ارزیابی کشت تاکی زوئیت های Neospora caninum در سل لاین های چسبنده(Vero) و معلق(ماکروفاژ موش)

منیره خرداد مهر[1*]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۸

چکیده

مقدمه: نئوسپورا کانینوم یک تک یاخته داخل سلولی و عامل بیماریزای مهم در گاو و سگ می باشد. در مطالعه حاضر، تاکی زوئیت های نئوسپورا کانینوم در سل لاین معلق ماکروفاژ موش(J774 A.1) کشت داده شدند و با سل لاین چسبنده Vero، مقایسه شدند.

مواد و روش ها: روزانه میانگین تعداد تکی زوئیت های رها شده از هر سلول ثبت شد. پس از مشاهده تکثیر اولیه انگل، تفاوت حدت تکی زوئیت های تکثیر شده، بعد از چند پاساژ متوالی، در تخم مرغ جنین دار مورد بررسی قرار گرفت. روزانه میزان تلفات در هر گروه ثبت و از مغز، قلب و کبد آن ها جهت مطالعات هیستوپاتولوژی نمونه برداری انجام شد.

یافته های پژوهش: میزان تلفات در جنین های تلقیح شده به وسیله تکی زوئیت های به دست آمده از سل لاین Vero و ماکروفاژ موش، به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰ درصد بود که این مرگ و میر، وابسته به دوز تلقیح بود. در مطالعات میکروسکوپی، در بافت کبد و قلب جنین های تلقیح شده با تکی زوئیت های به دست آمده از ماکروفاژهای موش، هپاتیت و میوکاردیت خفیف تری مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که کشت نئوسپورا کنینوم در ماکروفاژهای موش باعث تکثیر بسیار زیاد و هم چنین کاهش حدت سریع انگل در مقایسه با سل لاین Vero می شود. نتایج مطالعه حاضر یک سل لاین بسیار مناسب برای تولید انبوه تکی زوئیت های نئوسپورا کنینوم، در جهت انجام مطالعات مختلف تجربی و هم چنین تولید واکسن زنده تخفیف حدت یافته آن پیشنهاد می کند.

واژه های کلیدی: کشت سلول، حدت، تخم مرغ جنین دار، هیستوپاتولوژی

* نویسنده مسئول: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email:*khordadmehr@tabrizu.ac.ir*

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]

مقدمه

تاکی زوئیت های Neospora caninum به عنوان یک تک یاخته کوکسیدیایی مطرح می باشد که تنوع میزبانی وسیعی دارد. از نظر ساختاری و چرخه زندگی بسیار شبیه به توکسوپلاسما گوندئی می باشد البته با این تفاوت که نئوسپورا به صورت اولیه در گاو ایجاد بیماری می کند و سگ و سایر سگ سانان به عنوان میزبان نهایی آن مطرح می باشند، در حالی که توکسوپلاسما در انسان، گوسفند و بز به صورت اولیه بیماری ایجاد می کند و تنها میزبان نهایی آن گربه ها می باشند. با توجه به مثبت بودن تیتر سرمی انسانی در برخی کشورها، ابهامات و سوالات در مورد جنبه های مشترک بودن این بیماری هم چنان در هاله ای از ابهام می باشد. ولی یافته های فعلی دانشمندان Neospora caninum را عامل بیماریزای مهم در گاو و سگ ثابت می کند و یکی از مهم ترین عوامل سقط جنین گاو در جهان به شمار می رود(۱،۲). اخیراً در ایران، ۴۵ درصد سقط جنین نئوسپورایی در گاوهای مشهد گزارش شده است(۳). مطالعات دیگری شیوع سرمی به نسبت بالایی را در ایران نشان می دهد به عنوان مثال: ۳۸/۸ درصد گاوهای آبستن گاوداری های اطراف تهران(۴)، ۳۲ درصد از گاوهای سنتی و صنعتی شمال ایران(۵) و ۶۲/۲ درصد از سگ های شهرستان ارومیه(۶) آلوده گزارش شده اند. با توجه به طبیعت داخل سلولی انگل و درگیری سیستم ایمنی سلولی، پاسخ های ایمنی حاصل نقش مهمی جهت محافظت در برابر انگل دارند. با توجه به این نکات و عدم وجود داروی مناسب علیه این بیماری، روش های کنترل عفونت Neospora caninum، به طرف تولید واکسن های موثر سوق یافته است(۷). یکی از روش های مهم تولید واکسن برعلیه تک یاخته ها تخفیف حدت انگل زنده می باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که انجام پاساژهای متوالی در شرایط آزمایشگاهی باعث تخفیف حدت(بیماریزایی) تک یاخته نئوسپورا می شود(۸). آن چه در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته است این است که آیا سل لاین ماکروفاژ موشی برای کشت، تکثیر و پاساژ و سپس در تخفیف حدت احتمالی تکی زوئیت های نئوسپورا کنینوم مناسب می باشد یا خیر.

امروزه به طور گسترده ای از کشت سلولی به منظور جدا سازی و تکثیر Neospora caninum برای اهداف مختلفی استفاده می شود(۹،۱۰). در اکثر مطالعات، سلول Vero (با منشاء کلیه میمون سبز آفریقایی) به عنوان بهترین سلول برای جدا سازی و تکثیر نئوسپورا معرفی شده است(۱۱،۱۲). اگر چه گاهی مواقع مشکلاتی در زمینه سرعت تکثیر انگل و تامین مواد مغذی مورد نیاز در محیط کشت سلولی آن مشاهده شده است. به همین دلیل در سال های اخیر حساسیت رده های مختلف سلولی به این تک یاخته مورد بررسی قرار گرفته است. در سال های اخیر، سل لاین های ماکروفاژ موش برای تکثیر داخل سلولی طیف وسیعی از عوامل عفونت زا از جمله Mycobacterium tuberculosis(۱۳)، Brucella abortus(۱۴)، و Cryptococcus neoformans (۱۵) استفاده شده است. در مطالعه حاضر نیز برای اولین بار از این سل لاین، برای کشت و تکثیر نئوسپورا استفاده شده است.

در مطالعه حاضر، حساسیت دو سل لاین ماکروفاژ موش و Vero نسبت به کشت، تکثیر و پاساژهای متوالی تکی زوئیت های Neospora caninum در شرایط کشت سلول(in vitro) مقایسه شده است. علاوه بر این به منظور ارزیابی میزان حدت تکی زوئیت های انگل به دست آمده در شرایط کشت سلول در مدل های آزمایشگاهی حیوانی(in vivo)، یک مطالعه مقدماتی بر روی تخم مرغ جنین دار انجام شد با این هدف که آیا نوع سلول میزبان در در شرایط کشت سلول به تخفیف حدت تکی زوئیت های نئوسپورا در مدل های آزمایشگاهی حیوانی منجر می شود یا خیر که این ارزیابی با روش هیستوپاتولوژی انجام شد.

مواد و روش ها

کشت سلولی و تکثیر انگل: پس از کشت سل لاین Vero و تشکیل یک لایه سلولی در روز سوم، محیط کشت تازه DMEM (Dulbeco' s Modified Eagles ' s Medium) همراه با تاکی زوئیت های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]

Neospora caninum به فلاسک کشت سلولی اضافه گردید. محیط کشت شامل DMEM حاوی ۲ درصد سرم جنین گوساله، محلول های آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین و ضد قارچ آمفوتریسین بود که در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و دی اکسیدکربن ۵ درصد نگهداری شدند. با بررسی روزانه فلاسک های حاوی نئوسپورا با استفاده از میکروسکوپ معکوس، زمانی که ۹۰-۸۰ درصد سلول های Vero با ایجاد ضایعات سلولی توسط تکی زوئیت های نئوسپورا تخریب شدند(تقریباً هر سه روز یک بار)، مایع رویی فلاسک ها که حاوی تکی زوئیت ها بودند جمع آوری شدند و جهت جداسازی بقایای سلول های Vero، دو بار سانتریفیوژ(ده دقیقه با دور ۲۰۰۰ آر پی آم) انجام شد. در انتها تعداد تکی زوئیت های زنده در هر میلی لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار شمارش شد. میزان مشخص و مساوی از تکی زوئیت های به دست آمده در این مرحله($۱۰^{۶}$ تکی زوئیت در هر میلی لیتر)، به منظور آداپته سازی به سلول های مورد نظر شامل Vero و ماکروفاژ موش افزوده شد و به مدت دو هفته کشت داده شد. به این صورت که پس از مشاهده حداکثر CPE(Cytopathic effect)، تکی زوئیت های موجود در هر فلاسک جمع آوری شده و پس از سانتریفیوژ، به فلاسک های جدید از هر سل لاین افزوده شد.

مقایسه قدرت تکثیر انگل در دو سل لاین: تعداد مشخص و یکسان از تکی زوئیت به دست آمده در مرحله قبل در مجاورت تعداد مشخصی از سلول های نامبرده در بالا(تعداد ۲×۱۰^{۶} تکی زوئیت بر روی $۱/۴\times۱۰^{۶}$ از هر نوع سلول) در شرایط کاملاً یکسان (محیط کشت DMEM به همراه ۲ درصد سرم گوساله و ۱ µl/ml پنی سیلین استرپتومایسین و ۵ درصد دی اکسید کربن) قرار گرفته شد. به مدت چهار روز(تا زمانی که در تمام سلول ها CPE ایجاد شود و تکی زوئیت ها رها شوند) جهت مقایسه، روزانه مقداری از مایع رویی سلول ها جمع آوری و ۱۰ میکرولیتر از آن جهت شمارش بر روی لام هموسیتومتر نئوبار قرار گرفت و تعداد تکی زوئیت های آزاد بر روی هر سلول شمارش شد و میانگین روزانه آن ها محاسبه و با هم مقایسه شد. در نهایت به منظور بررسی میزان حدت انگل در این دو سل لاین، تکی زوئیت های انگل، با شرایط کاملاً یکسان، ۳۰ پاساژ متوالی داده شدند.

تلقیح به تخم مرغ جنین دار به منظور ارزیابی میزان حدت تکی زوئیت های به دست آمده از دو سل لاین: جهت مقایسه میزان حدت تکی زوئیت به دست آمده از هر سلول، ۷۰ تخم مرغ جنین دار نژاد لوهمن تهیه و با الکل اتانول ضد عفونی شدند. سپس در انکوباتور ضد عفونی شده(با فرمالدهید)، با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۷۰ درصد، ۸-۶ بار چرخش در ساعت به مدت ۱۸ روز نگهداری شدند. در روز نهم انکوباسیون محل غشاء کوریوآلانتوئیک با استفاده از کندلینگ مشخص و محدوده آن در هر تخم مرغ علامت گذاری شد. سپس سوراخی در حد فاصل کیسه هوایی و غشاء کوریوآلانتوئیک جهت محل تزریق انگل ایجاد شد. سپس تخم مرغ ها به صورت تصادفی به هفت گروه ده تایی تقسیم شده و دوز مشخص و حساب شده ای از تکی زوئیت های پاساژ داده شده بر روی دو سل لاین به شش گروه تخم مرغ های جنین دار با دوزهای $۰/۵\times۱۰^{۴}$، ۱×۱۰^{۴} و $۱/۵\times۱۰^{۴}$ (به ترتیب در گروه های V1 و J1، V2 و J2، V3 و J3) تکی زوئیت در میلی لیتر، تلقیح شد و به گروه هفتم به عنوان گروه کنترل(C) ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی استریل (DMEM) تلقیح شد. تمام تخم مرغ ها در شرایط کنترل شده حرارت و رطوبت در دستگاه جوجه کشی نگهداری شدند. روزانه دو بار تخم مرغ ها جهت بررسی تلفات کندل شدند و میزان مرگ و میر در هر گروه ثبت و از بافت های مغز، قلب و کبد آن ها نمونه برداری انجام شد.

مطالعات هیستوپاتولوژی: از جنین های تلف شده در گروه های مختلف تلقیح، ابتدا بازرسی دقیق خارجی به عمل آمد و سپس جهت مطالعات هیستوپاتولوژی از بافت های مغز، قلب و کبد نمونه برداری انجام شد. پس از تثبیت نمونه های بافتی در فرمالین بافر ۱۰ درصد و مراحل آماده سازی بافت ها، قالب گیری با استفاده از پارافین مذاب صورت گرفت. پس از تهیه برش های ۴ تا ۵ میکرونی از قالب ها و خنک شدن در محیط آزمایشگاه، رنگ آمیزی متداول هماتوکسیلین و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]

ائوزین(H&E) انجام شد و به وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. برای انجام مطالعات ایمنوهیستوشیمی، بعد از بررسی میکروسکوپیک اسلاید های رنگ آمیزی شده با روش H&E، مقاطع بافتی به ضخامت ۴ میکرون از همان قالب های پارافینی تهیه شدند. در انتها، اسلایدها در محلول الکل های صعودی و زایلل قرار داده شدند و پس از مانت کردن، به وسیله میکروسکوپ نوری مطالعه شدند(آزمایشات مذکور در بخش پاتوبیولوژی دانشکده دام پزشکی دانشگاه تبریز انجام شد).

آنالیز آماری: جهت بررسی معنی داری تفاوت میانگین تکی زوئیت های آزاد شده از هر سلول از T test (SPSS version 22, IL, USA) و یافته های هیستوپاتولوژیک با استفاده از تست انووا و تست های غیرپارامتری(non- parametric tests; Kruskal- wallis H and Mann- whitney U) با در نظر گرفتن میزان خطای کمتر از ۰/۰۵ انجام شد.

یافته های پژوهش

مقایسه قدرت تکثیر انگل به وسیله سلول های Veroو ماکروفاژ موش در کشت سلولی: میانگین نتایج شمارش روزانه در چهار روز متوالی بعد از عفونت در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در این نتایج مشاهده می شود که در سلول های ماکروفاژ و Vero از روز یک تا روز چهار، تعداد تکی زوئیت های آزاد شده از سلول ها سیر صعودی داشته است. در مورد سلول ماکروفاژ از روز یک تا سه، میانگین تعداد تکی زوئیت های رها شده کمتر از میانگین تعداد تکی زوئیت های رها شده از سلول Vero بوده ولی در روز چهار افزایش ناگهانی و شدیدی در تکی زوئیت های رها شده مشاهده شد(تصویر شماره ۱) که این تفاوت از نظر آماری معنی دار بود($P<0.05$).

میزان مرگ و میر در جنین های تخم مرغ: از روز هفت بعد از تلقیح، تلفات در جنین ها آغاز شد(در گروه های J3) و میزان مرگ و میر در شش گروه V وابسته به دوز تلقیح شده بوده، بدین صورت که در دوزهای بالاتر، تلفات زودتر مشاهده شد. در این شش گروه در طی سه روز(روز هفت، هشت و نه بعد از تلقیح) تمام جنین ها تلف شدند(تلفات ۱۰۰ درصد). در مقایسه با این شش گروه، در سه گروه مورد آزمایش J، تنها یک جنین از گروه J3 (۱۰ درصد) در روز هفت بعد از تلقیح تلف شد و سایر جنین ها در این سه گروه، به صورت زنده متولد شدند. در گروه کنترل(تلقیح شده با محیط کشت)، تمام جوجه ها به صورت زنده متولد شدند.

یافته های ماکروسکوپی: جوجه های متولد شده در گروه کنترل و گروه J1 و J2 از نظر بالینی طبیعی بودند. در حالی که یافته های بالینی در جوجه های هچ شده گروه J3 شامل عدم توانایی در بلند شدن، عدم تعادل، التهاب مفصل و وزن تولد کم تر از وزن متوسط بود. مشاهدات ماکروسکوپی در جنین های مرده گروه V، خون ریزی و پرخونی وابسته به دوز تلقیح را نشان داد. در گروه V1 (با دوز $۱۰^{۴}\times۰/۵$ تکی زوئیت در هر میلی لیتر) میزان خون ریزی کم، در گروه V2 (با دوز $۱۰^{۴}\times۱/۰$ تکی زوئیت در هر میلی لیتر) میزان خون ریزی متوسط و در گروه V3 (با دوز $۱۰^{۴}\times۱/۵$ تکی زوئیت در هر میلی لیتر) میزان خون ریزی شدید بود. در بافت های مختلف مغز، قلب و کبد هیچ گونه ضایعه ماکروسکوپی مشاهده نشد. خون ریزی در سطح داخلی پوسته تخم مرغ هم مشاهده شد. یافته های ماکروسکوپی در جنین های تلف شده در گروه J3 شامل پرخونی و خون ریزی ملایم در سطح بدن بود.

یافته های هیستوپاتولوژی: ضایعات میکروسکوپیک در گروه های مختلف Vero در بافت های کبد، و قلب شامل خونریزی، پرخونی، نکروز و آماس بافت در گروه های مختلف بود که با افزایش دوز تکی زوئیت های تلقیح شده، شدت ضایعات هم بیشتر و از نظر آماری، معنی دار بود($P<0.05$) بود. آماس بافتی با نفوذ منتشر یا تجمع کانونی سلول های آماسی تک هسته ای شامل لنفوسیت، پلاسماسل و به ویژه ماکروفاژ در بافت کبد در پارانشیم و اطراف عروق و در بافت قلب بین سلول های میوکارد قلب تشخیص داده شد(تصویر شماره ۲). در حالی که در گروه J ضایعات پاتولوژیک به شکل حضور سلول های آماسی تک هسته ای به خصوص ماکروفاژها، بدون پرخونی، خونریزی و نکروز بود که در این گروه نیز با افزایش دوز تکی زوئیت های تلقیح شده، شدت ضایعات بیشتر بود. در هیچ کدام از گروه های مورد آزمایش، اثری از

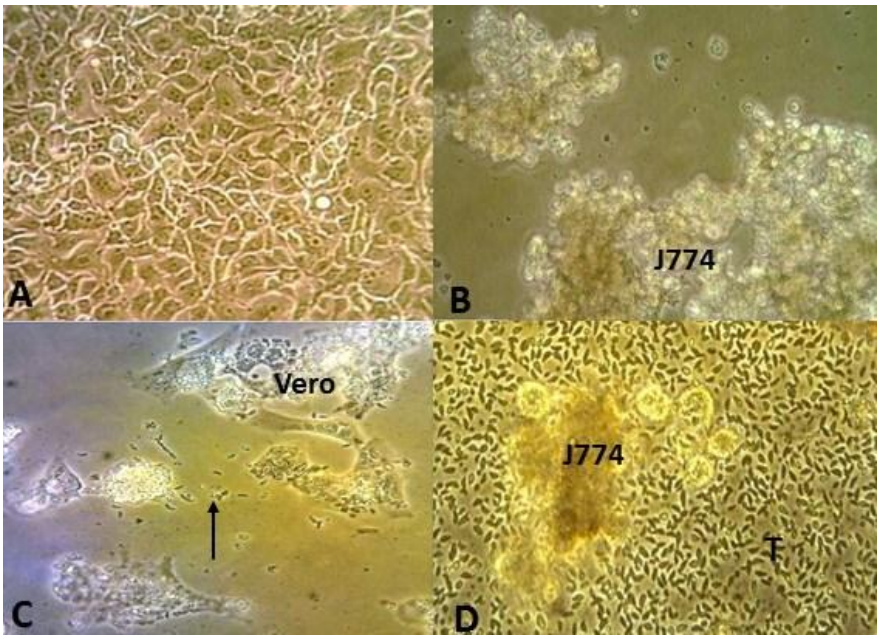
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]

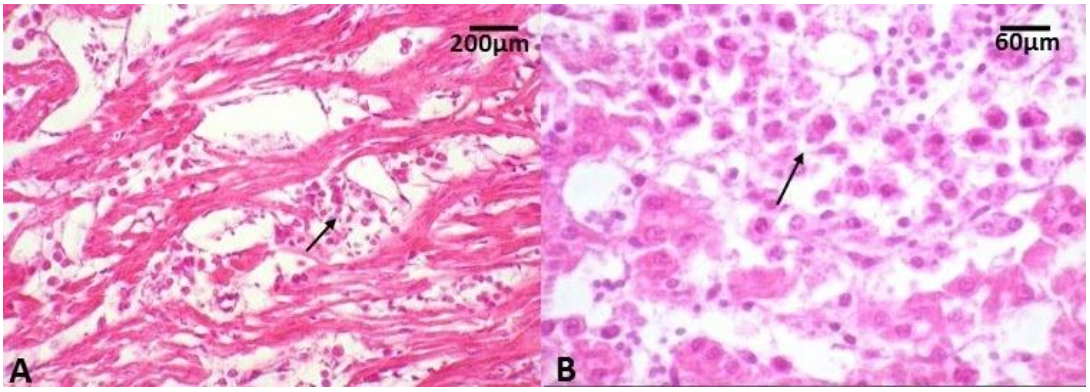
آماس در بافت مغز مشاهده نشد. در نمونه های بافتی جوجه های گروه کنترل هیچ گونه ضایعه هیستوپاتولوژیک مشاهده نشد.

جدول شماره ۱. میانگین تعداد تاکی زوئیت های رها شده از دو سل لاین Vero و ماکروفاژ موش در طی چهار روز. در روزهای یک، دو و چهار تفاوت آماری معنی دار بین دو گروه مشاهده شد.

نوع سل لاین	روز یک $\times ۱۰^{۴}$	روز دو $\times ۱۰^{۴}$	روز سه $\times ۱۰^{۴}$	روز چهار $\times ۱۰^{۴}$	میانگین $\times ۱۰^{۴}$
Vero	۳/۵±۰/۰۵	۶/۲۵±۱/۳	۲۱/۲۵±۱/۳	۲۴/۲±۲/۲	۱۳/۸±۲/۹
J774	۰/۷۵±۰/۲۵	۳±۰/۷	۱۶/۲۵±۲/۹	۱۰۵/۲±۱۰/۱	۳۱/۳±۳/۸



تصویر شماره ۱. سل لاین Vero و ماکروفاژ موش(J774). A: سل لاین Vero قبل از تلقیح تکی زوئیت ها. B: سل لاین ماکروفاژ قبل از تلقیح تکی زوئیت ها. C: سل لاین Vero در روز چهارم بعد از تلقیح تکی زوئیت ها. D: سل لاین ماکروفاژ در روز چهارم بعد از تلقیح تکی زوئیت ها. در روز چهارم، تعداد تکی زوئیت های رها شده از ماکروفاژهای موش چند برابر تعداد تکی زوئیت های رها شده از سل لاین Vero بود.



تصویر شماره ۲- آلودگی تجربی با تکی زوئیت های Neospora caninum. A: گروه آزمایش V3. بافت قلب. حضور سلول های آماسی در بین باندل های عضلانی قلب (پیکان ها) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). B: گروه آزمایش V2. بافت کبد. نفوذ سلول های آماسی تک هسته ای (پیکان ها) در اطراف عروق کبد (رنگ آمیزی H&E).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]

بحث و نتیجه گیری

در حال حاضر از تکنیک کشت سلولی جهت جداسازی، تکثیر و تشخیص انگل Neospora caninum به صورت گسترده ای استفاده می شود(۹،۱۰). هم اکنون نئوسپورا بیشتر بر روی رده های سلولی از جمله سلول Vero (۱۱،۱۶)، فیبروبلاست های سگ و گربه(۱۷)، سلول های کلیه گربه(۱۷)، آستروسیت های موش صحرایی(۱۸)، MDBK و MDCK (۱۶) کشت داده می شود. از بین تمام سلول های نامبرده، سلول Vero متداول ترین رده سلولی استفاده شده جهت کشت Neospora caninum می باشد(۱۱،۱۲). اگر چه گاهی مواقع مشکلاتی در زمینه سرعت تکثیر انگل و تامین مواد مغذی مورد نیاز در محیط کشت سلولی آن مشاهده شده است، چرا که این سلول ها، سلول هایی چسبنده هستند. بنا بر این کشت در سل لاین های غیر چسبنده(کشت معلق) می تواند برای تولید زیادتری از تکی زوئیت های Neospora caninum مناسب باشد. نتیجه این مطالعه نشان داد که سل لاین ماکروفاژ موش، به عنوان کشت سلولی معلق، یک میزبان مناسب برای کشت Neospora caninum می باشد. در این مطالعه پاساژهای متوالی تکی زوئیت Neospora caninum در سل لاین های Vero و ماکروفاژ موش با موفقیت انجام شد.

در مطالعه حاضر، بالاترین بازده تکثیر تکی زوئیت ها از سل لاین ماکروفاژ موش به دست آمد که تقریباً ۲/۵ برابر تعداد تکی زوئیت های به دست آمده از سل لاین Vero بود. با توجه به این که تا به امروز سل لاین Vero به عنوان بهترین سل لاین استاندارد برای کشت، تکثیر تکی زوئیت های نئوسپورا و حتی تولید واکسن نئوسپورا معرفی شده است(۱۱،۱۲)، نتایج حاضر نشان می دهد که سل لاین ماکروفاژ در مقایسه با سایر رده های سلولی، سل لاین بسیار مناسبی برای نئوسپورا می باشد. در مطالعه ای که بر روی کشت مداوم Toxoplasma gondii انجام شد، عملکرد بهتری را از سل لاین های Hela و LLC نسبت به سل لاین Vero مشاهده شد(۱۹). در مطالعه دیگری تکی زوئیت های Toxoplasma gondii را به فلاسک های کشت سلولی حاوی سل لاین ماکروفاژ موش تلقیح شد، تکثیر سریع تکی زوئیت های Toxoplasma gondii را در ماکروفاژهای موش مشاهده شد که بعد از چهار روز با دوز تلقیح $۱۰^{۷}$، تعداد تکی زوئیت ها ۳۰۰ برابر شده بود(۲۰). در سال های اخیر در مطالعات مختلف به طور موفقیت آمیزی از سلول ماکروفاژ موش جهت تکثیر عوامل عفونی داخل سلولی استفاده شده است که از آن جمله می توان به Listeria monocytogenes(۲۱) و گونه های لیشمانیا(۲۲) اشاره کرد.

نتایج حاصل از این مطالعه، تخفیف حدت تکی زوئیت های Neospora caninum در طی پاساژهای متوالی آن در سل لاین ماکروفاژ موش نشان داد. در گروه Vero مرگ و میر ۱۰۰ درصد به همراه ضایعات پاتولوژیکی شدید وجود داشت، در حالی که در گروه ماکروفاژ موش مرگ و میر ۱۰ درصد و ضایعات پاتولوژیک بسیار خفیف مشاهده شد. این تفاوت قابل ملاحظه در میزان مرگ و میر و ضایعات پاتولوژیک حاصل از دو سل لاین، به طور واضح تاثیر سلول میزبان روی تخفیف حدت Neospora caninum را نشان می دهد. این نتایج نشان می دهد که کاهش حدت تکی زوئیت های Neospora caninum طی پاساژ های متوالی در کشت سلولی در سل لاین ماکروفاژ موش امکان پذیر است.

اخیراً تخم مرغ جنین دار به عنوان مدل مناسبی در مطالعه تجربی عفونت زایی Neospora caninum و هم چنین بررسی حدت تکی زوئیت های Neospora caninum(۲۳) استفاده شده است. از این رو در این مطالعه از تخم مرغ جنین دار برای بررسی حدت تکی زوئیت های Neospora caninum استفاده شد. نتایج بررسی ضایعات ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک در بافت های مورد آزمایش جنین های تخم مرغ در این مطالعه مشابه مطالعات قبلی شامل هپاتیت و میوکاردیت غیرچرکی تک هسته ای و وابسته به دوز تلقیح بود(۲۳،۲۴).

در مطالعه حاضر علاوه بر پاساژهای متوالی، برای اولین بار اثر نوع سلول میزبان نیز بر تخفیف حدت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]

Neospora caninum در سل لاین ماکروفاژ موش بررسی شد که از این سل لاین برای تکثیر طیف وسیعی از عوامل عفونی داخل سلولی از جمله Brucella abortus(۱۴) و Cryptococcus neooformans(۱۳) استفاده شده است. پژوهش های قبلی از بین رفتن داخل سلولی Listeria monocytogenes در سل لاین ماکروفاژ موش توضیح داده است(۲۵). ماکروفاژها، نقش کلیدی را در مکانیسم دفاعی سیستم ایمنی ایفا می کند، بنا بر این، تعجب آور نیست پاساژ متوالی تکی زوئیت های Neospora caninum منجر به تضعیف حدت این تک یاخته شود.

به طور خلاصه نتایج این مطالعه، کشت و تکثیر موفقیت آمیز Neospora caninum بر روی سل لاین معلق ماکروفاژ موش را نشان داد که می تواند با سهولت بیشتر، باعث کاهش چشم گیر هزینه و زمان در تولید انبوه تکی زوئیت در جهت انجام مطالعات تجربی و هم چنین تولید واکسن گردد.

سپاسگزاری

نویسنده مقاله از دانشکده دام پزشکی دانشگاه تبریز و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز به دلیل حمایت مالی و همکاری علمی کمال تشکر را دارد.

References

1.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 2015; 4: 216-38.

2.Kul O, Atmaca HT, Anteplioglu T, Ocal N, Canpolat S. Neospora caninum: The First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. J Comp Pathol 2015; 153: 9-13.

3.Kamali A, Seifi H, Movassaghi AR, Razmi GR, Naseri Z. Histopathological and molecular study of Neospora caninum infection in bovine aborted fetuses. Asian Pac J Trop Biomed 2014; 4:990-994.

4.Salehi N, Haddadzadeh H, Ashrafihelan J, Shayan P, Sadrebazzaz A. Molecular and pathological study of bovine aboarted fetuses and placenta from Neospora caninum infected dairy cattle. Iran. J Parasitol 2009; 4: 40-51.

5.Youssefi MR, Arabkhazaeli F, Hassan ATM. Seroprevalence of Neospora caninum infection in rural and industrial cattle in northern Iran. Iran. J Parasitol 2009; 4: 20-3.

6.Yakhchali M, Javadi S, Morshedi A. Prevalence of antibodies to Neospora caninum in stray dogs of Urmia, Iran. Parasitol Res 2010; 106: 1455-8.

7.Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Guy F, McGarry JW, McKay JS, Trees AJ. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent Neospora caninum infection. Int J Parasitol 2003; 33: 1059-65.

8.Bartley PM, Wright S, Sales J, Chianini F, Buxton D, Innes EA. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of Neospora caninum in vivo. Parasitol 2006; 133:421-32.

9.Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Pathol 2006; 134:267-89.

10.Reichel MP, Ellis JT, Dubey JP. Neosporosis and hammondiosis in dogs. J Small Anim Pract 2007; 48: 308-12.

11.Kang SW, Kweon CH, Lee EH, Choe SE, Jung SC, Quyen DV. The differentiation of transcription between tachyzoites and bradyzoites of in vitro cultured Neospora caninum. Parasitol Res 2008; 103: 1011–1018.

12.Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A, Keller N, Riesen M, Guetg N, Srinivasan S and Alaeddine F. Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing Neospora caninum and its interactions with the host cell. Microsc Microanal 2004; 10: 602-20.

13.Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. J Exp Med 1992; 175: 1111-22.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]

14.Jiang X, Leonard B, Benson R, Baldwin CL. Macrophage control of Brucella abortus: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. Cell Immunol 1993; 151: 309-19.
15.Naslund PK, Miller WC, Granger DL. Cryptococcus neoformans fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. Infect Immun 1995; 63: 1298-304.
16.Cadore CC, Vogel FS, Flores EF, Sangioni LA, Camillo G. Susceptibility of cell lines and primary cell cultures to Neospora caninum. Ciencia Rural Santa Maria 2009; 39: 1581-5.
17.Lei Y, Davey M, Ellis JT. Attachment and invasion of Toxoplasma gondii and Neospora caninum to epithelial and fibroblast cell lines in vitro. Parasitology 2005; 131: 583-90.
18.Pinheiro AM, Costa SL, Freire SM, Almeida MA, Tardy M, El Bachá R, Costa MF. Astroglial cells in primary culture a valid model to study Neospora caninum infection in the CNS. Vet Immunol Immunopathol 2006; 113: 243–247.
19.Evans R, Chatterton JMW, Ashburn D, Joss AWL, Yen DO. Cell culture system for continuous production of Toxoplasma gondii tachyzoites. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 879-84.
20.Chamberland S, Current LW. Use of mouse macrophage cell lines for in vitro propagation of Toxoplasma gondii RH tachyzoites. 1990 Soc Exp Biol Med 150-157.
21.Donaldson JR, Nanduri B, Pittman JR, Givaruangsawat S, Burgess SC, Lawrence ML. Proteomic expression profiles of virulent and avirulent strains of Listeria monocytogenes isolated from macrophages. J Proteomics 2011; 74 :1906-17.
22.Sharief AH, Gasimkhalil EA, Omer SA, Abdalla HS. Innovative serum-free medium for in vitro cultivation of promastigote forms of Leishmania species. Int J Parasitol 2008; 57: 138-42.
23.Namavari M, Mansourian M, Khodakaram Tafti A, Hosseini MH, Rahimiyan A, Khordadmehr M, and Lotfi M. Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of Neospora caninum tachyzoites. Comp Clin Pathol 2011; 1346-9.
24.Furuta PI, Mineo TWP, Carrasco AOT, Godoy GS, Pinto AA, Machado RZ. Neospora caninum infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. Parasitol 2007; 34: 1931-39.
25.Inoue S, ItagAaki SI, Amano F. Intracellular killing of Listeria monocytogenes in the J774.1 macrophage-like cell line and the lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant LPS1916 cell line defective in the generation of reactive oxygen intermediates after LPS treatment. Infect Immun 1995; 63: 1876-86.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]

An evaluation of Neospora caninum Tachyzoites Cultivation in Attachment (Vero) and Suspension (Mouse macrophage) Cell Lines

*Khordadmehr M[1]**

(Received: September 17, 2017 Accepted: January 8, 2018)

Abstract

Introduction: Neospora caninum is an intracellular protozoan considered as a serious disease agent in cattle and dogs. In the present study, N. caninum tachyzoites were cultivated in mouse macrophage cell line and Vero cell line.

Materials & Methods: The number of harvested tachyzoites was recorded daily. After parasite propagation and continuous passages, chicken embryonated eggs were used for comparison of tachyzoites attenuation. Mortality rate was recorded daily and the tissue samples of brain, liver, and heart were taken for histopathological examination.

Findings: Mortality rate in embryonated eggs inoculated with N. caninum harvested from Vero and mouse macrophage cell line was 100% and 10%, respectively, which was dose-dependent. Microscopically, there were milder hepatitis and myocarditis in the liver and heart of chickens inoculated with N. caninum harvested from mouse macrophage cell line.

Discussion & Conclusions: The present findings showed that cultivation of N. caninum tachyzoites in macrophage cell line increased propagation of tachyzoites and also reduced attenuation of the parasite. These results suggested the suitable cell line for mass production of N. caninum tachyzoites for various experimental researches and also producing live attenuated vaccine.

Keywords: Cell culture, Attenuation, Embryonated egg, Histopathology

1.Dept of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Tabriz University, Tabriz, Iran
** Correspondin author Email:khordadmehr@tabrizu.ac.ir*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.6.141]