نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۱؛ ۱۶(۲):۷۳-۸۰.
https://doi.org/10.22034/IJVCS.2022.13856.10166

ارزیابی واکسن تجربی *توکسوپلاسما گوندئی* در گربه

رقیه رمضانپور رونیزی[۱]، محمد مهدی نام آوری[۲*]، الهام معظمیان[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز- ایران.
۲. موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازیف سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز- ایران.

دریافت: ۲۳ اردیبهشت‌ماه ۱۴۰۱ **پذیرش:** ۲ آبان‌ماه ۱۴۰۱

چکید

توکسوپلاسما گوندئی یک انگل داخل سلولی بیماری‌زا با طیف وسیعی از میزبان است. گربه به عنوان میزبان نهایی نقش مهمی در آلودگی اکوسیستم و سایر میزبان‌ها دارد؛ از این‌رو جلوگیری از دفع اووسیست *توکسوپلاسما* در گربه نقش به‌سزایی در کنترل بیماری دارد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی واکسن آزمایشی تخفیف حدت یافته تهیه شده در موسسه رازی به منظور جلوگیری از دفع اووسیست توسط گربه است. در این مطالعه ده سر گربه نر بومی به صورت تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول سوش تخفیف حدت یافته و گروه دوم به عنوان کنترل محیط کشت دریافت کردند. ایمن‌سازی طی دو مرحله، به فاصله ۲۱ روز و به صورت تزریق زیر پوستی انجام گرفت. علایم بالینی و تغییرات رفتاری از شروع آزمایش تا یک ماه پس از تزریق دوم به صورت روزانه مشاهده و ثبت گردید. یک ماه پس از تزریق دوم، تمامی گربه‌ها با سوش PRU به صورت خوراکی چالش شدند. آزمایش سرولوژیک آگلوتیناسیون و نتایج تست مولکولی به ترتیب نشان از ایجاد پاسخ ایمنی و ایمنی محافظت کننده به صورت معنی‌داری در گروه واکسینه نسبت به گروه کنترل بوده است ($p<0/05$). در مجموع ارزیابی سوش تخفیف حدت یافته روی گربه به عنوان یک واکسن آزمایشی نشان داد که این واکسن علاوه بر ایجاد پاسخ ایمنی و کنترل دفع اووسیست، بیماری‌زایی خاصی هم در گروه واکسینه ایجاد نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: *توکسوپلاسما گوندئی*، واکسن زنده تخفیف حدت یافته، پاسخ ایمنی، گربه، دفع اووسیست.

مقدمه

توکسوپلاسما گوندئی (Toxoplasma gondii) یک تک یاخته درون سلولی اجباری است که در سراسر جهان گسترش دارد (۱۴). این تک یاخته عامل بیماری توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) در انسان و حیوانات است و موجب سقط و آسیب جنینی در انسان و حیوانات می‌گردد (۷).

چرخه جنسی انگل در روده گربه‌سانان است که منجر به تشکیل و دفع اووسیست از طریق مدفوع آن‌ها می‌شود. تکثیر غیر جنسی انگل در طیف وسیعی از میزبان‌های حد واسط مانند انسان و یا سایر مهره‌داران انجام می‌گردد(۹). گربه‌هایی که برای اولین بار به انگل آلوده می‌شوند، در یک بازه زمانی ۱- ۲ هفته ده‌ها میلیون اووسیت در مدفوع خود دفع می‌کنند و باعث آلودگی خاک، آب، و مواد غذایی می‌شوند (۱۱).

شیوه‌های متفاوتی برای محافظت حیوانات و انسان در برابر توکسوپلاسموزیس صورت گرفته است. بهترین روش پیش‌گیری از بیماری، استفاده از واکسن است چون ایمنی نسبتاً طولانی و مؤثرتری را ایجاد می‌کند. تعدادی از سویه‌های جهش یافته و سویه‌های زنده، میکروب کشته شده، DNA یا آنتی‌ژن نوترکیب به شکل آزمایشی برای مطالعه توانایی آن‌ها در تشکیل ایمنی در حیوانات علیه انتقال مادرزادی *توکسوپلاسما* یا دوز کشنده *توکسوپلاسما* به کار برده شده‌اند (۱۳). با این حال، تاکنون هیچ نتیجه

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: namavari@yahoo.com

متقاعد کننده‌ای به‌دست نیامده است. تنها واکسن تجاری علیه توکسوپلاسموز، توکسوواکس (Toxovax) است که از سوش زنده تخفیف‌حدت‌یافته تهیه شده و فقط برای مقابله با انتقال مادرزادی و سقط در گوسفند استفاده می‌شود (۲۲)، در نتیجه تلاش برای تهیه واکسن همچنان ادامه دارد.

واکسن‌های سوش زنده تحفیف حدت یافته امیدوارکننده‌ترین نتایج را از لحاظ ایمنی نشان داده‌اند. به منظور تولید واکسن‌های مؤثر در تک یاخته‌هایی همانند *تیلریا*، *لیشمانیا* و *بابزیا* نیز از سوش تحفیف حدت‌یافته استفاده شده است که بهترین عملکرد را داشته و به مرحله تجاری رسیده‌اند (۴، ۱۶ و ۲۷). در همین راستا، در مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، یک مدل تجربی واکسن زنده تخفیف حدت یافته علیه *توکسوپلاسما گوندئی* تهیه شده است.

از اهداف مهم واکسناسیون علیه *توکسوپلاسما گوندئی* در گربه، جلوگیری یا کاهش دفع اووسیست انگل و پیشگیری از گسترش بیماری است (۱۷)، بنابراین در این مطالعه برای ایجاد ایمنی‌زایی علیه *توکسوپلاسما گوندئی* در گربه از سوش تخفیف‌حدت‌یافته‌ای که نتایج موفقیت آمیزی نیز در مطالعات قبلی در موش، تخم‌مرغ جنین‌دار و گوسفند به همراه داشته(۱، ۲۵ و ۲۸)، استفاده شد و علاوه بر بررسی بیماری‌زا نبودن سوش مزبور در گربه، میزان ایمنی‌زایی و جلوگیری از دفع اووسیست در گربه ارزیابی شد.

مواد و روش کار

برای انجام این پژوهش، از گربه‌های بومی با نژاد DSH (Domestic Short Hair) با جنسیت نر و با سن ۳ تا ۶ ماهگی استفاده شد. گربه‌ها با از تله، زنده‌گیری شدند. پیش از شروع آزمایش، با بررسی بالینی وضعیت ظاهری و انجام تست مولکولی با استفاده از نمونه مدفوع (۳۰)، از سلامت و آلوده نبودن گربه‌ها به *توکسوپلاسما* اطمینان حاصل گردید، سپس ۱۰ گربه به صورت تصادفی به دو گروه ۵ تایی؛ واکسینه و کنترل تقسیم شدند. در طول دوره مطالعه غذا و آب به‌طور آزاد در اختیارشان قرار گرفت، همچنین تمام مراحل کار طبق اصول کمیته مراقبت و رفتار با حیوانات آزمایشگاهی موسسه واکسن و سرم سازی رازی و نیز طبق شناسه کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.1400.098 انجام گرفت.

در این پژوهش از واکسن زنده تخفیف‌حدت‌یافته استفاده شد. سوش تخفیف‌حدت‌یافته *توکسوپلاسما گوندئی*، در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز با پاساژ طولانی مدت، روی رده سلولی Vero، تهیه شد. برای این منظور، تاکی‌زوئیت‌های *توکسوپلاسما گوندئی* همراه با محیط کشت DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک در فلاسک کشت سلولی، کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگه‌داری شد. این سویه برای دویست بار در محیط ذکر شده پاساژ داده شد تا بیماری‌زایی آن برای گربه از بین برود. به گروه واکسینه تعداد ۲۵×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت سوش تخفیف حدت یافته به صورت زیر جلدی در حجم ۰/۵ سی‌سی تزریق شد. گروه کنترل مقدار ۰/۵ سی‌سی محیط کشت DMEM دریافت کردند. تمام مراحل ایمن‌سازی در دو مرحله با فاصله سه هفته (۲۱ روز) انجام شد.

طی مراحل انجام آزمایش گربه‌ها به‌صورت روزانه از نظر علایم ظاهری و بالینی ارزیابی شدند. ۲۱ روز بعد از تزریق واکسن، خون‌گیری صورت گرفت و سپس دوز دوم ایمن‌سازی و خون‌گیری همانند مرحله اول انجام شد. خون‌گیری از رگ سفالیک (Cephalic vein) گربه انجام گرفت. یک ماه پس از ایمن سازی مرحله دوم، برای انجام چالش، طبق روش زولپو و همکاران در سال ۲۰۱۷، از مغز موش آلوده به *توکسوپلاسما گوندئی* استفاده شد. موش‌ها با سوش حاد PRU- که قادر به تولید کیست در مغز موش است- آلوده شده‌بودند (۳۴). مغز موش هموژن شده و در حجم ۲ میلی‌لیتر با استفاده از لوله دهانی، به گربه‌ها خورانده شد، همچنین به هر گربه مقدار ۵ میلی‌لیتر سالین تزریق شد (۳۲) و سپس ۳ روز بعد از چالش، به مدت ۵ روز، مدفوع تمامی گربه‌ها برای بررسی دفع اووسیست، بررسی شد.

آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم (Direct Agglutination Test) با استفاده از سرم خون گربه‌ها برای بررسی پاسخ ایمنی ایجاد شده با سوش تخفیف‌حدت‌یافته علیه توکسوپلاسما گوندئی انجام شد (۱۰). به صورت خلاصه، رقت‌های مختلف سرم‌ها در بافر فسفات سالین و

۲-مرکاپتواتانول (۰/۲ مولار) تهیه و به هر چاهک میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای U شکل به مقدار ۵۰ میکرولیتر اضافه شد، پس از آن به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی‌ژن *توکسوپلاسما گوندئی* و آلکالین بافر (۸ گرم Na2HP04؛ ۳۱/. گرم KH2Po4 در ۱ لیتر آب مقطر) اضافه شد و یک شب در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و روز بعد نتایج قرائت گردید. حداقل تیتر ۱:۲، به عنوان نمونه مثبت آگلوتیناسیون در نظر گرفته شد(۷).

برای تهیه آنتی‌ژن کشته شده *توکسوپلاسما گوندئی*، محتویات فلاسک‌هایی که ۸۰ درصد سلول‌های آن‌ها توسط تک‌یاخته تخریب شده بودند، جمع آوری شد و تاکی‌زوئیت‌ها پس از عبور از سوزن ۲۵، با بافر فسفات سالین استریل شسته و سپس با فرمالین ۴٪ غیر فعال شدند.

به منظور بررسی حضور یا عدم حضور اووسیست *توکسوپلاسما گوندئی* در مدفوع گربه‌های آزمایش شده، طبق روش یانگ و همکاران در سال ۲۰۰۹، مدفوع آن‌ها بررسی شد (۳۳). برای این منظور ۳ روز پس از چالش، به مدت ۵ روز نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری گردید و پس از کدگذاری برای انجام تست مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) به آزمایشگاه ارسال گردید. پرایمرهای (Tox1/Tox2) برای این منظور استفاده شده است (۳۰):

TOXO1: 5″- GGAACTGCATCCGTTCATGAG-3″
the reverse primer
TOXO2: 5″- TCTTTAAAGGGTTCGTGGTC-3″

طبق دستورالعمل کیت، مواد آماده شده و در دستگاه ترموسایکلر (چرخه تکثیر با دناتوره شدن ابتدایی در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال پرایمر در ۶۳ درجه سانتی‌گراد، طویل شدن در ۷۴ درجه سانتی‌گراد و طویل شدن نهایی در ۷۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. در نهایت محصول PCR روی ژل آگارز ۱درصد بررسی گردید.

تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با بهره‌گیری از نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۲۱ انجام شد. در این نرم‌افزار از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) برای ارزیابی بین گروه‌ها و با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شده است.

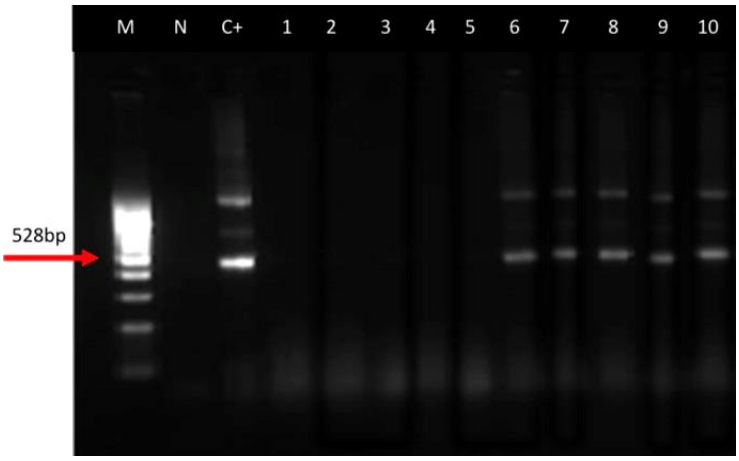
نتایج

بررسی ظاهری و علایم بالینی گربه‌ها پس از تزریق واکسن نشان‌دهنده سلامت ظاهری همه حیوانات در طول دوره درمان داشت، همچنین، همه گربه‌ها در گروه واکسینه پس از دریافت دوز خوراکی چالش، هیچ‌گونه علایم بیماری نشان ندادند؛ در حالی که گربه‌های گروه کنترل دچار اسهال، بی حالی و بی اشتهایی شدند. ارزیابی نتایج آگلوتیناسون برای تعیین میزان پاسخ ایمنی به‌صورت تولید آنتی‌بادی در گربه‌های دو گروه واکسینه و کنترل نشان داد که پاسخ ایمنی در گروه واکسینه (ایمن-شده با واکسن زنده تخفیف‌حدت یافته تجربی) به‌مقدار قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل بالا رفته بود و تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). بدین ترتیب که در گروه ایمن شده پاسخ آنتی‌بادی علیه *توکسوپلاسما گوندئی* در رقت ۱:۳۲ مشاهده گردید. با این وجود، گروه کنترل در این رقت فاقد آنتی‌بادی علیه *توکسوپلاسما گوندئی* بود (جدول ۱)،

جدول ۱- نتایج بررسی آگلوتیناسیون

گروه مورد بررسی		نتیجه تیتر
کنترل	۱	۰
	۲	۰
	۳	۰
	۴	۰
	۵	۰
واکسینه	۶	۱:۱۶
	۷	۱:۱۶
	۸	۱:۸
	۹	۱:۳۲
	۱۰	۱:۱۶

همچنین، بر اساس نتایج به دست آمده با استفاده از آزمایش مولکولی واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR)، گروه‌های ایمن شده دفع اووسیستی را نشان ندادند و در مقایسه با گروه کنترل که همه نمونه‌ها حضور اووسیست را نشان داده بودند (شکل ۱، جدول ۲)، تفاوت معنی داری، دارند (p<۰/۰۵).



شکل ۱- نتایج مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR). تنها گربه‌ها از گروه کنترل حضور اووسیست را نشان دادند. M: لدر، C+: کنترل مثبت، ۱ تا ۵: نمونه گربه‌های مطالعه شده در گروه واکسینه، ۶ تا ۱۰: نمونه گربه‌های مطالعه شده در گروه کنترل.

جدول ۲- نتایج بررسی آزمایش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

گروه‌های مطالعه شده	پیش از چالش	۴ روز پس از چالش	۵ روز پس از چالش	۶ روز پس از چالش	۷ روز پس از چالش	۸ روز پس از چالش
واکسینه	-	-	-	-	-	-
کنترل	-	+	+	+	+	+

بحث

در این پژوهش گربه به عنوان حیوان مطالعه شده برای ارزیابی واکسن آزمایشی ساخته شده در موسسه واکسن و سرم سازی رازی شیراز-که در مطالعات پیشین نیز نتایج بسیار موفقیت آمیزی را در موش و تخم مرغ جنین دار به همراه داشته- (۱ و ۲۹) انتخاب شده است؛ چراکه گربه به‌عنوان میزبان نهایی انگل *توکسوپلاسما گوندئی* نقش مهمی در شیوع این تک‌یاخته ایفا می‌کند، به طوری‌که شیوع جهانی توکسوپلاسموز در گربه‌ها و گربه‌سانان وحشی به ترتیب، ۳۵ و ۵۹ درصد تخمین زده شده‌است(۲۵). گربه با دفع اووسیست در مدفوع، عامل اصلی آلوده کننده محیط است و نیز باعث آلوده شدن سایر مهره‌داران خون‌گرم (۱۵) برآورد شده‌است و گربه‌هایی که برای اولین بار به *توکسوپلاسما گوندئی* آلوده می‌شوند، قادر به تولید میلیون‌ها اووسیست هستند؛ سالانه تقریباً ۹۴ تا ۴۶۷۱ اووسیست به‌ازای هر متر مربع محیط را آلوده می‌کنند (۱۸)؛ این یافته‌ها اهمیت کنترل دفع اووسیست در مدفوع گربه را نشان می‌دهند (۲۴).

در حال حاضر، درمان دارویی تنها برای کیست‌های بافتی انگل در دسترس است (۲۱) و در زمینه دفع اووسیست از گربه، هیچ داروی مؤثری در دسترس نیست. تا کنون هیچ‌کدام از راهبردهای به کاررفته برای تهیه واکسن علیه توکسوپلاسموز در مقایسه با سوش زنده تخفیف حدت یافته *توکسوپلاسما گوندئی* اثرگذاری نداشته است، همچنین تاکنون تمام واکسن‌های زنده تخفیف‌حدت‌یافته، از تاکی‌زوئیت *توکسوپلاسما گوندئی* تهیه شده؛ زیرا تنها مرحله‌ای از انگل بوده که به مقدار بسیار بالا قابل تولید و تکثیر است (۱). در این مطالعه هدف، بررسی واکسن آزمایشی *توکسوپلاسما گوندئی* در ایجاد پاسخ ایمنی و به دنبال آن کاهش دفع اووسیست، در عین عدم بیماری‌زایی در گربه بوده است.

در مطالعه حاضر، از تاکی‌زوئیت سوش زنده تخفیف‌حدت‌یافته *توکسوپلاسما گوندئی* که در مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، با استفاده از پاساژ طولانی مدت -که در محیط کشت ایجاد شده است- استفاده گردید. مطالعات پیشین نشان داده‌است که این سوش علاوه بر بیماری‌زا نبودن، می‌تواند پاسخ ایمنی قابل قبولی را در موش ایجاد کند(۱ و ۲۹). نتایج ما نشان داد که واکسن تهیه شده از تاکی‌زوئیت‌های زنده تخفیف‌حدت‌یافته قادر به ایجاد پاسخ ایمنی بسیار مناسبی در گربه است. این موضوع نشان می‌دهد که سوش زنده تخفیف‌حدت‌یافته انگل *توکسوپلاسما گوندئی*، گزینه مناسبی برای ایجاد محافظت علیه عفونت توکسوپلاسموز و استفاده به عنوان واکسن است.

استفاده از سوش زنده تخفیف‌حدت‌یافته *توکسوپلاسما گوندئی* به منظور کاهش دفع اووسیست در گربه از سوی پژوهشگران متعددی مورد توجه قرار گرفته و روش‌های مختلفی برای این منظور استفاده شده‌است. جهش شیمیایی سوش T-263 توانست قابلیت تولید اووسیست در این سوش را از بین ببرد. با این وجود، پس از استعمال خوراکی آن در گربه، هر دو مرحله شیزوگونی و گامتوگونی در گربه مشاهده شد (۸)، اما پژوهش‌ها نشان داده است که این سوش تخفیف‌حدت‌یافته، قادر است ایمنی مؤثری را در گربه ایجاد کند و پس از چالش خوراکی با کیست سوش T-263 هیچ‌گونه اووسیستی در مدفوع بچه گربه‌ها مشاهده نشد (۱۱ و ۱۲)؛ با وجودی‌که برادی‌زوئیت‌های این سوش قادر به محافظت در برابر دفع اووسیست هستند، تاکی‌زوئیت‌های آن این قابلیت را ندارند (۱۲). در مطالعه حاضر استفاده از تاکی‌زوئیت زنده تخفیف‌حدت‌یافته تک‌یاخته *توکسوپلاسما گوندئی*، قادر است به مقدار قابل‌توجهی دفع اووسیست را در گربه کاهش دهد.

حذف ژنی در سوش RH نیز به منظور تهیه یک سوش زنده تخفیف‌حدت‌یافته برای استفاده در گربه و همچنین گوسفند بررسی شده است (۲). نتایج مقدماتی نشان دهنده قابلیت سوش Mic1-3KO برای کاهش در تولید کیست بافتی در بره‌های متولد شده از مادر واکسینه شده، دارد. با این وجود، تزریق زیرپوستی و یا ایمن کردن خوارکی گربه با این سوش، پس از چالش خوراکی با اووسیست انگل، از دفع اووسیست جلوگیری به عمل نیاورد (۱۹) در صورتی‌که، سوش استفاده شده در این مطالعه توانست به خوبی از دفع اووسیست توسط گربه‌ها جلوگیری به عمل آورد. اخیراً یک سوش *توکسوپلاسما گوندئی* با نقص HAP2 از سوش تایپ II انگل تهیه شد. این سوش اووسیست‌هایی تولید می‌کند که قادر به تولید شیزونت نیستند (یعنی اووسیستی که میوز انجام نمی‌دهد). ایمن کردن خوارکی گربه با کیست بافتی این سوش تخفیف‌حدت‌یافته، نشان داد که به صورت کلی از دفع اووسیست جلوگیری شده است (۲۸). قابل یادآوری است که ایمن کردن گربه‌ها می‌تواند به خوبی از انتشار عفونت در محیط جلوگیری کند ؛ به طوری که طی بررسی‌های انجام شده روی خوک‌هایی که در کنار گربه‌های ایمن شده قرار داشتند، نشان داده است که میزان شیوع عفونت توکسوپلاسموز در این حیوانات به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۳)، بنابراین در صورت استفاده از واکسیناسیون گربه‌ها در مقیاس وسیع‌تر می‌توان این امید را داشت که میزان شیوع به مقدار قابل قبولی کاهش یابد.

اهمیت واکسن استفاده شده در این مطالعه علیه *توکسوپلاسما گوندئی*، استفاده از یک سوش زنده تخفیف‌حدت‌یافته، است. مطالعات متعددی نشان داده است که واکسن زنده تخفیف‌حدت‌یافته، قادر است میزان بسیار مناسبی از ایمنی هومورال و سلولی را ایجاد کند و در برخی از مطالعات محافظت کامل ایجاد شده است که به دلیل تقلید از عفونت ایجاد شده به صورت طبیعی است (۳، ۲۰ و ۲۱) و می‌تواند موجب کاهش مرگ و میر و نفوذ ژنوم انگل در بافت شود (۳ و ۳۱). در این پژوهش نیز همان‌گونه که مشاهده شد، با تزریق زیرپوستی واکسن علاوه بر تولید ایمنی مناسب، از دفع اووسیست انگل توسط گربه‌ها نیز جلوگیری به عمل آمد و هیچ‌گونه علایم بیماری یا مرگ و میر در حیوانات ایمن شده، مشاهده نشد.

ایمنی ایجاد شده به صورت پاسخ آنتی‌بادی، نشان‌دهنده ایجاد ایمنی اختصاصی علیه *توکسوپلاسما گوندئی* است. در بررسی القای آنتی‌بادی علیه *توکسوپلاسما گوندئی* در گروه دریافت کننده سوش زنده تخفیف‌حدت‌یافته نتایج به‌دست آمده، نشان داد که، این سوش قادر به القای پاسخ ایمنی هومورال در گربه‌های

ایمن شده، گردیده‌است و احتمالاً ایمنی ایجاد شده در گربه‌های ایمن شده، مانع دفع اووسیست در این حیوانات شده‌است. یادآور میشود که استفاده از واکسن نوترکیب توکسوپلاسموز با استفاده از DNA انگل نتیجه قابل قبولی در دفع اووسیست توسط گربه نشان نداده است (۳۶).

پس از ایجاد چالش با سوش مشابه (Homologue) به دنبال ایجاد ایمنی در گربه، عدم دفع دوباره اووسیست، مشاهده شده است (۵ و ۶). با این وجود در صورت چالش با سوش غیرمشابه، دفع دوباره اووسیست به صورت کامل و یا جزیی مشاهده می‌شود (۱۹ و ۳۵)، بنابراین در این مطالعه از سوش غیرمشابه برای چالش استفاده گردید؛ بدین ترتیب که موش‌های ماده با سن ۸-۶ هفته تهیه و پس از گذشت ۲۱ روز از زمان آلوده شدن آن‌ها با سویه PRU *توکسوپلاسما گوندئی*، معدوم و کل مغز به سرعت جمع‌آوری، شسته و در نهایت هموژن شد و در حجم ۲ میلی‌لیتر با استفاده از لوله دهانی به گربه‌ها خورانده شد (۳۲ و ۳۴). همان‌گونه که در نتایج مشخص شد، میزان دفع اووسیست در گربه‌های ایمن شده با سوش تخفیف‌حدت‌یافته *توکسوپلاسما گوندئی*، پس از خوراندن کیست بافتی انگل، به شدت کاهش یافت به گونه‌ای که هیچ‌گونه علامتی از حضور اووسیست در مطالعات مولکولی دیده نشد.

در نهایت، یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از سوش تخفیف‌حدت‌یافته *توکسوپلاسما گوندئی* در گربه، علاوه بر این که بیماری‌زا نیست، قادر است پاسخ ایمنی را به صورت تولید آنتی‌بادی بالا ببرد و همچنین با ایجاد ایمنی محافظت کننده، باعث عدم دفع اووسیست توسط میزبان نهایی این انگل گردد. با توجه به اهمیت گربه در انتشار و گسترش عفونت در همه‌ی جهان، استفاده از این واکسن در مقیاس وسیع‌تر و همچنین انجام آزمایش‌های اختصاصی‌تر پیشنهاد می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و همچنین بیمارستان دامپزشکی آریاوت شیراز و مراحل اجرایی آن نیز در آزمایشگاه ملی نئوسپورا انجام گرفته است.

منابع

1- Abbasifar, A., Namavari, M., Rezayian, A. Evaluation of Razi attenuated variety of Toxoplasma gondii in Balb/c mice. Veterinary Researches & Biological Products, 2017; 30(4): 107-113.
2- Cérède O, Dubremetz JF, Soête M, Deslée D, Vial H, Bout D, Lebrun M. Synergistic role of micronemal proteins in Toxoplasma gondii virulence. J Exp Med. 2005 Feb 7;201(3):453-63.
3- Cong, H., Yuan, Q., Zhao, Q. et al. Comparative efficacy of a multi-epitope DNA vaccine via intranasal, peroral, and intramuscular delivery against lethal Toxoplasma gondii infection in mice. Parasites Vectors **7**, 145, 2014.
4- Daneshvar H, Hagan P, Phillips RS. Leishmania mexicana H-line attenuated under pressure of gentamicin, potentiates a Th1 response and control of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. Parasite Immunol. 2003 Nov-Dec;25(11-12):589-96.
5- Davis SW, Dubey JP. Mediation of immunity to Toxoplasma gondii oocyst shedding in cats. J Parasitol. 1995 Dec;81(6):882-6.
6- Dubey JP. Duration of immunity to shedding of Toxoplasma gondii oocysts by cats. J Parasitol. 1995 Jun;81(3):410-5.
7- Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol. 2004 Dec 9;126(1-2):57-72.
8- Dubey JP. Schizogony and gametogony of oocyst-deficient T-263 strain of Toxoplasma gondii. Vet Parasitol. 2017 Oct 15;245:160-162.
9- Dubey JP, Lappin MR, Thulliez P. Long-term antibody responses of cats fed toxoplasma gondii tissue cysts. J Parasitol. 1995 Dec;81(6):887-93.
10- Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. Toxoplasma gondii: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends Parasitol. 2010 Apr;26(4):190-6.
11- Frenkel JK, Pfefferkorn ER, Smith DD, Fishback JL. Prospective vaccine prepared from

12- a new mutant of Toxoplasma gondii for use in cats. Am J Vet Res. 1991 May;52(5):759-63.
13- Freyre A, Choromanski L, Fishback JL, Popiel I. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of Toxoplasma gondii. J Parasitol. 1993 Oct;79(5):716-9.
14- Freyre A, Falcón J, Mendez J, Correa O, Morgades D, Rodríguez A. An investigation of sterile immunity against toxoplasmosis in rats. Exp Parasitol. 2004 May-Jun;107(1-2):14-9.
15- Garcia JL. Vaccination concepts against Toxoplasma gondii. Expert Rev Vaccines. 2009 Feb;8(2):215-25.
16- Garcia JL, Innes EA, Katzer F. Current progress toward vaccines against Toxoplasma gondii. Vaccine Devel Ther 2014;4:23-37.
17- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. Vet Parasitol. 2005 Mar 31;128(3-4):231-41.
18- Innes EA, Hamilton C, Garcia JL, Chryssafidis A, Smith D. A one health approach to vaccines against Toxoplasma gondii. Food Waterborne Parasitol. 2019 Apr 18;15:e00053. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00053. Erratum in: Food Waterborne Parasitol. 2020 Dec 15;21:e00105.
19- Kaul R, Chen P, Binder SR. Detection of immunoglobulin M antibodies specific for Toxoplasma gondii with increased selectivity for recently acquired infections. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5705-9.
20- Le Roux D, Djokic V, Morisse S, Chauvin C, Doré V, Lagrée AC, Voisin D, Villain Y, Grasset-Chevillot A, Boursin F, Su C, Perrot S, Vallée I, Seche E, Blaga R. Evaluation of immunogenicity and protection of the Mic1-3 knockout Toxoplasma gondii live attenuated strain in the feline host. Vaccine. 2020 Feb 5;38(6):1457-1466.
21- Li XZ, Lv L, Zhang X, Anchang KY, Abdullahi AY, Tu L, Wang X, Xia L, Zhang XX, Feng W, Lu C, Li S, Yuan ZG. Recombinant canine adenovirus type-2 expressing TgROP16 provides partial protection against acute Toxoplasma gondii infection in mice. Infect Genet Evol. 2016 Nov;45:447-453.
22- Li XZ, Wang XH, Xia LJ, Weng YB, Hernandez JA, Tu LQ, Li LT, Li SJ, Yuan ZG. Protective efficacy of recombinant canine adenovirus type-2 expressing TgROP18 (CAV-2-ROP18) against acute and chronic Toxoplasma gondii infection in mice. BMC Infect Dis. 2015 Mar 4;15:114.
23- Liu Q, Singla LD, Zhou H. Vaccines against Toxoplasma gondii: status, challenges and future directions. Hum Vaccin Immunother. 2012 Sep;8(9):1305-8.
24- Mateus-Pinilla NE, Dubey JP, Choromanski L, Weigel RM. A field trial of the effectiveness of a feline Toxoplasma gondii vaccine in reducing T. gondii exposure for swine. J Parasitol. 1999 Oct;85(5):855-60.
25- Miró G, Montoya A, Jiménez S, Frisuelos C, Mateo M, Fuentes I. Prevalence of antibodies to Toxoplasma gondii and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. Vet Parasitol. 2004 Dec 15;126(3):249-55.
26- Montazeri M, Mikaeili Galeh T, Moosazadeh M, Sarvi S, Dodangeh S, Javidnia J, Sharif M, Daryani A. The global serological prevalence of Toxoplasma gondii in felids during the last five decades (1967-2017): a systematic review and meta-analysis. Parasit Vectors. 2020 Feb 17;13(1):82.
27- Mousavi, E., Namavari, M. Use of Razi variety of Toxoplasma gondii in serological diagnosis of Toxoplasma infection in compare with molecular test. Veterinary Researches & Biological Products, 2018; 31(2): 86-92.
28- Pipano E, Shkap V, Kriegel Y, Leibovitz B, Savitsky I, Fish L. Babesia bovis and B. bigemina: Persistence of infection in friesian cows following vaccination with live antibabesial vaccines. Vet J. 2002 Jul;164(1):64-8.
29- Ramakrishnan C, Maier S, Walker RA, Rehrauer H, Joekel DE, Winiger RR, Basso WU, Grigg ME, Hehl AB, Deplazes P, Smith NC. An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of Toxoplasma gondii by cats. Sci Rep. 2019 Feb 6;9(1):1474.
30- Setasimy A, Namavari M. Use of chicken embryonated eggs for evaluating the virulence of Toxoplasma gondii. J Parasit Dis. 2016 Dec;40(4):1223-1225.
31- Veronesi F, Santoro A, Milardi GL, Diaferia M, Morganti G, Ranucci D, Gabrielli S. Detection of Toxoplasma gondii in faeces of privately owned cats using two PCR assays targeting the B1 gene and the 529-bp repetitive element. Parasitol Res. 2017 Mar;116(3):1063-1069.
32- Wang JL, Elsheikha HM, Zhu WN, Chen K, Li TT, Yue DM, Zhang XX, Huang SY, Zhu XQ. Immunization with Toxoplasma gondii GRA17 Deletion Mutant Induces Partial Protection and Survival in Challenged Mice. Front Immunol. 2017 Jun 29;8:730.
33- Xu MJ, Zhou DH, Nisbet AJ, Huang SY, Fan YF, Zhu XQ. Characterization of mouse brain microRNAs after infection with cyst-forming Toxoplasma gondii. Parasit Vectors. 2013 May 29;6:154.
34- Yang W, Lindquist HD, Cama V, Schaefer FW 3rd, Villegas E, Fayer R, Lewis EJ, Feng Y, Xiao L. Detection of Toxoplasma gondii oocysts in water sample concentrates by real-time PCR.

Appl Environ Microbiol. 2009 Jun;75(11):3477-83.

35- Zulpo DL, Igarashi M, Sammi AS, Santos JR, Sasse JP, Cunha IA, Taroda A, Barros LD, Almeida JC, Jenkins MC, Navarro IT, Garcia JL. rROP2 from Toxoplasma gondii as a potential vaccine against oocyst shedding in domestic cats. Rev Bras Parasitol Vet. 2017 Jan-Mar;26(1):67-73.

36- Zulpo DL, Sammi AS, Dos Santos JR, Sasse JP, Martins TA, Minutti AF, Cardim ST, de Barros LD, Navarro IT, Garcia JL. Toxoplasma gondii: A study of oocyst re-shedding in domestic cats. Vet Parasitol. 2018 Jan 15;249:17-20.

37- Zulpo DL, Headley SA, Biazzono L, da Cunha IA, Igarashi M, de Barros LD, Taroda A, Cardim ST, Bogado AL, Navarro IT, Garcia JL. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of Toxoplasma gondii. Exp Parasitol. 2012 Jun;131(2):223-30.

Vol.16/No.2
Fall-Winter 2023

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2023; 16(2): 73-80.
https://doi.org/10.22034/IJVCS.2022.13856.1016

Evaluation of experimental *toxoplasma gondii* vaccine in cats

Roghayeh Ramezanpoor Ronizi[1]; Mohammad Mehdi Namavari[2]*; Elham Moazamian[1]

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University of Shiraz, Shiraz- Iran.
2. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Agricultural and Extension Organization, Shiraz- Iran.

Received: 13 May 2022 ***Accepted:*** 24 October 2022

Summary

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite with a wide range of host species. As the final host, the cats play an important role in the environment contamination and other hosts infection. Therefore, preventing the oocysts shedding of Toxoplasma in cats play a significant role in controlling the disease. The purpose of this study is to evaluate the live attenuated strain of toxoplasma gondii experimental vaccine that was prepared at the Razi Institute in order to prevent the shedding of oocysts by cats. In this study, ten native male cats were randomly divided into two equal groups. The first group received the attenuated strain and the second group received the culture medium as a control. Immunization conducted twice (3-week interval) by subcutaneous injection. Clinical symptoms were observed and recorded daily from the beginning of the experiment until one month after the second injection. One month after the second injection, all cats were challenged orally with the PRU strain. The agglutination serological test and the molecular test results showed a significant immune response and protective immunity in the vaccinated group compared to the control group ($p<0.05$). In general, the evaluation of the attenuated strain on cats as an experimental vaccine showed that this vaccine, in addition to creating an immune response and controlling oocyst shedding, did not cause any specific pathogenicity in the vaccinated group. Therefore, it is suggested to carry out additional research on this experimental vaccine in a long time with a larger number of cats.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, live attenuated vaccine, immune response, cat, oocyst shedding.

***Corresponding Author:** namavari@yahoo.com