DOI: 10.22092/VJ.2021.128767.1672
شماره ۱۳۵ تابستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی سیستم ایمنی موش‌های BALB/c در برابر فرم لیوفلیزه نئوسپورا کانینوم

• **نیما توسلی**
واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی ، کرج ، ایران
• **مرضیه کفایت (نویسنده مسئول)**
گروه انگل شناسی ، واحدکرج، دانشگاه آزاداسلامی، کرج، ایران
• **محمد مهدی نام آوری**
موسسه رازی شعبه شیراز. شیراز. ایران

تاریخ دریافت: ۲۵-۰۹-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۰۹-۰۶-۱۴۰۰

Email: marziehkefayat@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه، هدف بررسی اثر لیوفلیزاسیون روی سوش تخفیف حدت‌یافته در مقایسه با سوش حاد در ایجاد پاسخ ایمنی در موش BALB/c می‌باشد. بدین منظور ۴۰ سر موش BALB/c در پنج گروه هشت‌تایی تقسیم شدند. گروه اول سوش حاد NC1، گروه دوم سوش حاد NC1به صورت لیوفلیزه، گروه سوم سوش تخفیف حدت یافته NCR، گروه چهارم سوش تخفیف حدت NCR به صورت لیوفلیزه و گروه پنجم گروه کنترل. براي انجام آزمون‌های الایزا و اینترفرون گاما سه هفته پس از تزریق، خون‌گیری صورت گرفت. نتایج نشان دادند که سیستم ایمنی هومورال به خوبی عمل کرده است و در هر چهار گروه ایمن شده پاسخ ایمنی هومورال نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار دارد (P value<۰/۰۵). این مطالعه نشان داد که سوش تخفیف حدت‌یافته به خوبی قادر به ایجاد پاسخ ایمنی هومورال و ایمنی سلولی می‌باشد و می‌تواند به عنوان کاندیدي مناسب جهت مطالعات بیشتر برای تولید واکسن مطرح گردد.

کلمات کلیدی: نئوسپورا کانینوم، لیوفلیزه، موش BALB/c، ایمنی، واکسن

Veterinary Researches & Biological Products No 135 pp: 43-48

Evaluation of immune response of BALB/c mice against lyophilized form of Neospora caninum

By: tavassoli, N., 1.Karaj branch,Islamic azad university,karaj, iran. kefayat, M., (Corresponding Author) department of Parasitology, karaj branch, Islamic azad university,karaj, Iran. and namavari, M.M., 3.Razi Vaccine and Serum Research Institute Shiraz- Iran.

Received: 2019-12-16 Accepted: 2021-08-31

Email: marziehkefayat@yahoo.com

The aim of this study was to investigate the effect of lyophilization on which strain in comparison with acute strain in the development of immune response in BALB/c mice. To this end, 40 BALB/c mice were divided into 5 groups each of 8 heads. The first group: NC1 (acute strain), the second group: lyophilized NC1 (acute strain), the third group: NCR (attenuated strain), the fourth group: lyophilized NCR (attenuated strain), and the fifth group: control. Three weeks after induction of vaccines, blood sampling was performed for ELISA and interferon-gamma tests. The results showed that the hemorrhagic immune system performed well (P <0.05, OR (CI95%)), and all four immunosuppressed groups had a significant difference in humoral immune response compared to the control group. An important result was the interferon test, which revealed that the lyophilized form in the acute strain had no significant difference in the level of interferon gamma compared to the control group, while lyophilized attenuated strain also had a significant difference between the levels of IFN-γ compared to the control (P <0.05, OR (CI95%)). This study showed that the lyophilized attenuated strain N.caninum is also able to produce a humoral and cell mediated immune and can be considered as an appropriate candidate for further studies on vaccine production.

Keywords: Neospora caninum, lyophilization, BALB/c mice, immunity, vaccine

مقدمه

نئوسپورا کانینوم تک‌یاخته داخل سلولی اجباری و بسیار شبیه به توکسوپلاسما است که در سال ۱۹۸۴ توسط برکاس و همکاران شناسایی و در سال ۱۹۸۸ نام‌گذاری گردید (۱). میزبان نهایی انگل سگ‌سانان و طیف وسیعی از حیوانات میزبان واسط می‌باشند(۲). گاو مهم‌ترین میزبان حد واسط نئوسپورا کانینوم است. بیماری ناشی از این تک‌یاخته نئوسپوروزیس است که انتشار جهانی داشته و از بسیاری کشورهای جهان گزارش شده است(۳). سقط‌جنین برجسته‌ترین پیامد آلودگی به این انگل است و زمانی که جمعیت زیادی از گله در معرض خطر آلودگی قرار دارند می‌تواند قابل توجه باشد. در گله‌های گاو شیري علاوه بر سقط‌جنین کاهش میزان شیر نیز به مورد خسارات اقتصادی بیماری سقط‌جنین اضافه می‌شود(۴). به نظر می‌رسد کنترل نئوسپوروزیس اقتصادی‌ترین روش کنترل بیماری باشد و تحقیقات گسترده در زمینه تولید واکسن و تأثیرات بر حیوانات آزمایشگاهی کوچک مثل موش معطوف است(۵). در حال حاضر بهترین رویکرد برای جلوگیری از عفونت نئوسپورا استفاده از واکسن زنده است(۶). اما خطرات ناشی از واکسن زنده از قبیل جهش‌های ثانویه که منجر به ایجاد سویه جدید بیماری‌زا می‌شود، نیز بایستی مورد توجه قرار گیرد. همچنین در مطالعات قبلی مشخص شد که واریته تخفیف حدت‌یافته نئوسپورا کانینوم موسسه رازی می‌تواند با ایجاد ایمنی هومورال و سلولی و همچنین جلوگیری از نفوذ و انتقال عمودی نئوسپورا کانینوم زمینه مناسبی را برای انجام تحقیقات کاربردی در راستای تهیه واکسن زنده ایجاد کند(۷). با توجه به اینکه یکی از بهترین روش ها برای نگه‌داری طولانی مدت، لیوفلیزاسیون خشک کردن انجمادی تحت خلا می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر لیوفلیزاسیون تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت‌یافته بر پاسخ ایمنی هومورال و سلولی موش های BALB/c تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت یافته و مقایسه آن با ایزوله حاد این تک‌یاخته در موش‌های BALB/c بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه از موش‌های BALB/c تهیه شده از موسسه رازی کرج استفاده گردید. موش‌های مورد مطالعه ماده‌های خالص ۴-۳ هفته با وزن ۳۵-۲۸ گرم بودند و در شرایط یکسان نگه‌داری و تغذیه شدند.

آماده‌سازی واکسن‌هاي نئوسپورا کانینوم

در این پژوهش از سوش‌هاي حاد و تخفیف حدت‌یافتهْ منجمد نئوسپورا کانینوم که از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز تهیه شده بود، استفاده گردید. سوش‌های مذکور درون فلاسک کشت سلولی حاوی رده سلولی Vero همراه با محیط کشت DMEM، ۲٪ سرم جنین گاو، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ mg/ml) و آمفوتریسین (۲۵ mg/ml) کشت داده شدند. پس از رشد، همه تک‌یاخته‌ها سانتریفیوژ شدند. تاکی‌زوئیت‌ها از روی محیط کشت جمع‌آوری و بعد

از شمارش با استفاده از لام نئوبار برای تهیه واکسن، دوز $۵×۱۰^{۶}$ تاکی زوئیت در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید(۸). همچنین تاکی‌زویت‌های سوش حاد و تخفیف حدت‌یافته به وسیله خشک‌کن انجمادی(۴LO-ALPHA۲ plus،GERMANY) لیوفلیزه شدند. به منظور بررسی عدم آلودگی میکروبی واکسن‌ها، از هر نمونه روی محیط کشت آگار خون‌دار کشت داده شد.

ایمنی‌سازی

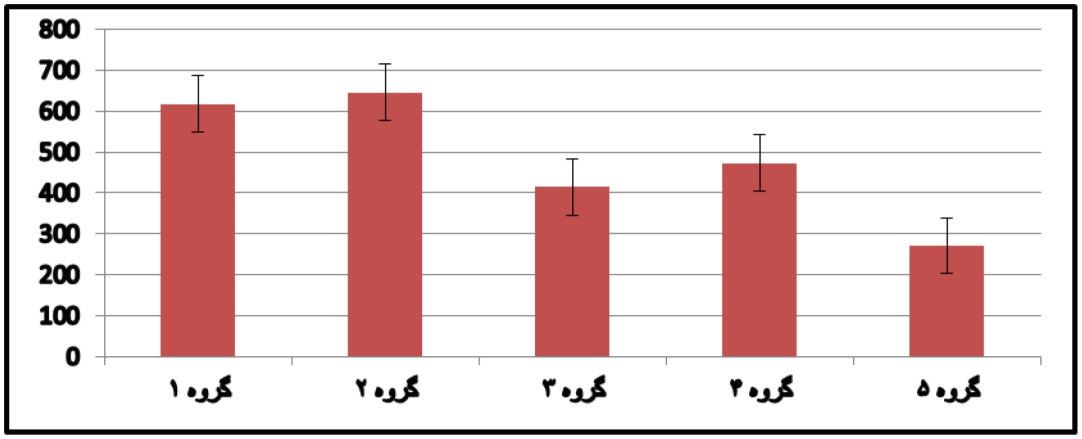
اثر واکسن‌های آماده بر موش‌های BALB/c تهیه شده از موسسه رازی کرج بررسی شد. موش‌های BALB/c مورد مطالعه ماده‌های خالص ۴-۳ هفته با وزن ۳۵-۲۸ گرم بودند. ۴۰ سر موش به پنج گروه هشت‌تایی تقسیم شدند. هر گروه به‌طور جداگانه در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگه‌داری شده و از آب و غذای معمولی تغذیه شدند. گروه اول و دوم به ترتیب $۵×۱۰^{۶}$ تاکی زوئیت نئوسپورا کانینوم سوش حاد را به صورت زنده و لیوفلیزه دریافت نمودند. گروه سوم و چهارم به ترتیب $۵×۱۰^{۶}$ تاکی زوئیت نئوسپورا کانینوم سوش تخفیف حدت‌یافته را به صورت زنده و لیوفلیزه دریافت نمودند. گروه پنجم به عنوان گروه کنترل، یک میلی‌لیتر از محیط کشت استریل را دریافت نمودند. تزریق واکسن به صورت زیر پوستی صورت گرفت. تمامی گروه‌ها به مدت ۲۸ روز، از لحاظ بروز علائم بالینی و تلفات تحت نظر قرار گرفتند. براي انجام آزمایش‌های سرولوژیک، ۲۱ روز پس از تزریق از تمامي موش‌های زنده مانده خون‌گیری و سپس سرم آن‌ها جدا شد سرم‌ها براي بررسی ایمنی هومورال و سلولی تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

بررسی ایمنی هومورال

بررسی ایمنی هومورال با استفاده از آزمون الایزا و روش داوینسون و همکاران (۱۹۹۹) انجام گرفت(۹). به‌طور خلاصه دو میلیون تاکی‌زوئیت کشته نئوسپورا کانینوم برای هر چاهک پلیت الایزا به عنوان آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفت. پوشش دهی چاهک‌ها با ۱۰۰ µl آنتی‌ژن همراه با بافر بی‌کربنات به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. بعد از تخلیه حفرات پلیت و شست و شو با PBS tween برای پوشاندن جاهای خالی BSA (آلبومین سرم گاو) یک درصد به میزان ۱۰۰ µl در حفرات پلیت ریخته شد و پلیت الایزا به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۴ بار شست و شوی حفرات پلیت، ۱۰۰ µl از سرم موش‌های مورد مطالعه با رقت ۱/۲۵ در حفرات ریخته شد، بعد از یک ساعت، شستشو با PBS انجام گرفت. آنتی کونژوگه با آنزیم پراکسیداز به میزان ۱۰۰ µl به هر چاهک اضافه شد و یک ساعت انکوبه گردید. پلیت ۴ بار با PBS tween شسته و به هر چاهک ۱۰۰ µl رنگ ارتوفنل دی آمین(OPD) افزوده‌شد و ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. پس از طی زمان موردنظر ۱۰۰ µl اسید سولفوریک ۱۲/۵ درصد به هر چاهک افزوده شد. قرائت نتایج با استفاده از دستگاه ELISA (Biotek، USA reader) طول موج ۴۵۰ nm صورت گرفت.

بررسی ایمنی سلولی

اندازه‌گیری ایمنی سلولی با استفاده از کیت اندازه‌گیری اینترفرون گامای (Introgen therofisher، USA) صورت گرفت. مراحل انجام آزمایش به‌طور خلاصه بدین صورت بود. ۱۰۰ µl محلول Coating Buffer antibody را به چاهک‌های حاوی سرم افزوده، پلیت پوشانده شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه گردید سپس چاهک‌ها با ۲۵۰ µl محلول شستشو، شسته شدند. به چاهک‌های پلیت ۱۰۰ µl محلول اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. ابتدا ۱۰۰ µl محلول استاندارد سپس ۱۰۰ µl نمونه به هر چاهک اضافه گردید و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. در آخر براي توقف واکنش



نمودار ۱- نتایج الایزا در گروه‌های موردمطالعه گروه اول: NC۱(سوش حاد)، گروه دوم: NC۱(سوش حاد) به صورت لیوفلیزه ، گروه سوم: NCR(سوش تخفیف حدت)، گروه چهارم: NCR(سوش تخفیف حدت) به صورت لیوفلیزه و گروه پنجم: کنترل.

Stop Solution ۵۰ µl به هر چاهک اضافه شد. قرائت نتایج با استفاده از دستگاه ELISA reader (Biotek، USA) در طول موج ۴۵۰ nm صورت گرفت.

نتایج

موش‌های مورد مطالعه در تمامی گروه‌ها بعد از تزریق به‌طور روزانه بررسي شدند، هیچ‌گونه مرگ‌ومیر یا علائمی که نشان‌دهنده وجود بیماری در موش‌ها باشد در هیچ گروهي مشاهده نشد.

نتایج آزمایشات سرم شناسی (الایزا)

در آزمایش الایزا تمام گروه‌های دریافت‌کننده واکسن، تیتر آنتی‌بادی بالاتری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵). گروه‌هایی که سوش حاد واکسن را به صورت زنده و لیوفلیزه دریافت نمودند تیتر بالاتری نسبت به گروه‌هایی داشتند که سوش تخفیف حدت‌یافته را به صورت زنده و لیوفلیزه دریافت نمودند.

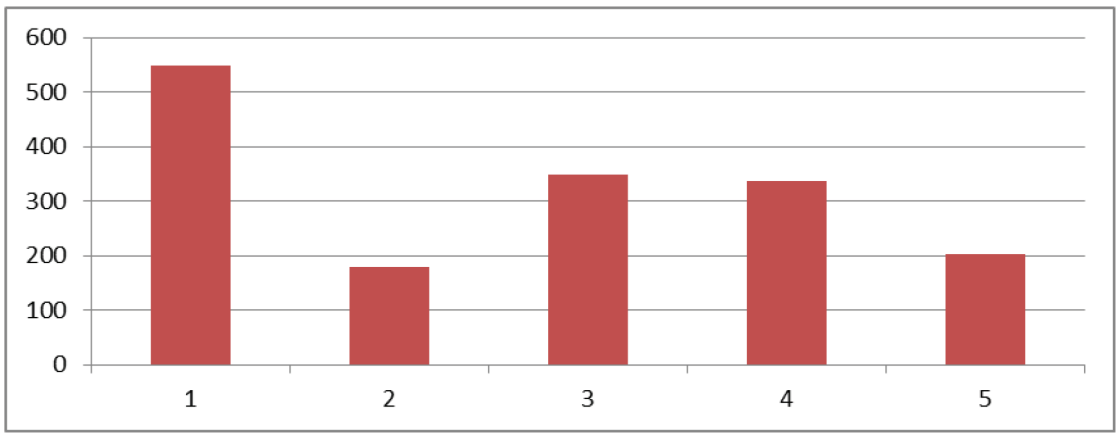
انجام آزمون آماری با استفاده از نرم‌افزار گراف پد نشان داد، تفاوت معنی‌داری در همه گروه‌های موردمطالعه با گروه کنترل مشاهده می‌شود (P value<۰/۰۵) نتایج حاکی از این مطلب است که سیستم ایمنی هومورال موفق عمل کرده و نسبت به گروه کنترل که هیچ‌گونه ایمن‌سازی دریافت نکرده‌اند تیتر بالاتری دارد. شایان ذکر است بین گروه‌های یک و دو و همچنین گروه سه و چهار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است.

نتایج آزمایش اینترفرون گاما

آزمایش اندازه‌گیری اینترفرون گاما نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه یک و دو مشاهده شد و میزان اینترفرون گاما در سوش حاد زنده نسبت به حاد لیوفلیزه بیشتر بود. این در حالی است که در بین گروه دو و کنترل تفاوت معنی‌داری دیده نشد. ولی گروه‌های زنده و لیوفلیزه تخفیف حدت‌یافته (گروه سه و چهار) تفاوت معنی‌داری را از لحاظ افزایش میزان اینترفرون گاما نشان ندادند. همچنین بین گروه‌های سه و چهار در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دیده شد (P<۰/۰۵ value) (نمودار ۲).

بحث

در حال حاضر هیچ واکسن موثری برای کنترل نئوسپورا به صورت تجاری تولید نمی‌شود. لیکن تجربیات موفق در زمینه تولید واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته از طریق پاساژ دادن متوالی تک‌یاخته‌های بیماری‌زا وجود دارد که از جمله می‌توان به لیشمانیا ماژور (۱۰) و تیلریا آنولاتا (۱۱) بابزیا بویس و بابزیا بایژمینا (۱۲) و توکسوپلاسما (۱۳) اشاره نمود. یکی از روش‌های مهم تولید واکسن علیه تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم که شباهت زیادی به توکسوپلاسما گوندی دارد نیز تخفیف حدت انگل زنده می‌باشد. لذا در این مطالعه نیز تمرکز بر روی ارزیابی واکسن زنده تخفیف حدت یافته بود که به دو صورت زنده و لیوفلیزه شده در موش مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه واکسن از کشت تک‌یاخته روی رده سلولی Vero استفاده شد. در حال حاضر از تکنیک کشت سلولی جهت جداسازی، تکثیر و تشخیص انگل نئوسپورا کانینوم به صورت گسترده استفاده می‌شود (۱۴). پاساژ دادن متوالی تک‌یاخته نئوسپورا روی رده‌های سلولی مانند Vero و J774 باعث کاهش حدت فراوان نئوسپورا کانینوم می‌گردد (۱۵). خرداد مهر و همکاران ۲۰۱۳ کاهش حدت قابل‌ملاحظه در نئوسپورا کانینوم پس از پاساژ بر روی سلول J774 در روی تخم‌مرغ جنین‌دار نشان دادند. لذا در این مطالعه نیز از واریته تخفیف حدت‌یافته موجود در موسسه رازی شیراز و سوش حاد به عنوان کنترل استفاده گردید.



نمودار ۲- نتایج اینترفرون گاما در گروه‌های موردمطالعه. گروه اول به عنوان گروه NC1(سوش حاد)، گروه دوم به عنوان گروه NC1(سوش حاد) به صورت لیوفلیزه ، گروه سوم به عنوان گروه NCR(سوش تخفیف حدت)، گروه چهارم به عنوان گروه NCR(سوش تخفیف حدت) به صورت لیوفلیزه و گروه پنجم به عنوان گروه کنترل.

مسئله بعدی در این مطالعه انتخاب حیوان مدل آزمایشگاهی بود. در این پژوهش از موش به عنوان مدل حیوانی استفاده شد، زیرا مطالعه بر روی آلودگی و انتقال مادرزادی نئوسپورا کانینوم در گاو بسیار پر هزینه و زمان بر است. ازاین‌رو موش به دلیل هزینه‌های پایین‌تر به عنوان مدل آزمایشگاهی مقبول‌تر است (۸). فاکتور مهمی که در زمینه تحقیقات واکسن علیه نئوسپوروزیس مشکل‌ساز می‌باشد این است که هیچ حیوان آزمایشی کوچکی وجود ندارد که عملکرد گاو را به درستی تقلید کند و در نهایت کارایی و ایمنی واکسن بایستی در گونه هدف که همان گاو است مورد آزمایش قرار گیرد. لذا نتایجی که در آزمایشات انجام گرفته بر روی مدل موش به عنوان حیوان آزمایشی انجام می‌گیرد بایستی با احتیاط به گاو تعمیم داده شود و نمی‌توان به‌طور صددرصد نتایج را در گاو پیش‌بینی کرد. البته حیواناتی مثل گوسفند نیز می‌توانند به عنوان حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرند تا نتایج بدست آمده با اطمینان بالاتری بر روی گاو قابل تعمیم باشند (۶)؛ لذا بهتر است برای اطمینان بیشتر واریته‌های پژوهش حاضر را بر روی گوسفند نیز مورد ارزیابی قرارداد.

نتایج آزمون الایزا جهت تعیین ایمنی هومورال (نمودار ۱-۴) نشان داد که در چهار گروه تحت آزمایش ایمنی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالا رفت و سوش‌های حاد و تخفیف حدت‌یافته به صورت زنده و لیوفلیزه توانایی تحریک ایمنی هومورال را داشته و تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل که هیچ‌گونه انگلی دریافت ننموده است را داشتند. همچنین گروه یک و دو نسبت به گروه سه و چهار ایمنی هومورال تیتر بالاتری را نشان داد و حاکی از آن است که سوش‌های حاد نسبت به تخفیف حدت‌یافته ایمنی هومورال بیشتری تولید می‌کنند. البته باید توجه داشت که سوش حاد بیماری‌زا بیشتری نیز ایجاد می‌کند و به‌هیچ‌عنوان واکسن توصیه نمی‌شود درحالی‌که فرم تخفیف حدت‌یافته همان‌طور که در مطالعات قبلی نیز نشان داده بود قادر به ایجاد پاسخ ایمنی هومورال می‌باشدو بیماری‌زایی آن نیز کاهش یافته است (۱۷ و ۷). همچنین بین گروه یک و دو و همچنین بین گروه سه و چهار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و بیانگر این است که در لیوفلیزاسیون ویژگی انگل حفظ شده است و لیوفلیزاسیون روش موفقی برای حفاظت از انگل نئوسپورا کانینوم می‌باشد. البته لیوفلیزاسیون انگل تاثیری در تحریک ایمنی هومورال توسط انگل ندارد. در تک یاخته‌های بیماری‌زای داخل سلولی مانند نئوسپورا کانینوم، پاسخ‌های ایمنی وابسته به سلول دارای نقش مهمی در جلوگیری از تکثیر نئوسپورا کانینوم انگل در سلول‌های بدن میزبان دارند (۱۸). پاسخ‌های ایمنی Th۱ شامل انواع سیتوکین‌های التهابی مثل اینترفرون گاما، نقش مهمی در حفاظت از بدن میزبان در برابر نئوسپورا کانینوم ایفاء می‌کنند (۶، ۱۹ و ۲۰)

بررسی نتایج ایمنی سلولی با استفاده از سنجش اینترفرون گاما نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های یک و دو می‌شود. یعنی بیش‌ترین تحریک ایمنی سلولی در گروه یک که سوش زنده حاد را دریافت نموده‌اند رخ می‌دهد و البته این مساله طبیعی به نظر می‌رسد چون سوش حاد بیماری‌زاست انتخاب مناسبی برای واکسن نمی‌باشد. کاهش ایمنی سلولی در گروه دو نشان‌دهنده این واقعیت است که روند لیوفلیزاسیون منجر به تغییراتی در سوش حاد گردیده که باعث می‌شود که پاسخ ایمنی سلولی به‌شدت کاهش یابد. این در حالی است که روند لیوفلیزاسیون برروی سوش تخفیف‌حدت‌یافته تغییری ایجاد نکرده بطوریکه پاسخ گاما اینترفرون با حالت غیرلیوفلیزه آن تفاوت معنی‌داری ندارد، به عبارت دیگر در مورد سوش تخفیف‌حدت‌یافته ایجاد پاسخ ایمنی سلولی در حالت لیوفلیزه و غیرلیوفلیزه آن تفاوت ندارد لذا می‌توان نتیجه گرفت که آنتی‌ژن‌های محرک سیستم ایمنی سلولی در اثر لیوفلیزاسیون دچار اختلال و نقص نشده‌اند. به نظر می‌رسد پاساژهای متوالی باعث کاهش بیماری‌زایی و ایجاد حالت پایدار آنتی‌ژنی در سوش تخفیف‌حدت یافته شده است در حالی‌که لیوفلیزاسیون در سوش حاد سبب تخریب آنتی‌ژن‌های موثر در پاسخ ایمنی سلولی گردیده است. در مورد نئوسپورا نیز مانند دیگر انگل‌های داخل سلولی، پاسخ‌های ایمنی وابسته به سلول دارای نقش مهمی در جلوگیری از تکثیر نئوسپورا کانینوم در سلول‌های بدن میزبان هستند (۱۹). در بین تمام فاکتورهای درگیر در سقط‌جنین ناشی از آلودگی نئوسپوروزیس، تبدیل Th2 به Th1 به مقدار بالا انجام می‌گیرد و این نشان می‌دهد Th1 در ایمنی در برابر آلودگی نقش بیشتری دارد. پاسخ‌های ایمنی Th1 شامل انواع سیتوکین‌های التهابی مثل اینترفرون گاما، می‌باشند که نقش مهمی در ایجاد ایمنی در برابر آلودگی به نئوسپورا کانینوم دارند به طوری که فاکتورهای ایمنیIgG2، اینترفرون گاما و Th1 در بدن میزبان تولید می‌شود (۱۹). معمولاً غلظت اینترفرون گاما در پلاسمای گاوهای باردار بسیار کوتاه مدت است (۲۱). پاسخ‌های ایمنی علیه آلودگی به افزایش در بیان اینترفرون گاما و افزایش حضور دیگر سیتوکین‌ها مثل اینترلوکین ۱۰ و اینترلوکین ۱۲ به خصوص در انتهای بارداری، وابسته می‌باشد. پس از آلودگی اولیه، اینترفرون گاما باعث تحریک سلول‌های تک‌هسته‌ای و ماکروفاژها می‌شود که به دنبال آن تاکی زوئیت به برادی زوئیت و کیست‌های بافتی تغییر شکل می‌دهد. این تغییر شکل بین تاکی زوئیت و برادی زوئیت نقشی ویژه در تولید و عود عفونت بازی می‌کند (۸). مطالعات مختلفی برای تعیین وجود ایمنی حفاظتی در گاو انجام گرفته است که بیانگر تولید ایمنی حفاظتی در بدن به دلیل آلودگی قبلی به نئوسپورا کانینوم می‌باشد و دیده شد که در گاوهای بارداری که قبلاً به عفونت نئوسپوروزیس مبتلا شده‌اند نسبت به انواعی که برای اولین بار آلوده می‌شوند سقط‌جنین کاهش یافته است (۱۶). در گاوهای شیری که به‌طور طبیعی آلوده شده بودند، کاهش پاسخ‌های هومورال به تأثیر منفی اینترفرون گاما بر تولید آنتی‌بادی‌های IgG1 مربوط بود، در حالی‌که تولید اینترفرون گاما بر روی سطح IgG2 اثر قابل‌ملاحظه‌ای نداشت. این نتایج در گاوهایی که سقط نکرده‌اند بیشتر از قبل نشان‌دهنده غالب بودن پاسخ ایمنی Th1، که به تولید اینترفرون گاما و آنتی‌بادی‌های IgG2 مربوط است، در این گاوها می‌باشد. در پاسخ ایمنی Th1 که در آن سطح IgG2 بالاست تنها در حضور اینترفرون گاما قادر به حفاظت از گاو در برابر سقط‌جنین ناشی از آلودگی نئوسپورا کانینوم می‌باشد (۲۱). تمامی آنچه ذکر گردید نشان‌دهنده اهمیت پاسخ ایمنی سلولی و نقش مهم گاما اینترفرون در این روند است که خوشبختانه در حالت لیوفلیزه سوش تخفیف حدت یافته نئوسپورا این پاسخ ایجاد شده و نشان از موفقیت‌آمیز بودن نتایج این پژوهش دارد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که می‌توان به پروسه تولید یک واکسن تخفیف حدت‌یافته لیوفلیزه نئوسپورا کانینوم امیدوار بود. چون هم ایمنی هومورال و هم ایمنی سلولی را به میزان معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد و هم ایمنی سلولی ایجادشده با سوش تخفیف حدت‌یافته انگل برابری می‌کند. این مطالعه می‌تواند ره‌یافتی در تولید یک واکسن موفق علیه نئوسپورا کانینوم باشد که بررسی‌های بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

منابع مورد استفاده

1. Dubey. J.P. 2003. Review of Neospora caninum and neosporosis in animal. The Korean Journal of Parasitology 41: 1-16.

2. Gondim. L.F.P. M.M. McAllister. W.C. Pitt. and D.E. Zemlicka. 2004a. Coyotes (Canislatrans) are definitive hosts of Neospora caninum. International Journal for Parasitology 34, 159–161

3. Reichel, M.P., J.T. Ellis, and J.P.Dubey. 2007. Neosporosis and hammondiosis in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48: 308–312.

4. Moore, D. P., A. Perez, S. Agliano, M. Brace, G. Canton, D. Cano, M. R. Leunda, Odeon, A. C. E. Odriozola, and C. M. Campero. 2009. Risk factors associated with Neospora caninum infections in cattle in Argentina. *Veterinary Parasitology* 161, 122–125.

5. McFadden. G.I. . 2011. The apicoplast. *Protoplasma* 248, 641–650.

6. Williams. D.J.. C.S. Guy. J.W. McGarry. F. Guy. L. Tasker. R.F. Smith. K. MacEachern. P.J. Cripps. D.F. Kelly and A. J. Trees .2000. Neospora caninum-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foet.al survival. *Parasitology*, 121: 347–358.

7. Beigi. P.. M.M. Namavari and N. Razmi. 2017. Study on the attenuation of Neospora caninum after continuous passage on J774 cell line.*Veterinary Journal (Pajouhesh and Sazandegi)*, 115: 128-135.

8. Liddel. S. C. Parker. B. Vinyard. M. Jenkins and J.P. Dubey . 2003. Immunization of mice with plasmid DNA coding for Nc-GRA7 or NcsHSP33 confers partial protection against vertical transmission of Neospora caninum. *J Parasitol* 89: 496-500.

9. Davison. A.. A. Otter. and J. Trees. 1999a. “Estimation of verticaland horizontal transmission parameters of Neospora caninum infections in dairy cattle,” *International Journal for Parasitology*,29(10), 1683–1689.

10. Michael. P., M. Reichel, A.A. Alejandra, F.P. Luís Gondim and J. T. Ellis. 2013. What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle – Thebillion dollar question *Parasitology* 43 ,133–142.

11. Dubey. J.P. A.L. Hattel and D.S. Lindsay. 1988. "Topper, Neonatal Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission."*J Am Vet Med Assoc*., 193: 1259–1263

12. .Soltani. M.. A. Sadrebazzaz. M. Nasiri and M. Tahmoorespour. 2013. Cloning, Nucleotide Sequencing and Bioinformatics Study of NcSRS2 Gene, an Immunogen from Iranian Isolate of Neospora caninum. *Iran J Parasitol*. 8(1): 114–127.

13. Trees. A.J. and D.J.L. Williams .2005. "Endogenous and exogenous transplacental infection in Neospora caninum and Toxoplasma gondii."Trends. *Parasitol*., 21(12):558-561.

14. Khordadmehr. M. M. Namavari. A.K. Tafti. M. Mansourian. A. Rahimian. and Y. Daneshbod . 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.

15. Barr. B.C.. P.A.Conrad. K.W. Sverlow. A.F.Tarantal and A.G. Hendrickx. 1994. "Experimental fetal and transplacental Neospora infection in the nonhuman primate."*Lab Invest*, 71:236–42.

16. Staubli. D. S. Nunez. H. Sager. G. Schares. and B. Gottstein. 2006. Neospora caninum immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. *Parasitol Res* 99, 648-58.

17. Abdeyazdan. A. and M.M. Namavari. 2015. Effect of inactivated Neospora caninum tachyzoite vaccine on immune markers and transplacental transmission in pregnant BALB/c mice. *Online Journal of Veterinary Research*.19:689-697.

18. Dubey. J.P. G. Schares. and L.M. Ortega-Mora .2007. Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum. *Cliical Microbiology Revew*,20:323-67.

19. Andrianarivo. A. G.. B. C. Barr. M. L. Anderson. J. D. Rowe. A. E. Packham. K.W. Sverlow. and P.A Conrad. 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following 3. experimental infection with Neospora caninum. *Parasitology Research*. 87:817–825.

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

21. Almeria. S.. R. Araujo. W. Tuo. F. Lopez-Gatius. J.P. Dubey. and L.C. Gasbarre. 2010. Fet.al death in cows experimentally infected with Neospora caninum at 110 days of gestation. *Vet Parasitol*. 169, 304–311.