

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



۹۱۴۰۶۵۲

دانشگاه شهید چمران اهواز  
دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری تخصصی انگل شناسی دامپزشکی

عنوان :

**ارزیابی پروتئین نو ترکیب Nc1GRA7 در تشخیص آنتی-  
بادی‌های ضد نئوسپورا کانینوم در گاو و گاومیش به روش  
الایزا**

استاد راهنما:

**دکتر حسین حمیدی نجات**

اساتید مشاور:

**دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری**

**دکتر پرویز شایان**

**دکتر مهدی نام آوری**

نگارنده :

**دکتر مرضیه کفایت**

اسفند ماه ۱۳۹۱



دانشگاه شهید چمران اهواز

۹۱۴۰۶۵۲

دانشگاه شهید چمران اهواز  
دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری تخصصی انگل شناسی دامپزشکی

عنوان :

**ارزیابی پروتئین نو ترکیب Nc1GRA7 در تشخیص آنتی-  
بادی‌های ضد نئوسپورا کانینوم در گاو و گاومیش به روش  
الایزا**

استاد راهنما:

**دکتر حسین حمیدی نجات**

اساتید مشاور:

**دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری**

**دکتر پرویز شایان**

**دکتر مهدی نام آوری**

نگارنده :

**دکتر مرضیه کفایت**

اسفند ماه ۱۳۹۱



پایان نامه دکترای تخصصی انگل شناسی دامپزشکی

عنوان

ارزیابی پروتئین فوترکیب Nc1GRA7 در تشخیص آنتی بادی های ضد نئوسپورا

کانینوم در گاو و گاومیش به روش الایزا

نگارش

دکتر مرضیه کفایت

- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| استاد راهنما                | دکتر حسین حمیدی نجات<br>(دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)          |
| استاد مشاور                 | دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری<br>(استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز) |
| استاد مشاور                 | دکتر پرویز شایان<br>(استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران)                           |
| استاد مشاور                 | دکتر مهدی نام آوری<br>(استادیار مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز)        |
| داور                        | دکتر سید مصطفی رضوی دینانی<br>(دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز)               |
| داور                        | دکتر عطاءاله غدیری<br>(استاد دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور)                       |
| داور                        | دکتر علیرضا البرزی<br>(استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)           |
| داور                        | دکتر محمدرحیم حاحی حاجیکلائی<br>(دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)  |
| ناظر تحصیلات تکمیلی دانشگاه | دکتر علیرضا غدیری<br>(دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)             |

زمان: چهارشنبه ۹۱/۱۲/۲۳ - ساعت ۸ صبح

مکان: آمفی تئاتر دانشکده دامپزشکی

## گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان‌نامه: ارزیابی پروتئین نو ترکیب **Nc1GRA7** در تشخیص آنتی بادی های ضد **نئوسپورا کانینوم در گاو و گاومیش به روش الایزا**

اینجانب مرضیه کفایت دانشجوی دکترای تخصصی انگل شناسی دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران به شماره دانشجویی ۸۶۴۰۶۰۳ تحت راهنمایی دکتر حسین حمیدی نجات و مشاوره دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری، دکتر پرویز شایان و دکتر مهدی نام آوری گواهی می‌دهم که: ۱- تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی شخص اینجانب بوده و صحت و اصالت تمام مطالب مندرج در آن را تایید می‌کنم.

۲- در صورت استفاده از آثار دیگران، مشخصات کامل آن‌ها را در منابع ذکر نموده‌ام.

۳- تاکنون مطالب درج شده در این پایان‌نامه، توسط اینجانب یا شخص دیگری به منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعد از این نیز نخواهد شد.

۴- در تدوین متن پایان‌نامه، شیوه‌نامه مصوب دانشکده را رعایت نموده‌ام.

۵- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و مقالات مستخرج از آن، ذیل نام دانشگاه شهید چمران اهواز (Shahid Chamran University of Ahvaz) به چاپ خواهد رسید.

۶- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند (اساتید راهنما و مشاور) در مقالات مستخرج از آن رعایت خواهد شد.

۷- در صورت استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مندرج در منشور موازین و اصول اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری رعایت شده است.

در صورت اثبات تخلف از مندرجات فوق، مسئولیت هر گونه پاسخگویی به اشخاص حقیقی و حقوقی و مراجع ذیصلاح بر عهده اینجانب بوده و دانشگاه شهید چمران هیچ مسئولیتی بر عهده نخواهد داشت. همچنین در صورت تضییع حقوق و منافع دانشگاه، حق پیگیری موضوع در مراجع ذیصلاح و اعمال قوانین مربوطه برای دانشگاه شهید چمران در حال و آینده محفوظ بوده و اینجانب مسئول پرداخت کلیه خسارات وارده خواهم بود.

تاریخ

نام و نام خانوادگی و امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به غیر نیست. استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

تقدیم به پیشگاه

## مهدی موعود

عجل الله تعالى فرجه

## با تقدیر از

پدرم، تعبیر واژه مهربانی و گذشت که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم.

مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر.

همسرم، اسطوره زندگیم، پناه خستگی و امید بودنم.

و برادرانم همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم.

از اساتید گرامیم جناب آقای دکتر حسین حمیدی نجات و جناب آقای دکتر مسعودرضا صیفی بسیار سپاسگذارم چرا که بدون راهنماییهای ایشان تامین این پایان نامه بسیار مشکل می نمود.

از جناب آقای دکتر مهدی نام آوری و جناب آقای دکتر پرویز شایان به دلیل یاری ها و راهنمایی های بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختی ها را برایم آسانتر نمودند، سپاسگذاری می نمایم.

از جنابان آقایان دکترعلیرضا البرزی، دکتر محمدرحیم حاجی حاجیکلائی، دکتر سید مصطفی رضوی دینانی، دکتر عطاءاله غدیری که قبول زحمت فرموده و داوری این پایان نامه را به نحو احسن به انجام رساندند، قدردانی می نمایم.

با تشکر از جناب آقای دکتر علیرضا غدیری که نظارت این پایان نامه را به عهده گرفتند.

با تقدیر از جناب آقای دکتر مهدی پورمهدی که در انجام مراحل آماری این پایان نامه مرا یاری فرمودند.

و در آخر

.

.

.

سپاسگذاری می نمایم از

مسئولین آزمایشگاه سرکار خانم خواجه و سرکار خانم داغری و جناب آقای غلیم پور

آقای دکتر رشنو بخاطر راهنمایی های بی دریغ شان  
دوستان عزیزم که در آن روز های سخت همراه و پشتیبانم بودند.

| صفحه    | فهرست مطالب | عنوان   |
|---------|-------------|---|
|         |             | چکیده   |
|         |             | فارسی.....                                    |
|         |             | ۱   |
|         |             | فصل اول/ مقدمه و هدف                          |
| ۴.....  |             | مقدمه و هدف.....                              |
|         |             | فصل دوم/ مروری بر منابع                       |
| ۹.....  |             | الف- تاریخچه.....                             |
| ۱۱..... |             | ب- طبقه بندی.....                             |
| ۱۱..... |             | ج- چرخه زندگی و ساختار انگل.....              |
| ۱۵..... |             | د- آنتی ژن های انگل.....                      |
| ۱۸..... |             | د- ۱- آنتی ژن های سطحی.....                   |
| ۱۹..... |             | د- ۲- آنتی ژن های گرانول های متراکم.....      |
| ۲۲..... |             | ه- تفریق نئوسپورا از سایر گونه های انگلی..... |
| ۲۲..... |             | ه- ۱- توکسوپلازما گوندا/بی.....               |
| ۲۳..... |             | ه- ۲- نئوسپورا هوقسی.....                     |



- ه-۳- هامونديا هيدروني..... ۲۴
- و- انتقال..... ۲۵
- و-۱- انتقال عمودي..... ۲۶
- و-۲- انتقال افقي..... ۲۷
- و-۳- انتقال از طريق جفت گيري..... ۲۸
- و-۴- انتقال از طريق شير..... ۲۸
- ز- اهميت اقتصادي در گاو..... ۲۸
- ک- اپيدميولوژي..... ۲۹
- ک-۱- مطالعات اپيدميولوژي صورت گرفته در ايران..... ۳۰
- ل- نشانه هاي باليني..... ۳۱
- ل-۱- سگ..... ۳۱
- ل-۲- گاو ميش..... ۳۳
- ل-۳- گوسفند..... ۳۳
- ل-۴- بز..... ۳۴
- ل-۵- اسب..... ۳۴
- ل-۶- حيوانات وحشي..... ۳۵
- ل-۷- انسان..... ۳۶
- ل-۸- گاو..... ۳۶
- م- بيماري زايي..... ۳۷

- م-۱- آسیب شناسی جفت و ریسک جنینی در عفونت نئوسپورا کانینوم..... ۳۹
- ن- روش های تشخیص..... ۴۵
- ن-۱- روش های سرولوژی..... ۴۶
- ن-۱-۱- آزمایش ایمنونوفلئورسانس غیرمستقیم..... ۴۸
- ن-۱-۲- آزمایش الایزا..... ۴۹
- ن-۱-۳- روش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)..... ۵۰
- ن-۲- روش های بافت شناسی..... ۵۰
- ن-۳- روش ایمنووهیستوشیمی..... ۵۱
- ن-۴- روش کشت سلولی..... ۵۲
- ن-۵- روش های مولکولی..... ۵۳
- ن-۶- استفاده از حیوانات آزمایشگاهی..... ۵۴
- س- عوامل مؤثر بر آلودگی و سقط..... ۵۵
- س-۱- سن گله..... ۵۵
- س-۲- میزبان های نهایی..... ۵۵
- س-۳- سایر گوشتخواران..... ۵۶
- س-۴- میزبان های واسط به غیر از گاو..... ۵۶
- س-۵- چرا، علوفه و آب شرب..... ۵۷
- س-۶- خوردن شیر یا آغوز..... ۵۷
- س-۷- تراکم گله و اندازه مزرعه..... ۵۸

- س-۸- آب و هوا..... ۵۸
- س-۹- تراکم جمعیت انسانی..... ۵۸
- س-۱۰- عوامل مرتبط با پادتن‌های ضد سایر..... ۵۹
- س-۱۱- پرورش..... ۵۹
- س-۱۲- فصل و نژاد..... ۵۹
- ع- درمان..... ۶۰
- ف- پیشگیری و کنترل..... ۶۱
- ص- پروتئین‌های نو ترکیب و اهمیت آنها..... ۶۳
- ق- سیستم‌های بیان ژن برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب..... ۶۳
- ق-۱- سیستم‌های باکتریایی..... ۶۴
- ق-۲- سیستم مخمیری و قارچی..... ۶۵
- ق-۳- حشرات..... ۶۶
- ق-۴- سلول پستانداران..... ۶۶

#### فصل سوم / مواد و روش کار

- الف-۱- مواد و وسایل مورد استفاده..... ۶۸
- الف-۱-۱- مواد مورد استفاده..... ۶۸
- الف-۱-۲- وسایل مورد نیاز..... ۷۰
- ب- روش کار..... ۷۱
- ب-۱- کشت سلولی انگل نئوسپورا کانینوم..... ۷۱

- ب-۲- استخراج DNA انگل نئوسپورا کانینوم..... ۷۲
- ب-۳- طراحی آغازگرهای مناسب..... ۷۲
- ب-۴- انجام واکنش PCR بر روی DNA استخراج شده از نئوسپورا کانینوم..... ۷۲
- ب-۵-۱- بررسی محصول PCR با الکترومورز در ژل آگارز..... ۷۴
- ب-۵-۱-۱- تهیه ژل آگارز..... ۷۴
- ب-۵-۱-۲- بارگذاری ژل و راه اندازی الکتروفورز..... ۷۴
- ب-۵-۲- خالص سازی محصول PCR..... ۷۵
- ب-۶- تعیین توالی محصول PCR و آنالیز توالی..... ۷۵
- ب-۷- تکثیر و خالص سازی وکتور..... ۷۵
- ب-۶-۱- استخراج پلاسمید..... ۷۷
- ب-۶-۱-۱- استخراج پلاسمید به روش miniprep..... ۷۷
- ب-۶-۱-۲- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت..... ۷۹
- ب-۷- مراحل کلونینگ..... ۷۹
- ب-۷-۱- هضم آنزیمی..... ۷۹
- ب-۷-۲- اتصال..... ۸۰
- ب-۷-۳- ترانسفورماسیون..... ۸۱
- ب-۸- بررسی نتایج کلونینگ..... ۸۱
- ب-۹- بررسی بیان پروتئین NCGRA7..... ۸۲
- ب-۹-۱- القاء بیان پروتئین با IPTG..... ۸۲

- ب-۹-۲- آزمایش SDS-PAGE..... ۸۲
- ب-۹-۲-۱- آماده سازی قالب و ژل پلی اکرلامید..... ۸۲
- ب-۹-۲-۲- آماده سازی نمونه ها و نردبان وزن مولکولی..... ۸۵
- ب-۹-۲-۳- آماده سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه..... ۸۶
- ب-۹-۲-۴- رنگ آمیزی پروتئین های الکتروفورز شده توسط رنگ آبی کوماسی..... ۸۷
- ب-۹-۳- وسترن بلاتینگ..... ۸۷
- ب-۱۰- خالص سازی پروتئین..... ۸۹
- ب-۱۱- اندازه گیری مقدار پروتئین نو ترکیب..... ۹۰
- ب-۱۲- آزمایش الایزا..... ۹۱
- ب-۱۲-۱- آزمایش الایزا با کیت تجاری..... ۹۱
- ب-۱۲-۲- انجام روش الایزای غیر مستقیم توسط کیت IDEXX..... ۹۱
- ب-۱۲-۳- طراحی آزمایش الایزا با استفاده از قطعه NcGRA7 نو ترکیب..... ۹۲
- ب-۱۲-۲-۱- بدست آوردن رقت های مناسب آنتی ژن، سرم و کونژوگه در آزمایش الایزا..... ۹۳
- ب-۱۲-۲-۲- روش آزمایش الایزای استاندارد شده برای نمونه های مورد بررسی..... ۹۶
- ب-۱۲-۲-۳- روش تعیین نقطه برش..... ۹۷
- ب-۱۲-۲-۴- آنالیز آماری..... ۹۸

#### فصل چهار / نتایج

- الف- آماده سازی محصول PCR ژن NcGRA7 و وکتور برای کلونینگ..... ۱۰۰
- الف-۱- طراحی پرایمر..... ۱۰۰

|  |        |
|--|--------|
| الف- استخراج DNA و آزمایش PCR                                  | ۱۰۰    |
| الف-۳- تعیین توالی ژن GRA7 تکثیر شده در آزمایش PCR             | ۱۰۱    |
| الف-۴- تکثیر و خالص سازی پلاسمید                               | ۱۰۱    |
| الف-۵- هضم آنزیمی  | ۱۰۲    |
| ب- کلونینگ و بررسی نتایج آن                                    | ۱۰۳    |
| ج- بررسی بیان پروتئین NcGRA7                                   | ۱۰۴    |
| د- ۱- ایمونوبلات   | ۱۰۵    |
| د- ۲- خالص سازی پروتئین با ستون کروماتوگرافی                   | ۱۰۶    |
| ه- اندازه گیری مقدار پروتئین                                   |        |
|  | NcGRA7 |
|  | ۱۰۷    |
| و- استاندارد نمودن الایزا با پروتئین نو ترکیب                  |        |
|  | NcGRA7 |
|  | ۱۰۷    |
| ز- تجزیه و تحلیل آماری داده-                                   |        |
| ها   | ۱۰۸    |
| ز-۱- شیوع سرمی نشوسپورا  |        |
| کانینوم  | ۱۰۸    |
| ز-۲- تجزیه و تحلیل نتایج کیفی حاصل از کیت IDEXX والایزای طراحی |        |
|  | NcGRA7 |
|  | ۱۱۰    |

ز-۳- مقایسه الایزای طراحی شده با NcGRA7 و کیت IDEXX در گاومیش.....۱۱۰

ز-۴- مقایسه الایزای طراحی شده با NcGRA7 و کیت IDEXX در گاو.....۱۱۰

### فصل پنجم / بحث و نتیجه گیری

بحث و نتیجه گیری.....۱۱۳

پیشنهادات.....  
۱۲۵

فصل ششم / منابع  
منابع.....  
۱۲۷

چکیده انگلیسی.....  
۱۴۸

جدول ۱-۳. برنامه حرارتی بهینه استفاده شده در واکنش ..... ۷۳

جدول ۲-۳ مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل جدا کننده ..... ۸۴

جدول ۳-۳ مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل متراکم کننده ..... ۸۴

جدول ۳-۴ وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در نردبان وزنی مولکولی به همراه الگوی

الکتروفوروز نیک آن‌ها بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد ..... ۸۵

جدول ۴-۱- توزیع فراوانی سرمی موارد مثبت و منفی نئوسپورا کانینوم با استفاده از کیت

IDEXX در گاو و گاومیش ..... ۱۰۹

جدول ۴-۲- توزیع فراوانی سرمی موارد مثبت و منفی نئوسپورا کانینوم با استفاده از الیزای

طراحی شده بر اساس NcGRA7 در گاو و گاومیش

گاومیش ..... ۱۰۹

جدول ۴-۳- نتایج حاصل از آزمایش سرم‌های فیلدی گاومیش با کیت تجاری و الیزای طراحی

شده NcGRA7 ..... ۱۱۱

جدول ۴-۴- نتایج حاصل از آزمایش سرم‌های فیلدی گاو با کیت تجاری و الیزای طراحی شده

NcGRA7 ..... ۱۱۱



| صفحه     | فهرست تصاویر   | تصویر     |
|----------|--|-----------|
| ۱۴.....  | مراحل مختلف سیر تکاملی.....  | تصویر ۱-۲ |
| ۱۵.....  | مراحل زندگی <i>نئوسپورا کانینوم</i> در سگ.....   | تصویر ۲-۲ |
| ۲۶.....  | انتقال <i>نئوسپوروزیس</i> در گاو.....  | تصویر ۳-۲ |
| ۴۱.....  | مقاطع بافت شناسی جفت گاو.....  | تصویر ۴-۲ |
| ۴۳.....  | مقطع بافت شناسی از جنین گاو.....   | تصویر ۵-۲ |
| ۴۴.....  | آسفالومیلیت ناشی از <i>نئوسپورا کانینوم</i> در جنین و گوساله‌هایی که به طور طبیعی آلوده شده‌اند..... | تصویر ۲-۶ |
| ۴۵.....  | نکروز و ضایعات التهابی در جنین گاو.....  | تصویر ۷-۲ |
| ۷۵.....  | نقشه وکتور <i>pMAL-c2X</i> و خصوصیات آن.....   | تصویر ۱-۳ |
| ۹۳.....  | نمای شماتیک از پروتئین کامل و ناقص <i>MBP</i> .....  | تصویر ۲-۳ |
| ۱۰۱..... | محصول <i>PCR</i> .....   | تصویر ۱-۴ |
| ۱۰۲..... | پلاسمید استخراج شده با استفاده از کیت ویوانتیس.....  | تصویر ۲-۴ |
| ۱۰۲..... | محصول هضم پلاسمید.....   | تصویر ۳-۴ |
| ۱۰۳..... | نتایج هضم آنزیمی بر روی پلاسمیدهای نوترکیب.....  | تصویر ۴-۴ |
| ۱۰۴..... | نتایج <i>PCR</i> کلون‌ها.....  | تصویر ۵-۴ |
| ۱۰۵..... | <i>TG1</i> ترانسفورمه شده با ساختار <i>pMAL-c2X- NcGRA7</i> .....                                    | تصویر ۶-۴ |

تصویر ۴-۷. چگونگی واکنش پروتئین NcGRA7 بیانی با سرم مثبت دارای آنتی‌بادی

ضد نئوسپورا کانینوم..... ۱۰۶

تصویر ۴-۸. پروتئین‌های خالص شده با ستون کروماتوگرافی رزین آمیلوز..... ۱۰۷

## چکیده پایان نامه

|   |                  |
|---|------------------|
| نام خانوادگی: کفایت   | نام: مرضیه       |
| عنوان پایان نامه: ارزیابی پروتئین نوترکیب <b>Nc1GRA7</b> در تشخیص آنتی بادی های ضد <i>نئوسپورا کانینوم</i> در گاو و گاو میش به روش الایزا   |                  |
| استاد راهنما: دکتر حسین حمیدی نجات  |                  |
| درجه تحصیلی: دکتری تخصصی  | رشته: انگل شناسی |
| گرایش: دامپزشکی   |                  |
| دانشگاه: شهید چمران اهواز   |                  |
| دانشکده: دامپزشکی   |                  |
| تاریخ فارغ التحصیلی:  | تعداد صفحه:      |
| کلید واژه ها: <i>نئوسپورا کانینوم</i> ، <b>NcGRA7</b> ، کلونینگ، بیان، الایزا   |                  |
| <p><i>نئوسپورا کانینوم</i> تک یاخته ای از شاخه اپی کمپلکسا بوده و طیف وسیعی از حیوانات خونگرم را آلوده می کند و عامل مهم سقط در گاو می باشد.</p> <p>آنتی ژن گرانول متراکم ۷ (<b>NcGRA7</b>) یک پروتئین ایمونودامینانت مهم و قابل اعتماد در تشخیص <i>نئوسپوروزیس</i> در گاو می باشد. هدف از تحقیق حاضر، تولید آنتی ژن نوترکیب <b>NcGRA7</b> و استفاده از آن در تدوین آزمایش الایزا و مقایسه ارزش تشخیصی آن با کیت تجاری الایزا می باشد. بدین منظور قطعه ای از DNA انگل مربوط به <b>GRA7</b> با استفاده از آزمون <b>PCR</b> تکثیر یافت. پس از تأیید ردیف نوکلئوتیدی محصول <b>PCR</b> در پلاسمید <b>pMAL-c2X</b> کلون و پروتئین در باکتری <i>E.coli</i> سویه <b>TG1</b> بیان و با وسترن بلات تأیید شد. پس از خالص سازی پروتئین نوترکیب <b>NcGRA7</b> با استفاده از</p> |                  |

رزین آمیلوز و تعیین غلظت پروتئین نو ترکیب، آزمایش الایزا با استفاده از آنتی ژن نو ترکیب NcGRA7 جهت تشخیص آنتی بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* برای سرم های گاو و گاومیش طراحی گردید. تیتراژ آنتی بادی ۱۰۸ سرم گاو و ۱۲۲ سرم گاومیش با استفاده از الایزاهای استاندارد شده با NcGRA7 و کیت تجاری الایزای (IDEXX) تعیین گردید. حساسیت و ویژگی این تست برای الایزاهای طراحی شده با NcGRA7 برای سرم های گاومیش به ترتیب ۹۰ و ۹۷ درصد و برای سرم های گاو به ترتیب ۹۱ و ۹۴ درصد بود.

شیوع سرمی *نئوسپورا کانینوم* در ۱۰۸ نمونه سرم های گاو جمع آوری شده از اطراف اهواز در کیت الایزای تجاری IDEXX، ۵۳/۷۰ درصد و در الایزای طراحی شده NcGRA7، ۵۱/۸۵ درصد بود و در ۱۲۲ نمونه سرمی گاومیش در کیت الایزای تجاری IDEXX و الایزای طراحی شده با NcGRA7 به ترتیب ۵۶/۵۵ و ۵۷/۳۷ درصد بود. اختلاف معنی داری بین دو تست کیت الایزای تجاری IDEXX و الایزای طراحی شده با NcGRA7 مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ). درجه تطابق تقریباً کاملی بین نتایج دو تست در الایزاهای طراحی شده برای گاو و گاومیش وجود داشت. آماره کاپا در الایزای طراحی شده برای سرم های گاو ۰/۸۵ و در الایزای طراحی شده برای سرم های گاومیش ۰/۸۳ بود ( $P < 0/001$ ).

نتایج نشان داد که الایزای طراحی شده بر اساس آنتی ژن نو ترکیب NcGRA7 تستی قابل اعتماد برای تشخیص آنتی بادی اختصاصی در آلودگی *نئوسپورا کانینوم* تحت شرایط مزرعه به نظر می رسد.