"مقاله پژوهشی"

ارزیابی ایمنی زایی سووش تخفیف حدت یافته نئوسپورا کنینوم در جلوگیری از دفع اووسیست در سگ

مهدی نام آوری[1]، احد علیایی*و[2]، سیده زهرا بوترابی[3]، الهام غضنفری[3]، محمد ارجمند[3]، زهرا خبازان[1]، فاطمه دبیری[1]

[1] موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

*و[2] گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۳ گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

*نویسنده مسئول: ahadoliaee97@gmail.com

دوره دوازدهم، شماره یک، بهار و تابستان ۱۴۰۰

دریافت مقاله: ۱۵ شهریور ماه ۱۴۰۰ ، پذیرش نهایی: ۱۹ ابان ماه ۱۴۰۰

چکیده

تک یاخته *نئوسپورا کنینوم* به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد طوفان های سقط جنین در گاوها بشمار می رود. اکنون، بیشترین توجه بسوی واکسن های زنده تخفیف حدت یافته است. در این پژوهش؛ به ارزیابی سووش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* (NC-a) در قالب واکسنی موثر برای جلوگیری از دفع اووسیست در سگ به عنوان میزبان اصلی اقدام شده است. شانزده قلاده سگ در چهار گروه مساوی شامل گروه های سووش تخفیف حدت یافته، سووش حاد، سووش تخفیف حدت یافته همراه ادجوانت روغنی مونتاناید و گروه کنترل تقسیم بندی و در دو مرحله به فاصله دو هفته ایمن سازی شدند. یک ماه بعد از تزریق نوبت دوم، گروه ها توسط سووش حاد NC-1 بصورت خوراکی چالش شدند. برای سنجش پاسخ ایمنی از تست آگلوتیناسیون و برای ارزیابی دفع اووسیت از تست مولکولی استفاده شد. نتایج نشان داد که گروه ایمن شده با سووش NC-a همراه ادجوانت بالاترین پاسخ ایمنی را ایجاد می کند. همچنین نتایج تست مولکولی نشان داد که سگ های ایمن شده پس از چالش دفع اووسیست نداشته و بهترین نتیجه ی عدم دفع اووسیست در سگ های ایمن شده با سووش NC-a همراه ادجوانت می باشد. در مجموع نتایج نشان دادند که؛ انجام تحقیقات بر روی واکسن تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* همراه ادجوانت روغنی در سگ جهت کنترل دفع اووسیست موثر و ایمن سازی سگ ها با این روش بی خطر می باشد. پیشنهاد می شود این واکسن آزمایشی در تحقیقات تکمیلی در دستیابی به واکسن کاربردی برای کنترل نئوسپوروزیس در سگ ها استفاده شود.

کلمات کلیدی: نئوسپورا کنینوم، واکسن، سگ، ایمنی زایی، دفع اووسیست

مقدمه

نئوسپورا کنینوم یک تک یاخته درون سلولی متعلق به خانواده آپی کمپلکسا و عامل ایجاد بیماری نئوسپوروزیس می‌باشد. ابتدا در بیماریهای عصبی- ماهیچه‌ای سگ ها شناسایی شده و به عنوان یکی از دلایل ایجاد بیماریهای سیستمیک سگ در سراسر جهان گزارش شده است (۱۹). سپس توسط دوبی و همکاران به عنوان عامل اصلی سقط جنین گاو ها در سراسر جهان شناخته شده و خسارات اقتصادی بسیار زیادی اعم از هزینه‌های ناشی از سقط، مرگ و میر گوساله های زنده، افزایش فاصله گوساله زائی، کاهش تولید شیر و حتی تولد نوزاد مبتلا به آلودگی را در صنایع گاوهای شیری و گوشتی ایجاد می‌کند (۱۱). میزبان قطعی این تک یاخته سگ ها، کایوت ها، گرگ های خاکستری و دینگو ها می باشند و میزبان های واسط آن شامل گاو، گوسفند، اسب، آهو و گاومیش هستند (۸). به عنوان میزبان قطعی؛ سگ ها نقش مهمی در حفظ عفونت و همچنین وقوع بحران و طوفان های سقط جنین به دلیل انتقال افقی در گله های گاو های شیری دارند (۹). بنابراین پیشگیری از گسترش و دفع اووسیت برای محدود کردن عفونت *نئوسپورا کنینوم* بسیار حائز اهمیت است. لذا، تولید واکسنی در سگ که از شیوع عفونت و بیماری در میزبان های طبیعی آن مخصوصا گاوها جلوگیری کند کاملا ضروری می باشد (۱,۱۶). تا به امروز، چندین استراتژی پیشگیری و درمانی ارائه شده است. با این حال، آنها در پیشگیری یا درمان بیماری موثر نبودند. بنابراین، فقط اقدامات پیشگیرانه به عنوان کارامدترین و با راندمان ترین استراتژی ها برای کنترل بیماری نئوسپروزیس در گاو و دفع اووسیت در سگ توصیه شده است (۲,۱۶).

پیش از این، فرمول های مختلف تهیه واکسن *نئوسپورا کنینوم* مورد سنجش قرار گرفته است و در مجموع برآورد بسیاری از محققین این است که، واکسن های سووش زنده تخفیف حدت یافته امیدوار کننده ترین نتایج را از نظر محافظت نشان داده اند (۲,۱۲). در همین راستا، برای تهیه واکسن هایی موثر برای سایر تک یاخته ها مانند؛ توکسپلاسما گوندی، تیلریا، لیشمانیا و بابزیا نیز از سووش زنده تخفیف حدت یافته استفاده شده و بهترین عملکرد را داشته اند و به مرحله تجاری رسیده اند (۱,٤). تک یاخته توکسوپلاسما گوندی از نظر رده تکاملی ارتباط بسیار نزدیکی به انگل *نئوسپورا کنینوم* دارد و تا به امروز فقط یک واکسن موثر با استفاده از سووش تخفیف حدت یافته زنده توکسوپلاسما گوندی برای پیشگیری از توکسوپلاسموزیس در گوسفند (Toxovax) تولید شده است (۲٤).

در مجموع با توجه به اهمیت بسیار زیاد کنترل دفع اووسیست در سگ به عنوان میزبان اصلی و منبع مهم آلودگی برای گاوها، در این مطالعه نیز ما برای تهیه واکسن علیه انگل *نئوسپورا کنینوم* از همین پروسه یعنی از سووش زنده تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* استفاده کرده ایم که اخیرا در موسسه رازی شیراز تولید شده و از نظر ایجاد پاسخ ایمنی و عدم بیماریزایی نتایج بسیار امیدبخشی را به همراه داشته است (۲). بنابراین، بر اساس تمام مطالب گفته شده، در مطالعه حاضر از این سووش زنده تخفیف حدت یافته برای اولین بار در تهیه واکسنی موثر در ایجاد ایمنی زایی در سگ استفاده شده و پاسخ ایمنی و بیماریزا نبودن آن مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

رده ی سلولی Vero از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد. روش کشت بطور خلاصه بدین صورت است که از محیط کشت سلولی DMEM و ۱۰ درصد سرم جنین گاو به همراه آنتی بیوتیک با مقادیر ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر جنتامایسین و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر ضد قارچ آمفوتریسین استفاده شد. در این مطالعه از سووش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* (NC-a) موجود در موسسه رازی شیراز جهت تهیه واکسن و ایزوله ی شماره یک *نئوسپورا کانینوم* (NC-1) جهت چالش استفاده شد (۲). بدین صورت که بعد از اضافه کردن تک یاخته، کشت به صورت روزانه مشاهده گردید و وقتی ۹۰-۸۰ درصد تخریب سلولی مشاهده شد؛ تاکی زوئیت ها برداشت و در فلاسک جدید پاساژ داده شدند. تاکی زوئیت های سوش حاد و سووش تخفیف حدت یافته *ی نئوسپورا کنینوم* پس از جمع آوری از روی سلول ها با لام نئوبار شمارش و دوزهای مورد نظر جهت تزریق آماده گردید (۱۲). آنتی ژن *نئوسپورا کنینوم* نیز براساس روش Packham و همکاران (۱۹۹۸) برای انجام تست آگلوتیناسیون تهیه شد (۱۷). غلظت نهایی تاکی زوئیت ها ۳۰۰۰۰ تا ٤۰۰۰۰ در میکرولیتر تنظیم و محلول آنتی ژن آماده استفاده در دمای ٤ درجه نگهداری شد.

حیوان مورد استفاده

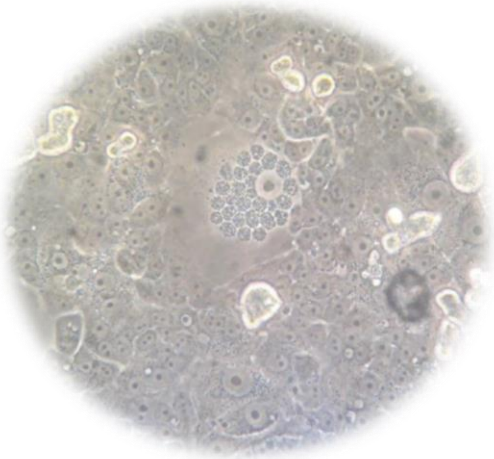
جهت انجام این پژوهش از ١٦ قلاده سگ به عنوان حیوان هدف و میزبان اصلی استفاده شد. سگ‌ها از نژاد بومی ایران با میانگین وزنی حدود ۲۰-۱۵ کیلوگرم و سن کمتر از دو سال انتخاب و در شهرستان کازرون استان فارس جمع آوری و نگهداری شدند. زیرا مطالعات قبلی نشان داده است که

سگ‌ها با سن کمتر از دو سال مقدار بالاتری اووسیست دفع می‌کنند (۱۰). قبل از شروع پژوهش، از تمامی سگ ها خونگیری جهت تست آگلوتیناسیون و نمونه گیری مدفوع جهت تست PCR انجام شده است (۳) و سگ هایی که از نظر آلودگی با تک یاخته *نئوسپورا کنینوم* مثبت بودند حذف و تنها سگ‌های سالم و منفی در نتیجه هر دو تست در آزمایش منظور گردیدند. سگ‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه چهارتایی تقسیم بندی شده و در تمام مراحل کار در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. همچنین تمام حیوانات از نظر سلامت ظاهری، تب، علائم عفونت نئوسپوروزیس مانند بی حالی، عدم اشتها و فلجی پا مورد بررسی قرار گرفتند.

گروه بندی سگ ها شامل؛ گروه یک: ۳۰×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت از سوش تخفیف حدت یافته بدون ادجوانت، گروه دو: ۳۰×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت از سوش حاد، گروه سه: ۳۰×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت از سوش تخفیف حدت یافته همراه با ادجوانت روغنی مونتاناید ژل (۱۸) و گروه چهار: کنترل که تنها محیط کشت دریافت کرده اند. در تمامی گروه ها ایمن سازی به روش تزریق زیر پوستی در دو مرحله و با فاصله دو هفته انجام گرفته است و هر گونه تغییر در علائم ظاهری و وضعیت سگ های مورد مطالعه بصورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

سه هفته بعد از تزریق دوم برای بررسی پاسخ ایمنی از آزمایش آگلوتیناسیون استفاده شد (۱۶). بدین صورت که رقت های مختلف سرم ها در PBS و ۲- مرکاپتواتانول (۲ /۰ مولار) تهیه و به هر چاهک میکرو پلیت های ۹۶ خانه ای 50 میکرولیتر اضافه گردید و پس از آن به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی ژن *نئوسپورا کنینوم* و آلکالین بافر اضافه و یک شب در انکوباسیون ۳۷ درجه قرار داده شد و روز بعد نتایج قرائت گردید.. در هر بار آزمایش یک نمونه شاهد مثبت و یک نمونه منفی مورد آزمایش قرار میگرفت.

یک ماه پس از نوبت دوم تزریق، تمامی سگ ها توسط سوش حاد *نئوسپورا کانینوم* Nc-1، بصورت خوراکی با استفاده از کیست های حاوی برادی زوئیت های رشد کرده بر روی کشت سلولی (شکل-۱) با دوز ۱۰×۱۰^{۶} چالش شدند.



شکل ۱- برادی زوئیت های نئوسپورا کنینوم کشت شده در فلاسک کشت سلولی جهت انجام چالش

یک هفته پس از تزریق دوز چالش از سگ‌ها خونگیری انجام شد و آنزیم های کبدی آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) به منظور ارزیابی ضایعات کبدی با استفاده از کیت های تجاری اندازه گیری شدند.

پنج روز بعد از چالش سگ‌ها ، نمونه های مدفوع به مدت ۷ روز از رکتوم سگ جمع‌آوری شد (٦). به منظور تشخیص حضور یا عدم حضور ژنوم انگل *نئوسپورا کنینوم* در مدفوع، واکنش مولکولی PCR با استفاده از نمونه های جمع آوری شده و توسط توالی پرایمرهای Np21-plus و Np6-plus انجام شد. (۲۳).

ارزیابی آماری

آنالیز آماری همه نتایج به دست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS با ورژن ۲۱ انجام گرفت. مقایسه بین گروه‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه محاسبه شد و در هر آزمون $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

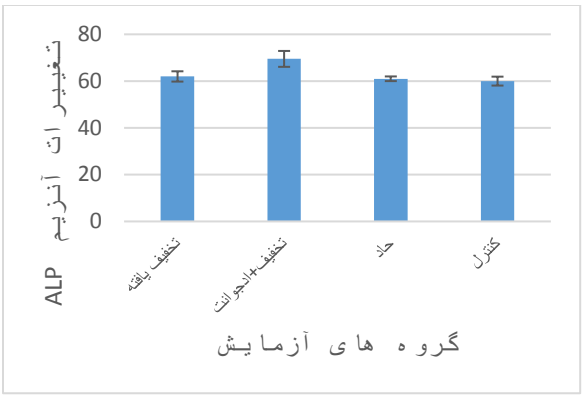
با بررسی های روزانه و نتایج بدست آمده؛ هیچ گونه علائم بالینی بیماری نظیر تب، بی حالی، عدم اشتها و فلجی در گروه های ایمن شده مشاهده نشده است. تنها در گروه ایمن شده توسط سووش حاد *نئوسپورا کنینوم* (NC-1)، تب خفیف با میانگین ۳۹/۸ درجه سانتی گراد بعد از ایمن سازی مشاهده شده که طبیعی بوده و طی ۲ روز برطرف گردید.

طی نتایج بدست آمده با توجه به تست آگلوتیناسیون (جدول-۱) جهت بررسی ایمنی هومورال، بالاترین پاسخ ایمنی در گروه ایمن شده توسط سووش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* (NC-a) به همراه ادجوانت بوده که هم با گروه کنترل و هم با سایر گروه ها دارای اختلاف معنادار می باشد ($P<0.05$).

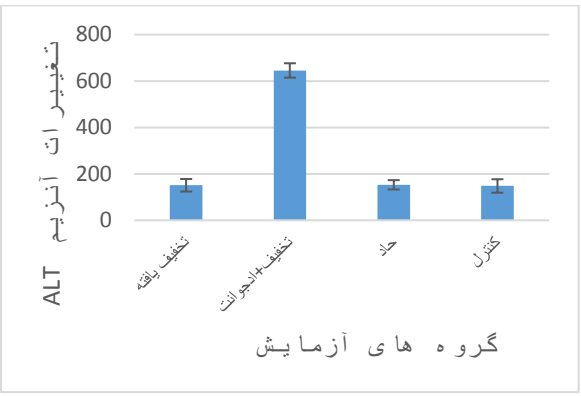
جدول ۱- تیتر آگلوتیناسیون سگ های مورد مطالعه بعد از ایمن سازی

شماره سگ های مورد مطالعه	ایمنی زایی	تیتر آگلوتیناسیون
۱	G1	۱:۱۶+
۲	G1	۱:۱۶+
۳	G1	۱:۸+
٤	G1	۱:۳۲+
٥	G2	۱:۸+
٦	G2	۱:۱٦+
۷	G2	۱:٤+
۸	G2	۱:۸+
۹	G3	۱:۳۲+
۱۰	G3	۱:٦٤+
۱۱	G3	۱:۱٦+
۱۲	G3	۱:۳۲+
۱۳	G4	-
۱٤	G4	-
۱٥	G4	-
۱٦	G4	-

نتایج بررسی آنزیم های کبدی آلکالین فسفاتاز (ALP) (نمودار-۱) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) (نمودار-۲) نشان داد که؛ در میزان سرمی هر دو آنزیم کبدی در گروه ایمن شده توسط سووش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* (NC-a) به همراه ادجوانت با گروه کنترل اختلاف معناداری با $P<0.05$ وجود دارد.



نمودار ۱- تغییرات سرمی آنزیم ALP



نمودار ۲- تغییرات سرمی آنزیم ALT

از آنجایی که جلوگیری از دفع اووسیست به عنوان مهم ترین شاخص در موفقیت آمیز بودن واکسن و ایمنی زایی در سگ به شمار می رود، لذا؛ با بررسی نتایج حاصل از تست مولکولی به این نتیجه دست یافته شد که در هر سه گروه ایمن شده با گروه کنترل اختلاف معناداری وجود دارد ($P<0.05$) و دفع اووسیست در هر سه گروه ایمن شده کنترل گردیده و تنها در گروه کنترل، دفع اووسیست مشاهده شده است. در گروه ایمن شده توسط سووش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* به همراه ادجوانت، تنها در یک مورد سگ و طی یک روز پس از بررسی های انجام شده، دفع اووسیست مشاهده گردیده است که بالاترین پاسخ ایمنی بوده است (جدول-۲).

جدول ۲- نتایج تست مولکولی PCR سگ های مورد مطالعه؛ G1 گروه ایمن سازی شده با سووش تخفیف حدت یافته، G2 گروه ایمن سازی شده با سووش حاد، G3 گروه ایمن سازی شده با سووش تخفیف حدت یافته به همراه ادجوانت و G4 گروه کنترل می باشند.

روز / شماره	روز صفر قبل از چالش	شش روز بعد از چالش	هفت روز بعد از چالش	هشت روز بعد از چالش	نه روز بعد از چالش	ده روز بعد از چالش	یازده روز بعد از چالش	دوازده روز بعد از چالش
G1	–	+	+	–	–	–	–	–
G1	–	+	+	–	–	–	–	–
G1	–	–	–	–	–	–	–	–
G1	–	–	–	–	–	–	–	–
G2	–	–	–	–	–	–	–	–
G2	–	+	+	+	–	–	–	–
G2	–	+	+	+	–	–	–	–
G2	–	–	–	–	–	–	–	–
G3	–	–	–	–	–	–	–	–
G3	–	+	–	–	–	–	–	–
G3	–	–	–	–	–	–	–	–
G3	–	-	–	–	–	–	–	–
G4	–	+	+	+	+	+	+	+
G4	–	+	+	+	+	+	+	+
G4	–	+	+	+	+	+	+	+
G4	–	+	+	+	+	+	+	+

بحث و نتیجه گیری

یکی از مهم‌ترین عوامل خطر برای عفونت نئوسپوروزیس، حضور میزبان نهایی، یعنی سگ می‌باشد که در کنار دیگر عوامل خطر مانند ایمنی ضعیف، نژاد دام و غیره در گسترش عفونت نقش بسزایی دارد (۲۱). در این مطالعه، سگ به عنوان حیوان هدف جهت ایمن سازی انتخاب شده است زیرا علاوه بر میزبان اصلی *نئوسپورا کنینوم*، مهم ترین عامل ایجاد آلودگی در گاوداریها می باشد؛ چرا که شیوع سرمی *نئوسپورا کنینوم* در سگ هایی که نزدیک مزارع دامداری و در کنار گاوها زندگی می‌کردند بسیار بالاتر (٤٦٪) از سگ‌های دیگر (۱۸٪) نشان داده شد که تفاوت بین آنها نیز معنادار بود. همچنین محققین متوجه شدند که شیوع سرمی *نئوسپورا کنینوم* در سگ های دامداری‌ها نشان‌دهنده خطر وقوع انتقال افقی *نئوسپورا کانینوم* بین سگ و گاو را بالا برده است (۲۰). در حال حاضر؛ هیچ واکسن موثری برای کنترل *نئوسپورا کنینوم* وجود ندارد (۲). طبق مطالعات انجام شده؛ کارهای تحقیقاتی بسیار کمی برای تهیه واکسن علیه *نئوسپورا کنینوم* در سگ انجام شده و عمده تحقیقات برای دستیابی به واکسنی موثر در گاو بوده است. بین انواع واکسن ها، بسیاری از محققین معتقدند که واکسن های زنده تخفیف حدت یافته بیشترین نتایج امیدوارکننده را به همراه داشته اند (۲). طی تنها مطالعه ای که در مورد سگ در ارتباط با ایمنی زایی علیه *نئوسپورا کنینوم* توسط نیشیکاوا و همکاران (۲۰۰۰) انجام شده؛ موفق شده اند که با استفاده از هرپس ویروس نوترکیب و بیان پروتئین سطحی *نئوسپورا کنینوم* اقدام به پیشنهاد واکسنی برای جلوگیری از دفع اووسیست در سگ نمایند (١٦). بنابراین با توجه به مطالعات صورت گرفته و موارد ذکر شده؛ در این مطالعه از سووش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* جهت تهیه واکسن موثر و ایمنی زایی سگ ها استفاده شده است که در مطالعات پیشین در موسسه رازی نشان داده، که علاوه بر بیماری‌زا نبودن، قادر به ایجاد ایمنی مناسب در حیوانات مدلی مانند؛ موش و تخم مرغ جنین دار بوده و همچنین قادر به جلوگیری از سقط و انتقال عمودی در موش حامله نیز بوده است و بطور معناداری باعث جلوگیری از سقط های ناشی از *نئوسپورا کنینوم* در موش گردیده بود (۲). بنابراین در این مطالعه، ایمنی‌زایی در سگ توسط سوش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کانینوم* همراه با ادجوانت روغنی مونتاناید ژل و بدون ادجوانت، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج موفقیت آمیزی را نیز به همراه داشته است.

برای بررسی پاسخ ایمنی هومورال تولید شده در بدن حیوانات مورد مطالعه از آزمایش آگلوتیناسیون استفاده شد چرا که، روش آگلوتیناسیون قابلیت خود را به عنوان یک

تست حساس، اختصاصی، ساده، سریع و ارزان با کاربردهای چندگانه نشان داده است (۱۷). مطالعات انجام شده در موش نشان داده اند که استفاده از ادجوانت باعث القا ایمنی سلولی و همچنین ایمنی هومورال می گردد (۱٤). در این پژوهش، پاسخ ایمنی ایجاد شده در هر سه گروه متعاقب ایمنی زایی اختلاف معناداری را با گروه کنترل داشته و بالاترین پاسخ در گروه ایمن شده با سوش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* به همراه ادجوانت روغنی مونتاناید می‌باشد که می‌توان پاسخ ایجاد شده را به حضور ادجوانت نسبت داد. مطالعات انجام شده نشان داده که؛ صرف ایمنی هومورال برای واکسنی موثر علیه *نئوسپورا کنینوم* کافی نمی باشد (۱٦).

همچنین دفع اووسیست در سگ‌های آلوده به عنوان بهترین راه تشخیص عفونت می‌باشد که در این مطالعه نیز مورد بررسی قرار گرفته است و ایمنی زایی در کنترل دفع اووسیست موثر بوده؛ بطوریکه هر سه گروه ایمن شده با گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان داده اند. مطالعات نشان می دهند که یک واکسن موثر علیه بیماری نئوسپوروزیس باید پاسخ ایمنی سلولی، ایمنی هومورال و همچنین پاسخ های تولید آنتی بادی در مخاطات را تحریک کند (۱۵).

علاوه بر مطالب گفته شده، از آنجایی که بیماری نئوسپوروزیس در سگ‌های بالغ (بالای ٦ ماه) معمولاً بدون علائم می‌باشد و تنها سگ هایی علائم بیماری را نشان می دهند که دچار ضعف سیستم ایمنی باشند (۱۳). بنابراین، هیچ گونه علائم بیماری در سگ های مورد مطالعه مشاهده نشد. از دیگر شاخص های مورد بررسی، ایمن بودن خود واکسن و عدم ایجاد بیماریزایی می باشد. لذا؛ هر گونه علامت بیماری مانند تب، کاهش وزن، علائم بیماری عصبی مانند عدم توانایی در ایستادن و یا تغییر در ظاهر پوست آنها بررسی و ثبت گردید و هیچ تفاوت معناداری در گروه های ایمن شده با گروه کنترل نیز مشاهده نشد. شایان ذکر است که؛ در گروه های ایمن شده با سووش تخفیف حدت یافته هیچ علائم بیماریزایی ثبت نشد که نشان دهنده عدم بیماریزا بودن سووش مورد مطالعه می باشد. در مطالعات پیشین انجام شده نیز نشان داده شده که؛ سووش تخفیف حدت یافته مورد مطالعه در موش، جوجه و موش حامله نیز بیماریزا نبوده است (۲). بنابراین، این مطالعه ثابت کرد که سووش تخفیف حدت یافته مورد مطالعه در سگ نیز ایجاد بیماری نخواهد کرد. در همین راستا از دیگر شاخص های مورد مطالعه، بررسی علائم بصورت پاراکلینیکی و اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی بود که پس از تزریق دوز چالش انجام گرفت. انگل قادر است به بافت‌های بدن از جمله؛ کبد، ریه، قلب و مغز حمله کرده و تشکیل کیست بافتی دهد و منجر به عفونت مزمن شود (۷).

نتایج به دست آمده نشان داد که آنزیم‌های کبدی تنها در گروه ایمن شده توسط سوش تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* به همراه ادجوانت به مقدار قابل توجهی بالا رفته و با گروه کنترل دارای اختلاف معناداری است. این افزایش در میزان آنزیم‌های کبدی می‌تواند به دلیل بروز التهاب در این بافت باشد. علاوه بر این، مطالعات پیشین در موش نیز نشان داده اند که، به دلیل استفاده از ادجوانت، ممکن است ایمنی به اندازه‌ای بالا برود که باعث ایجاد واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری شود. قابل ذکر است که در مطالعه ای که توسط بازلر و همکاران (۲۰۰۰) انجام شده است، مشاهده شده که بعد از انجام چالش، برخلاف انتظار؛ موش های ایمن سازی شده با تاکی زوئیت کشته به همراه ادجوانت نسبت به گروه کنترل مرگ و میر بیشتری داشته اند (۵). بنابراین، احتمال می رود که افزایش در میزان آنزیم های کبدی در گروه ایمن شده به همراه ادجوانت نیز به دلیل بروز واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری باشد که باید مورد بررسی های بیشتر قرار گیرد.

نتیجه گیری نهایی

در مجموع نتایج به دست آمده از این پژوهش ضمن تایید کارایی سووش مورد مطالعه که در پژوهش های قبلی در موسسه رازی شعبه شیراز نیز مورد مطالعه قرار گرفته بود؛ برای اولین بار در سگ از نظر ایمنی زایی مورد تایید قرار گرفت. سووش مورد مطالعه علاوه بر عدم بیماریزایی در سگ، پاسخ ایمنی هومورال مناسبی را نیز ایجاد کرده و این مهم با عدم دفع اووسیست در مدفوع سگ ثابت شد. چرا که؛ کنترل و عدم دفع اووسیست در سگ به عنوان هدف اصلی و نهایی برای محافظت گاو از آلودگی به *نئوسپورا کنینوم* و جلوگیری از ایجاد سقط های طوفانی می باشد (۹). زیرا شیوع بالای آنتی بادی علیه *نئوسپورا کنینوم* در گاو، با سگ های آلوده به *نئوسپورا کنینوم* در مزرعه ارتباط دارد. بنابراین، در مزارعی که سگ اعم از سگ نگهبان و یا سگ ولگرد حضور دارد؛ به دلیل دفع اووسیست، شیوع سرمی *نئوسپورا کنینوم* در گاوها به طور معناداری بیشتر است زیرا گاوها اغلب با قرار گرفتن در معرض اووسیست دفع شده در مدفوع سگ آلوده می شوند (۲۲). پیشنهاد می شود که در مطالعات آتی، سووش مورد مطالعه به عنوان واکسنی موثر برای مطالعات تکمیلی استفاده شده و مدت زمان ایمنی ایجاد شده در سگ نیز مورد بررسی قرار گیرد که تا چه زمانی بعد از واکسیناسیون ایمنی باقی می ماند و دفع اووسیست کنترل می گردد.

تشکر و قدردانی

مراحل اجرایی این پژوهش در آزمایشگاه ملی نئوسپورا و در محل نگهداری حیوانات دانشکده دامپزشکی آزاد اسلامی واحد کازرون انجام شده است.

منابع:

1. Aguado-Martínez, Adriana & Basto, Afonso & Leitão, Alexandre & Hemphill, Andrew. (2017). Neospora caninum in non-pregnant and pregnant mouse models: Cross-talk between infection and immunity. International Journal for Parasitology. 47. 10.1016/j.ijpara.2017.09.001.
2. Amini, L., Namavari, M., Khodakaram-Tafti, A., Divar, M. R., & Hosseini, S. M. H. (2020). The evaluation of attenuated *Neospora caninum* by long-term passages on murine macrophage cell line in prevention of vertical transmission in mice. *Veterinary Parasitology*, *283*, 109171.
3. Bandini, L. A., Neto, A. F., Pena, H. F., Cavalcante, G. T., Schares, G., Nishi, S. M., & Gennari, S. M. (2011). Experimental infection of dogs (Canis familiaris) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology*, *176*(2-3), 151-156.
4. Bartley, P.M., Wright, S., Sales, J., Chianini, F., Buxton, D., Innes, E.A., 2006. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate the virulence of Neospora caninum in vivo. Parasitology 133, 421–432.
5. Baszler, T. V., McElwain, T. F., & Mathison, B. A. (2000). Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, *7*(6), 893-898.
6. Cavalcante GT, Monteiro RM, Soares RM, Nishi SM, Alves Neto AF, Esmerini Pde O, Sercundes MK, Martins J, Gennari SM. Shedding of Neospora caninum oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. Vet Parasitol. 2011 Jun 30;179(1-3):220-3. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.02.026. Epub 2011 Mar 5. PMID: 21450407; PMCID: PMC7131750.
7. Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Šlapeta J. A review of neosporosis and pathologic findings of Neospora caninum infection in wildlife. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2015 Apr 24;4(2):216-38.
8. Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals—the last five years. Vet. Parasitol. 180, 90–108.
9. Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, *20*, 323–367.
10. Gondim, L. F., Laski, P., Gao, L., & McAllister, M. M. (2004). Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains & among different strains of *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*, *90*(1), 119-122.
11. Hernandez J, Risco C, Donovan A. Association between exposure to Neospora caninum and milk production in dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 2001 Sep 1;219(5):632-5.
12. Khordadmehr, M., Namavari, M., Khodakaram-Tafti,A., Mansourian, M., Rahimian, A., Daneshbod, Y. 2013. Comparison of use of Vero cell line and suspension culture of murine macrophageto attenuation of virulence of *Neospora caninum. Research in Veterinary Science*.95 :515–521.
13. Kul, O., Atmaca, H. T., Anteplioglu, T., Ocal,

S, Odriozola ER, Späth EJ, Odeón AC, Campero CM, Moore DP. Frequency of Neospora caninum infections in beef cow-calf operations under extensive management. Vet Parasitol. 2016 Mar 30;219:40-3.

22. Wouda W, Dijkstra T, Kramer AM, van Maanen C, Brinkhof JM. Seroepidemiological evidence for a relationship between Neospora caninum infections in dogs and cattle. Int J Parasitol. 1999 Oct;29(10):1677-82. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00105-8. PMID: 10608454.
23. Yamage, M., Flechtner, O., & Gottstein, B. (1996). *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain" cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of parasitology*, 272-279.
24. 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.

N., & Canpolat, S. (2015). Neospora caninum: the First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. *Journal of comparative pathology*, *153*(1), 9–13.

14. M.M .NamAvari, M Sayari, M Hayati, S Mirhashemi. 2011. Evaluation of Neospora caninum Vaccine Candidates in C57BL/6 Mouse Model . Razi Vaccine and Serum Research Institute.(in farsi)
15. Monney T, Debache K, Hemphill A. Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* Infection. *Animals*. 2011; 1(3):306-325.
16. Nishikawa Y, Ikeda H, Fukumoto S, Xuan X, Nagasawa H, Otsuka H, Mikami T. Immunization of dogs with a canine herpesvirus vector expressing Neospora caninum surface protein, NcSRS2. Int J Parasitol. 2000 Oct;30(11):1167-71.
17. Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A. (1998). A Modifed Agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5: 467-473.
18. Parker, R. & Deville, Sébastien & Laurent, Dupuis & Bertrand, F. & Aucouturier, Juliette. (2009). Adjuvant formulation for veterinary vaccines: Montanide (TM) Gel safety profile. Procedia in Vaccinology. 1. 140-147. 10.1016/j.provac.2009.07.026.
19. Piraine REA, Silva RAE, Junior AGDS, Cunha RC, Leite FPL (2015) The Potential of Neospora caninum Immunogens against Neosporosis. J Vaccines Vaccin 6: 298.
20. Robbe D, Passarelli A, Gloria A, Di Cesare A, Capelli G, Iorio R, Traversa D. Neospora caninum seropositivity and reproductive risk factors in dogs. Exp Parasitol. 2016 May;164:31-5.
21. Rodríguez AM, Maresca S, Cano DB, Armendano JI, Combessies G, Lopéz-Valiente