Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109230

مطالعه کاهش حدت *نئوسپورا کنینوم* بعد از پاساژهای متوالی روی رده سلولی J774

• **پریا بیگی**
گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
• **مهدی نام آوری (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **نعمت‌الله رزمی**
گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
تاریخ دریافت: فروردین ۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۵
Email: namavari@yahoo.com

چکیده

هدف از این مطالعه، ایجاد تخفیف حدت در تک یاخته‌ی *نئوسپورا کانینوم (Neospora caninum)* از طریق پاساژ متوالی روی رده سلولی J774 و ارزیابی میزان حدت آن در موش BALB/c بود. ایزوله شماره یک *نئوسپورا کانینوم* بر روی رده سلولی J774 ۹۰ مرتبه پاساژ داده شد تا سوش تخفیف حدت‌یافته تولید شود؛ سپس ۳۵ سر موش BALB/c ماده با متوسط سن شش تا هشت هفته به صورت تصادفی به هفت گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. به گروه اول به عنوان شاهد فقط محیط کشت، به گروه دوم و سوم و چهارم سوش حاد Nc1 با دوزهای 5×10^6، 10×10^6 و 20×10^6 و به گروه پنجم، ششم و هفتم سوش تخفیف حدت یافته Nc1 با دوزهای 5×10^6، 10×10^6 و 20×10^6 به صورت زیر جلدی تزریق شد. تمامی موش‌ها به صورت روزانه بررسی و نشانه‌های بیماری و تلفات احتمالی موش‌ها ثبت گردید. در این مطالعه ایمنی سلولی با آزمایش جلدی و ایمنی هومورال با آزمایش الایزا بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد موش‌هایی که سوش تخفیف حدت یافته را دریافت کرده بودند، نه تنها تلف نشدند بلکه علائم بیماری را نیز نشان ندادند. به علاوه پاسخ ایمنی هومورال و سلولی نیز در آن ها نسبت به گروه‌های دریافت کننده سوش حاد به طور معنی داری بالاتر بود. در جمع بندی نهایی این مطالعه نشان داد که با استفاده از رده سلولی J774 که یک سلول دفاعی می‌باشد، می‌توان به طور معنی‌داری بیماری‌زایی سوش حاد Nc1 را کاهش داد؛ لذا این روش می‌تواند روش مناسبی برای تحقیقات آتی در راستای دستیابی به واکسن زنده تخفیف حدت یافته باشد.

کلمات کلیدی: *نئوسپورا کانینوم*، BALB/c، J774

www.SID.ir

Archive of SID

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 128-135

Study on the attenuation of ***Neospora caninum*** after continuous passage on J774 cell line

By: Beigi, P., Group Bioshimi, Islamic Azad University, Shiraz Branch. Namavari, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran. and Razmi, N., Biochemistry Group, Islamic Azad University Branch Shiraz.

Email: namavari@yahoo.com

Received: 2016-04-19 Accepted: 2016-06-07

The aim of this study was to establish attenuated *Neospora caninum* (NC-1) tachyzoites through serial passage by J774 cell line. The virulence of attenuated tachyzoites for Balb/c mice was also evaluated. The NC-1 isolates were passaged 90 times in J774 cell line to produce a high-passage or attenuated strain. A total of 35 female BALB/c mice with an average age of six to eight weeks were randomly separated into seven groups. The first group as a control was inoculated subcutaneously with cell culture media and the second, third and fourth groups received low passage or acute NC-1 strain with different doses (5×10^6, 10×10^6, 20×10^6) of tachyzoites. The other three groups were inoculated with high-passage of NC-1 tachyzoites with similar doses. The mortality rate and pathological changes in all groups were noted daily. The cellular and humoral immunity were assessed by Skin test and ELISA, respectively. The results of the present study showed that the groups that received high-passage strain of Nc1 not only survived, but did not show pathological changes of neosporosis. In addition, cellular and humoral immune responses to NC-1 were significantly higher in mice that received high-passage tachyzoites of NC-1. These findings indicated that the serial passages of NC-1 in J774 cell line significantly led to decrease the virulence of NC-1. This attenuated tachyzoite could be used as a candidate for further research to develop live vaccines against *Neospora caninum.*

Key words: *Neospora caninum*, J774, Balb/c

مقدمه

تک یاخته نئوسپورا کانینوم عامل نئوسپوروزیس (Neosporosis) است، این انگل داخل سلولی اجباری از شاخه‌ی اپی‌کمپلکسا می‌باشد.عفونت نئوسپوروزیس انتشار جهانی داشته و باعث آلودگی میزبان‌های مختلف از جمله گاو، گوسفند، بز، گوزن، اسب، سگ، گربه و موش می‌گردد و همچنین ضررهای اقتصادی قابل توجهی را با سقط جنین، مرده زائی و تولد گوساله ضعیف باعث می‌گردد (۱۹). عفونت نئوسپوروزیس به عنوان یک بیماری مهم اقتصادی در صنعت دامپروری شناخته شده است (۵). با توجه به طبیعت داخل سلولی انگل پاسخ های ایمنی سلولی نقش مهمی جهت محافظت میزبان علیه انگل دارند (۱۴). چند روش برای کنترل بیماری ناشی از *نئوسپورا کانینوم* وجود دارد که شامل حذف جانور آلوده ازگله و یا جلوگیری از جفت‌گیری آن، درمان‌های آنتی بیوتیکی و واکسیناسیون می‌باشد. از آنجا که دیگر راه‌های کنترل بیماری بسیار هزینه بردار می‌باشد، استفاده از واکسیناسیون بهترین روش جهت کنترل این آلودگی است (۴).

خرداد مهر و همکاران (۲۰۱۳) برای اولین بار تأثیر چشمگیر رده سلولی J774 را در تخفیف حدت نئوسپورا کانینوم با استفاده از تخم مرغ جنین دار به عنوان حیوان مدل آزمایشگاهی نشان دادند، به طوری که بعد از سه ماه پاساژ متوالی *نئوسپورا کانینوم* روی رده سلولی J774، تلفات در گروه‌های دریافت کننده سوش تخفیف حدت یافته در مقایسه با گروه‌های سوش حاد به شدت کاهش یافته بود. از آن‌جایی که در حال حاضر بیشترین امید برای دستیابی به واکسن *نئوسپورا کانینوم* در تهیه‌ی سوش زنده غیربیماری‌زا است (۱۳)، هدف از این بررسی تکمیل مطالعه خرداد مهر و همکاران بود، چرا که در مطالعه آن‌ها *نئوسپورا کانینوم* به مدت سه ماه پاساژ داده شده بود و گرچه میزان کاهش حدت تک یاخته مذکور قابل ملاحضه بود ولی همچنان دردوز $۱/۵\times۱۰^۴$ موجب تلفات ده درصدی در تخم مرغ‌های جنین دار میشد، لذا در مطالعه حاضر ضمن افزایش مدت زمان پاساژ، بررسی بیماری‌زایی و ایمنی زایی سوش تخفیف حدت یافته در موش انجام گرفت، زیرا اگرچه تخم مرغ جنین یک مدل حیوانی نسبتا مناسب برای ارزیابی حدت تک یاخته‌هایی مانند *نئوسپورا کانینوم* (۱۶)، توکسوپلاسما (۲۱) و بسنوئیتیا (۱۸)، می‌باشد، ولی از لحاظ بررسی پاسخ ایمنی مدل مناسبی نیست. باید توجه داشت این احتمال وجود دارد که پاساژ طولانی مدت تک یاخته روی رده سلولی J774 می‌تواند علاوه برحدت بر روی توانایی ایجاد پاسخ ایمنی نیز تاثیر بگذارد لذا انجام این مطالعه در موش کاملا ضروری بود تا از قدرت ایمنی زایی سوش تخفیف

www.SID.ir

Archive of SID

حدت یافته اطمینان حاصل شود.

مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی J774 و Vero از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه شد. شرایط کشت هر دو سلول یکسان هست بدین صورت که از محیط کشت سلولی DMEM و ۱۰درصد سرم جنین گاو به همراه آنتی بیوتیک با مقادیر ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ضد قارچ آمفوتریسین استفاده شد. در این مطالعه از ایزوله‌ی شماره یک *نئوسپورا کانینوم* (Nc1) موجود در موسسه رازی شیراز استفاده شد و طبق روش خرداد مهر و همکاران (۲۰۱۳)، اقدام به کشت و تخفیف حدت Nc1 روی رده‌ی سلولی J774 شد. بدین صورت که بعد از اضافه کردن تک یاخته، کشت به صورت روزانه مشاهده گردید و وقتی ۸۰ تا ۹۰ درصد تخریب سلولی مشاهده شد تاکی‌زوئایت‌ها برداشت و در فلاسک جدید پاساژداده شدند. این روند روی سلول J774 به مدت یک سال ادامه داشت و محصول نهایی به عنوان سوش تخفیف حدت یافته درنظر گرفته شد و سوش حاد نیز طی چند بار پاساژ روی رده سلولیVero به اندازه کافی جمع‌آوری گردید. تاکی‌زوئایت‌های سوش حاد و تخفیف حدت یافته‌ی *نئوسپورا کانینوم* پس از جمع‌آوری از روی سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شدند تا دوزهای مورد نظر جهت تزریق آماده گردید .

در مرحله بعد ۳۵ سر موش BALB/c ماده شش تا هشت هفته به صورت تصادفی به هفت گروه پنج تایی تقسیم شدند. هر گروه در قفس های جداگانه قرار داده شد و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند. از غذای تولیدی موسسه رازی و آب تصفیه شده برای تغذیه استفاده گردید. به گروه اول به عنوان کنترل محیط کشت سلولی به میزان ۵۰۰ میکرولیتر، به گروه دوم و سوم و چهارم سوش حاد Nc1 با دوزهای ۵×۱۰^{۶}، ۱۰×۱۰^{۶} و ۲۰×۱۰^{۶} و به گروه پنجم، ششم و هفتم سوش تخفیف حدت یافته Nc1 با دوزهای ۵×۱۰^{۶}، ۱۰×۱۰^{۶} و ۲۰×۱۰^{۶} به صورت زیر جلدی تلقیح شد. تمامی موش‌ها به صورت روزانه بررسی و نشانه‌های بیماری و تلفات احتمالی موش‌ها ثبت می‌گردید. بیست و یک روز بعد از تزریق از تمامی موش‌های زنده مانده جهت انجام آزمایش الایزا خون‌گیری شد و سپس سرم آنها جدا شد. آزمایش الایزا بر اساس روشی که ویلیامز و همکاران (۱۹۹۷) ارائه کردند، انجام گرفت (۲۳). در این روش از ۲×۱۰^{۶} تاکی‌زوئایت *نئوسپورا کانینوم* کشته و تثبیت‌شده توسط فرمالین در هر چاهک پلیت الایزا به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد و سرم‌ها نیز با رقت ۱/۵۰مورد ارزیابی قرار گرفتند.

در انتهای هفته‌ی چهارم آزمون جلدی جهت بررسی ایمنی سلولی انجام گرفت (۱۸). برای آزمایش جلدی ابتدا به کف پای راست هر موش تاکی‌زوئایت های تثبیت‌شده نئوسپورا با فرمالین به میزان ۱۰×۱۰^{۶} در حجم ۵۰ میکرولیتر PBS به صورت زیر جلدی تلقیح شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان تغییر ضخامت در مقایسه با پای چپ موش ها که با ۵۰ میکر.لیتر PBS تلقیح شده بودند، توسط کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر تعیین و ثبت گردید.

ارزیابی آماری

آنالیز نتایج الایزا و آزمایش جلدی با روش آماری t test و از طریق سایت آماری Graph Pad انجام شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تغییرات موش‌ها بعد از تزریق

۱-موش‌های گروه شاهد-گروه اول که فقط محیط کشت را به روش

جدول ۱- میزان تلفات گروهای مختلف موش‌ها پس از تزریق سوش حاد و سوش تخفیف حدت‌یافته *نئوسپورا کنینوم* (گروه های پنج تایی).

	تلفات بعد از تزریق (روز)			
دوز تزریق ($\times۱۰^{۶}$)	۱۰	۱۴	۱۸	جمع کل
۵ (سوش حاد Nc۱)	۰	۰	۱	۱
۱۰ (سوش حاد Nc۱)	۲	۳	۰	۵
۲۰ (سوش حاد Nc۱)	۵	۰	۰	۵
۵ (سوش تخفیف حدت‌یافته Nc۱)	۰	۰	۰	۰
۱۰ سوش تخفیف حدت‌یافته Nc۱)	۰	۰	۰	۰
۲۰ (سوش تخفیف حدت‌یافته Nc۱)	۰	۰	۰	۰
شاهد	۰	۰	۰	۰

www.SID.ir

Archive of SID

زیـــر جلدی دریافت کرده بودند تا مرحله‌ی آخر آزمایش یعنی یک ماه بعد از تزریق زنده و سالم ماندند.

۲-موش‌های تلقیح شده با سوش حاد *نئوسپورا کانینوم* - درگروه دوم که تاکی‌زوئایت *نئوســـپورا کانینوم* حاد با دوز ۵×۱۰^{۶} دریافت کرده بودند، یک موش در روز هجدهم بعد از تلقیح تلف شـــد، یک موش نیز در انتهای هفته ســـوم علائم بیماری عصبی مانند چرخش به دور خود داشت و مابقی موش‌ها هیچ علامتی از خود نشـــان ندادند. در گروه ســـوم که تاکی‌زوئایت *نئوســـپورا کانینوم* حاد با دوز ۱۰×۱۰^{۶} دریافـــت کرده بودند، دو موش در روز دهم بعد از تلقیح تلف شـــدند و پیش از تلف شدن علایم بیماری مانند چرخش به دور خود، ژولیده شـــدن مو و بی حالی را نشان دادند (شکل ۱). سه موش دیگر در روز چهاردهم بعد از تلقیح تلف شدند. در گروه چهارم که تاکی‌زوئایت *نئوســـپورا کانینوم* حاد با دوز ۲۰×۱۰^{۶} را دریافت کرده بودند، همه‌ی موش‌ها تا انتهای روز دهم بعد از تلقیح تلف شدند. میزان تلفات در گروه‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.

۳- موش‌های تلقیح شـــده با ســـوش تخفیف حدت یافته *نئوســـپورا کانینـــوم*- گروه پنجم، ششـــم و هفتم که تاکی‌زوئایت *نئوســـپورا کانینوم* تخفیـــف حدت یافته با دوزهای ۵×۱۰^{۶}، ۱۰×۱۰^{۶} و ۲۰×۱۰^{۶} به آن ها تلقیح شده بود، نه تنها تلفاتی نداشتند بلکه هیچ یک از علایم بیماری را نیز مانند چرخش به دور خود، ژولیده شـــدن مو و بی‌حالی نشـــان ندادند؛ لذا همگی همراه با موش‌های مانده از سایر گروه‌ها در آخرین مرحله یعنی یک ماه بعد از تزریق آسان کشی شدند.

نتایج آزمایش الایزا

در انتهای هفته ی سوم آزمون الایزا جهت بررسی پاسخ ایمنی و تعیین تیتر آنتی بادی علیه نئوســـپورا کانینوم انجام شد. از سه گروهی که سوش حاد را دریافت کرده بودند تنها گروهی که کمترین دوز رادریافت کرده بود، زنده ماند. لذا تنها نتایج آزمایش ســـرمی الایزای این گروه قابل انجام بود. نتایج آزمایش ســـرمی الایزا نشـــان دهنده‌ی تفاوت کاملا معنی‌دار در تیتر آنتی بادی گروه‌های دریافت کننده‌ی تاکی‌زوئایت *نئوسپورا کانینوم* تخفیف حدت یافته نسبت به گروه شاهد بود (جدول ۲) ($p < ۰/۰۰۰۱$). همچنین گروهی که دوز ۱۰×۱۰^{۶} تاکی‌زوئایت *نئوسپورا کانینوم* تخفیف حدت یافته دریافت کرده بود، میانگین جذب نوری بیشـــتری نســـبت به سایر گروه‌ها داشـــت، که نشانه‌ی بالا بودن میزان تیتر آنتی بادی در پاسخ به آنتی‌ژن در این گروه می‌باشد (شکل ۲).

شکل ۱- ژولیده شدن مو و بی حالی در موش آلوده به نئوسپورا

www.SID.ir

Archive of SID

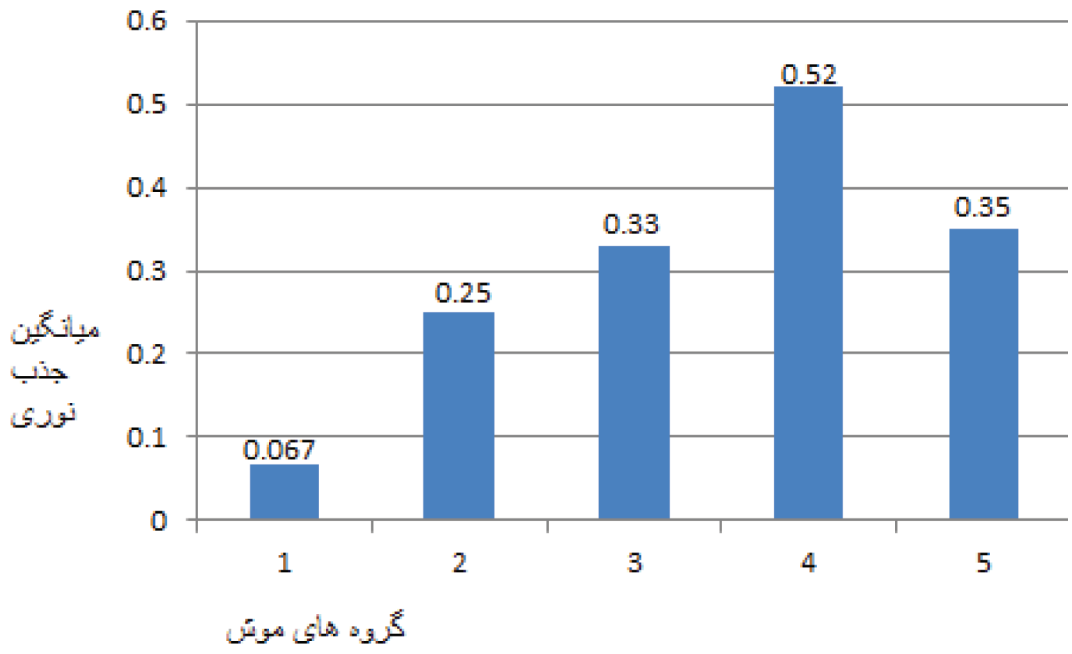
نتایج آزمایش جلدی

در این مطالعه ایمنی سلولی (آزمایش جلدی) در موش‌های آلوده شده با *نئوسپورا کانینوم* تخفیف حدت یافته مشاهده شد به طوری که پس از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌داری در کف پای موش‌های گروه تخفیف حدت یافته با دوز ۱۰×۱۰^{۶} در مقایسه با گروه شاهد دیده شد ($p < ۰/۰۰۰۱$). (جدول ۳ و شکل ۳).

بحث

تمایز و هدف اصلی این پژوهش نسبت به مطالعه خردادمهر و همکاران (۲۰۱۳) این بود که نشان دهد پاساژهای متوالی *نئوسپورا کانینوم* روی رده سلولی J774 ضمن کاهش حدت تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* قدرت ایمنی زایی آن را نیز حفظ می کند. امکان بررسی این نکته در مطالعه قبلی به‌دلیل استفاده از تخم مرغ جنین دار نبوده است. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که پاساژهای متوالی *نئوسپورا کانینوم* روی رده سلولی J774 باعث کاهش بیماری‌زایی و تخفیف حدت تاکی‌زوئایت می‌شود به طوری که هر سه گروه موش که سوش تخفیف حدت یافته را دریافت کرده بودند، سالم و زنده ماندند. برخلاف آن، موش‌های گروه های دریافت کننده‌ی سوش حاد همگی تلف شدند و یک گروه نیز تلفات وعلائم بیماری را نشان دادند. تاکنون بارها تخفیف حدت تک یاخته‌های بیماری‌زا از طریق پاساژ دادن متوالی اثبات شده است، به طوریکه حتی برخی از واکسن‌های تجاری موجود در بازار نیز بر همین اساس تولید شده است (۷ و ۲۴). در مطالعه‌ی بارتلی و همکاران (۲۰۰۶)، اثر تخفیف حدت تاکی‌زوئایت *نئوسپورا کانینوم* طی پاساژهای متوالی در کشت سلولی Vero و تلقیح به موش مشاهده شده است (۱). مطالعه‌ی دیگری که توسط نام آوری و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، نشان داده شد پاساژ متوالی نئوسپورا بر روی رده سلولی Vero باعث کاهش این تک یاخته در تخم مرغ‌های جنین دار می‌شود (۱۶).

در این مطالعه از رده سلولی J774 جهت تخفیف حدت استفاده شد. نتایج این مطالعه با نتایج خردادمهر و همکاران (۲۰۱۳)، هم‌خوانی داشت و نشان داد که این واریته پاسخ ایمنی را نیز در موش‌های مورد مطالعه تحریک می‌کند، به طوریکه پاسخ ایمنی هومورال و ایمنی سلولی (آزمایش جلدی) به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و حتی گروه دریافت کننده سوش حاد نیز بالاتر بود. نتایج این مطالعه در زمینه‌ی ایجاد ایمنی هومورال مطلوب، با بسیاری از مطالعاتی که در این زمینه در مدل‌های موش برای تولید ایمنی علیه آلودگی نئوسپوروسیس با استفاده از تک یاخته‌ی زنده انجام گرفته مطابقت دارد. از این موارد می‌توان به سوش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کانینوم* با پاساژ طولانی مدت (۲)، دوز تحت کشنده ایزوله حاد *نئوسپورا کانینوم* (۱۱)، ایزوله جهش یافته حساس به حرارت (۲۰)، و



شکل ۲- میانگین جذب نوری در آزمایش الایزا. ۱: گروه شاهد، ۲: گروه NC1 بیماری زا ۵×۶۰۱، ۳: NC1 تخفیف حدت‌یافته ۵×۱۰^{۶}، ۴: NC1 تخفیف‌حدت یافته ۱۰×۱۰^{۶} و ۵: NC1 تخفیف حدت‌یافته ۲۰×۱۰^{۶}.

www.SID.ir

Archive of SID

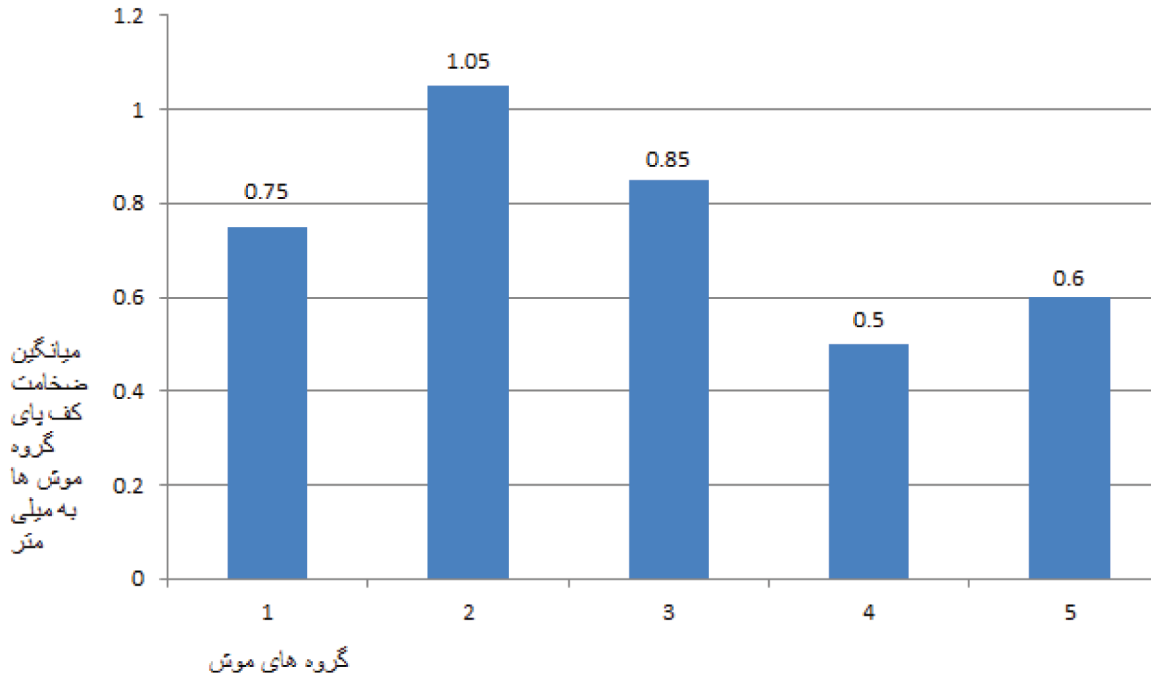
واکسن های ترانس‌ژنیک *نئوسپورا کانینوم* (۱۴) اشاره کرد.

ماهیت رده‌ی سلولی ماکروفاژ موشی یا J774 در تکثیر و تخفیف حدت تاکی‌زوئایت *نئوسپورا کانینوم* نقش به سزایی دارد. در مطالعه‌ی لم و همکاران (۲۰۰۹)، به اثبات رسیده بود که رده سلولی J774، مقادیر زیادی لیزوزوم و اینترلوکین ۱ را سنتز می‌کند و نقش کلیدی در سیستم ایمنی ایفا می‌کند که این ویژگی‌می‌تواند توجیه کننده کاهش بیماری‌زایی *نئوسپورا کانینوم* بر اثر پاساژ در این رده سلولی باشد (۱۰). از سوی دیگر با توجه به این که رده سلولی J774 معلق می‌باشد، پاساژ دادن و تکثیر آن در مقایسه با رده‌های سلولی چسبنده مثل Vero آسان‌تر است (۹). تولید انبوه و آسان تاکی‌زوئایت *نئوسپورا کانینوم* نیاز اساسی در راستای ساخت واکسن زنده‌ی تخفیف حدت یافته می‌باشد.

اخیرا محققان رده سلولی J774 را در مطالعات آزمایشگاهی برای اهداف مختلفی به کار برده اند. برای مثال در یک مطالعه قابلیت‌های رده سلولی J774 در جذب و رشد ایزوله‌های بالینی *مایکوباکتریوم توبرسلوسیس* بررسی شده است (۸). برخی محققان از رده سلولی J774 برای کشت در شرایط آزمایشگاهی پروماستیگوت‌های گونه‌های مختلف لیشمانیا استفاده کرده‌اند (۲۲)، و برخی محققان رده سلولی J774 را به عنوان رده مناسبی برای بررسی مطالعات عفونت‌زایی ویروس دنگو (Dengue) پیشنهاد کرده‌اند (۱۲). مهمترین جنبه‌ی نتایج این تحقیق اثبات تأثیر واکنش متقابل سلول میزبان بر میزان بیماری‌زایی تاکی‌زوئایت‌های *نئوسپورا کانینوم* می‌باشد. ویژگی J774 به عنوان رده سلولی ماکروفاژ در واکنش متقابل با طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا از جمله *مایکوباکتریوم توبرکلوسیس* (۳)، *بروسلا ابورتوس* (*Brucella abortus*) (۷) و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* (*Cryptococcus neoformans*) (۱۸)، بررسی شده است. اطلاعات گذشته کشته شدن درون سلولی *لیشمانیا مونوسایتوژنز* درده سلولی J774 را نشان می‌دهد؛ ماکروفاژها نقش کلیدی در مکانیسم دفاعی در سیستم ایمنی دارند، در نتیجه تعجب آور نیست که پاساژهای متوالی تاکی‌زوئایت *نئوسپورا کانینوم* بر روی رده سلولی باعث تخفیف حدت این تک‌یاخته می‌شود. با توجه به این قابلیت تاکی‌زوئایت زنده‌ی تخفیف حدت یافته‌ی *نئوسپورا کانینوم*، می‌توان این واریته را به عنوان واکسنی مناسب در تحقیقات آینده در نظر گرفت.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه با توجه به نتایج میکروسکوپی، رده سلولی معلق J774 رده سلولی مناسبی برای تکثیر انبوه و تخفیف حدت تک‌یاخته‌ی داخل سلولی *نئوسپورا کانینوم* معرفی شد. ضمن اینکه دوزی از انگل *نئوسپورا*



شکل ۳- میانگین ضخامت کف پای موش ها ۲۴ ساعت بعد ازآزمایش جلدی. محور عمودی: نشانگر میانگین اندازه ضخامت کف پای موش‌ها به میلی‌متر، محورافقی ستون ۱: گروه NC1 تخفیف حدت‌یافته دوز ۵×۱۰^{۶}، ستون۲: گروه NC1 تخفیف حدت‌یافته دوز ۱۰×۱۰^{۶}، ستون ۳: گروه NC1 تخفیف حدت‌یافته ۲۰×۱۰^{۶}، ستون ۴: گروه NC1 حاد ۵×۱۰^{۶} و ستون ۵: گروه شاهد (گروه‌های دریافت کننده‌ی دوز ۱۰×۱۰^{۶} و $۱۰^{۲}\times۱۰^{۶}$ NC1 حاد قبل از انجام آزمون جلدی تلف شدند).

www.SID.ir

Archive of SID

کانینـــوم که باعث مرگ موش BALB/c می‌شـــود دوز ۲۰×۱۰^{۶} می‌باشـــد. *نئوســـپورا کانینوم* تخفیف حدت یافته باعث ایجاد ایمنی سلولی و هومورال در موش BALB/c شد ولی باعث مرگ موش‌ها نشد.

تشکر و قدردانی

هزینه های انجام این مطالعه توســـط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۱۱۱۶-۱۸-۸۴-۲ تامین گردیده اســـت و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل اجرایی ان انجام گرفته اســـت. نویسندگان از همکاری ســـرکار خانم محبوبه مختاری و آقای صفر صادق‌زاده در طی انجام این مطالعه سپاسگزاری می نمایند .

منابع مورد استفاده

1.Bartley, P.M., Wright, S., Sales, J.,Chianini, F.,Buxton, D., and Innes, E.A. 2006. Long Term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* Invivo. *Parasitology*. 133:421-432.

2.Bartley, P.M., Wright, S.E., Maley, S.W., Buxton, D., Nath, M., and Innes, EA. 2009. The development of immune responses in Balb/c mice following inoculation with attenuated or virulent *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasite Immunology*. 31: 392-401.

3.Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R.S., and Bloom, B.R. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced byactivated murine macrophages. *Journal of Experimental Medicine*.175: 1111–1122.

4.Dijkstra, T., Barkema, HW., Eysker, M., Hesselink, JW and Wouda, W. 2002. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Veterinary Parasitology*. 105:99-104.

5.Dubey, J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animal.The *Korean Journal of Parasitology*. 41(1): 1-16.

6. Dubey, J.P., Schares, G. 2006. Diagnosis of Bovine Neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 140: 1-34.

7. Jiang, X., Leonard, B., Benson, R., Baldwin, C.L.1993. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cellular Immunology*. 151: 309–319.

8.Jurado, E.R., Tudo, G., Borrell, S., Alcaide, F., Coll, P., Espanol, M., Casabona, N.M.,Mick, V., Montemayor, M., Moure, R., Salvado, M., Vicente, E., Gonzalez-Martın, J. 2011. Impaired fitness of *Mycobacterium tuberculosis* resistant isolates in acell culture model of murine macrophages. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 66, 2277–2280.

9.Khordadmehr, M., Namavari, M., Khodakaram-Tafti,A., Mansourian, M., Rahimian, A., Daneshbod, Y. 2013. Comparison of use of Vero cell line and suspension culture of murine macrophageto attenuation of virulence of *Neospora caninum*. *Research in Veterinary Science*.95 :515–521.

10.Lam, J., Herant, M., Dembo, M., Heinrich,V. 2009. Baseline mechanical characterization of J774 Macrophages. *Biophysical Journal*. 96: 248-254.

11. Lunden, A., Wright, S., Allen, J., Buxton, D. 2002. Immunisation of mice against Neosporosis. *International Journal of Parasitology*. 32:867-876.

12. Maria, M.B., Moreno-Altamirano, F., Sánchez-García, J., Legorreta-Herrera, M., Aguilar-Carmona, I. 2007. Susceptibility of mouse macrophage J774 to dengue virus infection. Intervirology. 50, 237–239.

13. Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., Aguado-Martínez, A., Alvarez-García, G. 2011. Genetic manipulation of *Neospora caninum*to express the bradyzoite-specific protein NcSAG4 in tachyzoites. *Parasitology*.138, 472-480.

14.Miller, C., Quinn, H., Ryce, C., Reichel, M., and Ellis, J. 2005. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. *International Journal for Parasitology*.35:821-828.

15. Monney,T., Hemphill, A. 2014. Vaccines against neosporosis: What can we learn from the past studies? *Experimental Parasitology*. 140:52-70.

16. Namavari, M., Mansourian, M., Khodakaram-Tafti, A., Hosseini, M.H., Rahimiyan, A., Khordadmehr, M., and Lotfi, M. 2011. Applicatio of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of *Neospora caninum* tachyzoites. *Springer*.21:1665-68.

17. Namazi, F., Oryan, A., Namavari, MM. 2010. Experimental infection of embryonated eggs of chicken with *Besnoitia caprae*. *Trop Biomed.* 27(3):417-23.

18. Naslund, P.K., Miller, W.C., Granger, D.L. 1995.*Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. *Infectionand Immunity*. 63, 1298–1304.

19.Omata, Y., Kamiya, H., Kano, R., Kobayashi, Y., Maeda., R., Saito, A. 2006. Footpad Reaction induced by *Neospora caninum* tachyzoite extract in infected BALB/c mice. *Veterinary Parasitology*.139:102-108.

20. Ramamoorthy, S., Duncan, R., Lindsay, D.S. and Sriranganathan, N. 2007. Optimization of the use of C57BL/6 mice as a laboratory animal model for *Neospora caninum* vaccine studies. *Veterinary Parasitology*. 145: 253-259.

21. Setasimy, A., Namavari , M.2015.Use of chicken emberyonated eggs for evaluating the virulence of *Toxoplasma gondii. Parasitology Disease.* 11:1-3.

22. Sharief, A.H., Gasim-Khalil, E.A., Omer, S.A., Abdalla, H.S. 2008. Innovative serum free medium for in vitro cultivation of pro-

www.SID.ir

Archive of SID

mastigote forms of Leishmania species. *International Journal for Parasitology*.57, 138–142.

23. Williams D. J. L., McGarry J., Guy F., Barber J. and Trees A. J. 1997. Novel ELISA for detection of Neospora-specific antibodies in cattle. *Veterinary Record*. 140: 328–331.

24. Wilkins, M.F.,O'Connell,E., TePunga, W.A. 1988. Toxoplasmosis in sheep III. Futher evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection flowing an experimental oral challenge. *Newzealand Veterinary Journal*. 36:86-89.

www.SID.ir