معمولاً از روش های سرولوژی استفاده می گردد. یکی از تست های سرولوژی مورد استفاده روش آگلوتیناسیون مستقیم [1] می باشد. این تست دارای حساسیت خوبی بوده و در بررسی های سرواپیدمیولوژی ، غربالگری [2] و همینطور برای مراقبت از خانم هایی که در اوایل حاملگی از نظر پادتن های توکسوپلاسما منفی هستند تست مناسبی می باشد (۴،۵). دراین روش ایمنوگلبولین M اختصاصی و غیراختصاصی به وسیله 2ME [3] از بین می رود (۳). این تست از نظر کیفی با تست رنگی [4] ۹۸٪ مطابقت دارد (۴). بررسی انجام گرفته در آلمان ، در خانم های حامله همبستگی بین دو روش آگلوتیناسیون مستقیم و تست رنگی را ۹۹/۴۸٪ نشان داده است (۱۳). بررسی دیگری در فرانسه همبستگی آگلوتیناسیون مستقیم را در مقایسه با روش ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم ۹۷/۴٪ نشان داده است (۱۵).

باتوجه به سهولت کاربرد تست آگلوتیناسیون مستقیم در فیلد و یا مناطق دورافتاده و محروم و قابل استفاده بودن در تعیین میزان آلودگی در میزبان های مختلف و عدم نیاز به تجهیزات و مواد گران قیمت مانند میکروسکوپ ایمونوفلئورسانس و آنتی سرم کنژوگه شده اختصاصـــی ، در یک بـررسی در واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت مبـــادرت به تهیه

1- Direct agglutination test (DAT)
2- Screening
3- 2 Mercaptoethanol
4- Dye test

آنتی ژن و راه اندازی و ارزشیابی تست آگلوتیناسیون مستقیم گردید.

نمونه گیری و روش بررسی

جهت تهیه آنتی ژن توکسوپلاسما برای تست آگلوتیناسیون مستقیم از روش قبلی (۴) با مختصر تغییراتی استفاده گردید.

نمونه های خون انسان از مراجعه کنندگان به آزمایشگاه واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت و نمونه های خون حیوانات از کشتارگاه های زیاران واسلام شهرتهیه گردید.

جهت آزمایش سرم های تهیه شده در میکروپلیت های لـا شکل سریال رقت های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰ و ۱/۴۰۰ و ... از سرم انسان و سریال رقت های ۱/۶۰ و ۱/۱۸۰ و ۱/۵۴۰ و ۱/۱۶۲۰ و ۱/۱۶۰۰۰ و... از سرم حیوانات تهیه گردید. سپس به هر حفره پلیت که حاوی ۵۰ میکرولیتر سرم رقیق شده بود ۵۰ میکرولیتر آنتی ژن تهیه شده اضافه گردید و پلیت های حاوی سرم های مورد آزمایش یک شبانه روز در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. در سرم هائی که دارای آنتی بادی توکسوپلاسما بود ، کمپلکس آنتی ژن آنتی بادی در حفره های پلیت ایجاد شده که درمایع حفره های پلیت به صورت پراکنده و ابرمانند دیده می شدو درصورت عدم وجود پادتن آنتی ژن به صورت یک توده گرد تکمه مانند در ته ولها جمع می گردید.

در این بررسی :

الف - ۲۵۱ نمونه سرم خون بیماران مشکوک به توکسوپلاسموز جـمع آوری و بـــا دو روش آگلوتیناسیون مستقیم و ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم مورد آزمایش قرار گرفت و در هر دو تست از رقت ۱/۱۰۰ استفاده گردید.

ب - ۳۱ موش سفید کوچک آزمایشگاهی با توکسوپلاسما گوندی ای ، سویه غیرویرولان ، از راه صفاقی آلوده گردید و تعداد ۱۰ موش از همان سری به عنوان شاهد درنظر گرفته شد. بعداز ۶ تا ۸ هفته ازنوک دم تمام موش های مورد و شاهد به طور جداگانه خون گرفته پلاسمای خون آنهااز نظر وجود پادتن توکسوپلاسما با روش آگلوتیناسیون مستقیم آزمایش شد. تمام نمونه ها را ابتدا با رقت های ۱/۴۰ و ۱/۴۰۰۰ غربال کرده و سپس برای تعیین عیار سرم هایی که در ۱/۴۰ مثبت و در ۱/۴۰۰۰ منفی بودند با استفاده از رقت های ۱/۶۰ و ۱/۱۸۰ و ۱/۵۴۰ و ۱/۱۶۲۰ و سرم هایی که در رقت ۱/۴۰ و ۱/۴۰۰۰ مثبت و یا در ۱/۴۰۰۰ مثبت ولی در ۱/۴۰ منفی بودند با رقت هـای ۱/۶۰۰۰ ، ۱/۱۸۰۰۰ ، ۱/۵۴۰۰۰ و ۱/۱۶۲۰۰۰ تعـیین تیتـر گـردید. سپس تمام موش های آلوده و شاهد را به مرور بـا کلـروفرم کشته و مغزآنهـا از نظر وجود کیست نسـجی تـوکسـوپلاسما مورد مطالعه میکروسکپی قرار گرفت.

ج - ۲۹۳ نمونه سرم خون حیوانات اهلی (۱۸۳ گوسفند ، ۹۴ گاو و ۱۶ بز) از کشتارگاه های زیاران و اسلام شهر جمع آوری و از نظر پادتن توکسوپلاسما به روش آگلوتیناسیون مستقیم (مشابه سرم موش ها) مورد آزمایش قرارگرفت. تمام سرم های انسانی و حیوانی جمع آوری شده تا زمان آزمایش در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری می گردید.

یافته ها

به طوری که درشترنگه شماره ۱ آمده است از مجموع ۲۵۱ نمونه سرم آزمایش شده از نظر پادتن های توکسوپلاسما با روش ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم ۱۷۹نمونه (۷۱/۳٪) با عیارهای ۱/۱۰۰ تا ۱/۶۴۰۰ و باروش آگلوتیناسیون مستقیم ، ۱۶۶ نمونه (۶۶/۱٪) با عیارهای ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۰۲۴۰۰ مثبت بود. عیارهای پایین تراز ۱/۱۰۰ در هیچ یک از دو روش ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم وآگلوتیناسیون مستقیم منظور نگردیده است.

نمونه های سرم مورد آزمایش از بیمارانی که در سنین مختلف بودند جمع آوری گردیده و میزان آلودگی SPR [1] ومیانگین هندسی عکس عیارپادتن ها[2] در گروه های سنی محاسبه و در شترنگه شماره ۲ آمده است.

نتایج تست های ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم وآگلوتیناسیون مستقیم در ۸۱/۳٪ موارد با یکدیگر تطابق داشته است (شترنگه شماره ۳). تطابق فوق با آزمون کای اسکور(X^2) با احتمال ۹۹٪ و با آزمون فرضیه نسبت ها (Z) با احتمال ۹۷/۵٪ تایید گردید.

میزان حساسیت و ویژگی تست آگلوتیناسیون مستقیم نسبت به ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم (روش استاندارد) به ترتیب ۸۳/۲٪ و ۸۶/۴٪ تعیین گردید.

باتوجه به میانگین هندسی عکس عیارهای بدست آمده در دو تست ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم و آگلوتیناسیون مستقیم (شترنگه شماره ۲) چون GMRT تست آگلوتیناسیون مستقیم نسبت به ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم نزدیک چهاربرابر بود ، لذا حداقل عیار تست آگلوتیناسیون مستقیم را چهار برابر (۱/۴۰۰) درنظر گرفته و تطابق ، حساسیت و ویژگی دو تست محاسبه گردید که نتایج بدست آمده به ترتیب ۷۸/۹٪ ، ۷۴/۹٪ ، ۸۸/۹٪ محاسبه گردید (شترنگه شماره ۴).

در مقایسه روش آگلوتیناسیون مستقیم با روش پارازیتولوژی در موش هایی که به طور تجربی آلوده شده بودند به طوری که درشترنگه شماره ۵ نشان داده شده است ، در پلاسمای خون تمام موش های مورد مطالعه تجربی پس از گذشت ۴۳ تا ۶۰ روز پادتن توکسوپلاسما

1- Sero - Positive Rate

2- Geometric Mean of Reciprocal Titers

با عیارهای ۱/۵۴۰ تا ۱/۱۶۲۰۰۰ مشاهده شد و در مطالعه میکروسکپی مغز تمام موش های فوق کیست نسجی توکسوپلاسما دیده شد. خون موش های شاهد از نظر پادتن توکسوپلاسما و مغز آنها ازنظر کیست نسجی منفی بود.

نتایج آزمایش سرولوژی سرم خون نشخوارکنندگان به طوری که در شترنگه شماره ۶ نشان داده شده است به شرح زیر بود. از ۱۸۳ نمونه سرم خون گوسفند ۵۷ مورد (۳۱/۱٪) با عیارهای ۱/۴۰ تا ۱/۶۰۰۰ و از ۹۴ نمونه سرم خون گاو ۳۲ مورد (۳۴٪) با عیارهای ۱/۴۰ تا ۱/۵۴۰ و از ۱۶ نمونه سرم بز ۴ مورد (۲۵٪) با عیارهای ۱/۴۰ تا ۱/۵۴۰ مثبت بودند.

گفتگو و بهره گیری پایانی

درایران به طور معمول در بیشتر آزمایشگاه ها برای بررسی های سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسموز از روش ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم استفاده می شود که برای انجام آن میکروسکپ ایمونوفلوئورسانس ، آنتی سرم کنژوگه اختصاصی وامکانات یک آزمایشگاه نسبتاً مجهز ضروری است. در مواردی هم از روش هایی استفاده می شود که معرف های آنها بایستی به صورت کیت تجارتی از خارج از کشور تهیه شود که خودمستلزم صرف هزینه های زیادی است. اگر بتوان آنتی ژن آگلوتیناسیون مستقیم را به مقدار کافی تهیه نمود ، با این روش که نسبتاً حساس ، ارزان و قابل اجرا در مناطق دورافتاده و محروم می باشد ، می توان بدون صرف ارز و احتیاج به آزمایشگاه مجهز مطالعات سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسموز را در انسان و حیوانات در سراسر کشورانجام داد.

مطابقت نتایج کیفی تست آگلوتیناسیون مستقیم با تست رنگی ۹۸٪ گزارش شده است (۴) در بررسی حاضر نیز این تست با روش ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم در سرم های انسانی ۸۱/۳٪ تطابق نشان داده است. در مطالعه دیگری دو تست ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم وآگلوتیناسیون مستقیم مقایسه شده است که همبستگی آنها برابر ۹۷/۴٪ بوده است (۱۲).

بررسی انجام شده در آلمان روی سرم خانم های حامله همبستگی بین دو روش آگلوتیناسیون مستقیم وتست رنگی را ۹۹/۴۸٪ نشان داده است (۱۳).

نتایج حاصل از مطالعه ای که در اسپانیا روی نمونه های خون خشک شده روی کاغذ صافی از نظر پادتن توکسوپلاسما به روش آگلوتیناسیون مستقیم و الیزا انجام گرفت نشان داد که در بررسی های سرواپیدمیولوژی به روش آگلوتیناسیون مستقیم از نمونه های خون خشک شده نیز به خوبی می توان استفاده کرد (۸).

یکی دیگر ازمزایای روش آگلوتیناسیون مستقیم استفاده از آن در تعیین آلودگی حیوانات مختلف بدون نیاز به آنتی سرم کنژوکه اختصاصی هریک از آنهاست.

نتایج حاصل از این بررسی درتعیین میزان آلودگی گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه های زیاران واسلام شهر (۳۱/۱٪) با نتایج حاصل از مطالعات انجام شده در گوسفندان بومی سواحل دریای خزر به روش اسلاید لاتکس آگلوتیناسیون (۳۲/۵٪) خیلی نزدیک است (۱۱). از طرفی درنتایج بررسی انجام شده در اسپانیا در خوک با روش های ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم و آگلوتیناسیون مستقیم که به ترتیب ۳۲ و ۳۲/۳۴ درصد مثبت بوده است اختلافی مشاهده نمی شود (۴). روش آگلوتیناسیون مستقیم درتشخیص آلودگی های توکسوپلاسمایی درگاو به عنوان یک روش حساس و مناسب ذکرشده است. (۶)

باتوجه به نتایج این بررسی و مطالعاتی که در سایر کشورها روی سرم های انسانی و حیوانی انجام گرفته ، بنظر می رسد این روش برای بررسی های سرواپیدمیولوژی در انسان و سایر پستانداران بسیار مناسب باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله وظیفه خود می دانند از کلیه همکاران واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت که دراین بررسی صمیمانه همکاری داشته اند تشکر و قدردانی نمایند.

شترنگه ۱ - مقایسه نتایج تست های سرولوژی IFA و DA در ۲۵۱ نمونه سرم بیماران مشکوک به توکسوپلاسموز

عیار / روش آزمایش	منفی	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/۴۰۰	۱/۸۰۰	۱/۱۶۰۰	۱/۳۲۰۰	۱/۶۴۰۰	۱/۱۲۸۰۰	۱/۲۵۶۰۰	۱/۵۱۲۰۰	۱/۱۰۲۴۰۰	تعداد موارد مثبت	٪
IFA	۷۲	۳۵	۲۰	۴۱	۲۰	۳۹	۱۸	۶	-	-	-	-	۱۷۹	٪۷۱/۳
DA	۸۵	۱۸	۶	۲۱	۱۹	۲۹	۱۹	۱۹	۱۶	۹	۵	۵	۱۶۶	٪۶۶/۱

شترنگه ۲ - مقایسه فراوانی پادتن توکسوپلاسما با روش های IFA و DA دربیماران مشکوک به توکسوپلاسموز برحسب گروه سنی (عیار $\geq \frac{1}{100}$)

گروه های سنی (سال)	مورد آزمایش شده	IFAT				DAT			
		جمع موارد مثبت	SPR	GMRT		جمع موارد مثبت	SPR	GMRT	
< ۲	۶	۲	۳۳.۳	۱۹۹.۵		۳	۵۰	۱۹۹	
۲ - ۱۰	۳۰	۱۶	۵۳.۳	۴۱۵		۱۴	۴۶.۶	۱۵۸۴	
۱۱ - ۲۰	۴۵	۳۲	۷۱.۱	۶۰۲		۲۹	۶۴.۴	۲۵۵۲	
۲۱ - ۳۰	۸۴	۶۳	۷۵	۶۷۴		۶۳	۷۵	۲۵۶۷	
۳۱ - ۴۰	۴۲	۳۹	۸۰.۹	۴۴۱		۲۹	۶۹	۱۵۱۱	
۴۱	۲۷	۲۰	۷۴	۴۷۳		۱۸	۶۶.۶	۱۵۲۵	
ناشناس	۱۷	۱۲	۷۰.۶	۶۵۶		۱۰	۵۸.۸	۱۲۰۲	
جمع ≥	۲۵۱	۱۷۹	۷۱.۳	۵۵۴		۱۶۶	۶۶.۱	۱۹۱۱	

SPR=Sero - Positive Rate

GMRT = Geometric Mean of Reciprocal titer

درصد موارد مثبت سرولوژی

میانگین هندسی عکس عیارپادتن

شترنگه ۳ - میزان تطابق تست های سرولوژی IFA و DA با عیار $\geq \frac{1}{100}$ (درسرم بیماران مشکوک به توکسوپلاسموز)

DAT \ IFAT	+	-	جمع
+	۱۴۹ (٪۵۹/۴)	۱۷ (٪۶/۷)	۱۶۶ (٪۶۶/۱)
-	۳۰ (٪۱۱/۹)	۵۵ (٪۲۱/۹)	۸۵ (٪۳۳/۹)
جمع	۱۷۹ (٪۷۱/۳)	۷۲ (٪۲۸/۷)	۲۵۱ (٪۱۰۰)

٪۸۱/۳ = میزان تطابق

شترنگه ۴ - میزان تطابق تست های سرولوژی IFA با عیار $\geq \frac{1}{100}$ و DA با عیار $\geq \frac{1}{400}$ در سرم بیماران مشکوک به توکسوپلاسموز

DAT \ IFAT	+	-	جمع
+	۱۳۴ (٪۵۳/۳۸)	۸ (٪۳/۱۸)	۱۴۲ (٪۵۶/۵۷)
-	۴۵ (٪۱۷/۹۲)	۶۴ (٪۲۵/۴۹)	۱۰۹ (٪۴۳/۴۲)
جمع	۱۷۹ (٪۷۱/۳۱)	۷۲ (٪۲۸/۶۸)	۲۵۱ (٪۱۰۰)

٪۷۸/۹ = میزان تطابق

شترنگه ۵ - مقایسه نتایج آزمایش های پارازیتولوژی و سرولوژی در موش های با آلودگی تجربی برحسب زمان و عیار پادتن

مدت زمان آلودگی (روز)	تعداد موش های تلفیح شده	نتیجه پارازیتولوژی	تیترآنتی بادی به روش DA			
		تعدادموارد مثبت	۱/۱۶۲۰ - ۱/۵۴۰	۱/۸۰۰۰ - ۱/۴۰۰۰	۱/۱۶۲۰۰۰ - ۱/۵۴۰۰۰	
۴۳	۱۳	۱۳	۲	۹	۲	
۴۵	۷	۷	۱	۵	۱	
۴۶	۲	۲	-	۲	-	
۴۸	۶	۶	۱	۵	-	
۶۰	۳	۳	-	۳	-	
جمع	۳۱	۳۱	۴	۲۴	۳	

شترنگه ۶- توزیع فراوانی پادتن توکسوپلاسما گوندی ای در خون حیوانات اهلی به روش DA برحسب عیار

نوع حیوان	تعداد نمونه آزمایش شده	عیار پادتن							جمع	
		۱/۴۰	۱/۶۰	۱/۱۸۰	۱/۵۴۰	۱/۱۶۲۰	۱/۴۰۰۰	۱/۶۰۰۰	تعداد	درصد
گوسفند	۱۸۳	۳۱	۸	۵	۱	۱	۸	۳	۵۷	۳۱/۱
گاو	۹۴	۲۲	۷	۲	۱	-	-	-	۳۲	۳۴
بز	۱۶	۲	-	۱	۱	-	-	-	۴	۲۵

کتابنامه

۱- سرکاری ، بهادر (۷۰-۱۳۶۹): بررسی سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسموز در مراجعین به مراکز بهداشتی شهرستان کازرون. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس.

۲- صـــلاحی مقدم ، عبدالرضا (۷۳-۱۳۷۲): بررسی سرولوژی توکسوپلاسموز در مراجعین به درمانگاه های نمـــونه شهـــرستان ری با استفاده از روش IFA. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد انگل شناسی دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

3- Baufine - Ducrocq , H. ; Bourillet , B. ; Quillet , P. and Couzineau , P. (1983): Effect of 2-mercaptoethanol on immunoglobulin M in toxoplasmosis and rubella. Ann. Biol. Clin. Paris , 41: 337-40.

4- Desmonts , G. and Remington , J.S. (1980): Direct agglutination test of diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. J. Clin. Microbiol. 11: 562-568.

5- Desmonts , G. (1983) : Detection of toxoplasmosis by agglutination of parasites. Value of a very sensitive antigen in the search for specific immunoglobulins G. , Ann. Biol. Clin. Paris. 41: 139-43.

6- Dubey , J.P. ; Desmonts , G. ; McDonald , C. and Walls , K.W. (1985): Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma* gondii , Comparison of Sabin-Feldman dye test and other agglutination tests. Am. J. Vet. Res. 46: 1085-1088.

7- Frenkel , J.K. (1989):Toxoplasmosis in Tropical Medicine and Parasitology, Goldsmith , R. and Heyneman , D. Prentice - Hall International Editions.

8- Gascon , J. ; Torres - Rodriguez , J.M. and Gonzalez , C. (1989): Usefulness of total dry blood samples on filter paper in the detection of antitoxoplasma antibodies. Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 31: 100-102.

9- Ghorbani , M. ; Edrissian ; Gh. H. and Afshar , A. (1981): Serological survey of human toxoplasmosis in mountainous regions of the north-west and south - west parts of Iran. Tran. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 38-40.

10-Ghorbani , M. ; Edrissian , Gh. H. and Assad. N. (1978): Serological survey of toxoplasmosis in the northern part of Iran , using indirect fluorescent antibody techniqúe , 72: 369-371.

11-Ghorbani , M. ; Hafizi , A. ; Shegerfcar , M. T. ; Rezainan , M. ; Nadim , A. ; Anwar , M. and Afshar , A. (1983): Animal toxoplasmosis in Iran. J. Trop. Med. Hyg. 86: 73-76.

12-Hoghooghi-Rad , N. ; Afraa , M. (1993): Prevalence of toxoplasmosis in humans and domestic animals in Ahwaz , Capital of Khoozestan Province , South - west Iran , J. Trop. Med. Hyg. 96: 163-168.

13-Janitschke , K. ; Busch , W. and Kellershofen , C. (1988): Direct agglutination as a tool for *Toxoplasma* control in pregnancy. Immun. Infekt, 16: 189-191.

14-Moreno , T. ; Martinez-Gomez , F. and Hernandez - Rodriguez , S. (1985): Toxoplasmosis in pigs in Cordoba , Spain. Ann. Trop. Med. Parasitol. 79: 271-273.

15-Valtand , E. ; Lacroix , C. ; Rodier , M.H. ; Toullat , G. and Jacquemin , J.L. (1991): Critical study of Elisa technique and high sensitivity direct agglutination test for the screening of antitoxoplasma IgG. Ann. Biol. Clin. Paris. 49: 397-400.

16-Wilson , M. ; McAuley , J.B. (1991): Laboratory diagnosis of toxoplasmosis. Clin. Lab. Med. 11: 923-939.