

## مطالعه کاهش حدت نئوسپورا کانینوم بعد از پاساژهای متوالی روی رده سلولی J774

• پربا بیگی

گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

• مهدی نام آوری (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

• نعمت‌الله رزمی

گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

تاریخ دریافت: فروردین ۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۵

Email: namavari@yahoo.com



### چکیده

هدف از این مطالعه، ایجاد تخفیف حدت در تک یاخته‌ی نئوسپورا کانینوم (*Neospora caninum*) از طریق پاساژ متوالی روی رده سلولی J774 و ارزیابی میزان حدت آن در موش BALB/c بود. ایزوله شماره یک نئوسپورا کانینوم بر روی رده سلولی J774، ۹۰ مرتبه پاساژ داده شد تا سوش تخفیف حدت یافته تولید شود؛ سپس ۳۵ سر موش BALB/c ماده با متوسط سن شش تا هشت هفته به صورت تصادفی به هفت گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. به گروه اول به عنوان شاهد فقط محیط کشت، به گروه دوم و سوم و چهارم سوش حاد Nc1 با دوزهای  $5 \times 10^6$ ،  $10 \times 10^6$  و  $20 \times 10^6$  و به گروه پنجم، ششم و هفتم سوش تخفیف حدت یافته Nc1 با دوزهای  $5 \times 10^6$ ،  $10 \times 10^6$  و  $20 \times 10^6$  به صورت زیر جلدی تزریق شد. تمامی موش‌ها به صورت روزانه بررسی و نشانه‌های بیماری و تلفات احتمالی موش‌ها ثبت گردید. در این مطالعه ایمنی سلولی با آزمایش جلدی و ایمنی هومورال با آزمایش الایزا بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد موش‌هایی که سوش تخفیف حدت یافته را دریافت کرده بودند، نه تنها تلف نشدند بلکه علائم بیماری را نیز نشان ندادند. به علاوه پاسخ ایمنی هومورال و سلولی نیز در آن‌ها نسبت به گروه‌های دریافت کننده سوش حاد به طور معنی داری بالاتر بود. در جمع بندی نهایی این مطالعه نشان داد که با استفاده از رده سلولی J774 که یک سلول دفاعی می‌باشد، می‌توان به طور معنی داری بیماری‌زایی سوش حاد Nc1 را کاهش داد؛ لذا این روش می‌تواند روش مناسبی برای تحقیقات آتی در راستای دستیابی به واکسن زنده تخفیف حدت یافته باشد.

کلمات کلیدی: نئوسپورا کانینوم، BALB/c، J774

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 128-135

Study on the attenuation of *Neospora caninum* after continuous passage on J774 cell line

By: Beigi, P., Group Bioshimi, Islamic Azad University, Shiraz Branch. Namavari, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran. and Razmi, N., Biochemistry Group, Islamic Azad University Branch Shiraz.

Email: namavari@yahoo.com

Received: 2016-04-19 Accepted: 2016-06-07

The aim of this study was to establish attenuated *Neospora caninum* (NC-1) tachyzoites through serial passage by J774 cell line. The virulence of attenuated tachyzoites for Balb/c mice was also evaluated. The NC-1 isolates were passaged 90 times in J774 cell line to produce a high-passage or attenuated strain. A total of 35 female BALB/c mice with an average age of six to eight weeks were randomly separated into seven groups. The first group as a control was inoculated subcutaneously with cell culture media and the second, third and fourth groups received low passage or acute NC-1 strain with different doses ( $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ) of tachyzoites. The other three groups were inoculated with high-passage of NC-1 tachyzoites with similar doses. The mortality rate and pathological changes in all groups were noted daily. The cellular and humoral immunity were assessed by Skin test and ELISA, respectively. The results of the present study showed that the groups that received high-passage strain of Nc1 not only survived, but did not show pathological changes of neosporosis. In addition, cellular and humoral immune responses to NC-1 were significantly higher in mice that received high-passage tachyzoites of NC-1. These findings indicated that the serial passages of NC-1 in J774 cell line significantly led to decrease the virulence of NC-1. This attenuated tachyzoite could be used as a candidate for further research to develop live vaccines against *Neospora caninum*.

Key words: *Neospora caninum*, J774, Balb/c

#### مقدمه

تک یاخته نئوسپورا کانینوم عامل نئوسپوروزیس (Neosporosis) است، این انگل داخل سلولی اجباری از شاخه‌ی اپی کمپلکسا می‌باشد. عفونت نئوسپوروزیس انتشار جهانی داشته و باعث آلودگی میزبان‌های مختلف از جمله گاو، گوسفند، بز، گوزن، اسب، سگ، گربه و موش می‌گردد و همچنین ضررهای اقتصادی قابل توجهی را با سقط جنین، مرده زائی و تولد گوساله ضعیف باعث می‌گردد (۱۹). عفونت نئوسپوروزیس به عنوان یک بیماری مهم اقتصادی در صنعت دامپروری شناخته شده است (۵). با توجه به طبیعت داخل سلولی انگل پاسخ‌های ایمنی سلولی نقش مهمی جهت محافظت میزبان علیه انگل دارند (۱۴). چند روش برای کنترل بیماری ناشی از نئوسپورا کانینوم وجود دارد که شامل حذف جانور آلوده از گله و یا جلوگیری از جفت‌گیری آن، درمان‌های آنتی بیوتیکی و واکسیناسیون می‌باشد. از آنجا که دیگر راه‌های کنترل بیماری بسیار هزینه بردار می‌باشد، استفاده از واکسیناسیون بهترین روش جهت کنترل این آلودگی است (۴). خرداد مهر و همکاران (۲۰۱۳) برای اولین بار تأثیر چشمگیر رده سلولی J774 را در تخفیف حدت نئوسپورا کانینوم با استفاده از تخم مرغ جنین دار به عنوان حیوان مدل آزمایشگاهی نشان دادند، به طوری که بعد

از سه ماه پاساژ متوالی نئوسپورا کانینوم روی رده سلولی J774، تلفات در گروه‌های دریافت کننده سوش تخفیف حدت یافته در مقایسه با گروه‌های سوش حاد به شدت کاهش یافته بود. از آنجایی که در حال حاضر بیشترین امید برای دستیابی به واکسن نئوسپورا کانینوم در تهیه‌ی سوش زنده غیربیماری‌زا است (۱۳)، هدف از این بررسی تکمیل مطالعه خرداد مهر و همکاران بود، چرا که در مطالعه آن‌ها نئوسپورا کانینوم به مدت سه ماه پاساژ داده شده بود و گرچه میزان کاهش حدت تک یاخته مذکور قابل ملاحظه بود ولی همچنان در روز  $10^4 \times 1/5$  موجب تلفات ده درصدی در تخم مرغ‌های جنین دار میشد، لذا در مطالعه حاضر ضمن افزایش مدت زمان پاساژ، بررسی بیماری‌زایی و ایمنی زایی سوش تخفیف حدت یافته در موش انجام گرفت، زیرا اگرچه تخم مرغ جنین یک مدل حیوانی نسبتاً مناسب برای ارزیابی حدت تک یاخته‌هایی مانند نئوسپورا کانینوم (۱۶)، توکسوپلازما (۲۱) و بسنوئیتیا (۱۸)، می‌باشد، ولی از لحاظ بررسی پاسخ ایمنی مدل مناسبی نیست. باید توجه داشت این احتمال وجود دارد که پاساژ طولانی مدت تک یاخته روی رده سلولی J774 می‌تواند علاوه بر حدت بر روی توانایی ایجاد پاسخ ایمنی نیز تأثیر بگذارد لذا انجام این مطالعه در موش کاملاً ضروری بود تا از قدرت ایمنی زایی سوش تخفیف

حدت یافته اطمینان حاصل شود.

### مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی J774 و Vero از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه شد. شرایط کشت هر دو سلول یکسان هست بدین صورت 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 و 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 ایزوله‌ی شماره یک نئوسپورا کانینوم (Nc1) موجود در موسسه رازی شیراز استفاده شد و طبق روش خرداد مهر و همکاران (۲۰۱۳)، اقدام به کشت و تخفیف حدت Nc1 روی رده‌ی سلولی J774 شد. بدین صورت که بعد از اضافه کردن تک یاخته، کشت به صورت روزانه مشاهده گردید و وقتی ۸۰ تا ۹۰ درصد تخریب سلولی مشاهده شد تاکی‌زونایت‌ها برداشت و در فلاسک جدید پاساژ داده شدند. این روند روی سلول J774 به مدت یک سال ادامه داشت و محصول نهایی به عنوان سوش تخفیف حدت یافته در نظر گرفته شد و سوش حد نیز طی چند بار پاساژ روی رده سلولی Vero به اندازه کافی جمع‌آوری گردید. تاکی‌زونایت‌های سوش حد و تخفیف حدت یافته‌ی نئوسپورا کانینوم پس از جمع‌آوری از روی سلول‌ها با لام ثوبار شمارش شدند تا دوزهای مورد نظر جهت تزریق آماده گردید.

در مرحله بعد ۳۵ سر موش BALB/c ماده شش تا هشت هفته به صورت تصادفی به هفت گروه پنج تایی تقسیم شدند. هر گروه در قفس‌های جداگانه قرار داده شد و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند. از غذای تولیدی موسسه رازی و آب تصفیه شده برای تغذیه استفاده گردید. به گروه اول به عنوان کنترل محیط کشت سلولی به میزان ۵۰۰ میکرولیتر،

به گروه دوم و سوم و چهارم سوش حد Nc1 با دوزهای  $10^6 \times 10^6 \times 10^6$  و  $20 \times 10^6$  و به گروه پنجم، ششم و هفتم سوش تخفیف حدت یافته Nc1 با دوزهای  $10^6 \times 10^6 \times 10^6$  و  $5 \times 10^6$  و  $20 \times 10^6$  به صورت زیر جلدی تلقیح شد. تمامی موش‌ها به صورت روزانه بررسی و نشانه‌های بیماری و تلفات احتمالی موش‌ها ثبت می‌گردید. بیست و یک روز بعد از تزریق از تمامی موش‌های زنده مانده جهت انجام آزمایش الایزا خون‌گیری شد و سپس سرم آنها جدا شد. آزمایش الایزا بر اساس روشی که ویلیامز و همکاران (۱۹۹۷) ارائه کردند، انجام گرفت (۲۳). در این روش از  $2 \times 10^6$  تاکی‌زونایت نئوسپورا کانینوم کشته و تثبیت‌شده توسط فرمالین در هر چاهک پلیت الایزا به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد و سرم‌ها نیز با رقت ۱/۵۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

در انتهای هفته‌ی چهارم آزمون جلدی جهت بررسی ایمنی سلولی انجام گرفت (۱۸). برای آزمایش جلدی ابتدا به کف پای راست هر موش تاکی‌زونایت‌های تثبیت‌شده نئوسپورا با فرمالین به میزان  $10 \times 10^6$  در حجم ۵۰ میکرولیتر PBS به صورت زیر جلدی تلقیح شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان تغییر ضخامت در مقایسه با پای چپ موش‌ها که با ۵۰ میکرولیتر PBS تلقیح شده بودند، توسط کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر تعیین و ثبت گردید.

### ارزیابی آماری

آنالیز نتایج الایزا و آزمایش جلدی با روش آماری t test و از طریق سایت آماری Graph Pad انجام شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

#### نتایج تغییرات موش‌ها بعد از تزریق

۱- موش‌های گروه شاهد-گروه اول که فقط محیط کشت را به روش

جدول ۱- میزان تلفات گروه‌های مختلف موش‌ها پس از تزریق سوش حد و سوش تخفیف حدت یافته نئوسپورا کانینوم (گروه‌های پنج تایی).

جمع کل	تلفات بعد از تزریق (روز)			دوز تزریق ( $10^6 \times$ )
	۱۸	۱۴	۱۰	
۱	۱	۰	۰	۵ (سوش حد Nc1)
۵	۰	۳	۲	۱۰ (سوش حد Nc1)
۵	۰	۰	۵	۲۰ (سوش حد Nc1)
۰	۰	۰	۰	۵ (سوش تخفیف حدت یافته Nc1)
۰	۰	۰	۰	۱۰ (سوش تخفیف حدت یافته Nc1)
۰	۰	۰	۰	۲۰ (سوش تخفیف حدت یافته Nc1)
۰	۰	۰	۰	شاهد

شده بود، نه تنها تلفاتی نداشتند بلکه هیچ یک از علائم بیماری را نیز مانند چرخش به دور خود، ژولیده شدن مو و بی حالی نشان ندادند؛ لذا همگی همراه با موش‌های مانده از سایر گروه‌ها در آخرین مرحله یعنی یک ماه بعد از تزریق آسان کشی شدند.

### نتایج آزمایش الایزا

در انتهای هفته ی سوم آزمون الایزا جهت بررسی پاسخ ایمنی و تعیین تیتراژ آنتی بادی علیه نئوسپورا کانینوم انجام شد. از سه گروهی که سوش حاد را دریافت کرده بودند تنها گروهی که کمترین دوز رادیافت کرده بود، زنده ماند. لذا تنها نتایج آزمایش سرمی الایزای این گروه قابل انجام بود. نتایج آزمایش سرمی الایزا نشان دهنده ی تفاوت کاملاً معنی دار در تیتراژ آنتی بادی گروه‌های دریافت کننده ی تاکیزوئایت نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت یافته نسبت به گروه شاهد بود (جدول ۲) ( $p < 0/0001$ ). همچنین گروهی که دوز  $10 \times 10^6$  تاکیزوئایت نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت یافته دریافت کرده بود، میانگین جذب نوری بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها داشت، که نشانه‌ی بالا بودن میزان تیتراژ آنتی بادی در پاسخ به آنتی‌ژن در این گروه می‌باشد (شکل ۲).

زیر جلدی دریافت کرده بودند تا مرحله‌ی آخر آزمایش یعنی یک ماه بعد از تزریق زنده و سالم ماندند.

۲- موش‌های تلقیح شده با سوش حاد نئوسپورا کانینوم - در گروه دوم که تاکیزوئایت نئوسپورا کانینوم حاد با دوز  $5 \times 10^6$  دریافت کرده بودند، یک موش در روز هجدهم بعد از تلقیح تلف شد، یک موش نیز در انتهای هفته سوم علائم بیماری عصبی مانند چرخش به دور خود داشت و مابقی موش‌ها هیچ علامتی از خود نشان ندادند. در گروه سوم که تاکیزوئایت نئوسپورا کانینوم حاد با دوز  $10 \times 10^6$  دریافت کرده بودند، دو موش در روز دهم بعد از تلقیح تلف شدند و پیش از تلف شدن علائم بیماری مانند چرخش به دور خود، ژولیده شدن مو و بی حالی را نشان دادند (شکل ۱). سه موش دیگر در روز چهاردهم بعد از تلقیح تلف شدند. در گروه چهارم که تاکیزوئایت نئوسپورا کانینوم حاد با دوز  $20 \times 10^6$  را دریافت کرده بودند، همه‌ی موش‌ها تا انتهای روز دهم بعد از تلقیح تلف شدند. میزان تلفات در گروه‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.

۳- موش‌های تلقیح شده با سوش تخفیف حدت یافته نئوسپورا کانینوم - گروه پنجم، ششم و هفتم که تاکیزوئایت نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت یافته با دوزهای  $10^6 \times 10^6$ ،  $5 \times 10^6$  و  $20 \times 10^6$  به آن‌ها تلقیح



شکل ۱- ژولیده شدن مو و بی حالی در موش آلوده به نئوسپورا

دادند. تاکنون بارها تخفیف حدت تک یاخته‌های بیماری‌زا از طریق پاساژ دادن متوالی اثبات شده است، به طوریکه حتی برخی از واکسن‌های تجاری موجود در بازار نیز بر همین اساس تولید شده است (۷ و ۲۴). در مطالعه‌ی بارتلی و همکاران (۲۰۰۶)، اثر تخفیف حدت تاکی‌زونایت نئوسپورا کانینوم طی پاساژهای متوالی در کشت سلولی Vero و تلقیح به موش مشاهده شده است (۱). مطالعه‌ی دیگری که توسط نام آوری و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، نشان داده شد پاساژ متوالی نئوسپورا بر روی رده سلولی Vero باعث کاهش این تک یاخته در تخم مرغ‌های جنین دار می‌شود (۱۶).

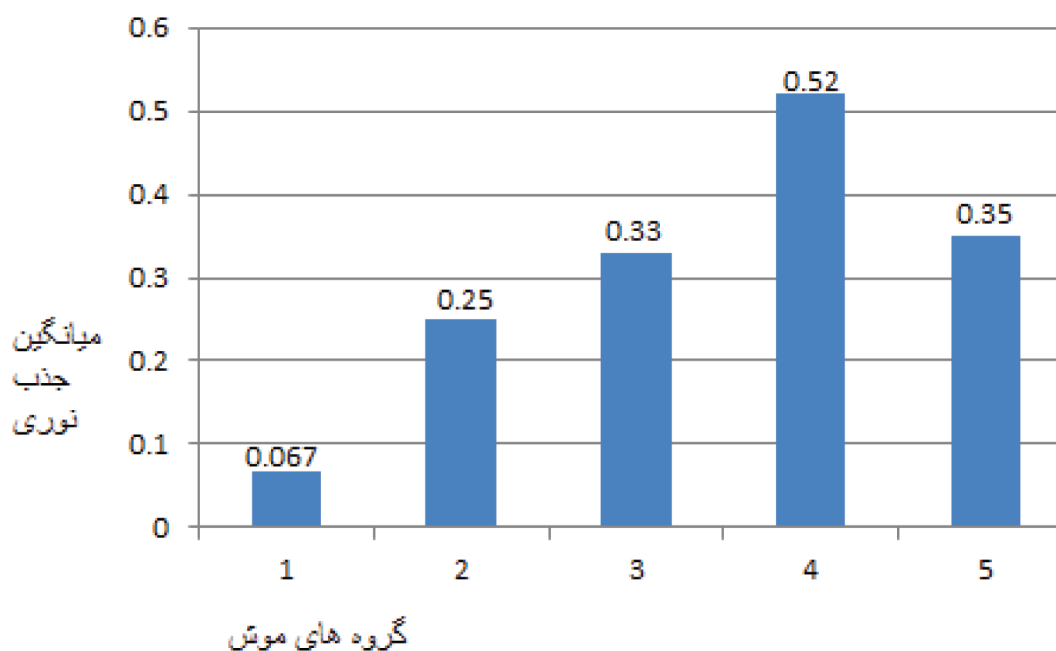
در این مطالعه از رده سلولی J774 جهت تخفیف حدت استفاده شد. نتایج این مطالعه با نتایج خردادمهر و همکاران (۲۰۱۳)، هم‌خوانی داشت و نشان داد که این وارپته پاسخ ایمنی را نیز در موش‌های مورد مطالعه تحریک می‌کند، به طوریکه پاسخ ایمنی هومورال و ایمنی سلولی (آزمایش جلدی) به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و حتی گروه دریافت کننده سوش حاد نیز بالاتر بود. نتایج این مطالعه در زمینه‌ی ایجاد ایمنی هومورال مطلوب، با بسیاری از مطالعاتی که در این زمینه در مدل‌های موش برای تولید ایمنی علیه آلودگی نئوسپوروسیس با استفاده از تک یاخته‌ی زنده انجام گرفته مطابقت دارد. از این موارد می‌توان به سوش تخفیف حدت یافته نئوسپورا کانینوم با پاساژ طولانی مدت (۲)، دوز تحت کشنده ایزوله حاد نئوسپورا کانینوم (۱۱)، ایزوله جهش یافته حساس به حرارت (۲۰)، و

## نتایج آزمایش جلدی

در این مطالعه ایمنی سلولی (آزمایش جلدی) در موش‌های آلوده شده با نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت یافته مشاهده شد به طوری که پس از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌داری در کف پای موش‌های گروه تخفیف حدت یافته با دوز  $10 \times 10^6$  در مقایسه با گروه شاهد دیده شد ( $p < 0/0001$ ). (جدول ۳ و شکل ۳).

## بحث

تمایز و هدف اصلی این پژوهش نسبت به مطالعه خردادمهر و همکاران (۲۰۱۳) این بود که نشان دهد پاساژهای متوالی نئوسپورا کانینوم روی رده سلولی J774 ضمن کاهش حدت تک یاخته نئوسپورا کانینوم قدرت ایمنی‌زایی آن را نیز حفظ می‌کند. امکان بررسی این نکته در مطالعه قبلی به دلیل استفاده از تخم مرغ جنین دار نبوده است. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که پاساژهای متوالی نئوسپورا کانینوم روی رده سلولی J774 باعث کاهش بیماری‌زایی و تخفیف حدت تاکی‌زونایت می‌شود به طوری که هر سه گروه موش که سوش تخفیف حدت یافته را دریافت کرده بودند، سالم و زنده ماندند. برخلاف آن، موش‌های گروه‌های دریافت کننده سوش حاد همگی تلف شدند و یک گروه نیز تلفات و علائم بیماری را نشان



شکل ۲- میانگین جذب نوری در آزمایش‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۷، ۴۸، ۴۹، ۵۰، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۴، ۵۵، ۵۶، ۵۷، ۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱، ۶۲، ۶۳، ۶۴، ۶۵، ۶۶، ۶۷، ۶۸، ۶۹، ۷۰، ۷۱، ۷۲، ۷۳، ۷۴، ۷۵، ۷۶، ۷۷، ۷۸، ۷۹، ۸۰، ۸۱، ۸۲، ۸۳، ۸۴، ۸۵، ۸۶، ۸۷، ۸۸، ۸۹، ۹۰، ۹۱، ۹۲، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۹۶، ۹۷، ۹۸، ۹۹، ۱۰۰، ۱۰۱، ۱۰۲، ۱۰۳، ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۶، ۱۰۷، ۱۰۸، ۱۰۹، ۱۱۰، ۱۱۱، ۱۱۲، ۱۱۳، ۱۱۴، ۱۱۵، ۱۱۶، ۱۱۷، ۱۱۸، ۱۱۹، ۱۲۰، ۱۲۱، ۱۲۲، ۱۲۳، ۱۲۴، ۱۲۵، ۱۲۶، ۱۲۷، ۱۲۸، ۱۲۹، ۱۳۰، ۱۳۱، ۱۳۲، ۱۳۳، ۱۳۴، ۱۳۵، ۱۳۶، ۱۳۷، ۱۳۸، ۱۳۹، ۱۴۰، ۱۴۱، ۱۴۲، ۱۴۳، ۱۴۴، ۱۴۵، ۱۴۶، ۱۴۷، ۱۴۸، ۱۴۹، ۱۵۰، ۱۵۱، ۱۵۲، ۱۵۳، ۱۵۴، ۱۵۵، ۱۵۶، ۱۵۷، ۱۵۸، ۱۵۹، ۱۶۰، ۱۶۱، ۱۶۲، ۱۶۳، ۱۶۴، ۱۶۵، ۱۶۶، ۱۶۷، ۱۶۸، ۱۶۹، ۱۷۰، ۱۷۱، ۱۷۲، ۱۷۳، ۱۷۴، ۱۷۵، ۱۷۶، ۱۷۷، ۱۷۸، ۱۷۹، ۱۸۰، ۱۸۱، ۱۸۲، ۱۸۳، ۱۸۴، ۱۸۵، ۱۸۶، ۱۸۷، ۱۸۸، ۱۸۹، ۱۹۰، ۱۹۱، ۱۹۲، ۱۹۳، ۱۹۴، ۱۹۵، ۱۹۶، ۱۹۷، ۱۹۸، ۱۹۹، ۲۰۰، ۲۰۱، ۲۰۲، ۲۰۳، ۲۰۴، ۲۰۵، ۲۰۶، ۲۰۷، ۲۰۸، ۲۰۹، ۲۱۰، ۲۱۱، ۲۱۲، ۲۱۳، ۲۱۴، ۲۱۵، ۲۱۶، ۲۱۷، ۲۱۸، ۲۱۹، ۲۲۰، ۲۲۱، ۲۲۲، ۲۲۳، ۲۲۴، ۲۲۵، ۲۲۶، ۲۲۷، ۲۲۸، ۲۲۹، ۲۳۰، ۲۳۱، ۲۳۲، ۲۳۳، ۲۳۴، ۲۳۵، ۲۳۶، ۲۳۷، ۲۳۸، ۲۳۹، ۲۴۰، ۲۴۱، ۲۴۲، ۲۴۳، ۲۴۴، ۲۴۵، ۲۴۶، ۲۴۷، ۲۴۸، ۲۴۹، ۲۵۰، ۲۵۱، ۲۵۲، ۲۵۳، ۲۵۴، ۲۵۵، ۲۵۶، ۲۵۷، ۲۵۸، ۲۵۹، ۲۶۰، ۲۶۱، ۲۶۲، ۲۶۳، ۲۶۴، ۲۶۵، ۲۶۶، ۲۶۷، ۲۶۸، ۲۶۹، ۲۷۰، ۲۷۱، ۲۷۲، ۲۷۳، ۲۷۴، ۲۷۵، ۲۷۶، ۲۷۷، ۲۷۸، ۲۷۹، ۲۸۰، ۲۸۱، ۲۸۲، ۲۸۳، ۲۸۴، ۲۸۵، ۲۸۶، ۲۸۷، ۲۸۸، ۲۸۹، ۲۹۰، ۲۹۱، ۲۹۲، ۲۹۳، ۲۹۴، ۲۹۵، ۲۹۶، ۲۹۷، ۲۹۸، ۲۹۹، ۳۰۰، ۳۰۱، ۳۰۲، ۳۰۳، ۳۰۴، ۳۰۵، ۳۰۶، ۳۰۷، ۳۰۸، ۳۰۹، ۳۱۰، ۳۱۱، ۳۱۲، ۳۱۳، ۳۱۴، ۳۱۵، ۳۱۶، ۳۱۷، ۳۱۸، ۳۱۹، ۳۲۰، ۳۲۱، ۳۲۲، ۳۲۳، ۳۲۴، ۳۲۵، ۳۲۶، ۳۲۷، ۳۲۸، ۳۲۹، ۳۳۰، ۳۳۱، ۳۳۲، ۳۳۳، ۳۳۴، ۳۳۵، ۳۳۶، ۳۳۷، ۳۳۸، ۳۳۹، ۳۴۰، ۳۴۱، ۳۴۲، ۳۴۳، ۳۴۴، ۳۴۵، ۳۴۶، ۳۴۷، ۳۴۸، ۳۴۹، ۳۵۰، ۳۵۱، ۳۵۲، ۳۵۳، ۳۵۴، ۳۵۵، ۳۵۶، ۳۵۷، ۳۵۸، ۳۵۹، ۳۶۰، ۳۶۱، ۳۶۲، ۳۶۳، ۳۶۴، ۳۶۵، ۳۶۶، ۳۶۷، ۳۶۸، ۳۶۹، ۳۷۰، ۳۷۱، ۳۷۲، ۳۷۳، ۳۷۴، ۳۷۵، ۳۷۶، ۳۷۷، ۳۷۸، ۳۷۹، ۳۸۰، ۳۸۱، ۳۸۲، ۳۸۳، ۳۸۴، ۳۸۵، ۳۸۶، ۳۸۷، ۳۸۸، ۳۸۹، ۳۹۰، ۳۹۱، ۳۹۲، ۳۹۳، ۳۹۴، ۳۹۵، ۳۹۶، ۳۹۷، ۳۹۸، ۳۹۹، ۴۰۰، ۴۰۱، ۴۰۲، ۴۰۳، ۴۰۴، ۴۰۵، ۴۰۶، ۴۰۷، ۴۰۸، ۴۰۹، ۴۱۰، ۴۱۱، ۴۱۲، ۴۱۳، ۴۱۴، ۴۱۵، ۴۱۶، ۴۱۷، ۴۱۸، ۴۱۹، ۴۲۰، ۴۲۱، ۴۲۲، ۴۲۳، ۴۲۴، ۴۲۵، ۴۲۶، ۴۲۷، ۴۲۸، ۴۲۹، ۴۳۰، ۴۳۱، ۴۳۲، ۴۳۳، ۴۳۴، ۴۳۵، ۴۳۶، ۴۳۷، ۴۳۸، ۴۳۹، ۴۴۰، ۴۴۱، ۴۴۲، ۴۴۳، ۴۴۴، ۴۴۵، ۴۴۶، ۴۴۷، ۴۴۸، ۴۴۹، ۴۵۰، ۴۵۱، ۴۵۲، ۴۵۳، ۴۵۴، ۴۵۵، ۴۵۶، ۴۵۷، ۴۵۸، ۴۵۹، ۴۶۰، ۴۶۱، ۴۶۲، ۴۶۳، ۴۶۴، ۴۶۵، ۴۶۶، ۴۶۷، ۴۶۸، ۴۶۹، ۴۷۰، ۴۷۱، ۴۷۲، ۴۷۳، ۴۷۴، ۴۷۵، ۴۷۶، ۴۷۷، ۴۷۸، ۴۷۹، ۴۸۰، ۴۸۱، ۴۸۲، ۴۸۳، ۴۸۴، ۴۸۵، ۴۸۶، ۴۸۷، ۴۸۸، ۴۸۹، ۴۹۰، ۴۹۱، ۴۹۲، ۴۹۳، ۴۹۴، ۴۹۵، ۴۹۶، ۴۹۷، ۴۹۸، ۴۹۹، ۵۰۰، ۵۰۱، ۵۰۲، ۵۰۳، ۵۰۴، ۵۰۵، ۵۰۶، ۵۰۷، ۵۰۸، ۵۰۹، ۵۱۰، ۵۱۱، ۵۱۲، ۵۱۳، ۵۱۴، ۵۱۵، ۵۱۶، ۵۱۷، ۵۱۸، ۵۱۹، ۵۲۰، ۵۲۱، ۵۲۲، ۵۲۳، ۵۲۴، ۵۲۵، ۵۲۶، ۵۲۷، ۵۲۸، ۵۲۹، ۵۳۰، ۵۳۱، ۵۳۲، ۵۳۳، ۵۳۴، ۵۳۵، ۵۳۶، ۵۳۷، ۵۳۸، ۵۳۹، ۵۴۰، ۵۴۱، ۵۴۲، ۵۴۳، ۵۴۴، ۵۴۵، ۵۴۶، ۵۴۷، ۵۴۸، ۵۴۹، ۵۵۰، ۵۵۱، ۵۵۲، ۵۵۳، ۵۵۴، ۵۵۵، ۵۵۶، ۵۵۷، ۵۵۸، ۵۵۹، ۵۶۰، ۵۶۱، ۵۶۲، ۵۶۳، ۵۶۴، ۵۶۵، ۵۶۶، ۵۶۷، ۵۶۸، ۵۶۹، ۵۷۰، ۵۷۱، ۵۷۲، ۵۷۳، ۵۷۴، ۵۷۵، ۵۷۶، ۵۷۷، ۵۷۸، ۵۷۹، ۵۸۰، ۵۸۱، ۵۸۲، ۵۸۳، ۵۸۴، ۵۸۵، ۵۸۶، ۵۸۷، ۵۸۸، ۵۸۹، ۵۹۰، ۵۹۱، ۵۹۲، ۵۹۳، ۵۹۴، ۵۹۵، ۵۹۶، ۵۹۷، ۵۹۸، ۵۹۹، ۶۰۰، ۶۰۱، ۶۰۲، ۶۰۳، ۶۰۴، ۶۰۵، ۶۰۶، ۶۰۷، ۶۰۸، ۶۰۹، ۶۱۰، ۶۱۱، ۶۱۲، ۶۱۳، ۶۱۴، ۶۱۵، ۶۱۶، ۶۱۷، ۶۱۸، ۶۱۹، ۶۲۰، ۶۲۱، ۶۲۲، ۶۲۳، ۶۲۴، ۶۲۵، ۶۲۶، ۶۲۷، ۶۲۸، ۶۲۹، ۶۳۰، ۶۳۱، ۶۳۲، ۶۳۳، ۶۳۴، ۶۳۵، ۶۳۶، ۶۳۷، ۶۳۸، ۶۳۹، ۶۴۰، ۶۴۱، ۶۴۲، ۶۴۳، ۶۴۴، ۶۴۵، ۶۴۶، ۶۴۷، ۶۴۸، ۶۴۹، ۶۵۰، ۶۵۱، ۶۵۲، ۶۵۳، ۶۵۴، ۶۵۵، ۶۵۶، ۶۵۷، ۶۵۸، ۶۵۹، ۶۶۰، ۶۶۱، ۶۶۲، ۶۶۳، ۶۶۴، ۶۶۵، ۶۶۶، ۶۶۷، ۶۶۸، ۶۶۹، ۶۷۰، ۶۷۱، ۶۷۲، ۶۷۳، ۶۷۴، ۶۷۵، ۶۷۶، ۶۷۷، ۶۷۸، ۶۷۹، ۶۸۰، ۶۸۱، ۶۸۲، ۶۸۳، ۶۸۴، ۶۸۵، ۶۸۶، ۶۸۷، ۶۸۸، ۶۸۹، ۶۹۰، ۶۹۱، ۶۹۲، ۶۹۳، ۶۹۴، ۶۹۵، ۶۹۶، ۶۹۷، ۶۹۸، ۶۹۹، ۷۰۰، ۷۰۱، ۷۰۲، ۷۰۳، ۷۰۴، ۷۰۵، ۷۰۶، ۷۰۷، ۷۰۸، ۷۰۹، ۷۱۰، ۷۱۱، ۷۱۲، ۷۱۳، ۷۱۴، ۷۱۵، ۷۱۶، ۷۱۷، ۷۱۸، ۷۱۹، ۷۲۰، ۷۲۱، ۷۲۲، ۷۲۳، ۷۲۴، ۷۲۵، ۷۲۶، ۷۲۷، ۷۲۸، ۷۲۹، ۷۳۰، ۷۳۱، ۷۳۲، ۷۳۳، ۷۳۴، ۷۳۵، ۷۳۶، ۷۳۷، ۷۳۸، ۷۳۹، ۷۴۰، ۷۴۱، ۷۴۲، ۷۴۳، ۷۴۴، ۷۴۵، ۷۴۶، ۷۴۷، ۷۴۸، ۷۴۹، ۷۵۰، ۷۵۱، ۷۵۲، ۷۵۳، ۷۵۴، ۷۵۵، ۷۵۶، ۷۵۷، ۷۵۸، ۷۵۹، ۷۶۰، ۷۶۱، ۷۶۲، ۷۶۳، ۷۶۴، ۷۶۵، ۷۶۶، ۷۶۷، ۷۶۸، ۷۶۹، ۷۷۰، ۷۷۱، ۷۷۲، ۷۷۳، ۷۷۴، ۷۷۵، ۷۷۶، ۷۷۷، ۷۷۸، ۷۷۹، ۷۸۰، ۷۸۱، ۷۸۲، ۷۸۳، ۷۸۴، ۷۸۵، ۷۸۶، ۷۸۷، ۷۸۸، ۷۸۹، ۷۹۰، ۷۹۱، ۷۹۲، ۷۹۳، ۷۹۴، ۷۹۵، ۷۹۶، ۷۹۷، ۷۹۸، ۷۹۹، ۸۰۰، ۸۰۱، ۸۰۲، ۸۰۳، ۸۰۴، ۸۰۵، ۸۰۶، ۸۰۷، ۸۰۸، ۸۰۹، ۸۱۰، ۸۱۱، ۸۱۲، ۸۱۳، ۸۱۴، ۸۱۵، ۸۱۶، ۸۱۷، ۸۱۸، ۸۱۹، ۸۲۰، ۸۲۱، ۸۲۲، ۸۲۳، ۸۲۴، ۸۲۵، ۸۲۶، ۸۲۷، ۸۲۸، ۸۲۹، ۸۳۰، ۸۳۱، ۸۳۲، ۸۳۳، ۸۳۴، ۸۳۵، ۸۳۶، ۸۳۷، ۸۳۸، ۸۳۹، ۸۴۰، ۸۴۱، ۸۴۲، ۸۴۳، ۸۴۴، ۸۴۵، ۸۴۶، ۸۴۷، ۸۴۸، ۸۴۹، ۸۵۰، ۸۵۱، ۸۵۲، ۸۵۳، ۸۵۴، ۸۵۵، ۸۵۶، ۸۵۷، ۸۵۸، ۸۵۹، ۸۶۰، ۸۶۱، ۸۶۲، ۸۶۳، ۸۶۴، ۸۶۵، ۸۶۶، ۸۶۷، ۸۶۸، ۸۶۹، ۸۷۰، ۸۷۱، ۸۷۲، ۸۷۳، ۸۷۴، ۸۷۵، ۸۷۶، ۸۷۷، ۸۷۸، ۸۷۹، ۸۸۰، ۸۸۱، ۸۸۲، ۸۸۳، ۸۸۴، ۸۸۵، ۸۸۶، ۸۸۷، ۸۸۸، ۸۸۹، ۸۹۰، ۸۹۱، ۸۹۲، ۸۹۳، ۸۹۴، ۸۹۵، ۸۹۶، ۸۹۷، ۸۹۸، ۸۹۹، ۹۰۰، ۹۰۱، ۹۰۲، ۹۰۳، ۹۰۴، ۹۰۵، ۹۰۶، ۹۰۷، ۹۰۸، ۹۰۹، ۹۱۰، ۹۱۱، ۹۱۲، ۹۱۳، ۹۱۴، ۹۱۵، ۹۱۶، ۹۱۷، ۹۱۸، ۹۱۹، ۹۲۰، ۹۲۱، ۹۲۲، ۹۲۳، ۹۲۴، ۹۲۵، ۹۲۶، ۹۲۷، ۹۲۸، ۹۲۹، ۹۳۰، ۹۳۱، ۹۳۲، ۹۳۳، ۹۳۴، ۹۳۵، ۹۳۶، ۹۳۷، ۹۳۸، ۹۳۹، ۹۴۰، ۹۴۱، ۹۴۲، ۹۴۳، ۹۴۴، ۹۴۵، ۹۴۶، ۹۴۷، ۹۴۸، ۹۴۹، ۹۵۰، ۹۵۱، ۹۵۲، ۹۵۳، ۹۵۴، ۹۵۵، ۹۵۶، ۹۵۷، ۹۵۸، ۹۵۹، ۹۶۰، ۹۶۱، ۹۶۲، ۹۶۳، ۹۶۴، ۹۶۵، ۹۶۶، ۹۶۷، ۹۶۸، ۹۶۹، ۹۷۰، ۹۷۱، ۹۷۲، ۹۷۳، ۹۷۴، ۹۷۵، ۹۷۶، ۹۷۷، ۹۷۸، ۹۷۹، ۹۸۰، ۹۸۱، ۹۸۲، ۹۸۳، ۹۸۴، ۹۸۵، ۹۸۶، ۹۸۷، ۹۸۸، ۹۸۹، ۹۹۰، ۹۹۱، ۹۹۲، ۹۹۳، ۹۹۴، ۹۹۵، ۹۹۶، ۹۹۷، ۹۹۸، ۹۹۹، ۱۰۰۰، ۱۰۰۱، ۱۰۰۲، ۱۰۰۳، ۱۰۰۴، ۱۰۰۵، ۱۰۰۶، ۱۰۰۷، ۱۰۰۸، ۱۰۰۹، ۱۰۱۰، ۱۰۱۱، ۱۰۱۲، ۱۰۱۳، ۱۰۱۴، ۱۰۱۵، ۱۰۱۶، ۱۰۱۷، ۱۰۱۸، ۱۰۱۹، ۱۰۲۰، ۱۰۲۱، ۱۰۲۲، ۱۰۲۳، ۱۰۲۴، ۱۰۲۵، ۱۰۲۶، ۱۰۲۷، ۱۰۲۸، ۱۰۲۹، ۱۰۳۰، ۱۰۳۱، ۱۰۳۲، ۱۰۳۳، ۱۰۳۴، ۱۰۳۵، ۱۰۳۶، ۱۰۳۷، ۱۰۳۸، ۱۰۳۹، ۱۰۴۰، ۱۰۴۱، ۱۰۴۲، ۱۰۴۳، ۱۰۴۴، ۱۰۴۵، ۱۰۴۶، ۱۰۴۷، ۱۰۴۸، ۱۰۴۹، ۱۰۵۰، ۱۰۵۱، ۱۰۵۲، ۱۰۵۳، ۱۰۵۴، ۱۰۵۵، ۱۰۵۶، ۱۰۵۷، ۱۰۵۸، ۱۰۵۹، ۱۰۶۰، ۱۰۶۱، ۱۰۶۲، ۱۰۶۳، ۱۰۶۴، ۱۰۶۵، ۱۰۶۶، ۱۰۶۷، ۱۰۶۸، ۱۰۶۹، ۱۰۷۰، ۱۰۷۱، ۱۰۷۲، ۱۰۷۳، ۱۰۷۴، ۱۰۷۵، ۱۰۷۶، ۱۰۷۷، ۱۰۷۸، ۱۰۷۹، ۱۰۸۰، ۱۰۸۱، ۱۰۸۲، ۱۰۸۳، ۱۰۸۴، ۱۰۸۵، ۱۰۸۶، ۱۰۸۷، ۱۰۸۸، ۱۰۸۹، ۱۰۹۰، ۱۰۹۱، ۱۰۹۲، ۱۰۹۳، ۱۰۹۴، ۱۰۹۵، ۱۰۹۶، ۱۰۹۷، ۱۰۹۸، ۱۰۹۹، ۱۱۰۰، ۱۱۰۱، ۱۱۰۲، ۱۱۰۳، ۱۱۰۴، ۱۱۰۵، ۱۱۰۶، ۱۱۰۷، ۱۱۰۸، ۱۱۰۹، ۱۱۱۰، ۱۱۱۱، ۱۱۱۲، ۱۱۱۳، ۱۱۱۴، ۱۱۱۵، ۱۱۱۶، ۱۱۱۷، ۱۱۱۸، ۱۱۱۹، ۱۱۲۰، ۱۱۲۱، ۱۱۲۲، ۱۱۲۳، ۱۱۲۴، ۱۱۲۵، ۱۱۲۶، ۱۱۲۷، ۱۱۲۸، ۱۱۲۹، ۱۱۳۰، ۱۱۳۱، ۱۱۳۲، ۱۱۳۳، ۱۱۳۴، ۱۱۳۵، ۱۱۳۶، ۱۱۳۷، ۱۱۳۸، ۱۱۳۹، ۱۱۴۰، ۱۱۴۱، ۱۱۴۲، ۱۱۴۳، ۱۱۴۴، ۱۱۴۵، ۱۱۴۶، ۱۱۴۷، ۱۱۴۸، ۱۱۴۹، ۱۱۵۰، ۱۱۵۱، ۱۱۵۲، ۱۱۵۳، ۱۱۵۴، ۱۱۵۵، ۱۱۵۶، ۱۱۵۷، ۱۱۵۸، ۱۱۵۹، ۱۱۶۰، ۱۱۶۱، ۱۱۶۲، ۱۱۶۳، ۱۱۶۴، ۱۱۶۵، ۱۱۶۶، ۱۱۶۷، ۱۱۶۸، ۱۱۶۹، ۱۱۷۰، ۱۱۷۱، ۱۱۷۲، ۱۱۷۳، ۱۱۷۴، ۱۱۷۵، ۱۱۷۶، ۱۱۷۷، ۱۱۷۸، ۱۱۷۹، ۱۱۸۰، ۱۱۸۱، ۱۱۸۲، ۱۱۸۳، ۱۱۸۴، ۱۱۸۵، ۱۱۸۶، ۱۱۸۷، ۱۱۸۸، ۱۱۸۹، ۱۱۹۰، ۱۱۹۱، ۱۱۹۲، ۱۱۹۳، ۱۱۹۴، ۱۱۹۵، ۱۱۹۶، ۱۱۹۷، ۱۱۹۸، ۱۱۹۹، ۱۲۰۰، ۱۲۰۱، ۱۲۰۲، ۱۲۰۳، ۱۲۰۴، ۱۲۰۵، ۱۲۰۶، ۱۲۰۷، ۱۲۰۸، ۱۲۰۹، ۱۲۱۰، ۱۲۱۱، ۱۲۱۲، ۱۲۱۳، ۱۲۱۴، ۱۲۱۵، ۱۲۱۶، ۱۲۱۷، ۱۲۱۸، ۱۲۱۹، ۱۲۲۰، ۱۲۲۱، ۱۲۲۲، ۱۲۲۳، ۱۲۲۴، ۱۲۲۵، ۱۲۲۶، ۱۲۲۷، ۱۲۲۸، ۱۲۲۹، ۱۲۳۰، ۱۲۳۱، ۱۲۳۲، ۱۲۳۳، ۱۲۳۴، ۱۲۳۵، ۱۲۳۶، ۱۲۳۷، ۱۲۳۸، ۱۲۳۹، ۱۲۴۰، ۱۲۴۱، ۱۲۴۲، ۱۲۴۳، ۱۲۴۴، ۱۲۴۵، ۱۲۴۶، ۱۲۴۷، ۱۲۴۸، ۱۲۴۹، ۱۲۵۰، ۱۲۵۱، ۱۲۵۲، ۱۲۵۳، ۱۲۵۴، ۱۲۵۵، ۱۲۵۶، ۱۲۵۷، ۱۲۵۸، ۱۲۵۹، ۱۲۶۰، ۱۲۶۱، ۱۲۶۲، ۱۲۶۳، ۱۲۶۴، ۱۲۶۵، ۱۲۶۶، ۱۲۶۷، ۱۲۶۸، ۱۲۶۹، ۱۲۷۰، ۱۲۷۱، ۱۲۷۲، ۱۲۷۳، ۱۲۷۴، ۱۲۷۵، ۱۲۷۶، ۱۲۷۷، ۱۲۷۸، ۱۲۷۹، ۱۲۸۰، ۱۲۸۱، ۱۲۸۲، ۱۲۸۳، ۱۲۸۴، ۱۲۸۵، ۱۲۸۶، ۱۲۸۷، ۱۲۸۸، ۱۲۸۹، ۱۲۹۰، ۱۲۹۱، ۱۲۹۲، ۱۲۹۳، ۱۲۹۴، ۱۲۹۵، ۱۲۹۶، ۱۲۹۷، ۱۲۹۸، ۱۲۹۹، ۱۳۰۰، ۱۳۰۱، ۱۳۰۲، ۱۳۰۳، ۱۳۰۴، ۱۳۰۵، ۱۳۰۶، ۱۳۰۷، ۱۳۰۸، ۱۳۰۹، ۱۳۱۰، ۱۳۱۱، ۱۳۱۲، ۱۳۱۳،

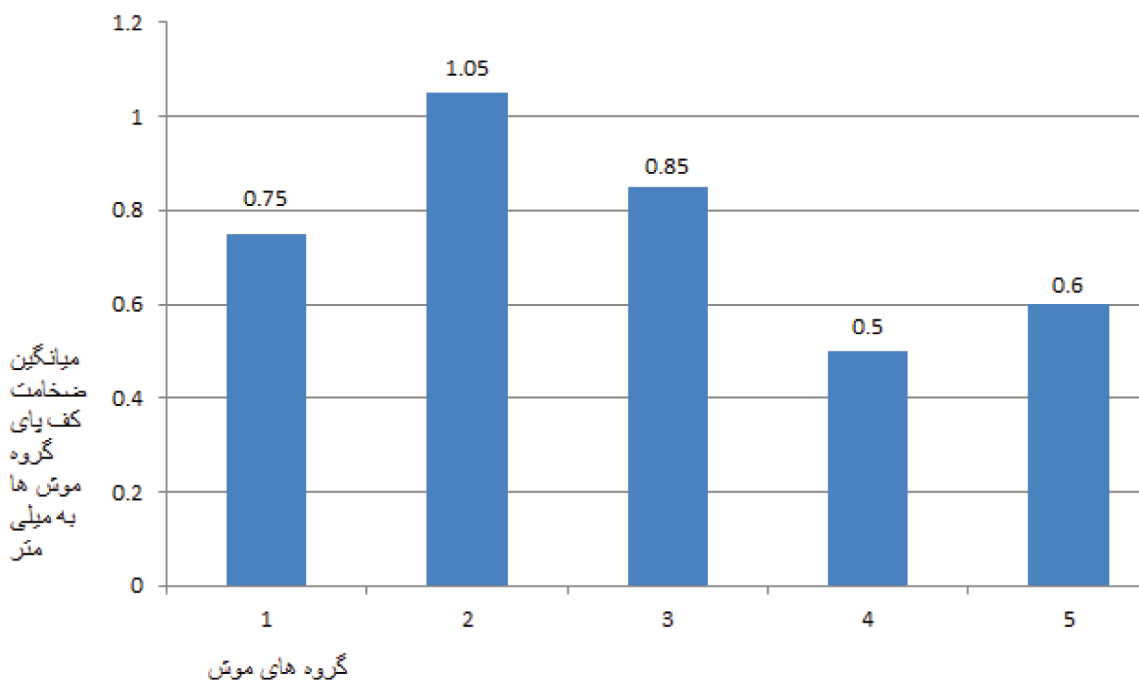
(۱۲). مهمترین جنبه‌ی نتایج این تحقیق اثبات تأثیر واکنش متقابل سلول میزبان بر میزان بیماری‌زایی تاک‌ی‌زونا‌یت‌های *نئوسپورا کانینوم* می‌باشد. ویژگی J774 به عنوان رده سلولی ماکروفاژ در واکنش متقابل با طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا از جمله *مایکوباکتریوم تویرکلوسیس* (۳)، *بروسلا ابورتوس* (*Brucella abortus*) (۷) و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* (*Cryptococcus neoformans*) (۱۸)، بررسی شده است. اطلاعات گذشته کشته شدن درون سلولی *لیشمانیا مونوسایتوزنز* در رده سلولی J774 را نشان می‌دهد؛ ماکروفاژها نقش کلیدی در مکانیسم دفاعی در سیستم ایمنی دارند، در نتیجه تعجب آور نیست که پاساژهای متوالی تاک‌ی‌زونا‌یت *نئوسپورا کانینوم* بر روی رده سلولی باعث تخفیف حدت این تک‌یاخته می‌شود. با توجه به این قابلیت تاک‌ی‌زونا‌یت زنده‌ی تخفیف حدت یافته‌ی *نئوسپورا کانینوم*، می‌توان این وارینه را به عنوان واکنشی مناسب در تحقیقات آینده در نظر گرفت.

### نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه با توجه به نتایج میکروسکوپی، رده سلولی معلق J774 رده سلولی مناسبی برای تکثیر انبوه و تخفیف حدت تک‌یاخته‌ی داخل سلولی *نئوسپورا کانینوم* معرفی شد. ضمن اینکه دوزی از انگل *نئوسپورا*

واکسن های ترانس ژنیک *نئوسپورا کانینوم* (۱۴) اشاره کرد. ماهیت رده‌ی سلولی ماکروفاژ موشی یا J774 در تکثیر و تخفیف حدت تاک‌ی‌زونا‌یت *نئوسپورا کانینوم* نقش به‌سزایی دارد. در مطالعه‌ی لم و همکاران (۲۰۰۹)، به اثبات رسیده بود که رده سلولی J774، مقادیر زیادی لیزوزوم و اینترلوکین ۱ را سنتز می‌کند و نقش کلیدی در سیستم ایمنی ایفا می‌کند که این ویژگی می‌تواند توجیه‌کننده کاهش بیماری‌زایی *نئوسپورا کانینوم* بر اثر پاساژ در این رده سلولی باشد (۱۰). از سوی دیگر با توجه به این که رده سلولی J774 معلق می‌باشد، پاساژ دادن و تکثیر آن در مقایسه با رده‌های سلولی چسبنده مثل Vero آسان‌تر است (۹). تولید انبوه و آسان تاک‌ی‌زونا‌یت *نئوسپورا کانینوم* نیاز اساسی در راستای ساخت واکسن زنده‌ی تخفیف حدت یافته می‌باشد.

اخیرا محققان رده سلولی J774 را در مطالعات آزمایشگاهی برای اهداف مختلفی به کار برده اند. برای مثال در یک مطالعه قابلیت‌های رده سلولی J774 در جذب و رشد ایزوله‌های بالینی *مایکوباکتریوم تویرکلوسیس* بررسی شده است (۸). برخی محققان از رده سلولی J774 برای کشت در شرایط آزمایشگاهی پروماستیگوت‌های گونه‌های مختلف *لیشمانیا* استفاده کرده‌اند (۲۲)، و برخی محققان رده سلولی J774 را به عنوان رده مناسبی برای بررسی مطالعات عفونت‌زایی ویروس دنگو (Dengue) پیشنهاد کرده‌اند



شکل ۳- میانگین ضخامت کف پای موش‌ها ۲۴ ساعت بعد از آزمایش جلدی. محور عمودی: نشانگر میانگین اندازه ضخامت کف پای موش‌ها به میلی‌متر، محورا افقی ستون ۱: گروه NC1 تخفیف حدت یافته دوز  $10^6 \times 5$ ، ستون ۲: گروه NC1 تخفیف حدت یافته دوز  $10^6 \times 10$ ، ستون ۳: گروه NC1 تخفیف حدت یافته  $10^6 \times 20$ ، ستون ۴: گروه NC1 حاد  $10^6 \times 5$  و ستون ۵: گروه شاهد (گروه‌های دریافت کننده‌ی دوز  $10^6 \times 10$  و  $10^6 \times 20$  NC1 حاد قبل از انجام آزمون جلدی تلف شدند).

10. Lam, J., Herant, M., Dembo, M., Heinrich, V. 2009. Baseline mechanical characterization of J774 Macrophages. *Biophysical Journal*. 96: 248-254.

11. Lunden, A., Wright, S., Allen, J., Buxton, D. 2002. Immunisation of mice against Neosporosis. *International Journal of Parasitology*. 32:867-876.

12. Maria, M.B., Moreno-Altamirano, F., Sánchez-García, J., Legorreta-Herrera, M., Aguilar-Carmona, I. 2007. Susceptibility of mouse macrophage J774 to dengue virus infection. *Intervirology*. 50, 237-239.

13. Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., Aguado-Martínez, A., Alvarez-García, G. 2011. Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the bradyzoite-specific protein NcSAG4 in tachyzoites. *Parasitology*. 138, 472-480.

14. Miller, C., Quinn, H., Ryce, C., Reichel, M., and Ellis, J. 2005. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. *International Journal for Parasitology*. 35:821-828.

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

16. Namavari, M., Mansourian, M., Khodakaram-Tafti, A., Hosseini, M.H., Rahimian, A., Khordadmehr, M., and Lotfi, M. 2011. Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of *Neospora caninum* tachyzoites. *Springer*. 21:1665-68.

17. Namazi, F., Oryan, A., Namavari, M.M. 2010. Experimental infection of embryonated eggs of chicken with *Besnoitia caprae*. *Trop Biomed*. 27(3):417-23.

18. Naslund, P.K., Miller, W.C., Granger, D.L. 1995. *Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. *Infection and Immunity*. 63, 1298-1304.

19. Omata, Y., Kamiya, H., Kano, R., Kobayashi, Y., Maeda, R., Saito, A. 2006. Footpad Reaction induced by *Neospora caninum* tachyzoite extract in infected BALB/c mice. *Veterinary Parasitology*. 139:102-108.

20. 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.

21. Setasimy, A., Namavari, M. 2015. Use of chicken embryonated eggs for evaluating the virulence of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Disease*. 11:1-3.

22. Sharief, A.H., Gasim-Khalil, E.A., Omer, S.A., Abdalla, H.S. 2008. Innovative serum free medium for in vitro cultivation of pro-

کانینوم که باعث مرگ موش BALB/c می شود دوز  $20 \times 10^6$  می باشد. نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت یافته باعث ایجاد ایمنی سلولی و هومورال در موش BALB/c شد ولی باعث مرگ موش ها نشد.

### تشکر و قدردانی

هزینه های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۱۱۱۶-۱۸-۸۴-۲ تامین گردیده است و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل اجرایی آن انجام گرفته است. نویسندگان از همکاری سرکار خانم محبوبه مختاری و آقای صفر صادق زاده در طی انجام این مطالعه سپاسگزاری می نمایند.

### 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. Bartley, P.M., Wright, S.E., Maley, S.W., Buxton, D., Nath, M., and Innes, E.A. 2009. The development of immune responses in Balb/c mice following inoculation with attenuated or virulent *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasite Immunology*. 31: 392-401.

3. Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R.S., and Bloom, B.R. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. 175: 1111-1122.

4. Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Hesselink, J.W. and Wouda, W. 2002. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Veterinary Parasitology*. 105:99-104.

5. Dubey, J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animal. *The Korean Journal of Parasitology*. 41(1): 1-16.

6. Dubey, J.P., Schares, G. 2006. Diagnosis of Bovine Neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 140: 1-34.

7. Jiang, X., Leonard, B., Benson, R., Baldwin, C.L. 1993. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cellular Immunology*. 151: 309-319.

8. Jurado, E.R., Tundo, G., Borrell, S., Alcaide, F., Coll, P., Espanol, M., Casabona, N.M., Mick, V., Montemayor, M., Moure, R., Salvador, M., Vicente, E., Gonzalez-Martín, J. 2011. Impaired fitness of *Mycobacterium tuberculosis* resistant isolates in a cell culture model of murine macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 66, 2277-2280.

9. 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 macrophage to attenuation of virulence of *Neospora caninum*. *Research in Veterinary Science*. 95 :515-521.

mastigote forms of Leishmania species. *International Journal for Parasitology*.57, 138-142.

23. Williams D. J. L., McGarry J., Guy F., Barber J. and Trees A. J. 1997. Novel ELISA for detection of Neospora-specific antibodies in cattle. *Veterinary Record*. 140: 328-331.

24. Wilkins, M.F., O'Connell, E., TePunga, 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. *Newzealand Veterinary Journal*. 36:86-89.

