مجله افق‌های نوین در شیمی

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

خاطره دهقانی[1]

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری

https://science-journals.ir , https://onsh.science-journals.ir

چکیده

تکوین جانوران به صورت زمانی در فرآیند خاصی انجام می گیرد. امروزه با توجه به عدم وجود داروی مناسب علیه بیماری 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 روش‌های کنترل عفونت نئوسپورا پرداختیم بدین منظور NC۱با پاساژ بالاو NC۱با پاساژ پاییندر دوزهای مختلف (شامل ۱×۱۰^{۴} ، ۱×۱۰^{۵} و ۱×۱۰^{۶}) به گروه-های 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 J۷۷۴ 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.

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

۱- مقدمه

*نئوسپورا کانینوم*تک‌یاخته‌ای اجباری داخل سلولی از شاخه‌ی آپی کمپلکسا است که محدوده-ی میزبانی وسیعی دارد از جمله آن‌ها گاو، گوسفند، سگ، آهوی کوهی می‌باشد که باعث سقط جنین، مرده‌زایی و بیماری‌های عصبی مادرزادی می‌شود. انگل *نئوسپورا* در چرخه‌ی زندگی خود دارای سه مرحله‌ی مشخص تاکی زوئیت، برادی زوئیت و اوسیست می‌باشد.تاکی زوئیت‌ها در بدن میزبان‌های واسط ایجاد می‌شوند که داخل سلولی هستند (دوبئی[۱]،۲۰۰۷). نئوسپوراکانینوم از طریق بلعیدن اووسیت دفع شده از سگ و یا از طریق جفت از حیوان ماده مثل گاو به جنین منتقل می‌شود که در حالت دوم منجر به سقط جنین یا مرده‌زایی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض انگل زنده قبل از جفت‌گیری باعث ایجاد ایمنی در گاو شده و میزان سقط جنین در این گاوها بعداً کاهش می‌یابد . در مطالعه‌ی مشابه، آلوده شدن گاو با تاکی زوئیت مرده باعث ایجاد ایمنی در مقابل انگل نمی‌شود. در نتیجه برای واکسیناسیون و ایجاد ایمنی مطلوب تولید تاکی زوئیت زنده‌ی تخفیف حدت یافته ضروری می‌باشد.کشت سلولی روشی مناسب برای تکثیر سریع و کاهش بیماری زایی تاکی زوئیت‌ها می‌باشد (دانشور،۲۰۰۳،انیز،۲۰۱۱)[۲]. آلودگی با نئوسپوراکانینوم در حیوانات مختلف از کشورهای زیادی گزارش شده است. مطالعات انجام شده در برخی از کشورها حاکی از این است که ۱۲ تا ۴۲ درصد جنین‌های سقط شده گاوها به این انگل آلوده می‌باشند. نشانه اصلی بیماری ناشی از *نئوسپوراکانینوم* در گاوها سقط جنین می‌باشد(ریچل،۲۰۰۷)[۳].نئوسپوراکانینوم سلول‌های اغلب بافت ها را مورد تهاجم قرار می‌دهد؛ اما تمایلی خاص به سیستم اعصاب مرکزی، میوکارد، عضلات اسکلتی و اندوتلیوم دارد. آنسفالومیلیت و پلی میوزیت مهمترین یافته‌های آسیب شناسی می‌باشند. تکثیر داخل سلولی تاکی زوئیت‌ها منجر به ایجاد کانون‌های نکروزه با اندازه‌های مختلف می‌گردد. ممکن است در مغز علاوه بر تکثیر و تجمعات تاکی زوئیت، کیست‌هایی با دیواره ضخیم نیز حضور داشته باشند. ضایعات اصلی در جنین‌های سقط شده، شامل نکروزهای چند کانونی و آنسفالومیلیت غیر چرکی می‌باشد. آلودگی مادرزادی در بره‌های متولد شده به صورت آنسفالیت و در کره اسب‌های سقط شده با ارگانیسم های تکثیر

۱. Dubey
۲. Daneshvar, Innes
۳. Reichel

شده در ریه همراه می‌باشد. ارگانیسم تمایل به اپی تلیوم کوریونی و عروق خونی جفت داشته و منجر به بروز التهاب جفت و واسکولیت در جنین می گردد. در جفت موجب التهاب و دژنره شدن کوریوالانتویس گردیده و نکروز گسترده جفت را سبب می‌شود. تاکی زوئیت ها به سلول های میزبان نفوذ نموده و در واکوئل های پارازیتوفروس جایگزین می‌گردند. این ارگانیسم ها می توانند در ماکروفاژها، منوسیت‌ها، هپاتوسیت‌ها و سلول های مجاری کلیوی و نورون‌های عصبی مغزی و نخاعی حیوانات آلوده یافت شوند. مرگ سلول‌ها به علت تکثیر تاکی زوئیت ها رخ می‌دهد. متعاقب پارازیتمی تاکی زوئیت‌ها، سلول‌های کارانکول مادری را آلوده ساخته و از آنجا به سلول‌های تروفوبلاست جنینی منتشر شده و موجب دژنره شدن آن‌ها می‌گردند. چنانچه سیستم ایمنی جنین بالغ به حدی تکامل یافته باشد که تکثیر انگل را متوقف کند، قادر به کنترل عفونت و بقا می‌باشد.

۲- مروری بر تحقیقات انجام شده

نئوسپوراکانینوم و *توکسوپلاسما* گوندی تا قبل از سال ۱۹۸۸به عنوان یک انگل تلقی می‌شدند تااینکه دوبئی و همکاران *نئوسپورا* را به عنوان یک گونه‌ی جدید معرفی کردند .بجرکاسو همکاران در سال ۱۹۹۶، اعلام داشتند سقط عفونی در گاوها در ماه های ۴ تا ۶ 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 کلی تشخیص *نئوسپورا* به دلیل نداشتن علائم بالینی اختصاصی مشکل می‌باشد. روش-های بیولوژی مولکولی از جمله PCR یکی از حساس‌ترین ابزارها برای تشخیص این پروتوزوا در نمونه‌های بافتی می‌باشد. *نئوسپوراکانینوم* در سرتاسر دنیا پراکنش دارد و عامل سقط جنین و مرده‌زایی در احشام است از این جهت مضرات اقتصادی و بهداشتی فراوانی در حوزه‌ی دام‌پروری دارد . در حال حاضر به صورت تجاری واکسن مؤثر ویا عامل درمانی بازدارنده‌ی تکثیر و همانندسازی این انگل شناسایی نشده است (حبیبی، ۲۰۰۵؛ دوبئی، ۲۰۰۷).

بارتلیوهمکاران درسال ۲۰۰۰، دریک مطالعه از لاین سلولی کلیه‌ی میمون سبز آفریقایی (Vero) جهت تخفیف حدت *نئوسپوراکانینوم* استفاده شد سپس گروه تاکی زوئیت‌های

تخفیف حدت‌یافته با ۷۶ مرتبه پاساژ وگروه تاکی زوئیت‌های بیماری‌زا با ۳۴ مرتبه پاساژ با دوزهای مشخص به دو گروه از موش‌های Balb/c تزریق شدند نتایج این مطالعه نشان دهنده-ی مرگ و میر کم‌تر موش‌های واکسینه شده با تاکی زوئیت‌های تخفیف حدت یافته و ایمنی مطلوب در آن‌ها می‌باشد.

ویلیامز و همکاران درسال ۲۰۰۷، 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 ۲۰۰۹، 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 ۲۰۰۹ 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 درسال۲۰۰۹ پرندگانی ازقبیل کبوتروتخم مرغ‌های نطفه‌دار رابه عنوان مدل مناسب برای عفونت *نئوسپوراکانینوم* آزمایشگاهی موردمطالعه قراردادند.

نام‌آوری درسال۲۰۱۱، درمطالعه‌ای از تخم مرغ‌های جنین‌دار به عنوان مدل برای ارزیابی بیماری‌زایی *نئوسپوراکانینوم* استفاده کردند. دراین مطالعه به یک گروه از تخم مرغ‌های جنین-دار هشت روزه *نئوسپوراکانینوم* پاساژ داده شده و به گروه دیگر از تخم‌مرغ‌های جنین‌دار *نئوسپوراکانینوم* بدون پاساژ تزریق شد و نتایج حاکی از میزان مرگ ومیر بالای جنین‌های آلوده شده بانئوسپوراکانینوم بدون پاساژ بود بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی بر روی قلب مغز و کبد جنین‌های مرده انجام گرفت و آنتی ژن *نئوسپوراکنینوم* در بافت قلب شناسایی شد اما در هیچ گروهی آلودگی آنتی‌ژنی دربافت مغز شناسایی نشد.

تفتی درسال ۲۰۱۲، در مطالعه‌ای تخم‌مرغ جنین‌دار مرغ گوشتی هشت روزه را با دوزهای مختلف تاکیزوئیت NC۱ آلوده کردند و سپس میزان آلودگی بافت مغز ، قلب وکبد را با روش-های ایمونوهیستوشیمی و PCR و بررسی کردند نتایج حاکی از آن بود که انجام PCR نه تنها برای شناسایی DNA بلکه به منظور بررسی نئوسپوروسیس در نمونه‌های آلوده شده در راستای دستیابی به تولید واکسن و درمان ضروری است.

خردادمهر درسال ۲۰۱۱۳ دریک مطالعه تولید*نئوسپوراکانینوم* رادوسل لاین (Vero) کلیه‌ی میمون سبز آفریقایی(murine macrophage (J۷۷۴را مقایسه کردند*نئوسپوراکانینوم* به‌طورمداوم دراین خطوط سلولی به مدت ۳ماه 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* ۱۵،۵ و ۱۸،۴ درصد گزارش شده است و در گزارشات اخیر این میزان ۳۳،۳۳٪ نیز اعلام گردیده است(رزمی[۴]، ۲۰۰۷؛ نعمت اللهی[۵]، ۲۰۱۱؛ نام آوری[۶]، ۲۰۱۲).

صالحی در سال ۱۳۸۹، در بررسی سرولوژیکی گاوهای آبستن تهران میزان سقط در بین گاوهای سرم مثبت گاوداری‌ها را ۲۰،۶۷٪ و در بین گاوهای سرم منفی ۱۰/۱۱درصد گزارش نمودند و نتیجه گرفتند که ریسک سقط در بین گاوان سرم مثبت دو برابر گاوهای سرم منفی بوده است. حیدری و اکبرین در سال ۱۳۹۱ با بررسی سرولوژیکی بر روی گاوهای دورگ و بومی همدان فراوانی کلی سرمی آنتی بادی ضد *نئوسپورا کانینوم*را ۲۰٪ گزارش کردند همچنین بیشترین و کمترین میزان فراوانی آلودگی را به ترتیب در گاوهای دارای بیش از ۴ سال سن (۳۲/۳۳٪) و زیر ۲سال سن (۷/۳۲٪) مشاهده نمودند. عزیزی (۱۳۹۲)، شیوع آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گاوها و سگ‌های نگهبان منطقه قم و نیشابور نیز گزارش شده است (عزیزی،۱۳۹۲؛ فضلی و نوراللهی فرد،۱۳۹۲).

[۴]. Razmi
[۵]. Nematollahi
[۶]. Namavari

بهرامی در سال۱۳۹۴، برای اولین بار با استفاده از PCRبه بررسی وجود تک یاخته *نئوسپوراکانینوم* در مغز گنجشک در ایران پرداختند که میزان آلودگی را ۸,۲٪ گزارش داد.

۳- 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 ۷۰عدد تخم مرغ جنین‌دار نژاد لوهمن تهیه و با اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی شدند. سپس در انکوباتور ضد عفونی شده (با فرمالدهید)، با دمای۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، رطوبت ۷۰ درصد، ۸-۶ بار چرخش در ساعت نگهداری شدند.. تخم مرغ‌ها به طور روزانه کندل شده و زنده بودن جنین‌ها، با حرکت جنین و رگه‌دار بودن تخم مرغ بررسی شد. روز نهم انکوباسیون ۵۶ عدد تخم مرغ جنین‌دار به طور تصادفی انتخاب شده و به هفت گروه هشت‌تایی تقسیم گردید.سپس محل غشاء کوریوآلانتوئیک با استفاده از کندلینگ مشخص و محدوده آن در هر تخم مرغ علامت‌گذاری شده و سوراخی در حد فاصل کیسه هوایی و غشاء کوریوآلانتوئیک جهت محل تزریق انگل ایجاد شد. دوز مشخص و حساب شده‌ای از تاکی زوئیت‌های تخفیف حدت داده شده با پاساژ بالا و تاکی زوئیت‌های با پاساژ پایین به ۶ گروه تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شد، و گروه هفتم به عنوان کنترل ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت دریافت نمود، محل تزریق نیز برای جلوگیری از عفونت احتمالی مسدود گردید

۴- 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 ۷۰عدد تخم مرغ جنین‌دار نژاد لوهمن تهیه و با اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی شدند. سپس در انکوباتور ضد عفونی شده (با فرمالدهید)، با دمای۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، رطوبت ۷۰ درصد، ۸-۶ بار چرخش در ساعت نگهداری شدند.. تخم مرغ‌ها به طور روزانه کندل شده و زنده بودن جنین‌ها، با حرکت جنین و رگه‌دار بودن تخم مرغ بررسی شد. روز نهم انکوباسیون ۵۶ عدد تخم مرغ جنین‌دار به طور تصادفی انتخاب شده و به هفت گروه

هشت‌تایی تقسیم گردید.سپس محل غشاء کوریوآلانتوئیک با استفاده از کندلینگ مشخص و محدوده آن در هر تخم مرغ علامت‌گذاری شده و سوراخی در حد فاصل کیسه هوایی و غشاء کوریوآلانتوئیک جهت محل تزریق انگل ایجاد شد.

دوز مشخص و حساب شده‌ای از تاکی زوئیت‌های تخفیف حدت داده شده با پاساژ بالا و تاکی زوئیت‌های با پاساژ پایین به ۶ گروه تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شد، و گروه هفتم به عنوان کنترل ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت دریافت نمود، محل تزریق نیز برای جلوگیری از عفونت احتمالی مسدود گردید. تزریق دوزها به ترتیب جدول می‌باشد.

جدول۱. گروه‌بندی تخم مرغ ها و دوز تزریقی تک‌یاخته

گروه	دوز تزریقی و نوع تاکی زوئیت
۱	تک یاخته *نئوسپوراکانینوم*low passage با دوز ۱×۱۰^{۴} در میلیلیتر
۲	تک یاخته *نئوسپورا کانینوم*low passage با دوز ۱×۱۰^{۵} در میلیلیتر
۳	تک یاخته *نئوسپورا کانینوم*low passage با دوز ۱×۱۰^{۶} در میلیلیتر
۴	تک یاخته تخفیف حدت یافته High passage با دوز ۱×۱۰^{۴} در میلیلیتر
۵	تک یاخته تخفیف حدت یافته High passage با دوز ۱×۱۰^{۵} در میلیلیتر
۶	تک یاخته تخفیف حدت یافته High passage با دوز ۱×۱۰^{۶} در میلیلیتر
۷	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.

۵- استخراج DNA

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

۱. ۲۵میلی‌گرم از هر نمونه به طور کامل هموژن شد وپس ازآن۱۰۰میکرولیتر بافر پروتئاز و ۵ میکرولیتر پروتئاز به آن افزوده شد و به مدت۹۰ دقیقه در۵۵ درجه سانتیگراد قرارداده شد.

۲. سپس۴۰۰ میکرولیتر از محلول لیزکننده اضافه شد و به مدت۲۰ ثانیه ورتکس شد.

۳. به مخلوط فوق۳۰۰ میکرولیترمحلول رسوب دهنده افزوده شد وپس ازورتکس، درمنفی ۲۰درجه سانتیگراد به مدت۲۰ دقیقه نگهداری شد پس ازآن برای۱۰ دقیقه بادور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد ومایعرویی به طور کامل دور ریخته شد.

۴. به هر لوله یک میلی لیتر بافر شستشو دهنده اضافه شد وپس از ۵ثانیه ورتکس، مجددا مایع رویی حذف شد(این مرحله دوبار انجام شد).

۵. نمونه‌ها به مدت۵دقیقه در۶۵ درجه سانتیگراد قرارداده شد.

۶. درانتها۵۰میکرولیتر بافر حل‌کننده افزوده شدو به مدت۵ دقیقه در۶۵درجه سانتیگراد نگهداری شدوسپس۳۰ ثانیه سانترفیوژ شدو محلول باقیمانده به عنوان DNA مورد نظر تا زمان مورد استفاده جهت پروسه PCRدر منفی۷۰ درجه سانتیگراد قرارداده شد.

۶- انجام روش PCR

جهت انجام واکنش PCRبه منظورتشخیص حضوری اعدم حضور ژنوم انگلم و رد نظر در بافت‌های مختلف،مواد زیر برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری مخلوط شدند:

مواد مورد نیاز	حجم (میکرو لیتر)
PCR buffer (۱۰ x)	۲,۵
$Mgcl_2$	۱
dNTPs	۰,۵
Taq DNA polymerase (۵u/µl)	۰,۲۵
Forward primer (۱۰ pmol/µl)	۱
Reverse primer (۱۰ pmol/µl)	۱
DNA Template	۲
D.W	۱۶,۷۵
Total	۲۵

توالی پرایمرهای استفاده شده در این واکنش به شرح زیرمی‌باشد: (یاماگه[۷] ۱۹۹۶)

Np۲۱-plus :۵'–gtg cgt cca atc ctg taa c– ۳'

[۱].Yamage

Np۶-plus :۵'–cag tca acc tac gtc ttc t– ۳'

این جفت پرایمر الیگو نوکلوتیدی، قطعات ۳۲۸جفت باز از ژنوم انگل را شناسایی می‌کنند . جفت پرایمرNp۶/ Np۲۱ قادربه تشخیص اختصاصی *نئوسپورا کانینوم*(حتی تشخیص یک تاکی زوئیت در ۲میلی‌گرم از ژنوم نمونه) می‌باشد.

سیکل‌های دمایی جهت انجام واکنش PCR به قرار زیر می‌باشد:

۱. ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۴دقیقه

۲. ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵۰ثانیه

۳. ۵۳ درجه سانتیگراد برای ۵۰ثانیه برای هرسیکل (جمعا ۳۵سیکل)

۴. ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۱دقیقه

۵. ۷۲درجه سانتیگراد برای ۵دقیقه

۶. ۴ درجه سانتیگراد برای ۱دقیقه

پس از اتمام واکنش، ۶میکرولیترازمحصول PCRبا ۲میکرولیتراز loading buffer مخلوط شده و بر روی ژل آگارز ۱٪به همراه رنگ اتیدیم بروماید به وسیله‌ی نورUV مورد مطالعه قرارگرفت.

۷- 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 ۱×۱۰^{۴} 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 ۱۸ انکوبه گذاری، یک جنین تلف گردید.

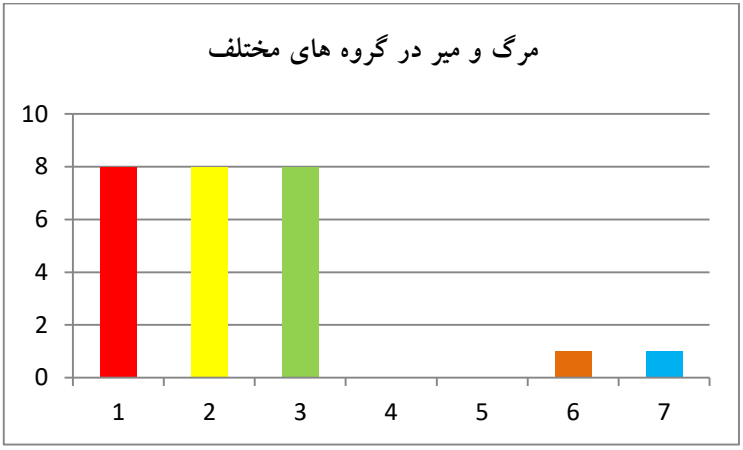
در گروه‌های *نئوسپوراکانینوم*با پاساژ پایین در هر سه گروه با دوزهای مختلف تلفات مشاهده شد و تا روز آخر از هر گروه ۸ جنین تلف گردید.نتایج مرگ و میر در هر گروه در جدول آورده شده است. مقایسهمیزان مرگ و میر در هر گروه در نمودار دیده می‌شود.مقایسه آماری گروه تزریقی با *نئوسپورا*تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا 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 ($P \geq ۰.۰۰۰۱$).

جدول۲. نتایج مرگ و میر در هر گروه تخم مرغ در روزهای مختلف پس از تزریق

گروه	روز	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	مجموع
تک یاخته نئوسپوراکانینوم Low passageدوز ۱×۱۰^{۴} در میلی لیتر		–	–	–	–	۳	۳	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۸
تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* Low passageدوز ۱×۱۰^{۵} در میلی لیتر		–	–	–	–	۴	۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۸
تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* Low passageدوز ۱×۱۰^{۶} در میلی لیتر		–	–	۳	۳	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۸
تک یاخته تخفیف حدت یافته High passageدوز ۱×۱۰^{۴} در میلی لیتر		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۰

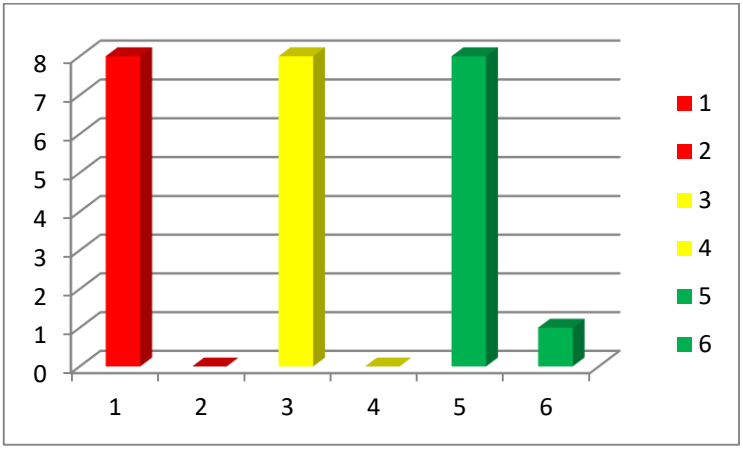
تک یاخته تخفیف حدت یافته High passageدوز ۱×۱۰^۵ در میلی لیتر	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۰
تک یاخته تخفیف حدت یافته High passageدوز ۱×۱۰^۶ در میلی لیتر	–	۱	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱
محیط کشت DMEM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱	–	–	–	۱

تصویرمقایسه 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 ۱×۱۰^۴در میلی لیتر، دوز۱×۱۰^۵در میلی لیتر، دوز ۱×۱۰^۶در میلی لیتر، تک یاخته تخفیف حدت یافته با پاساژ بالادوز ۱×۱۰^۴ در میلی لیتر، دوز

۱×۱۰^{۵} در میلی لیتر، دوز ۱×۱۰^{۶} 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 ۱ *نئوسپوراکانینوم*با پاساژ پایین دوز ۱×۱۰^{۴}در میلی لیتر گروه ۲ تک یاخته تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا دوز ۱×۱۰^{۴} در میلی لیتر می باشد. گروه ۳ و ۴ نیز مقایسه تک یاخته *نئوسپورا*با پاساژ پایین با دوز۱×۱۰^{۵}در میلی لیتر و تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا دوز۱×۱۰^{۵}در میلی لیتر می باشد. دو گروه آخر مقایسه *نئوسپورا*با پاساژ پایین با دوز ۱×۱۰^{۶}در میلی لیتر و تخفیف حدت یافته با پاساژ بالا با دوز ۱×۱۰^{۶} در میلی لیتر می باشد.

۸- 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 ۲۰۱۴ 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 J۷۷۴ ، 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(۱۳۹۳)."اصول آزمایشگاهی ،روشهای مولکولی " چاپ،دوم.

- Al-Qassab, S.E., Reichel, M.P., Ellis, J.T., ۲۰۱۰. On the biological and genetic diversity in Neospora caninum. Diversity ۲, ٤١١–٤٣٨.

- Almeria, S., Araujo, R., Tuo, W., Lopez-Gatius, F., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., ۲۰۱۰. Fetal death in cows experimentally infected with Neospora caninum at ۱۱۰ days of gestation. Veterinary Parasitology ۱٦۹, ۳۰٤–۳۱۱.

-Alexander J. Trees, Diana J.L. Williams .Endogenous and exogenous transplacental infection in Neospora caninum and Toxoplasma gondii.Trends in parasitology. Volume ۲۱, Issue ۱۲, December ۲۰۰٥, Pages ٥٥۸–٥٦۱.

- 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. ۱۰۸, no. ۳, pp. ۷٤۱–۷٤۳, ۲۰۱۱.

-Barratt, J., Al Qassab, S., Reichel, M.P., Ellis, J.T., ۲۰۰۹. 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 ۲۲, ۲۲۸–۲۳۳.

- Barratt, J.L.N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J.T., Stark, D., ۲۰۱۰. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. Clinical Microbiology Reviews ۲۳, ۷۹٥.

-Bartly, P.M., Wright S.E., MaleyS.W.,Buxton D., Nath,M.,andInnes,EA.(۲۰۰۹)The development of immune responses in Balb/c mice following inoculation with a attenuated or virulent *Neosporacaninum*tachyzoites , Parasite Immunology,۳۱:۳۹۲- ٤۰۱.

-Bjorkimanetal(۱۹۹٦). N.Caninum and bovine virus diarrhea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion.Vet.J.۱۵۹,۲۰۱-۲۰٦

- 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., ۲۰۰۸. Chickens (Gallus domesticus) are natural intermediate hosts of Neospora caninum. International Journal for Parasitology .۳۸, ۱۵۷–۱۵۹.

-Daneshvar, H., Coombs , G.H., Hagan,P., and Phillips, S. (۲۰۰۳) *LeishmaniaMexicana* and *Leishmaniamajor*:Vaccination with the attenuated lines, Journal of Investigative Derm- atology, ۳:۱٦٦۲-٦۸.

- Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. ۱۹۹۹. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. Int J Parasitol ۲۹:۱٦۸۳-

۱٦۸۹.

- 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. ۳۱, no. ۸, pp. ۷٤۷–۷۵۲, ۲۰۰۱.

- D. S. Lindsay, S. J. Upton, and J. P. Dubey, "A structural study of the *Neospora caninum* oocyst," *International Journal for Parasitology*, vol. ۲۹, no. ۱۰, pp. ۱۵۲۱–۱۵۲۳, ۱۹۹۹.

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

S.M., Gondim, L.F., ۲۰۱۰. Toxoplasma gondii and Neospora caninum in sparrows (Passer domesticus) in the Northeast of Brazil. Veterinary Parasitology ۱۶۸,۱۲۱–۱۲۴.

- 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.* ۲۰۱۱, ۴۱, ۶۸۵-۶۹۵.

-Dubey, J.P., Lindsay, D.S., ۱۹۹۶. A review of Neospora caninum and neosporosis.

Veterinary Parasitology ۶۷, ۱–۵۹.

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

***Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* ۲۰۰۷, ۲۰, ۳۲۳-۳۶۷.**

- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., ۲۰۰۴c. Coyotes (Canis latrans) are definitive hosts of Neospora caninum. International Journal for

Parasitology ۳۴, ۱۵۹–۱۶۱.

- G.S., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., ۲۰۰۷c. Prevention of vertical transmission of Neospora caninum in C۵۷BL/۶ mice vaccinated with Brucella abortus strain RB۵۱ expressing N. caninum protective antigens. Int. J. Parasitol. ۳۷, ۱۵۳۱–۱۵۳۸.

- 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. ۲۹, no. ۱۰, pp. ۱۶۸۳–۱۶۸۹, ۱۹۹۹.

- Hall, C.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T., ۲۰۰۵. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. Veterinary Parasitology ۱۲۸,۲۳۱–۲٤۱.

-Habibi G.R., Hashemi-Fesharki,R., Sadrebazzaz,A., Bozorgi,S., and Bordbar,N. (۲۰۰۵)

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

٥٩:٥٥-٦٤.

- 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. ۲۸, no. ۹, pp. ۱٤۷۳–۱٤۷۸, ۱۹۹۸.

- 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 ۹٥ (۲۰۱۳) ٥۱٥–٥۲۱.

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

۲۰۰۹. Pigeons (Columba livia) are a suitable experimental model for Neospora

caninum infection in birds. Veterinary Parasitology ۱٥۹, ۱٤۹–۱٥۳

-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., ۲۰۰۲. Characterisation of the first

Australian isolate of Neospora caninum from cattle. Australian Veterinary.Journal ۸۰, ٦۲۰–٦۲٥.

- 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? Parasitology۱۹ January ۲۰۱٤. , Page ۱ of ۱٦.

- Mugridge, N.B., Morrison, D.A., Heckeroth, A.R., Johnson, A.M., Tenter, A.M., ۲۰۰۳. 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 ۲۹, ۱٥٤٥–۱٥٥٦.

-Mansourian, M., Khodakaram-Tafti, A., Namavari, M., ۲۰۰۹.Histopathological and clinical investigations in Neosporacaninum experimentally infected broiler chickenembryonated eggs. Veterinary Parasitology ۱٦٦, ۱۸٥–۱۹۰.

- Michael P. Reichel , M. Alejandra Ayanegui-Alcérreca , Luís F.P. Gondim , John T. Ellis(۲۰۰۹) . What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle – The billion dollar question .International Journal for Parasitology ٤۳ (۲۰۱۳) ۱۳۳–۱٤۲

- Mugridge, N.B., Morrison, D.A., Heckeroth, A.R., Johnson, A.M., Tenter, A.M., ۱۹۹۹. 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 ۲۹, ۱٥٤٥–۱٥٥٦.

-McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., ۱۹۹۸. Rapid communication: dogs are definitive hosts of Neospora caninum. International Journal for Parasitology ۲۸, ۱٤۷۳–۱٤۷۹.

-Namavari M, Hosseini MH, Mansourian M, Shams Z, Amrabadi O, Tahamtan Y, Moazeni-Jula (۲۰۰۹). Testing for infective abortive agents in cattle in Iran. Online Journal of Veterinary Research.*Volume ۱٦ (۳): ۱٤۷-۱٥۳*, ۲۰۱۲.

-Namavari, M., Mansourian, M., Khodakaram-Tafti, A., Hosseini, M.H., Rahimiyan, A., Khordadmehr, M., Lotfi, M., ۲۰۱۱. Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of Neosporacaninumtachyzoites. Comparative Clinical Pathology, ۱۳٤٦–۱۳٤۹.

- Jennifer Tranas, Robert A. Heinzen, Louis M. Wesss, and Milton M Mcallister.(۱۹۹۹). Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neosporacaninum*. ClinIcal and Diagnostic Laboratory Immunology, p. ۷٦٥–۷٦

- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernandez, E., Blanco-Murcia, J., Rodriguez-Bertos, A., Risco-Castillo, V., Miguel Ortega-Mora, L., ۲۰۰۹a. Experimental infection with a low virulence isolate of Neospora caninum at ۷۰ days gestation in cattle did not result in foetopathy. Veterinary Research ٤۰.

-Reichel, M. P., Ellis, J. T. and Dubey, J. P. (۲۰۰۷). Neosporosis and hammondiosis in dogs. Journal of Small Animal Practice ٤۸, ۳۰۸–۳۱۲. doi: ۱۰,۱۱۱۱/j.۱۷٤۸-٥۸۲۷,۲۰۰٦,۰۰۲۳٦.x.

-Ramamoorthy, S., Sanakkayala, N., Vemulapalli, R., Jain, N., Lindsay, D.S., Schurig,G.S., Boyle, S.M., Sriranganathan, N.,(۲۰۰۷). Prevention of vertical transmission of Neosporacaninum inC٥۷BL/٦ mice vaccinated with Brucellaabortus strain RB٥۱ expressing N. caninum protective antigens. Int. J. Parasitol. ۳۷, ۱٥۳۱–۱٥۳۸

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

-Reichel, M.P., Ellis, J.T., Dubey, J.P.,(۲۰۰۷). Neosporosis and hammondiosis in dogs. J. Small Anim. Prac. ٤٨, ۳۰۸–۳۱۲.

- Santos JM, Soldati-Favre D: Invasion factors are coupled to key signaling events leading to the establishment of infection in apicomplexan parasites.Cell Microbiol ۲۰۱۱, ۱۳(٦):۷۸۷–۷۹٦.

- Williams, D.J.L., Trees, A.J., ۲۰۰۷. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in Neospora caninum-infected cattle. Parasite Immunology ۲۸, ٦۱–٦۷.

- 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., ۲۰۰۰. Neospora caninum-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. Parasitology ۱۲۱, ۳٤۷–۳٥۸.

-Wouda. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis a review.Vet Q.۲۰۰۰,۲۲:۷۱.

- Vetsci. Development of a Web Based Database for Orphan Genes of the Apicomplexa.July .۱۰. ۲۰۱۱.