DOI: 10.22034/vj.2017.108176.1239
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی ایمنی‌زایی واریته تخفیف حدت‌یافته رازی از *توکسوپلاسما گوندی* در موش Balb/c

• **آرزو عباسی فر**
گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
• **مهدی نام‌آوری (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی، شیراز
• **عباسعلی رضاییان**
موسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی، شعبه شیراز،
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۶-۰۹-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۱۳-۱۱-۱۳۹۵
Email: namavari@yahoo.com

چکیده

در حال حاضر واکسن زنده توکسوواکس از واریته تخفیف حدت‌یافته‌ی توکسوپلاسما تولید می‌شود. هدف از این پژوهش ارزیابی ایمنی‌زایی واریته‌ی رازی از توکسوپلاسما است که در موسسه رازی شیراز از طریق پاساژهای متوالی و طولانی مدت تولید شده است. بیست و چهار سر موش Balb/c در سه گروه تقسیم شدند. گروه اول کنترل منفی محیط کشت، گروه دوم کنترل مثبت سوش زنده و گروه سوم واریته زنده توکسوپلاسما رازی را دریافت کردند. تمامی موش‌ها به صورت روزانه بررسی و تلفات احتمالی ثبت شد. بیست و هشت روز بعد از تزریق، از تمامی گروه‌های باقي مانده خون‌گیري جهت تست الایزا انجام گرفت و سپس همه گروه‌ها با تزریق سوش حاد چالش شدند. نتایج نشان داد که در گروه کنترل منفی هشت روز پس از چالش تلفات شروع شد و تا روز ۱۴ تمامی موش‌ها در این گروه تلف شدند. در گروه کنترل مثبت مانند گروه اول هشت روز پس از چالش تلفات شروع شد و تا روز ۱۸ تمامی موش‌های این گروه نیز تلف شدند. نتیجه بسیار جالب اینکه در گروه سوم ۱۴ روز پس از چالش تلفات شروع شد و تا یک ماه پس از چالش تنها ۵۰ درصد این گروه تلف شدند. این نتایج نشان داد که واریته توکسوپلاسما رازی منجر به ایجاد ایمنی نسبی در موش گردیده و باعث ایجاد تلفات و بروز بیماری نشد.

کلمات کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، موش، Balb/c

Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 107-113

Evaluation of Razi attenuated variety of *Toxoplasma gondii* in Balb/c mice

By: Abbasifar, A., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. Namavari, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran. and Rezayian, A., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Email: namavari@yahoo.com

Received: 2016-12-06 **Accepted: 2017-02-01**

Currently, the live vaccine Toxovax is produced from the attenuated variety of *Toxoplasma (T.) gondii*. The aim of this study was to evaluate the immunogenicity of live variety of *T. gondii* which was produced through serial passages in cell culture in Shiraz, Razi Institute. Twenty-four Balb/C mice were randomly divided into three groups. Group I was the negative control and received cell culture media. Group II as positive control and group III were inoculated with acute and Razi strains of *T. gondii,* respectively. All mice were assessed daily and potential mortality was recorded. Twenty-eight days later blood sample were collected from all groups for ELISA and then all mice were challenged with injections of acute strain of *T. gondii.* The results showed that in the control group, mortality started from day 8 and up to14 days after challenge, all mice of this group died. Similar to the first group, mortality was started in the positive control group 8 days after challenge and all mice died until the day 18. The interesting finding was that the mortality rate was 50% in the third group. These results suggest that the Razi variety of T. gondii caused partial immunity in mice and this variety doesn't cause disease and mortality in mice.

Key words: *Toxoplasma gondii*, BALB/c, mice

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی یکی از رایج‌ترین بیماری‌های مشترک در جهان می‌باشد به طوریکه یک سوم جمعیت بشری به این تک‌یاخته آلوده می‌باشند. توکسوپلاسما گوندی یک تک‌یاخته انگل اجباری درون یاخته‌ای از شاخه اپی‌کمپلکسا می‌باشد (۱۶،۷). شاخه اپیکمپلکسا شامل بیش از ۵۰۰۰ گونه تک‌یاخته انگل می‌باشد (۱۲) و تقریباً همه گونه‌های آن بیماری‌زا می‌باشد از جمله توکسوپلاسما گوندی، نئوسپورا کنینوم، پلاسمودیوم فالسی‌پاروم و ایمریا تنلا (۱۲،۱۱،۶). این تک‌یاخته قادر به آلوده‌سازی انواع جانوران خون‌گرم از جمله انسان، حیوانات اهلی و وحشی می‌باشد که از این نظر به‌عنوان یکی از موفق‌ترین تک‌یاخته‌های انگلی دنیا محسوب می‌شود (۱۶). از آنجایی‌که این تک‌یاخته انگلي در همه جا وجود دارد، عفونت‌های انساني در برخي جوامع تا ۱۰۰ درصد نیز گزارش شده است (۷). یکی از بزرگ‌ترین مشکلاتی که بیماری ناشی از این انگل در صنعت پرورش گوسفند ایجاد می‌کند، سقط جنین است. به دلیل تأثیر بالایی که توکسوپلاسما بر روی کیفیت زندگی انسان‌ها می‌گذارد، تمامی سازمان‌ها نظیر سازمان بهداشت جهانی در فکر کنترل و جلوگیری از آلودگی انسان‌ها به این تک‌یاخته می‌باشند. داروهای آنتی‌کوکسیدیای بسیاری برای جلوگیری از این آلودگی تهیه شده ولی این مسئله وجود دارد که این تک‌یاخته به‌مرور به این داروها مقاوم می‌شود. همچنین هیچ نوع دارویی که بر مرحله تشکیل کیست مؤثر باشد، وجود ندارد. از آنجاکه توکسوپلاسما در سلول بدن میزبان رشد می‌کند، لذا به نظر می‌رسد سیستم ایمنی نتواند به‌خوبی بر روی آن تأثیر گذاشته و آن را کنترل کند، پس تهیه یک واکسن که هم بتواند از انتقال مادر به جنین جلوگیری کند و هم بر روی حالت کیستی انگل مؤثر باشد می‌تواند راه‌کار مناسبی برای مبارزه با آن باشد (۱۰،۲۳). در این راستا واکسن‌های متنوعی ازجمله توکسوپلاسمای زنده تخفیف حدت‌یافته، واکسن DNA و همچنین واکسن‌های نوترکیب این انگل تهیه و مورد آزمایش و استفاده قرار گرفته‌اند. تنها واکسن تجاری توکسوپلاسما با نام توکسوواکس به‌وسیله تخفیف حدت تاکی‌زوئایت‌های سوش S48 توکسوپلاسما با سه هزار بار پاساژ در صفاق موش تولیدشده است گرچه تزریق این واکسن باعث مرگ موش‌ها می‌شود ولی در گوسفند از سقط جنین و تشکیل کیست جلوگیری می‌کند (۲۵،۲)

هدف از این پژوهش نیز این بود تا واریته‌ای از توکسوپلاسما که طی پاساژهای متوالی در شرایط آزمایشگاهی در موسسه رازی شیراز تهیه شده است، ارزیابی گردد. قبلا در مطالعه انجام شده روی این واریته با استفاده از تخم‌مرغ جنین‌دار مشخص گردیده که پاساژ متوالی در شرایط آزمایشگاهی منجر به کاهش قابل‌ملاحضه حدت آن گردیده است (۲۱). در این مطالعه ایمنی‌زایی این واریته با استفاده از موش Balb/c مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش می‌تواند در دستیابي به روش سریع‌تر و مؤثرتر جهت تهیه واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته (از طریق

پاساژهای متوالي در کشت سلولی) بسیار مفید باشد و سبب صرفه‌جویی در وقت و هزینه‌های تولید واکسن شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از تاکی‌زوئایت توکسوپلاسما گوندی سویه Rh و واریته تخفیف حدت‌یافته موجود در مؤسسه رازي شیراز استفاده شد. کشت انگل طبق روش دبی (۲۰۱۰) انجام شد (۶). به این صورت که پس از کشت رده سلولی Vero و تشکیل یک‌لایه سلولی در روز سوم، محیط کشت DMEM تازه همراه با تاکي‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به فلاسک کشت سلولی اضافه گردید. در این پژوهش از تاکی‌زوئایت توکسوپلاسما گوندی موجود در مؤسسه رازي شیراز استفاده شد. محیط کشت شامل DMEM حاوی دو درصد سرم جنین گوساله، محلول‌های آنتي‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ضد قارچ آمفوتریسین (۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود که در شرایط دمایي ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد CO_2 نگهداری شدند. با بررسی روزانه فلاسک‌های حاوی توکسوپلاسما با استفاده از میکروسکوپ معکوس، زمانی که ۹۰-۸۰ درصد سلول‌های Vero با ایجاد ضایعات سلولی توسط تاکي‌زوئیت‌های توکسوپلاسما تخریب شدند، مایع رویی فلاسک‌هایی که حاوی تاکي‌زوئیت‌ها بودند جمع‌آوری شدند و جهت جداسازی بقایاي سلول‌های Vero، دو بار سانتریفیوژ (۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) انجام شد. در انتها تعداد تاکي زوئیت‌های زنده در هر میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومترنئوبار شمارش شد (۲۱،۵).

برای بررسی واکسن‌های تهیه شده از موش‌های Balb/c ماده با سن سه تا چهار هفته و میانگین وزن ۱۸ تا ۲۲ گرم موجود در موسسه رازی شیراز استفاده شد. موش‌ها به‌صورت تصادفی به سه گروه هشت‌تایی تقسیم شدند. هر گروه در قفس‌های جداگانه قرار داده شد و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند و از غذا و آب معمولی برای تغذیه استفاده گردید. گروه اول به‌عنوان گروه کنترل منفی صرفا یک میلی‌لیتر محیط کشت سلولی به صورت تزریق زیر پوستی دریافت کردند. در گروه دوم به‌عنوان گروه کنترل مثبت سوش حاد با دوز پایین، هر موش ۵۰۰ تاکي زوئیت توکسوپلاسما دریافت کرد. گروه سوم به‌عنوان گروه واکسن سوش تخفیف حدت‌یافته موسسه رازی تحت عنوان توکسوپلاسما واریته پارس 1×10^6 تاکي زوئیت به هر موش به صورت زیر پوستی تزریق شد. تمامی موش‌ها به صورت روزانه بررسی و نشانه‌های بیماری و تلفات احتمالی آن‌ها ثبت گردید. در این مطالعه ایمنی سلولی با تست پوستی و ایمنی هومورال با تست الایزا بررسی شد و میانگین جذب نوری و انحراف معیار برای هر گروه محاسبه شد. ۲۸ روز بعد از تزریق، از تمامی موش‌های زنده مانده خون‌گیري انجام و سپس سرم آن‌ها جدا شد. تست الایزا طبق روش داویسون و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد (۴) . در این روش از 2×10^6 تاکي زوئیت توکسوپلاسما کشته و فیکس شده توسط فرمالین در هر چاهك پلیت الایزا به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد و سرم‌ها نیز با رقت ۲۵:۱ به دلیل تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌های کنترل مثبت و منفی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای قرائت نتایج، چاهک‌ها در دستگاه ELISA reader و طول‌موج ۴۵۰ نانومتر قرار داده شدند.

برای تست پوستي ابتدا به کف پای راست هر موش تاکي زوئیت‌های توکسوپلاسمای فیکس شده با فرمالین به میزان ۱۰ میلیون در ۵۰ میکرولیتر PBS به صورت زیر پوستی تزریق شد و میزان تغییر ضخامت در مقایسه با پاي چپ موش‌ها که با ۵۰ میکرولیتر PBS تزریق شده بودند، پس از ۲۴ساعت با کولیس دیجیتال با دقت یک صدم میلی‌متر تعیین و ثبت گردید. چهار هفته پس از ایمنی‌سازی، کلیه موش‌ها با دوز ۱۰۰۰ تاکی‌زوئایت توکسوپلاسما به روش زیرپوستی مورد چالش قرار گرفتند. تمام گروه‌ها به مدت یک ماه روزانه تحت نظر قرار گرفتند و تلفات و علائم بالینی ثبت گردید.

ارزیابی آماری

زمان بقا در گروه کنترل، سوش حاد و تخفیف حدت‌یافته با استفاده از روش کاپلان مایر تحلیل گردید. سطح معنی‌داری کمتر از یک درصد در نظر گرفته شد. آزمون t بین گروه های مختلف در سامانه‌ی Graphpad به صورت آنلاین انجام شد.

نتایج

در موش‌های گروه کنترل منفی تا قبل از چالش هیچ‌گونه تلفات و یا بروز بیماری مشاهده نگردید، اما نه روز پس از چالش تلفات شروع شد و تا روز ۱۲ تمامی موش‌های این گروه تلف شدند. در گروه کنترل مثبت قبل از چالش گرچه تلفاتی مشاهده نشد، لیکن علائم بیماری شامل عدم تمایل به حرکت، قوز کردن، ضعف، بیحالی، ژولیده شدن مو و تورم شدید چشم در سه سر موش مشاهد شد. یازده روز پس از چالش نیز تلفات در این گروه شروع شد و تا روز ۱۴ تمامی موش‌های این گروه تلف شدند. در گروه سوم که با سوش تخفیف حدت‌یافته موسسه رازی ایمن شده بودند، تا زمان چالش هیچ‌گونه تلفات و بروز بیماری مشاهد نشد. پس از چالش نیز تلفات از روز ۱۲ شروع شد ولی تنها چهار سر (۵۰ درصد) از موش‌های این گروه تلف شدند. در گروه کنترل، ۱۰۰ درصد موش‌ها در روز دوازدهم و در گروه سوش حاد، ۱۰۰ درصد موش‌ها در انتهای روز چهاردهم از بین رفتند. این در حالی است که ۵۰ درصد موش‌ها در گروهی که واریته تخفیف حدت یافته دریافت کرده بودند در انتهای روز بیستم هنوز زنده بودند (شکل ۲). نتایج آزمون الایزا نشان داد که گروه دریافت کننده ی تاکي زوئیت توکسوپلاسما گوندی سوش تخفیف حدّت بالاترین تیتر را داشته و اختلاف این گروه نسبت به گروه کنترل کاملاً معنی‌دار بود (شکل ۳).

تست پوستي جهت بررسی تغییر ضخامت کف پا و بررسی ایمني سلولی موش‌های آلوده شده ۲۴ ساعت بعد از تزریق انجام شد (شکل ۱). بیشترین میزان افزایش و تورم پوستی در گروه واکسن تخفیف حدت‌یافته مشاهده گردید (شکل ۴). افزایش تورم کف پا در گروه واکسن تخفیف حدت‌یافته به خوبی مشخص است که نشان دهنده ایمنی پوستی مناسب می‌باشد. میزان افزایش ضخامت پا هم در گروه کنترل مثبت و هم گروه واکسینه نسبت به زمان قبل از تزریق آنتی ژن توکسوپلاسما دارای تفاوت معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$)، درحالی که این افزایش در گروه کنترل منفی معنی‌دار نبود (شکل ۴).

بحث

در این مطالعه از واریته توکسوپلاسمای موسسه رازی استفاده شد

و نتایج بدست آمده نشان داد که این واریته بیماری‌زایی ندارد زیرا موش‌های ایمن‌شده با آن تا زمان چالش همگی سالم ماندند، برخلاف گروه کنترل مثبت که قبل از چالش نیز علائم بیماری را نشان دادند. این نتایج با مطالعه‌ای که در آن حدت این واریته در تخم‌مرغ جنین‌دار ارزیابی شد هماهنگی دارد زیرا در ان مطالعه نیز این واریته برای تخم‌مرغ‌های جنین‌دار بیماری‌زایی نشان نداد. در مطالعه قبلی روی واریته تخیف‌حدت یافته رازی از تخم‌مرغ جنین‌دار استفاده شد (۲۱). اگرچه مدل تخم‌مرغ جنین‌دار برای ارزیابی حدت و بیماری‌زایی برخی تک‌یاخته‌ها مانند نئوسپورا و توکسوپلاسما که شباهت بسیاری بهم دارند، مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷) ولی با این مدل حیوانی، امکان ارزیابی پاسخ ایمنی نیست. لذا لازم بود برای ارزیابی امکان استفاده از این واریته در تحقیقات واکسن توانایی پاسخ ایمنی توسط آن در موش مورد ارزیابی قرار گیرد. تا کنون سویه‌های مختلف موش اعم از خالص و یا ناخالص به عنوان مدل برای توکسوپلاسما و نئوسپورا مورد ارزیابی قرارگرفته اند. موش Balb/c یکی از حیوانات مدل مناسب برای مطالعات توکسوپلاسما است (۱۳، ۱۴). در این بررسی از سوش زنده و تخفیف حدت‌یافته توکسوپلاسما استفاده شد. پژوهش‌های سالیان اخیر نشان داده‌اند که بهترین واکسن بر علیه برخی تک‌یاخته‌هایی مانند لیشمانیا ماژور، لیشمانیا مکزیکانا (۳)، تیلریا آنولاتا (۹) T بابزیا بویس و بابزیا بیجمینا (۱۸) و نئوسپورا کنینوم (۱۵) واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته می‌باشد. واکسن توکسوپلاسما با نام تجاری توکسوواکس نیز به‌وسیله تخفیف حدت تاکی‌زوئایت‌های استرین S48 توکسوپلاسما با سه هزار بار پاساژ در صفاق موش تولید شده است (۲، ۲۵). به‌منظور تولید واکسن توکسوپلاسما (توکسوواکس) جهت پاساژهای متوالی تاکی‌زوئایت توکسوپلاسما گوندی، از موش استفاده شد. مراحل تزریق تاکی‌زوئایت‌ها و پاساژ دادن آن‌ها در صفاق موش در مقایسه با کشت سلولی بسیار پر هزینه‌تر و دشوارتر می‌باشد. همچنین برداشت و خالص‌سازی تاکی‌زوئایت‌های پاساژ داده‌شده در محوطه صفاقی موش به مراتب دشوارتر از کشت سلولی می‌باشد. به همین دلیل امروزه جهت تولید اغلب واکسن‌ها، روش‌های کشت سلولی به دلیل آسان‌تر بودن وکم هزینه‌تر بودن به‌صورت جدی مورد توجه قرارگرفته است. اوانس و همکاران (۱۹۹۹) از رده‌های سلولی معلق Hela و LLC جهت پاساژهای متوالی توکسوپلاسما گوندی استفاده کردند (۸)، زیرا پاساژ دادن متوالی در کاهش حدت تک‌یاخته‌ها مؤثر است (۱، ۲،۲۱، ۲۲).

در این مطالعه در گروه کنترل مثبت قبل از چالش علائم کلینیکی در موش‌ها مشاهده گردید که به علت حدت زیاد سوش توکسوپلاسما بود. این علائم شامل عدم تمایل به حرکت، قوز کردن و ضعف بود. تمامی این علائم در مطالعات قبلی نیز ثبت و اعلام گردیده است (۱، ۲۴)، لذا نتایج این مطالعه در هماهنگی و تایید کامل با گزارش‌های قبلی می‌باشد.

پس از چالش، علائم بیماری و تلفات در تمامی موش‌ها مشاهده شد. البته شدت علائم و میزان تلفات در گروه سوم که واریته تخفیف حدت‌یافته را دریافت کرده بودند، کمتر بود. این یافته مشابه با نتایج مطالعاتی است که روی توکسوپلاسما و نئوسپورا کنینوم صورت گرفته است (۱، ۸، ۱۰، ۲۴)، اما اینکه در دو گروه کنترل مثبت و منفی نیز تلفات و علائم بیماری با تفاوت قابل توجه نسبت به گروه ایمن شده با سوش تخفیف حدت‌یافته دیده شد، بدلیل پاساژدادن متوالی تک‌یاخته بود که منجر به کاهش حدت قابلٍ ملاحظه تک‌یاخته و در عین حال ایجاد پاسخ ایمنی گردید. این یافته قبلاً در موش Balb-C نشان داده شد (۲، ۲۵). در این پژوهش نیز برای اولین باردر مورد واریته توکسوپلاسما موسسه رازی شیراز به اثبات رسید.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تلفات با نتایج پاسخ ایمنی و بروز علائم هماهنگ بود. هنگامی‌که پاسخ ایمنی هومورال در گروه‌های مختلف با هم مقایسه شد، مشخص گردید که بیشترین پاسخ وقتی ایجاد شد که تاکی‌زوایت تخفیف حدت‌یافته موسسه رازی جهت ایمن‌سازی استفاده‌شد. پاسخ تست پوستی نیز در این گروه در مقایسه با سایرگروه‌ها به طور معنی‌داری بیشتر بود. وقتی که تاکی‌زوئایت کامل و دست نخورده جهت ایمن‌سازی استفاده شد معمولا بهترین پاسخ ایمنی ایجاد شد. در مطالعه‌ای که قبلا انجام شده بود نیز هنگامی که آنتی‌ژن به صورت تاکی‌زوایت کامل و ثابت شده با فرمالین در موش با استفاده از ادجوانت روغنی تزریق شد، پاسخ ایمنی ایجاده شده بهتر بود (۲۰). همچنین واکسن‌های زنده باعث ایجاد پاسخ ایمنی سلولی با تولید لنفوسیت‌های T گردید (۲۰). این یافته در مطالعه حاضر نیز با ایجاد بهترین پاسخ ایمنی سلولی (تست پوستی) در هماهنگی کامل بود، زیرا گروه سوم کامل‌ترین افزایش تورم را در تست پوستی داشتند.

در این مطالعه مانند سایر گزارش‌های مشابه از دوز کشنده تک‌یاخته توکسوپلاسما برای چالش استفاده شد. در مطالعات قبلی علت مرگ در موش‌هایی که در معرض دوز کشنده قرار گرفتند، التهاب شدید صفاق، نارسایی و از کارافتادن اعضای حیاتی مانند کبد و ریه بوده است (۱۴،۱۹،۲۴). در حالی که در موش‌های گروه سوم بعد از چالش مدت طولانی‌تری طول کشید تا علائم آلودگی و تلفات را نشان دهند. این نتایج پس از چالش نیز با نحوه پاسخ ایمنی در گروه‌های مختلف منطبق بود. به طوری که بهترین مقاومت در مقابل چالش در گروهی که بیشترین پاسخ ایمنی هومورال و ایمنی سلولی را نشان داد، مشاهده شد. این یافته با مطالعات قبلی نیز هماهنگی داشت. مطالعات نشان داده است که در ایجاد ایمنی محافظت کننده در مقابل تک‌یاخته ها هم ایمنی سلولی و هم ایمنی هومورال نقش دارد (۲۰،۳۰). لی و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که افزایش ایمنی هومورال و سلولی علیه توکسوپلاسما باعث افزایش زمان زنده ماندن موش‌ها در عفونت با توکسوپلاسما شد (۱۳).

در این مطالعه استفاده از واریته زنده تخفیف حدت‌یافته در ایجاد ایمنی نقش داشت و این چالش منجر به بروز علائم و تلفات در هر دو گروه یک و دوی موش‌ها شد. چالش در گروه دو صرفا روند بیماری را تسریع کرد و همین امر باعث عدم ایجاد پاسخ ایمنی مناسب در موش‌های این گروه گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که واریته موسسه رازی شیراز در مقایسه با توکسوواکس از حدت ذاتی پایین تری برخوردار بوده و تلقیح آن منجر به مرگ موش‌ها نمی‌شود (۲، ۲۵).

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۱۱۱۶-۱۸-۸۴-۲ تامین گردیده است و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل

اجرایی آن انجام گرفته است.

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* in vivo. *Parasitology.* 133:421-432.

2. Buxton, D. 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitology Today.*9: 335–337.

3. Daneshvar, H., Coombs, G.H., Hagen, P., Philips, S. 2003. *Leishmania mexicana* and *Leishmania major* attenuation of wild type parasites and vaccination with the attenuated lines. *Journal of Infectious Diseases.* 187: 1662–1668.

4. Davison, H.C., Guy,F., Trees, A.J. 1999. In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Research in Veterinary Science.* 67: 103-105.

5. Değirmenci A1, Döşkaya M, Caner A, Çiçek C, Korkmaz M, Gürüz Y, Uner A. 2011. *Toxoplasma gondii* RH Ankara: production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Experimental Parasitology.*128:1-8.

6. Dubey, J.P. 2010 *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. Zoonoses and Public Health. 57: 60-73.

7. Dubey JP, Tiao N, Gebreyes WA, Jones JL. 2012. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Ethiopia. *Epidemiology and Infection*. Nov;140:1935-1938.

8. Evans, R., Chatterton, J.M.W., Ashburn, D., Joss, A.W.L., Ho-Yen, D.O.1999. Cell culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 18: 879–884.

9. Hall, R., Ilhan, T., Kivar, E., Wilkie, G., Preston, P.M., Darghouth, M., Somerville, R. and Adamson, R. 1999. Mechanism(s) of attenuation of *Theileria annulata* vaccine cell lines. *Tropical Medicine & International Health.* 4: 78–84.

10. Innes, E.A., Lunden, A., Esteban, J., Marks, S., Maley, S., Wrigth, A., Rae, D., Harkins, A., Vermeculen, I., McKendrick, J., Buxton, D. 2001. A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep. *Parasite Immunology*. 23: 121-32.

11. Levin,N.D.and Nye,R.R. 1976.Toxoplasma ranae sp. n. from the leopard frog *Rana pipiens* Linnaeus, *Journal of Protozoology*. 23:488-490.

12. Levine, N.D. 1988a. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 35:518–520

13. Li J, Han Q,Gong P, Yang T, Ren B, Li S, Zhang X. 2012. *Toxoplasma gondii* rhomboid protein 1 (TgROM1) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*. 184:154–160

14. Lundén A1, Parmley SF, Bengtsson KL, Araujo FG. 1997.Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research.* 83:6-9.

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

16. Montoya, J.G., Liesenfeld, O. 2004. Toxoplasmosis. Lancet 363, 1965–1976

17. Namavari, M., Mansourian, M., Khodakaram-Tafti, A., Hosseini, M.H., Rahimiyan, A., Khordadmehr, M., and Lotfi, M. 2012 Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of *Neospora caninum* tachyzoites. *Comparative Clinical Pathology* 21:1665-68.

18. Pipano, E., Shkap, V., Kreigel, Y., Leibovitz, B., Savitsky, I., Fish, I. 2002. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* persistence of infection in Friesian cows following vaccination with live antibabesial vaccines. *Veterinary Journal,* 164: 64–68.

19. 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.

20. Rojo-Montejo,S., Collantes-Fernandez,E., Regidor-Cerrillo,J., Alvarez-Garcia,G., Marugan- Hernandez,V., Pedraza-Diaz,S., Blanco-Muria,J., Prenafeta, A., and Ortega-Mora,L. 2011. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Veterinary Parasitology*, 159:7-16.

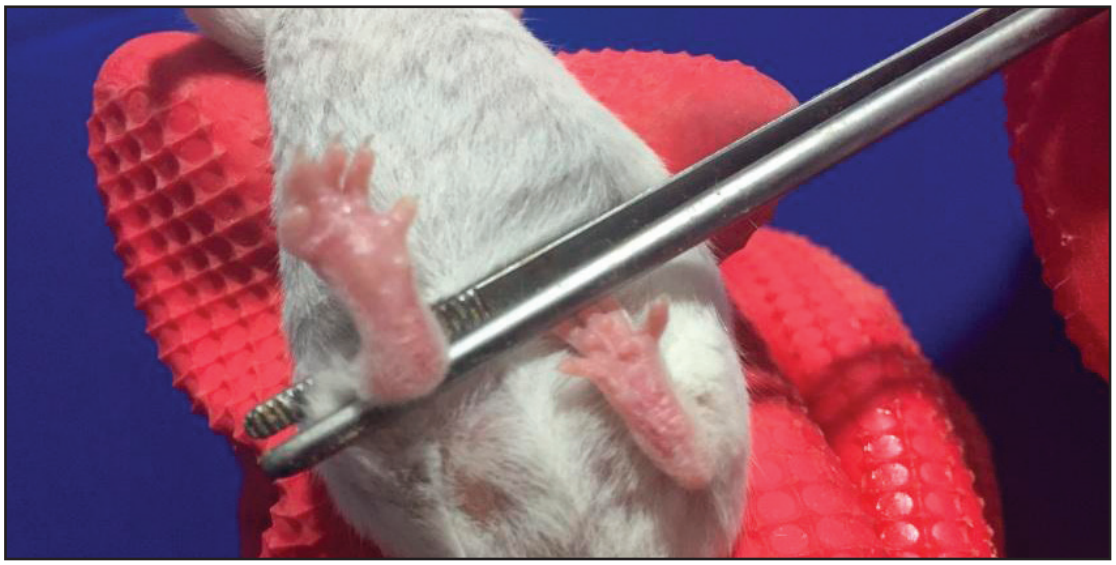
21. Setasimy, A. & Namavari, M. 2016. Use of chicken embryonated eggs for evaluating the virulence of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitic Diseases.* 40: 1223–1225

22. Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y., Hay, S.I. 2005. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature*. 434:214–217.

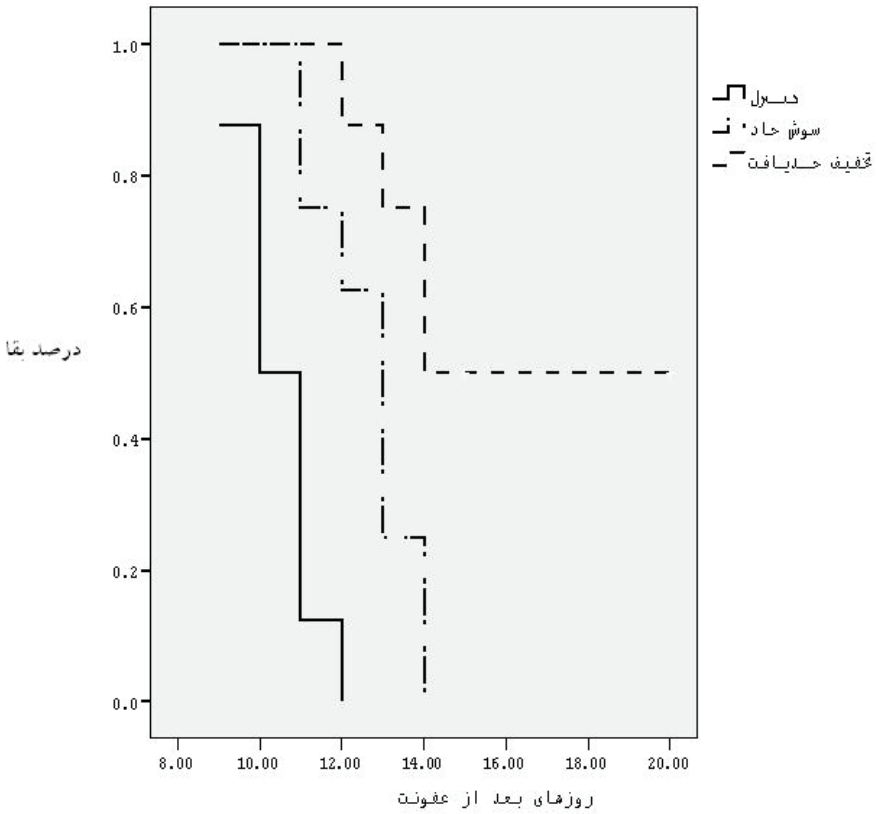
23. Wallance,G.D.1973.The role of the cat in the natural history of *Toxoplasma gondii*, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 22:313-322

24. Wang, HL, Wang, YJ., Pei,YJ, Bai, JZ., Yin, LT., Guo, R., Yin, GR. 2016. DNA vaccination with a gene encoding *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein 17 induces partial protective immunity against lethal challenge in mice. *Parasite*. 23:4.

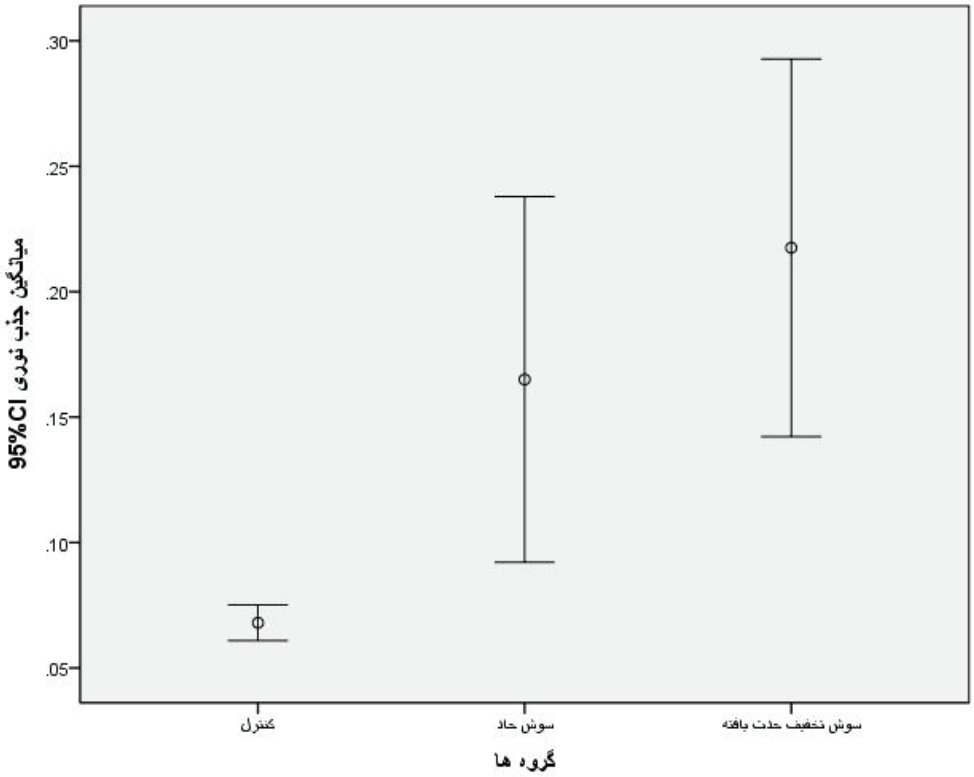
25. Wilkins, M.F.,O Connel, E., Te Punga, W.A. 1988. Toxoplasmosis in sheep III. Further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following an experimental oral challenge. *New Zealand Veterinary Journal*. 36:86-89.



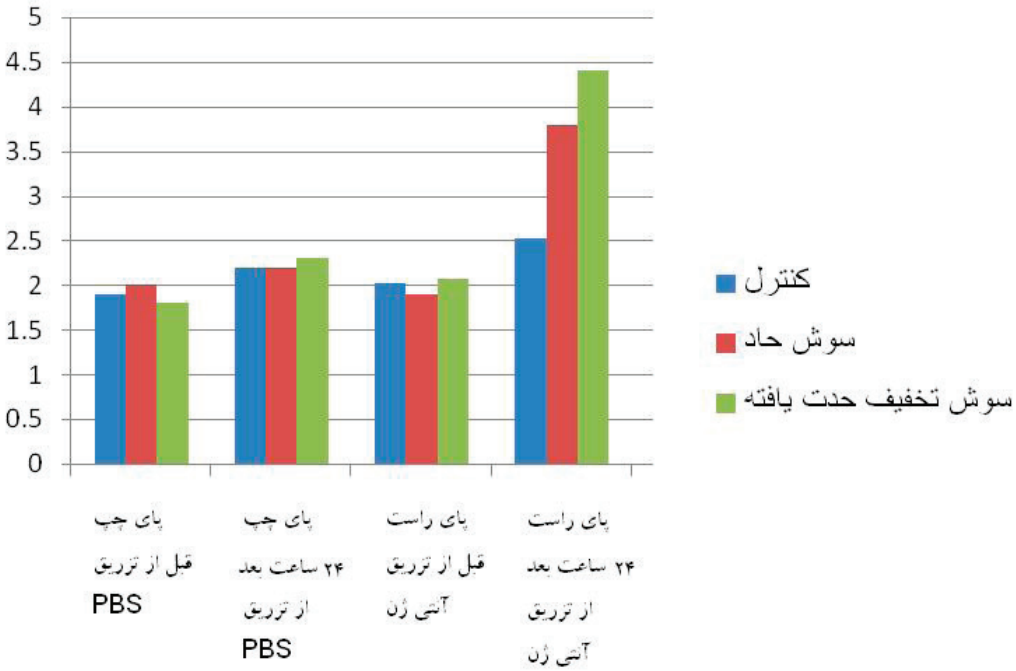
شکل ۱- تست پوستی کف پای موش. ۴۲ ساعت بعد از تزریق آنتی‌ژن، تورم و قرمزی در کف پای راست ناشی از پاسخ ایمنی سلولی.



شکل ۲- نمودار آنالیز بقا براساس روش کاپلان مایر (درصد بقا از یک معادل ۱۰۰ درصد تا صفر تنظیم گردیده است).



شکل ۳- نتایج الایزا در گروه‌های مختلف.



شکل ٤- مقایسه میانگین افزایش ضخامت کف پا برحسب میلی متر در گروه‌های مختلف، ٤۲ ساعت پس از تزریق آنتی ژن توکسوپلاسما.