Journal of Microbial World
Volume 14, No. 4, March 2022

Original Article

Evaluation of the immunogenicity of *Toxoplasma gondii* attenuated strain in cats

Pejman Houshmand[1], Ahad Olyaei[2], Darya Davoodi[1], Seyedeh Zahra Bootorabi[1], Elham Ghazanfari[1], Masoumeh Hayati[3], Zahra Khabazan[3], Fatemeh Dabiri[3], Mohammad Mehdi Namavari[3,*], Fatemeh Khosravi[4]

[1]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. [2]Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. [3]Razi vaccine and serum research institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran. [4]Department of Information Technology, Faculty of Engineering, Salman Farsi Branch, Salman Farsi University, Kazerun, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Toxoplasma gondii is a parasite which definitive hosts, Felid and cats, play a critical role in transmission and distribution of the parasite and their immunization is a proper way to control the infection. The aim of the present study is to evaluate the immunogenicity of Toxoplasma gondii attenuated isolate produced in Razi Institute branch of Shiraz in cats

Materials & Methods: Twelve male DSH (Domestic short hair) kittens aged 3-6 months were randomly divided into three groups; each contains four cats. The First group received tachyzoites of *Toxoplasma gondii* attenuated isolate at a dose of 10×10^6 by injection, the second group received a dose of 25×10^6 orally and the last group received culture medium as a control. The humoral immune responses and Cellular immunity evaluated by modified agglutination and skin test. One month after immunization, all cats were challenged by Toxoplasma's PRU strain, after which the cats' feces were collected and molecular tests were performed for five days.

Results: The results of modified agglutination and skin test showed that administration of oral and injection vaccine had a significant increase in comparison with control. Also, Molecular testing after challenge revealed that immunization of cats by oral and injection way of *Toxoplasma gondii* attenuated isolate could successfully prohibit oocysts shedding in cats.

Conclusion: In order to the significant immune responses and prevention of oocysts shedding, it is suggested that, using this isolation of *Toxoplasma gondii* as a possible candidate vaccine for cats in future studies.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Immune responses, Cat, Oocysts shedding.

Received: 18 September 2021 Revised: 6 December 2021 Accepted: 7 February 2022

Correspondence to: Mohammad Mehdi Namavari
Tel: +98 09173398132
E-mail: namavari@yahoo.com

Journal of Microbial World 2022, 14(4): 49-58
DOI:10.30495/jmw.2021.690455

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهاردهم شماره چهارم (پیاپی ۴۹) زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۵۸-۴۹

Original Article

ارزیابی ایمنی‌زایی سوش تحفیف حدت‌یافته *توکسوپلاسما گوندی* در گربه

پژمان هوشمند[۱]، احد علیایی[۲]، دریا داودی[۱]، سیده زهرا بوترابی[۱]، الهام غضنفری[۱]، معصومه حیاتی[۳]، زهرا خبازان[۳]، فاطمه دبیری[۳]، محمد مهدی نام‌آوری [۳*]، فاطمه خسروی[۴]

[۱]گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران. [۲]گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران. [۳]موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. [۴]گروه فناوری اطلاعات، دانشکده فنی و مهندسی، واحد سلمان فارسی، دانشگاه سلمان فارسی، کازرون، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: توکسوپلاسما گوندی انگلی است که میزبان نهایی آن، گربه و گربه‌سانان، نقش مهمی در گسترش بیماری دارند و ایمن‌سازی آن‌ها یکی از راه‌های کنترل آلودگی به شمار می‌رود. این مطالعه با هدف ارزیابی ایمنی‌زایی سوش تخفیف حدت‌یافته توکسوپلاسما گوندی تولید شده در موسسه رازی شیراز در گربه انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: دوازده بچه گربه نر نژاد DSH (Do mestic short hair) با سن ۶-۳ ماه به صورت تصادفی به سه گروه چهارتایی تقسیم‌بندی شدند. گروه اول سوش تخفیف حدت‌یافته تاکی‌زوایتتوکسوپلاسما گوندی با دوز $۱۰^{۶}$ ×۱۰ را به صورت تزریقی، گروه دوم دوز ۲۵×۱۰^{۶} را به صورت خوارکی و گروه آخر به عنوان کنترل تنها محیط کشت دریافت نمودند. ایمنی هومورال و سلولی به ترتیب با استفاده از آزمون آگلوتیناسیون و آزمون پوستی انجام گرفت. یک ماه بعد از ایمن‌سازی تمامی گربه‌ها توسط سووش PRU توکسوپلاسما آزموده شدند و پس از آن به مدت پنج روز مدفوع گربه‌ها جمع‌آوری و آزمون مولکولی انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج آزمون آگلوتیناسیون و آزمایش پوستی در هر دو گروه تزریقی و خوراکی افزایش معناداری را با گروه کنترل نشان دادند. تست مولکولی نشان داد که ایمن کردن گربه با واکسن تخفیف حدت‌یافته توسوپلاسما گوندی در هر دو صورت خوراکی و تزریقی قادر به جلوگیری از دفع اووسیست توسط گربه می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز پاسخ ایمنی و همچنین جلوگیری از دفع اووسیست، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی با بررسی دقیق‌تر سوش، امکان استفاده از آن به عنوان واکسن در گربه مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، پاسخ ایمنی، گربه، دفع اووسیست.

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۷ ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸

مقدمه

تک‌یاخته *توکسوپلاسما گوندی* (*Toxoplasma gondii*)، یکی از اعضاء شاخه اپی‌کمپلکسا (Apicomplexa) می‌باشد که قادر است تقریباً انواع سلول‌های پستاندارن و پرندگان را آلوده نماید (۱). تمامی حیواناتی که توسط این انگل آلوده می‌شوند، به‌عنوان میزبان حد واسط این انگل شناخته می‌شوند زیرا تنها مرحله غیرجنسی در بدن آن‌ها رخ می‌دهد. مرحله جنسی زندگی انگل که شامل گربه اهلی نیز می‌شود، تنها در اعضاء

*) آدرس برای مکاتبه: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شیراز، ایران.
تلفن: ۰۹۱۷۳۳۹۸۱۳۲ پست الکترونیک: namavari@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

خانواده گربه‌سانان بوقوع می‌پیوندد (۲). در نتیجه این حیوانات را به عنوان میزبان نهایی انگل می‌شناسند (۳).

طی چرخه زندگی انگل، سه مرحله عفونی، یعنی تاکی‌زوایت (Tachyzoite)، برادی‌زوایت (Bradyzoite) و اسپوروزوایت (Sporozoite) ایجاد می‌شود که قادر به آلوده نمودن میزبان می‌باشند (٤). با توجه به ارتباط بین گربه و انسان و همچنین دام‌ها، گربه‌ها قادر به آلوده نمودن انسان و حیوانات دامی هستند که این عمل را با دفع اووسیست انجام می‌دهند و بدین ترتیب قادر به آلوده نمودن محیط می‌باشند (۵). این نکته حائز اهمیت است که نگهداری گربه در آزمایشگاه راحت نمی‌باشد و مقالات اندکی در مورد چرخه زندگی انگل در بدن میزبان نهایی وجود دارد.

بهترین راه کنترل عفونت توکسوپلاسموز (Toxoplasmosis)، ارائه یک برنامه واکسیناسیون است. در یک برنامه موفق واکسیناسیون، هدف باید جلوگیری از بیماری مادرزادی در انسان و حیوانات، پیشگیری و یا کاهش کیست بافتی در حیوانات مورد مصرف خوراکی، و کاهش دفع اووسیست از گربه باشد. در مطالعه‌ی حاضر، تمرکز بر روی کاهش دفع اووسیست توسط گربه (میزان نهایی) بوده است. همچنین برای تهیه واکسن بر علیه توکسوپلاسموز، نوع و روش واکسیناسیون که قادر به ایجاد ایمنی مناسب می‌باشد بسیار حائز اهمیت است (٦). واکسن‌های سوش زنده تحفیف حدت‌یافته امیدوارکننده‌ترین نتایج را در ارتباط با ایجاد پاسخ ایمنی نشان داده‌اند. همچنین در تولید واکسن‌های مؤثر و تجاری در تک یاخته‌هایی همانند *تیلریا*، *لیشمانیا* و *بابزیا* نیز از سوش تحفیف حدت‌یافته استفاده شده که بهترین عملکرد را داشته‌اند (۷و۸). تا به امروز فقط یک واکسن موثر با استفاده از سووش تخفیف حدت‌یافته زنده *توکسوپلاسما گوندی* برای پیشگیری از توکسوپلاسموزیس در گوسفند (Toxovax) تولید شده است (۹). بنابراین، در این پژوهش نیز از تک‌یاخته *توکسوپلاسما گوندی* که در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز حدت آن به شدت کاهش یافته و در مطالعات پیشین نیز آزمایشات اولیه بر روی موش و تخم مرغ جنین‌دار انجام گرفته و نتایج موفقیت‌آمیزی نیز به دست آورده است (۱۰و۱۱)، بر روی گربه به عنوان میزبان اصلی استفاده شد. در این مقاله دو راه ایمن‌سازی در گربه بررسی شده و علاوه بر امکان جلوگیری از دفع اووسیست، بهترین راه ایمن‌سازی نیز معرفی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

الف) انتخاب و گروه‌بندی حیوانات: برای انجام این پژوهش از ۱۲ بچه گربه با سن ٦-۳ ماه و وزن مشابه با جنسیت نر و نژاد DSH انتخاب شدند. تنها حیواناتی که با استفاده از تست آگلوتیناسیون و تست مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از نظر سرمی و دفع اووسیست در مدفوع برعلیه *توکسوپلاسما گوندی* منفی بودند برای انجام پژوهش انتخاب شدند. سپس به صورت تصادفی در سه گروه چهارتایی قرار گرفتند. تمامی مراحل کار با حیوانات، طبق دستورالعمل کار با حیوانات مؤسسه دامپزشکی کل کشور و طبق شناسه کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.1400.098 انجام گرفت و در نهایت تمام گربه‌های انتخاب شده، کدگذاری شدند.

ب) ایمن‌سازی: برای تهیه واکسن، تاکی‌زوایت‌ها در فلاسک کشت سلولی به همراه محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) به مقدار ۵ میلی‌گرم (شرکت سیگما، آلمان) ، ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک (جنتامایسین ۵۰ میکروگرم، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم) و ضدقارچ ۲۵ میکروگرم (شرکت مرک، آلمان) اضافه گردید. فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرار گرفتند و روزانه توسط میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. تاکی‌زوایت‌ها جمع‌آوری شده و به دو صورت خوراکی و تزریقی مورد استفاده قرار گرفتند (۱۲و۱۳). ایمن‌سازی به ترتیب زیر صورت پذیرفت:

گروه ۱: تزریق زیرپوستی ۱۰×۱۰^{٦} تاکی‌زوایت از سوش تخفیف حدت‌یافته همراه با ادجوانت کیتوزان (شرکت سیگما) (۵۰۰ میکرولیتر). تزریق با استفاده از سوزن استریل انسولین و در پشت گردن گربه انجام شد. گروه ۲: مقدار ۲۵×۱۰^{٦}

تاکی‌زوایت از سوش تخفیف حدت‌یافته همراه با ادجوانت کیتوزان (شرکت سیگما) (۱۰۰۰ میکرولیتر همراه با محیط کشت و یا سالین) با استفاده از لوله به گربه‌ها خورانده شد. گروه ۳: تنها محیط کشت و یا فسفات بافر سالین دریافت نموده و به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. تمام مراحل ایمن‌سازی در یک مرحله انجام شد. سپس پاسخ ایمنی هومورال و سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

ج) آزمایش آگلوتیناسیون تغییر یافته (ModifiedAgglutination): برای بررسی پاسخ آنتی‌بادی واکسن در گربه، از گربه‌ها خونگیری و سرم آن‌ها جداسازی شد. تست آگلوتیناسیون طبق روش دوبی و همکاران در سال ۲۰۰۸ به‌طور خلاصه به صورت زیر انجام گرفت: رقت‌های ۱:٤، ۱:۸، ۱:۱٦ و ۱:۳۲سرم تهیه شده از گربه‌ها، در PBS و ۲-مرکاپتواتانول (2- mercaptoethanol) ۰/۲ مولار تهیه و در هر چاهک از پلیت ۹٦ خانه‌ای u-bottom، مقدار ۵۰ میکرولیتر از رقت سرمِ تهیه شده اضافه گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن تهیه شده به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند نتایج ۲٤ ساعت بعد مشاهده گردید (۱٤).

د) آزمایش پوستی: برای بررسی پاسخ ایمنی سلولی در گربه‌ها پس از ایمن‌سازی، تست پوستی طبق روش اوتو و همکاران در سال ۱۹۹۳ به صورت زیر انجام شد: مقدار ۱۰ میلیون تاکی‌زوایت فیکس شده با فرمالدهید در ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین، در زیر پوست ناحیه گوش تزریق شد و سپس تغییر ضخامت ایجاد شده پس از ٤۸ و ۷۲ ساعت با کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. شایان ذکر است که پیش از تزریق، محلول آماده شده سه مرتبه با بافر فسفات سالین شست و شو داده شد تا تمام فرمالین حذف گردد (۱۰و۱۵).

ه) چالش: یک ماه پس از ایمن‌سازی، تمام گربه‌ها چالش شدند. طبق روش زولپو و همکاران در سال ۲۰۱۷ برای انجام چالش از مغز موش آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* استفاده شد. موش‌ها با سوش حاد PRU که قادر به تولید کیست در مغز موش است آلوده شده بودند (۱٦). مغز هموژن شده و در حجم ۲ میلی‌لیتر با استفاده از لوله دهانی به گربه‌ها خورانده شد. همچنین، به هر گربه مقدار ۵ میلی‌لیتر سالین تزریق شد (۱۷).

و) انجام آزمایش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: به‌منظور بررسی حضور یا عدم حضور اووسیست در مدفوع گربه‌های مورد آزمایش، طبق روش یانگ و همکاران در سال ۲۰۰۹ مدفوع آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۳ روز پس از چالش، به مدت ۵ روز نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری گردید و پس از کدگذاری به آزمایشگاه ارسال گردید. پس از استخراج DNA (کیت سیناژن ژن، ایران) با استفاده از توالی پرایمرهای زیر واکنش مولکولی انجام گرفت (۱۸):

(F) 5’ GGAGGACTGGCAACCTGGTGTCG3’
(R) 5’ TTGTTTCACCCGGACCGTTTAGCAG3’

این جفت پرایمر الیگونوکلوتیدی، قطعات ۳۰٦ تا ۳۳۸ جفت باز از ژنوم انگل را شناسایی می‌کنند.

ز) تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آنالیز آماری همه نتایج به دست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گرفت. مقایسه بین گروه‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه محاسبه شد و در هر آزمون $P<0.05$ به عنوان معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف) نتایج ایمنی‌زایی سوش تخفیف حدت‌یافته پس از ایمنی‌زایی: بررسی روزانه گربه‌ها پس از تزریق واکسن هیچ‌گونه علامت بیماری ظاهری در گربه‌ها را نشان نداد و تمامی گربه‌های دو گروه ایمن شده تا انتهای دوره آزمایش سالم بودند.

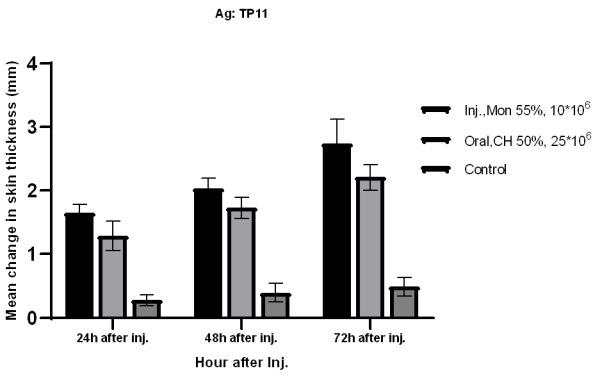
آزمایش آگلوتیناسیون تغییر یافته انجام گرفت و طبق نتایج به‌دست آمده تمام گروه‌ها تا تیتر ۱:٤ در تولید آنتی‌بادی مثبت بودند. گروه ایمن شده به صورت خوراکی، تا رقت ۱:۱٦ و گروه ایمن شده با سوش تخفیف حدت‌یافته به صورت تزریقی تا رقت ۱:۳۲ مثبت بودند (جدول۱). طبق این نتایج می‌توان بیان کرد که هر دو گروه پاسخ ایمنی بسیار مناسب و قابل قبولی را ایجاد نموده‌اند. طبق بررسی آماری نتایج بدست آمده

از آزمون آگلوتیناسیون، بین گروه‌های واکسینه شده ۱ و ۲ (خوراکی و تزریقی) تفاوت معناداری وجود ندارد ($P>0.05$) اما هر کدام از گروه‌ها به تنهایی با گروه کنترل تفاوت معناداری را دارند ($P<0.0001$).

جدول ۱: نتایج آگلوتیناسیون.

شماره گربه‌های مورد مطالعه	گروه	دوز ایمن‌سازی	تیتر آنتی‌بادی
۱	تزریقی	۱۰×۱۰^{۶} تاکی‌زوایت	۱:۱۶+
۲		۱۰×۱۰^{۶} تاکی‌زوایت	۱:۱۶+
۳		۱۰×۱۰^{۶} تاکی‌زوایت	۱:۸+
٤		۱۰×۱۰^{۶} تاکی‌زوایت	۱:۳۲+
٥	خوراکی	۲۵×۱۰^{۶} تاکی‌زوایت	۱:۸+
٦		۲۵×۱۰^{۶} تاکی‌زوایت	۱:۱٦+
۷		۲۵×۱۰^{۶} تاکی‌زوایت	۱:۸+
۸		۲۵×۱۰^{۶} تاکی‌زوایت	۱:٤+
۹	کنترل	–	–
۱۰		–	–
۱۱		–	–
۱۲		–	–

همچنین، نتایج به‌دست آمده از آزمایش پوستی نشان داد که هر دو گروه ایمن شده با گروه کنترل تفاوت معناداری دارند ($P<0.0001$) (نمودار ۱).



نمودار ۱: نتایج آزمون پوستی. همان‌گونه که در نمودار مشخص است هر دو گروه دارای تفاوت معنادار با گروه کنترل هستند.

ب) نتایج پس از چالش: بر اساس نتایج به‌دست آمده از این مرحله و با استفاده از آزمایش مولکولی واکنش زنجیره پلیمراز، گروه‌های ایمن شده دفع اووسیستی را نشان ندادند. تنها دو گربه از گروه خوراکی، ٤ روز پس از چالش دفع اووسیست داشتند که پس از آن دفع مشاهده نشد. تمامی گربه‌های گروه کنترل دفع اووسیست را نشان دادند (جدول ۲).

جدول۲: نتایج بررسی مولکولی.

واکسیناسیون گربه‌ها	روز شماره گربه	روز صفر قبل از چالش	٤ روز بعد از چالش	٥ روز بعد از چالش	٦ روز بعد از چالش	۷ روز بعد از چالش	۸ روز بعد از چالش
تزریقی	۱	-	-	-	-	-	-
	۲	-	-	-	-	-	-
	۳	-	-	-	-	-	-
	٤	-	-	-	-	-	-
خوراکی	٥	-	+	-	-	-	-
	٦	-	+	-	-	-	-
	۷	-	-	-	-	-	-
کنترل	۸	-	-	-	-	-	-
	۹	-	+	+	+	+	+
	۱۰	-	+	+	+	+	+
	۱۱	-	+	+	+	+	+
	۱۲	-	+	+	+	+	+

بحث

در مطالعه حاضر، گربه برای پژوهش انتخاب شد زیرا میزبان اصلی *توکسوپلاسما گوندی* بشمار می‌رود. همچنین شیوع توکسوپلاسموز در گربه‌های اهلی ۳۵ درصد و در گربه‌های وحشی ۵۱ درصد گزارش شده است و بنابراین حائز اهمیت می‌باشد (۱۹).

در حال حاضر، درمان دارویی تنها برای کیست‌های بافتی انگل موجود است (۲۰) و در زمینه دفع اووسیست از گربه هیچ داروی مؤثری در دسترس نمی‌باشد. یکی از عوامل مؤثر در تهیه واکسن بر علیه *توکسوپلاسما گوندی*، تهیه واکسنی می‌باشد که قابلیت کاهش دفع اووسیست توسط گربه را دارا باشد (۲۱). هیچکدام از استراتژی‌های به کار رفته در تهیه واکسن بر علیه توکسوپلاسموز در مقایسه با سوش زنده

تخفیف حدت‌یافته *توکسوپلاسما گوندی* اثرگذاری ندارند. علاوه‌بر این، تاکنون تمام واکسن‌های زنده تخفیف حدت‌یافته، از تاکی‌زوایت *توکسوپلاسما گوندی* تهیه شده اند زیرا تنها مرحله‌ای از انگل می‌باشد که در محیط *بیولوژی* به مقدار بسیار بالا قابل تولید و تکثیر است (۱۰). تاکنون مطالعات اندکی در زمینه تهیه واکسن برای کاهش دفع اووسیست توسط گربه انجام شده است. در این مطالعه هدف، بررسی واکسن آزمایشی *توکسوپلاسما گوندی* در کاهش دفع اووسیست توسط گربه بوده است. در مطالعه حاضر از تاکی‌زوایت سوش زنده تخفیف حدت یافته *توکسوپلاسما گوندی* استفاده گردید که در مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، با استفاده از پاساژ طولانی مدت در محیط کشت ایجاد شده است و در مطالعات پیشین نیز نتایج بسیار موفقیت‌آمیزی را به همراه داشته است(۱۰و۱۱).

در این پژوهش، ایمن‌سازی به دو صورت تزریقی و خوراکی انجام گرفت و سپس نتایج به‌دست آمده با گروه کنترل مقایسه گردید. ایمن‌سازی به روش خوراکی این اهمیت را دارا می‌باشد که می‌توان واکسیناسیون را حتی در غالب طعمه نیز برای گربه‌های ولگرد در جلوگیری از گسترش اووسیست در محیط استفاده نمود. مطالعات نشان داده است که مسیر ایمن‌سازی بر روی ایجاد ایمنی مؤثر است (۲۲و۲۳). برای مثال، برای ایجاد ایمنی موکوسی در مقابل بیماری‌های ناشی از غذا (Foodborne) بهتر است ایمنی از طریق دهانی ایجاد گردد. این موضوع باعث شد که در این مطالعه هر دو مسیر تزریق عضلانی و خوراکی مورد بررسی قرار گیرد. همانگونه که در بخش یافته‌ها اشاره شد، ایمنی مناسبی در هر دو گروه ایجاد شده بود و تفاوت معنادار نبود. با توجه به اینکه در ایجاد ایمنی‌های با تعداد بالا برای گربه و گربه‌سانان، استفاده از راه خوراکی راحت‌تر و مقرون به صرفه‌تر می‌باشد، و همچنین با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، می‌توان بیان داشت که تفاوت چندانی بین دو مسیر ایمن‌سازی مشاهده نشده است و می‌توان این واکسن را به صورت خوراکی نیز مورد استفاده قرار داد. استفاده از مسیر خوراکی برای ایجاد ایمنی، دارای محدودیت‌هایی می‌باشد از جمله اینکه واکسن تهیه شده، حاوی تاکی‌زوایت انگل است که در مقابل اسیدیته معده دارای حساسیت می‌باشد (۱۲). بنابراین، معمولاً برای ایجاد ایمنی از یک حامل استفاده می‌شود که در این مطالعه از کیتوزان استفاده شده است چرا که کیتوزان بطور موثر پاسخ‌های ایمنی مخاطی خاص آنتی‌ژن را از طریق برانگیختن پاسخ‌های ایمنی Th-2 القا می‌کند (۲٤). پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی از حامل‌های دیگری مانند صمغ گوار (Guar gum)، که به صورت گسترده‌ای در صنایع داروسازی کاربرد دارد، استفاده گردد (۲۵). نتایج بررسی ایمنی ایجاد شده پس از ایمن کردن حیوانات، نشان داد که با وجود تفاوت اندکی که بین دو گروه ایمن‌سازی (خوراکی و تزریقی) وجود داشت، تفاوت معناداری بین این دو گروه وجود ندارد. بررسی پاسخ ایمنی به هر دو صورت هومورال و سلولی (آگلوتیناسیون و آزمون پوستی) نشان‌دهنده بالا بودن پاسخ ایمنی در گروه‌های ایمن شده می‌باشد.

این نکته حائز اهمیت است که برای ایمن‌سازی معمولاً از تزریق دو دوز استفاده می‌شود تا پاسخ ایمنی را تشدید نمود. در این مطالعه تنها از یک دوز برای ایجاد ایمن‌سازی در یک مرحله استفاده شد و نتایج بسیار امیدبخش بودند. در مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر، سوش زنده *توکسوپلاسما گوندی* دو بار (با فاصله دو ماه) به صورت خوراکی مصرف شد تا ایمنی مطلوب حاصل شود (۱۲). یک‌بار ایمن کردن گربه‌ها در این مطالعه، مزیتی نسبت به مطالعه ذکر شده می‌باشد.

در صورت ایجاد ایمنی در گربه، پس از ایجاد چالش با سوش مشابه (Homologue)، عدم دفع دوباره اووسیست مشاهده شده است (۲٦و۲۷). با این وجود، در صورت چالش با سوش غیرمشابه، دفع دوباره اووسیست به صورت کامل و یا جزیی مشاهده می‌شود (۱۲و۱۳). بنابراین در این مطالعه از سوش غیرمشابه برای چالش استفاده گردید. بدین ترتیب که موش‌های ماده با سن ۸-٦ هفته تهیه و پس از گذشت ۲۱ روز از زمان آلوده شدن آن‌ها با سویه PRU *توکسوپلاسما گوندی*، معدوم و کل مغز به سرعت جمع‌آوری، شسته و در نهایت هموژن شد و

در حجم ۲ میلی‌لیتر با استفاده از لوله دهانی، به گربه‌ها خورانده شد (۱۷و۲۸). همان‌گونه که در نتایج مشخص شد، میزان دفع اووسیست در گربه‌های ایمن شده با سوش تخفیف حدت‌یافته *توکسوپلاسما گوندی*، پس از خوراندن کیست بافتی انگل، به شدت کاهش یافت به گونه‌ای که در واکسن تزریقی هیچ‌گونه علامتی از حضور اووسیست در مطالعات مولکولی دیده نشد و در ایمن‌سازی خوراکی تنها در یک گربه، در روزهای ابتدایی چالش اووسیست دیده شد که در مقایسه با نتیجه کلی، قابل چشم پوشی می‌باشد.

در مطالعات پیشین، سوش تخفیف حدت‌یافته دیگری با نام Mic1-3KO در گوسفند و گربه مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج به‌دست آمده در گوسفند بسیار موفقیت‌آمیز بود و تأثیر آن را همانند تأثیر واکسن S48 معرفی نمودند. با این وجود، تجویز آن به صورت خوراکی و عضلانی، قادر به جلوگیری از دفع اووسیست در گربه نبود (۱۲). در صورتی که سوش مورد استفاده در این مطالعه، به خوبی از دفع اووسیست توسط گربه در هر دو مسیر ایمن‌سازی موفق عمل نموده و از این نقطه نظر، دارای ارجحیت می‌باشد. در مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر، یک سوش تضعیف شده *توکسوپلاسما گوندی*، با ایجاد نقض در HAP2 تولید شد و برای ایمن‌سازی گربه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده حاکی از موفقیت‌آمیز بودن واکسن به صورت خوراکی برای جلوگیری از دفع اووسیست توسط گربه می‌باشد (۲۹). اما واکسن مورد استفاده در این مطالعه نیاز به هیچ پروسه هزینه‌بردار مولکولی ندارد و با پاساژ طولانی مدت در محیط کشت ایجاد شده است که علاوه بر صرفه‌جویی در هزینه تولید به دلیل استفاده از هیچ‌گونه فرآیند هزینه‌بردار، به مقدار بسیار بالا نیز قابل تولید می‌باشد که می‌توان به عنوان یکی از مزیت‌های این واکسن، از آن نام برد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که واکسن مورد استفاده در این مطالعه قادر است به صورت قابل ملاحظه و معناداری میزان دفع اووسیست از گربه را کاهش دهد و یا مانع از دفع اووسیست گردد. در نتیجه می‌تواند خطر آلوده شدن محیط توسط اووسیست و ایجاد عفونت در انسان و دام را به مقدار قابل توجهی کاهش دهد. بنابراین، به عنوان یک واکسن مناسب برای استفاده در گربه برای مطالعات بیشتر پیشنهاد می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون در قالب پایان نامه تحصیلی با شناسه کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.1400.098 تامین گردیده است و مراحل اجرایی در آزمایشگاه ملی نئوسپورا انجام گرفته است.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Hill D, Dubey JP. Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. Clinical microbiology and infection. 2002 Oct 1;8(10):634-40.
2. Dubey JP. Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. Veterinary parasitology. 2009 Jul 7;163 (1-2):1-4.
3. Ferguson DJ. Toxoplasma gondii: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009; 104:133-48.
4. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of Toxoplasma gondii. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000 Sep 1;64(3):607-23.
5. Garcia JL, Navarro IT, Biazzono L, Freire RL, Junior JD, Cryssafidis AL, Bugni FM, da Cunha IA, Hamada FN, Dias RC. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the Toxoplasma gondii by the intranasal route. Veterinary Parasitology. 2007 Apr 30;145(3-4):197-206.
6. Mévélec MN, Lakhrif Z, Dimier-Poisson I. Key Limitations and New Insights into the Toxoplasma gondii Parasite Stage Switching for Future Vaccine Development in Human, Livestock, and Cats. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020;10.
7. Pipano E, Shkap V, Kriegel Y, Leibovitz B, Savitsky I, Fish L. (2002). Babesia bovis and B. bigemina: Persistence of infection in friesian cows following vaccination with live antibabesial vaccines. Vet j, 164(1), 64-68.
8. Daneshvar H, Hagan P, Phillips RS. (2003). Leishmania mexicana H-line attenuated under pressure of gentamicin, potentiates a Th1 response and control of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. Parasite immunol,25 (11-12),589-596.
9. Zhang N-Z, Chen J, Wang M, et al. Vaccines against Toxoplasma gondii: new developments and perspectives. Expert Rev Vaccines. 2013;12(11):1287–1299.
10. Abbasifar, A., Namavari, M., Rezayian, A. Evaluation of Razi attenuated variety of Toxoplasma gondii in Balb/c mice. Veterinary Researches & Biological Products. 2017 Apr; 30(4), 107-113. (In persian).
11. Setasimy A, Namavari M. Use of chicken embryonated eggs for evaluating the virulence of Toxoplasma gondii. Journal of Parasitic Diseases. 2016 Dec;40(4):1223-5.
12. Le Roux D, Djokic V, Morisse S, Chauvin C, Doré V, Lagrée AC, Voisin D, Villain Y, Grasset-Chevillot A, Boursin F, Su C. Evaluation of immunogenicity and protection of the Mic1-3 knockout Toxoplasma gondii live attenuated strain in the feline host. Vaccine. 2020 Feb 5;38(6):1457-66.
13. Zulpo DL, Sammi AS, Dos Santos JR, Sasse JP, Martins TA, Minutti AF, Cardim ST, de Barros LD, Navarro IT, Garcia JL. Toxoplasma gondii: a study of oocyst re-shedding in domestic cats. Veterinary parasitology. 2018 Jan 15; 249:17-20.

14. Dubey JP, Jones JL. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States. International journal for parasitology. 2008 Sep 1;38(11):1257-78.

15. Otto CM, Brown CA, Lindl PA, Dawe DL. Delayed hypersensitivity testing as a clinical measure of cell-mediated immunity in the cat. Vet Immunol Immunopathol. 1993 Sep; 38(1-2):91-102.

16. Xu MJ, Zhou DH, Nisbet AJ, Huang SY, Fan YF, Zhu XQ. Characterization of mouse brain microRNAs after infection with cyst-forming Toxoplasma gondii. Parasites & vectors. 2013 Dec;6(1):1-7.

17. Zulpo DL, Igarashi M, Sammi AS, Santos JR, Sasse JP, Cunha IA, Taroda A, Barros LD, Almeida JC, Jenkins MC, Navarro IT. rROP2 from Toxoplasma gondii as a potential vaccine against oocyst shedding in domestic cats. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2017 Jan; 26:67-73.

18. Yang W, Lindquist HA, Cama V, Schaefer III FW, Villegas E, Fayer R, Lewis EJ, Feng Y, Xiao L. Detection of Toxoplasma gondii oocysts in water sample concentrates by real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology. 2009 Jun 1;75(11):3477-83.

19. Montazeri M, Galeh TM, Moosazadeh M, Sarvi S, Dodangeh S, Javidnia J, Sharif M, Daryani A. The global serological prevalence of Toxoplasma gondii in felids during the last five decades (1967–2017): a systematic review and meta-analysis. Parasites & vectors. 2020 Dec;13(1):1-0.

20. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. Clinical microbiology reviews. 2018 Oct 1;31(4):e00057-17.

21. Innes EA, Hamilton C, Garcia JL, Chryssafidis A, Smith D. A one health approach to vaccines against Toxoplasma gondii. Food and Waterborne Parasitology. 2019 Jun 1;15: e00053.

22. Sandoval F, Nizard M, Terme M, Badoual C, Bureau MF, Clement O, Marcheteau E, Gey A, Dransart E, Quintin-Colonna F, Autret G. Mucosal imprinting of vaccine induced-CD8+ T cells is crucial to inhibit mucosal tumors. 2013; 2830.

23. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, Mouz N, Amacker M, Chalifour A, Diomede L, Devillier G. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. Immunity. 2011 Feb 25;34(2):269-80.

24. Sang Hee Soh, Soojin Shim, Young Bin Im, Hong-Tae Park, Chong-Su Cho, Han Sang Yoo, Induction of Th2-related immune responses and production of systemic IgA in mice intranasally immunized wit lBrucella abortus malate dehydrogenase loaded chitosan nanoparticles, Vaccine, Volume 37, Issue 12, 2019, Pages 1554-1564,

25. Sharma G, Sharma S, Kumar A, Ala'a H, Naushad M, Ghfar AA, Mola GT, Stadler FJ. Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A review. Carbohydrate polymers. 2018 Nov 1; 199:534-45.

26. Dubey JP. Duration of immunity to shedding of Toxoplasma gondii oocysts by cats. The Journal of parasitology. 1995 Jun 1:410-5.

27. Davis SW, Dubey JP. Mediation of immunity to Toxoplasma gondii oocyst shedding in cats. The Journal of parasitology. 1995 Dec 1:882-6.

28. Xu MJ, Zhou DH, Nisbet AJ, Huang SY, Fan YF, Zhu XQ. Characterization of mouse brain microRNAs after infection with cyst-forming Toxoplasma gondii. Parasit Vectors. 2013 May 29;6:154.

29. Ramakrishnan C, Maier S, Walker RA, Rehrauer H, Joekel DE, Winiger RR, Basso WU, Grigg ME, Hehl AB, Deplazes P, Smith NC. An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of Toxoplasma gondii by cats. Scientific reports. 2019 Feb 6;9 (1):1-4.