

بررسی ایجاد مقاومت علیه توکسو پلاسموزیس در مدل حیوانی با استفاده از آنتی ژنهای سطحی تاکی زوئیت توکسو پلازما گوندی

بهروز عزت پور¹، بهزاد حق پناه²، سید حسین حجازی³، زهرا غیور⁴، علیرضا عندهلیب⁵

- 1- مربی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
- 2- استادیار، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- 3- دانشیار، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- 4- مربی، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- 5- دانشیار، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

یافته / دوره دهم / شماره 4 / زمستان 87 / مسلسل 38

دریافت مقاله: 87/8/17، پذیرش مقاله: 88/1/29

Ø مقدمه: توکسوپلازما گوندی یک انگل بیماریزای منتقله از راه غذا است که از طریق مصرف گوشت و عمدتاً گوشت گوسفند و خوک آلوده - بوسیله اوسیست های دفع شده در مدفوع گربه، انسان را آلوده می سازد. آلودگی در انسان می تواند باعث ناهنجاریهای جنینی شدید، گرفتاریهای چشم ویا آنسفالیت گردد. ابتلا به توکسوپلاسموزیس در دوران حاملگی خصوصاً در دام اغلب منجر به سقط و لطمات اقتصادی قابل ملاحظه ای خواهد شد. هدف از این مطالعه بررسی این نکته است که آیا ایمونیزاسیون بوسیله آنتی ژنهای سطحی توکسوپلازما گوندی می تواند باعث محافظت موش در برابر عفونت با این انگل شود؟

Ø مواد و روش ها: جهت انجام برنامه ایمن سازی از سویه بسیار بیماریزای RH در مطالعه استفاده شد. آنتی ژنهای سطحی تاکی زوئیت ها که در محیط کشت تکثیر یافته بودند با استفاده از MEGA-10 - یک دترجنت غیر یونیک - جدا شدند. گروههای 17 آتایی موشهای نر به دو صورت داخل صفاقی و زیر جلدی به فواصل ده روز، دو بار این آنتی ژن را دریافت کردند. 21 روز پس از دریافت آخرین دوز، نمونه خون نیمی از موشها جهت انجام آزمایش IFAT گرفته شد و باقیمانده موشها تعداد 2000 تاکی زوئیت زنده و فعال سوش کشنده RH را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

Ø یافته ها: نتایج حاکی از افزایش تیتراژ آنتی بادی بعد از برنامه ایمونیزاسیون بود ($p < 0/05$). نتایج بقای موشها پس از انجام آزمایشات (challenge) نیز نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروههای آزمایش (IP, ID) با گروه شاهد بود ($p < 0/05$).

Ø بحث و نتیجه گیری: ادجوانت ها نقش مهمی را در برنامه های ایمن سازی ایفا می کنند. در هر صورت استفاده از ادجوانت های مناسب از قبیل ISCOM مجموعه های محرک سیستم ایمنی (Immune Stimulating Complexes) و پروتئین های سطحی تاکی زوئیت توکسوپلازما گوندی از قبیل P30 برای تحریک بهتر پاسخهای ایمنی سلولار و طبیعی پیشنهاد می گردد.

Ø کلید واژه ها: ایمونیزاسیون، آنتی ژنهای سطحی، تاکی زوئیت، توکسو پلازما گوندی، MEGA-10

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

پست الکترونیک: ezatpourb@yahoo.com

مقدمه

توکسو پلازما گوندی از مدت‌ها پیش به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در موارد تضعیف سیستم ایمنی ناشی از ابتلا به ایدز یا پیوند اعضا و نیز به عنوان عامل تهدید کننده سلامت انسان و دام مطرح بوده است. افزایش روز افزون موارد ابتلا به ایدز و نیز بالارفتن توانایی مراکز درمانی کشور در زمینه پیوند اعضا، محدود کردن خطر ابتلای این دسته از افراد و پیشگیری از این بیماری باز پدید را بیش از پیش خاطر نشان می‌سازد. همچنین برای جلوگیری از صدمات وارده این انگل به صنعت دامپروری، تحقیقات لازم در زمینه ایجاد ایمنی زایی ضروری به نظر می‌رسد. فازحاد بیماری، به واسطه فعالیت پاتولوژیک فرم فعال انگل یعنی تاکی زوئیت‌ها بروز می‌کند. پاسخ ایمنی هومورال شامل IgG، IgM، IgE، IgA باعث حذف پارازیتی و تشکیل کیست‌های نسجی و مزمن شدن عفونت می‌شوند. این آنتی بادیها کاربرد بالینی جهت تشخیص توکسو پلاسموز دارند. به نحوی که توکسو پلاسموز بطور رایج، پس از تشخیص کلینیکی توسط آزمایشهای¹ IFAT و ELISA تایید می‌شود(1).

پروتئینهای سطحی پاتوژنهای داخل سلولی، اولین محل برخورد با سیستم ایمنی میزبان می‌باشند بنابراین آنتی بادیهای ساخته شده علیه آنها اولین رخداد پس از عفونت هستند. این پروتئینها دارای چندین عملکرد مهم از جمله چسبیدن به غشا سلول میزبان و محافظت انگل از پاسخ کشنده ایمنی هستند(2).

در توکسو پلازما گوندی سطح تاکی زوئیت‌ها بوسیله آنتی ژنهایی از جنس گیلکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول پوشیده شده که مهمترینشان تقریباً دارای اندازه‌هایی در محدوده 22 تا 43 کیلودالتون می‌باشند(3).

تعدادی از این آنتی ژنهای توکسو پلازما گوندی پاسخ های آنتی بادی بالایی را در حیوانات آلوده و انسان ایجاد می‌نمایند، بنابر این در مصارف تشخیصی و یا در تهیه واکسن می‌توانند بکار روند(4). مطالعات بر روی موش (5) و بر روی انسان (6) همچنین مشخص ساخت که اولین پاسخ ایمنی پس از عفونت مستقیماً علیه یکی از پروتئینهای سطحی تاکی

زوئیت بنام P21 آغاز می‌شود. در مطالعه حاضر از آنتی ژنهای سطحی تاکی زوئیت های توکسو پلازما گوندی که بوسیله MEGA-10 جدا گردیده جهت ایمونیزاسیون استفاده می‌شود. Decanoyl-N-methylucamide یا MEGA-10 یک دتر جنت غیر یونی است که جهت جدا سازی پروتئینهای سطحی میکروارگانیزمها مطرح شده و بکار می‌رود. هدف از این تحقیق بررسی اثر آنتی ژنهای سطحی تاکی زوئیت توکسو پلازما گوندی در تحریک سیستم ایمنی و ایجاد مقاومت در برابر چالش با سوش بسیار بیماریزای RH توکسو پلازما گوندی بود.

مواد و روشها

تاکی زوئیت‌های سویه RH از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 تکثیر گردیدند. تاکی زوئیت های حاصله قبل از افزودن MEGA-10 با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند.

جداسازی پروتئینهای دیواره تاکی زوئیت و تهیه آنتی ژن: رسوب حاصله از کشت، سه بار با ² PBS استریل شستشو و سانتریفیوژ گردید و در مرحله آخر، رسوب با 10 سی سی PBS استریل مخلوط شد و یک سوسپانسیون 25% درصد MEGA-10 از آن تهیه شد.

سوسپانسیون مورد نظریه مدت 30 دقیقه در دمای محیط، نگهداری شده، سپس به مدت 15 دقیقه در دور 2000g سانتریفیوژ شد و مایع رویی جدا و با همان دور سانتریفیوژ محلول رویی مجدداً جدا گردید (7) و میزان پروتئین آن با روش اسید سولفو سالیسیلیک اندازه گیری شد.

به هر یک از موشها 85 میکرو گرم از آنتی ژن به اضافه 120 میکرو لیتر PBS استریل که با ادجوانت ناکامل فروند نسبت به (1:1) امولسیونه گردیده بود تزریق گردید.

شرایط انتخاب نمونه: جهت تحقیق حاضر موشهای نر BaIb/c با سن 25-15 هفته از لانه حیوانات دانشگاه اصفهان انتخاب گردیدند و از نظر آلودگی به توکسو پلازما مورد آزمایش قرار گرفتند. 17 عدد جهت گروه زیر جلدی³ (ID)،

1. Indirect Fluorescent Antibody Test
2. phosphate buffered saline
3. ID: Intradermal

17 عدد جهت گروه داخل صفاقی¹ (IP) و 5 عدد جهت گروه شاهد انتخاب شدند. تعداد نمونه، با توجه به تجربی بودن آزمایش و بررسی مطالعات قبلی انجام پذیرفت. در تمام طول تحقیق مسائل اخلاقی برای حیوانات رعایت گردید.

ایمو نیزاسیون: آنتی ژن تهیه شده به مقدار 200 میکرو لیتر حاوی پروتئین جدا شده از تاکی ژوئیت محلول در PBS و ادجوانت غیر کامل فرونت به هر موش از گروههای آزمایش تزریق گردید. 17 عدد موش، آنتی ژن فوق را بصورت ID، 17 عدد دیگر آنتی ژن فوق را بصورت IP دریافت کردند. گروه شاهد منفی نیز مقدار 120 میکرو لیتر PBS و ادجوانت غیر کامل فرونت دریافت نمود.

بعد از 10 روز از تزریق اولیه مجدد 200 میکرو لیتر آنتی ژن به شیوه مرحله اول به عنوان یاد آور در موشهای IP بصورت داخل صفاقی و در موشهای ID به روش زیر جلدی تزریق شد و در قفس های جداگانه قرار داده و علامت گذاری شد.

نمونه گیری از موشهای گروه آزمایش: سه هفته پس از تزریق یاد آور و پس از تکمیل پاسخ ایمنی، از موشهای ایمن شده در گروههای آزمایش IP، ID، به منظور بررسی میزان آنتی بادی تشکیل شده، بیهوش و خونگیری از قلب آنها جهت تهیه سرم انجام گرفت. سرم نمونه های فوق جمع آوری و در 20- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

تشخیص تیتراژ آنتی بادی اختصاصی گروههای شاهد و آزمایش به روش IFAT: سرم های جمع آوری شده با استفاده از آنتی گلوبولین موش (DAKO.F 0479) به روش IFAT و با استفاده از تاکی ژوئیت لیوفیلیزه (شرکت بهار افشان) از نظر تیتراژ اختصاصی علیه توکسوپلاسمما گوندی با بکارگیری میکروسکوپ ایمونوفلورسانس بررسی گردیدند.

بررسی مقاومت علیه آلودگی با سویه RH در موشهای ایمن شده و شاهد: گروههای ایمن شده (ID، IP) و شاهد بوسیله 2000 عدد تاکی ژوئیت زنده و فعال سویه کشنده RH توکسوپلاسمما گوندی از طریق داخل صفاقی آلوده شدند (7). پس از این مرحله، گروههای ID، IP و شاهد در قفس های جداگانه ای قرار داده شدند و هر روز به آنها سرکشی می شد و از نظر وجود زخم و یا حالت های غیر عادی بررسی می شدند و چنانچه هر کدام از موشها می مرد، به آزمایشگاه انتقال داده

می شد و مایع صفاقی آنها را به روش استریل جمع آوری کرده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود تاکی ژوئیت زنده، مورد بررسی قرار می گرفتند.

یافته ها

نتایج ایمنی و مقاومت ایجاد شده: جهت بررسی اینکه آیا برنامه ایمونیزاسیون منجر به ایجاد مقاومت در موشهای تحت بررسی شده یا خیر به آنها تعداد 2000 تاکی ژوئیت زنده و فعال سوش کشنده RH به صورت داخل صفاقی تزریق شد (8) و تا 10 روز از نظر زنده ماندن تحت کنترل قرار داده شدند. نتایج تحقیق توسط آزمونهای آماری Oneway ANOVA و Post Hoc Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج IFAT: میانگین تیتراژ آنتی بادی اختصاصی بر علیه توکسوپلاسمما گوندی در گروه شاهد 1:80 بود این میزان برای گروه (ID) برابر با 1:1371، و برای گروه (IP) 1:1051 بود. این نتایج حاکی از اختلاف معنی دار بین گروههای آزمایش (ID، IP) با گروه شاهد می باشد ($p < 0/05$). ولی بین گروههای آزمایش با یکدیگر (ID، IP) اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0/05$)

نتایج بقا: میانگین بقای موشهای گروه شاهد برابر 5 روز بود که این ایام برای موشهای گروه ID برابر با 8/6 روز و برای موشهای گروه IP 8 روز بود. این نتایج نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروههای آزمایش (IP، ID) با گروه شاهد می باشد ($p < 0/05$)، ولی بین گروههای آزمایشی با یکدیگر (IP با ID) اختلاف معنی داری در مدت زنده ماندن پس از challenge مشاهده نشد ($p > 0/05$).

بنابراین ایمنی زایی با آنتی ژنهای سطحی تاکی ژوئیت منتج به مقاومت نسبی در برابر مرگ ناشی از عفونت با تاکی ژوئیت های توکسوپلاسمما گوندی در موشهای هر دو گروه آزمایش (IP، ID) شد.

در حالی که در روز پنجم تمامی موشهای گروه شاهد مردند ولی در این روز تمامی موشهای ایمن شده زنده بودند و

1 . IP: Intrapretoneal

75% موشهای گروه زیر جلدی و 43% موشهای گروه داخل صفاقی تا روز نهم پس از عفونت زنده ماندند (جدول شماره 2).

بحث و نتیجه گیری

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر آنتی ژن های سطحی توکسوپلاسمما گوندی در تحریک سیستم ایمنی و ایجاد مصونیت محافظت کننده با استفاده از MEGA-10 در برابر چالش با یک سویه بسیار بیماریزای توکسوپلاسمما گوندی بود. از آنجایی که برای مقابله با این عفونت یا باید میزبان نهایی (گره) را واکسینه نمود، که به علت فقدان واکسن موثر و نیز تعداد بسیار زیاد گره ها، فراوانی گره های ولگرد و عدم دسترسی به همه آنها این اقدام عملی نیست و یا ایمن سازی بر روی میزبانان واسط متمرکز شود که انجام این اقدام عملی است. به همین خاطر بیشتر تحقیقات در زمینه مصون سازی میزبانان واسط صورت گرفته است. راه ورود آنتی ژن به بدن می تواند تعیین کننده مسیر فعالیت سیستم ایمنی باشد (9). به طوری که مثلاً تزریق داخل وریدی یک آنتی ژن القاء تولرانس آن را ایجاد نمی نماید. در صورتی که تزریق زیر جلدی و یا داخل صفاقی آن فرصت دخالت کافی را به سلول های عرضه کننده آنتی ژن (APC) جهت ایجاد ایمنی می دهد (10).

مقایسه بین تیتراآنتی بادی اختصاصی در گروههای IP، ID و مشاهده افزایش کمتر تیترا آنتی بادی در گروه ID می تواند به این دلیل باشد که در روش زیر جلدی آنتی ژن بهتر و بیشتر در معرض سیستم ایمنی قرار گرفته و زمان روبرو شدن سلولهای دستگاه ایمنی با آنتی ژن در این روش بیشتر از روش داخل صفاقی بوده است و در شرایط یکسان گمان می رود که آزادسازی آنتی ژن در روش زیر جلدی از روش داخل صفاقی آهسته تر باشد.

با آنکه در این تحقیق افزایش تیترا، در گروههای آزمایش نسبت به گروههای شاهد مشاهده شد، ولی این افزایش قابل توجه نبود زیرا در شرایط عادی در موجودات مبتلا به توکسوپلاسموزیس تیترا تا 1/12800 هم می رسد. دلیل آن می تواند به این علت باشد که ادجوانت غیر کامل فروند امکان آزاد سازی آنتی ژنهای تاکی زوئیت را برای مدت طولانی نداشته است.

در آلودگی به توکسوپلاسموزیس، پاسخ ایمنی غالباً سلولی است و ادجوانت غیر کامل فروند در تحریک ایمنی سلولی تعیین کننده نیست و نتوانسته است کمک شایانی در بالا بردن سطح ایمنی در برابر این تک یاخته نماید. در مطالعه حاضر تیترا گروه شاهد 1/80 بود که می توان علت این امر را قرابت آنتی ژنیک توکسوپلاسمما گوندی با سویه موشی توکسوپلاسمما و یا سایر کوکسیدباهای موجود در بدن موشها دانست (2، 11، 12).

مرگ ومیر موشهای ایمن شده را می توان به دلایلی چون عدم فعال شدن ایمنی سلولی و مرگ موجودات آلوده به سویه RH در اثر ترشح توکسین توسط انگل دانست. احتمال دارد MEGA-10 نتوانسته باشد توکسین های فوق را به مقدار کافی از تاکی زوئیتها جمع آوری نماید و باعث ایمنی زایی کافی در هنگام challenge شود.

لوندن و همکاران در تحقیق مشابهی، البته با استفاده از (Immune Stimulating Complexes) ISCOM مقاومت موشها را در برابر سویه RH بررسی کردند و مشاهده نمودند که با اینکه موشهای گروه کنترل در بین روزهای نهم تا دوازدهم پس از عفونت مردند ولی موشهای گروه آزمایش، مرگ میر آنها در روزهای دوازدهم تا بیست و پنجم اتفاق افتاد (13). البته در تحقیق آنها، ایمونیزاسیون تنها از طریق زیر جلدی و در سه نوبت شش هفته ای صورت گرفته بود. در کار آنان همانند ما، تمامی موشها پس از challenge، بیمار شدند و کیست های نسجی در مغز آنها مشاهده شد. کورنر و همکاران (14) و اوگلا و همکاران (15) نیز به نتایج مشابهی، البته با ISCOM دست یافتند. تحقیقات در این زمینه و بر روی گوسفند و با به کار گیری ISCOM نیز به نتایج مشابهی ختم شد (7).

برخلاف سایر جوندگان از قبیل موش و هامستر، رت ها مقاوم به توکسوپلاسمما گوندی هستند (16). در این میان رت های فاقد تیموس (nude; nu.nu) در مواجهه با تعداد 1000 عدد تاکی زوئیت سویه RH توکسوپلاسمما گوندی زنده نمی مانند، ولی همین رت های فاقد تیموس چنانچه لنفوسیت های موجود در غدد لنفاوی را دریافت کنند، نسبت به عفونت توکسوپلاسمایی مقاوم خواهند شد. علت این مقاومت را سطح

بالای آنتی بادیهای اختصاصی توکسوپلازما دانسته اند (17). این امر نقش مهم سلولهای T را در مقابل رت های فاقد تیموس نسبت به عفونت توکسوپلازما را خاطر نشان میسازد و اینکه این سلول باعث القای تولید آنتی بادی هایی می شوند که در محافظت جانور مشارکت دارند (18).

در انسان سالم، عفونت به توکسوپلازما باعث ایجاد یک ایمنی مادام العمر بر علیه عفونت مجدد می شود (19) که دلالت بر تحریک موثر پاسخ ایمنی در طول اولین عفونت دارد. در این مطالعه، بر همین اساس، کوشش شد تا با استفاده از آنتی ژنهای سطحی، سیستم ایمنی موشها وادار به تحریک شود.

سه مطالعه (20, 21, 22) نقش قابل ملاحظه آنتی ژنهای سطحی و سیتوپلاسمی را در تولید ایمنی تشریح نموده اند. همچنین Darcy و همکارانش در مطالعه خود از یک ساختمان پپتیدی مشتق شده از آنتی ژن P30 توکسوپلازما- که دارای ایمونوژنسیته بالایی می باشد- استفاده کردند و محافظت نسبی را در رت ها و موشهای دریافت کننده پپتید P30 48-67MAP مشاهده کردند. آنها در تحقیق خود جهت چالش challenge، سویه نسبتاً ویرولان 76K را بصورت oral بکار برده بودند و مشخص شد که 40 درصد موشها، دو برابر گروه کنترل، بعد از عفونت زنده ماندند (23).

شیوع سرمی بالای آنتی ژن P30 در سرم افراد مبتلا به توکسوپلاسموزیس، آنتی ژن P30 را بعنوان یک کاندید مناسب جهت آزمونهای سرولوژیک توکسوپلازما گوندی مطرح ساخته است (24).

خان و همکارانش با بکار بردن P30 به همراه ادجوانت ساپونین کوپل A به محافظت بسیار بالای موشهای تحت مطالعه در مقابل عفونت توکسوپلاسمایی دست یافتند، بدون

اینکه در مغز موشها مدرکی دال بر حضور انگل بیابند. البته اهمیت ادجوانت مناسب را نبایستی نادیده گرفت، چرا که P30 به تنهایی اثر محافظتی را در موشهای out bred CDI و یا موشهای inbred نژاد های A/J یا C57BL/6 نشان نداد. همینطور در ترکیب با ادجوانت کامل فروند، اثر محافظت کننده ای در موشهای baIb/c ندارد (25).

در تحقیقاتی که در زمینه ایمونیزاسیون توکسوپلازما گوندی بعمل می آید، چنانچه بتوان به واکسنی (آنتی ژنی) دست یافت که قادر به جلوگیری از پارازیتی و مانع از تجمع انگل در بافت ها شود، می توان امیدوار بود که توکسوپلاسموزیس مهار شده و یا باعث کاهش انتقال این بیماری از طریق فرآورده های حیوانات شود. این امید می رود که با تحقیقات بیشتر بر روی آنتی ژنهای سطحی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی و با آزمون مقادیر مختلف پروتئین (آنتی ژن) و به کار گیری ادجوانت های مناسب به این مهم دست یافت.

در نهایت آنچه را که نویسندگان به محققین بعدی پیشنهاد می نمایند، بالا بردن سطح محافظت با استفاده از سایر ادجوانت ها و به کار گیری مقادیر متفاوت از آنتی ژنها می باشد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی میگردد. همچنین از زحمات سرکار خانم لیلیا کولیوند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

1. Lloyd H; Kasper. Toxoplasma infection; In: Fauci, Branwald, Mortin; Text book of Harrison's Principle of Internal Medicine; From: McGrawhill company; Newyork.1998; pp. 1197-1202
2. How OK,Crawford A.C,Lindsay D,Sibley LD. The p29 and p35 Immunodominant Antigenes of Neospora caninum Tachyzoites Are Homologous to the family of surface Antigenes of Toxoplasma gondii; Infect Immun. 1998; 66(11): 5322-5328
3. Boothroyd JC,Hehl A,Knoll LJ,Manager ID. The surface of Toxoplasma More and less .Int. j.Parasito.1998;28: 3- 9
4. Bulow R Boothroyd J. Protection of mice from latal Toxoplasma gondii infection by immunization with P30 antigen in liposome. J. Immunol.1991;147, 3496-3500
5. Charde T, Bourguin I, Mevelec MN, Duberme JF, and Bout D. Antibody responses to Toxoplasma gondii in sera, Intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of trarget antigen. Infect. Immun.1990; 58(5)1240- 1246.
6. Decoster A, Darcy F, and Capron A. Recognition of Toxoplasma gondii excreted and secreted by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: Identification of markers of acute and chronic infection. Clin. Exp.Immunol. 1988; 73:376-382
7. Lunden A. Immune responses in sheep after immunization with Toxoplasma gondii antigens incorporation in to iscoms. Veterinary parasitology. 1994; 56, 23- 35
8. Yap G,Kerten TS,ferguson OJP,Howe D,Suzuki Y, and Shera. partially protection permits the development of latency in anormally virulent strain of Toxoplasma gondii, Infect. Immunity.1998; 66(9): 4382- 4388
9. Glenn GM, Scharton-Kersten T, Alving CR. Advances in vaccine delivery transcutaneous immunization. Exp.Opin.Invest.Drugs. 1999;8:797-805
10. Nossal G.J.V ,vaccines. In: william. E. Paul; Fundamental immunology; from: Lippincohh-Raven publishers ,Philadelphia. 1999 ;1378-1425
11. Uggla A, Buxton D. Immune responses against Toxoplasma and sarcocystis infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. Revue Scientifique et Technique de l' Office International des Epizooties. 1990;9:441-462
12. Uggla A, Hilali M,Lovgren K. Serological responses in Sarcocystis cruzi infected calves challenged with Toxoplasma gondii. Res. Vet.Sci. 1987;43:127- 129
13. Lunden A, Lovgren K, Uggla, A and Araujo, F.G. Immune responses and resistance to Toxoplasma gondii in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immuno stimulating

- complex. *Infect.Immun.* 1993; 61(6): 2639-2643
14. Overnes G, Nesse LL, Waldeland H, Lövgren K, Gudding R. Immune response after immunization with an experimental *Toxoplasma gondii* iscom. *Vaccine*.1991; *Vaccine* 9:25- 28
 15. Uggla A, Araujo FG, Lunden A, Lövgren K, Remington JS, Morein B. immunizing effects in mice of two T . *gondii* iscom preparations. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1988;.35:311- 314
 16. Chinchilla M. Guerrero OM,Solano E. Lack of multiplication of *Toxoplasma* in macrophages of rats in vitro. *J.Parasitol.* 1982;68:952- 955
 17. Santoro F, Auriault C, Leite.P, Darcy F. Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii* .*C.R.Acad.Sci.III Sci.Vie.* 1987 ; 304:297- 300
 18. Duquesn V, Auriault C, Darcy F. Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted- secreted antigen- apespecific helper Tcells. *Infect. Immun.*1990; 58(7):2120- 2126
 19. Ferenkel JK. Pathophysiology of *Toxoplasmosis*.*Parasitol Today.* 1988;10:273- 278
 20. Johnson AM, McdonaId PJ and Neoh SH. Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens Protect mice from toxoplasmosis. *J . Parasitol.* 1983; 30:351- 356
 21. Sharma SD, Araujo FG and Remington JS. *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*, *J. Immunol.*1984; 133:2818- 2820
 22. Sibley LD, Sharma SD. Ultrastructural localization of an Intracellular *Toxoplasma* protein that induces Protection in mice. *Infect. Immune.* 1987;55:2137- 2141
 23. Darcy F, Meas M, Gras- Masse H, Auriault C, Bossus MD, Codard I, Cesbron MF,Tartar A and Capron A. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J.Immunl.* 1992; 149(11): 3636- 3641
 24. Huskinson J, Thulliez P,Remington JS . *Toxoplasma* antigens recognized by human Immunoglobulin IgA antigens.*J . Clin. Microbiol.* 1990; 28:2632
 25. Kasper LH, Currie KM, Bradly MS. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen(P30) of *toxoplasma gondii*. *J.Immunol.* 1985;134:3426

جدول شماره 1: نتایج آزمایش IFAT در سرم موشهای گروههای IP، ID و شاهد

1	1	1	1	1	1	1	تیتراژ آنتی بادی سرم موشها
2560	1600	1280	640	320	160	80	
0	0	71/4	85/7	100	100	100	گروه IP
0	28/6	71/4	100	100	100	100	گروه ID
0	0	0	0	0	0	100	گروه شاهد

اعداد ذکر شده در جدول بیانگر درصد هر گروه می باشد ($p < 0/05$)

جدول شماره 2: نتایج مربوط به درصد بقا برای هر گروه بر حسب روز در موشهای ایمن شده و شاهد

روزهای پس از عفونت	درصد	بقای	گروهها
	Intra Peritoneal (IP)	Intra Dermal (ID)	گروه شاهد
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	100	100	100
6	85/7	100	0
7	71/4	87/5	0
8	42/8	75	0
9	0	0	0

* اعداد ذکر شده در جدول بیانگر درصد هر گروه می باشد

جدول شماره 3: نتایج مربوط به درصد فراوانی تجمعی مرگ و برای هر گروه بر حسب روز در موشهای ایمن شده و شاهد

روزهای پس از عفونت	درصد فراوانی تجمعی مرگ و میر گروهها		
	Intra Peritoneal (IP)	Intra Dermal (ID)	گروه شاهد
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	100
6	14/3	0	0
7	28/6	12/5	0
8	57/2	25	0
9	100	100	0

* اعداد ذکر شده در جدول بیانگر درصد هر گروه می باشد