نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ٦، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۱-۷

تعیین میزان حدت و تغییرات هیستوپاتولوژی *بسنوتیا بسنویتی* در تخم‌مرغ جنین‌دار

شادزی متکلمی[۱]، مرضیه کفایت*[۲]، سیدرضا حسینی[۳]، میلاد حمزه علی طهرانی[۴]

۱- دانش‌آموخته، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۴- دانش‌آموخته، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۱۳ خرداد ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۹ تیر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۸ شهریور ۱۴۰۲

10.22034/NFVM.2023.400320.1188 20.1001.1.26454491.1402.6.2.1.9

چکیده

بسنوتیازیس یک بیماری مزمن تا شدید و به‌طور معمول غیر کشنده در گاو است که توسط تک‌یاخته *بسنوتیا بسنویتی* ایجاد و سبب تظاهرات جلدی و سیستمیک شدید می‌شود. ایزوله Bb-Ger1 از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد و ابتدا در محیط کشت با رده سلولی (MARC 145) تکثیر و سپس با استفاده از لام نئوبار شمارش شد، هفت گروه ده‌تایی از تخم‌مرغ‌های جنین‌دار استاندارد نژاد Ross 308 از مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران تهیه و در روز نهم هچینگ تخم‌مرغ‌ها به گروه‌های اول تا ششم به‌ترتیب رقت‌های (ده، صد، هزار، ده هزار، صد هزار، یک میلیون) از تاکی‌زوئیت‌های انگل به میزان ۲۰۰ میکرولیتر و گروه هفتم به‌عنوان گروه شاهد فقط با PBS استریل تلقیح شدند. تخم‌مرغ‌ها روزانه بررسی و نمونه‌های بافتی از مغز، قلب، کبد، و پوست در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری و جهت بررسی هیستوپاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت. مرگ و میر جنین‌ها در گروه‌های دریافت کننده انگل تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل داشت ($P<0.05$) و تلفات جنین‌ها و شدت ضایعات بافتی در گروه‌های مختلف وابسته به دوز انگل نبوده و تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ($P>0.05$). ضایعات هیستوپاتولوژی در بافت‌های مختلف شامل پرخونی، خونریزی، سلول‌های آماسی و نکروز مشاهده شد. مطالعه حاضر نشان داد که تخم‌مرغ جنین‌دار نمی‌تواند محیط مناسبی برای رشد و تکثیر انگل *بسنوتیا بسنویتی* باشد.

واژگان کلیدی: *بسنوتیا بسنویتی ، تخم‌مرغ جنین‌دار، حیوان مدل آزمایشگاهی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: marziehkefayat@yahoo.com

مقدمه

تک‌یاخته *بسنوتیا* از خانواده سارکوسیستیده است و انگل لوله گوارش گربه بوده و اووسیست آن دفع شده و اگر چنانچه توسط گاو بلع شود یک دوره نزله‌ای (تب‌دار) را طی می‌کند و بعد از این دوره در زیر جلد مستقر شده و کیست‌های بسنوتیا را ایجاد می‌کند که ابتدا موجب ریزش مو و سپس شاخی و سفت شدن پوست (اسکلرودرما) شده که تحت عنوان بیماری پوست فیلی نیز شناخته می‌شود. مگس‌های خونخوار در دوران کوتاه گزش خود موجب انتقال انگل از یک حیوان آلوده (دوره پارازیتمی) به حیوان دیگر می‌شوند و به‌طور کلی روند بیماری با دو مرحله شروع می‌شود: ابتدا مرحله تب‌دار انگل که در آن ترشحات اشک، ریزش بینی و گاهی ممکن است ترس از نور و اگزوفتالمی و تورم غده‌های لنفاوی پشت چشم را نشان دهد و در نهایت یک آدنوپاتی منتشر (تورم سایر غدد لنفاوی بدن) رخ دهد. در مرحله بعد تمامی علائم از بین رفته و ریزش مو و ایجاد سبورئیک مشاهده می‌شود، همچنین کیست‌های انگل در صلبیه چشم قابل مشاهده هستند (۵). در حال حاضر دارو یا واکسن مؤثری علیه بیماری در دنیا وجود ندارد ولیکن راه‌های تشخیصی همچون سرولوژی شامل الایزا و وسترن بلات و روش‌های تشخیص مولکولی (PCR) با استفاده از توالی‌های ITS-1 و 18srDNA برای این بیماری شناخته شده است (۳، ۴، ۸، ۹). تخم‌مرغ‌های جنین‌دار چندین دهه در انگل‌شناسی به‌عنوان مدلی برای ایزوله کردن تک‌یاخته و تکثیر آنها استفاده شده است، استفاده از تخم‌مرغ‌های جنین‌دار به دلیل مقرون به صرفه و استریل بودن بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند و کشت تک‌یاخته توکسوپلاسما گوندی در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار گزارش شده است (۱۶). بر این اساس جهت انجام مطالعه حاضر از تخم‌مرغ جنین‌دار به‌عنوان محیط کشت جهت رشد و تکثیر انگل استفاده شد تا میزان حدت انگل در دوزهای مختلف و آسیب‌های وارده به بافت‌های مختلف جنین تخم‌مرغ‌ها در اثر انگل مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی: از ایزوله Bb-Ger1 *بسنوتیا بسنویتی* تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی جهت آلوده‌سازی و تکثیر تک‌یاخته مورد نیاز تحقیق حاضر استفاده شد و ایزوله مذکور ابتدا در محیط کشت با رده سلولی (MARC 145) (سلول کلیه میمون سبز آفریقایی) در محیط کشت DMEM به همراه ۲ درصد سرم جنین گوساله و پنی‌سیلین - استرپتومایسین به میزان (1µl/ml) کشت داده شد. فلاسک‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شد و روزانه به‌منظور مشاهده تخریب سلولی با میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفت، پس از سه روز تخریب ۸۰ تا ۹۰ درصدی در سلول‌ها مشاهده شد، سپس محتویات مایع رویی فلاسک جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 1800g سانتریفیوژ شد، رسوب باقیمانده که حاوی *بسنوتیا بسنویتی* بود با رنگ تریپان بلو (Sigma Aldrich- Germany) رنگ‌آمیزی شد و با لام نئوبار مورد شمارش قرار گرفت. کشت و پاساژ دادن تاکی‌زوئیت‌های بسنویتیا بسنویتی در رده‌های سلولی ذکرشده به طور اصولی با خصوصیات بیولوژیکی مناسب تأیید شد. عدم آلودگی مایکوپلاسمایی روی محیط کشت PPLO آگار تأیید شد و جهت اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی از محیط کشت سلولی و سرم، کشت تاکی‌زوئیت‌ها در محیط آگارخون‌دار انجام و عدم رشد باکتری در این محیط‌ها نیز تایید شد.

تلقیح به تخم‌مرغ جنین‌دار: جهت مقایسه‌ی میزان حدت تاکی‌زوئیت‌های *بسنوتیا بسنویتی*، هفت گروه ده تایی از تخم‌مرغ‌های جنین‌دار استاندارد نژاد Ross 308 از مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران تهیه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۷۰ درصد و ۶ تا ۸ بار چرخش در ساعت داخل دستگاه هچر به‌صورت استریل نگهداری شد، تخم‌مرغ‌ها به‌طور روزانه به روش کندل مورد بررسی قرار گرفت و جنین‌ها از لحاظ وجود علائم حیاتی (حرکت و تشکیل رگه‌ها) بررسی شدند و در روز

نهم هچینگ تخم‌مرغ‌ها، محل غشاء کوریوآلانتوئیک با استفاده از کندلینگ مشخص و محدوده آن در هر تخم‌مرغ علامت‌گذاری شد، سپس سوراخی در حد فاصل کیسه هوایی و غشاء کوریو آلانتوئیک جهت محل تزریق انگل ایجاد، سپس به گروه‌های اول تا ششم به‌ترتیب رقت‌های (ده، صد، هزار، ده هزار، صد هزار، یک میلیون) از تاکی‌زوئیت‌های انگل به میزان ۲۰۰ میکرولیتر تلقیح شد و گروه هفتم به‌عنوان گروه شاهد فقط با سرم PBS استریل تلقیح شدند. تخم‌مرغ‌ها به مدت ۱۸ روز در دمای مناسب و شرایط کنترل شده حرارت و رطوبت در دستگاه جوجه‌کشی نگهداری شدند و به‌صورت روزانه دو بار جهت بررسی تلفات احتمالی کندل شدند و میزان مرگ و میر در هر گروه ثبت و از بافت‌های مغز، قلب و کبد، پوست و عضله آنها نمونه‌برداری انجام شد و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری و جهت بررسی هیستوپاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت.

هیستوپاتولوژی: از جنین‌های تلف شده در گروه‌های مختلف تلقیح، ابتدا بازرسی دقیق خارجی به عمل آمده و سپس جهت مطالعات هیستوپاتولوژی بافت‌های مغز، قلب، کبد و پوست آنها نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های بافتی در فرمالین ۱۰ درصد به میزان حداقل ۱۰ برابر حجم نمونه برای مغز، قلب، کبد و پوست و همچنین به میزان حداقل۲۰ برابر برای مغز استفاده شد، بعد از ۲۴ ساعت فرمالین تعویض شد و مراحل آماده‌سازی بافت شامل آبگیری با استفاده از الکل‌هایی با درجه صعودی انجام شد و پس از آن مرحله شفاف‌سازی با استفاده از گزیلول و خارج کردن الکل انجام شد (دستگاه اتوتکنیکون) و نهایتاً مرحله آغشتگی و قالب‌گیری با استفاده از پارافین مذاب صورت گرفت و پس از تهیه برش‌های ۴ تا ۵ میکرونی از بلوک‌های بافتی، به مدت سی دقیقه در آون ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از خنک شدن در محیط آزمایشگاه، رنگ‌آمیزی متداول هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و به‌وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت (تصویر ۱).

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل نمونه‌ها و تعیین رابطه بین متغیرهای کیفی مورد مطالعه حاضر به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ و با کمک تست آزمون مربع کای استفاده شد.

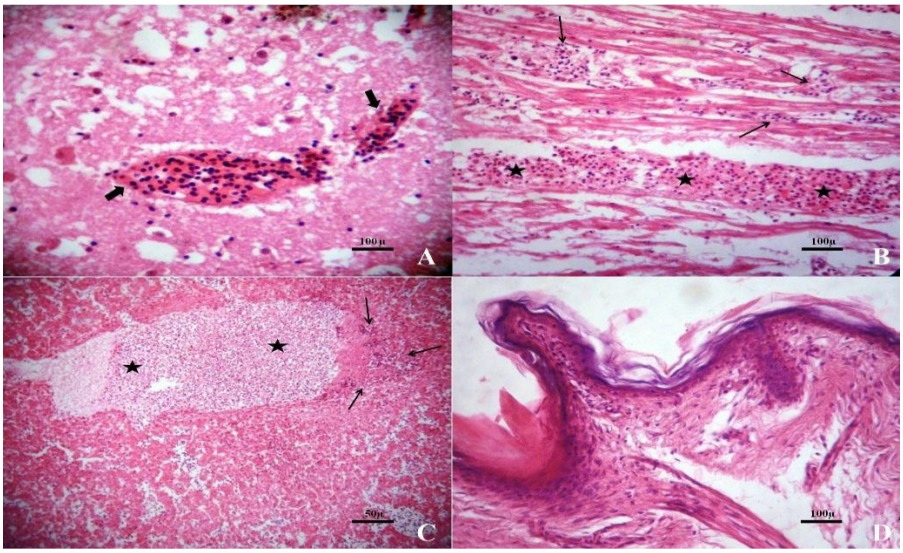
نتایج

در جوجه‌های هچ شده با گروه‌های دریافت کننده تاکی‌زوئیت‌های *بسنوتیا بسنویتی* علائم بالینی شامل عدم جذب کامل کیسه زرده، ضعف، عدم تعادل، ناتوانی در ایستادن و ژولیدگی پرها و مرگ در رقت‌های چهارم و ششم مشاهده شد و همچنین جوجه‌های هچ شده گروه شاهد از نظر بالینی کاملاً طبیعی بودند (جدول شماره ۱).

جدول ۱- نتایج تلفات جنین‌ها ۱۵ روز پس از تلقیح

گروه	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم (شاهد)
رقت تاکی‌زوئیت	۱۰	۱۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰	۰
میزان کشندگی	٪۵۰	٪۵۰	٪۷۵	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	۰

در بررسی ماکروسکوپیک جنین‌های مرده درگروه‌های مختلف در بافت‌های مختلف مغز، قلب، کبد و پوست هیچ‌گونه ضایعه‌ای مشاهده نشد و لیکن در بررسی هیستوپاتولوژیک میکروسکوپی در بافت مغز: خونریزی، پرخونی، سلول‌های آماسی، در بافت قلب: نکروز سلول‌های عضلانی، پرخونی، ارتشاء سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای (لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و هتروفیل‌ها) در بین سلول های عضلانی، در بافت کبد: پرخونی، خون‌ریزی، نفوذ سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای (لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و هتروفیل‌ها) در اطراف سیاهرگ مرکز لوبولی و همچنین در بافت پوست: افزایش بافت همبند، ضخیم و چروکیده شدن پوست مشهود می‌باشد (تصویر ۱).



تصویر ۱- مقاطع هیستوپاتولوژی، بافت مغز (A)، بافت قلب (B)، بافت کبد (C)، بافت پوست (D)

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ایزوله‌ی تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (Bb-Ger1) با موفقیت در محیط کشت با رده سلولی (MARC 145) (سلول کلیه میمون سبز آفریقایی) تکثیر و جهت آلوده‌سازی تخم‌مرغ‌ها استفاده شد (۶، ۱۰، ۱۲). در سال‌های اخیر از تخم‌مرغ جنین‌دار به‌عنوان مدلی برای جداسازی، انتشار و انجام مطالعات بر روی بیولوژی انگل‌ها استفاده شده است که در دسترس بودن و قیمت مناسب، آن را به مدل خوبی برای انجام مطالعات تبدیل کرده است. تاکنون از تخم‌مرغ جنین‌دار به‌عنوان محیط کشت برای تک‌یاخته‌هایی همچون تریپانوزوم کروزی استفاده شده است (۱۳).

کیست بافتی *بسنوتیا بسنویتی* تاکنون در هیچ حیوان آزمایشگاهی تولید نشده است و R.D. Biglake در سال ۱۹۶۲ نشان داد که تاکی‌زوئیت‌های *بسنوتیا بسنویتی* مشتق شده از محیط کشت برای ژربیل‌ها و رت‌های خاکی کشنده است و خرگوش‌ها علائم بالینی شامل تب، کونژکتیویت و ارکیت را نشان دادند اما زنده مانده‌اند. موش‌ها، رت‌ها، خوکچه هندی، همستر و میکروتوس‌ها نشانه بالینی بیماری را بروز ندادند اما تیتر پادتن اختصاصی ضد *بسنوتیا بسنویتی* در آنها افزایش یافته است (۱). در مطالعه نمازی و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز مرگ و میر در تخم‌مرغ‌های جنین‌داری که دوزهای مختلف بسنوتیا کاپره را دریافت نموده بودند از ۶ الی ۷ روز پس از تلقیح انگل آغاز شده بود و تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل دیده شده است (۱۵). همچنین نتایج مرگ و میر تخم‌مرغ‌های جنین‌دار دریافت کننده دوزهای مختلف انگل در مقایسه گروه کنترل مشابه مطالعه فورتا و همکاران در سال ۲۰۰۷، منصوریان و همکاران در سال ۲۰۱۵، و بابایی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بود. مقایسه گروه‌های دریافت کننده تاکی‌زوئیت‌های *بسنوتیا بسنویتی* نشان داد که افزایش دوز تاکی‌زوئیت تلقیح شده تأثیری در میزان مرگ و میر جنین‌ها نداشته است و این بدین معناست که تلفات جنین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه به دوز انگل تلقیح شده وابسته نبوده است (۲، ۱۱، ۱۴).

نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه فورتا و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد که در آن تک‌یاخته *نئوسپورا کنینوم* را به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار نژاد تخم‌گذار تلقیح نمودند و مشخص شد که میزان مرگ و میر جنین‌ها در اثر تک‌یاخته *نئوسپورا کنینوم* به دوز تلقیح شده وابسته نیست (۱۱). هر چند که نمازی و همکاران در سال ۲۰۱۰ توانستند تک‌یاخته *بسنوتیا کاپره* را به‌طور موفقیت‌آمیزی در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار کشت و تکثیر

نمایند. علارغم این که در مطالعه حاضر از تخم‌مرغ جنین‌دار نژاد گوشتی Ross 308 استفاده شد اما نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه ذکر شده مغایرت دارد (۱۵). همچنین در بررسی هیستوپاتولوژی در بافت‌های مختلف جنین‌های تلف شده ضایعاتی از قبیل نکروز و درجاتی از سلول‌های آماسی، خونریزی و پرخونی مشاهده شد که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۲).

مطالعه حاضر که برای اولین بار بر روی جنین جوجه‌های گوشتی انجام شده است نشان داد که تخم‌مرغ جنین‌دار نمی‌تواند محیط مناسبی برای رشد و تکثیر انگل *بسنوتیا بسنویتی* باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

References

1- Bigalke R.D. Preliminary communication on the cultivation of *Besnoitia besnoiti* (Morotel, 1912) in tissue culture and embryonated eggs. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1962; 33(4).

2- Babaei Gourchinloo Z, Kefayat M, Namavari M. Comparison of virulence and histopathological changes of NC-1 and NC-SweB1 isolates of *Neospora caninum* in chicken embryonated eggs. *Veterinary Research & Biological Products*. 2017; 30(4): 92-99. [In Persian]

3- Cortes H.C, Nunes S, Reis Y, Staubli D, Vidal R, Sager H, *et al.* Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Vet Parasitol.* 2006; 141(3-4): 216-225.

4- Cortes H.C, Reis Y, Gottstein B, Hemphill A, Leitao A, Muller N. Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Vet Parasitol.* 2007; 146(3-4):352-356.

5- Cortes H.C, Reis Y, Waap H, Vidal R, Soares H, Marques I, *et al.* Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Vet Parasitol*. 2006; 141(3-4): 226-233.

6- Dubey J.P, Sreekumar C, Rosenthal B.M, Vianna M.C.B, Nylund M, Nikander S, *et al.* Redescription of *Besnoitia tarandi* (Protozoa: Apicomplexa) from the reindeer (Rangifer tarandus). *International Journal of Parasitology*. 2004; 34: 1273-1287.

7- Ellis J.T, Holmdahl J.M, Ryce C, Njenga M.J, Harper P.A.W, Morrison D.A. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest, and goats. *Protist*. 2000;151: 329-336.

8- Ellis J.T, Holmdahl J.M, Ryce C, Njenga M.J, Harper P.A.W, Morrison D.A. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest, and goats. *Protist*. 2000; 151: 329-336.

9- Fernandez-García A, Alvarez-García G, Risco-Castillo V, Aguado-Martínez A, Marcen J.M, Rojo-Montejo S, *et al.* Development and use of an indirect ELISA in the outbreak of bovine besnoitiosis in Spain. *Vet Rec*. 2010; 166(26): 818-822.

10- Fernandez-García, A, Risco-Castillo, V, Pedraza-Diaz, S, Aguado-Martínez, A, Alvarez-García, G, Gomez-Bautista, M, *et al.* First isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain. *J. Parasitol*. 2009; 95(2): 474-476.

11- Furuta P.I, Mineo T.W.P, Carrasco A.O.T, Godoy G.S, Pinto A.A, Machado R.Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology*. 2007; 134: 1931-1939.

12- G Schares, Basso W, Majzoub M, Cortes H.C, Rostaher A, Semair J, *et al.* First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Vet. Parasitol*. 2009; 163(4): 31-322.

13- Mello M.N, Deane M.P. Patterns of development of *Trypanosoma cruzi* in the embryonated chicken egg. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1976; 70: 380-388.

14- Mansourian M, Namavari M, Khodakaram-Tafti A, Rahimian A. Experimental *Neospora caninum* infection in domestic bird's embryonated eggs. *J Parasit Dis*. 2015; 39(2): 241-

244. [In Persian]

15- Namazi F, Oryan A, Namavari M.M, Rahimian A. Experimental infection of embryonated eggs of chicken. *Tropical Biomedicine*. 2010; 27(3): 417. [In Persian]

16- Que X, Wunderlich A, Joiner K.A, Reed S.L. Toxopain-1 is critical for infection in a novel chicken embryo model of congenital toxoplasmosis. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 2915-2921.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 6, Issue 2, Autumn & Winter 2023, pages: 1-7

Determining the intensity and histopathological changes of *Besnoitia besnoiti* in embryonated eggs

Shadzi Motakalemi, Marzieh Kefayat[*1], Seyed Reza Hosseini [2], Milad Hamzehali Tehrani[3]

1- Graduate, faculty of veterinary, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2- Associate Professor, Department of Pathobiology, faculty of veterinary, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
3- Associate Professor, Department of Pathobiology, faculty of veterinary, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
4- Graduate, Department of Pathobiology, faculty of veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Receive: June 03, 2023; Revise: July 10, 2023; Accept: September 9, 2023

10.22034/NFVM.2023.400320.1188 20.1001.1.26454491.1402.6.2.1.9

Summary

Besnoitiosis is a chronic to severe and usually non-fatal disease in cattle, which is caused by the protozoan *Besnoitia besnoiti* and causes severe skin and systemic manifestations. The Bb-Ger1 isolate was obtained from the Razi Vaccine and Serum Research Institute and was first propagated in the culture medium with the cell line (MARC 145) and then counted using Neubauer chamber, seven groups of ten from Ross 308 standard embryonated eggs from Iran Animal Science Research Institute and on the ninth day of hatching, the eggs were divided into the first to sixth groups, respectively (ten, one hundred, one thousand, ten thousand, one hundred thousand, one million) dilutions of parasite tachyzoites in the amount of 200 microliter and the seventh group were inoculated only with sterile PBS as a control group. Eggs were examined daily and tissue samples from brain, heart, liver, and skin were fixed in 10% formalin and evaluated for histopathology. The mortality of fetuses in the groups receiving the parasite was significantly different from the control group ($P<0.05$) and the death of the fetuses and the severity of tissue lesions in different groups were not dependent on the parasite dose and had no significant difference ($P>0.05$). Histopathological lesions were observed in various tissues, including hyperemia, hemorrhage, edematous cells, and necrosis. The present study showed that the embryonated egg cannot be a suitable environment for the growth and reproduction of *Besnoitia besnoiti* parasite.

Keywords: *Besnoitia besnoiti, embryonated egg, laboratory model animal*