مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره دوم (پیاپی ۱۵) تابستان ۱۳۹۲
صفحات ۱۳۷-۱۳۲

Original Article

کشت معلق *نئوسپورا کنینوم* با استفاده از لنفوسیت ترانسفورم شده با *تیلریا لستوکاردی*

شمسی اژدهاکش پور*[۱]، محمد مهدی نام آوری[۲]، ناهید نقشگر[۱]، عبدالله رحیمیان[۳]، مریم منصوریان[۳]، معصومه حیاتی[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی، [۳] کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *نئوسپورا کنینوم* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده سقط جنین گاو در جهان به شمار می‌رود. تولید انبوه این تک یاخته در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از کشت سلولی و رده‌های سلولی مختلف انجام می‌گردد. از طرفی استفاده از رده های سلولی معلق در تولید انبوه فرآورده‌های بیولوژیک بسیار مقرون به صرفه است. هدف از این مطالعه بررسی امکان کشت تک یاخته *نئوسپورا کنینوم* با استفاده از رده سلولی معلق Ka6 می‌باشد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت تجربی پس از کشت تاکی‌زوئیت *نئوسپورا کنینوم* بر روی رده سلولی Ka6 انجام شد. سپس توانایی این رده سلولی با رده سلولی Vero که در حال حاضر بهترین رده سلولی برای کشت *نئوسپورا* است با روش رنگ سنجی MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج این پژوهش نشان داد که تاکی‌زوئیت‌های *نئوسپورا کانینوم* به خوبی درون سلول‌های Ka6 وارد، تکثیر و از این سلول‌ها خارج شده‌اند. همچنین تکثیر تاکی‌زوئیت‌های این تک یاخته در هر دو رده سلولی Ka6 و Vero نسبت به گروه کنترل معنی دار بود. اما میزان تکثیر *نئوسپورا* بر روی رده سلولی Ka6 تفاوت معنی داری نسبت به رده سلولی Vero نداشت.

نتیجه گیری: این مطالعه اولین گزارش موفق آمیز کشت تک یاخته *نئوسپورا کنینوم* با استفاده از رده سلولی معلق می باشد. از آن‌جایی که رده سلولی Ka6 یک لنفوسیت ترانسفورم شده است و به دلیل امکان کشت آن به صورت معلق در سطح انبوه در بیوراکتور، استفاده از آن نسبت به رده سلولی Vero ارجحیت دارد.

واژگان کلیدی: *نئوسپورا کنینوم*، رده سلولی عفونی با *تیلریا لستوکاردی*، کشت سلولی معلق، رنگ سنجی MTT

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۱

مقدمه

نئوسپورا کنینوم (*Neospora caninum*) یک انگل دو میزبانه متعلق به خانواده *سارکوسیستیده* و شاخه *اپی‌کمپلکسا* می‌باشد. در حال حاضر سگ و گرگ به عنوان میزبان های نهایی و نشخوار کنندگانی مانند گاو به عنوان میزبان حد واسط این انگل شناخته شده‌اند.

نئوسپورا کنینوم در چرخه زندگی خود دارای سه مرحله به نام‌های تاکی‌زوئیت، برادی‌زوئیت و اوسیست می‌باشد (۳-۱). مطالعات نشان می‌دهد که انگل *نئوسپورا کنینوم* با ایجاد ضایعاتی در مغز و قلب می‌تواند به عنوان یک عامل اولیه در سقط جنین گاو محسوب گردد (۱ و ۴). تا کنون روش های تشخیصی بسیاری از جمله سرم شناسی، هیستوپاتولوژی، ایمونوهیستوشیمی، روش‌های مولکولی، کشت سلولی و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی به منظور شناسایی آلودگی دام‌ها به

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۷۶۱۴۹۷۰۶ پست الکترونیک: sh.ezhdahakosh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

نئوسپورا کنینوم مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۵).

تولید انبوه این تک یاخته در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از کشت سلولی انجام می‌شود. تا کنون رده‌های کشت سلولی مانند Vero (۵)، سلول اندوتلیال گاو، فیبروبلاست‌های سگ و سلول‌های کراتینوسیت موش (۸-۶) به منظور کشت *نئوسپورا کنینوم* مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در حال حاضر رده سلولی Vero به عنوان متداول‌ترین رده سلولی برای کشت و تکثیر این تک یاخته در آزمایشگاه استفاده می‌شود (۴، ۹ و ۱۰).

به طور کلی استفاده از رده‌های سلولی معلق در تولید انبوه فرآورده‌های بیولوژیک نسبت به رده‌های سلولی چسبیده مقرون به صرفه‌تر است (۷). هدف از این پژوهش، بررسی امکان کشت تک یاخته *نئوسپورا کنینوم* با استفاده از رده سلولی معلق Ka6 بود.

مواد و روش‌ها

الف) کشت تاکی‌زوئیت‌های نئوسپورا کنینوم بر روی رده سلولی Ka6: در ابتدا ۵۰۰۰ سلول از دو رده سلولی Ka6 و Vero (به عنوان کنترل مثبت) در دو فلاسک ۲۵ سانتی متر مربعی کشت داده شد. این رده سلولی Ka6 به تازگی از گاو مبتلا به *تیلریا لستوکاردی* در موسسه رازی شیراز تولید شده بود. ۲۴ ساعت پس از رشد سلول‌ها درگرمخانه، تاکی زوئیت‌های شمارش شده *نئوسپورا کانینوم* (۵۰۰۰۰ تاکی‌زوئیت) بر روی سلول‌ها ریخته شدند. سپس فلاسک ها برای مشاهده کیست‌ها و تاکی‌زوئیت‌های تک یاخته هر روز مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱).

ب) ارزیابی حساسیت توسط آزمون MTT: در ابتدا مقدار ۵۰۰۰ سلول از هر کدام از رده‌های سلولی Ka6 و Vero (به عنوان سلول کنترل) به طور مساوی در پلیت‌های ۹۶ حفره ای توزیع شدند (۱۲). سپس محیط کشت DMEM، سرم ۱۰ درصد (سرم اسب برای Ka6 و سرم جنین گوساله برای سلول Vero) و آنتی بیوتیک (۱ درصد) به پلیت‌ها اضافه و به مدت یک شبانه روز در گرمخانه نگهداری شدند. مقدار ۵۰۰۰۰ تاکی زوئیت *نئوسپورا کنینوم* به کمک لام نئوبار شمارش و به چاهک‌ها اضافه گردید.

ج) محاسبه تعداد سلول‌های زنده: محیط رویی چاهک‌ها تخلیه و ۲۰ میکرولیتر معرف MTT به آن ها اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۴ ساعت در گرمخانه نگهداری شدند. به منظور حل کردن کریستال‌های تشکیل شده، ۱۵۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Solfoxide) به چاهک‌ها اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شدند (۱۰). میزان جذب نوری پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده ELISA اندازه گیری و میانگین OD (Optimum Density) آن ها محاسبه گردید. نتایج به دست آمده با استفاده از سایت www.grafpad.com مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

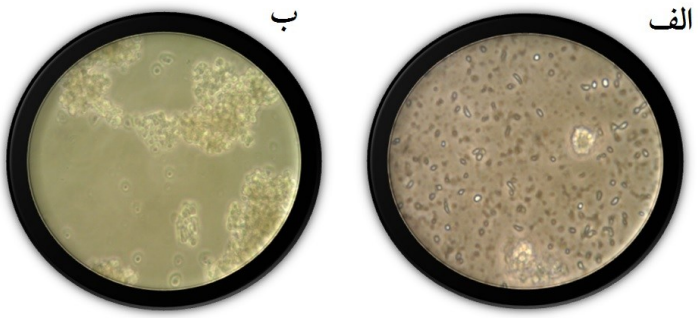
نتایج نشان داد که تاکی‌زوئیت‌های این تک یاخته به خوبی درون سلول‌های Ka6 وارد، تکثیر و از این سلول ها خارج شده‌اند (شکل ۱). همچنین ارزیابی روش MTT (با استفاده از سایت www.grafpad.com) نشان داد که تکثیر تاکی‌زوئیت‌های *نئوسپورا کانینوم* در هر دو رده سلولی Ka6 و Vero نسبت به گروه کنترل معنادار ($p<0/001$) بوده است. اما میزان تکثیر این تک یاخته بر روی رده سلولی Ka6 نسبت به رده سلولی Vero معنادار نبود ($p>0/001$) (نمودار ۱).

بحث

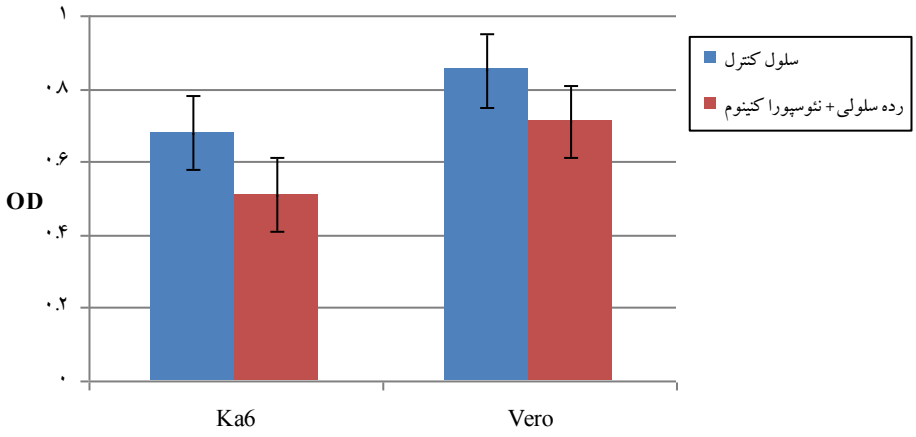
اولین بار در سال ۱۹۸۷ زمانی که انگل *نئوسپورا کانینوم* از یک سگ بیمار جدا شد، به منظور کشت آن از سلول های مونوسیت و سلول های اندوتلیال سرخرگ قلبی شششی گاو استفاده گردید. از آن پس تاکی زوئیت و برادی زوئیت های *نئوسپورا کنینوم* به وفور در آزمایشگاه کشت داده شده اند (۴). بارتلی (Bartley) و همکاران از تاکی زوئیت های تضعیف شده در سلول Vero جهت آزمایش ایمنی زایی در موش BALB/c استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد که موش های تلقیح شده با این تاکی زوئیت ها علائم بالینی خفیفی را نشان داده و توانسته

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: رده سلولی Ka6. الف) ۲۴ ساعت پس از تلقیح تاکی‌زوئیت‌های *نئوسپورا کنینوم*. ب) تکثیر و خروج تاکی‌زوئیت‌ها ۴۸ ساعت پس از تلقیح.



نمودار ۱: مقایسه قابلیت تکثیر *نئوسپورا کنینوم* توسط سلول‌های Ka6 و Vero (با در نظر گرفتن $p<0/001$)

اند پاسخ ایمنی مناسبی را بر علیه نئوسپوروسیس ایجاد نمایند (۵). تا کنون سلول‌های چسبیده زیادی به منظور کشت سلولی *نئوسپورا کنینوم* استفاده شده‌اند. اما از میان آن ها رده سلولی Vero بهترین رده سلولی شناخته شده برای تکثیر تک یاخته درون سلولی *نئوسپورا کانینوم* می‌باشد (۸ و ۱۰). اما از آنجائی که در تولید انبوه فرآورده‌های بیولوژیک عموماً استفاده از رده‌های سلولی معلق نسبت به رده‌های سلولی چسبیده مقرون به صرفه‌تر است (۷)، در مطالعه حاضر تاکی زوئیت های *نئوسپورا کنینوم* به صورت معلق بر روی رده سلولی Ka6 کشت داده شدند. از نظر ظاهری در بررسی داخل فلاسک کشت سلولی تاکی زوئیت‌های این تک یاخته در سلول های Ka6 به خوبی تکثیر پیدا کرده بودند (شکل ۱). همچنین در بررسی حساسیت با آزمون MTT نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تکثیر تاکی‌زوئیت‌های *نئوسپورا کنینوم* در هر دو رده سلولی Ka6 و Vero نسبت به گروه کنترل معنادار بوده است ($p<0/001$). این امر نشان دهنده حساسیت بالای هر دو رده سلولی می‌باشد. از طرفی اختلاف معناداری میان میزان تکثیر این تک یاخته بر روی رده سلولی Ka6 در مقایسه با رده

www.SID.ir

سلولی Vero مشاهده نگردید. بنابراین با توجه به این‌که رده سلولی Ka6 یک لنفوسیت ترانسفورم شده است و امکان کشت آن به صورت معلق در سطح انبوه با استفاده از بیوراکتورها وجود دارد نسبت به رده سلولی Vero ارجحیت دارد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر اولین گزارش موفق آمیز کشت تک یاخته *نئوسپورا کنینوم* با استفاده از یک رده سلولی معلق می باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که به دلیل معلق بودن و سرعت رشد خوب رده سلولی Ka6 می‌توان این سلول را به عنوان یک سلول حساس و ایده‌آل به منظور کشت و تکثیر تک یاخته *نئوسپورا کنینوم* در نظرگرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Heidari H. *Neospora caninum* a newly identified protozoa. 1st ed. Hamedan, Daneshjo Press; 2008.
2. Anderson ML, Andrivo AG, Conard PA. Neosporosis in cattle. Anim Reprod Sci. 2000; 60-61: 417-431.
3. Dubey JP. Neosporosis in cattle. J Parasitol. 2003; 89: 42-56.
4. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animal. Korean J Parasitol. 2003; 41(1): 1-16.
5. Bartley PM, Wright SE, Maley SW, Buxton D, Nath M, Innes EA. The development of immune responses in BALB/c mice following inoculation with attenuated or virulent *Neospora caninum* tachyzoites. Parasite Immunol. 2009; 31(7): 392-401.
6. Mannan BA. Encyclopedia of cell culture. 2ed ed. Delhi, India. Mehra Offset Press; 2008.
7. Lubiniecki AS. Continuous cell culture technology. In: Lubiniecki AS. Large-scale mammalian cell culture technology. New York. Marcel Dekker; 1987: 495-513.
8. Vonlaufen V, Guetg N, Naguleswaran A, Müller N, Björkman C, Schares G, Blumroeder DV, Ellis J, Hemphill A. In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in Vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. Infect Immun. 2004; 72 (1): 576-583.
9. Hemphill A, Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 2000; 30(8): 877-924.
10. De Meerschaman F, Rettigner C, Focant C, Boreux R, Pinset C, Leclipteux, T, Losson B. Use of a serum-free medium to produce in vitro *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites on Vero cells. Vet Res. 2002; 33(2): 159-168.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(8): 3727-3729.

12. Saravanan BC, Sreekumar C, Bansal GC, Ray D, Rao JR, Mishra AK. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. Vet Parasitol. 2003; 113(3-4): 211-216.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 2, June 2013

Original Article

Suspension culture of *Neospora caninum* using lymphocyte transformed by *Theileria lestoquardi*

Shamsi Ezhdahakoshpour[1], Mohammad Mehdi Namavari[2], Nahid Naghshgar[1], Abdollah Rahimian[3], Maryam Mansoorian[3], Masoomeh Hayati[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran.

[2]Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran.

[3]M.Sc., Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Neospora caninum* is one of main etiologic factors of abortion in in cattle. The mass production of protozoa in laboratory conditions is performed based on growing in different cell lines. Since using suspension cell lines are very cost effective for mass production of biological products, this study aimed to evaluate the suspension cell culturing for production of this protozoan.

Materials and Methods: This study was experimentally performed bases on growth of *N. caninum* tachyzoites on Ka6 cell line (a cell line obtained from cattle infected with *Theileria lestoquardi*, Razi Institute, Shiraz, Iran. Next, based on MTT assay, ability of this cell culture for production of *N. caninum* was compared with Vero cell as the best current cell line for this purpose.

Results: The results showed that *N. caninum* tachyzoites could enter into K6a cell lines and after replication released from the cells successfully. Replication of the tachyzoites was significant in both Vero and K6a cell lines in compare to the control.

Conclusion: To our knowledge, this is the first and successful report of suspension culture of *N. caninum* tachyzoites. Although, the rate of *N. caninum* proliferation on Ka6 cell line did not show any significant difference in compare to Vero cell line, since Ka6 cell line is a transformed lymphocytic cell and it is possible to grow massively this cell line as suspension bioreactors, it is preferred to Vero cell line.

Keywords: *Neospora caninum*, *Theileria lestoquardi* infected cell line, Suspension culture, MTT assay.

Correspondance to: Shamsi Ezhdahakoshpour

Tel: +989176149706

E-mail: sh.ezhdahakosh@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(2): 132-137.

Archive of SID

www.SID.ir