بررسی ژن GRA6 در تفریق ژنوتیپ‌های *توکسوپلاسما گوندیی* با استفاده از روش PCR- RFLP در جنین‌های سقط شده گوسفندی منطقه اردبیل

غلامرضا شهبازی[۱]، ناصر حقوقی‌راد*[۱]، رسول مدنی[۲]، سعیده شجاعی[۳]

چکیده

توکسوپلاسما گوندیی تک یاخته درون سلولی ایزوسپورائی در حیوانات مهره دار خونگرم است که از نظر بهداشتی و اقتصادی برای انسان و برای حیوانات اهلی و وحشی اهمیت فراوانی دارد. مراحل تکاملی این انگل در دو میزبان طی می شود، بدین صورت که میزبان نهائی انگل گربه سانان هستند که اووسیست دفع می کنند . انسان و بسیاری از حیوانات به عنوان میزبان واسط تصادفی عمل می کنند و در اندامهای مختلف بدن آنان کیست نسجی تشکیل می شود. این انگل موجب سقط جنین در انسان و در برخی حیوانات علفخوار می شود. از آنجا که میزان آلودگی بره‌های سقط شده منطقه اردبیل به *توکسوپلاسما گوندیی* با روش PCR بیش از ۷۵ درصد بوده است و از طرفی تعیین ژنوتیپ‌های این تک یاخته از اهمیت ویژه ای برخوردار است به همین جهت از ژن GRA6 برای تعیین تیپ های انگل و پاتوژنیسته آن با روش PCR-RFLP در ۷۵ جنین سقط شده گوسفند مورد استفاده قرار گرفت، اما در هیچ کدام از آزمایشات ژن مزبور تکثیر نیافت و نتیجه مثبت حاصل نشد. در آزمایش زیست سنجی که با تزریق نمونه هایی از مغز جنین‌های سقط شده به موش‌های آزمایشگاهی صورت گرفت، هیچگونه آثاری از انگل توکسوپلاسما گوندیی مشاهده نشد. در نهایت چنین بنظر می‌رسد که در جنین‌های سقط شده ممکن است احتمالا بدلیل تعداد کم انگل توکسوپلاسما ژن GRA6 تکثیر نیا فت و نیز این بیماری بعلت وجود تیپ غیر حاد موشی *توکسوپلاسما* نقشی در سقط جنین گوسفندان اردبیل نداشته باشد.

واژگان کلیدی: *توکسوپلاسما گوندیی، GRA6، گوسفند، اردبیل، ایران.*

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۳

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی(*Toxoplasma gondii*) تک یاخته‌ای است از گروه اپی کمپلکسا که در سیتوپلاسم بسیاری از سلول‌های بدن جانوران پستاندار خونگرم مستقر وتکثیر می‌یابد. این تک یاخته علاوه بر انتقال از راه جفت و ایجاد سقط جنین در انسان و برخی حیوانات موجب ضایعات متعددی در افراد یا حیواناتی می‌شود که غیر از آلودگی مادرزادی به صورت اکتسابی آلوده می‌شوند.

اسپروزوئیت‌های آزاد شده از اووسیست در داخل روده و برادی زوئیت‌های آزاد شده از کیست نسجی از دیواره روده عبور و به محض رسیدن به خون توسط ماکروفاژها بلعیده می‌شوند. انگل در سیتوپلاسم ماکروفاژ تکثیر و موجب پاره شدن سلول می‌شود. انگل‌های آزاد شده یا تاکی زوئیتها به تمام قسمت‌های بدن میزبان رفته و وارد تمام سلول‌ها خصوصا سلول‌های سامانه عصبی بدن می‌شوند و موجب نکروز گردیده و ضایعات گسترده ای بوجود می‌آورند. گرچه مکانیسم بیماریزایی انگل بخوبی شناخته نشده است ولی تقسیم و تکثیر تاکی زوایت‌ها در داخل واکوئل پارازیتوفروس، ممانعت از بهم پیوستن فاگوزوم با لیزوزیم و اسیدی شدن فاگوزوم و نهایت مرگ سلول و ایجاد کانون‌های نکروزبخشی از علائم توکسوپلاسموز حاد را تشکیل می‌دهند (۸ و ۲، ۱).

توکسوپلاسموزیس بیشترین خطر را برای جنین در دو ماهگی آبستنی بوجود می‌آورد در حالی که آلودگی قبل از جفت‌گیری ممکن است خطر کمی را ایجاد کند. در گوسفندهای آبستن در طی ۲ هفته اول بعد از آلودگی با اووسیستها، تاکی زوئیت‌ها در داخل گردش خون به حرکت درآمده و در انتهای مرحله پارازیتمی آلودگی جنین را باعث می‌شوند(٤). همچنین ارگانیسم‌های شبه توکسوپلاسما از جفت و جنین سقط‌های

۱* – دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه انگل شناسی، تهران، ایران
(hoghooghiradnasser@yahoo.com)
۲ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه کلینیکال پاتولوژی، تهران، ایران
۳ـ گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی ، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران

نامشخص در نیوزلند جدا شده است که این عفونت «سقط جنین تیپ II نیوزلند» نامیده می شود. همچنین *توکسوپلاسماگوندیی* از مواد سقط جدا شده است و آن را یکی از عوامل اصلی سقط جنین گوسفند شناخته شده است (۸).

آلودگی ازطریق اووسیست بیشتر از آلودگی با تاکی زوایت و کیست‌های بافتی باعث ضایعات می‌گردد. بعد از بلع اووسیست میش‌ها ممکن است علائمی از قبیل اسهال، دیسترس تنفسی و ترشحات بینی داشته باشند ولی معمولا بعد از ١٤ روز بر طرف می‌شود.

نشانه‌های درمانگاهی و آسیب شناسی زمانی است که میش آبستن آلوده می‌گردد. تاکی زوئیت ها جفت را مورد حمله قرار داده و تورم آن همراه با تب شکل می گیرد. پیامد آلودگی(برای مثال جذب جنین، عقیمی، مومیایی شدن جنین، مرد ه زایی، سقط و تولد بره زنده) بستگی به مرحله آبستنی و دوز عفونی آلوده کننده دارد (۱۷ و ۸، ۵). ضایعات در جنین خیلی اختصاصی نبوده و شامل علائمی مثل ادم عمومی و تجمع مایعات در حفرات می‌باشد که ممکن است ناشی از مرگ جنین در داخل رحم باشد (۸). دلیل سقط جنین در توکسوپلاسموزیس به درستی مشخص نیست. ضایعات در جنین شدید نیستند و برخی از بره‌ها با ضایعات شدید به سلامتی متولد می شوند. احتمال عدم تعادل هورمونی در این بیماری ممکن است باعث سقط جنین بشود(۸).

حقوقی راد و افرا میزان آلودگی را با روش LAT در اهواز ۱۳/۸ (١٤)، قضایی در اردبیل با روش الیزا۳۰ (۱۲) و شریف در مازندران باروش IFA ۳۵٪ (۱۹) عنوان نمودند. در بررسی رهبری و همکاران میزان شیوع توکسوپلاسموزیس در گوسفندان در سه اقلیم مازندران با روش آگلوتاسیون مستقیم به ترتیب ٦٤/٣، ٥٤/٥ و ٤٩٪ بدست آمد(۳). احتمالا تفاوت اکولوژیکی و بعضی عوامل دیگر در این مناطق و در تغییرات میزان شیوع توکسوپلاسموزیس موثر است. در مطالعاتی که توسط رسولی و همکاران با استفاده از ژن B1 در خراسان انجام گرفت میزان آلودگی را در جنین‌های سقط شده ۱۳/۵در صد نشان دادند(۱۸). همچنین تحقیقی که توسط حبیبی و همکاران در قزوین در تعدادی از جنین‌های سقط شده انجام گرفت از تعداد ۱۸ جنین سقط شده با استفاده از ژن B1 در ۱۲ بره سقط شده آلودگی به توکسوپلاسما گوندی گزارش گردید.(۱۳) . مطالعات متعدد دیگری در کشور های دیگر انجام یافته از جمله ایتالیا ۱/ ۱۸(۱۷) اسپانیا ۲۳/۱ (۱۵) و آمریکا ۱۷/۵(۸) درصد میزان آلودگی را گزارش نمودند. .

نظر به اینکه *توکسوپلاسما* از نظر بیماریزایی به سه تیپ تقسیم می شود که عبارتند از: تیپ ۱ یا سوش RH که حادترین سویه است، تیپ ۲ که معمولا با دوره کمون طولانی‌تر و سیر بیماری ملایم‌تری طی می‌شود و با لاخره تیپ ۳ که عمدتا فاقد علائم بالینی است و برای موش غیر بیماری‌زاست به همین جهت تصمیم گرفته شد در منطقه‌ای که آلودگی به این انگل بیش از ۷۵٪ است (شهبازی و همکاران، مقاله زیر چاپ) از یک ژن گرانولار پلی مورفیک و آنتی ژنیک این انگل به نام GRA6 با روش PCR-RFLP استفاده شود (۱۱). تعیین بیماریزایی *توکسوپلاسما* در حیوانات منطقه و مشخص ساختن تیپ آن هم از نظر بیماری‌زایی و خسارات وارده و هم از نظر درمانی و مبارزه با انتشار آن حائز اهمیت فراوانی است(۹ و ۸، ۷، ۵).

استان اردبیل نیز با دارا بودن تعداد ۲۰۰۰۰۰۰ راس گوسفند یکی از قطب‌های دامپروری در کشور می‌باشد و در این میان شهرستان اردبیل به دلیل واقع شدن در دامنه سبلان به عنوان یکی از مناطق ییلاقی برای عشایر استان به حساب می‌آید که در اواسط بهار تا اواسط پاییز پذیرای قسمت عمده دام‌های عشایر استان می‌باشد. مرکز شهرستان اردبیل ١١٣٦ متر بالاتر از سطح دریا می باشد و جمعیت عشایری تا نزدیکی‌های قله سبلان به ارتفاع ٤٨٠٠ متر در در مناطق ییلاقی پراکنده می‌باشند. متوسط رطوبت سالانه این شهرستان ٥٦٪ می‌باشد وحداکثر و حداقل دمای هوا در مرکز شهرستان به ترتیب ۳۰ و۲۰- می‌باشد.

در حالت کلی روش PCR یک روش ساده، سریع، حساس و مقرون به صرفه بوده وبر روی نمونه‌های مختلف بالینی قابل انجام می‌باشد (۱۵ و ۱۰، ۹).

وقتی حجم نمونه کم باشد روش PCR روش مناسبی خواهد بود و وجود ۱ تا ۲ ارگانیسم در جواب دادن آزمایش کفایت می‌کند. همچنین در بافت‌هایی که دچار اتولیز می‌شوند نیز قابل انجام است(۱۶).

آنتی ژن های گرانولی یا GRA (granule antigens) از آنتی ژن‌های ترشحی هستند که هم در زمینه واکسن و هم در زمینه تشخیصی مهم می باشند. از میان آنتی ژن های دفعی ترشحی، آنتی‌ژن‌های گرانولی متراکم از اهمیت خاصی برخوردارند.

GRA6 یکی از انواع آنتی ژنهای مربوط به گرانولهای سخت GRA (dense granule antigens) در حقیقت مولکولهای مترشحه انگل *توکسوپلاسما گوندی* می باشند که به داخل واکوئل پارازیتوفروس (Parasitoplorous) ترشح می شوند. ترشح آنها به داخل واکوئل پارازیتوفروس بعد از تهاجم انگل به سلولهای میزبان اتفاق افتاده و مسئول بقاء انگل در داخل سلول‌های میزبان می‌باشند(٦).

ژن GRA6 در ژنوم توکسوپلاسما یکبار تکرار شده و ناحیه کد کننده این ژن برای تجزیه و تحلیل پلی مورفیسم در جمعیت توکسوپلاسما و تعیین ژنوتایپ سویه‌های توکسوپلاسما برای اولین بار توسط فضائلی و همکاران بررسی شده است (۱۱).

مواد و روش کار

از تعداد ۷۵ راس جنین سقط شده گوسفندی با اطلاع دادن سقط جنین گوسفندان توسط دامدار و یا آوردن جنین سقط شده تازه، پس از ضد عفونی کردن ناحیه جمجمه با الکل ۷۰٪ و جدا نمودن پوست از سر جنین، شکاف مناسب در جمجمه ایجاد کرده و با کمک پنس استریل مغز حیوان جدا شده و بعد از نوشتن مشخصات و اطلاعات لازم به فریزرمنتقل و تا ارسال آن به آزمایشگاه جهت جداسازی DNA و انجام PCR نگهداری شد. روش کار جداسازی DNA از مغز جنین های طبق دستوالعمل شرکت QIA GEN انجام گرفت وDNA در دمای۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

طراحی آغازگرها

پرایمرهای GRA6 بر اساس مقاله فضائلی و همکاران(۱۱) از شرکت سینا ژن سفارش و ساخته شد.

Forward 5`-GTAGCGTGCTTGTTGGCGAC-3´
Reverse 5`-TACAAGACATAGAGTGCCCC - 3´

آزمایش زیست‌سنجی در موش

از تعداد ۲۵ جنین نمونه‌های مغزی تهیه شد. جهت آماده‌سازی نمونه‌های مغز جنین جهت تلقیح به حیوان آزمایشگاهی از روش Beverley استفاده شد(٤).در این روش جهت آماده سازی نمونه‌های مغز حیوان ابتدا بعد از برش جمجمه با استفاده از تیغه اسکالپل پرده منژ را از روی مغز برداشته شد.

حدود ۲-۱ گرم از نمونه از مغز حیوان نمونه‌برداری شده و به داخل هاون چینی استریل منتقل گردید (هاون چینی قبل از استفاده با پوشانده فویل آلومینیوم وبه کمک فور به مدت یکساعت در ۱۲۰ درجه سانتیگراد استریل شد).

نمونه‌های مغز را به کمک دسته‌ها و در مجاورت شعله کاملا له نموده و سپس با کمک سرم فیزیولوژیک استریل یک سوسپانسیون ۲۰٪ تهیه نمودیم. سوسپانسیون حاصله را با استفاده از سرنگ ۵ میلی لیتری چند بار کشیده و تخلیه نموده تا ذرات بافتی کاملا خرد شوند. به سوسپانسیون حاصله آنتی بیوتیک (۱۰۰۰ واحد پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین به ازای هر میلی لیتر) اضافه گردید.

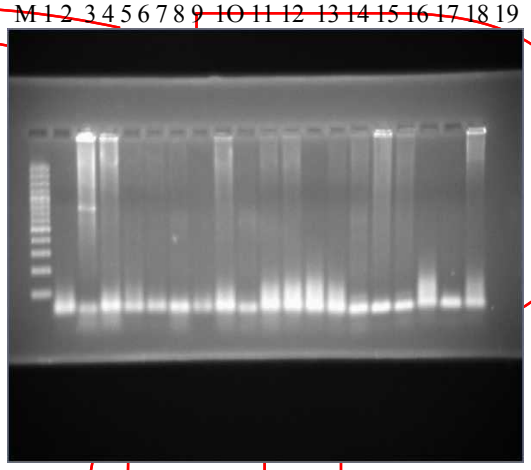
از نمونه آماده شده حدود یک میلی لیتر به موش سوری به صورت داخل صفاق تزریق شد. موش‌های تلقیح شده تا ۲ ماه تحت نظر بودند. موش‌هایی که بعد از تلقیح مردند از نظر وجود تاکی زوایت در اگزودای صفاقی بررسی شدند ولی موش‌هایی که زنده ماندند و فعالیت طبیعی داشتند، ۸ هفته پس از تلقیح از قسمت‌های مختلف آن مقاطع پاتولوژیک تهیه شد

و از نظر کیست‌های نسجی توکسوپلاسما مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج آزمایش PCR با استفاده از ژن GRA6 روی مغز جنین های گوسفندی سقط شده

از نمونه های DNA استخراج شده آزمایش PCR با تکثیر GRA6 انجام گرفت که در هیچ کدام از نمونه‌ها باند مورد نظر مشاهده نگردید(نگاره ۱)



نگاره ۱- الکتروفورز محصول pcr (GRA6) بر روی ژل آگارز یک درصد. M مارکر (۱۰۰bp)، ستون یک کنترل منفی،ستون ۲ کنترل مثبت، ستون ۱۹-۳ نمونه‌های منفی

نتایج آزمایش زیست سنجی در موش‌های سفید

در طی آزمایش ٦ موش سفید در هفته های اول و دوم تلف شدند که بعد از تهیه مایع صفاقی یک قطره از آن روی سطح یک لام تمییز قرار داده شدو با لامل پوشیده شد و با درشت نمایی X٤٠ از نظر وجود تاکی زوایت بررسی گردید و وقتی که تاکی زوایت در گسترش مستقیم مشاهده نشد تمام مایع صفاقی به روش تغلیظ بررسی شد. بدین ترتیب که مایع صفاقی به داخل لوله آزمایش تمیز و استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ rpm در دمای آزمایشگاه سانتریفوژگردید. رسوب حاصل از سانترفوژ با حداکثر ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیو لوژیک بصورت سوسپانسیون در آمد. قطره ای از سوسپانسیون بر روی لام قرار داده واز نظر وجودتاکی زوایت‌های توکسوپلاسما بررسی میکروسکپی شد.نتیجه بررسی ها منفی بود زیرا هیچ تاکی زوایتی مشاهده نگردید.در مقاطع پاتولوژیک تهیه شده از مغز موش‌ها نیز در هیچیک از اسلایدها کیست نسجی مشاهده نشد.

بحث

نتایج آزمایشات نشان می‌دهند که علیرغم میزان بالای آلودگی جنین‌های سقط شده به توکسوپلاسما که با روش PCR با قطعه ۵۲۹bp (شهبازی و همکاران، اطلاعات منتشر نشده)صورت گرفته بود حتی تزریق نمونه های مغزی ۲۵ جنین سقط شده به موش‌های سفید آزمایشگاهی انگل منتقل نشد و بررسی مقاطع کورتیکال مغز موش‌های مزبور از نظر وجود کیست‌های نسجی منفی بود.

استفاده از ژن GRA6 نیز بیشتر به منظور مشاهده وجود آن در توکسوپلاسما و نقش مهم آن در تعیین قدرت آنتی ژنیسته انگل بوده است. ناحیه کد کننده GRA6 در مقایسه با سایر ژن‌های کننده توکسوپلاسما که تاکنون مورد ازمایش قرار گرفته‌اند به طور قابل توجهی پلی مورفیسم بیشتر و مکان قابل تغییر فراوانتری را نشان می‌دهد. توانایی ژن GRA6 در تفریق سه تیپ ۱و۲و۳ و خصوصا تیپ ۳ که نزدیکتر به گروه تجمعی تیپ ۱ می‌باشد قابل توجه است. در حقیقت معلوم شده که تیپ ۳ توکسوپلاسما مجموعه‌ای از آلل‌های تیپ ۳و۱ (سوش‌های حاد و غیر حاد برای موش) می‌باشد(۱۱).

بر اساس ویژگی‌های پلی مورفیسم نوکلئوتیدیGRA6 به خوبی می‌توان سه تیپ ۱و۲و۳ توکسوپلاسما را با استفاده از واکنش PCR و استفاده از آنزیم هضمی اندونوکلئاز Mse1 از یکدیگر تفریق داد. به عبارت دیگر GRA6 یک کپی دارد (single copy) و در مقایسه با سایر مارکر های مورد استفاده مارکری ساده بشمار می‌آید، مثلا ژن B1 برای تعیین

ژنوتیپ‌های توکسوپلاسما مناسب نیست. این ژن ۳۵-۳۰ کپی و ژن 529bp ۳۰۰-۲۰۰ کپی دارد (۱۱). یا برای استفاده از ژن SAG2 باید دو آنزیم هضمی و دو روش PCR بکار برد، در حالی که با استفاده ازژن GRA6 در صورتی‌که تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما زیاد باشند و یا در محیط کشت توکسوپلاسما به خوبی تکثیر یافته و زیاد گردند تنها با استفاده از یک آنزیم با روش ساده PCR می‌توان نتایج مطلوب را بدست آورد. علیرغم مطالب بالا باید اذعان کردکه هنوز مسائل زیادی در مورد این ژن وجود دارد که نیاز به بررسی‌های بیشتری در آینده است.

در آزمایش‌های انجام شده تکثیر ژن GRA6 در هیچیک از موارد دیده نشد. احتمالا این امر نشان دهنده این است که اگر چه توکسوپلاسما ممکن است در جنین‌های سقط شده وجو داشته باشد ولی به خاطر تعداد کم آن نمی‌تواند دلیل سقط جنین‌های گوسفند محسوب گردد.

همانگونه که در موش‌های تلقیح شده نیز تقریبا واکنشی ایجاد نشد و هیچ‌گونه کیست نسجی در مغز موش‌ها و حتی در مغز جنین‌های سقط شده مشاهده نگردید (شهبازی و همکاران، اطلاعات منتشر نشده). نتیجه نهایی آنکه علیرغم مزایای آنتی ژن پلی مورفیک نوکلئوتیدی GRA6 نمی‌توان از این ژن را برای مطالعات اپیدمیولوژیک و یا موضوعاتی مانند بررسی حاضر مورد استفاده قرار داد بلکه لازم است با استفاده از روش زیست سنجی ابتدا به تکثیر توکسوپلاسما در حیوان آزمایشگاهی پرداخت و سپس با کمک ژن GRA6 ژنوتیپ‌های انگل را مشخص ساخت.

فهرست منابع

۱- ادریسیان، غ.، رضائیان، م.، قربانی، م.، کشاورز، ح، محبعلی، م.(۱۳۸۵): تک یاخته شناسی پزشکی، چاپ اول ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران ایران: ۱۴۰-۱۵۹.

۲- اصلانی، م.(۱۳۸٦): سقط جنین در گوسفند عوامل اصلی و تشخیص آن، چاپ اول، قطب علمی مطالعات سقط جنین و مرگ و میر نوزاد دام های نشخوارکننده، مشهد، ایران: ۱-٤۷.

۳ – رهبری، ص.، رزمی، غ.، نوروزیان، ایرج.(۱۳۷٤): بررسی سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسموز در گوسفندان استان مازندران، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵(۱-۲):۳۹-٤۹.

4. Beverly, J.K.A. (1960): The laboratory diagnosis of toxoplasmosis. In: recent advances in clinical pathology, 3rd Series (Ed. Dyke S.C). Churchill, London; 44.
5. Buxton, D., Maley, S.W., Wright, S.E., Rodger, S., Bartlry, P., Innes, E.A. (2007): Toxoplasma gondii and ovine toxoplasmosis, new aspect and old history. Vet. Parasitol. 149: 25-28.
6. Cesborn-Delaw, M.F., Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Capron, A. (1993): Dence granule antigens of Toxoplasma gondii. In: Toxoplasmosis, 2nd edition(Ed. Smith J). Springer- Verlage, Berlin:33-42.
7. Dubey, J.P. (2009): Toxoplasmosis in sheep-the last 20 year.Vet. Parasitol. 163: 1-14
8. Dubey, J.P., Beattie, C.P.(2010):Toxoplasmosis of humans and animals 2 th edition. CRC press, florida.p:1-98
9. Dubey, J.P., Jones, J. (2008): Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States. Int . J. Parasitol. 38: 1257–1278.
10. Esteban-Redondo, I., Maley, S.W., Thomson, K., Nicoll, S., Wright, S., Buxton, D., Innes, E.A. (1999): Detection of Toxoplasma gondii in tissues of sheep and cattle following oral infection.Vet.parasitol.86:155-171.
11. Fazaeli, A., Carter, P.E., Darde, M.L., Penington, T.H. (2000): Molecular typing of Toxoplasma gondii strains by GRA6 gene sequence analysis.Int.J. Parasitol.30:637-642.
12. Ghazaei, C. (2006): Serological survey of antibodies to Toxoplasma gondii. Afr. J. Health Sci. 13: 131–134.
13. Habibi, GR., Imani, A.R., Gholami, M.R., Hablolvarid, M.H., Behroozikhah, A.M., Lotfi, M., Kamalzade, M.E., Najjar, E.K., Esmaeil-Nia, K., Bozorgi, S. (2012): Detection and Identification of Toxoplasma gondii ,Type One Infection in Sheep Aborted Fetuses in Qazvin Province of Iran .Iranian. J. Parasitol. 7 (3):64-72.

14. Hoghooghi- rad, N., Afraa, M. (1993): Prevalence of toxoplasmosis in human and domestic animals in Ahwaz, capital of khoozestan province,south-west Iran. J. Trop. Med. Hyg. 96:163-168.
15. Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., Garcia-Perez, A.L. (2001): Single tube nested PCR for the detection of Toxoplasma gondii in fetal tissues from naturally aborted ewes. Vet. Parasitol. 102: 17–27
16. Jennifer, A.H., Linda, K.J., Mark, M.T., Timothy, J. (1995): Specifity of polymerase chain reaction identification of Toxoplasma gondii infection in parafiin - embedded animal tissues. J. Vet. Diag. Invest. 7: 275- 278.
17. Masala, G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, G., Patta, C., Tola, S. (2007): Detection of pathogens in ovine and caprine abortion sample from Sardinia Italy by PCR. J.Vet. Diag. Invest.19: 96 – 98.
18. Rassouli, M., Razmi, G.R., Bassami, M.R., Movassaghi, A.R., Azizzade,M.(2011): Study on ovine abortion associated with Toxoplasma gondii in affected herds of Khorasan Razavi Province, Iran based on PCR detection of fetal brains and maternal serology. Parasitol. 138: 691–697.
19. Sharif, M., Gholami, S. H. (2006): Seroprevalence of Toxoplasma gondii in cattle, sheep and goat slaughtered for food in mazandaran province. Iran. J. Animal . Vet. Advances. 5(3):188-190.