

طراحی کیت الیزا جهت تعیین IgG علیه توکسوپلازما در سرم انسان با استفاده از آنتی ژن های دفعی- ترشچی و بررسی قدرت تشخیص آن

سید حسین عبداللہی* (Ph.D.) محمد کاظمی عرب آبادی** (M.Sc.)

چکیده

سابقه و هدف: روش رایج جهت تشخیص توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) تعیین آنتی بادی علیه توکسوپلازما در سرم به کمک آزمون های سرولوژی می باشد. در مطالعات قبلی از آنتی ژن های دفعی- ترشچی به دست آمده از کشت انگل در محیط کشت RPMI استفاده شده است. در این مطالعه، انگل در مایع صفاق موش کوچک آزمایشگاهی کشت داده شد و از آنتی ژن های به دست آمده به عنوان آنتی ژن در طراحی کیت الیزای تشخیص آنتی بادی های ضد توکسوپلازما استفاده شد.

مواد و روش ها: مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی که ۳ روز قبل به طریق تزریق داخل صفاقی با تاکی زوئیت های توکسوپلازما آلوده شده بود، کشیده شد و به میزان $750 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۴۰ درصد) از مایع رویی آن تهیه و به عنوان ترکیب حاوی E/SA در شرایط مناسب نگه داری شد. نمونه های سرم انسانی با استفاده از اسباب (kit) الیزا (رادیم IgG ساخت کشور ایتالیا) آزمایش و نمونه های منفی و حاوی IgG تعیین و با آزمون رنگ سنجی نیز تأیید شدند سپس مجدداً به روش الیزا با استفاده از ترکیب حاوی E/SA تهیه شده در این مطالعه آزمایش شدند.

یافته ها: با توجه به نتایج آزمایش، ۳۲ نمونه حاوی IgG علیه توکسوپلازما و ۴۰ نمونه بدون آنتی بادی علیه توکسوپلازما انتخاب شد. تحت شرایط مورد نظر در این مطالعه با ۹۵ درصد اطمینان، نقطه برش آزمون الیزا برابر ۰/۷۸ تعیین گردید که جذب نوری سه عدد از نمونه های منفی بیش تر و جذب نوری ۵ عدد از نمونه های حاوی IgG کم تر از نقطه برش به دست آمد. بنابراین حساسیت و ویژگی آزمون الیزا به ترتیب ۸۴ و ۹۲ درصد محاسبه گردید.

استنتاج: مطالعه حاضر نشان داد که مایع صفاق موش آلوده به توکسوپلازما می تواند ترکیب مناسبی جهت به دست آوردن آنتی ژن های دفعی- ترشچی برای استفاده در روش های تشخیص سرولوژی توکسوپلاسموزیس باشد.

واژه های کلیدی: توکسوپلاسموزیس، الیزا، آنتی ژن های دفعی- ترشچی، توکسوپلازما گوندی

* دکترای انگل شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

E-mail: habdollahid38@yahoo.com

** کارشناسی ارشد انگل شناسی، مربی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۶/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۸۶/۸/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۸۶/۱۱/۳

مقدمه

توکسوپلازموزیس (Toxoplasmosis) از جمله بیماری‌های شایع در سراسر دنیا می‌باشد که در اثر آلودگی به تک یاخته درون سلولی اجباری به نام توکسوپلازما گوندی بروز می‌کند (۱). انسان از دو راه اکتسابی و مادرزادی به این انگل مبتلا می‌شود (۱). سیر بیماری در انسان به صورت دو مرحله حاد و مزمن می‌باشد و اکثر عوارض، علائم و همچنین انتقال آلودگی از مادر به جنین در مرحله حاد بیماری رخ می‌دهد (۲). تشخیص دقیق توکسوپلازموزیس حائز اهمیت است زیرا با تشخیص به موقع و درمان مناسب، عوارض ناشی از این بیماری به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند (۳). برای تشخیص توکسوپلازموزیس از روش‌هایی مثل تلقیح نمونه‌های بالینی به حیوان حساس، کشت سلولی و شناسایی انگل در برش‌های بافتی می‌توان استفاده کرد که از ویژگی و حساسیت مناسبی برخوردار می‌باشند ولی به دلیل نیاز به امکانات خاص، طولانی بودن زمان مشخص شدن نتیجه و خطر آلودگی افراد و محیط کار، در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی معمولاً مورد استفاده قرار نمی‌گیرند (۴). لذا تعیین عیار آنتی‌بادی تولید شده علیه توکسوپلازما به کمک روش‌های سرولوژیکی در سرم افراد مبتلا روش رایج تشخیص توکسوپلازموزیس محسوب می‌شود (۳).

مطالعات زیادی به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلازما به عنوان آنتی‌ژن برای استفاده در روش‌های تشخیص سرولوژی برای بهبود ارزش تشخیصی آن‌ها صورت گرفته است (۳، ۴). در این رابطه توجه زیادی به آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی (Excreted/Secreted Antigens) تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما جلب شده است (۵). با توجه به ویژگی‌هایی که برای این آنتی‌ژن‌ها گزارش شده، به نظر می‌رسد این آنتی‌ژن‌ها نشانگرهای مناسبی برای شناسایی آنتی‌بادی

علیه انگل در سرم می‌باشند (۶).

در بین تکنیک‌های قابل استفاده برای تعیین آنتی‌بادی ضد توکسوپلازما در سرم با به کارگیری آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی، روش الیزا با توجه به سادگی نسبی روش اجراء، در دسترس بودن مواد و وسایل انجام آن به صورت تجاری در قالب کیت‌های آماده، عدم نیاز به دستگاه‌های گران قیمت و حساسیت نسبتاً بالا مناسب‌تر به نظر می‌رسد (۷).

همچنین نتایج بررسی‌های قبلی نشان داده که روش الیزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی توکسوپلازما دارای ویژگی و حساسیت نسبتاً بالایی برای تشخیص توکسوپلازموزیس در موش صحرایی می‌باشد (۸). در این مطالعات معمولاً مایع رویی کشت سلولی توکسوپلازما یا محیط کشت RPMI- 1640 که تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما در آن پروراند شده است به عنوان ترکیب حاوی E/SA استفاده شده است (۹، ۸). استفاده از این روش‌ها دو مشکل اساسی دارد: اول این‌که شرایط تولید آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی انگل در محیط آزمایشگاهی (In vitro) متفاوت با محیط درون تنی (In vivo) می‌باشد و این تفاوت ممکن است روی شکل آنتی‌ژنی این آنتی‌ژن‌ها مانند گلیکوزیلاسیون و دیگر تغییرات بعد از ترجمه موثر باشد و دوم این‌که تهیه آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی با این روش‌ها نسبتاً مشکل بوده و نیاز به دستگاه و امکانات خاص دارد (۹، ۸). لذا در این مطالعه از مایع صفاق موش کوچک آزمایشگاهی به عنوان محیط درون تنی جهت تولید این آنتی‌ژن‌ها استفاده شد و میزان دقت و حساسیت کیت‌های الیزای تولیدی با این آنتی‌ژن‌ها اندازه‌گیری و با کیت‌های استفاده شده از آنتی‌ژن‌های حاصل از محیط آزمایشگاهی مقایسه گردید. بنابراین هدف این مطالعه، ارزیابی روش الیزا به عنوان آزمون

توکسوپلازما آزمایش شدند و با روش آزمون مواد رنگی (dye-test) نیز تأیید شدند. با توجه به نتایج آزمایش نمونه‌های سرم با کیت الیزا IgG و dye-Test ۳۲ عدد سرم حاوی IgG و ۴۰ نمونه منفی از نظر وجود آنتی بادی علیه توکسوپلازما انتخاب گردید.

طراحی الیزا:

پس از تعیین رقت‌های مناسب کونژوگه، آنتی ژن و سرم اقدام به تعیین نقطه برش (Cut off) شد که در ادامه روش، آورده شده است:

تعیین نقطه برش:

در این قسمت تمام سرم‌های منفی با رقت مناسب آنتی ژن، سرم و کونژوگه (تعیین شده در مراحل قبل) به صورت دو تایی در قالب الیزا غیر مستقیم به صورت تک رقتی آزمایش شدند پس از تعیین میزان جذب نوری حفره‌های صفحه (Plate) با دستگاه سنجش طیف نور چند کانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر، میانگین رقت‌های دو تایی نمونه‌ها محاسبه و نمودار فراوانی آن‌ها رسم گردید هم‌چنین میانگین و انحراف معیار میانگین‌ها نیز محاسبه شد (۵).

انجام الیزا:

در این مرحله نمونه سرم‌های مورد نظر به روش الیزا مستقیم به صورت تک رقتی آزمایش و با توجه به نتایج حاصل، ویژگی و حساسیت روش الیزا برای تعیین IgG علیه توکسوپلازما در سرم انسان محاسبه گردید.

یافته‌ها

انجام الیزا:

الف) تعیین رقت مناسب کونژوگه، آنتی ژن و سرم

با در نظر گرفتن عوامل زیر در جدول تعیین عیار: - ارتفاع خط تراز (Plateau-height). حفره‌هایی

حساس و رایج در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع مایع صفاق موش سوری آلوده به توکسوپلازما گوندی به عنوان آنتی ژن برای تعیین IgG علیه توکسوپلازما در سرم انسان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه آنتی ژن:

مایع صفاق موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی که ۳ روز قبل با تاکی زوئیت‌های سویه RH توکسوپلازما گوندی (۱۰^۶ تاکی زوئیت در هر میلی‌لیتر) به روش تلقیح داخل صفاقی آلوده شده بودند، کشیده شد و با دور ۷۵۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی به عنوان ترکیب حاوی E/SA جدا شد. برای تهیه رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۴۰ درصد)، پس از تعیین مقدار سولفات آمونیوم مورد نیاز، نمک تدریجاً به ظرف حاوی مایع صفاق موش که روی همزن و در محل مناسب از نظر حرارت قرار داشت اضافه شد. سپس محلول به مدت یک شب در یخچال نگهداری و پس از این که به مدت نیم ساعت با دور ۷۵۰g سانتریفیوژ گردید، مایع رویی آن خارج و رسوب در مقابل بافر تریس ۰/۰۵ مولار دیالیز شد. سپس با قرار دادن کیسه دیالیز در مقابل جریان شدید هوا (کولر گازی) تغلیظ و به روش براد فورد میزان پروتئین آن تعیین گردید. سپس در ویال‌های دریچ‌دار تقسیم و ضمن افزودن آنتی بیوتیک در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، نگهداری شد.

تهیه نمونه‌های سرم:

از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان خون‌گیری و نمونه‌های سرم با استفاده از کیت الیزا رادیوم IgG ساخت کشور ایتالیا به منظور تعیین IgG علیه

که در نتیجه نقطه برش با حدود اطمینان ۹۵ درصد به شرح ذیل محاسبه شد.

$$\text{Cut Off: } \mu + 2SD = 0.32 + 2 \times 0.23 = 0.78$$

ج) تعیین حساسیت و ویژگی الیزای غیر مستقیم با استفاده از رسوب سولفات امونیوم اشباع ۴۰ درصد

نتایج آزمایش سرم‌های منفی به روش الیزای غیر مستقیم در جدول شماره یک و سرم‌های آلوده به توکسوپلاسموزیس انسانی در جدول شماره ۲ آمده است. بررسی داده‌های مذکور نشان می‌دهد که در نمونه‌های سرم منفی، سه عدد از داده‌ها از نقطه برش مورد نظر بیش تر است و همچنین در نمونه‌های سرم‌های آلوده، پنج مورد از داده‌ها از نقطه برش کم‌تر هستند. بنابراین با توجه به شرایط مورد نظر در این بررسی برای آزمون مورد نظر حساسیت ۸۴ درصد، اختصاصیت ۹۲ درصد، ارزش اخباری مثبت ۹۰ درصد و ارزش اخباری منفی آن ۸۸ درصد می‌باشد. همچنین حدود کای دو برای حساسیت آزمون با دامنه اطمینان ۹۵ درصد برابر ۹۶-۷۲ درصد، برای ویژگی آزمون برابر ۱۰۰-۸۴ درصد، برای ارزش اخباری مثبت، برابر ۱۰۰-۸۰ درصد و برای ارزش اخباری منفی ۹۳-۸۳ درصد محاسبه گردید.

است که در آن‌ها آنتی ژن یا آنتی بادی وجود داشت؛ به عبارت دیگر با تعیین رقت آنتی ژن و یا سرم، میزان جذب نوری در آن‌ها تغییر پیدا نکرد.

- صفحه زمینه (Background plate). میزان جذب نوری ناشی از واکنش‌های غیر اختصاصی و بدون ارتباط با فعالیت آنزیم است.

- نقطه انتهایی (End-point). آخرین رقتی از آنتی ژن یا سرم است که میزان جذب نوری آن بالاتر از زمینه (Background) باشد. برای هر مورد تحت شرایط این مطالعه رقت کونژگه $\frac{1}{500}$ ، رقت مناسب آنتی ژن $\frac{1}{100}$ و رقت مناسب سرم مطابق رقت مناسب شرکت سازنده کیت مورد استفاده تعیین گردید.

ب) تعیین نقطه برش آزمون

در این قسمت، تمام سرم‌های منفی با رقت مناسب آنتی ژن، سرم کونژگه (به دست آمده از مراحل قبل) در قالب الیزای غیر مستقیم به صورت تک رقتی آزمایش شدند. پس از تعیین میزان جذب نوری حفره‌های صفحه با دستگاه سنجش طیف نور چند کانالی در طول موج ۴۵۰ نانومتر، میانگین نمونه‌ها $\mu = 0.32$ محاسبه شد و نمودار فراوانی آنها رسم گردید. همچنین $SD = 0.23$

جدول شماره ۱: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم‌های منفی به روش الیزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی ژن‌های تهیه شده از صفاق موش

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۰.۲۱۶	۹	۰.۲۱۷	۱۷	۰.۲۸۹	۲۵	۰.۲۶۱	۳۳	۰.۲۰۸
۲	۰.۲۶۹	۱۰	۰.۳۰۷	۱۸	۰.۲۴۸	۲۶	۰.۷۰۳	۳۴	۰.۴۹۸
۳	۰.۲۵۰	۱۱	۰.۷۹۷	۱۹	۰.۱۷۲	۲۷	۰.۲۷۷	۳۵	۰.۲۰۲
۴	۰.۳۹۰	۱۲	۰.۹۵۸	۲۰	۰.۱۸۹	۲۸	۰.۲۴۸	۳۶	۰.۱۷۱
۵	۰.۲۷۸	۱۳	۰.۲۳۸	۲۱	۰.۳۲۹	۲۹	۰.۲۷۴	۳۷	۱.۰۸۴
۶	۰.۲۳۵	۱۴	۰.۲۱۲	۲۲	۰.۲۷۰	۳۰	۰.۷۱۱	۳۸	۰.۲۱۸
۷	۰.۲۱۱	۱۵	۰.۶۳۰	۲۳	۰.۱۰۶	۳۱	۰.۱۷۴	۳۹	۰.۲۱۰
۸	۰.۱۸۰	۱۶	۰.۲۰۴	۲۴	۰.۷۵۴	۳۲	۰.۲۸۴	۴۰	۰.۲۴۴

جدول شماره ۲: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم های حاوی IgG به روش الیزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی ژن های تهیه شده از صفاق موش

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۰/۸۷۱	۹	۱/۵۲۴	۱۷	۱/۲۶۲	۲۵	۰/۸۷۵
۲	۰/۸۵۵	۱۰	۲/۲۵۴	۱۸	۰/۹۶۰	۲۶	۰/۲۵۷
۳	۲/۰۵۶	۱۱	۰/۵۹۰	۱۹	۱/۲۴۸	۲۷	۰/۸۸۱
۴	۰/۸۹۰	۱۲	۰/۴۹۶	۲۰	۰/۷۴۷	۲۸	۱/۲۰۵
۵	۱/۰۰۵	۱۳	۲/۳۴۹	۲۱	۰/۵۵۴	۲۹	۰/۹۷۷
۶	۰/۸۵۰	۱۴	۱/۲۹۶	۲۲	۱/۲۶۰	۳۰	۱/۳۷۳
۷	۰/۷۹۰	۱۵	۱/۲۶۸	۲۳	۰/۸۸۰	۳۱	۰/۸۵۰
۸	۱/۰۰۱	۱۶	۰/۹۰۸	۲۴	۱/۲۸۸	۳۲	۰/۷۹۸

بحث

ترشحي با اين روش‌ها نسبتاً مشکل و نیاز به دستگاه و امکانات خاص دارد (۱۰).

پاماتو (۱۹۹۸) گزارش کرد مایع صفاق موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی که از طریق تزریق داخل صفاقی با تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما آلوده شده بودند با سرم‌های انسانی حاوی آنتی‌بادی علیه توکسوپلازما واکنش نشان می‌دهد (۱۱). این محقق هم چنین رسوب سولفات آمونیوم اشباع ۸۰-۳۰ درصد از این ترکیبات را به روش الیزا نقطه‌ای با نمونه سرم‌های فوق، آزمایش و گزارش نمود که رسوب سولفات آمونیوم اشباع ۴۰-۳۰ درصدی حاوی ترکیبات آنتی ژنیک بیش تری نسبت به بقیه اجزاء می‌باشد (۱۱). بنابراین به نظر می‌رسد با تلقیح تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما از طریق داخل صفاقی به موش‌های کوچک آزمایشگاهی می‌توان مایع صفاق آن‌ها را به عنوان ترکیب حاوی آنتی ژن‌های دفعی- ترشحي به کار برد. تهیه آنتی ژن‌های مذکور از این طریق نسبت به روش‌های دیگر آسان تر و ارزان تر می‌باشد و با استفاده از روش‌های تخلیص می‌توان آغشتگی آن‌ها را نیز بر طرف کرد.

در بین تکنیک‌های قابل استفاده برای تشخیص توکسوپلازموزیس، به کارگیری روش الیزا (ELISA)

بیشتر مشکلات در رابطه با استفاده از آزمون‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلازموزیس را به آنتی ژن‌های به کار رفته در این آزمون‌ها نسبت می‌دهند (۸). مطالعات انجام شده به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلازما به عنوان نشانگر مناسب جهت بهبود ارزش تشخیصی روش‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلازموزیس نشان می‌دهد که آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحي تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما در این رابطه از اهمیت خاصی برخوردار هستند (۸ تا ۶).

در مطالعات قبلی معمولاً از مایع رویی کشت سلولی توکسوپلازما در محیط کشت RPMI-1640 که تاکی زوئیت‌های این تک یاخته در آن پروراند شده بودند به عنوان ترکیب حاوی E\SA استفاده شده است (۹) اگر چه آنتی ژن‌های تهیه شده با این روش از خلوص بیش تری برخوردار هستند، استفاده از این روش‌ها دو مشکل اساسی دارد: اول این که شرایط تولید آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحي انگل در محیط آزمایشگاهی (In vitro) متفاوت با محیط درون تنی (In vivo) می‌باشد و این تفاوت ممکن است روی شکل آنتی ژنی این آنتی ژن‌ها مانند گلیکوزیلاسیون و دیگر تغییرات بعد از ترجمه موثر باشد (۹) و دوم این که تهیه آنتی ژن‌های دفعی-

می‌گیرد این موضوع در رابطه با آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی با توجه به کم بودن نسبی میزان آن‌ها در ترکیب کامل نمونه حاوی آنتی ژن اهمیت بیش‌تری دارد (جدول شماره ۱ و ۲).

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که روش الیزا با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۴۰ درصد) مایع صفاق موش سفید آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلازما برای شناسایی IgG علیه توکسوپلازما در سرم انسانی روش مناسبی می‌باشد و می‌تواند جایگزین استفاده از آنتی ژن‌های به دست آمده از محیط‌های کشتی مانند RPMI شود.

مناسب‌تر به نظر می‌رسد. زیرا روش‌هایی مثل پاک شدن ایمنی (Immunoblotting) و سنجش پرتوب ایمنی (Radioimmuno Assay) گرچه از ارزش تشخیصی مناسب برخوردار می‌باشد، به کارگیری آن‌ها به خاطر پیچیدگی روش اجرا، در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقدور نمی‌باشد. با توجه به پایین بودن مقدار آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی در واحد حجم ترکیب حاوی این آنتی ژن‌ها، در آزمون‌هایی مانند IHA، لاتکس آگلوتیناسیون و عمل ثابت شدن آنتی ژن بر روی گلبول‌های قرمز یا ذرات لاتکس ممکن است به خوبی صورت نگیرد. حساسیت الیزا نسبتاً بالا است؛ به طوری که با ۱-۵ نانوگرم از آنتی ژن نیز واکنش صورت

فهرست منابع

1. Wastling J, Heap S, Ferguson D. Toxoplasma gondii—keeping our guests under control. *Biologist* (London) 2000; 47: 234-238.
2. J. P. Dubey, D. S. Lindsay, and C. A. Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts Speer *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(2): 267-299.
3. Tenter A M, Heckeroth AR, Weiss LM. Toxoplasma gondii: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1217-58.
4. Suzuki Y. Host resistance in the brain against Toxoplasma gondii. *J Infect Dis* 2002; 185(suppl 1): S58-S65.
5. Conejero-Goldberg C, Torrey EF, Yolken RH. Herpesviruses and Toxoplasma gondii in orbital frontal cortex of psychiatric patients. *Schizophr Res* 2003; 60: 65-69.
6. Nishikawa Y, Claveria FG, Fujisaki K, Nagasawa H. Studies on serological cross-reaction of Neospora caninum with Toxoplasma gondii and Hammondia heydorni. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 161-164.
7. S. J. Parker, F. M. Smith, A. M. Johnson. Murine Immune Responses to Recombinant Toxoplasma gondii Antigens. *J Parasitol* 1991; 77(3): 402-409.
8. T.D. Nguyen, M. DE Kesel, G. Bigaignin, P. Hoet, G. Passaglia, M. Lammens, M. Delmee. Detection of Toxoplasma gondii Tachyzoites and Bradyzoites in Blood, Urine, and Brains of Infected Mice. *Clin Diag Lab Immunol* 1996; p: 635-639.

9. Debierre-Grockiego, Françoise; Hippe, Diana; Schwarz, Ralph; Lüder, Carsten. Toxoplasma gondii glycosylphosphatidylinositols are not involved in T. gondii-induced host cell survival. *Apoptosis* 2007; 12(4): 781-790.
10. J. Diana, C. Vincent, F. Peyron, S. Picot, D. Schmitt and F. Persat. Toxoplasma gondii regulates recruitment and migration of human dendritic cells via different soluble secreted factors. *Clin Expe Immunol* 2005; 141: 475-484.
11. Pamato. Toxoplasmosis: the time has come. *NE J Med* 1988; 318: 313-315.

Archive of SID