DOI: 10.22092/VJ.2021.355424.1882
شماره ۱۳۶ پاییز ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تشخیص *Neospora caninum* در جنین سقط شده گاو با استفاده از PCR، ELISA، Histopathology و Real time PCR

• **فرهنگ ساسانی**
دپارتمان پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• **فاطمه امینی‌نجفی(نویسنده مسئول)**
دپارتمان پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• **محمد حسین ناظم‌شیرازی**
سازمان دامپزشکی کل کشور

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۰۷-۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۰۷-۱۵
Emali: vadieamini@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعه: نئوسپوروز گاو توسط *Neospora caninum*، انگل تک‌یاخته‌ای که باعث عفونت دائمی می‌شود، ایجاد می‌شود. سقط جنین اغلب تنها علامت بیماری است.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع نئوسپورا کنینوم در برخی گاوداری‌های البرز و قزوین می‌باشد.

روش کار: در این تحقیق، ۱۰۵ نمونه از سقط جنین گاو به آزمایشگاه از مهرماه سال ۹۵ تا آبان سال ۹۷ ارسال شد. نمونه‌های دریافتی شامل مغز، قلب و جفت از نقطه نظر آلودگی با *N. caninum* با استفاده از PCR، ELISA، Histopathology و Real Time PCR بررسی گردید. از تکنیک الایزا به‌عنوان آزمون غربالگری اولیه گله مبتلا به سقط و تأیید آن با استفاده از روش‌های آسیب‌شناسی بافتی و مولکولی PCR استفاده گردید.

نتایج: *N. caninum* باعث نفوذ التهابی تک‌هسته‌ای در اندام‌های مختلف و نکروز کانونی با نفوذ تک‌هسته‌ای در مغز می‌شود، ضایعات غیرچرکی نیز در اندام‌ها نشان می‌دهد عفونت سیستمیک است. میزان عفونت جنین با N. caninum با هر یک از روش‌های تشخیصی، ۸/۶ درصد با Elisa ، ۲۰/۹ درصد با Real Time PCR و ۶/۷ درصد با PCR بود.

نتیجه‌گیری نهایی: ارزیابی تکنیک‌ها برای تفسیر این نتایج مهم است. تشخیص سقط جنین ناشی از *N. caninum* مستلزم شناسایی انگل از طریق تکنیک‌های خاص مانند هیستوپاتولوژی یا روش‌های مولکولی مانند PCR است که از حساسیت بالاتری برخوردار هستند. ترجیحاً با شناسایی ضایعات هیستوپاتولوژیک و انجام آزمون‌های مولکولی به همراه هم می‌توان به نتایج درست‌تری دست پیدا نمود. استفاده از جفت و مهم‌تر از آن، مغز جنین و آزمون‌های PCR و Real Time PCR بهمراه استفاده از هیستوپاتولوژی تشخیص قطعی نئوسپروز را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: نئوسپورا کنینوم، هیستوپاتولوژی، آزمون‌های مولکولی

Veterinary Researches & Biological Products No 136 pp: 62-70

Detection of Neospora caninum in aborted bovine embryos using Histopathology, ELISA, PCR and Real time PCR

By: Sasani, F., pathology department , Tehran university,Tehran,Iran. amininajafi, F., (Corresponding Author) pathology department , Tehran university,Tehran, Iran. and nazemshirazi, M.H., Iran veterinary organization.

Received: 2021-09-25 Accepted: 2021-10-07

Emali: vadieamini@yahoo.com

Background:Bovine neosporosis is caused by Neosporacaninum, A parasite that causes abortion is often the only observed sign of disease.

Objective: The aim of this study was to investigate the prevalence of Neospora caninum in some Alborz and Qazvin farms.

Methods: in this reaserch 105 samples from bovine abortions were sent to the laboratory, from January 2018 to May 2019. Samples were screened for N. caninum in the brain, heart, kidney, liver, lung, spleen, and placenta, using HistoPatology, ELISA, conventional, PCR and Real Time PCR.. Elisa was used as an initial screen for indication of infectious abortion and the second was histopathology and PCR

Results: A mononuclear inflammatory infiltrate was predominant in the heart, kidney, liver, lung, brain, and placenta.

N. caninum causes mononuclear inflammatory infiltrate in various organs and focal necrosis with mononuclear infiltrate in the brain, Non-suppurative lesions were also present in the lung, liver, kidney, and placenta, indicating that N. caninum infection is systemic. The rate of fetal infection with N. caninum, represented separately by each of the diagnostic techniques, was 8/6% with Elisa, 20/9% with Real Time PCR and 6/7% with conventional -PCR.

Conclusions :The diagnosis of abortion due to N. caninum requires detection of the parasite through techniques that are specific, such as Histopathology, or PCR that are both specific and more sensitive, preferably associated with identification of histopathological lesions placenta and, importantly, fetal brain, should be encouraged to increase the success of the definitive diagnosis of neosporosis by tests of conventionalPCR and Real Time PCR.

Keywords: *Neospora caninum*,Histopathology,molocular Tests

مقدمه

نئوسپوروز گاو توسط *Neospora caninum*، انگل تک‌یاخته‌ای که باعث عفونت مادام‌العمر می‌شود، ایجاد می‌گردد. سقط جنین اغلب تنها علامت مشاهده شده بیماری است. هیچ درمان مؤثری وجود ندارد و از میزان اثربخشی واکسن اطمینانی وجود ندارد. عفونت با *N. caninum* می‌تواند منجر به مرگ زودهنگام جنین، سقط جنین، مرده‌زایی یا گوساله ضعیف و غیرطبیعی شود *Neospora caninum* یک تک‌یاخته اولیه است به‌عنوان انگل در سگ‌ها شناخته شده است که در آن‌ها باعث میوزیت و انسفالیت می‌شود. نئوسپوروز گاو در حال حاضر به عنوان عامل اصلی سقط خود به خودی در گاو شناخته شده است. در ۲۰ درصد مزارع با سقط مکرر، احتمال زیاد می‌رود که *Neospora caninum* عامل سقط باشد، که این احتمال سه برابر بیشتر از گاوی که نئوسپورا منفی است، سقط جنین دارد. نئوسپورا مسئول ۲۱ درصد سقط‌های خود به خودی است که در یک حیوان رخ می‌دهد. این درصد برای کل گله به ۳۳ درصد می‌رسد. انتقال افقی معمولاً اتفاق میوفتد (حداقل ۸۰ درصد گوساله‌های متولد شده از گاوهای مثبت مبتلا به عفونت هستند). آزمایشات قبل از اولین مصرف آغوز گوساله، عفونت قبل از تولد را نشان می‌دهد.

عفونت‌های *N. caninum* از اکثر نقاط جهان گزارش شده است که نشان می‌دهد ۱۲-۴۵ درصد از جنین‌های سقط شده از گاوهای شیری با *N.caninum* آلوده هستند. یک ویژگی بارز این بیماری این است که بیشتر سقط‌های ناشی از این انگل در ماه ۶-۵ آبستنی اتفاق می‌افتد. خوردن پرده‌های جفت و جنین‌های سقط شده به احتمال زیاد مهم‌ترین منشأ آلودگی در سگ باشد. گاوها به‌طور افقی با آلوده شدن آب و خوراک و از سگ‌های آلوده و یا انتقال عمودی از گاو به جنین در دوران بارداری به این انگل آلوده می‌شوند و سپس این عفونت به‌عنوان یک عفونت مادام‌العمر حفظ می‌شود. پس از آلوده شدن، گاو می‌تواند در تمام دوران بارداری، ارگانیسم را از طریق جفت به گوساله خود منتقل کند. در برخی حاملگی‌ها، این عفونت جنین ممکن است منجر به سقط یا ضعف گوساله‌ها شود. با این حال، اکثریت قریب به اتفاق ۹۵ درصد گوساله‌هایی که با عفونت ("به‌طور مادرزادی آلوده") از گاوهای مثبت متولد شده‌اند کاملاً طبیعی هستند، اما تا پایان عمر آلوده باقی می‌مانند. یک تلیسه که با عفونت متولد می‌شود، می‌تواند عفونت را در زمان بارداری به نسل بعدی منتقل کند، بنابراین عفونت را در گله حفظ می‌کند. انتقال عمودی به‌عنوان اصلی‌ترین راه انتقال در گاو شناخته شده است، اما انتقال افقی

و عمودی برای زنده ماندن انگل ضروری است.
تصور می‌شود که سقط جنین با تخریب مستقیم جنین و جفت و یا آسیب جفت ممکن است باعث ترشح PGهای مادر شود که باعث لوتئولیز و سقط جنین می‌شود. شناسایی کامل سقط جنین از طریق یافتن ارگانیسم *N.caninum* در بافت‌های جنین و مطمئن‌ترین حالت جداسازی ارگانیسم از مغز جنین است. کنترل بر اساس حذف حیوانات مثبت، اجتناب از ورود جایگزین‌های آلوده به گله و جلوگیری از روش‌های احتمالی عفونت افقی است.

مواد و روش‌ها

تعداد صد و پنج نمونه از جنین‌های سقط شده از مهر ۹۵ تا آبان ۹۷ به آزمایشگاه ارسال شد. نمونه‌های مغز، قلب و جفت از جنین‌های دریافتی برداشت شد و با استفاده از تکنیک‌های PCR، Histopathology و Real Time PCR مورد آزمون قرار گرفت، از روش الایزا به‌عنوان آزمون غربالگری در گله‌ای که از آن نمونه‌برداری صورت گرفته استفاده گردید.

آزمون ELISA

به‌منظور تعیین اینکه آیا نئوسپوروز یک مشکل باروری بالقوه در دامداری‌ها است، گله باید مورد آزمایش قرار گیرد و ضمن حذف گوساله‌های مثبت باید فقط تلیسه‌های جایگزین منفی خریداری شوند.
بر اساس منابع، کیت الایزا غیرمستقیم کمپانی ID Vet برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضدنیوسپورا کانینوم در نمونه‌های سرم و یا شیر از حساسیت و ویژگی (> ۹۵) بسیار بالایی برخوردار است.
نمونه‌های خون از گاوهای با سابقه سقط اخذ شده و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس سرم‌های جداشده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شد. ۵۰ میلی‌لیتر از هریک از نمونه سرم در چاهک‌های پلیت الایزا اضافه و طبق دستورالعمل کیت برای ردیابی آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضدنیوسپورا IgG به روش الایزا غیر مستقیم مورد آزمایش قرار گرفتند.

آسیب‌شناسی بافتی

یافته‌های بافت‌شناسی تا حدودی متغیر است. ضایعات میکروسکوپی گزارش شده شامل نکروز کبدی و هپاتیت، اسپلنیت گرانولوماتوز، هپاتیت گرانولوماتوز، میوزیت، لنفوئید طحال، میوکاردیت، گاستروانتریت و هیپرپلازی سلول‌های شبکیه‌ای، برونکوپنومونی و مننژوانسفالیت است. اغلب بارزترین ضایعه هیستوپاتولوژیک انسفالومیلیت مننژوانسفالومیلیت چند کانونی است که به‌صورت نکروزهای کانونی گاهی اوقات در نورون‌ها مشخص می‌شود. بافت‌ها در فرمالین ۱۰ درصد ثابت شده، در پارافین جداسازی شده، در ۴ میکرومتر برش داده شد و برای پاتولوژی با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد.

PCR

برای مشخص کردن وضعیت گله از نظر بیماری نیوسپوروز تمام موارد سقط جنین بایستی با روش مولکولی PCR مورد آزمایش قرار گیرد. DNA ژنومی از بافت‌های تازه و فریزشده، با استفاده از کیت استخراج PCR template preparation kit High Pure از کمپانی Roche با استفاده از بافر لیزکننده با استفاده از بافر لیزکننده شامل تریس و EDTA و SDS و با استفاده از پروتیناز k به‌عنوان هضم‌کننده پروتین‌ها و اتصالات بین سلولی، طبق دستورالعمل سازنده استخراج و خالص‌سازی گردید. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام تستPCR نگهداری شد. استخراج DNA نمونه مغز از جنین سقط شده به‌عنوان نمونه هدف گرفته شد. ژن Nc به‌عنوان ژن هدف برای تشخیص Neospora انتخاب شده است.
واکنش PCR با استفاده از کیت تجاری Qiagen و طبق پروتکل کیت سازنده و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلرکمپانی Eppendorf انجام و محصول PCR توسط ژل آگارز الکتروفورز مشاهده گردید. به منظور الکتروفورز و مشاهده باندها، ژل آگارز یک و نیم درصد تهیه وتحت تأثیر ولتاژ الکتریسیته ۱۱۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه قرار گرفت. سرعت حرکت DNA بسته به طول قطعه DNA و ولتاژ مورد استفاده بستگی دارد. در انتها با استفاده از نور فرابنفش، محصولات PCR مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل ۱، ۳۴۰ جفت باز را برای تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم به‌عنوان پاسخ مثبت قلمداد می‌کنیم.

Real time PCR

در این روش یک کاوشگر (پروب) به واکنش اضافه شده و در هنگام شروع واکنش PCR با فعالیت ۵'نوکلیازی آنزیم Taq polymerase تجزیه می‌شود. کاوشگر فلورسنته این واکنش دارای رنگ فلوروفور گزارشگر reporter و خاموش کننده quencher می‌باشد. تمام ترکیبات مورد نیاز واکنش PCR در یک میکروتیوب ریخته شده و با استفاده از آنزیم Hot start Taq DNA polymerase که در دمای بالا فعال می‌شود مانع ایجاد پرایمر دایمر می‌گردد. سایر اجزای آزمایش شامل آب مولکولار گرید و بافر TaqMan ۲x به مقدار ۱۰ میکرولیتر و مخلوط پرایمرهای فوروارد و ریورس و پروب فلورسانس FAM به مقدار ۲/۵ میکرولیتر می‌باشد. ژن Nc به‌عنوان ژن هدف برای تشخیص Neospora انتخاب شده است. اندازه قطعه مورد تکثیر ۱۱۷ باز تعیین و ۵ میکرولیتر از DNA ژنومی (با غلظت ۱۰-۱ نانوگرم در میکرولیتر) را در میکروتیب ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول مستر میکس تهیه شده به آن اضافه گردید. میکروتیوب با حجم ۲۵ میکرولیتر را در دستگاه رییل تایم گذاشته و برنامه حرارتی طبق جدول ۱ اجرا گردید.
آغازگرها و کاوشگر Real Time PCR بر اساس S. De Craeyea انتخاب شدند (جدول ۲ را برای آغازگرها و پروب مشاهده کنید).

نتایج

در مطالعه حاضر تشخیص سقط جنین بر اساس ELISA، HistoPatology، PCR، معمولی و Real Time PCR جهت تشخیص *N.caninum* بود. تست الایزا به‌عنوان غربالگری اولیه برای نشان دادن سقط عفونی و دومین مورد آسیب شناسی بافتی و PCR بود، نفوذ سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای در قلب، کلیه، کبد، ریه، مغز و جفت غالب بود. به گفته Lindsay و همکاران در سال ۱۹۹۹، تاکیزوئیت‌ها یا کیست‌های *N.caninum* به ندرت به اندازه کافی در همه بخش‌های بافتی از حیوان یافت می‌شوند، بنابراین

برای تشخیص انگل نیاز به استفاده از آزمایشات خاص و حساس است. به همین دلیل، هیستوپاتولوژی باید مکمل آزمایش‌هایی مانند ELISA، PCR و Real Time PCR باشد که عامل ایجادکننده را مشخص می‌کند. در آزمایش ELISA نتیجه در جدول ۳ نشان داده شده است. (۲۵)

نئوسپورا کنینوم باعث نفوذ سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای در اندام‌های مختلف و نکروز کانونی با نفوذ سلول‌های تک‌هسته‌ای در مغز می‌شود. مطالعات PESCADOR و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان می‌دهد که مغز ارگان انتخابی برای تشخیص انگل است، زیرا بیشترین آسیب را به آن وارد می‌کند و هر قسمتی از آن را می‌توان برای بررسی بافت‌شناسی استفاده کرد De Craeye و همکاران در سال۲۰۱۰ نشان دادند سقط می‌تواند به دلیل انتقال عمودی انگل باشد De Craeye و همکاران در سال ۲۰۱۰ و DUBEY و همکاران در سال ۲۰۰۳ و SAGER و همکاران ۲۰۰۷ معتقدند که در برخی موارد، عفونت توسط *N. caninum* می‌تواند منجر به مرگ جنین قبل از ایجاد ضایعات شود(۹،۱۰،۳۸،۴۰).

در مطالعه حاضر PCR real time نمونه‌های آلوده مغز را تشخیص داد، در این مطالعه از آغازگر ناحیه DNA NC۵ ریبوزومی استفاده شده است و در نمونه‌های بافت مغز آلوده جنین‌های سقط شده از گله‌های شیری ۸۰ درصد مثبت بودند و میزان عفونت جنین با *N. caninum*، جداگانه با هر یک از روش‌های تشخیصی به شرح ذیل می‌باشد:

با الایزا ۸/۶ درصد، با Real time PCR ۶۰/۳ درصد و با PCR معمولی ۲۰/۲ درصد

شکل ۱- نتیجه الکتروفورز ژل آگارز نمونه‌های PCR در تشخیص *Neospora.caninum*

نمودار ۱- نتیجه Real time PCR در تشخیص *Neospora.caninum*

یافته‌های هیستوپاتولوژی

وجود کانون‌ها نکروزه همراه با تجمع سلول‌های آماسی در همه اندام‌ها خصوصاً مغز مشاهده شد، سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای شامل لنفوسیت، مونوسیت و ماکروفاژها بودند، کیست نئوسپورا در ۲ مورد از مغزها قابل مشاهده بود (شکل ۲).

ضایعات غیرچرکی نیز در ریه، کبد، کلیه و جفت وجود داشت که نشان می‌دهد عفونت *N. caninum* سیستمیک است و می‌تواند به بافت‌های مختلف جنین برسد. نکروز کبدی و گرانولوماتوز کانونی به وضوح مشاهده شد. آنسفالیت غیر چرکی، گلیوزیس(به صورت کانونی) ،هایپرامیای شدید و ادم نیز مشاهده گردید.

تکنیک‌های مولکولی DNA را در مقادیر کمی از نمونه‌های جنین، در هر شرایطی، مومیایی شده یا درجات مختلف اتولیز تشخیص می‌دهند. مقادیر پایین ضرایب کاپا در بین آزمایش‌ها نشان می‌دهد که تکنیک‌ها مکمل یکدیگر هستند و نیاز به محاسبه میزان عفونت جنین را با در نظر گرفتن حداقل یک نتیجه مثبت برای هر یک از تکنیک‌ها نشان می‌دهند. بنابراین، ۲۴/۸ درصد نمونه‌ها حداقل برای یکی از تکنیک‌ها Real time PCR، معمولی PCR یا Histopathology مثبت بودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از بیش از یک روش تشخیصی برای افزایش احتمال تشخیص انگل در جنین‌های سقط شده ضروری است.

بحث

در طی چند سال اخیر در ایران مطالعات مختلفی بر روی میزان آلودگی به انگل نئوسپورا کانینوم صورت گرفته است Moayer و همکاران در سال ۲۰۱۱، تعداد ۲۰۰ نمونه جنین سقط شده از گاوداری‌های صنعتی اطراف تهران جمع‌آوری کرده، سپس از بافت‌های جنین، لام تهیه شده و به روش پاتولوژی مورد بررسی قرار دادند. در پایان آن‌ها گزارش دادند که ۲۱ درصد (۴۲ جنین سقط شده) دارای آلودگی به انگل نئوسپورا کانینوم بودند مطالعه Moayer و همکاران در سال ۲۰۱۱ همانند مطالعه حاضر بود که از بافت‌های جنین به‌عنوان نمونه آزمایشگاهی استفاده شده اما روش بررسی کاملاً متفاوت است. در میان روش‌های تشخیصی، تست PCR حساسیت و ویژگی بیشتری نسبت به سایر تست‌های هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی دارد. مضاف بر اینکه نتایج این تست کمتر توسط تغییرات ناشی از اتولیز جنین در هنگام سقط مخدوش می‌گردد. بنابراین اختلاف میان دو تحقیق می‌تواند به واسطه دقت کمتر تشخیصی روش پاتولوژی به تنهایی باشد(۲۹).

همچنین نتیجه به دست آمده در این پژوهش می‌تواند مشابه نتایج به دست آمده توسط Gottstein و همکاران در سال ۱۹۹۸ باشد که از آغازگرهای منطقه DNA Nc۵ ژنومی استفاده کرد و *N.caninum* را در مغز ۲۹ درصد از ۸۳ جنین سقط شده گاو در سوئد با استفاده از PCR معمولی تشخیص داد. Paula و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از آغازگرهای منطقه Nc۵، PCR معمولی را بکار گرفتند و *N.caninum* را در ۳۱،۳ درصد از ۳۲ نمونه بافت مغزی منجمد از جنین‌های سقط شده در برزیل پیدا کردند(۲۰).

مطالعه Sager و همکاران در سال ۲۰۰۱ در ۴۷ مورد همبستگی ضعیفی بین PCR و Real time PCR نشان داد در ۴۷ مورد با Real time PCR مثبت نشان داد. پنج مورد از این موارد هیچ ضایعه‌ای مطابق با ضایعات ناشی از *N.caninum* نشان ندادند و هیچ یک از این موارد با PCR مثبت نبود (۴۰).

Baszler و همکاران در سال ۱۹۹۹ پروتکلی برای تشخیص *N.caninum* در جنین‌های سقط شده گاو با استفاده از هیستوپاتولوژی و شناسایی انگل توسط PCR و هیستوپاتولوژی، مانند کار حاضر، پیشنهاد کردند یکی دیگر از عواملی که ممکن است به اختلاف در میزان تشخیص تکنیک‌ها کمک کند، نمونه‌برداری از بافت است. هنگامی که قطعات بریده شدند، یکی برای بافت‌شناسی و دیگری برای تجزیه و تحلیل مولکولی، انگل ممکن است در یک قسمت وجود داشته باشد، اما در قسمت دیگر وجود نداشته است. با توجه به نتایج PCR، یک توضیح احتمالی برای عدم تشخیص DNA در برخی از اندام‌های جنینی که با هیستوپاتولوژی مثبت است ممکن است تخریب DNA توسط اتولیز باشد(۴).

از دیگر عوامل احتمالی می‌توان به میزان اختصاصیت و حساسیت پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR برای انواع نمونه‌های مورد استفاده اشاره کرد.

در مطالعه حاضر، ما از ژن Nc-۵ برای تشخیص و ردیابی *N.caninum* استفاده کردیم. این ژن در توالی *N.caninum* تکرار می‌شود (Alvarez-García,G و همکاران در سال ۲۰۱۳). از این رو، به عنوان یک ژن هدف برای تشخیص نئوسپوروز ارائه می‌شود مطالعه قبلی در این زمینه توسط

Yamage و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام شد. که حساسیت و ویژگی آغازگرهای مختلف را برای تشخیص *N.caninum* مقایسه کردند. در این مطالعه، پنج آغازگر الیگونوکلئوتیدی رو به جلو Np۲۱ و آغازگر معکوس Np۶، که از ژن‌های Nc-۵ مشتق شده بودند برای تشخیص نئوسپروز در نمونه‌های سقطی مورد استفاده قرار گرفتند. ژن Nc-۵ همچنین می‌تواند *N.caninum* را از سایر انگل‌های apicomplexan مرتبط (گونه‌های Toxoplasma gondii و Sarcocystis) تشخیص دهد. بنابراین، ژن Nc-5 به‌عنوان یک ژن بسیار حساس و اختصاصی برای تشخیص نئوسپروز استفاده شده است (Dubey و همکاران در سال ۲۰۰۷؛ Hughes و همکاران در سال ۲۰۰۶؛ Paula و همکاران در سال ۲۰۰۴؛ Yamage و همکاران در سال ۱۹۹۶). از این رو، ما در مطالعه حاضر ژن Nc-۵ را برای تشخیص حساس و خاص نئوسپروز انتخاب کردیم. تجزیه و تحلیل BLAST تأیید کرد که آغازگرهای منطقه Nc-۵ مختص این انگل هستند، بنابراین هیچ واکنش متقابل با سایر کوکسیدیاها در توالی آغازگرهای منطقه Nc۵ در ژنوم‌های *S. cruzi*، *S. tenella*، *S. moulei* یا *mieschelianа*، *Hammondia hammondi* یافت نمی‌شود(۱،۱۴،۲۲،۳۵،۴۴).

نتیجه‌گیری کلی

تشخیص سقط جنین ناشی از *N. caninum* مستلزم ردیابی انگل از طریق تکنیک‌های خاص مانند هیستوپاتولوژی یا روش‌هایی مانند PCR است که هم اختصاصی و هم حساس هستند، ترجیحاً با شناسایی ضایعات هیستوپاتولوژیک و انجام آزمون‌های مولکولی به همراه هم می‌توان به نتایج دقیق‌تری دست پیدا نمود، همچنین باید تلاش نمود از نمونه‌هایی استفاده شود که تا حد ممکن تازه هستند و استفاده از بافت‌هایی از جمله جفت و مهم‌تر از آن، مغز جنین، با آزمون‌های PCR و Real Time PCR و در کنار آن استفاده از هیستوپاتولوژی موفقیت تشخیص قطعی

جدول ۱- برنامه حرارتی.

هدف	دناتوراسیون اولیه	دناتوراسیون اصلی	اتصال و گسترش
		۴۰ سیکل	
درجه حرارت	۹۵ درجه	۹۴ درجه	۶۰ درجه
زمان	۱۰ دقیقه	۱۵ثانیه	۱ دقیقه

جدول ۲- آغازگرها و کاوشگر Real Time PCR بر اساس S. De Craeyea.

Primer	Sequence	Target gene
Np21	CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC	NC۵
Np6	CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT	NC۵
N. caninum Forward primer	GAGAATGAGAGCGATTTCCAG	ITS۱
N. caninum Reverse primer	CTCCTGAAGTCCCAGCGA	ITS۱
N. caninum probe	FAM-CCTTCTGAGTCGGGTTGTGTTTGG-BHQ1	ITS۱

جدول ۳- نتایج آزمایش Elisa.

The number of animals tested	No.of positive
۱۰۵	۳۶

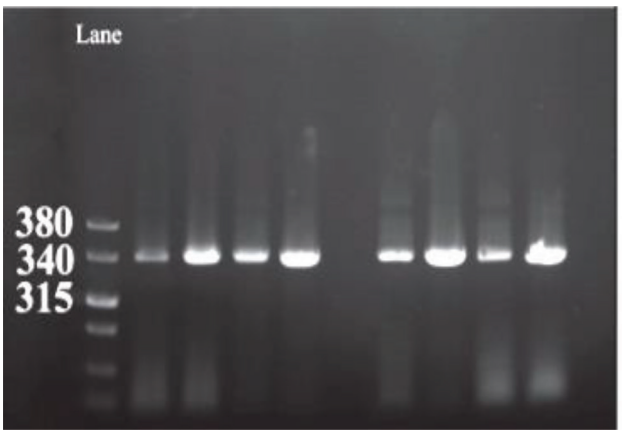
نئوسپروز را افزایش دهد.

منابع مورد استفاده

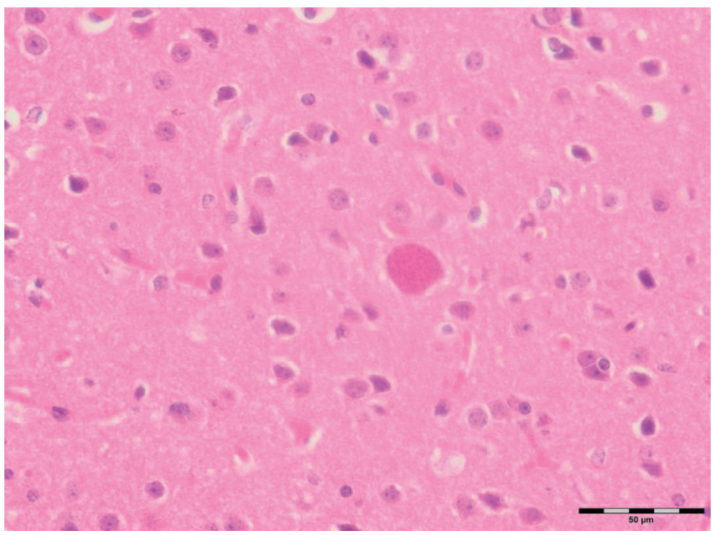
1- Alvarez-García, G., Culebras, A.G., Expósito, D.G., Navarro-Lozano,V., Pastor-Fernández, I., Ortega-Mora, L.M. (2013). Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests, *Vet Parasitol,* 198(1-2), 85-95. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.033 PMID: 23953144.

2- Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L., Conrad, P.A. (1991). Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle, *J Am Vet Med Assoc*,198(2):241-4. https://doi.org/.

3- Barratt, J., Al Qassab, S., Reichel, M.P., Ellis J.T. (2008). The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of Neospora caninum and Hammondia heydorni in feral mouse tissues, https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.03.001 PMID: 18420378.



شکل ۱- نتیجه الکتروفورز ژل آگارز نمونه‌های PCR در تشخیص *Neospora.caninum*.



شکل ۲- کیست نئوسپورا کنینوم در مغز جنین‌های سقط شده.

4-Baszler, T.V., Gay, L.J., Long, M.T Mathison, B.A. (1999). Detection by PCR of Neospora caninum in fetal tissues from spontaneous bovine abortions, *J Clin Microbiol* (12):4059-64. https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.4059-4064.1999 PMID: 10565932.

5- Bjerkås, I., Mohn, S. F., Presthus, J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs, Z Parasitenkd.,70(2):271-4. https://doi.org/10.1007/bf00942230 PMID: 6426185.

6-BOENISCH, T. (2005). Effect of heat-induced antigen retrieval following inconsistent formalin fixation, Appl Immunohistochem *Mol Morphol*(3):283-6 https://doi.org/10.1097/01.0000146524.74402.a4 PMID: 16082257.

7-Collantes-Fernández , E., Zaballos, A., Alvarez-García, G., Luis M Ortega-Mora, L. M. Quantitative detection of Neospora caninum in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. (2002). *J Clin Microbiol*.,40(4):1194-8. https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1194-1198.2002 PMID: 11923330.

8- Corbellini , L. G., Driemeier, D., Cruz, C. F. E., Gondim, L. F. P., Wald, V. (2002). Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil, *Vet Parasitol*.,103(3):195-202. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00600-8 PMID: 11750112.

9-De Craeye , S., Speybroeck, N., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Collinet, F., Tavernier, P., Van Gucht, S., Dorny, P., Dierick, K. (2011). Toxoplasma gondii and Neospora caninum in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae, *Vet Parasitol*.,178(1-2):64-9 https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.016PMID: 21236577.

10-Dubey , J. P. (2003). Review of Neospora caninum and neosporosis in animals, *Korean J Parasitol*.,41(1):1-16. https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1 PMID: 12666725.

11-DUBE, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J., Uggla, A. (1988(. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*.,192(9):1269-85. PMID: 3391851.

12- Dubey, J. P., Lindsay, D. S.)1996(. A review of Neospora caninum and neosporosis, *Vet Parasitol*.,67(1-2):1-59 .https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01035-7 PMID: 9011014.

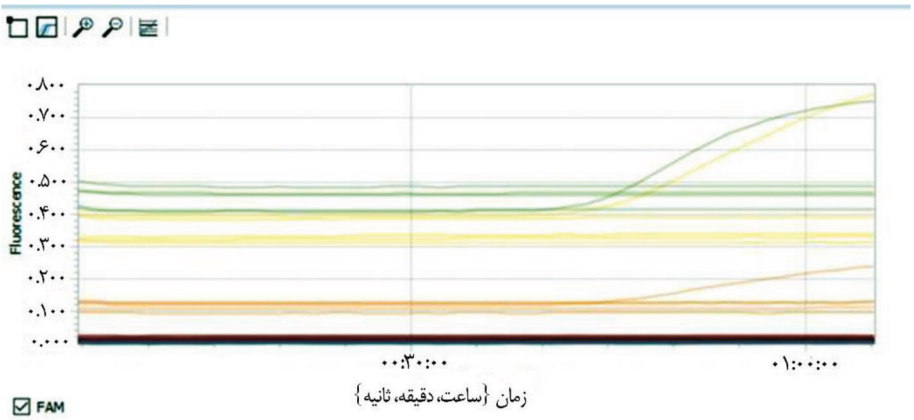
13- Dubey, J. P., Lindsay, D.S., Speer, C. A. (1998). Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*.,11(2):267-99.
https://doi.org/ 10.1128/CMR.11.2.267 PMID: 9564564

14- Dubey , J. P., Schares, G., Ortega-Mora L. M. (2007(. Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum, *Clin Microbiol Rev*.,20(2):323-67. https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06 PMID: 17428888.

15- Eperon , S., Brönnimann, K., Hemphill, A., Gottstein, B. (1999). Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to Neospora caninum infection. *Parasite Immunol* (5):225-36. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00223.x PMID: 10320620.

16- Gharekhani ,J., Yakhchali,M.(2010). Neospora caninum infection in dairy farms with history of abortion in West of Iran. *Vet Anim Sci*; 8:100071. https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100071 PMID: 32734088.

17- Gondim, L. F., Sartor, I. F., Monteiro, J.r., Haritani, M.(1999). Neospora caninum infection in an aborted bovine foetus in Brazil. *N Z Vet J*.,47(1):35. https://doi.org/10.1080/00480169.1999.36106



نمودار ۱- نتیجه Real Time PCR در تشخیص *Neospora.caninum*.

PMID: 16032066.
18- Gondim , L. F.P., Laski, P., Gao, L., McAllister, M. M.(2004). Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of Neospora caninum. *J Parasitol*;90(1):119-22. https://doi.org/10.1645/ge-134r PMID: 15040677.
19- Gondim , L. F.P., McAllister, M. M., Pitt, W. C., Zemlicka, D. E.(2004). Coyotes (Canis latrans) are definitive hosts of Neospora caninum. *Int J Parasitol*;34(2):159-61. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001 PMID: 15037103.
20- Gottstein , B., Hentrich, B., Wyss, R., Thür, B., Busato, A., Stärk, K. D., Müller, N.(1998). Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int J Parasitol*, 28(4):679-91. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00006-x PMID: 9602392.
21- Holmdahl , O. J., Mattsson, J.G.(1996). Rapid and sensitive identification of Neospora caninum by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*,112 (Pt 2):177-82. https://doi.org/10.1017/s0031182000084742 PMID: 8851857.
22- Hughes , J. M., Williams, R. H., Morley, E. K., Cook, D .A .N., Terry, R .S., Murphy, R .G., Smith, J. E., Hide, G.(2006). The prevalence of Neospora caninum and co-infection with Toxoplasma gondii by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitology*. 132(Pt 1):29-36. https://doi.org/10.1017/s0031182005008784 PMID: 16393351.
23-KEY, M.., BOENISCH, T. Antigen Retrieval. In: KEY, M. (ed.). Immunohistochemical staining methods. 4 ed. Carpinteria: Dako Corporation, 2006. p. 41-45.
24-Kirkbride, C. A. Laboratory diagnosis of livestock abortion. 3 ed. Iowa State: University Press, 1990. 260 p.
25- Lindsay , D. S., Dubey J. P. (1989). Immunohistochemical diagnosis of Neospora caninum in tissue sections. *Am J Vet Res*;50(11):1981-3. PMID: 2694869.
26- McAllister , M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., W R Jolley, W. R., Wills, R. A., McGuire A. M. (1998). Dogs are definitive hosts of Neospora caninum, *Int J Parasitol*;28(9):1473-8. PMID: 9770635.
27- Medina , L., Cruz-Vázquez, C ., Quezada, T., Morales, E., García-Vázquez, Z. (2006). Survey of Neospora caninum infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico, *Vet Parasitol*;136(3-4):187-91. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.003 PMID: 16332413.
28- McNamee , P. T., Trees, A. J., Guy, F., Moffett, D., Kilpatrick. D. (1996). The diagnosis and prevalence of neosporosis in Northern Ireland cattle, *Vet Rec*;138(17):419-20 https://doi.org/10.1136/vr.138.17.419 PMID: 8733183.
29-Moayer, F., Ataie, O., Mosa Khani, F., Bahonar, A. (2011). Pathologic findings of aborted fetuses in dairy farms around Tehran, *JVCR* V:2, N:3(7):155-166.
30- Monteiro , R. M., Richtzenhain, L. J., Pena, H. F. J., Souza, S. L. P., Funada, M. R., Gennari, S. M., Dubey, J. P., Sreekumar, C., Keid, L. B., Soares, R. M.)2007(. Molecular phylogenetic analysis in Hammondia-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences, *Parasitology*;134(Pt 9):1195-203 https://doi.org/10.1017/s0031182007002612 PMID: 17462122.
31- Moore , D. P., Regidor-Cerrillo, J., Morrell, E., Poso, M. A., Cano, D. B., Leunda, M. R., Linschinky, L., Odeón, A. C., Odriozola, E., Ortega-Mora, L. M., Campero, C. M.)2008(. The role of Neospora caninum and Toxoplasma gondii in spontaneous bovine abortion in Argentina, *Vet Parasitol*;156(3-4):163-7 https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.020 PMID: 18691819.
32- Müller , N., Zimmermann, V., Hentrich, B., Gottstein B.)1996(. Diagnosis of Neospora caninum and Toxoplasma gondii Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay, *J Clin Microbiol*;34(11):2850-2 https://doi.org/10.1128/jcm.34.11.2850-2852.1996 PMID: 8897199.
33- Müller , N., Vonlaufen, N., Gianinazzi, C., Leib, S. L., Hemphill A.)2002(. Application of Real-Time Fluorescent PCR for Quantitative Assessment of Neospora caninum Infections in Organotypic Slice Cultures of Rat Central Nervous System Tissue, *J Clin Microbiol*;40(1):252-5 https://doi.org/10.1128/jcm.40.1.252-255.2002 PMID: 11773124.
34- Otter , A., M Jeffrey, M., Griffiths, I. B., Dubey J. P. (1995). A survey of the incidence of Neospora caninum infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales, *Vet Rec*;136(24):602-6. https://doi.org/10.1136/vr.136.24.602 PMID: 7571263.
35- Paula , V. S. O., Rodrigues, A. A. R., Richtzenhain, L. J., Cortez, A., Soares, R. M. Gennari, S. M. (2004). Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of Neospora caninum in brain tissues of bovine aborted fetuses, *Vet Res Commun*;28(7):581-5 https://doi.org/10.1023/b:verc.0000042877.07684.89 PMID: 15563105.
36- Payne , S., Ellis, J. (1996). Detection of Neospora caninum DNA by the polymerase chain reaction. .) *Int. J. Parasitol*, Int J Parasitol;26(4):347-51 https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)00030-6 PMID: 8773521.
37- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozalo, A., Pérez-Pérez, V., Espi-Felgueroso, A., Alvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora L. M.)2003). Evaluation by different diagnostic

techniques of bovine abortion associated with Neospora caninum in Spain. *Vet Parasitol*;111(2-3):143-52. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00361-8 PMID: 12531290.

38- Pescador , C. A., Corbellini, L. G., Oliveira, E. C., Raymundo, D. L., Driemeier, D. (2007). Histopathological and immunohistochemical aspects of Neospora caninum diagnosis in bovine aborted fetuses, *Vet Parasitol*;150(1-2):159-63 https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.028 PMID: 17904290.

39- Ramos-Vara , J., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, Laura Brodersen, B., Chelack, B., Czub, S., Del Piero, F., Dial, S., Ehrhart, E. J., Graham, T., Manning, L., Paulsen, D., Valli, V. E., West, K. (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories, *J Vet Diagn Invest* ,20(4):393-413. https://doi.org/10.1177/104063870802000401 PMID: 18599844.

40- Sager , H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, A., Boerlin, P., Audigé, L., Gottstein B. (2001). A Swiss case-control study to assess Neospora caninum-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology, *Vet Parasitol*;102(1-2):1-15 https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00524-6 PMID: 11705647.

41- Schares , G., Peters, M., Wurm, R., Bärwald, A., Conraths F. J. (1998). The efficiency of vertical transmission of Neospora caninum in dairy cattle analysed by serological techniques, *Vet Parasitol*;80(2):87-98 https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00195-2 PMID: 9870361.

42-Söndgen , P., Peters, M., Bärwald, A., Wurm, R., Holling, F., Conraths, F. J., Schares G. (2001). Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology, *Vet Parasitol*;102(4):279-90 https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00543-x PMID: 11731071.

43-Wouda , W., Moen, A. R., Visser, I. J., van Knapen F. (1997). Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver, *J Vet Diagn Invest*;9(2):180-5 https://doi.org/10.1177/104063879700900212 PMID: 9211238.

44- Yamage , M., Flechtner, O., Gottstein B. (1996). Neospora caninum: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR), PMID: 8604096.