

بررسی میزان آلودگی راتوس‌های شهر تهران به توکسوپلازما گوندی با روش الیزا

عباس محمودزاده^۱، جاوید صدرايي^{۲*}، رحیم مختاری خجسته^۳

۱- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۹/۲۷

دریافت مقاله: ۸۹/۰۶/۰۳

چکیده

هدف: توکسوپلازموزیس دارای عفونتی منتشر در جهان است که به وسیله تک یاخته درون سلولی توکسوپلازما گوندی ایجاد می‌شود. توکسوپلازما عامل ایجاد تغییرات در رفتارهای جونندگان است. جونندگان نقش مهمی در چرخه زندگی توکسوپلازما گوندی بازی می‌کنند و به‌عنوان مخزن اصلی عفونت در گربه‌های اهلی مطرح هستند. هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی موش‌های تهران به توکسوپلازما بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۵۰ موش از تمامی پنج منطقه تهران (شمال، جنوب، مرکز، شرق و غرب) توسط تله‌های زنده‌گیر در مدت ۸ ماه شکار شدند. برای تشخیص عفونت از کونزوگه آنتی‌رت به روش الیزا استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که ۳۶/۷ درصد موش‌های تهران دارای آلودگی به توکسوپلازما هستند و بیشترین میزان آلودگی مربوط به جنوب و مرکز تهران با ۱۱/۷ درصد و کمترین میزان آلودگی در غرب تهران با ۱/۴۷ درصد است.

نتیجه‌گیری: این میزان آلودگی نمایانگر اهمیت وجود موش‌های رت وحشی در برقراری و ماندگاری چرخه زندگی این انگل است.

کلیدواژگان: راتوس، الیزا، توکسوپلازما گوندی

۱- مقدمه

تحرک [۳]، کاهش میزان یادگیری [۴]، ترس از نور [۵]، بروز وحشت و ترس [۶] و افزایش زمان انجام فعالیت‌های روزمره [۷، ۸] و افزایش زمان عکس‌العمل به محرک‌های محیطی [۹] اشاره کرد.

جونندگان کوچک نقش مهمی در چرخه زندگی توکسوپلازما گوندی بازی می‌کنند و به‌عنوان یکی از عوامل آلوده شدن گربه‌های اهلی و وحشی مطرح هستند [۱۰، ۱۱].

توکسوپلازموزیس (Toxoplasmosis) عفونتی منتشر در جهان به‌واسطه تک یاخته درون سلولی توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) است [۱]. از آن‌جایی که این تک یاخته انگلی در همه مکان‌ها وجود دارد، عفونت‌های انسانی در برخی جوامع تا ۱۰۰ درصد نیز گزارش شده است [۲].

طبق مطالعات انجام شده توکسوپلازما عامل ایجاد تغییر در رفتارهای جونندگان است که از آن جمله می‌توان به کاهش

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

راتوس نوروژیکوس (*Rattus norvegicus*) بودند. رت‌ها ابتدا با اثر بیهوش شده و بعد از ضد عفونی کردن قفسه سینه، به میزان ۲ سی‌سی از قلب ۶۸ رت زنده منتقل شده به آزمایشگاه خون‌گیری انجام گرفته و سرم‌ها بعد از جداسازی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۱-۲- انجام آزمایش ELISA

برای انجام آزمایش ELISA ابتدا تاکی‌زوئیت‌های (Tachyzoites) توکسوپلازما گوندی سویه RH از انستیتو پاستور تهیه شد و آنتی‌ژن خام آن‌ها روی کف ویال‌های پلیت کوت (Coat) شد. پس از آماده‌سازی پلیت، ابتدا نمونه‌های سرم موجود با محلول رقیق کننده سرم (حاوی کازین ۲ درصد، ۱۰ میلی‌مولار بافر سدیم سیترات، توین ۲۰ یک درصد، سدیم آزاید ۹ درصد، کاتون جی سی (Katon JC) ۱ درصد) به نسبت $\frac{1}{10}$ رقیق شد. از محلول رقیق شده به مقدار ۱۰۰ لاندا به ویال‌ها اضافه شد و پلیت مذکور به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس پلیت ELISA با محلول حاوی (۱۰ میلی‌مولار بافر سدیم سیترات pH=۷، توین ۲۰ پنج درصد، کاتون جی سی ۱ درصد) پنج بار شستشو داده شد. بعد از این مرحله با کونزوگه IgG آنتی‌رت (Anti-Rat IgG-HRP from Goat A9037 شرکت Sigma رقیق شده و به نسبت ۱ به ۱۰۰۰۰ به میزان ۱۰۰ لاندا به هر ویال اضافه شد و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

مجدداً پلیت ۵ بار شستشو و سپس به ویال‌های پلیت مورد نظر سوپسترا (Ortho-Phenylene-Diamine) OPD در بافر سیترات- فسفات ۵ مولار به مقدار ۱۰۰ لاندا اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از آن محلول متوقف کننده (Stop Solution) حاوی اسید سولفوریک دو نرمال به میزان ۵۰ لاندا به هر ویال اضافه شد. در انتها پلیت توسط دستگاه قرائت‌گر ELISA (ELISA Reader) در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد.

در برخی نقاط جهان میزان آلودگی به توکسوپلازما گوندی در جوندگان کوچک تا ۷۳ درصد گزارش شده است [۱۲].

عفونت در جوندگان با بلع خاک، سبزی یا آب آلوده به کیست رخ می‌دهد [۲].

در بررسی‌های مختلف عفونت مادرزادی توکسوپلازما گوندی در موش‌ها به میزان ۳۷ درصد به اثبات رسیده است [۱۳].

طی دوره عفونت مزمن توکسوپلازموزیس در موش‌ها، انتقال مادرزادی دیده شده است و ۵۱ درصد انتقال مادرزادی نیز در ابتلا به عفونت حاد توکسوپلازما گوندی گزارش شده است [۱۴].

برای تشخیص آنتی‌بادی علیه توکسوپلازما گوندی روش‌های گوناگونی در دسترس است که از آن جمله می‌توان الیزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) و ایمنوفلورسانس (Immunofluorescent) و Sabin-Feldman و dye test را نام برد. Dye test به دلیل استفاده از انگل زنده به ندرت کاربرد دارد [۱۵، ۱۶].

ELISA برای تعیین آنتی‌بادی یک روش راحت و آسان و قابل دسترس است. روش ELISA به صورت دستی و خودکار با حساسیت و ویژگی بالا و مورد قبول برای تیتراژ انواع آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شود [۱۷، ۱۸].

هدف از این تحقیق بررسی میزان آلودگی راتوس‌های تهران به توکسوپلازما و نشان دادن اهمیت بهداشتی این حیوان در برقراری چرخه بیماری است.

۲- مواد و روش‌ها

۱۵۰ راتوس از تمامی مناطق تهران براساس پنج منطقه (شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز) توسط ۴۲۰ تله زنده‌گیر در مدت ۸ ماه شکار شدند. رت‌های مورد نظر پس از شکار به آزمایشگاه تحقیقاتی گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس منتقل می‌شدند. راتوس‌های شکار شده ۸۴ درصد از جنس راتوس راتوس (*Rattus rattus*) و بقیه

۲-۲- تعیین سطح حداقل (Cut Off) آزمون

بدین منظور چهار نمونه سرم رت آزمایشگاهی که از نظر آلودگی به توکسوپلازما گوندی با روش DT (Dye Test) منفی بودند، به‌عنوان نمونه سرمی منفی برای سطح حداقل استفاده شد.

میانگین (μ) و انحراف معیار (SD) جذب نمونه سرم‌های منفی به ترتیب ۰/۳۴۲ و ۰/۰۳۵ به‌دست آمد و با توجه به این‌که منحنی فراوانی جذب نوری (Optical Density: OD) سرم‌های منفی به سمت راست کشیدگی داشت، سطح حداقل آزمون با ۹۹ درصد اطمینان عبارت است از:

$$\text{سطح حداقل} = \mu + 3 SD = 0.342 + 3(0.035) = 0.447$$

۲-۳- آزمون آماری

نمونه‌های با $OD < 0.447$ مثبت در نظر گرفته شد.

اطلاعات به‌دست آمده برحسب پنج منطقه شمال، جنوب، مرکز، شرق و غرب توسط آزمون آماری مجذور کای (Chi-square) با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ بررسی شد.

۳- نتایج

پس از انجام آزمایش ELISA روی سرم نمونه با توجه به سطح حداقل به میزان ۰/۴۴۷ مشخص شد که ۲۵ نمونه از ۶۸ نمونه دارای تیتراژ مثبت آنتی‌بادی توکسوپلازما بود و بالاترین تیتراژ آنتی‌بادی ۱/۲۲۸ و پایین‌ترین ۰/۰۵۹ بود. بیشترین آلودگی مربوط به جنوب و مرکز تهران با ۱۱/۷ درصد آلودگی و کمترین میزان مربوط به غرب تهران با ۱/۴۷ درصد آلودگی است که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری برحسب منطقه مشاهده نشد. مجموع نتایج به تفکیک مناطق و محله‌ها و جزئیات آن‌ها در جداول ۱ و ۲ ذکر شده است.

جدول ۱ درصد آلودگی سرمی موش‌های تهران

موش شکار شده	سرم جدا شده	تعداد مثبت	درصد آلودگی نسبت به کل سرم‌ها
شمال	۳۵	۴	۵/۸۸
جنوب	۴۱	۸	۱۱/۷۶
شرق	۳۳	۴	۵/۸۸
غرب	۱۳	۱	۱/۴۷
مرکز	۲۸	۸	۱۱/۷۶
جمع	۱۵۰	۲۵	۳۶/۷۶

در ۷ منطقه جنوب شهر تهران، ۴۱ سر موش شکار شدند که از این تعداد موش ۲۰ نمونه سرم تهیه شد و پس از انجام آزمایش ELISA، ۸ نمونه سرم از لحاظ توکسوپلازما مثبت بودند. در ۵ محله مرکز تهران، ۲۸ سر موش در تله افتادند که از این تعداد موش ۱۴ نمونه سرم تهیه شد و پس از انجام آزمایش ELISA ۸ نمونه سرم از لحاظ توکسوپلازما مثبت بودند. در ۶ منطقه شرق تهران نیز ۳۳ سر موش در تله افتادند که از این تعداد موش ۱۵ نمونه سرم تهیه شد و پس از انجام آزمایش

از مجموع ۶۸ نمونه سرم جدا شده، ۴۵ نمونه سرم موش‌های ماده و ۲۳ نمونه سرم موش‌های نر بود که میزان ۳۴ درصد آلودگی در موش‌های ماده و ۳۷ درصد در موش‌های نر مشاهده شد.

پس از تله‌گذاری در ۵ منطقه شمال شهر تهران، ۳۵ سر موش شکار شد که از این تعداد موش ۱۳ نمونه سرم تهیه شد و پس از انجام آزمایش ELISA، ۴ نمونه سرم از لحاظ توکسوپلازما مثبت بود.

ELISA، ۴ نمونه سرم از لحاظ توکسوپلازما مثبت بود. ELISA ۱ نمونه سرم از لحاظ توکسوپلازما مثبت بود. ۱۳ سر موش در ۴ منطقه غرب تهران در تله افتادند که از این تعداد موش ۶ نمونه سرم تهیه شد و پس از انجام آزمایش و عفونت در هیچ‌کدام از مناطق مشاهده نشد. با توجه به آزمون آماری ارتباط معنی‌داری بین محل زندگی

جدول ۲ میزان آلودگی به توکسوپلازما گوندی در تهران به تفکیک مناطق و محلات

در صد سرم مثبت به کل سرم جدا شده در منطقه	تعداد سرم مثبت جدا شده	تعداد سرم جدا شده	تعداد موش شکار شده	نام محل تله‌گذاری	
				نام محله	نام منطقه
۰	۰	۲	۵	میدان آرژانتین	شمال
۰	۰	۱	۳	ظفر	شمال
۰	۰	۳	۸	اوین	شمال
۲۳	۳	۵	۱۲	ونک	شمال
۷/۷	۱	۲	۷	درکه	شمال
۳۰/۷	۴	۱۳	۳۵	مجموع منطقه شمال	
۰	۰	۲	۷	خزانه	جنوب
۰	۰	۱	۴	راه آهن	جنوب
۵	۱	۱	۵	خلیج	جنوب
۱۰	۲	۴	۶	مولوی	جنوب
۵	۱	۲	۶	جوانمرد	جنوب
۱۰	۲	۴	۶	خانی آباد	جنوب
۱۰	۲	۶	۷	نازی آباد	جنوب
۴۰	۸	۲۰	۴۱	مجموع منطقه جنوب	
۱۴/۲	۲	۳	۸	بلوار کشاورز	مرکز
۱۴/۲	۲	۳	۶	میدان انقلاب	مرکز
۲۱/۴	۲	۴	۴	پل چوبی	مرکز
۷	۱	۲	۷	هاشمی	مرکز
۷	۱	۲	۳	آزادی	مرکز
۵۷	۸	۱۴	۲۸	مجموع منطقه مرکزی	
۱۳/۳	۲	۴	۷	میدان هفت‌حوض	شرق
-	-	۲	۷	تهرانپارس	شرق
-	-	۱	۴	میدان امام حسین	شرق
-	-	۲	۴	میدان شهدا	شرق
-	-	۲	۴	میدان الغدیر	شرق
۱۳/۳	۲	۴	۷	بزرگراه صیاد	شرق
۲۶/۶	۴	۱۵	۳۳	مجموع منطقه شرق	
۰	-	۲	۴	فلکه اول صادقیه	غرب
۰	-	۱	۳	پونک	غرب
۰	-	۲	۳	دهکده المپیک	غرب
۱۶/۶۶	۱	۱	۳	توحید	غرب
۱۶/۶۶	۱	۶	۱۳	مجموع منطقه غرب	

۴- بحث

در این مطالعه از ۶۸ مورد سرم بررسی شده میزان ۳۷/۶ درصد آلودگی مشاهده شد. با توجه به نقش موش در چرخه توکسوپلازما گوندی و انتقال آلودگی از مادر به جنین در موش‌ها [۱۳-۱۴]، اهمیت بهداشتی آن‌ها در ماندگاری آلودگی توکسوپلازما سموزیس در جامعه بیشتر می‌شود.

مجموع میزان ۳۷/۶ درصد آلودگی در شهر تهران و به‌خصوص آلودگی ۱۱/۷ درصد در جنوب و مرکز شهر تهران نمایانگر آلودگی پایدار توکسوپلازما در سطح شهر است.

میزان آلودگی در تعدادی از مطالعات تا ۷۰ درصد هم گزارش شده است، درصد آلودگی پایین در برخی مطالعات می‌تواند به دلیل استفاده از روش‌های غیرحساس باشد، اغلب بررسی‌های با روش‌های غیر از ELISA انجام شده‌اند [۱۹].

نتایج حاضر با نتایج وبستر (Webster) (۱۹۹۴) به میزان ۳۵/۷ درصد از انگلستان که با روش (Latex LAT (Agglutination Test) آزمایش شده همخوانی دارد [۲۰].

در سال ۱۹۸۶، چیلدس و سگار (Childs and Seegar) در بررسی موش‌های شهر مریلند در کشور آمریکا ملاحظه نمودند که ۴۹/۵ درصد از ۱۰۹ موش به روش ایمنوفلورسانس آلوده به توکسوپلازما هستند که در مقایسه با مطالعه حاضر اختلاف قابل توجهی را نشان می‌دهد که این شاید به دلیل شیوع بیشتر توکسوپلازما در منطقه مورد مطالعه و حساسیت روش استفاده شده باشد [۲۱].

در همان سال (۱۹۸۶) جکسون (Jackson) و همکاران در شهر استرابلان اسکاتلند به روش DT میزان آلودگی موش‌های آن منطقه را ۵ از ۶۵ نمونه (۷/۷ درصد) اعلام کردند [۲۲]. در سال ۱۹۸۹ موراتا (Murata) و همکاران در باغ وحش

شهر کوبه ژاپن ۵۵ راتوس از نژادهای نروژیکوس و راتوس راتوس شکار کردند ولی میزان آلودگی را برابر با صفر دانستند که احتمال داده شد به دلیل استفاده از روش غیرحساس و محدود بودن باغ وحش باشد [۲۳].

طی مطالعه هوگس (Hughes) و همکاران در شهر منچستر انگلیس ۱۹ رت از ۴۵ رت با استفاده از روش بسیار دقیق و اختصاصی PCR آلوده به توکسوپلازما بودند [۲۴].

بردوی (Berdoy) و همکاران نشان دادند که عفونت با توکسوپلازما منجر به تغییرات رفتاری در موش می‌شود به‌گونه‌ای که موش آلوده دارای ترس کمتر یا عدم ترس از گربه است. این تغییر رفتار در موش در جهت منافع انگل است زیرا با از بین رفتن ترس موش از گربه، موش به راحتی توسط گربه شکار شده و انگل توکسوپلازما با این روش چرخه زندگی خود را در گربه به‌عنوان میزبان نهایی کامل خواهد کرد [۲۵].

با توجه به میزان آلودگی ۳۷/۶ درصد رت‌های شهر تهران و این نکته که موش‌های آلوده دچار تغییر رفتار شده و طعمه گربه‌ها می‌شوند و در نهایت باعث آلودگی آن‌ها و باقی ماندن چرخه انتقال انگل به انسان می‌شوند، باید در راستای مبارزه بهداشتی با این موش‌ها اقدام اساسی صورت گیرد تا از میزان در معرض خطر قرار گرفتن افراد به‌خصوص زنان باردار پیشگیری شود.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله و گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به‌خاطر حمایت مالی و علمی و عملی این مقاله تشکر و قدردانی می‌شود.

۶- منابع

[1] Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exp Med 1970; 132(4): 636-62.

[2] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000; 30(12-13): 1217-58.

- [3] Hutchison WM, Aitken PP, Wells BW. Chronic *Toxoplasma* infections and motor performance in the mouse. *Ann Trop Med Parasitol* 1980; 74(5): 507-10.
- [4] Hutchinson WM, Bradley M, Cheyne WM, Wells BW, Hay J. Behavioural abnormalities in *Toxoplasma*-infected mice. *Ann Trop Med Parasitol* 1980; 74(3): 337-45.
- [5] Webster JP, Brunton CF, MacDonald DW. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 1994; 109(Pt 1): 37-43.
- [6] Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc Biol Sci* 2000; 267(1452): 1591-4.
- [7] Hay J, Hutchison WM, Aitken PP, Graham DI. The effect of congenital and adult-acquired *Toxoplasma* infections on activity and responsiveness to novel stimulation in mice. *Ann Trop Med Parasitol* 1983; 77(5): 483-95.
- [8] Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* and other parasites on activity levels in wild and hybrid *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 1994; 109(Pt 5): 583-9.
- [9] Hrda S, Votycka J, Kodym P, Flegr J. Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral changes in mice. *J Parasitol* 2000; 86(4): 657-63.
- [10] Molsher R, Newsome A, Dickman C. Feeding ecology and population dynamics of the feral cat (*Felis catus*) in relation to the availability of prey in central-eastern New South Wales. *Wildlife Res* 1999; 26(5): 593-607.
- [11] Jackson MH, Hutchison WM. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv Parasitol* 1989; 28: 55-105.
- [12] Freyre A, Correa O, Falcon J, Mendez J, Gopnzalez M, Venzal J. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. *Parasitol Res* 2001; 87(11): 941-4.
- [13] Remington JS, Jacobs L, Melton ML. Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. *J Infect Dis* 1961; 108: 163-73.
- [14] Freyre A, Falcón J, Mendez J, González M, Venzal JM, Morgades D. Fetal *Toxoplasma* infection after oocyst inoculation of pregnant rats. *Parasitol Res* 2003; 89(5): 352-3.
- [15] Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Darde ML, Disko R, Dreazen O, Dumon H, Grillo R, Gross U, Hayde M, Holliman R, Ho-Yen DO, Janitschke K, Jenum PA, Naser K, Olszewski M, Thulliez P, Seitz HM. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ* 1999; 77(11): 929-35.
- [16] Liesenfeld O, Press C, Flanders R, Ramirez R, Remington JS. Study of Abbott Toxo IMx system for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M *toxoplasma* antibodies: value of confirmatory testing for diagnosis of acute toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10): 2526-30.
- [17] Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, Remington JS. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia

- Toxo IgM test. J Clin Microbiol 1997; 35(1): 174-8.
- [18] Singh S, Singh N, Dwivedi SN. Evaluation of seven commercially available ELISA kits for serodiagnosis of acute toxoplasmosis. Indian J Med Res 1977; 105: 103-7.
- [19] Genchi G, Polidori GA, Zaghini L, Lanfranchi P. Aspetti epidemiologici della toxoplasmosi nell'allevamento intensivo del suino. Arch Vet Ital 1991; 42: 105-11.
- [20] Webster JP. Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. Parasitology 1994; 108(Pt 4): 407-11.
- [21] Childs JE, Seegar WS. Epidemiologic observations on infection with *Toxoplasma gondii* in three species of urban mammals from Baltimore, Maryland, USA. Int J Zoonoses 1986; 13(4): 249-61.
- [22] Jackson MH, Hutchison WM, Siim J. Toxoplasmosis in a wild rodent population of central Scotland and a possible explanation of the mode of transmission. J Zool London 1986; 209: 549-57.
- [23] Murata K. A serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in zoo animals and other animals. Nippon Juigaku Zasshi 1989; 51(5): 935-40.
- [24] Hughes JM, Williams RH, Morley EK, Cook DA, Terry RS, Murphy RG, Smith JE, Hide G. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. Parasitology 2006; 132(Pt 1): 29-36.
- [25] Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. Proc Biol Sci 2000; 267(1452): 1591-4.