مقایسه‌ی تکثیر و پاساژهای متوالی تاکی زوئیت‌های *نئوسپورا کنینوم* در سل لاین‌های Vero و TLI

منیره خردادمهر[۱]، معین زهتاب[۲]، مهدی نام‌آوری[۳*] و عزیزاله خداکرم‌تفتی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۶

چکیده

نئوسپورا کنینوم یک عامل بیماری‌زای مهم در گاو و سگ می‌باشد. امروزه به طور گسترده‌ای از کشت سلولی به منظور جداسازی و تکثیر نئوسپورا برای اهداف مختلفی استفاده می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر، میزان یکسانی از تاکی زوئیت انگل در مجاورت میزان یکسانی از سل لاین‌های Vero (سلول اپیتلیال کلیه‌ی میمون سبز آفریقایی) و سل لاین TLI (لنفوسیت ترانسفورم شده با تیلریا) قرار گرفت و به مدت سه ماه پاساژ متوالی داده شدند. به منظور ارزیابی میزان حدت تاکی زوئیت‌های به دست آمده از هر سل لاین، دوزهای مختلف انگل (۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۱۵۰۰۰ تاکی زوئیت در هر میکرولیتر)، به تخم مرغ جنین‌دار تزریق شد و میزان تلفات ثبت و از بافت‌های مغز، قلب و کبد آن‌ها جهت مطالعات هیستوپاتولوژی و مولکولی نمونه‌برداری انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که سل لاین TLI توان تکثیر مناسبی را برای نئوسپورا نسبت به سل لاین Vero دارد و اختلاف آماری معنی‌داری در تعداد تاکی زوئیت‌های رها شده از دو سل لاین مشاهده نشد ($p>0/05$). نتایج میزان تلفات، مرگ و میر ۱۰۰ درصد در تخم مرغ‌های تلقیح شده به وسیله‌ی دوزهای مختلف تاکی زوئیت‌های به دست آمده از هر دو سل لاین را نشان داد که البته این میزان تلفات، وابسته به دوز تلقیح شده بود؛ بدین صورت که در دوزهای بالاتر، تلفات زودتر مشاهده شد. بررسی‌های هیستوپاتولوژیک، هپاتیت و میوکاردیت غیرچرکی تک هسته‌ای را نشان داد. با مطالعات مولکولی و ایمنوهیستوشیمی حضور آنتی‌ژن و ژنوم نئوسپورا در بافت‌های مختلف تأیید شد. یافته‌های این پژوهش، سل لاین مناسبی را جهت تکثیر و پاساژ متوالی *نئوسپورا کنینوم* معرفی می‌کند که می‌تواند در دستیابی به روش سریع‌تر و مؤثرتر جهت تهیه واکسن زنده و همچنین صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها بسیار کمک کننده باشد.

کلمات کلیدی: *نئوسپورا کنینوم*، کشت سلول، سل لاین Vero، سل لاین TLI

مقدمه

نئوسپورا کنینوم یک تک یاخته‌ی داخل سلولی اجباری و عامل بیماری‌زای مهم در گاو و سگ به شمار می‌رود که به دلیل ایجاد اختلال در تولید مثل، باعث ایجاد خسارات اقتصادی زیادی در صنعت گاوداری شده و یکی از مهم‌ترین عوامل سقط جنین گاو در جهان به شمار می‌رود (صدربزاز و همکاران ۲۰۰۴، Dubey et al. 2007a, Razmi et al. 2007). این بیماری به عنوان یک بیماری جدی در گاو و سگ مطرح است اما فرم کلینیکی بیماری در اکثر گونه‌ها از جمله گوسفند، بز، گوزن، اسب و کرگدن نیز گزارش شده است. همچنین آنتی‌بادی بر علیه *نئوسپورا کنینوم* در سرم گاومیش آبی، روباه قرمز و خاکستری، گرگ، شتر و گربه‌سانان مشاهده شده است (Dubey et al. 2007b). در مورد پتانسیل زئونوز بودن این انگل هنوز سئوالات زیادی مطرح است (Dubey et al. 2007a). سگ‌ها به عنوان هر دو میزبان واسط و اصلی انگل مطرح هستند (Dubey 2003).

[۱] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز

[۲] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز

[۳*] دانشیار موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران

E-mail: namavari@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۴] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شیراز

در ایران رزمی و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای اولین بار حضور نئوسپورا را در جنین سقط شده گاو گزارش کردند. تحقیقات اولیه در ایران نیز نشان می‌دهد که درصد قابل توجهی از سقط جنین‌های ایجاد شده، ناشی از این عامل است؛ به طوری که مطالعه انجام شده نشان می‌دهد که ۴۶/۲۹ درصد از گاوهای شیری مشهد (Razmi et al. 2007)، ۳۸/۸ درصد گاوهای آبستن گاوداری‌های اطراف تهران (Salehi et al. 2007) و ۳۷ درصد از گاومیش‌های اهواز واجد آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کنینوم* بوده و رابطه‌ی مستقیمی میان سقط و مثبت بودن تیتر سرمی گاو وجود دارد (Hajikolaei et al. 2007). این مطالعات، ضرورت انجام تحقیقات بیش‌تری را در این زمینه مطرح می‌کند. در سال‌های اخیر، مطالعات تجربی ارزشمندی در زمینه‌ی کشت سلول نئوسپورا توسط Mansourian و همکاران در سال ۲۰۰۹، Namavari و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Khodakaram-Tafti و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شده است. Namavari و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که با افزایش تعداد پاساژهای *نئوسپورا کنینوم* و تلقیح آن به تخم مرغ جنین‌دار نژاد گوشتی، از میزان حدت و بیماری‌زایی انگل کاسته شده و در نتیجه، میزان تلفات و ضایعات پاتولوژیک کم‌تری نسبت به پاساژهای پائین‌تر آن ایجاد می‌شود. مطالعات Bartley و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که تزریق سویه‌ی تخفیف حدت یافته با پاساژ طولانی مدت تاکی زوئیت انگل در محیط کشت، سبب محافظت موش‌های Balb/C علیه دوز حاد *نئوسپورا کنینوم* به دلیل تخفیف حدت به وجود آمده در انگل، شد.

آن چه در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته است در مرحله‌ی اول، بررسی پتانسیل کشت و تکثیر تاکی زوئیت‌های *نئوسپورا کنینوم* بر روی سل لاین معلق TLI و سپس توانایی انجام پاساژ متوالی این تک یاخته روی سل لاین مذکور و در نهایت ارزیابی مقایسه‌ای میزان حدت تاکی زوئیت‌های پاساژ داده شده در این سل لاین با سل لاین Vero بوده است. بدین منظور سویه NC-1 موجود در موسسه‌ی رازی شیراز در شرایط آزمایشگاهی (کشت روی رده‌های سلولی مختلف) پاساژ داده شد و در نهایت با استفاده از روش هیستوپاتولوژی و مولکولی میزان حدت در هر گروه، در تخم مرغ جنین‌دار بررسی شد.

مواد و روش کار

در این پژوهش از تاکی زوئیت *نئوسپورا کنینوم* سویه‌ی NC-1 موجود در مؤسسه‌ی رازی شیراز (پاساژ ۳۰ روی سل لاین MARC-145) استفاده شد. کشت انگل طبق روش Dubei و همکاران در سال ۱۹۸۸ انجام شد. به این صورت که پس از کشت سل لاین Vero و تشکیل مونولایر در روز سوم، محیط کشت تازه DMEM همراه با تاکی زوئیت‌های *نئوسپورا کنینوم* به فلاسک کشت سلولی اضافه گردید. محیط کشت شامل DMEM حاوی ۲ درصد سرم جنین گوساله، محلول‌های آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) و ضد قارچ آمفوتریسین (25µg, In vitrogen; USA) بود که در شرایط دمایی ۳۷°C و ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. با بررسی روزانه‌ی فلاسک‌های حاوی نئوسپورا با استفاده از میکروسکوپ معکوس، زمانی که ۹۰–۸۰ درصد سلول‌های Vero با ایجاد ضایعات سلولی توسط تاکی‌زوئیت‌های نئوسپورا تخریب شدند (تقریباً هر سه روز یک بار)، مایع رویی فلاسک‌ها که حاوی تاکی‌زوئیت‌ها بودند جمع‌آوری شدند و جهت جداسازی بقایای سلول‌های Vero، دو بار سانتریفیوژ (۱۰min، rpm ۲۰۰۰) انجام شد. در انتها، تعداد تاکی زوئیت‌های زنده در هر میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار شمارش شد (Dubey and Schares 2006). میزان مشخص و مساوی از تاکی زوئیت‌های به دست آمده در این مرحله (10^6تاکی زوئیت در هر میلی‌لیتر) به منظور آداپته‌سازی به سلول‌های مورد نظر شامل Vero و TLI افزوده شد و به مدت ۲ هفته کشت داده شد. به این صورت که پس از مشاهده حداکثر CPE، تاکی زوئیت-

های موجود در هر فلاسک جمع‌آوری شد و پس از سانتریفیوژ، به فلاسک‌های مونولایر از هر سل لاین افزوده شد.

به منظور مقایسه‌ی پتانسیل تکثیر انگل به وسیله‌ی سلول‌های مختلف در کشت سلولی، تعداد مشخص و یکسان از تاکی زوئیت به دست آمده در مرحله‌ی قبل در مجاورت تعداد مشخصی از سلول‌های نامبرده در بالا (تعداد ۲×۱۰^{۶} تاکی زوئیت روی $۱/۴ \times ۱۰^{۶}$ از هر نوع سلول) در شرایط کاملاً یکسان (محیط کشت DMEM به همراه ۲ درصد سرم گوساله و 1µl/ml پنی‌سیلین-استرپتومایسین و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن) قرار گرفته شد. به مدت چهار روز (تا زمانی که در تمام سلول‌ها CPE ایجاد شود) جهت مقایسه، روزانه مقداری از مایع رویی سلول‌ها جمع‌آوری و ۱۰ میکرولیتر از آن جهت شمارش روی لام هموسیتومتر نئوبار قرار گرفت و تعداد تاکی زوئیت‌های آزاد روی هر سلول شمارش شد و میانگین روزانه‌ی آن‌ها محاسبه و با هم مقایسه شد. در نهایت به منظور بررسی میزان حدت انگل در این دو سل لاین، تاکی زوئیت‌های انگل، به مدت سه ماه، با شرایط کاملاً یکسان، روی این دو سل لاین پاساژ داده شدند. همچنین در این سه ماه، در فواصل زمانی مشخصی (هر دو هفته یک بار)، آلودگی مایکوپلاسمایی کشت سلول‌ها با استفاده از روش PCR و پرایمرهای زیر (Sakhaei et al. 2009) انجام شد:

Forward mgso:
5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'
Reverse gpo3:
5'-GGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'

جهت مقایسه‌ی میزان حدت تاکی زوئیت به دست آمده از هر سلول، ۷۰ تخم مرغ جنین‌دار نژاد لوهمن تهیه و با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. سپس در انکوباتور ضدعفونی شده (با فرمالدهید)، با دمای ۳۷°C، رطوبت ۷۰ درصد، ۸-۶ بار چرخش در ساعت به مدت ۱۸ روز نگهداری شدند. سپس تخم مرغ‌ها به صورت تصادفی به ۷ گروه ده تایی تقسیم شده و با توجه به LD50 به دست آمده در مطالعه منصوریان و همکاران در سال ۲۰۰۹ دوز مشخص و حساب شده‌ای از تاکی زوئیت‌های پاساژ داده شده روی دو سل لاین به شش گروه تخم مرغ‌های جنین‌دار با دوزهای ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ و ۱۵۰۰۰ تاکی زوئیت در میلی‌لیتر تلقیح شد و به گروه هفتم به عنوان گروه کنترل (C) ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی استریل (DMEM) تلقیح شد و محل تزریق جهت جلوگیری از عفونت ناخواسته مسدود شد. تمام تخم مرغ‌ها در شرایط کنترل شده حرارت و رطوبت در دستگاه جوجه‌کشی نگهداری شدند. روزانه دو بار تخم مرغ‌ها جهت بررسی تلفات کندل شدند و میزان مرگ و میر در هر گروه ثبت و از بافت‌های مغز، قلب و کبد آن‌ها نمونه‌برداری انجام شد.

از جنین‌های تلف شده در گروه‌های مختلف تلقیح، ابتدا بازرسی دقیق خارجی به عمل آمد و سپس جهت مطالعات هیستوپاتولوژی از بافت‌های مغز، قلب و کبد نمونه‌برداری انجام شد. پس از تثبیت نمونه‌های بافتی در فرمالین بافر ۱۰ درصد و مراحل آماده‌سازی بافت‌ها، قالب‌گیری با استفاده از پارافین مذاب صورت گرفت. پس از تهیه‌ی برش‌های ۴ تا ۵ میکرونی از قالب‌ها و خنک شدن در محیط آزمایشگاه، رنگ‌آمیزی متداول هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. برای انجام مطالعات ایمنوهیستوشیمی، بعد از بررسی میکروسکوپیک اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با روش H&E، مقاطع بافتی به ضخامت ۴ میکرون از همان قالب‌های پارافینی تهیه شدند. برای رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی مقاطع بافتی و موضعی سازی آنتی‌ژن، از کیت DakoCytomation Envision+ System- HRP (DakoCytomation, K4008, Denmark) با توجه به دستورالعمل کیت استفاده شد. بدین صورت که پس از قرار دادن اسلایدها در محلول زایلل و الکل‌های نزولی، اسلایدها در محلول Dual Endogenous Enzyme Block (پراکسید هیدروژن ۰/۰۳ درصد حاوی سدیم آزاید و لوامیزول؛ پراکسید هیدروژن

جهت خنثی کردن پراکسیدازهای بافتی اندوژن و لوامیزول جهت خنثی کردن آلکالین فسفاتاز اندوژن) قرار داده شدند. بعد از شستشو در محلول PBS، اسلایدها در محلول بافر سیترات جوشانده شده و سپس در دمای اتاق خنک شدند (جهت بلوکه کردن بیوتین آندوژن موجود در میتوکندری‌ها). بعد از شستشو در محلول PBS و خشک شدن اسلایدها، پروتئین بلاک موجود در کیت روی مقاطع قرار داده شد (بلاک به پروتئین می‌چسبد تا آنتی-بادی به پروتئین نچسبد و به آنتی‌ژن خاص خود بچسبد). سپس، آنتی‌بادی اولیه‌ی خرگوش با رقت ۱ به ۱۰۰۰ روی مقاطع بافتی قرار داده شد و سپس با محلول PBS شستشو انجام شد. بعد از آن، محلول Enough Labelled Polymer- HRP (پلیمر نشان‌دار با پراکسیداز کنژوگه با ایمنوگلوبولین بزی ضد موش و خرگوش در بافر تریس-هاش سی ال حاوی پروتئین تثبیت کننده و یک فاکتور ضدمیکروبی) روی مقاطع قرار داده شد و سپس با محلول PBS شستشو انجام شد. بعد از قرار دادن سوبسترا-کروموژن و شستشو در آب مقطر و قرار دادن اسلایدها در محلول هماتوکسیلین، شستشو در آب مقطر انجام شد. در انتها، اسلایدها در محلول الکل‌های صعودی و زایلل قرار داده شدند و پس از مانت کردن، به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

در مطالعات مولکولی، از بافت‌های مغز، قلب و کبد جنین‌های تلف شده در روزهای مختلف انکوباسیون، جهت یافتن ژنوم انگل نمونه‌هایی به وزن تقریبی ۵۰ میلی‌گرم (Kang et al. 2008) در میکروب گرفته شد و تا زمان انجام آزمایش در فریزر۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت استخراج DNA و انجام PCR نمونه‌های گرفته شده از کیت شرکت سیناژن (CinnaGen, Iran) استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده (Kang et al. 2008) در این واکنش که به شرح زیر می‌باشد، قطعات ۳۲۸ جفت باز از ژنوم انگل را شناسایی می‌کند:

F: Np21-plus: 5'–gtg cgt cca atc ctg taa c– 3'
R: Np6-plus: 5'–cag tca acc tac gtc ttc t– 3'

پس از اتمام واکنش، شش میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از loading buffer مخلوط شده و روی ژل اگارز ۱ درصد به وسیله‌ی دستگاه ژل داک مورد مطالعه قرار گرفت.

جهت بررسی معنی‌داری تفاوت میانگین تاکی زوئیت-های آزاد شده از هر سلول از T test (SPSS version 22, IL, USA) و یافته‌های هیستوپاتولوژیک با استفاده از تست ANOVA و تست‌های غیرپارامتری (non-parametric tests; Kruskal- Wallis H and Mann-Whitney U) (SPSS version 22, IL, USA) با در نظر گرفتن درجه‌ی اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج

مقایسه‌ی پتانسیل تکثیر انگل به وسیله‌ی سلول‌های مختلف در کشت سلولی

میانگین نتایج شمارش روزانه در چهار روز متوالی بعد از عفونت در هر دو سل لاین، در جدول ۱ نشان داده شده است. در این نتایج، در هر دو سل لاین Vero, TLI از روز یک تا روز چهار، تعداد تاکی زوئیت‌های آزاد شده از سلول‌ها سیر صعودی نشان دادند که در هر چهار روز شمارش، میانگین تعداد تاکی زوئیت‌های رها شده از سل لاین TLI، نزدیک به میانگین تعداد تاکی زوئیت‌های رها شده از سلول Vero بوده است و این اختلاف میانگین، از نظر آماری، معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

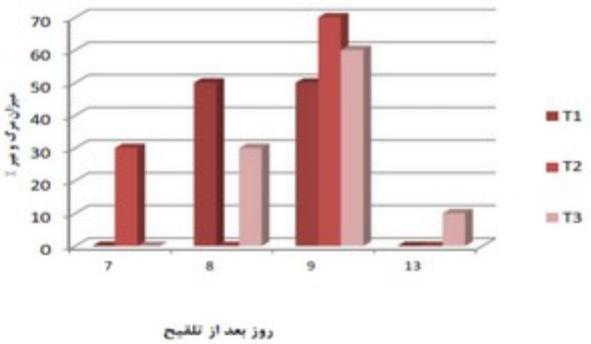
جدول ۱: نتایج شمارش تاکی زوئیت‌های رها شده از سل لاین‌های Vero و TLI در طول چهار روز بعد از عفونت

	تعدادتاکی زوئیت $۱۰^۴$				
نوع سل لاین	روز یک	روز دو	روز سه	روز چهار	میانگین
Vero	۳/۵±۰/۵	۶/۲۵±۱/۳	۲۱/۲۵±۳/۷	۲۴/۲±۲/۲	۱۳/۸
TLI	۲/۲۵±۰/۲۵	۴/۵±۰/۹۵	۱۷/۷۵±۳/۵	۲۰/۸۵±۱/۷	۱۱/۸۳

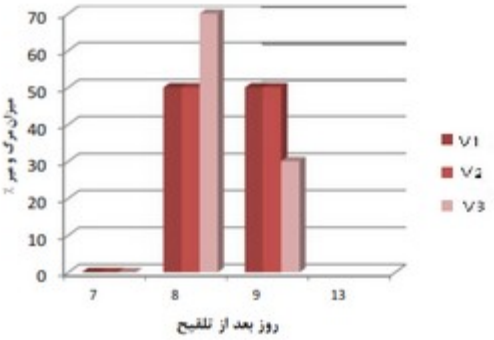
نتایج بررسی آلودگی مایکوپلاسمایی محتویات فلاسک‌های کشت سلولی با استفاده از روش مولکولی PCR، به کمک پرایمرهای mgso و gpo3 منفی بود.

میزان مرگ و میر در جنین‌های تخم مرغ

نتایج میزان مرگ و میر در جنین‌های تخم‌مرغ در گروه‌های مختلف آزمایش به صورت مقایسه‌ای در نمودار ۱ آمده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که از روز هفتم بعد از تلقیح تلفات در جنین‌ها آغاز شد (در گروه T2) و میزان مرگ و میر در شش گروه V و T وابسته به دوز تلقیح شده بود، به این صورت که در دوزهای بالاتر، مرگ و میر 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). تنها یک جنین در گروه T3 در روز ۱۳ بعد از تلقیح تلف شد. در گروه کنترل (تلقیح شده با محیط کشت)، تمام جوجه‌ها به صورت زنده متولد شدند.



میزان مرگ و میر در گروه های TLI



میزان مرگ و میر در گروه های Vero

نمودار ۱: مقایسه‌ی میزان مرگ و میر در گروه‌های مختلف آزمایش در روزهای مختلف بعد از تلقیح

یافته‌های ماکروسکوپیک

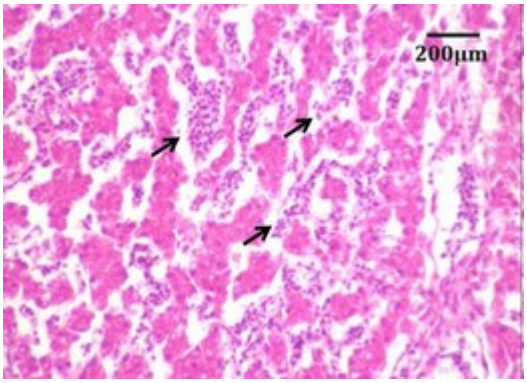
در بررسی ماکروسکوپیک جنین‌های مرده در گروه‌های مختلف T, V ، در بافت‌های مختلف مغز، قلب و کبد هیچ گونه ضایعه‌ای مشاهده نشد. ضایعات ماکروسکوپیک در تخم مرغ‌های جنین‌دار شامل پرخونی سطح بدن (تصویر ۱) و خون‌ریزی در سطح داخلی پوسته‌ی تخم‌مرغ بود که این خون‌ریزی در سطح داخلی پوسته‌ی تخم‌مرغ به ویژه در گروه‌های با دوز بالاتر تلقیح، شدیدتر بود.

تصویر ۱: گروه آزمایش V2, T2. پرخونی در سطح بدن جنین تلف شده.

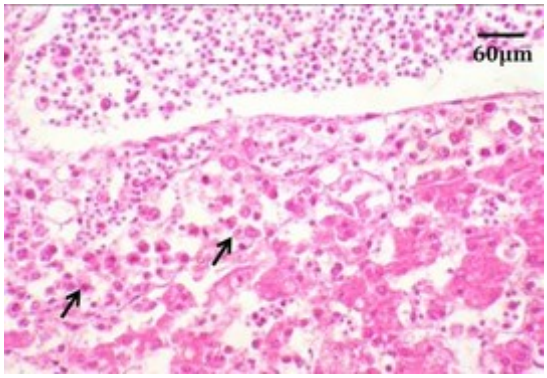
یافته‌های هیستوپاتولوژی

مقاطع تهیه شده از بافت‌های مختلف که مورد رنگ-آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین قرار گرفته بودند، به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. ضایعات میکروسکوپیک در بافت‌های کبد و قلب شامل خون‌ریزی، پرخونی، نکروز و آماس بافت بود. آماس بافتی با نفوذ منتشر یا تجمع کانونی سلول‌های آماسی تک هسته‌ای شامل لنفوسیت، پلاسماسل و به ویژه ماکروفاژ در بافت کبد در پارانشیم و اطراف عروق و در بافت قلب بین سلول‌های میوکارد قلب تشخیص داده شد (تصاویر ۲ و ۳). در گروه‌های آزمایش ضایعات ایجادی تقریباً مشابه بود که به صورت پرخونی شدید، خون‌ریزی و نکروز بودند که با افزایش دوز تاکی زوئیت‌های تلقیح شده، شدت ضایعات هم بیش‌تر بود. در هیچ کدام از گروه‌های مورد آزمایش، اثری از آماس در بافت مغز مشاهده نشد. در نمونه‌های بافتی جوجه‌های گروه کنترل هیچ گونه ضایعه‌ی هیستوپاتولوژیک مشاهده نشد.

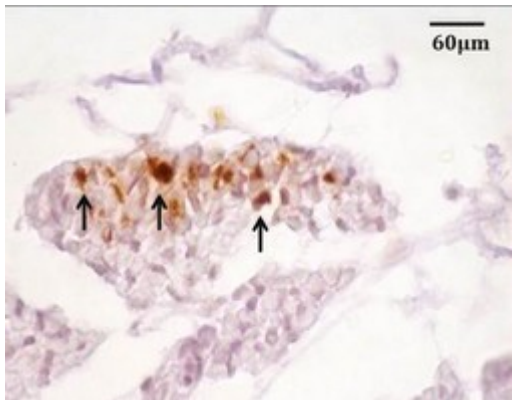
تمام بافت‌هایی که با استفاده از روش مولکولی قطعه‌ی تکثیر شده ژنوم *نئوسپورا کنینوم* در آن‌ها تشخیص داده شد با IHC نیز مورد بررسی قرار گرفت که در اکثر موارد در مقاطع رنگ‌آمیزی شده حضور تاکی زوئیت *نئوسپورا کنینوم* تشخیص داده شد. علی‌رغم این که در مقاطع رنگ‌آمیزی شده به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین هیچ اثری از آماس در مقاطع تهیه شده از بافت مغز مشاهده نشد. در بافت کبد، غالباً تاکی زوئیت‌ها در سیتوپلاسم سلول‌های بافت همبند و اندوتلیوم عروق وجود داشتند. مقاطع بافت قلب، اطراف سلول‌های میوکارد قلب حضور تاکی زوئیت را نشان دادند (تصویر ۴). در اکثر موارد، تاکی زوئیت‌ها در سیتوپلاسم سلول-های بافت همبند، اندوتلیوم عروق و پارانشیم مغز مشاهده شدند (تصویر ۵). از نظر IHC، در دوزهای مختلف گروه‌های مختلف، تفاوت چشم‌گیری مشاهده نشد.



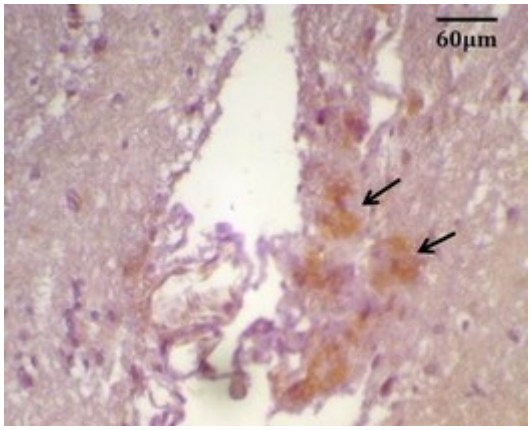
تصویر ۲: گروه آزمایش T3. بافت کبد. اتساع و پرخونی شدید سینوزوئید های کبدی (پیکان ها) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).



تصویر ۳: گروه آزمایش V2. بافت کبد. نفوذ سلول‌های آماسی تک هسته‌ای (پیکان‌ها) در اطراف عروق و پرخونی سیاهرگ مرکزی کبد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).



تصویر ۴: گروه آزمایش T2. بافت قلب. حضور تاکی زوئیت *نئوسپورا کنینوم* (پیکان‌ها) در لایه‌ی عضلانی قلب (رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی).



تصویر ۵: گروه آزمایش V3. بافت مغز. حضور تاکی زوئیت *نئوسپورا کنینوم* (پیکان‌ها) در اطراف اندوتلیوم عروق (رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی).

یافته‌های مولکولی

به منظور جستجوی قطعه‌ی تکثیر شده‌ی ژنوم *نئوسپورا کنینوم*، تمام بافت‌های نمونه‌برداری شده با استفاده از تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. در بافت مغز در گروه‌های مختلف تلقیح V, T (V1, V2, V3- T1, T2, T3) قطعه‌ی تکثیر شده ژنوم نئوسپورا شناسایی شد در حالی که بافت قلب و کبد در دوزهای بالاتر (V2, V3-T2, T3) حضور قطعه‌ی تکثیر شده ژنوم را نشان دادند.

بحث

در حال حاضر از تکنیک کشت سلولی جهت جداسازی، تکثیر، تشخیص و تخفیف حدت انگل *نئوسپورا کنینوم* به صورت گسترده‌ای استفاده می‌شود (Dubey and Schares 2006, Reichel et al. 2007). *نئوسپورا کنینوم* برای کشت به رده‌ی سلولی خاصی وابسته نیست. هم اکنون نئوسپورا بیش‌تر بر روی رده‌های سلولی از جمله سلول Vero (Cadore et al. 2009, Kang et al. 2008, Lv et al. 2010)، سلول‌های تک هسته‌ای گاو (Tuo et al. 2005) و سلول‌های آنژیواندوتلیال گاو (Omata et al. 2005) کشت داده می‌شود. از بین تمام سلول‌های نامبرده، سلول Vero متداول‌ترین رده‌ی سلولی استفاده شده جهت کشت *نئوسپورا کنینوم* می‌باشد (Kang et al. 2008, Vonlaufen et al. 2004). گاهی مواقع مشکلاتی در زمینه‌ی سرعت تکثیر انگل و تأمین مواد مغذی مورد نیاز در محیط کشت سلولی آن مشاهده شده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر حساسیت رده‌های مختلف سلولی به این تک یاخته مورد بررسی قرار گرفته است.

در مطالعه‌ی حاضر حساسیت و پتانسیل تکثیری سل لاین TLI با سل لاین Vero به *نئوسپورا کنینوم* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است. نتایج به دست آمده پتانسیل تکثیری تقریباً مشابهی را در دو سل لاین نامبرده نشان داد و یک روند افزایشی در میانگین روزانه تعداد تاکی زوئیت‌های آزاد شده، از روز اول تا روز چهارم بعد از تلقیح انگل به فلاسک‌های کشت سلولی مشاهده شد. به این صورت که در روز اول و دوم، تعداد کمی تاکی زوئیت آزاد مشاهده شد. در روز سوم، همزمان با آغاز CPE در سلول‌ها، تعداد زیادی تاکی زوئیت از سلول‌های متلاشی شده آزاد شد که این میزان در روز چهارم به حداکثر خود رسید که در این شرایط بیش از ۹۰ درصد سلول‌های میزبان متلاشی شده بودند. البته از نظر آماری، در روزهای مختلف بعد از تلقیح انگل، تفاوت معنی‌داری

بین میانگین روزانه تعداد تاکی زوئیت‌های رها شده از این دو سل لاین مشاهده نشد (p>۰/۰۵). در مطالعه‌ای که Cadore و همکاران در سال ۲۰۰۹ حساسیت سل لاین-های مختلف را به *نئوسپورا کنینوم* بررسی کردند، سل لاین Vero را به عنوان بهترین سل لاین معرفی کردند و حساسیت سل لاین MA-104 به تکثیر *نئوسپورا کنینوم* را در حد خوبی ارزیابی کردند که نتایج مشاهده شده در مطالعه‌ی حاضر نیز شبیه آن می‌باشد.

همچنین نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر حاکی از این است که سلول‌های TLI به آسانی توسط تاکی زوئیت *نئوسپورا کنینوم* آلوده می‌شوند و در مقایسه با سل لاین Vero قدرت تکثیری مناسبی برای تاکی زوئیت‌های *نئوسپورا کنینوم* را دارا می‌باشد. نتایج حاصله تأیید کننده‌ی این نکته است که تاکی زوئیت *نئوسپورا کنینوم* قادر است انواعی از سلول‌ها شامل سلول‌های گاو، گوسفند، سگ، گربه، موش، میمون و انسان را آلوده کرده و در آن‌ها تکثیر یابد (Kang et al. 2008, Lei et al. 2005, Vonlaufen et al. 2004). نکته‌ی قابل اهمیت در مورد سل لاین TLI این است که با توجه به این که منشاء این سلول لنفوسیتی می‌باشد، این سل لاین به عنوان یک کشت معلق برای *نئوسپورا کنینوم* مطرح بوده که در محیط آزمایشگاه، شرایط کشت و پاساژ سلول‌ها و تکثیر تاکی زوئیت‌ها، به مراتب آسان‌تر و کم هزینه‌تر از سل لاین‌های چسبنده مثل Veroمی‌باشد. سل لاین‌های معلق در مقایسه با محیط کشت چسبنده بدون نیاز به جداسازی مکانیکی یا آنزیمی (بدون نیاز به تریپسین) سلول‌های آن، باعث کشت سریع‌تر و پاساژ آسان‌تر عوامل عفونی می‌شوند، از این رو جهت تولید انبوه عوامل عفونی مناسب هستند (Assoian1997, Folkman and Moscona 1978, Griffiths 2001). در این پژوهش برای اولین بار از سلول‌های معلق جهت تکثیر تاکی زوئیت‌های *نئوسپوراکنینوم* استفاده شده است. در چند مطالعه‌ی تجربی از رده‌ی سلولی معلق TG180 با منشاء سلول‌های سارکومای موش (Couatarmanach et al. 1991) و سلول Hela (سلول سرطانی گردن رحم انسان) (Sakurai et al. 1987) جهت تکثیر و جداسازی *توکسوپلاسما گوندئی* استفاده شده است. در مطالعه‌ای که ایوانس و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی کشت مداوم *توکسوپلاسما گوندئی* انجام دادند، عملکرد بهتری را از سل لاین‌های Hela و LLC نسبت به سل لاین Vero مشاهده کردند.

در مطالعه‌ی حاضر، بعد از کشت و تکثیر موفقیت‌آمیز نئوسپورا در سل لاین TLI، به منظور مقایسه‌ی میزان حدت تاکی زوئیت‌های به دست آمده از سل لاین TLI با سل لاین Vero، تاکی زوئیت‌های انگل به مدت سه ماه روی این سلول‌ها به صورت متوالی پاساژ داده شدند. Bartley و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که در پاساژهای متوالی و طولانی مدت علاوه بر این که سرعت تکثیر انگل افزایش می‌یابد، حدت انگل نیز کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ی حاضر از تخم مرغ جنین‌دار به عنوان مدل آزمایشگاهی به منظور بررسی میزان حدت انگل پاساژ داده شده روی رده‌های مختلف سلولی نیز استفاده شده که محققان قبلی علل عمده‌ی استفاده از آن را ارزان و در دسترس بودن (Furuta et al. 2007) و نیز پایین بودن میزان LD50 (Mansourian et al. 2009) آن مطرح کرده-اند. از طرف دیگر، میزان ایمنی در تخم مرغ جنین‌دار نسبت به سایر حیوانات آزمایشگاهی کم‌تر است. این نکته باعث تکثیر انگل در تخم مرغ به صورت تاکی زوئیت می‌شود که در تهیه‌ی واکسن زنده بسیار ارزشمند است. همچنین Namavari و همکاران در سال ۲۰۱۱ تخم مرغ جنین‌دار را به عنوان مدل آزمایشگاهی مناسبی جهت بررسی حدت انگل *نئوسپورا کنینوم* معرفی کردند.

در گروه‌های مختلف تلقیح تفاوتی بین مرگ و میر گروه Vero, TLI مشاهده نشد (در دو گروه مرگ و میر ۱۰۰ درصد وجود داشت) که نتایج حاصله نشان می‌دهد که تاکی زوئیت‌های پاساژ داده شده به وسیله‌ی دو سل لاین از نظر میزان حدت، تفاوتی نشان ندادند. Chamberland و Current در سال ۱۹۹۱ تاکی زوئیت‌های *توکسوپلاسما گوندئی* پاساژ داده شده در کشت سلولی

(روی سل لاین ماکروفاژ موش) و صفاق موش را به گروه‌های ده تایی موش تلقیح کردند که تفاوتی بین حدت دو گروه تاکی زوئیت‌های به دست آمده مشاهده نکردند. البته در گروه‌های مورد مطالعه در پژوهش مذکور، مانند مطالعه‌ی Mansourian و همکاران در سال ۲۰۰۹ مرگ و میر وابسته به دوز مشاهده شد.

در مطالعه‌ی حاضر، وجود خون‌ریزی در سطح داخلی پوسته‌ی تخم مرغ تنها ضایعه‌ی ماکروسکوپیک مشاهده شده بود که شدت آن در تخم مرغ‌های تلقیح شده با دوز بالاتر شدیدتر بود. نتایج بررسی ضایعات ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک در بافت‌های مورد آزمایش جنین‌های تخم مرغ در این مطالعه مشابه مطالعه Furuta و همکاران در سال ۲۰۰۷، Mansourian و همکاران در سال ۲۰۰۹، Namavari و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Khodakaram-Tafti و همکاران در سال ۲۰۱۲، شامل هپاتیت و میوکاردیت غیرچرکی تک هسته‌ای بود. Khodakaram-Tafti و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان آنتی ژن *نئوسپورا کنینوم* در رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی را به صورت زیاد، متوسط و کم درجه‌بندی کردند. در اکثر موارد آنتی‌ژن-های *نئوسپورا کنینوم* را در سیتوپلاسم سلول‌های بافت همبند و اندوتلیوم عروق مشاهده نمودند که با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد.

در مطالعه‌ی حاضر آزمایش‌های مولکولی نسبت به ایمنوهیستوشیمی، میزان حساسیت بیش‌تری را در تشخیص حضور آنتی‌ژن *نئوسپورا کنینوم* در بافت‌ها، به خصوص بافت مغز نشان داد. به این صورت که در هیچ کدام از گروه‌های مورد آزمایش، در مقاطع تهیه شده با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین از بافت مغز، اثری از آماس مشاهده نشد و در مقاطع تهیه شده با رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی میزان تاکی زوئیت، کم تا متوسط بود. در حالی که نتایج PCR حضور باندهای واضحی از قطعه‌ی تکثیر شده ژنوم *نئوسپورا کنینوم* با ۳۲۸ جفت باز را نشان داد. Dubey و Schares در سال ۲۰۰۶ روش PCR را به عنوان یک روش مهم در تشخیص حضور ژنوم *نئوسپورا کنینوم* در بافت‌ها مطرح کردند. البته در آزمایشگاه‌های تشخیصی مختلف، معمولاً از روش‌های PCR و IHC جهت شناسایی عفونت *نئوسپورا کنینوم* استفاده می‌شود که معمولاً هم‌خوانی مناسبی بین این دو روش وجود دارد (Van-Maanen et al. 2004).

با توجه به طبیعت داخل سلولی انگل *نئوسپورا کنینوم* و درگیری سیستم ایمنی سلولی، پاسخ‌های ایمنی حاصل نقش مهمی جهت محافظت در برابر انگل دارند. با توجه به این نکات و عدم وجود داروی مناسب علیه این بیماری، روش‌های کنترل عفونت *نئوسپورا کنینوم*، به طرف تولید واکسن‌های مؤثر سوق یافته است. یکی از روش‌های مهم تولید واکسن بر علیه تک یاخته‌ها تخفیف حدت انگل زنده در کشت سلول می‌باشد. به منظور تولید واکسن توکسوپلاسما (توکسوواکس) که بسیار شبیه به *نئوسپورا کنینوم* می‌باشد، جهت پاساژهای متوالی *توکسوپلاسما گوندئی*، از موش به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شده است که مراحل تزریق تاکی زوئیت‌ها و پاساژ دادن آن‌ها در صفاق موش در مقایسه با کشت سلولی بسیار پر هزینه‌تر و دشوارتر می‌باشد. همچنین برداشت و خالص‌سازی تاکی زوئیت‌های پاساژ داده شده در محوطه‌ی صفاقی موش به مراتب دشوارتر از کشت سلولی می‌باشد. به همین دلیل امروزه جهت تولید اغلب واکسن‌ها، روش‌های کشت سلولی به دلیل آسان‌تر بودن و کم هزینه‌تر بودن به صورت جدی مورد توجه قرار گرفته است. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سل لاین TLI از نظر توان تکثیر و همچنین تأثیر بر میزان حدت انگل، بسیار شبیه به سل لاین Vero عمل می‌کند. با این برتری که کار کردن با سل لاین TLI (که یک سل لاین معلق می‌باشد)، در جهت تولید میزان انبوه تاکی زوئیت انگل، بسیار آسان‌تر و ارزان‌تر از سل لاین Vero (که یک سل لاین چسبنده می‌باشد) می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از موسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز، دانشکده‌ی دامپزشکی شیراز و آزمایشگاه پاتولوژی دکتر دانشبد کمال تشکر را دارند.

منابع

صدربزاز، علیرضا (۱۳۸۳). بررسی آلودگی به نئوسپورا کنینوم با روش IFA و بررسی آسیب‌شناسی و جداسازی تک یاخته از جنین‌های سقط شده در گاوهای شیری برخی از گاوداری‌های مشهد. پایان‌نامه دکترای تخصصی انگل‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۹۸.

Assoian, R.K. (1997). Anchorage-dependent cell cycle progression. Journal of Cell Biology, 136: 1-4.

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.

Cadore, C.C.; Vogel, F.S.; Flores, E.F.; Sangioni, L.A. and Camillo, G. (2009). Susceptibility of cell lines and primary cell cultures to *Neospora caninum*. Ciencia Rural, Santa Maria 39 (5): 1581-1585.

Chamberland, S. and Current, L.W. (1991). Use of mouse macrophage cell lines for *in vitro* propagation of *Toxoplasma gondii* RH tachyzoites. Proceedings of the Society Experimental Biology Medicine, 150-157.

Couatarmanach, A.; Andre, P.; Le Minous, D.; Martin, L.; Robert, R. and Deunff, J. (1991). *In vitro* culture and cloning of *Toxoplasma gondii* in a newly established cell line derived from TG180. International Journal for Parasitology 21, 129-132.

Dubey, J.P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean Journal of Parasitology. 41: 1-16.

Dubey, J.P.; Carpenter, J.L.; Speer, C.A.; Topper, M.J. and Uggla, A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association, 192: 1269-1285.

Dubey, J.P. and Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. Veterinary Parasitology, 141: 1-34.

Dubey, J.P.; Alvarado-Esquivel, C.; Liesenfeld, O.; Herrera-Flores, R.G.; Ramirez-Sanchez, B.E.; Gonzalez-Herrera, A. et al. (2007a). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Durango city, Mexico. Journal of Parasitology. 93: 1033-1035.

Dubey, J.P.; Schares, G. and Ortega-Mora, L.M. (2007b). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clinical Microbiology Reviews, 20: 323-367.

Evans, R.; Chatterton, J.M.W.; Ashburn, D.; Joss, A.W.L. and Ho-Yen D.O. (1999). Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 18: 879-884.

Folkman, J. and Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. Nature, 273: 345-349.

Furuta, P.I.; Mineo, T.W.P.; Carrasco, A.O.T.; Godoy, G.S.; Pinto, A.A. and Machado, R.Z. (2007). *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. Parasitology, 34: 1931-1939.

Griffiths, B. (2001). Scale-up of suspension and anchorage-dependent animal cells. Molecular Biotechnology, 17: 225-238.

Hajikolaei, M.R.H.; Goraninejad, S.; Hamidinejat, H.; Ghorbanpour, M. and Paryab, R. (2007). Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bulalis*) from the south-western region of Iran. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 51: 233-235.

Kang, S.W.; Kweon, C.H.; Lee, E.H.; Choe, S.E.; Jung, S.C. and Quyen, D.V. (2008). The differentiation of transcription between tachyzoites and bradyzoites of *in vitro* cultured *Neospora caninum*. Parasitology Research, 103: 1011-1018.

Khodakaram-Tafti, A.; Mansourian, M.; Namavari, M. and Hosseini, A. (2012). Immunohistochemical and polymerase chain reaction studies in *Neospora caninum* experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. Veterinary Parasitology, 188: 10-13.

Lei, Y.; Davey, M. and Ellis, J.T. (2005). Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines *in vitro*. Parasitology, 131: 583-590.

Lv, Q.; Li, J.; Gong, P.; Xing, S. and Zhang, X. (2010). *Neospora caninum*: *in vitro* culture of tachyzoites in MCF-7 human breast carcinoma cells. Experimental Parasitology, 126: 536-539.

Mansourian, M.; Khodakaram-Tafti, A. and Namavari, M. (2009). Histopathological and clinical investigations in *Neospora caninum* experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. Veterinary Parasitology, 166: 185-190.

Namavari, M.; Mansourian, M.; Khodakaram-Tafti, A.; Hosseini, M.H.; Rahimiyan, A.; Khordadmehr, M. and Lotfi, M. (2011). Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of *Neospora caninum* tachyzoites. Comparative Clinical Pathology, 1346-1349.

Omata, Y.; Kano, R.; Masukata, Y.; Kobayashi, Y.; Igarashi, M.; Maeda, R. and Saito, A. (2005). Development of *Neospora caninum* cultured with human serum *in vitro* and *in vivo*. Journal of Parasitology, 91: 222-225.

Razmi, G.R.; Maleki, M.; Farzaneh, N.; Talebkhan Garoussi, M. and Fallah, A.H. (2007). First report of Neospora caninum-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. Parasitology Research, 100: 755-757.

Reichel, M.P.; Ellis, J.T. and Dubey, J.P. (2007). Neosporosis and hammondiosis in dogs. Journal of Small Animal Practice, 48: 308-312.

Sakhaei, D.; Pourbakhsh, S.A.; Banani, M.; Lotfi, M.; Akhlaghi, F. and Asli, E. (2009). Using PCR and culture methods for *Mycoplasma* testing in poliomyelitis vaccine. Archives of Razi Institute, 64 (2): 109-114.

Sakurai, H.; Tegoshi, T.; Takagi, T.; Saito, A.; Suzuki, A. and Seitz, H.M. (1987). Long term *in vitro* suspension culture of toxoplasma and HeLa cells. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, A 264: 468-471.

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

Tuo, W.; Fetterer, R.; Jenkins, M. and Dubey, J.P. (2005). Identification and characterization of *Neospora caninum* cyclophilin that elicits gamma interferon production. Infection and Immunity, 73: 5093-5100.

Van Maanen, C.; Wouda, W.; Schares, G.; von Blumröder, D.; Conraths, F.J.; Norton, R. et al. (2004). An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. Veterinary Parasitology, 126: 351-364.

Vonlaufen, N.; Guetg, N.; Naguleswaran, A.; Muller, N.; Bjorkman, C.; Schares, G. et al. (2004). In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in Vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. Infection and Immunity, 72: 576-583.

Comparison of propagation and continuous passages of *Neospora caninum* tachyzoites in Vero and TLI cell lines

Khordadmehr, M.[1]; Zehtab-Najafi, M.[1]; Namavari, M.[2] and Khodakaram-Tafti, A.[3]

Received: 16.11.2016 Accepted: 10.03.2016

Abstract

Neospora caninum causes major bovine abortions and neonatal mortality in cattle, sheep, goat and horse. Vero cells are the most frequently used cell line for culture of *Neospora caninum* but problems are with propagation and required level of nutritional components for the media persist. In this study the tachyzoite yields of *N. caninum* were compared in two cell lines: Vero (African green monkey kidney) and suspension culture *Theileria lestoquardi*-infected lymphoblastoid (TLI) cell lines. Then, *N. caninum* were continuously passaged in these cell lines for 3 months and the effect of host cells on virulence of tachyzoites was assessed by broiler chicken embryonated eggs. Inoculation was performed in the chorioallantoic (CA) liquid of the embryonated eggs with different dilutions (0.5×10^4, 1.0×10^4, 1.5×10^4 / µl) of tachtzoites isolated from these cell cultures. The mortality pattern and pathological changes of the dead embryos and hatched chickens were noted. Tissue samples of brain, liver and heart were examined by histopathological and detection of DNA of parasite by polymerase chain reaction (PCR). Also, consecutive sections of the tissues examined histologically were used for immunohistochemical (IHC) examination. Results of the present study did not show any significant differences in number of tachyzoites harvested from both cell line and also in mortality rate of inoculated embryonated eggs. Attenuation of virulence after 3 months continuous passages of suspension culture of TLI cell line was not different with Vero cell line which the results were confirmed by histopathology, IHC and PCR. Continuous passage of *Neospora caninum* in both cell lines suggesting that TLI cells could be used for vaccine production.

Key words: *Neospora caninum*, Cell culture, Vero cell line, TLI cell line

1- Assistant Professor Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Iran
2- Graduated . Veterinary Medicine, University of Tabriz, Iran
3- Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran
Corresponding Author: Namavari, M., E-mail: namavari@yahoo.com