مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۳، ۳۸۲-۳۷۷
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.203195.2450

مقایسه آلودگی بافت‌های مختلف جنین‌های سقط شده گاو به انگل نئوسپور\ کانینوم با روش PCR

آرمان حسینی[۱] احسان مرآت[۱*] سیمین سامانی[۲] سعید سلطان نژاد[۳] رضا داننده[۳]
۱) گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۳) دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، تبریز، ایران

(دریافت مقاله: ۲۹ بهمن ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۳ خرداد ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: نئوسپور\ کانینوم یک انگل تک یاخته داخل سلولی و یکی از اصلی‌ترین عوامل سقط‌های مکرر در گاوهای شیری در کشورهای مختلف از جمله ایران به شمار می‌رود که منجر به تأثیرات اقتصادی زیادی از جمله کاهش تولید مثل، کاهش میزان شیر، افزایش فاصله بین زایمان‌ها می‌گردد. **هدف:** امروزه تست‌های متعددی برای تشخیص عامل ایجاد کننده سقط جنین وجود دارد. آزمایش PCR روشی با حساسیت و ویژگی مناسب برای DNA نئوسپور\ کانینوم به شمار می‌رود و می‌تواند DNA این انگل را به خوبی در نمونه‌های بافتی و مایعات بدن جنین سقط شده، مشخص کند. هدف این مطالعه بررسی میزان آلودگی انگلی در بافت‌های جنین‌های سقط شده به روش PCR است تا بتواند در نهایت بهترین بافت برای تشخیص این انگل را در جنین‌های سقط شده مشخص کند. **روش کار:** در این مطالعه تعداد ۸۲ جنین سقط شده در ۶ ماهه ابتدایی سال ۲۰۱۵ مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های مورد آزمایش شامل بافت‌های مغز، کبد، ریه، طحال، کلیه و مایع شیردان جنین سقط شده بود. آزمایش PCR با استفاده از پرایمر NP21plus برای شناسایی انگل نئوسپور\ کانینوم انجام گرفت. پس از انجام آزمون PCR نمونه‌های دارای باند ۳۴۰ جفت باز در ژل الکتروفورزیس مثبت قلمداد گردیدند. داده‌های آماری حاصل از بررسی حضور نئوسپورا کنینوم در بافت‌های مورد نظر در نرم افزار آماری SAS (version ۹/۲) مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** آلودگی با این انگل در بافت مغز ۳۴ جنین سقط شده (۴۱/۵ ٪) مشخص گردید. به ترتیب در ۲ (۲/۴ ٪) و ۴ (۴/۹ ٪) جنین سقط شده مجزا، DNA انگل به غیر از بافت مغزی از بافت‌های ریه و کبد نیز جداسازی گردید. **نتیجه گیری نهایی:** در مجموع با توجه به میزان اختلاف معنی‌دار آلودگی در مغز نسبت به سایر بافت‌ها، مقاله ما این بافت را مناسب‌ترین نمونه برای آزمایشات PCR جهت تشخیص آلودگی با عامل نئوسپور\ کانینوم در جنین‌های سقط شده می‌داند.

واژه‌های کلیدی: نئوسپور\ کانینوم، جنین سقط شده گاو، PCR

مقدمه

نئوسپور\ کانینوم یک انگل تک یاخته داخل سلولی است که در گروه آغازیان، شاخه‌هاگداران، راسته Eucoccidiorida و خانواده Sarcocystidae تقسیم بندی می‌شود. این انگل یکی از اصلی‌ترین عوامل سقط‌های مکرر در گاوهای شیری در کشورهای مختلف از جمله ایران به شمار می‌رود و منجر به تأثیرات اقتصادی، از جمله کاهش تولید مثل، کاهش میزان شیر، افزایش فاصله بین زایمان‌ها و در نهایت کاهش سودآوری فارم می‌گردد. گاو ممکن است از طریق خوردن اووسیست‌های‌هاگدار نئوسپور\ کانینوم به صورت افقی به این انگل آلوده شود، اما اصلی‌ترین راه انتقال آلودگی در گاوها انتقال عمودی است. این شکل از انتقال آلودگی می‌تواند در آبستنی‌های بعدی هم در گاو صورت گیرد، بنابراین آلودگی می‌تواند از این طریق به نسل‌های بعدی منتقل و در گله تثبیت شود. آلودگی به این انگل مزمن بوده و می‌تواند تا پایان عمر، دام را تهدید نماید (۴).

گاوهای بالغ غیر آبستن آلوده به انگل نئوسپور\ کانینوم، هیچ علایمی از بیماری را نشان نمی دهند، اگرچه ممکن است این روال در گاوهای آبستن نیز ادامه داشته باشد اما عموما دام‌های آبستن با عوارض چون سقط جنین، مرده زایی و یا تولد گوساله‌های ضعیف مواجه می‌شوند (۳،۱۱). آنچه از تحقیقات استنباط می گردد، میزان سقط جنین در دام‌های آلوده به بیماری نئوسپوروزیس سه تا هفت برابر بیشتر از دام‌های غیر آلوده است و بیشترین رخداد پدیده سقط جنین، بین ماه‌های پنجم تا هفتم آبستنی رخ می‌دهد (۵). همچنین بررسی نتایج مطالعات اخیر و مقایسه آن با نتایج مطالعات دو دهه گذشته، نشان از افزایش میزان شیوع سقط جنین با محوریت آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم دارد. نتایج تحقیقات انجام گرفته در کشورهای مختلف حاکی از آن است که میزان آلودگی در نواحی مختلف جهان بسیار متغیر می‌باشد. علت این موضوع کاملاً شناخته شده نیست اما تعداد سگ‌هایی که با گاوداری در ارتباط هستند می‌تواند رابطه مستقیمی با شیوع آلودگی داشته باشد. فارغ از میزان تراکم سگ‌های منطقه، مواردی چون شرایط آب و هوایی محل پرورش دام‌ها، روش نمونه برداری و نوع آزمایش تشخیصی از عواملی هستند که می‌توانند در میزان فراوانی آلودگی گاوها به نئوسپور\ کانینوم مؤثر باشند (۳).

تشخیص سریع عارضه نئوسپوروزیس، اصلی‌ترین روش برای کنترل و درمان آن می‌باشد. امروزه تست‌های متعددی برای تشخیص عامل ایجاد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۸-۳۳۳۲۳۱۰۹، نمابر: ۰۲۸-۳۳۳۲۳۱۰۹
Email: ehsanmerat@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

کننده سقط جنین وجود دارد که از این میان آن‌ها می‌توان به آزمایشاتی چون IFAT، ایمونوبلات (IB، Elisa، NAT) واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) و سایر روش‌ها اشاره کرد. آزمایش PCR روشی با حساسیت و ویژگی مناسب برای DNA نئوسپور\ کانینوم به شمار می‌رود و می‌تواند DNA این انگل را به خوبی در نمونه‌های بافتی و مایعات بدن جنین سقط شده، مشخص کند (۲). هدف این مطالعه بررسی میزان آلودگی انگلی در بافت‌های جنین‌های سقط شده به روش PCR است تا بتواند در نهایت بهترین بافت برای تشخیص این انگل را در جنین‌های سقط شده مشخص کند.

مواد و روش کار

محدوده مورد مطالعه: مطالعه حاضر در ۶ ماهه ابتدایی سال ۲۰۱۵ در مجتمع دامپروری کشت و صنعت مغان صورت گرفته است. در این مدت ۲۰۱ جنین سقط شده گزارش گردید که ۸۲ مورد از آن‌ها به صورت تصادفی برای نمونه برداری انتخاب شدند.

نمونه برداری: از بافت‌های کبد، ریه، کلیه، طحال، مایع شیردان و تمام بافت مغز نمونه برداری انجام گردید. نمونه‌ها تا زمان انتقال به آزمایشگاه در فریزر با دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. به منظور حفظ دمای نمونه‌ها در طول انتقال به آزمایشگاه از یخ خشک استفاده گردید.

استخراج ماده ژنتیک: در ابتدا نمونه‌های بافتی جنین ارسالی به آزمایشگاه برای باز شدن یخ در محیط اتاق قرار داده شد. بعد از باز شدن یخ نمونه‌ها، ۰/۰۵ g از هر بافت به وسیله تیغه اسکارپل استریل برداشته شده و درون میکروتیوب‌های ۱/۵ ml RNase – DNase Free ریخته شد. در ادامه از کیت مخصوص استخراج DNA (شرکت MBST) استفاده شد که شامل بافر لیز کننده، بافر پیوندی، بافر شستشو، پروئیناز کا و آب مقطر دو بار استریل است.

DNA انگل نئوسپور\ کانینوم مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. مطابق این روش ۵۰ mg از سوسپانسیون بافتی را در میکروتیوب‌های PCR grade قرار داده می‌شود. سپس ۱۸۰ µl از بافر لیز کننده و ۲۰ µl پروتئیناز K را به سوسپانسیون بافتی اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ °C قرار داده می‌شود. سپس ۳۶۰ µl بافر پیوندی به آن افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ °C انکوبه می‌کنیم. به محلول فوق ۲۷۰ µl اتانول افزوده و محلول حاصله را روی میکروتیوب فیلتردار می‌ریزیم و با دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم. سپس فیلتر را دوبار با محلول شستشو می‌دهیم و در آخر DNA استخراج شده را با بافر شستشو از فیلتر جدا می‌کنیم.

تست PCR: برای انجام این آزمایش از پرایمرهای NP۲۱plus (۵′CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC۳′) و Np۶plus (۵′CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT۳′) استفاده گردید.

جدول ۱. نتیجه آزمایش PCR بافت‌های ۳۴ جنین سقط شده با آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم. سطح معنی‌داری ما بین نمونه‌های مغز و کبد و همچنین میان مغز و ریه‌ها کمتر از ۰/۰۵ به دست آمد که این اختلاف معنی دار می‌باشد. از طرف دیگر تفاوت معنی‌داری میان نمونه‌های کبد و ریه مشاهده نگردید (P-value<۰/۰۵).

بافت‌های جنین		مغز	کبد	ریه	طحال	کلیه	مایع شیردان
انگل نئوسپور اکانینوم	مثبت	۳۴	۶	۴	۰	۰	۰
	منفی	۰	۲۸	۳۰	۳۴	۳۴	۳۴

برای انجام تست PCR، از کیت Taq DNA Polymerase Master Mix (شرکت Amplicon، شماره کاتالوگ ۱۸۰۳۰۱) استفاده گردید.

الکتروفورز و قرائت نتایج: به منظور الکتروفورز و مشاهده باندها، پس از ریختن نمونه‌ها در داخل ژل آگارز ۱/۵٪، ژل در معرض جریان برق ۱۱۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه قرار گرفت. در انتها با استفاده از نور فرابنفش محصولات بدست آمده نمایان گردید. مطابق تصویر ۱، باندهای دارای ۳۴۰ جفت باز را برای تک یاخته نئوسپور\ کانینوم به عنوان پاسخ مثبت قلمداد می‌کنیم.

تحلیل آماری: داده‌های آماری حاصل از بررسی حضور نئوسپورا کنینوم در بافت‌های مورد نظر در نرم افزار آماری SAS (ورژن ۹/۲) ابتدا تحت آزمون Kolmogrov-Smirnov جهت تشخیص نرمال بودن تعداد داده‌ها قرار گرفت که نتیجه آزمون مذکور کمتر از ۰/۰۵ گزارش شد، لذا جهت تشخیص سطح معنی‌داری، تست Kruskal-Wallis ما بین گروه‌های نمونه برداری شده از مغز، کبد و ریه انجام گردید.

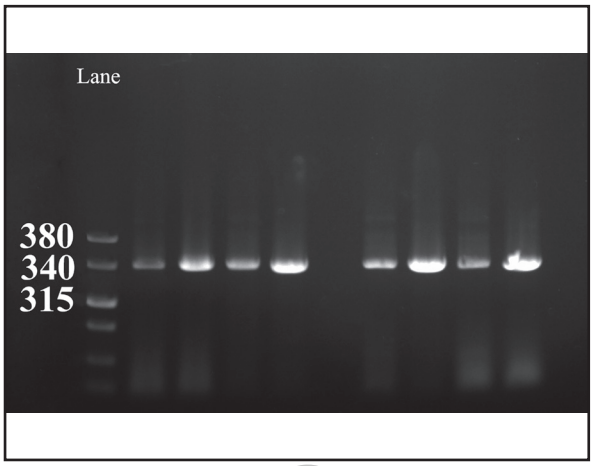
نتایج

در مطالعه حاضر از ۸۲ جنین سقط شده مورد بررسی، تعداد ۳۴ جنین (۴۱/۵ ٪) به انگل نئوسپور\ کانینوم آلوده بودند. در تمام ۳۴ جنین (۴۱/۵ ٪) آلوده به انگل نئوسپور\ کانینوم، DNA این انگل از بافت مغز جداسازی شد. به ترتیب در ۲ (۲/۴ ٪) و ۴ (۴/۹ ٪) جنین سقط شده مجزا، DNA انگل به غیر از بافت مغزی از بافت‌های ریه و کبد نیز جداسازی گردید. در ۲ جنین (۲/۴ ٪) سقط شده مورد بررسی، ماده ژنتیک انگل به صورت همزمان از بافت‌های مغز، کبد و ریه جداسازی شد.

بحث

هدف این مطالعه بررسی مقایسه‌ای میزان آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم در نمونه‌های بافتی جنین‌های سقط شده گاو می‌باشد. مطابق نتیجه از ۸۲ جنین مورد بررسی، تعداد ۳۴ جنین (۴۱/۵ ٪) به انگل نئوسپور\ کانینوم آلوده بودند. در تمام ۳۴ جنین (۴۱/۵ ٪) آلوده به انگل نئوسپور\ کانینوم، DNA این انگل از بافت مغز جداسازی شد. به ترتیب در ۲ (۲/۴ ٪) و ۴ (۴/۹ ٪) جنین سقط شده مجزا، DNA انگل به غیر از بافت مغزی از بافت‌های ریه و کبد نیز جداسازی گردید. در ۲ جنین (۲/۴ ٪) سقط شده مورد بررسی، ماده ژنتیک انگل به صورت همزمان از بافت‌های مغز، کبد

Archive of SID
www.SID.ir



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

و ریه جداسازی شد.

در طی چند سال اخیر در ایران نیز مطالعات مختلفی بر روی میزان آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم صورت گرفته است. Moayer و همکاران در سال ۲۰۱۱، تعداد ۲۰۰ نمونه جنین سقط شده از گاوداری‌های صنعتی اطراف تهران جمع آوری کرده، سپس از بافت‌های جنین لام تهیه شده و به روش پاتولوژی مورد بررسی قرار دادند. در پایان آن‌ها گزارش دادند که ۲۱٪ (۴۲ جنین سقط شده) دارای آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم بودند (۸). در مطالعه Moayer و همکاران در سال ۲۰۱۱ همانند مطالعه حاضر از بافت‌های جنین به عنوان 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 (۵). بنابراین اختلاف میان دو تحقیق می‌تواند به واسطه دقت کمتر تشخیصی روش پاتولوژی باشد. از طرف دیگر، نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه Moayer و همکاران در سال ۲۰۱۱ از چندین گاوداری تهیه گردیده که در چنین شرایطی، عواملی چون سیستم مدیریت، نوع تغذیه، وضعیت آب و هوایی، تراکم سگ‌های ولگرد در منطقه و ... می‌توانند به عنوان عامل مخدوشگر بر روی نتایج تأثیر بگذارند اما در مطالعه حاضر جنین‌های سقط شده صرفاً متعلق به واحد دامپروری کشت و صنعت مغان می‌باشد.

Sabevarinejad و همکاران در سال ۲۰۱۳ با هدف بررسی میزان شیوع پادتن ضد انگل نئوسپور\ کانینوم، از ۱۸۱ رأس گاو شیری هولشتاین در منطقه لرستان خون گیری کرده و سپس با استفاده از کیت‌های تجاری الایزا آن‌ها را مورد آزمایش قرار دادند. آن‌ها در پایان ۲۷/۲۶ ٪ (۵۰ رأس) گاوها را نسبت به این انگل، سرم مثبت اعلام کردند (۱۲). در مطالعه‌ای دیگر، Adhami و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی ۳۳۶ نمونه سرمی از انواع گاوهای شیری منطقه سنندج با استفاده از کیت‌های الایزا تجاری، میزان آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم را در این منطقه ۱۷/۶ ٪ (۶۴ رأس) گزارش کرده‌اند (۱). مهم‌ترین تفاوت بین تحقیق حاضر و مقالات ذکر شده، اختلاف در نمونه گیری و روش آزمایش است. در آزمایشات ذکر شده از گاوهای مادر نمونه سرم تهیه و مورد آزمایش قرار گرفته است. اگرچه مطالعات اخیر میزان سقط جنین در دام‌های آلوده به انگل نئوسپور\ کانینوم سه تا هفت برابر بیشتر از دام‌های غیر آلوده می‌داند، اما تاکنون هیچ ارتباط قطعی بین آلودگی مادر و سقط جنین به واسطه انگل نئوسپور\ کانینوم به اثبات نرسیده است (۳،۵،۱۱). همچنین، با اینکه تست الایزا دارای حساسیت و ویژگی مطلوبی است اما بحث برانگیزترین بخش این روش، تعیین نقطه برش بین نتایج مثبت و منفی است. از آنجا که نتایج تست الایزا به صورت عددی گزارش می‌شود، تعیین نادرست نقطه برش می‌تواند باعث افزایش شدید تعداد پاسخ‌های مثبت یا منفی کاذب شود. علاوه بر این شانس موفقیت در ردیابی عامل مورد بررسی، وابستگی شدیدی به تیتر دارد، بنابراین امروزه از تست‌های الایزا بیشتر با هدف ارزیابی‌های غربال گری استفاده می‌شود (۲). از طرف دیگر، نمونه‌های مورد بررسی در مطالعات ذکر شده از چندین گاوداری تهیه گردیده که در چنین شرایطی، عواملی چون سیستم مدیریت، نوع تغذیه، وضعیت آب و هوایی، تراکم سگ‌های ولگرد در منطقه و ... می‌توانند به عنوان عامل مخدوشگر بر روی نتایج تأثیر بگذارند اما در مطالعه حاضر جنین‌های سقط شده صرفاً متعلق به واحد دامپروری کشت و صنعت مغان می‌باشد.

در سراسر جهان نیز مطالعات متعددی در زمینه بررسی مقایسه‌ای میزان آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم در نمونه‌های بافتی صورت گرفته است. در مطالعه انجام شده توسط HO و همکاران در سال ۱۹۹۷، بافت‌های ۹ گاو آلوده به انگل نئوسپور\ کانینوم مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از بافت‌های مغز، طناب نخاعی، قلب، ریه، کلیه، دیافراگم، عضلات اسکلتی، جفت و مایع شیردانی برای انجام تست PCR نمونه برداری شد. در پایان DNA انگل در مغز، طناب نخاع، قلب و ریه با موفقیت جداسازی شد اما در بافت‌های کلیه، جفت، دیافراگم، عضلات اسکلتی و مایع شیردانی هیچ گونه آلودگی به این انگل یافت نگردید. مطابق گزارش ارائه شده به ترتیب ۶ گاو (۶۶٪)، ۲ گاو (۲۲/۲٪) و ۱ گاو (۱۱/۱٪) دارای آلودگی در دستگاه عصبی مرکزی، قلب و ریه بودند (۶). در مطالعه انجام شده توسط HO و همکاران در سال ۱۹۹۷ همانند مطالعه حاضر، سیستم عصبی مرکزی بیشترین میزان آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم را نشان می‌دهد و این بافت را مناسب‌ترین نمونه برای آزمایشات PCR جهت تشخیص آلودگی با عامل نئوسپور\ کانینوم می‌داند. البته باید توجه داشت که این مطالعه بر روی گاوهای بالغ صورت گرفته است که از نظر بروز پاسخ ایمنی نسبت به رویان، عملکرد کاملاً متفاوتی دارند. احتمال دارد تفاوت درصد آلودگی بین مطالعه HO و همکاران در سال ۱۹۹۷ و مطالعه حاضر، به دلیل همین تفاوت در پاسخ سیستم ایمنی نسبت به انگل نئوسپور\ کانینوم باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

در مطالعه دیگری که توسط Kritzner و همکاران در سال ۲۰۰۲ صورت گرفت، ۱۵ گاو به صورت تجربی به انگل نئوسپور\ کانینوم آلوده شدند. بعد از نمونه برداری از بافت‌های مختلف و انجام تست PCR، مشخص گردید که ۸ گاو (۵۳/۳ ٪) از دام‌های آلوده شده، DNA انگل را در بافت مغز، ۴ گاو (۲۶/۶٪) در بافت قلب و ۲ گاو (۱۳/۳٪) در عضلات اسکلتی نشان دادند اما در هیچ یک از دام‌های مورد بررسی اثراتی از آلودگی در بافت‌های کبد، طحال، ریه، پانکراس و دستگاه گوارش وجود نداشت (۷). در این مطالعه همانند مطالعه حاضر، سیستم عصبی مرکزی بیشترین میزان آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم را نشان می‌دهد و این بافت را مناسب‌ترین نمونه برای آزمایشات PCR جهت تشخیص آلودگی با عامل نئوسپور\ کانینوم می‌داند. البته باید توجه داشت که این مطالعه بر روی گاوهای بالغ آلوده شده به صورت تجربی انجام گرفته است که از نظر بروز پاسخ ایمنی نسبت به رویان، عملکرد کاملاً متفاوتی دارند. احتمال دارد تفاوت در آلودگی بافت‌های ریه و کبد بین مطالعه صورت گرفته توسط Kritzner و همکاران در سال ۲۰۰۲ و مطالعه حاضر، به دلیل همین تفاوت در پاسخ سیستم ایمنی نسبت به انگل نئوسپور\ کانینوم باشد.

Nishimura و همکاران در سال ۲۰۱۲، برای انجام تست qPCR نمونه‌های بافتی مخ، مخچه، طناب نخاعی، کبد، طحال، کلیه، قلب، ریه، پانکراس، تیموس، زبان، عضلات اسکلتی، چشم و غدد لنفاوی از ۸ گوساله ۲ تا ۴ ماهه هولشتاین تهیه کردند. بعد از انجام آزمایش آن‌ها توانستند DNA انگل را فقط از بافت‌های مغزی و طناب نخاعی (دستگاه عصبی مرکزی) ۳ گوساله (۳۷/۵ ٪) جداسازی کنند (۹). در این مطالعه همانند مطالعه حاضر، سیستم عصبی مرکزی بیشترین میزان آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم را نشان می‌دهد و این بافت را مناسب‌ترین نمونه برای آزمایشات PCR جهت تشخیص آلودگی با عامل نئوسپور\ کانینوم می‌داند.

Pereira و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطالعه‌ای با هدف ردیابی حضور انگل در اندام‌های جنین‌های سقط شده به واسطه آلودگی تجربی با انگل نئوسپور\ کانینوم انجام دادند. در این مطالعه بافت‌های دستگاه عصبی مرکزی، قلب، کلیه، ریه، عضلات اسکلتی و کارنکول در ۱۳ جنین سقط شده بعد از آلودگی مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از انجام تست PCR، ۳ جنین (۲۳٪) آلودگی به انگل را در بافت سیستم عصبی مرکزی و ۱ جنین (۷/۷ ٪) آلودگی را در کارنکول نشان دادند و در بقیه جنین‌های سقط شده و اندام‌ها هیچ گونه نشانی از آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم یافت نشد (۱۰). در این مطالعه همانند مطالعه حاضر، سیستم عصبی مرکزی بیشترین میزان آلودگی به انگل نئوسپور\ کانینوم را نشان می‌دهد و این بافت را مناسب‌ترین نمونه برای آزمایشات PCR جهت تشخیص آلودگی با عامل نئوسپور\ کانینوم می‌داند.

در نهایت، مطالعه حاضر از احتمال بالای آلودگی بافت مغزی در جنین‌های سقط شده حکایت دارد و این بافت را مناسب‌ترین نمونه برای آزمایشات PCR جهت تشخیص آلودگی با عامل نئوسپور\ کانینوم در جنین‌های سقط شده می‌داند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری‌های ارزشمند مدیریت کشت و صنعت مغان، جناب حاج آقا محمدی و همچنین مدیریت محترم مجتمع دامپروری این واحد، جناب آقای مهندس بصیری و مدیر تیم دامپزشکی این واحد، جناب آقای دکتر نوری کمال سپاس و قدردانی را دارد.

References

1. Adhami, Gh., Hoghooghi-Rad, N., Dalimi Asl, AH. (2014) The Seroepidemiological Investigation into *Neospora caninum* in Cattle in Sanandaj, Kordestan Province. IJVR. 10: 83-92
2. Almería, S., López-Gatius, F. (2015) Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. Res Vet Sci. 100: 169-175.
3. Dubey, P., Schares, G., Ortega-Mora, M. (2007) Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 20: 323-367.
4. Garcia-Vazquez, Z., Rosario-Cruz, R., Mejia-Estrada, F., Rodriguez-Vivas, I., Romero-Salas, D., Fernandez-Ruvalcaba, M., Cruz-Vazquez, C. (2009) Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle in three southern states of Mexico. Trop Anim Health Prod. 41: 749-753.
5. Hajikolaei, H., Rahim, M., Hamidinejat, H., Ghorbanpoor, M., Goraninejad, S. (2008) Serological study of *Neospora caninum* infection in cattle from Ahvaz area, Iran. Iran J Vet Med. 2: 63-66.
6. Ho, M. S., Barr, B. C., Rowe, J. D., Anderson, M. L., Sverlow, K. W., Packham, A., Conrad, P. A. (1997) Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. J Parasitol. 83: 508-514.
7. Kritzner, S., Sager, H., Blum, J., Krebber, R., Greif, G., Gottstein, B. (2002) An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. Ann Clin Microbiol

Archive of SID
www.SID.ir

Antimicrob. 1(1): 4.
8. Moayer F., Ataie O., Mosa Khani F., Bahonar A. (2011) Pathologic findings of aborted fetuses in dairy farms around Tehran. J Vet Med Res. 2(3): 155-166.
9. Nishimura, M., Kohara, J., Hiasa, J., Muroi, Y., Yokoyama, N., Kida, K., Nishikawa, Y. (2013) Tissue distribution of *Neospora caninum* in experimentally infected cattle. Clin Vaccine Immunol. 20(2): 309-312.
10. Pereira, R., Vogel, F., Bohrer, C., da Nóbrega Jr, E., Ilha, F., da Rosa, P., Gonçalves, D. (2014) *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally infected pregnant heifers. Vet Parasitol. 199: 129-135.
11. Razmi, R., Maleki, M., Farzaneh, N., Garoussi, T., Fallah, H. (2007) First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. Parasitol Res. 100(4): 755-757.
12. Sabevarinejad, Gh., Dalim, A., Ghafarifar, F., Forouzandeh-Moghadam, M. (2013) Serological survey of *Neospora caninum* infection in Holstein dairy cattle from Khoramabad region. Iran J Vet. 101: 48-54.

Archive of SID

Comparison of *Neospora caninum* Infected Tissues in Aborted Fetal Bovine by PCR

Hoseini, A.[1], Merat, E.[1*], Samani, S.[2], Soltan Nezhad, S.[3], Danandeh, R.[3]

[1]*Department of Obstetrics and Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

[2]*Department of Pathology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran*

[3]*Graduated From the Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran*

(Received 18 February 2018, Accepted 13 June 2018)

Abstract:

BACKGROUND: *Neospora caninum* is a protozoan intracellular parasite which is considered as one of the main factors for recurrent abortions of dairy cattle in various countries such as Iran. This parasite leads to negative economic impacts such as decline in reproduction, reduced amount of milk, and long calving intervals. **OBJECTIVES:** There have been numerous tests to determine the cause of abortion. PCR test is considered as a suitable method to specify *Neospora caninum* DNA and it can determine the DNA in tissue samples and body fluids of the aborted fetus. This study aims to use PCR to evaluate parasites in the tissues of aborted fetuses so as to detect the best tissue for determining the parasite. **METHODS:** In this study, 82 aborted fetuses in the first six months of 2015 were studied. The tissues were selected from brain, liver, lungs, spleen, kidneys and rennet fluids. The NP21plus primer was used to detect the presence of *Neospora caninum* in samples. After conducting the PCR Test, samples with 340bp band in Gel electrophoresis were considered as positive. Statistical data from the survey of *Neospora caninum*'s presence in selected tissues were evaluated by SAS (version 9.2) software. **RESULTS:** Contamination with this parasite was found in 34 brain samples (41.5%) of aborted fetuses. In 2 (2.4%) and 4 (4.9%) of the aborted fetuses, parasite DNA was found in lung and liver tissues along with brain tissues, respectively. **CONCLUSIONS:** Due to significant difference of infection of brain tissues in comparison to other tissues, our study considers brain tissue as the most appropriate sample for detecting *Neospora caninum* infection in aborted fetuses in PCR method.

Keyword: *Neospora caninum*, Bovine fetus aborted, PCR

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The results of PCR assay of 34 fetuses aborted with *Neospora caninum* infection.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of *Neospora caninum* specific PCR.

***Corresponding author's email: ehsanmerat@yahoo.com, Tel: 028-33323109, Fax: 028-33323109**

www.SID.ir