DOI: 10.22092/vj.2019.123760.1511
شماره ۱۲۴ پاییز ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثر ضد انگلی عصاره‌های آبی زنجبیل و شیرین‌بیان بر روی تک یاخته نئوسپورا کانینوم

• نسرین رفیعی بلداجی
گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
• مهدی نام‌آوری (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
تاریخ دریافت: ۲۶-۰۷-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۱۱-۱۰-۱۳۹۷
Email: Namavari@yahoo.com

چکیده

تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم، عامل بیماری نئوسپوروزیس، انگل داخل سلولی اجباری می‌باشد. عفونت نئوسپوروزیس انتشار جهانی داشته و باعث آلودگی جانوران مختلف از جمله گاو، گوسفند، بز،سگ و گوزن می‌شود. روش‌های کنترل بیماری شامل حذف جانوران آلوده، درمان آنتی‌بیوتیکی و واکسیناسیون است. نبود داروی مناسب و عدم وجود واکسن مؤثر، ما را بر آن داشت تا تأثیرات ضد انگلی عصاره زنجبیل و شیرین بیان را بر روی انگل نئوسپورا بررسی نماییم. برای این منظور، دوزهای مختلف از عصاره‌های آبی زنجبیل و شیرین بیان تهیه گردید، و دوز غیر سمی هر دو عصاره‌های آبی، بر سلول Vero با استفاده از روش MTT مشخص شد.در مرحله بعد اثر عصاره‌های آبی زنجبیل و شیرین بیان بر تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم، در تخم‌مرغ جنین‌دار بررسی شد. با استفاده از روش MTT نشان داده شد که شیرین بیان و زنجبیل هر دو در غلظت ۰/۶۲۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر سلول‌های Vero هیچ گونه سمیتی ندارند. همچنین در مطالعه روی تخم مرغ جنین‌دار مشخص گردیدکه در گروه‌هایی که کلیندامایسین و شیرین بیان استفاده شد، تلفات وجود دارد، در حالی‌که زنجبیل مانع ایجاد تلفات ناشی از نئوسپوروزیس در تخم مرغ جنین دار میشود. گزارشات قبلی تاثیر زنجبیل را روی تک یاخته توکسوپلاسما ثابت کرده بود. در این مطالعه نیز اثر مهاری این گیاه بخوبی بروی تک یاخته نئوسپورا نشان داده شد. در ضمن برای اولین بار از تخم‌مرغ جنین‌دار برای ارزیابی داروی موثر روی این تک‌یاخته استفاده شد. هر دوی این یافته‌ها می‌تواند در تحقیقات کاربردی جهت تهیه داروی موثر برای کنترل و درمان نئوسپوروزیس مفید واقع گردد.

کلمات کلیدی: نئوسپورا کانینوم، MTT، زنجبیل، شیرین بیان، تخم‌مرغ جنین‌دار

Veterinary Researches & Biological Products No 124 pp: 47-54

Study of antiparasitic effects of Ginger and Glycyrrhizin aqua extracts against *Neospora caninum*

By: Rafei, N., Group Bioshimi, Islamic Azad University Branch Shiraz and Namavari, M., (Corresponding Author) Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.

Received: 2018-10-18 Accepted: 2019-01-01

Emali: Namavari@yahoo.com

Neospora caninum, the cause of Neosporosis, is an obligate intracellular parasite. Neosporosis infection has worldwide distribution and infect many animals such as cattle, sheep, goat and deer. The control methods of disease are included test and cull, antibiotic treatment and vaccination. The lack of proper drugs and the absence of effective vaccines led us to evaluate the anti neospora effects of Ginger and Glycyrrhizin aqua extracts. In this study, different doses of two herbal extracts were prepared. At first the cytotoxicity of aqua extracts was evaluated on Vero cell line by MTT assay. Then their effects on parasite were tested in chicken embryonated eggs. The results showed that Ginger and Glycyrrhizin aqua extract, have no cytotoxic effect on Vero cell line in 0.625 mg/ml dose. Also, in the study on embryonic eggs, there were casualties in the groups that used clindamycin and Glycyrrhizin,while the ginger prevents losses due to the neosporosis in chicken embryonated eggs. Previous reports had proved the effect of ginger on *Toxoplasma gondii* .In this study, the inhibitory effect of this plant was also shown on Neospora caninum. In addition, for the first time embryonated eggs were used to evaluate drug effects on *Neospora caninum*. Both of these findings can be useful in applied research for the preparation of an effective drug for the control and treatment of neosporosis.

Key words: *Neospora caninum*, MTT, Aqua extract, Ginger, Glycyrrhizin, Chicken embryonated egg

مقدمه

تک‌یاخته بیماری‌زای نئوسپورا کانینوم یکی از علل شایع سقط جنین در دام‌ها در سرتاسر جهان است. نئوسپورا برای اولین بار در سال ۱۹۸۴ در توله سگ‌ها در نروژ شناسایی شد (۳). این تک‌یاخته در گونه‌های مختلفی از جمله در سگ‌ها، گاوها، اسب‌ها و گوسفندان و بزها دیده می‌شود (۸). نئوسپورا کانینوم بیشترین اثر خود را به صورت عوارض تولید مثلی نشان می‌دهد و علاوه بر گاو در اسب، گوسفند و بز نیز باعث سقط می‌شود. سگ میزبان اصلی نئوسپورا کانینوم می‌باشد و این تک یاخته می‌تواند باعث بیماری عصب عضلانی در سگ‌ها گردد. روش اصلی انتقال این عامل عفونی در گاوها انتقال از راه جفت می‌باشد (۲۹ و ۳۴).

نئوسپورا کانینوم موجب سقط جنین در گاوهای شیری و گوشتی می‌شود و بدین ترتیب موجب خسارات اقتصادی بالایی در تمام جهان می‌گردد (۹). خسارت وارده به واحدهای دامپروری به دلیل آلودگی با نئوسپورا کانینوم به صورت مرده‌زایی، سقط جنین و تولد گوساله ضعیف بروز می‌کند. علاوه بر این آلودگی با این تک‌یاخته می‌تواند موجب تولد گوساله سالمی شود که از نظر سرمی حامل انگل است و می‌تواند آلودگی را به نسل بعد منتقل کند (۳۱).

راه‌های کنترل عفونت نئوسپوروزیس شامل از بین بردن حیوانات سرم مثبت، جلوگیری از پرورش حیوانات سرم مثبت، واکسیناسیون، و درمان‌های آنتی‌بیوتیکی است (۱۴)، ولی همیشه روش مؤثرتر به عنوان مقرون به صرفه‌ترین روش محسوب نمی‌گردد (۳۲). درمان با داروهای شیمیایی زیاد مورد توجه قرار نگرفته است زیرا دوره درمان طولانی بوده و شیر و گوشت حیوان تحت درمان غیر قابل استفاده است (۹). با این وجود آزمایشات استفاده از چندین ترکیب را با خواص ضد نئوسپورایی نشان داده است (۲۵). از راه‌های کنترل آلودگی های انگلی واکسیناسیون، و درمان با داروهای ضدانگلی می‌باشد. در حال حاضر واکسن مؤثری برای پیشگیری از نئوسپوروزیس وجود ندارد و روش‌های درمان دارویی نیز گران می‌باشد، از این‌رو تحقیقات در راستای دستیابی به واکسن و داروی مناسب ادامه دارد (۸).

شیرین بیان گیاهی مدیترانه‌ای است که اثرات دارویی آن بر روی مالاریا (۴)، لیشمانیوز (۱۵) و توکسوپلاسموزیس (۵) مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر این خواص ضد التهابی (۱۹)، ضد سرطانی، ضد ویروسی (۲) و باکتریایی (۱۳) این گیاه نیز ثابت شده است. زنجبیل که ریزوم گیاه قابل استفاده است، در تمام جهان به عنوان ادویه مورد استفاده

قرار می‌گیرد (۲۰). شواهد علمی بیان می‌کنند که زنجبیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد انعقاد خون و ضد التهابی دارد و سبب کاهش درد می‌گردد (۲۱).

در حال حاضر هیچ واکسن مؤثری بر علیه نئوسپوروزیس بصورت تجاری وجود ندارد و از طرفی دارویی نیز برای درمان در دام توصیه نشده است. دستیابی به واکسن و داروی موثر از اولویت‌های مهم تحقیقاتی می‌باشد، لذا با توجه به جایگاه دو گیاه زنجبیل و شیرین بیان بعنوان داروهای گیاهی و ضد انگلی بخصوص در مورد توکسوپلاسما گوندئی که دارای شباهت زیادی به نئوسپورا کانینوم است (۱ و ۵)، در این مطالعه به بررسی اثرات ضد نئوسپورایی آن‌ها در مقایسه با داروی کلیندامایسین به عنوان داروی مورد استفاده در آزمایش‌ها بر علیه نئوسپورا کانینوم، پرداخته خواهد شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه عصاره آبی گیاه شیرین بیان و زنجبیل تهیه گردید. گیاه شیرین بیان از محوطه باغچه دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پردیس شیراز جمع‌آوری گردید و ریزوم گیاه زنجبیل از بازار تهیه شد. پس از تهیه گیاه‌های مورد نظر، به دور از نور آفتاب خشک شدند. پس از آسیاب ریشه شیرین بیان و ریزوم زنجبیل، از گیاهان عصاره‌گیری انجام شد. بدین ترتیب که ۱۵ گرم از پودر گیاهی بدست آمده در ارلن ریخته شده و مدت ۳ روز در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر خیسانده شد. پس از صاف کردن محلول بدست آمده با صافی، عمل تبخیر حلال در پلیت‌های پهن بر روی بن ماری دمای ۴۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (۱۷). سپس محلول با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محیط DMEM ماده جامد باقی‌مانده تهیه گردید. این عصاره، جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

عصاره آبی زنجبیل و شیرین بیان

بدین منظور از محلول‌های تهیه شده، غلظت‌های ۵ ،۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان غلظت‌های منتخب استفاده شد. در مرحله بعد، تعداد ۴۱۰×۳ سلول Vero در ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت سلولی DMEM به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل گردید، سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی هر دو گیاه به طور جداگانه به صورت ۶ ردیف شش‌تایی به چاهک‌ها اضافه گردید به این صورت که گروه اول به عنوان گروه کنترل حاوی ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کشت سلولی DMEM همراه با سرم جنین گوساله، و آنتی‌بیوتیک‌ها با مقادیر ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین و ضد قارچ آمفوتریسین ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. گروه‌های بعدی غلظت‌های مختلف ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۲ را برای هر عصاره آبی (در محیط کشت DMEM حاوی انتی بیوتیک) دارا هستند. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه گردید. بعد از بررسی سلول‌های Vero ۵۰ میکرو لیتر رنگ MTT به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید تا واکنش انجام شود. پس از خالی نمودن محلول درون چاهک‌ها به هر چاهک مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر محلول DMSO اضافه و پلیت به آرامی به مدت چند دقیقه تکان داده شد و با استفاده از الایزا ریدر میزان جذب نوری، در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی اثر ضدانگلی عصاره‌های آبی گیاه زنجبیل و شیرین بیان بر روی نئوسپورا کانینوم در تخم‌مرغ جنین‌دار

برای این منظور ۵۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد لوهمن تهیه گردید و در انکوباتور، با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ درصد، ۸-۶ بار چرخش در ساعت قرار گرفتند. تخم‌مرغ‌ها روز هشتم کندلینگ شدند و ۴۰ عدد تخم‌مرغ جنین‌دار سالم و زنده انتخاب و به صورت تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند.

تاکی زوایت نئوسپورا از فلاسک‌های کشت که بیش از ۹۰ درصد سلول‌های تخریب شده بودند برداشت شد و پس از شمارش و تعیین تعداد تاکی زوایت در هر میلی‌لیتر رقت‌های نهایی با استفاده از عصاره‌های آبی زنجبیل و شیرین بیان بصورتی تنظیم شد که در نهایت هر میلی‌لیتر DMEM حاوی ۱ میلیون تاکی زوایت نئوسپورا و، ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر زنجبیل یا شیرین بیان باشد. میزان ۰/۶۲۵ میلی‌گرم زنجبیل یا شیرین بیان به این دلیل انتخاب شد که این دوز روی سلول‌های Vero در روش MTT غیر سمی بودند.

پنج گروه تخم‌مرغ جنین‌دار بصورتی‌که در جدول ۱ مشخص گردیده تزریق شدند. دوز کلیندامایسین در این مطالعه ۲ میکرولیتر در هر

جدول ۱-گروه‌بندی تخم‌مرغ‌های جنین‌دار

گروه اول(سالم)	DMEM
گروه دوم(کنترل منفی)	انگل
گروه سوم(کنترل مثبت)	انگل + کیلیندامایسین
گروه چهارم(عصاره شیرین بیان)	انگل + شیرین بیان
گروه پنجم(عصاره زنجبیل)	انگل + زنجبیل

میلی لیتر DMEM در نظر گرفته شد (۳۶). سپس تزریق به میزان ۲۰۰ میکرو لیتر از گروه‌های تهیه شده مطابق جدول ۱ به هر تخم مرغ در روز نهم رشد جنین با استفاده از سرنگ انسولین تزریق گردید. قبل از تزریق تخم‌مرغ‌ها کندلینگ شدند تا از زنده بودن جنین اطمینان حاصل گردد. بدین صورت به هر تخم‌مرغ در گروه‌های ۲-۵ دویست هزار تاکی زوایت نئوسپورا تزریق گردید (۲۶). پس از تزریق سوراخ‌های محل تزریق جهت ممانعت از آلودگی مسدود گردیدند همچنین، از روز دهم تا روز بیست و یکم کندلینگ به صورت روزانه انجام و تلفات احتمالی در هر گروه ثبت گردید.

ارزیابی آماری

آنالیز نتایج MTT با روش آماری t test و نتایج تلفات با آزمون فیشر با استفاده از نرم‌افزار آماری Graph Pad انجام شد. مقدار P کمتر از ۰,۰۵ از نظر آماري معني‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

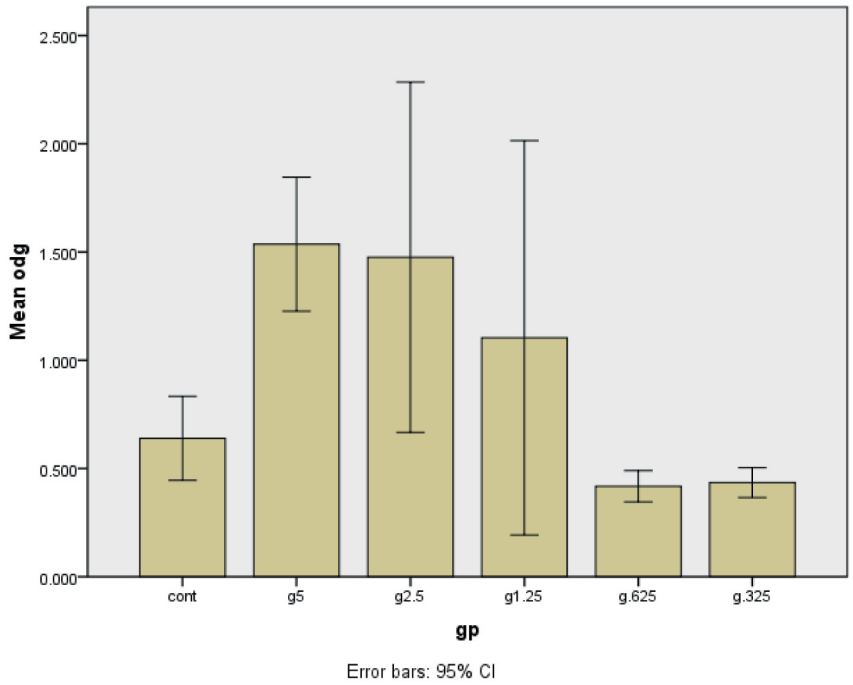
نتایج تعیین دوز غیر سمی عصاره آبی زنجبیل و شیرین بیان در سلول‌های Vero با استفاده از روش MTT با توجه به نتایج آماری به دست آمده از روش واریانس یک طرفه مشخص گردید که عصاره آبی شیرین بیان در غلظت‌های ۵ ,۲/۵ و ۱/۲۵ با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار هستند لیکن این اثر سمی نیست بلکه باعث افزایش رشد سلول‌ها گردیده است. شیرین بیان در غلظت ۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۲ با گروه کنترل اختلاف معناداری نداشته است. (نمودار ۱).

در مورد زنجبیل نیز غلظت‌های ۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۲ با گروه کنترل اختلاف معناداری نداشته است و در غلظت‌های بالاتر دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل بودند و رشد سلول‌ها کاهش یافته بود که نشان دهنده اثر سمی بر روی سلول‌ها می‌باشد (نمودار ۲).

نتایج اثر ضدانگلی عصاره‌های آبی زنجبیل و شیرین بیان بر روی انگل نئوسپورا در تخم‌مرغ جنین‌دار

نتایج حاصل از بررسی تخم مرغ های جنین‌دار بعد از تزریق انگل و عصاره‌های گیاهی در جدول ۲ ذکر شده است. تمامی جنین‌ها در گروه زنجبیل زنده ماندند. بعبارتی نتایج گروه درمان شده با عصاره آبی زنجبیل مشابه گروه جنین سالم می‌باشد. تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه نمی‌باشد و تمامی جنین‌ها تا انتهای روز بیست و یکم زنده گزارش شده‌اند. در صورتی که در گروه تیمار شده با شیرین بیان، در روز آخر فقط یک جنین زنده ماند که از لحاظ اماری نیز با گروه زنجبیل تفاوت معنی‌دار دارد ($p<۰/۰۵$). همچنین در گروه کنترل منفی نتایج مشابه گروه شیرین بیان بود و در گروه کنترل مثبت که از کلیندامایسین استفاده شده بود تعداد ۵ جنین زنده باقی ماند که البته بین این گروه و گروه زنجبیل نیز این میزان تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد. در مجموع بر طبق نتایج آماری می‌توان گفت که زنجبیل و کلیندامایسن در کنترل تلفات موثر

نمودار ۱- بررسی تاثیر غلظت های مختلف شیرین بیان بر رشد سلول



بوده اند و بین این د و نیز تفاوت معنی داری در کاهش تلفات وجود ندارد (p>۰/۰۵).

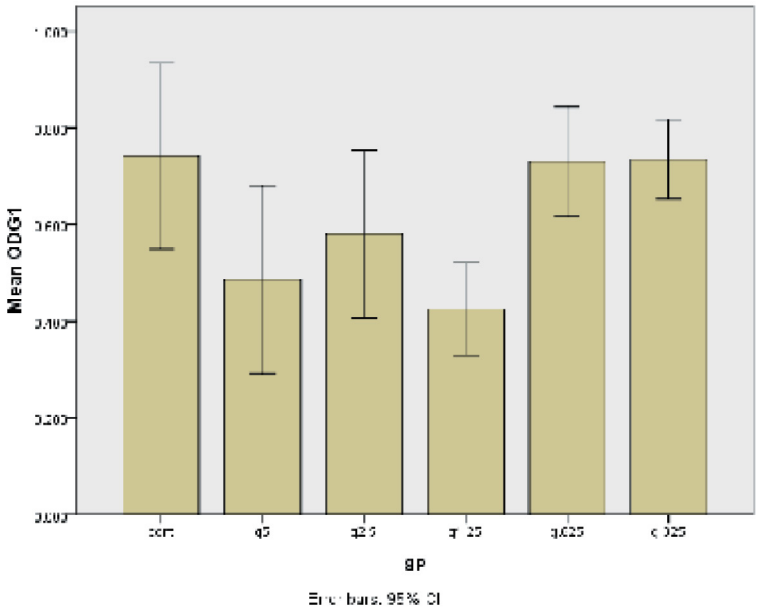
بحث

در این مطالعه اثر ضد انگلی عصاره‌های آبی گیاه زنجبیل و شیرین بیان در مقایسه با داروی کلیندامایسین مورد ارزیابی قرار گرفت. امروزه استفاده از داروهای گیاهی به دلیل سمیت کمتر و عوارض کمتر بسیار مورد توجه قرار دارد (۲۸، ۳۰ و ۳۴). در این مطالعه از تخم‌مرغ جنین‌دار به عنوان مدل حیوانی استفاده شد. تخم‌مرغ جنین‌دار در مطالعات متعددی برای بررسی انگل‌ها مورد استفاده قرار گرفته است و نتایج قابل قبولی را به عنوان یک مدل حیوانی مناسب برای انگل‌ها از خود نشان داده است. از جمله می‌توان به بررسی مراحل مختلف زندگی انگل تریپانوزوم کروزی،

جدول۲- تعداد جنین های زنده در گروه های مختلف طی روزهای کندلینگ پس از تلقیح انگل

گروه ها	تعداد در هر گروه	تعداد جنین های زنده در روزهای پس از تلقیح											
		روز دهم	روز یازدهم	روز دوازدهم	روز سیزدهم	روز چهاردهم	روز پانزدهم	روز شانزدهم	روز هفدهم	روز هجدهم	روز نوزدهم	روز بیستم	روز بیست و یکم
سالم	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸
کنترل منفی	۸	۸	۸	۸	۸	۵	۵	۴	۴	۳	۲	۲	۱
کنترل مثبت	۸	۸	۸	۸	۸	۷	۷	۷	۷	۶	۶	۶	۵
شیرین بیان	۸	۸	۸	۷	۷	۷	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
زنجبیل	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸

نمودار ۲- بررسی تاثیر غلظت های مختلف زنجبیل بر رشد سلول



در تخم‌مرغ جنین‌دار اشاره نمود (۲۳). همچنین برای بررسی عفونت نئوسپورایی توسط فوراتا و همکاران (۲۰۰۷)، منصوریان و همکاران (۲۰۰۹) و نام‌آوری و همکاران (۲۰۱۱)، مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱، ۲۲ و ۲۶). مطالعات انجام شده بیان می‌دارد که تخم‌مرغ جنین‌دار از میزان ایمنی کمتری نسبت به سایر حیوانات آزمایشگاهی برخوردار است؛ بنابراین استفاده از مدل تخم‌مرغ جنین‌دار برای مطالعه نئوسپورا کانینوم به عنوان یک روش سریع و آسان مفید می‌باشد. همچنین نتایج بافتی و علائم بیماری مشاهده شده در مطالعه منصوریان و همکاران (۲۰۰۹)، نشان داد که دوز ۱۰۴ تاکی‌زوئیت برای هر تخم‌مرغ جنین‌دار می‌تواند منجر به بروز عفونت شود (۲۲). خردادمهر و همکاران (۲۰۱۳)، نیز تخم‌مرغ جنین‌دار را برای بررسی میزان کاهش حدت نئوسپورا کانینوم مورد استفاده قرار دادند که نتایج موفقیت‌آمیزی کسب نمودند (۱۸). به علاوه ستاسیمی و نام‌آوری (۲۰۱۵)، از تخم‌مرغ جنین‌دار برای بررسی میزان عفونت حاصل از تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی تخفیف حدت‌یافته استفاده نمودند و نتایج آنها نشان داد تخم‌مرغ جنین‌دار می‌تواند مدل حیوانی مناسبی برای تک‌یاخته‌ها از جمله توکسوپلاسما گوندی باشد (۳۵).

با توجه به نتایج موفق مطالعات ذکر شده، در این مطالعه نیز از تخم‌مرغ جنین‌دار به عنوان مدل حیوانی استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که گروه‌های تزریق شده با کلیندامایسین و شیرین بیان، تلفات وجود دارد، در صورتی‌که جنین تخم‌مرغ‌های گروهی که با عصاره‌ی آبی زنجبیل و گروه یک یا همان گروه سالم تا انتهای روز ۲۱ هیچگونه تلفاتی نداشته و همگی زنده ماندند، که این موضوع مؤثر بودن عصاره گیاهی زنجبیل در ممانعت از تکثیر و بیماریزایی انگل نئوسپورا کانینوم نشان می‌دهد. بررسی منابع موجود نشان می‌دهد که تاکنون مطالعه‌ای که تأثیر شیرین بیان و زنجبیل را بر انگل نئوسپورا کانینوم بررسی کند منتشر نگردیده و به عبارتی این اولین تجربه آزمایشگاهی از مجاورت این گیاهان دارویی در مقابل انگل نئوسپورا است. لیکن در مطالعات قبلی تاثیر مثبت عصاره‌های گیاهی زنجبیل در کنترل و مهار انگل توکسوپلاسما گوندی که مشابهت مورفولوژیکی زیادی با نئوسپورا کانینوم دارد گزارش شده است (۵ و ۱۰). در مطالعه چوی و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره‌های متانولی ۱۵ گیاه دارویی بر تاکی‌زوئیت‌های سویه RH توکسوپلاسما بر روی رده سلولی Hella در مقایسه با پری‌متامین بررسی شد. در همان مطالعه عصاره شیرین بیان بیشترین فعالیت ضد توکسوپلاسمایی را نشان داد اما سمیت انتخابی نشان نداد (۵). همچنین مطالعات مشابه دیگر اثر ضد انگلی و ضدعفونی کننده زنجبیل را نشان دادند (۱۰). مطالعات آزمایشگاهی و بالینی خاصیت ضدانگلی زنجبیل علیه نماتودها، سستودها، پروتوزوا، حشرات و نرم‌تنان را گزارش کرده‌اند. به نظر می‌رسد مکانیسم فعالیت زنجبیل از طریق آنتی کولینرژیک و آنتی هیستامینی باشد (۱۲).

با وجودی که نقش عصاره‌های زنجبیل در طیف وسیعی از پروتوزواها مشخص شده، اما تأثیر آن بر نئوسپورا کانینوم تاکنون در هیچ مطالعه‌ای بررسی نشده است و مکانیسم عمل آن نیز مشخص نیست اما به نظر می‌رسد از پیگیری مطالعات مشابه می‌توان تا حدودی مکانیسم عمل زنجبیل در نئوسپورا را حدس زد. چوی و همکاران گزارش کردند که عصاره ریشه زنجبیل نه تنها با غیر فعال‌کردن پروتئین‌های آپوپتیک در سلول‌های آلوده میزبان سبب مهار مستقیم توکسوپلاسما گوندی می‌شود، بلکه خواص ضدانگلی خود را با مهار سایتوکاین‌های مهاری نیز القا می‌کند (۵).

شیرین بیان گیاهی از خانواده نخود است که وجود موادی با فعالیت آنتی‌اکسیدان قوی در این گیاه به اثبات رسیده است. تعدادی از مواد مؤثر این گیاه شامل تری‌ترپنهای ساپونینی، فلاونوییدها و ایزوفلاون‌ها است. مهم‌ترین ماده موجود در گیاه شیرین بیان، اسیدگلیسریزیک است که مقدار آن در ریشه شیرین بیان بیشتر از سایر قسمت‌های گیاه است (۱۶). تحقیقات فارماکولوژیک نشان داده که این ماده فعالیت آنتی‌باکتریال، آنتی‌تومور و آنتی‌اکسیدان دارد اما خواص ضدانگلی آن گزارش نشده است (۱۶، ۲۴ و ۲۷). در مطالعه حاضر نیز شیرین بیان در مهار تکثیر انگل نئوسپورا کانینوم موفق نبود و تفاوت معناداری در این گروه با گروه کنترل منفی دیده نشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به خاصیت ضدنئوسپورایی زنجبیل در مقایسه با کلیندامایسین، می‌توان از ترکیبات عصاره‌ای زنجبیل که به صورت طبیعی تهیه می‌گردد و عوارض ناخواسته داروهایی مانند کلیندامایسین را ندارد در مهار رشد انگل نئوسپورا کانینوم استفاده کرد. علاوه بر این هزینه‌های تأمین زنجبیل به مراتب کمتر از آنتی بیوتیک‌های صنعتی است که این عامل نیز سبب ارجحیت استفاده از داروهای گیاهی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۵۰۰۶۱-۰۰۹-۱۸-۸۴-۲ تأمین گردیده است و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل اجرایی ان انجام گرفته است.

منابع مورد استفاده

1. Abdollahi S, Kazemi M. Designing of ELISA kit for diagnosis of anti-Toxoplasma Specific IgG, using exerted/secreted antigens and its *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2008; 17 (62) :14-20

2. Armanini, D., Bonanni G. and Palermo M. 1999. Reduction of serum testosterone in men by licorice. *New England Journal of Medicine*, 341: 1158-1158.

3. Bjerkas, I., Mohn, S.F., Presthus, J. 1984. Unidentified cyst-forming-sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd*, 70: 271-274.

4. Chen, M., Theander, T. G., Christensen, S. B., Hviid, L., Zhai, L. and Kharazmi, A. 1994. Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite Plasmodium falciparum and protects mice from P. yoelii infection. *Antimicrobial agents and chemotherap*, 38: 1470-1475.

5. Choi, W., M. Jiang and J. Chu. 2013. Antiparasitic effects of

Zingiber officinale (Ginger) extract against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Applied Biomedicine*, 11(1): 15-26.
6. Debache, K. and Hemphill, A. 2013. Differential effects of intranasal vaccination with recombinant NcPDI in different mouse models of *Neospora caninum* infection. *Parasite immunology*, 35: 11-20.
7. Dubey, J. P. 2003. Review of Neospora caninum and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology*, 16: 41.
8. Dubey, J.P., Schares, G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 31:1-34.
9. Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Revew*, 20:323–367.
10. Forouzan, S., Bahmani, M., Parsae, P., Mohsenzadegan, A., Gholami-Ahangaran, M., and Sadeghi, E. 2012. Anti-parasitic activites of Zingiber officinale methanolic extract on Limnatis nilotica. *Global Veterinary*, 9: 144-148.
11. Furuta, P., T. Mineo, A. Carrasco, G. Godoy, A. Pinto and R. Machado. 2007. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology,* 134(14): 1931-1939.
12. Gilani, A. and Ghayur, M. 2005. Ginger: from myths to reality. Ethnotherapies in the cycle of life. BOD-Books on Demand/ Ethnomed Institut für Ethnomedizin eV, Munich: 307-315.
13. Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., and Kinoshita, T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from Glycyrrhiza inflata. *Phytochemistry*, 48: 125-129.
14. Häsler, B., Regula, G., Stärk, KD., Sager, H., Gottstein, B., Reist, M. 2006. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Prevew Veterinary & Medicine*, 77:230-53.
15. Hosseini, A., Jaffary, F.G., Asghari, R., Hejazi, S. H., and Bidabadi, L. S. 2012. In Vitro Effects of Turmeric and Licorice Total Extracts on L. Major Promastigotes. *Journal of Isfahan Medical School*, 29:169.
16. Jatav, V. S., S. K. Singh, P. Khatri and A. Sharma. 2011. Recent pharmacological trends of Glycyrrhiza glabra Linn. Unani Res 1: 1-11
17. Khaksarian M, Javan M, Sonboli A, Motamedi F. Inhibition of acute and chronic pain in male rats by aqueous extract of Hypericum perforatum L. yafte. 2004; 5 (3) :11-18
18. Khordadmehr, M., M. Namavari, A. Khodakaram-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(2): 515-521.
19. Kobayashi, M., Fujita, K., Katakura, T., Utsunomiya, T., Pollard, R. B., and Suzuki, F. 2001. Inhibitory effect of glycyrrhizin on experimental pulmonary metastasis in mice inoculated with B16 melanoma. *Anticancer research*, 22: 4053-4058.
20. Lantz, R. C., Chen, G., Sarihan, M., Solyom, A., Jolad, S. and Timmermann, B. 2007. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*, 14: 123-128.
21. Li, Y., Tran, V. H.,.Duke, C. C and Roufogalis, B. D. 2012. Preventive and protective properties of Zingiber officinale (ginger) in diabetes mellitus, diabetic complications, and associated lipid and other metabolic disorders: a brief review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012:516870
22. Mansourian, M., A. Khodakaram-Tafti and M. Namavari. 2009. "Histopathological and clinical investigations in *Neospora caninum* experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. *Veterinary parasitology*, 166(3): 185-1
23. Mello, M. N. and M. P. Deane. 1976. "Patterns of development of *Trypanosoma cruzi* in the embryonated chicken egg. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 70(4): 381-388.
24. Mirmala, P. and Selvaraj, T. 2011. Anti-inflammatory & antibacterial activities of Glycyrrhiza glabra. *Journal of Agriculture Technology*, 7: 815-823.
25. Müller, J., Hemphill, A. 2011. Drug target identification in intracellular and extracellular protozoan parasites. *Current Topics in Medicine Chemistry*, 11:2029–2038.
26. Namavari, M., M. Mansourian, A. K. Tafti, M. H. Hosseini, A. Rahimiyan, M. Khordadmehr and M. Lotfi. 2012. Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of *Neospora caninum* tachyzoites. *Comparative Clinical Pathology*, 21(6): 1665-1668.
27. Numazaki, K., N. Nagata, T. Sato and S. Chiba. 1994. "Effect of glycyrrhizin, cyclosporin A, and tumor necrosis factor alpha on infection of U-937 and MRC-5 cells by human cytomegalovirus. *Journal of leukocyte biology*, 55(1): 24-28.
28. Nweze, E., Okafor, J. and Njoku, O. 2004. Antimicrobial activities of methanolic extracts of Trema guineensis (Schumm and Thorn) and Morinda lucida benth used in Nigerian. *Bio-research,* 2: 39-46.
29. Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K. 1996. Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Canadaian Journal of Veterinary Research*, 60:133–139.
30. Rathi, S., Suthar, M., Patel, P., Bhaskar, V., and Rajgor, N. 2009. In-vitro cytotoxic screening of Glycyrrhiza glabra L.(Fabaceae): A natural anticancer drug. *Journal of Young Pharmacists*, 1: 239-243.
31. Reichel, M.P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim,

L.F., Ellis, J.T. 2012. What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle – the billiondollar question. *International Journal of Parasitology*, 43:133–142.

32. Reichel, MP, Ellis, JT. 2006. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Veterinary Parasitology*. 142:23-34.

33. Schares,G. , Pantchev, N., Barutzki, D., Heydorn, A.O., Bauer, C., Conraths, F.J. 2005. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *International Journal for Parasitology*, 35: 1525–1537.

34. Schoen, A. M. and S. G. Wynn. 1998. Complementary and alternative veterinary medicine, Mosby.

35. Setasimy, A., and Namavari, M., 2016, Use of chicken embryonated eggs for evaluating the virulence of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4):1223-1225.

36. Sykes, J. E. (2013). Canine and Feline Infectious Diseases-E-BOOK. Elsevier Health Sciences.