**مطالعه آسیب شناسی و مولکولی حدت نئوسپورا كانينوم بر فیزیک جنین و ساختار آن**

**خاطره دهقانی1**

**1- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری**

**چکیده**

تکوین جانوران به صورت زمانی در فرآیند خاصی انجام می گیرد.امروزه با توجه به عدم وجود داروي مناسب عليه بيماري های جانوران از دوران نطفه تا مرحله تولد بسیاری از حیوانات دچار آسیب جسمی شدید می شوند و بصورتی که در نهایت به مرگ آنها ختم می شود. در این پژوهش ما به بررسی روش­هاي کنترل عفونت نئوسپورا پرداختیم بدین منظور NC1با پاساژ بالاو NC1با پاساژ پاییندر دوزهای مختلف (شامل 104×1 ، 105×1 و 106×1 ) به گروه­های هشت­تایی تخم مرغ جنین­دارتزریق شد در ضمن یک گروه به عنوان کنترل صرفا محیط کشت دریافت نمود. میزان حدت در واریته با پاساژ بالا و پاساژ پایین از طریق میزان مرگ و میر، روش مولکولی و پاتالوژیک مقایسه گردید. تمامی جوجه­ها در گروه تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا زنده از تخم در آمدند. نتایج مولکولی برای گروه تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا کمترین میزان نفوذ ژنوم را در بافت­ها نشان داد.. نتایج کلی مطالعه­ی حاضر نشان داد که پاساژ طولانی مدت تک­یاخته *نئوسپوراکانینوم* بر روی رده سلولی J774 از حدت تک یاخته­ی مورد نظر به میزان زیادی کاسته می­شود و می­تواند به عنوان کاندیدای مناسب جهت مطالعه برای تهیه واکسن علیه*نئوسپوروزیس* محسوب گردد.

[**https://science-journals.ir**](https://science-journals.ir) **,** [**https://onsh.science-journals.ir**](https://onsh.science-journals.ir)

**کلمات کلیدی:** *نئوسپورا کانینوم*، تخم مرغ جنین­دار، تخفیف حدت، پاساژ طولانی مدت، سلول معلق

**1- مقدمه**

*نئوسپورا كانينوم*تك­ياخته­ای اجباری داخل سلولی از شاخه­ی آپی کمپلکسا است كه محدوده­ي ميزباني وسيعي دارد از جمله آن­ها گاو، گوسفند، سگ، آهوي كوهي مي­باشد كه باعث سقط جنين، مرده­زايي و بيماري­هاي عصبي مادرزادي مي­شود. انگل *نئوسپورا* در چرخه­ي زندگي خود داراي سه مرحله­ي مشخص تاكي زوئيت، برادي زوئيت و اوسيست مي­باشد.تاكي زوئيت­ها در بدن ميزبان­هاي واسط ايجاد مي­شوند كه داخل سلولي هستند )دوبئی[[1]](#footnote-1)،2007(. نئوسپوراكانينوم از طريق بلعيدن اووسيت دفع شده از سگ و يا از طريق جفت از حيوان ماده مثل گاو به جنين منتقل مي­شود كه در حالت دوم منجر به سقط جنين يا مرده­زايي مي­شود. مطالعات نشان مي­دهد كه قرار گرفتن در معرض انگل زنده قبل از جفت­گيري باعث ايجاد ايمني در گاو شده و ميزان سقط جنين در اين گاوها بعداً كاهش مي­يابد . در مطالعه­ي مشابه، آلوده شدن گاو با تاكي زوئيت مرده باعث ايجاد ايمني در مقابل انگل نمي­شود. در نتيجه براي واكسيناسيون و ايجاد ايمني مطلوب توليد تاكي زوئيت زنده­ي تخفيف حدت يافته ضروري مي­باشد.كشت سلولي روشي مناسب براي تكثير سريع و كاهش بيماري زايي تاكي زوئيت­ها مي­باشد (دانشور،2003،انیز،2011)[[2]](#footnote-2).  آلودگی با نئوسپوراکانینو*م* در حیوانات مختلف از کشورهای زیادی گزارش شده است. مطالعات انجام شده در برخی از کشورها حاکی از این است که 12 تا 42 درصد جنین­های سقط شده گاوها به این انگل آلوده می­باشند. نشانه اصلی بیماری ناشی از *نئوسپوراکانینوم* در گاوها سقط جنین می­باشد(ریچل،2007)[[3]](#footnote-3).نئوسپوراكانينوم سلول­هاي اغلب بافت ها را مورد تهاجم قرار می­دهد؛ اما تمايلي خاص به سيستم اعصاب مركزي، ميوكارد، عضلات اسكلتي و اندوتليوم دارد. آنسفالوميليت و پلي ميوزيت مهمترين يافته­هاي آسیب شناسی مي­باشند. تكثير داخل سلولي تاكي زوئيت­ها منجر به ايجاد كانون­هاي نكروزه با اندازه­هاي مختلف مي­گردد. ممکن است در مغز علاوه بر تكثير و تجمعات تاكي زوئيت، كيست­هايي با ديواره ضخيم نیز حضور داشته باشند. ضایعات اصلی در جنين­هاي سقط شده، شامل نكروزهاي چند كانوني و آنسفالوميليت غير چركي مي­باشد. آلودگی مادرزادي در بره­هاي متولد شده  به صورت آنسفاليت و در كره اسب­هاي سقط شده با ارگانيسم های تكثير شده در ريه همراه مي­باشد. ارگانيسم تمايل به اپي تليوم كوريوني و عروق خوني جفت داشته و منجر به بروز التهاب جفت و واسكوليت در جنين مي گردد. در جفت موجب التهاب و دژنره شدن كوريوالانتويس گرديده و نكروز گسترده جفت را سبب مي­شود. تاكي زوئيت ها به سلول هاي ميزبان نفوذ نموده و در واكوئل هاي پارازيتوفروس جايگزين  مي­گردند. اين ارگانيسم ها مي توانند در ماكروفاژها، منوسيت­ها، هپاتوسيت­ها و سلول هاي مجاري كليوي و نورون­هاي عصبي مغزي و نخاعي حيوانات آلوده يافت شوند. مرگ سلول­ها به علت تكثير تاكي زوئيت ها رخ مي­دهد. متعاقب پارازيتمي تاكي زوئيت­ها، سلول­هاي كارانكول مادري را آلوده ساخته و از آنجا به  سلول­هاي تروفوبلاست جنيني منتشر شده و موجب دژنره شدن آن­ها  مي­گردند. چنانچه سيستم ايمني جنين بالغ به حدي تكامل يافته باشد كه تكثير انگل را متوقف كند، قادر به كنترل عفونت و بقا مي­باشد.

**2- مروری بر تحقیقات انجام شده**

*نئوسپوراکانینوم* و *توكسوپلاسما* گوندي تا قبل از سال 1988به عنوان يك انگل تلقي مي­شدند تااينكه دوبئی و همكاران *نئوسپورا* را به عنوان يك گونه­ي جديد معرفي كردند .بجرکاسو همکاران در سال 1996، اعلام داشتند سقط عفونی در گاوها در ماه های 4 تا 6 بارداری معمولا مربوط به *نئوسپورا* می­باشد. این انگل می­تواند از گاو باردار به جنین از طریق جفت انتقال یابد. گوساله مبتلا نیز اگر زنده به دنیا بیاید توانایی انتقال را به جنین خود خواهد داشت.

به طور كلي تشخيص *نئوسپورا* به دليل نداشتن علائم باليني اختصاصي مشكل مي­باشد. روش­هاي بيولوژي مولكولي از جمله PCR يكي از حساس­ترين ابزارها براي تشخيص اين پروتوزوا در نمونه­هاي بافتي مي­باشد. *نئوسپوراكانينوم* در سرتاسر دنيا پراكنش دارد و عامل سقط جنين و مرده­زايي در احشام است از اين جهت مضرات اقتصادي و بهداشتي فراواني در حوزه­ي دام­پروري دارد . در حال حاضر به صورت تجاري واكسن مؤثر ويا عامل درماني بازدارنده­ي تكثير و همانندسازي اين انگل شناسايي نشده است (حبیبی، 2005؛ دوبئی، 2007).

بارتلیوهمکاران درسال 2000، دريك مطالعه­ از لاين سلولي كليه­ي ميمون سبز آفريقايي Vero)) جهت تخفيف حدت *نئوسپوراكانينوم* استفاده شد سپس گروه تاكي زوئيت­هاي تخفيف حدت­يافته با 76 مرتبه پاساژ وگروه تاكي زوئيت­هاي بيماري­زا با 34 مرتبه پاساژ با دوزهاي مشخص به دو گروه از موش­هاي Balb/c تزريق شدند نتايج اين مطالعه نشان دهنده­ي مرگ و مير كم­تر موش­هاي واكسينه شده با تاكي زوئيت­هاي تخفيف حدت يافته و ايمني مطلوب در آن­ها مي­باشد.

ویلیامز و همکاران درسال 2007، بیان کردند که گاوهای عفونی شده به طور طبیعی، به دنبال آلودگی ثانویه با *نئوسپورا* درمراحل اولیه آبستنی، علیه سقط و انتقال از طریق جفت به جنین در بارداری های بعدی محافظت می­شود.این مطالعات تجربی نشان­دهنده­ی ایمنی محافظت به دنبال آلودگی قبلی انگل و پیشنهاد­کننده­ی تولید و استفاده از واکسن در کنترل عفونت می­باشد. میچلدرسال 2009، بهترین راه مبارزه با سقط وابسته به *نئوسپورا* واکسیناسیون بر علیه این انگل رااعلام کردند که واکسن تولید شده باید این توانایی را داشته باشد که از انتقال انگل به جنین گاو باردارو همچنین تولید گوساله آلوده جلوگیری کند.

ترانس درسال 2009 اعلام کردند که درهرحال احتمال آلودگی به این انگل در انسان بسیار بالا است زیرا که سگ­ها میزبان آن هستند و سگ در تماس زیادی با انسان می­باشد. آزمایشات بافت و مایعات بدن جنین مشکوک به *توکسوپلاسما گاندی* می­تواند این را نشان دهد که بسیاری از آنها در واقع مبتلا به *نئوسپوراکانینوم* می­باشند.

مینئو درسال2009 پرندگانی ازقبیل کبوتروتخم مرغ­های نطفه­دار رابه عنوان مدل مناسب برای عفونت *نئوسپوراکانینوم* آزمایشگاهی موردمطالعه قراردادند.

نام­آوری درسال2011، درمطالعه­اي از تخم مرغ­هاي جنين­دار به عنوان مدل براي ارزيابي بيماري­زايي *نئوسپوراكانينوم* استفاده کردند. دراين مطالعه به يك گروه از تخم مرغ­هاي جنين­دار هشت روزه *نئوسپوراكانينوم* پاساژ داده شده و به گروه ديگر از تخم­مرغ­هاي جنين­دار *نئوسپوراكانينوم* بدون پاساژ تزريق شد و نتايج حاكي از ميزان مرگ ومير بالاي جنين­هاي آلوده شده با*نئوسپوراکانینوم* بدون پاساژ بود بررسي­هاي ايمونوهيستوشيمي بر روي قلب مغز و كبد جنين­هاي مرده انجام گرفت و آنتي ژن *نئوسپوراكنينوم* در بافت قلب شناسايي شد اما در هيچ گروهي آلودگي آنتي­ژني دربافت مغز شناسايي نشد.

تفتی درسال 2012، در مطالعه­ای تخم­مرغ جنين­دار مرغ گوشتي هشت روزه را با دوزهاي مختلف تاكيزوئيتNC1 آلوده كردند و سپس ميزان آلودگي بافت مغز ، قلب وكبد را با روش­هاي ايمونوهيستوشيمي و PCR و بررسي كردند نتايج حاكي از آن بود كه انجام PCR نه تنها براي شناساييDNA بلكه به منظور بررسي نئوسپوروسيس در نمونه­هاي آلوده شده در راستاي دستيابي به توليد واكسن و درمان ضروري است.

خردادمهر درسال 20113 دريك مطالعه تولید*نئوسپوراکانینوم* رادوسل لاین (Vero) کليه­ي ميمون سبز آفريقاييmurine macrophage (J774)را مقایسه کردندو*نئوسپوراکانینوم* به­طورمداوم دراین خطوط سلولی به مدت 3ماه پاساژداده شدندو تاثیرسلول­های میزبان برکشندگی تاکی زوئیت­های تعیین شده باتخم­های نطفه­دارمرغ­های گوشتی درمایع CA))با رقت­های تعیین­شده تاکی زوئیت ازاین کشت­های سلولی انجام شد.

در ایران میزان سقط جنین به دلیل آلودگی به *نئوسپورا* 15.5 و 18.4 درصد گزارش شده است و در گزارشات اخیر این میزان 33.33% نیز اعلام گردیده است(رزمی[[4]](#footnote-4)، 2007؛ نعمت اللهی[[5]](#footnote-5)، 2011؛ نام آوری[[6]](#footnote-6)، 2012).

صالحی در سال 1389، در بررسی سرولوژیکی گاوهای آبستن تهران ميزان سقط در بين گاوهای سرم مثبت گاوداري­ها را 20.67% و در بين گاوهای سرم منفي 11/10درصد گزارش نمودند و نتیجه گرفتند که ريسک سقط در بين گاوان سرم مثبت دو برابر گاوهای سرم منفي بوده است. حیدری و اکبرین در سال 1391 با بررسی سرولوژیکی بر روی گاوهای دورگ و بومی همدان فراوانی کلی سرمی آنتی بادی ضد *نئوسپورا کانینوم‌*را 20% گزارش کردند همچنین بیشترین و کمترین میزان فراوانی آلودگی را به ترتیب در گاوهای دارای بیش از 4 سال سن (33/32%) و زیـر2 سـال سـن (32/7%) مشـاهـده نمودند. عزیزی (1392)، شیوع آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گاوها و سگ­های نگهبان منطقه قم و نیشابور نیز گزارش شده است (عزیزی،1392؛ فضلی و نوراللهی فرد،1392).

بهرامی در سال1394، برای اولین بار با استفاده از PCRبه بررسی وجود تک یاخته *نئوسپوراکانینوم* در مغز گنجشک در ایران پرداختند که میزان آلودگی را 8.2% گزراش داد.

**3- مواد و روش ها**

جهت بررسی حدت تاکی زوئیت­های کشت داده شده به روش گفته شده، از تخم مرغ جنین­دار استفاده شد. به این منظور 70عدد تخم مرغ جنین­دار نژاد لوهمن تهيه و با اتانول 70 درصد ضد عفوني شدند. سپس در انکوباتور ضد عفوني شده (با فرمالدهيد)، با دماي37 درجه­ی سانتیگراد، رطوبت 70 درصد، 8-6 بار چرخش در ساعت نگهداري شدند.. تخم مرغ­ها به طور روزانه کندل شده و زنده بودن جنين­ها، با حرکت جنين و رگه­دار بودن تخم مرغ بررسي شد. روز نهم انکوباسیون 56 عدد تخم مرغ جنین­دار به طور تصادفی انتخاب شده و به هفت گروه هشت­تایی تقسیم گردید.سپس محل غشاء کوريوآلانتوئيک با استفاده از کندلينگ مشخص و محدوده آن در هر تخم مرغ علامت­گذاري شده و سوراخي در حد فاصل كيسه هوايي و غشاء كوريوآلانتوئيک جهت محل تزريق انگل ايجاد شد. دوز مشخص و حساب شده­ای از تاکی زوئیت­های تخفیف حدت داده شده با پاساژ بالا و تاکی زوئیت­های با پاساژ پایین به 6 گروه تخم مرغ­های جنین­دار تلقیح شد، و گروه هفتم به عنوان کنترل 200 میکرولیتر محیط کشت دریافت نمود، محل تزریق نیز برای جلوگیری از عفونت احتمالی مسدود گردید

**4- تلقیح به تخم مرغ جنین­دار**

جهت بررسی حدت تاکی زوئیت­های کشت داده شده به روش گفته شده، از تخم مرغ جنین­دار استفاده شد. به این منظور 70عدد تخم مرغ جنین­دار نژاد لوهمن تهيه و با اتانول 70 درصد ضد عفوني شدند. سپس در انکوباتور ضد عفوني شده (با فرمالدهيد)، با دماي37 درجه­ی سانتیگراد، رطوبت 70 درصد، 8-6 بار چرخش در ساعت نگهداري شدند.. تخم مرغ­ها به طور روزانه کندل شده و زنده بودن جنين­ها، با حرکت جنين و رگه­دار بودن تخم مرغ بررسي شد. روز نهم انکوباسیون 56 عدد تخم مرغ جنین­دار به طور تصادفی انتخاب شده و به هفت گروه هشت­تایی تقسیم گردید.سپس محل غشاء کوريوآلانتوئيک با استفاده از کندلينگ مشخص و محدوده آن در هر تخم مرغ علامت­گذاري شده و سوراخي در حد فاصل كيسه هوايي و غشاء كوريوآلانتوئيک جهت محل تزريق انگل ايجاد شد.

دوز مشخص و حساب شده­ای از تاکی زوئیت­های تخفیف حدت داده شده با پاساژ بالا و تاکی زوئیت­های با پاساژ پایین به 6 گروه تخم مرغ­های جنین­دار تلقیح شد، و گروه هفتم به عنوان کنترل 200 میکرولیتر محیط کشت دریافت نمود، محل تزریق نیز برای جلوگیری از عفونت احتمالی مسدود گردید. تزریق دوزها به ترتیب جدول می­باشد.

**جدول1. گروه­بندی تخم مرغ ها و دوز تزریقی تک­یاخته**

|  |  |
| --- | --- |
| **گروه** | **دوز تزریقی و نوع تاکی زوئیت** |
| 1 | تک یاخته *نئوسپوراکانینوم*low passageبا دوز 104×1 در میلیلیتر |
| 2 | تک یاخته *نئوسپورا کانینوم*low passage با دوز 105×1 در میلیلیتر |
| 3 | تک یاخته *نئوسپورا کانینوم*low passage با دوز 106×1 در میلیلیتر |
| 4 | تک یاخته تخفیف حدت یافته High passage با دوز 104×1 در میلیلیتر |
| 5 | تک یاخته تخفیف حدت یافته High passage با دوز 105×1 در میلیلیتر |
| 6 | تک یاخته تخفیف حدت یافته High passage با دوز 106×1 در میلیلیتر |
| 7 | محیط کشت DMEM |

تمام تخم مرغ­ها در شرایط کنترل شده حرارت و رطوبت در دستگاه جوجه­کشی نگهداری شدند. روزانه دو بار تخم مرغ­ها جهت بررسی تلفات کندلشدند و میزان مرگ و میر در هر گروه ثبت و از بافت­هایقلب و کبد آنها نمونه­برداری انجام شد. جوجه­های هچ شده نیز از نظر علائم بالینی بررسی شدند و از هر گروه یک جوجه یوتنایز شده و نمونه­گیری در مورد آنها نیزمانند جنین­های تلف شده انجام شد.

**5- استخراج DNA**

برای استخراج ژنوم تک یاخته از بافت­های انتخابی با استفاده از کیت به ترتیب زیر عمل می­کنیم:

1. 25میلی­گرم از هر نمونه به طور کامل هموژن شد وپس ازآن100میکرولیتر بافر پروتئاز و 5 میکرولیتر پروتئاز به آن افزوده شد و به مدت90 دقیقه در55 درجه سانتیگراد قرارداده شد.

2. سپس400 میکرولیتر از محلول لیزکننده اضافه شد و به مدت20 ثاتیه ورتکس شد.

3. به مخلوط فوق300 میکرولیترمحلول رسوب دهنده افزوده شد وپس ازورتکس، درمنفی 20درجه سانتیگراد به مدت20 دقیقه نگهداري شد پس ازآن براي10 دقیقه بادور g 12000 سانتریفیوژ شد ومایعرویی به طور کامل دور ریخته شد.

4. به هر لوله یک میلی لیتر بافر شستشو دهنده اضافه شد وپس از5 ثانیه ورتکس، مجددا مایع رویی حذف شد(این مرحله دوبار انجام شد).

5. نمونه­ها به مدت5دقیقه در65 درجه سانتیگراد قرارداده شد.

6. درانتها50میکرولیتر بافر حل­کننده افزوده شدو به مدت5 دقیقه در65درجه سانتیگراد نگهداري شدوسپس30 ثانیه سانترفیوژ شدو محلول باقیمانده به عنوان DNA مورد نظر تا زمان مورد استفاده جهت پروسه PCRدر منفی70 درجه سانتیگراد قرارداده شد.

**6- انجام روش PCR**

جهت انجام واکنش PCRبه منظورتشخیص حضوری اعدم حضور ژنوم انگلم و رد نظر در بافت­هاي مختلف،مواد زیر براي یک واکنش 25 میکرولیتري مخلوط شدند:

|  |  |
| --- | --- |
| **حجم (ميكرو ليتر)** | **مواد مورد نياز** |
| 2.5 | PCR buffer (10 x) |
| 1 | Mgcl2 |
| 0.5 | dNTPs |
| 0.25 | Taq DNA polymerase ( 5u/μl) |
| 1 | Forward primer (10 pmol/μl) |
| 1 | Reverse primer (10 pmol/μl) |
| 2 | DNA Template |
| 16.75 | D.W |
| 25 | Total |

توالی پرایمرهاي استفاده شده در این واکنش به شرح زیرمی­باشد: (یاماگه[[7]](#footnote-7) 1996)

Np21-plus :5'–gtg cgt cca atc ctg taa c– 3'

Np6-plus :5'–cag tca acc tac gtc ttc t– 3'

این جفت پرایمر الیگو نوکلوتیدي، قطعات328 جفت باز از ژنوم انگل را شناسایی می­کنند. جفت پرایمر Np21/ Np6قادربه تشخیص اختصاصی *نئوسپورا کانینوم*(حتی تشخیص یک تاکی زوئیت در2 میلی­گرم از ژنوم نمونه) می­باشد.

سیکل­هاي دمایی جهت انجام واکنش PCR به قرار زیر می­باشد:

1. 95 درجه سانتیگراد براي4 دقیقه

2. 94 درجه سانتیگراد براي50 ثانیه

3. 53 درجه سانتیگراد براي50 ثانیه براي هرسیکل (جمعا35 سیکل)

4. 72 درجه سانتیگراد براي1 دقیقه

5. 72درجه سانتیگراد براي5 دقیقه

6. 4 درجه سانتیگراد براي1 دقیقه

پس از اتمام واکنش،6 میکرولیترازمحصول PCRبا2 میکرولیتراز loading buffer مخلوط شده و بر روي ژل آگارز1% به همراه رنگ اتیدیم بروماید به وسیله­ی نور UV مورد مطالعه قرارگرفت.

**7- میزان مرگ و میر در جنین های تخم مرغ**

نتایج میزان مرگ و میر در جنین­ها نشان می­دهد که در گروه­های چهارم، پنجم و ششم که گروه­های *نئوسپورا* تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا می­باشد، تا پایان دوره هچری، هیچ­گونه مرگ و میری رخ نداده است به جز گروه تخفیف حدت یافته پاساژ بالا با دوز 104×1 در میلی­لیتر که در روز دوم پس از تزریق یک جنین تلف شد که می­تواند به دلیل عواملی دیگر و یا مرگ طبیعی باشد چرا که پس از آن هیچ­گونه تلفاتی تا روز آخر مشاهده نگردید. همچنین در گروه کنترل در روز 18 انکوبه گذاری، یک جنین تلف گردید.

در گروه­های *نئوسپوراکانینوم*با پاساژ پایین در هر سه گروه با دوزهای مختلف تلفات مشاهده شد و تا روز آخر از هر گروه 8 جنین تلف گردید.نتایج مرگ و میر در هر گروه در جدول آورده شده است. مقایسهمیزان مرگ و میر در هر گروه در نمودار دیده می­شود.مقایسه آماری گروه تزریقی با *نئوسپورا*تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا با گروه کنترل (با استفاده از سایت آماری graphpad) نشان دهنده­یعدم وجود تفاوت معنا داری بین آنها می­باشد و این مقایسه با گروه نئوسپورا با پاساژ پایین نشان دهنده­ی تفاوت معناداری بین این دو گروه می­باشد (0.0001P ≥ .).

**جدول2. نتایج مرگ و میر در هر گروه تخم مرغ در روزهای مختلف پس از تزریق**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **مجموع** | **21** | **20** | **19** | **18** | **17** | **16** | **15** | **14** | **13** | **12** | **11** | **10** | **روز** | **گروه** |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | - | - | - | - | تک یاخته نئوسپورا*کانینوم*Low passageدوز 104×1 در میلی لیتر |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | - | - | - | - | تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* Low passageدوز 105×1 در میلی لیتر |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | - | - | تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* Low passageدوز 106×1 در میلی لیتر |
| 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | تک یاخته تخفیف حدت یافته High passageدوز 104×1 در میلی لیتر |
| 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | تک یاخته تخفیف حدت یافته High passageدوز 105×1 در میلی لیتر |
| 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | تک یاخته تخفیف حدت یافته High passageدوز 106×1 در میلی لیتر |
| 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | محیط کشت DMEM |

**تصویر**مقایسه آماری بین گروه تزریقی با پاساژ بالا و کنترل با استفاده از نرم افزارgraphpad

**نمودار مقایسه میزان مرگ و میر در گروه های مختلف.** گروه­ها به ترتیب شامل تک یاخته *نئوسپوراکانینوم*با پاساژ پایین دوز 104×1در میلی لیتر، دوز105×1در میلی لیتر، دوز 106×1در میلی لیتر، تک یاخته تخفیف حدت یافته با پاساژ بالادوز 104×1 در میلی لیتر، دوز 105×1 در میلی لیتر، دوز 106×1 در میلی لیتر، و گروه کنترل محیط کشت DMEM می باشد.

**نمودار مقایسه گروه های *نئوسپوراکانینوم* با پاساژ پایین و *نئوسپورا* تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا.**گروه 1 *نئوسپوراکانینوم*با پاساژ پایین دوز 104×1در میلی لیتر گروه 2 تک یاخته تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا دوز 104×1 در میلی لیتر می باشد. گروه 3 و 4 نیز مقایسه تک یاخته *نئوسپورا*با پاساژ پایین با دوز105×1در میلی لیتر و تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا دوز105×1در میلی لیتر می باشد. دو گروه آخر مقایسه *نئوسپورا*با پاساژ پایین با دوز 106×1در میلی لیتر و تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا با دوز 106×1 در میلی لیتر می باشد.

**8- نتیجه­گیری**

در مطالعه حاضر از واکسن تخفیف حدت یافته برای ایجاد ایمنی بر علیه نئوسپورا کنینوم در تخم مرغ جنین دار استفاده شد. از آنجا که واکسن تجاری نئوگارد ( واکسن کشته) به تازگی در سال 2014 از بازار های جهانی جمع آوری شده است محققین را برای تولید واکسنی مناسب به چالش کشیده است و با توجه به کارآمد بودن واکسن های تخفیف حدت یافته بر علیه آلودگی های تک یاخته ای لذا استفاده از یک واکسن تخفیف حدت یافته برای مبارزه با نئوسپورا کنینوم مناسب به نظر می آید.نتایج بدست آمده در این مطالعه در مقایسه با گروه­های ارزیابی شده با نئوسپوراکانینوم با تخفیف پایین بسیار چشم­گیر و موفقیت ­آمیز بود با توجه به جدید بودن روش کار در زمینه­ی کاهش حدت تک­یاخته با استفاده از پاساژ طولانی مدت بر روی سل لاین معلق، و نتایج بدست آمده می­تواند راهی برای تحقیقات بیشتر در این زمینه باز نماید.با توجه به اینکه بیماری نئوسپوروزیس در گاو­ها باعث سقط جنین شده و باعث تولید خسارات اقتصادی بالایی در جهان می­شود پیشنهاد می­شود جهت ارزیابی بیشتر واریته تخفیف حدت یافته به عنوان واکسن آزمایشی مطرح شده در زمینه جلوگیری از سقط جنین و ایجاد ایمنی کامل در آینده از گوسفند و در نهایت گاو نیز برای بررسی استفاده گردد همچنین برای استاندارد کردن دوز مصرفی جهت ایمنی­زایی مطالعات بیشتری انجام گیرد. نتایج بدست آمده در این مطالعه در مقایسه با واکسن کشته و گروه ایمن نشده مورد مطالعه بسیار چشمگیر و موفقیت آمیز بود با توجه به جدید بودن روش کار در زمینه کاهش حدت تک یاخته با استفاده از پاساژ طولانی مدت بر روی رده سلولی معلق J774 ، نتایج بدست آمده می تواند راهی برای تحقیقات بیشتر در این زمینه باز نماید.

**منابع و ماخذ**

**-پیتر رایم،پل لائیر،اورس هوفمان،مترجم،جبرئیل شمس الدین(1393)."اصول آزمایشگاهی ،روشهای مولکولی " چاپ،دوم.**

**- Al-Qassab, S.E., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2010. On the biological and genetic diversity in Neospora caninum. Diversity 2, 411–438.**

**- Almeria, S., Araujo, R., Tuo, W., Lopez-Gatius, F., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., 2010. Fetal death in cows experimentally infected with Neospora caninum at 110 days of gestation. Veterinary Parasitology 169, 304–311.**

**-**[**Alexander J. Trees**](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492205002795)**,** [**Diana J.L. Williams**](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492205002795)**. Endogenous and exogenous transplacental infection in Neospora caninum and Toxoplasma gondii.Trends in parasitology.** [**Volume 21, Issue 12**](http://www.sciencedirect.com/science/journal/14714922/21/12)**, December 2005, Pages 558–561.**

**- A. L. Chryssafidis, R. M. Soares, A. A. R. Rodrigues, N. A. T. Carvalho, and S. M. Gennari, “Evidence of congenital transmission of *Neospora caninum* in naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) fetus from Brazil,” *Parasitology Research*, vol. 108, no. 3, pp. 741–743, 2011.**

**-Barratt, J., Al Qassab, S., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2009. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of Neospora caninum and Hammondia heydorni in feral mouse tissues. Molecular and Cellular Probes 22, 228–233.**

**- Barratt, J.L.N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J.T., Stark, D., 2010. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. Clinical Microbiology Reviews 23, 795.**

**-Bartly, P.M., Wright S.E., MaleyS.W.,Buxton D., Nath,M.,andInnes,EA.(2009)The development of immune responses in Balb/c mice following inoculation with a attenuated or virulent *Neosporacaninum*tachyzoites , Parasite Immunology,31:392- 401.**

**-Bjorkimanetal(1996). N.Caninum and bovine virus diarrhea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion.Vet.J.159,201-206**

**- Costa, K.S., Santos, S.L., Uzeda, R.S., Pinheiro, A.M., Almeida, M.A.O., Araujo, F.R., McAllister, M.M., Gondim, L.F.P., 2008. Chickens (Gallus domesticus) are natural intermediate hosts of Neospora caninum. International Journal for Parasitology .38, 157–159.**

**-Daneshvar, H., Coombs , G.H., Hagan,P., and Phillips, S. (2003) *LeishmaniaMexicana* and *Leishmaniamajor*:Vaccination with the attenuated lines, Journal of Investigative Derm- atology, 3:1662-68.**

**- Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. Int J Parasitol 29:1683-**

**1689.**

**- Dijkstra, M. Eysker, G. Schares, F. J. Conraths, W. Wouda,and H. W. Barkema, “Dogs shed *Neospora caninum* oocystsafter ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites,” *International Journal for Parasitology*, vol. 31, no. 8, pp. 747–752, 2001.**

**- D. S. Lindsay, S. J. Upton, and J. P. Dubey, “A structural study of the *Neospora caninum* oocyst,” *International Journal for Parasitology*, vol. 29, no. 10, pp. 1521–1523, 1999.**

**- Gondim, L.S., Abe-Sandes, K., Uzeda, R.S., Silva, M.S., Santos, S.L., Mota, R.A., Vilela,**

**S.M., Gondim, L.F., 2010. Toxoplasma gondii and Neospora caninum in sparrows (Passer domesticus) in the Northeast of Brazil. Veterinary Parasitology 168,121–124.**

**- Dion, S.; Germon, S.; Guiton, R.; Ducournau, C.; Dimier-Poisson, I. Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum.Int. J. Parasitol.* 2011, *41*, 685-695.**

**-Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of Neospora caninum and neosporosis.**

**Veterinary Parasitology 67, 1–59.**

**- Dubey, J.P.; Schares, G.; Ortega-Mora, L.M.; Epidemiology and control of neosporosis and**

***Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, *20*, 323-367.**

**- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., 2004c. Coyotes (Canis latrans) are definitive hosts of Neospora caninum. International Journal for**

**Parasitology 34, 159–161.**

**- G.S., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., 2007c. Prevention of vertical transmission of Neospora caninum in C57BL/6 mice vaccinated with Brucella abortus strain RB51 expressing N. caninum protective antigens. Int. J. Parasitol. 37, 1531–1538.**

**- H. C.Davison, A.Otter, and A. J. Trees, “Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle,” *International Journal for Parasitology*, vol. 29, no. 10, pp. 1683–1689, 1999.**

**- Hall, C.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2005. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. Veterinary Parasitology 128,231–241.**

**-Habibi G.R., Hashemi-Fesharki,R., Sadrebazzaz,A., Bozorgi,S., and Bordbar,N. (2005)**

**Seminested PCR for diagnosis of *Neosporacaninum* infection in cattle , Arch Razi,**

 **59:55-64.**

**- M. M. McAllister, J. P. Dubey, D. S. Lindsay, W. R. Jolley, R. A. Wills, and A. M. McGuire, “Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*,” *International Journal for Parasitology*, vol. 28, no. 9, pp. 1473–1478, 1998.**

**- Monireh Khordadmehr , Mehdi Namavari , Azizollah Khodakaram-Tafti , Maryam Mansourian , Abdollah Rahimian , Yahya Daneshbod. Comparison of use of Vero cell line and suspension culture of murine macrophage to attenuation of virulence of Neospora caninum. Research in Veterinary Science 95 (2013) 515–521.**

**-Mineo, T.W., Carrasco, A.O., Marciano, J.A., Werther, K., Pinto, A.A., Machado, R.Z.,**

**2009. Pigeons (Columba livia) are a suitable experimental model for Neospora**

**caninum infection in birds. Veterinary Parasitology 159, 149–153**

**-Mehdi Namavari& Maryam Mansourian&AzizollahKhodakaramTafti& Mohammad HosseinHosseini&AbdollahRahimiyan&MonirKhordadmehr& Mohsen Lotfi.Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of Neosporacaninumtachyzoites.**

**- Miller, C.M., Quinn, H.E., Windsor, P.A., Ellis, J.T., 2002. Characterisation of the first**

**Australian isolate of Neospora caninum from cattle. Australian Veterinary.Journal 80, 620–625.**

**- Michael P. Reichel, Milton M. Mcallister, WillIame. Pomroy, Carlos Campero, Luis M. Ortega-Mora and Johnt. Ellis. Control options for Neospora caninum – is there anything new or are we going backwards? Parasitology19 January 2014. , Page 1 of 16.**

**- Mugridge, N.B., Morrison, D.A., Heckeroth, A.R., Johnson, A.M., Tenter, A.M., 2003. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that Neospora caninum is more closely related to Hammondia heydorni than to Toxoplasma gondii. International Journal for Parasitology 29, 1545–1556.**

**-Mansourian, M., Khodakaram-Tafti, A., Namavari, M., 2009.Histopathological and clinical investigations in Neosporacaninum experimentally infected broiler chickenembryonated eggs. Veterinary Parasitology 166, 185–190.**

**- Michael P. Reichel , M. Alejandra Ayanegui-Alcérreca , Luís F.P. Gondim , John T. Ellis(2009) . What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle – The billion dollar question. International Journal for Parasitology 43 (2013) 133–142**

**- Mugridge, N.B., Morrison, D.A., Heckeroth, A.R., Johnson, A.M., Tenter, A.M., 1999. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that Neospora caninum is more closely related to Hammondia heydorni than to Toxoplasma gondii. International Journal for Parasitology 29, 1545–1556.**

**-McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Rapid communication: dogs are definitive hosts of Neospora caninum. International Journal for Parasitology 28, 1473–1479.**

**-Namavari M, Hosseini MH, Mansourian M, Shams Z, Amrabadi O, Tahamtan Y, Moazeni-Jula (2009). Testing for infective abortive agents in cattle in Iran. Online Journal of Veterinary Research.*Volume 16 (3):147-153, 2012.***

**-Namavari, M., Mansourian, M., Khodakaram-Tafti, A., Hosseini, M.H., Rahimiyan, A., Khordadmehr, M., Lotﬁ, M., 2011. Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of Neosporacaninumtachyzoites. Comparative Clinical Pathology, 1346–1349.**

***-* Jennifer Tranas, Robert A. Heinzen, Louis M. Wesss, and Milton M Mcallister.(1999). Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neosporacaninum*. ClinIcal and Diagnostic Laboratory Immunology, p. 765–76**

**- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernandez, E., Blanco-Murcia, J., Rodriguez-Bertos, A., Risco-Castillo, V., Miguel Ortega-Mora, L., 2009a. Experimental infection with a low virulence isolate of Neospora caninum at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. Veterinary Research 40.**

**-Reichel, M. P., Ellis, J. T. and Dubey, J. P. (2007). Neosporosis and hammondiosis in dogs. Journal of Small Animal Practice 48, 308–312. doi: 10.1111/j.1748-5827.2006.00236.x.**

**-Ramamoorthy, S., Sanakkayala, N., Vemulapalli, R., Jain, N., Lindsay, D.S., Schurig,G.S., Boyle, S.M., Sriranganathan, N.,( 2007). Prevention of vertical transmission of Neosporacaninum inC57BL/6 mice vaccinated with Brucellaabortus strain RB51 expressing N. caninum protective antigens. Int. J. Parasitol. 37, 1531–1538**

**-Rammamorthy.HISTORY AND ECONOMIC IMPORTANCE OF *NEOSPORA CANINUM***

**-Reichel, M.P., Ellis, J.T., Dubey, J.P.,( 2007). Neosporosis and hammondiosis in dogs. J. Small Anim. Prac. 48, 308–312.**

**- Santos JM, Soldati-Favre D: Invasion factors are coupled to key signaling events leading to the establishment of infection in apicomplexan parasites.Cell Microbiol 2011, 13(6):787–796.**

**- Williams, D.J.L., Trees, A.J., 2007. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in Neospora caninum-infected cattle. Parasite Immunology 28, 61–67.**

**- Williams, D.J.L., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., MacEachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J., 2000. Neospora caninum-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. Parasitology 121, 347–358.**

**-Wouda. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis a review.Vet Q.2000.22:71.**

**- Vetsci. Development of a Web Based Database for Orphan Genes of the Apicomplexa.July .10. 2011.**

1. . Dubey [↑](#footnote-ref-1)
2. . Daneshvar, Innes [↑](#footnote-ref-2)
3. . Reichel [↑](#footnote-ref-3)
4. .Razmi [↑](#footnote-ref-4)
5. . Nematollahi [↑](#footnote-ref-5)
6. .Namavari [↑](#footnote-ref-6)
7. 1.Yamage [↑](#footnote-ref-7)