

ردیابی انگل نئوسپورا کاینوم در جنین‌های سقط شده در گاوداری‌های شهرستان اراک به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

محمد خانی^۱ فاطمه عرب خزائلی^۲ سید داوود حسینی^۱ پرویز شایان^۲

^۱ موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، اراک، ایران
^۲ گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
(دریافت مقاله: ۹ خرداد ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۰ شهریور ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: نئوسپورا کاینوم تک یاخته انگلی بیماریزاست که به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد کننده سقط جنین عفونی گاو در سراسر جهان مطرح می‌باشد.
هدف: هدف از این مطالعه بررسی و ردیابی حضور انگل نئوسپورا کاینوم در مغز، مخچه و بصل النخاع جنین‌های سقط شده در گاوداری‌های شهرستان اراک به روش ملکولی می‌باشد.
روش کار: تعداد ۳۸ نمونه مغز، مخچه و بصل النخاع جنین‌های سقط شده با روش ملکولی از نظر وجود انگل نئوسپورا مورد آزمایش قرار گرفت.
نتایج: بررسی آماری یافته‌های مطالعه نشان دهنده این است که در ۲۶/۳٪ از مغز جنین‌های سقط شده DNA نئوسپورا کاینوم وجود دارد و در مخچه و بصل النخاع جنین‌های سقط شده حضور DNA نئوسپورا کاینوم مشاهده نگردید. ارتباط آماری معنی‌داری بین آلودگی به انگل نئوسپورا کاینوم با سن مادر (تعداد زایش)، سابقه سقط و حضور سگ در گله وجود دارد.
نتیجه‌گیری نهایی: نتایج تحقیق حاضر ارتباط معنی‌داری را بین آلودگی به نئوسپوروزیس و تعداد سقط‌های انجام شده در گاوهای مورد بررسی نشان داد؛ به همین دلیل به نظر می‌رسد این تک‌یاخته را می‌توان از عوامل مهم همه‌گیری‌های سقط جنین در گله‌های مزرعه‌شیری شهرستان اراک به شمار آورد که لزوم نظارت مستمر در تشخیص و پیشگیری در صنعت گاوداری را گوشزد می‌نماید.
واژه‌های کلیدی: نئوسپورا کاینوم، گاو، گوساله، سقط، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۷۰۴۹، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲، Email: farab@ut.ac.ir

How to Cite This Article

Khani, M., Arabkhazaeli, F., Hosseini, S., Shayan, P. (2018). Molecular Detection of *Neospora caninum* in Aborted Fetuses of Cattle Farms in Arak, Iran. J Vet Res, 73(4), 457-463. doi: 10.22059/jvr.2018.218656.2535



مقدمه

نمونه برداری انجام شد. ۱۰۰-۵۰ از این نمونه‌ها در ۲۰ ml PBS استریل حاوی ۲٪ آنتی بیوتیک (پنی سیلین) هموژنیزه شده و برای انجام آزمایشات ملکولی در ۲۰°C فریز شدند. جهت استخراج DNA، از کیت استخراج DNA (DNPTM) سیناژن، ایران استفاده شد و آزمون PCR در این بررسی بر روی ژن ۵PNC و به روش nested-PCR انجام گرفت. این ژن تنها در نئوسپورا وجود دارد و در توکسوپلازما و سایر کوسیتیس وجود ندارد. (۲) به همین دلیل از نظر نتایج، جواب مثبت کاذب وجود نخواهد داشت. واکنش ابتدایی PCR با استفاده از دو زوج پرایمر خارجی NP۶-NP۲۱ و در ادامه مرحله دوم با استفاده از پرایمرهای داخلی NP۷-NP۱۰ انجام گرفت (جدول ۱). در صورت آلوده بودن نمونه‌ها، در مرحله اول PCR باندی با وزن ۳۴۴ جفت باز و در مرحله دوم باندی با وزن ۱۹۸ جفت باز مشاهده می‌گردد.

نتایج

در بررسی حاضر، ۳۸ نمونه جنین سقط شده از ۱۴ گاوداری‌های مزرعه شیروی شهرستان اراک از نظر حضور DNA انگل نئوسپورا کاینوم در قسمت‌های مختلف مغز شامل قشر مغز، مخچه و بصل النخاع تحت آزمایش قرار گرفتند که اطلاعات مربوط به نشانه‌های کالبدگشایی مشاهده شده در جنین‌های سقط شده، مادران و نحوه مدیریت گاوداری‌های مربوط در جدول ۲ خلاصه شده است.

از ۳۸ نمونه مغز جنین سقط شده که به روش Nested-PCR و هر کدام نیز با دوبار تکرار مورد بررسی قرار گرفتند، حضور DNA نئوسپورا کاینوم در ۱۰ نمونه (۲۶/۳٪) مشاهده گردید. در مرحله اول PCR باندی با وزن ۳۴۴ جفت باز و در مرحله دوم با پرایمرهای داخلی باندی با وزن ۱۹۸ جفت باز در نمونه‌های مثبت مشاهده گردید. در این مطالعه حضور انگل تنها در نمونه‌های برداشت شده از قشر مغز مشاهده و اثبات گردید و نمونه‌های برداشت شده از مخچه و بصل النخاع نیز مورد بررسی ملکولی قرار گرفتند که حضور DNA در هیچکدام از نمونه‌ها مشاهده نگردید (تصویر ۱).

از ۱۰ نمونه مغز جنین آلوده، ۵ مادر دارای سابقه سقط قبلی و ۵ مادر دیگر فاقد سابقه سقط بوده‌اند. بررسی آماری نتایج یافته‌های این مطالعه با آزمون مربع chi با استفاده از نرم افزار SPSS۲۰ (IBM) ارتباط معنی داری میان آلودگی بافت مغز جنین‌ها به DNA انگل و سابقه سقط در مادر نشان نداد (۱/۰۰۱ = P, ۶/۳ = χ^2 , ۱, N = ۳۸).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی انگل نئوسپورا کاینوم.

نام پرایمر	توالی (۵'-۳')
Np ۶	CTCGCCAGTCAACCTACGTTCT
Np۲۱	GGGTGTGCGTCCAATCCTGTAAC
Np۷	GGGTGAACCGAGGGAGTTG
Np۱۰	TGTCGCCGTTGCTCCCTATGAAT

نئوسپورا کاینوم به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده سقط جنین در گاو مطرح بوده و دارای گسترش جهانی می‌باشد. اهمیت این انگل به دلیل خسارت مستقیم ناشی از سقط جنین و خسارت غیر مستقیم (شامل تشخیص بیماری هزینه تلقیح مجدد دام مبتلا به سقط و کاهش تولید شیر و ...) می‌باشد. نئوسپورا کاینوم یک انگل دو میزبان است و سگ و کایوت یا سگ گرگ به عنوان میزبان نهایی این تک یاخته هستند. گاو و طیف وسیعی از حیوانات خونگرم از جمله سگ، گوسفند بز، اسب، آهو به عنوان میزبان واسط انگل شناخته شده‌اند (۱۰). انتقال عمودی انگل مهم‌ترین و اصلی‌ترین راه ایجاد آلودگی در حیوانات می‌باشد، اما انتقال افقی انگل از طریق اسیست‌ها هم نقش مهمی در انتشار آلودگی دارد (۴). نشانه اصلی بیماری ناشی از نئوسپورا کاینوم در گاوها سقط جنین می‌باشد اما در گوساله‌هایی که به طور مادرزادی به این انگل آلوده می‌شوند، نشانه‌های عصبی - عضلانی هم مشاهده می‌شود. این انگل در سگ‌ها موجب سقط جنین و در توله سگ‌ها باعث ایجاد علائم عصبی - عضلانی می‌شود (۳). سقط و توقف رشد جنین در اثر نئوسپوروزیس از عوارض مهم این انگل است که خسارات اقتصادی فراوانی را در اثر افزایش فاصله گوساله‌زایی و کاهش تولید شیر، به گاوداری‌ها تحمیل می‌نماید. در ایران آلودگی به نئوسپورا کاینوم برای اولین بار از گاوهای نژاد هلشتاین و براون سوییس در گاوهای شهر مشهد توسط Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۶، گزارش گردید (۱۹). از آن پس گزارشات دیگری مبنی بر وجود آلودگی در گاوهای سایر نقاط کشور نیز منتشر شده است. اکثر مطالعاتی که تاکنون در رابطه با فراوانی نئوسپورا کاینوم در ایران صورت گرفته است به روش سرولوژیک انجام شده‌اند. با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری و این که تاکنون هیچ تحقیق جامعی در مورد این بیماری زیان بار در گاوداری‌های شهرستان اراک با موقعیت جغرافیایی مناطق مرکزی کشور صورت نگرفته است، به نظر می‌رسد که بررسی حضور این تک یاخته می‌تواند اطلاعات اولیه جهت طراحی و اعمال اقدامات کنترلی و پیشگیرانه آتی را فراهم آورد. لذا در این تحقیق حضور تک یاخته نئوسپورا کاینوم به صورت مقطعی در جنین‌های سقط شده در گاوداری‌های شهرستان اراک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی به مدت ۶ ماه از زمستان ۱۳۹۳ تا بهار ۱۳۹۴ بر روی گاوهای نژاد هلشتاین، گاوداری‌های نواحی مختلف شهرستان اراک صورت پذیرفت. نمونه‌های جنین‌های سقط شده در کنار یخ همراه با پرسشنامه (سن، نژاد، سابقه سقط مادر، زمان سقط، تعداد زایمان، عبور مرور سگ‌های ولگرد و ...) به آزمایشگاه موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک منتقل گردیدند. سپس به صورت استریل از مخچه و بصل النخاع ۵۰ و از قشر مغز ۱۰۰ به صورت عمقی و سطحی



جدول ۲. مشخصات گاوداری‌ها و جنین‌های سقط شده و نتیجه آزمون مولکولی (nested-PCR) بر روی مغز جنین‌ها در شهرستان اراک.

شماره نمونه اخذ شده	سابقه سقط	مشاهده سگ‌های ولگرد در مزرعه	نشانه‌های ماکروسکوپی جنین	سن گاو (سال)	تعداد زایمان‌ها	سن جنین‌های سقط شده (ماه)	جنس جنین	نتیجه PCR
۱	دارد	+	اسیت	۸	۶	۶	ماده	+
۲	دارد	+	-	۳	۲	۸	ماده	-
۳	ندارد	+	-	۲	۱	۵	نر	-
۴	دارد	+	اختلالات رشدی	۴	۲	۵	ماده	-
۵	ندارد	-	-	۵	۳	۹	نر	-
۶	دارد	-	له شدگی	۳	۱	۶	نر	-
۷	دارد	+	-	۶	۴	۸	ماده	-
۸	ندارد	+	-	۶	۵	۷	نر	+
۹	دارد	+	اتولیز	۶	۵	۵	ماده	+
۱۰	ندارد	+	خونریزی شدید	۷	۶	۶	ماده	+
۱۱	دارد	+	-	۶	۵	۷	ماده	+
۱۲	دارد	+	آسیت	۵	۴	۶	نر	+
۱۳	ندارد	+	-	۶	۵	۴	ماده	+
۱۴	دارد	+	-	۷	۵	۷	ماده	+
۱۵	ندارد	-	التهاب جفت	۴	۲	۵	نر	-
۱۶	دارد	+	-	۳	۱	۹	ماده	-
۱۷	ندارد	+	عفونت شدید	۶	۵	۷	نر	+
۱۸	ندارد	-	-	۵	۴	۶	نر	-
۱۹	ندارد	+	-	۴	۲	۴	ماده	-
۲۰	ندارد	-	-	۲	۱	۳	نر	-
۲۱	ندارد	+	-	۵	۳	۹	نر	-
۲۲	ندارد	-	-	۳	۲	۵	نر	-
۲۳	ندارد	+	خون در حفره شکم	۵	۳	۶	نر	-
۲۴	ندارد	+	آسیت	۶	۳	۵	نر	-
۲۵	ندارد	+	-	۴	۲	۹	ماده	-
۲۶	ندارد	-	-	۳	۱	۵	ماده	-
۲۷	دارد	+	-	۵	۳	۴	ماده	-
۲۸	ندارد	+	التهاب جفت	۴	۲	۹	نر	-
۲۹	ندارد	-	-	۶	۴	۷	ماده	-
۳۰	ندارد	+	-	۵	۳	۶	ماده	-
۳۱	ندارد	-	-	۳	۱	۳	نر	-
۳۲	دارد	-	عفونت شدید	۴	۲	۹	نر	-
۳۳	ندارد	-	هیپاتومگالی	۳	۲	۶	نر	-
۳۴	ندارد	+	-	۴	۲	۷	نر	-
۳۵	ندارد	+	-	۳	۱	۵	ماده	-
۳۶	ندارد	+	آسیت	۵	۳	۸	ماده	-
۳۷	ندارد	+	اتولیز	۶	۴	۴	ماده	+
۳۸	دارد	+	-	۶	۴	۶	نر	-

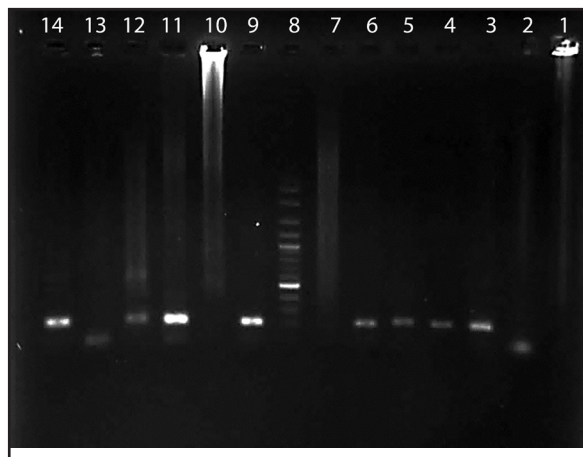
مادرانی با سن ۶ سال، ۲ گوساله از گاوهایی با ۲ سال سن و از گاوهایی با ۵ و ۸ سال سن ۱ جنین آلوده تشخیص داده شد. از نظر آماری ارتباط بسیار معنی داری میان آلودگی جنین به انگل با سن مادر وجود داشته است و

که سگ در زمان نمونه برداری در اطراف آن‌ها مشاهده گردیده بود. از نظر آماری نیز حضور سگ با آلودگی به انگل در جنین‌های گاو دارای ارتباط معنی داری بوده است ($\chi^2(1, N=38) = 6.3, P = 0.01$). شش جنین آلوده از



و بصل النخاع، تنها در مغز نشان داد. مطالعات مولکولی، احتمال حضور نئوسپورا کاینوم را در مغز جنین‌های سقط شده گاو نسبت به سایر اندام‌های جنین بیشتر دانسته‌اند. مطالعات انجام شده در کشور عمدتاً به روش سرمی بوده است؛ Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۶ آلودگی به نئوسپورا کاینوم به روش الایزا را در مشهد ۴۶٪ (۱۹)، Hajikolaie و همکاران در سال ۲۰۰۸ آلودگی سرمی را در اهواز ۲۱٪ (۱۲)، Youssefi و همکاران در سال ۲۰۰۹، آلودگی سرمی را در گاوهای صنعتی و بومی به ترتیب ۲۵/۸٪ و ۴۳/۹٪ (۲۵) و Nematollahi و همکاران در سال ۲۰۱۱ آلودگی سرمی را در گاوهای شیری تبریز ۱۰/۵٪ (۱۷) گزارش نمودند. Sattari و همکاران در سال ۲۰۱۱، از ۸۰۰ نمونه خون متعلق به ۶ گاوداری صنعتی و نیمه صنعتی گاوهای شیری در استان گلستان، آلودگی به نئوسپورا کاینوم با روش الایزا را، ۱۳/۳۷٪ نمونه اعلام نمودند (۲۲). Gharekhani و Heidari در سال ۲۰۱۴ در بررسی بیش از ۲۰۰۰ نمونه سرمی از گاو، گوسفند، اسب، الاغ و سگ در همدان به روش‌های الایزا، آگلوتیناسیون و ایمنوفلورسنت غیر مستقیم به جز در گوسفند، تعداد حیوانات مثبت را بسیار بالا ارزیابی کردند (۹). Gharekhani و همکاران در سال ۲۰۱۴ شیوع سروولوژیک این انگل را در گاوهای شیری استان همدان ۱۲/۸٪ اعلام نمودند (۸). Heidari و همکاران در سال ۲۰۱۴، ۷/۸٪ گاوهای بومی کردستان را از نظر سرمی مثبت ارزیابی نمودند (۱۳). Habibi و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعات مولکولی، در مشهد حضور انگل را در ۴ نمونه بافت مغز جنین‌های سقط شده به روش PCR نشان دادند (۱۱). Salehi و همکاران در سال ۲۰۰۹ در گاوداری‌های اطراف تهران به روش مولکولی در ۱۲ مغز جنین سقط شده و در جفت گاوهای سرم مثبت انگل را شناسایی نمودند (۲۱). در مطالعه دیگری، Razmi و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مشهد در ۱۰/۸٪ مغز جنین‌های سقط شده از مادران سرم مثبت، DNA نئوسپورا را ردیابی کردند (۲۰). Kamali و همکاران در سال ۲۰۱۴ از استان‌های اصفهان، چهارمحال بختیاری، خراسان شمالی و جنوبی و رضوی، آذربایجان غربی، کرمانشاه، گلستان و مازندران تعداد ۳۹۵ مغز جنین سقط شده گاو را به روش PCR مورد بررسی قرار دادند که ۴۵٪ موارد مثبت تشخیص داده شدند (۱۵).

در این مطالعه بیشترین حضور DNA نئوسپورا کاینوم در جنین‌های سقط شده ۷-۵ ماهه بود و ارتباط معنی‌داری بین آلودگی به نئوسپورا کاینوم با تعداد زایمان و سن گاو مادر به اثبات رسید. Nematollahi و همکاران در سال ۲۰۱۱ آلوده‌ترین سن مادر را بین ۸-۵ سال و آلوده‌ترین سن جنین‌های سقط شده را ۶-۴ ماهگی اعلام نمودند (۱۷) که با نتیجه مطالعه حاضر که بیشترین حضور انگل نئوسپورا کاینوم در سه ماهه دوم و سوم بارداری بوده‌است، همخوانی دارد. در مطالعه سروایدمیولوژی نئوسپورا کاینوم در گاوهای دو رگ بومی ایران، Heidari و همکاران در سال ۲۰۱۴ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان فراوانی آلودگی را



تصویر ۱. nested-PCR نمونه‌های قشر مغز جنین‌های گاو سقط شده با پرایمرهای داخلی نئوسپورا کاینوم. نمونه‌های ۱، ۲، ۷، ۱۰ و ۱۳ فاقد آلودگی و در سایر نمونه‌ها باندی با وزن جفت باز قابل مشاهده می‌باشد. (شماره ۸: LADDER ۱۰۰ bp).

آلودگی در مادران مسن‌تر با احتمال بالاتری رخ داده است ($P=0/01$). $\chi^2(6, N=38)=2$ ، به همین ترتیب مغز ۶ جنین از مادرانی با ۵ زایمان، ۲ جنین از مادرانی با ۴ و ۶ زایمان آلوده به انگل تشخیص داده شدند که از نظر آماری همانند سن مادر، دارای ارتباط آماری بسیار معنی‌داری بوده است ($P=0/00$). $\chi^2(5, N=38)=31/12$ ، بررسی یافته‌های این مطالعه نشان دهنده این است که از نظر سنی، جنین‌های سقط‌شده آلوده در مطالعه حاضر، نیمی (۵ جنین) در سه ماهه دوم بارداری و نیم دیگر (۵ جنین) در سه ماهه سوم بارداری قرار داشته‌اند.

در مجموع در ۲۶/۳٪ از مغز جنین‌های سقط شده، حضور DNA نئوسپورا کاینوم در این تحقیق به اثبات رسید و در نمونه‌های برداشت شده از مخچه و بصل النخاع حضور DNA مشاهده نگردید همچنین در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین آلودگی نئوسپورا کاینوم با سن گاو و تعداد زایمان دیده می‌شود که گاوهایی که سن بیشتری دارند آلودگی نئوسپورا را در مقایسه با گاوهایی که سن پایینتری دارند بیشتر نشان داده‌اند و همچنین گاوهایی که تعداد زایمان بیشتری دارند بیشترین آلودگی نئوسپورا را شامل می‌شوند. در رابطه با سابقه سقط، گاوهای دارای سابقه سقط نیز آلودگی نئوسپورا ۵۰٪ نشان داده‌اند.

بحث

تک یاخته نئوسپورا کاینوم به عنوان یکی از عوامل مهم سقط جنین در سراسر دنیا شناخته شده است که باعث ایجاد خسارات اقتصادی زیادی می‌گردد. در مطالعه حاضر حضور DNA نئوسپورا کاینوم در ۱۰ مورد از ۳۸ نمونه (۲۶/۳٪) مغز جنین‌های سقط شده گاوهای شیری گاوداری‌های شهرستان اراک، به روش مولکولی تایید شد. این اولین گزارش از حضور انگل در گاوداری‌های شهرستان اراک می‌باشد. نتایج این مطالعه، حضور DNA نئوسپورا کاینوم را از نمونه‌های برداشت شده از مغز، مخچه



گزارش حضور DNA نئوسپورا کاینوم در گاوداری‌های شهرستان اراک می‌باشد. نتایج بدست آمده مطالعه حاضر، مطابق با بسیاری از گزارشات قبلی نشان داد که گاوهایی که سابقه سقط دارند با احتمال بیشتری حضور نئوسپورا کاینوم را در جنین‌های سقط شده نشان می‌دهند. به همین دلیل به نظر می‌رسد که این تک‌یاخته را می‌توان از عوامل مهم همه‌گیری‌های سقط جنین در گله‌های گاوهای مزرعه شیری شهرستان اراک به شمار آورد که لزوم اعمال برنامه‌های کشوری کنترل و پیشگیری را در صنعت دامداری خصوصاً گاوداری‌ها، با هدف کاهش خسارت اقتصادی ناشی از سقط را نمایان می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیه همکارانی که ما را در اجرا و گزارش این تحقیق یاری نمودند و نیز از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M. C., Hill, D. E., Kwok, O. C. H., Shen, S. K., Dubey, J. P. (2001). First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol*, 87(3), 612-618.
- Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J., Uggla, A. N. D. A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *JA-VMA*, 192(9), 1269-1285.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Adams, D. S., Gay, J. M., Baszler, T. V., Blagburn, B. L., Thulliez, P. (1996). Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am J Vet Res*, 57(3), 329-336.
- Dubey, J. P., Schares, G. (2006) Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol*, 140(1), 1-34.
- Dubey, J. P., Schares, G., Ortega-Mora, L. M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev*, 20(2), 323-367.
- Dubey, J.P., Hartley, W.J., Lindsay, D.S., Topper, M.J. (1990). Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *J Parasitol*, 76:127-130.

در گاوهای بیش از ۴ سال سن (۳۲/۳۳٪) و زیر ۲ سال سن (۷/۳۲٪) مشاهده نموده و اعلام کردند که ۶۴٪ از گاوهای دارای سابقه سقط، از نظر سرمی مثبت می‌باشند (۱۳). همچنین Sattari و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که گاوهای دارای سابقه سقط، آلودگی بیشتری به نئوسپورا کاینوم دارند (۲۲). Macedo و همکاران در سال ۲۰۱۳ در گاوهای شیری کشتار شده، با روش الایزا میزان آلودگی را در گاوهای آبستن ۴۱/۶٪، در گاوهای غیر آبستن ۴۳/۳٪ و در جنین‌ها ۵/۵٪ تشخیص دادند و در آنالیز PCR حضور DNA را در ۳/۳٪ گاوها و ۶/۶٪ جنین‌های سقط شده اعلام کردند (۱۶). این محققان بیشترین میزان آلودگی در جنین‌های سقط شده را ۶-۴ ماهگی دانستند که در مقایسه یافته‌های مطالعه حاضر، تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد.

در این بررسی حضور سگ در مزرعه ارتباط معنی‌داری با آلودگی به نئوسپورا کاینوم داشته‌است. نئوسپوروزیس در سگ برای اولین بار توسط یک محقق از نروژ گزارش گردید (۳). سگ به عنوان میزبان نهایی نئوسپورا کاینوم نقش مهمی در چرخه‌ی انگل ایفا می‌نماید. گزارشات پر شمار حاکی از گستردگی جهانی آلودگی سگ‌ها با این انگل می‌باشد و وجود آنتی‌بادی ضد نئوسپورا در سگ، از کشورهای زیادی گزارش شده‌است (۶). Sawada و همکاران در سال ۱۹۹۸ در ژاپن حضور پادتن ضد نئوسپورا را در ۳۱٪ از سگ‌های مزارع گاوهای شیری و ۷٪ از سگ‌های موجود در محدوده شهری گزارش کردند (۲۳). Wouda و همکاران در سال ۱۹۹۹ در هلند شیوع آلودگی در سگ‌های مزرعه را بیشتر از شیوع آلودگی در سگ‌های شهری گزارش نمودند (۲۴). Basso و همکاران در سال ۲۰۰۱ در آرژانتین شیوع آلودگی را در سگ‌های گله‌های شیری (۴۸٪) و در سگ‌های گله‌های گوشتی (۵۴/۲٪)، بیشتر از آلودگی در سگ‌های محدوده شهری (۲/۲۲٪) گزارش نمودند (۱). Razmi وجود نئوسپورا را در ۲ نمونه از ۱۴۷ نمونه مدفوع سگ گله و خانگی به روش PCR اثبات نمود (۱۸). Hosseini و Hosseinejad در سال ۲۰۱۱ شیوع انگل نئوسپورا کاینوم را در سگ‌های استان‌های غربی و مرکزی کشور به روش الایزای غیر مستقیم ۲۹٪ گزارش نمودند (۱۴).

نتیجه گیری نهایی: نئوسپوروزیس در گاو از کشورهای زیادی گزارش شده است و تقریباً دارای گسترش جهانی می‌باشد. در برخی کشورها سهم عمده‌ای از همه‌گیری‌های سقط جنین، مربوط به این انگل دانسته می‌شود. در کالیفرنیا ۲۰ تا ۳۰٪ و در هلند ۱۷٪ از تمام موارد متداول سقط جنین در گاو، ناشی از این انگل گزارش شده است (۷). با توجه به آمارهای متعددی که از ایران و سایر کشورها در دسترس می‌باشد، ۱۲ تا ۴۲٪ جنین‌های سقط شده در گاوها با این انگل آلوده می‌باشند. Dubey و همکاران در سال ۲۰۰۵ میزان خسارات اقتصادی سالیانه ناشی از نئوسپوروزیس را در کالیفرنیا حدود ۳۵ میلیون دلار تخمین می‌زنند و ظاهراً ارزش واقعی خسارات بالاتر از این حدود می‌باشد (۵). نتایج این مطالعه در واقع اولین



7. Dubey, J.P., Lindsay, D.S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*, 67, 1-59.
8. Gharekhani, J., Haddadzadeh, H., Bahonar, A. (2014). Prevalence of immunoglobulin G (IgG) antibody to *Neospora caninum* in dairy cattle of Hamedan province, west of Iran. *Vet Res Forum*, 5(2), 149-152.
9. Gharekhani, J., Heidari, H. (2014). Serology based comprehensive study of *Neospora* infection in domestic animals in Hamedan province, Iran. *J Adv Vet Anim Re*, 1(3), 119-124.
10. Gondim, L. F., McAllister, M. M., Pitt, W. C., Zemlicka, D. E. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 34(2), 159-161.
11. Habibi, G. R., Hashemi-Fesharki, R., Sadrebazaz, A., Bozorgi, S., Bordbar, N. (2005). Semi-nested PCR for diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Arch Razi Inst*, 55, 55-64.
12. Hajikolaie, M.H., Hamidinejat, H., Ghorbanpoor, M., Goraninejad, S. (2008). Serological study of *Neospora caninum* infection in cattle from Ahvaz area, Iran. *Int J Vet Res*, 2(1), 63-66.
13. Heidari, H., Mohammadzadeh, A., Gharekhani, J. (2014). Seroprevalence of *Neospora caninum* in slaughtered native cattle in Kurdistan province, Iran. *Vet Res Forum*, 5(1), 69-72.
14. Hosseini, M., Hosseini, F. (2011). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in dogs from west and central parts of Iran using two indirect ELISA tests and assessment of associate risk factors. *Iran J Vet Res*, 12(1), 46-51.
15. Kamali, A., Adin Seifi, H., Movassaghi, A. R., Razmi, Gh.R., Naseri, Z. (2014). Histopathological and molecular study of *Neospora caninum* infection in bovine aborted fetuse. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(12), 990-994.
16. Macedo, C. A. B. D., Macedo, M. F. S. B. D., Cardim, S. T., Paiva, M. C. D. C., Taroda, A., Barros, L. D., Garcia, J. L. (2013). *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered dairy cows (*Bos taurus*). *Rev Bras Parasitol Vet*, 22(1), 13-17.
17. Nematollahi, A., Jaafari, R., Moghaddam, Gh. (2011). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Tabriz, Northwest Iran. *Iran J Parasitol*, 6(4), 95-98.
18. Razmi, G. (2009). Survey of dogs' parasites in Khorasan Razavi province, Iran. *Iran J Parasitol*, 4(4), 48-54.
19. Razmi, G. R., Mohammadi, G. R., Garrosi, T., Farzaneh, N., Fallah, A. H., Maleki, M. (2006). Seroepidemiology of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Mashhad area. *Vet Parasitol*, 135(2), 187-189.
20. Razmi, Gh.R., Zarae, H., Nourbakhsh, M.F., Naseri, Z. (2013). Estimating the rate of transplacental transmission of *Neospora caninum* to aborted fetuses in seropositive dams in Mashhad area. *Iran J Parasitol*, 7(4):253-256 25.
21. Salehi, N., Hadadzadeh, H., Ashrafi Helan, J., Shayan, P., Sadrebazaz, A. (2009). Molecular and pathological study of bovine aborted fetuses and placenta from *Neospora caninum* infected dairy cattle. *Iran J Parasitol*, 4(3), 40-51.
22. Sattari, A., Moshiri, F., Musavi, S. Gh. (2011). The seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle herds in Golestan province, Iran. *J Vet Microbiol*, 1(22), 60-64.
23. Sawada, M., Park, C. H., Kondo, H., Morita, T., Shimada, A., Yamane, I., Umemura, T. (1998). Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *J Vet Med Sci*, 60(7), 853-854.
24. Wouda, W., Dijkstra, T. H., Kramer, A. M. H., Van Maanen, C., Brinkhof, J. M. A. (1999). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol*, 29(10), 1677-1682.
25. Youssefi, MR., Arabkhazaeli, F., Tabar Molla, H. (2009). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in rural and industrial cattle in northern Iran. *Iran J Parasitol*, 4(1), 15-18.



Molecular Detection of *Neospora caninum* in Aborted Fetuses of Cattle Farms in Arak

Mohammad Khani¹, Fatemeh Arabkhazaeli², Seyed Davood Hosseini¹, Parviz Shayan²

¹Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak, Iran

²Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received 30 June 2018, Accepted 11 September 2018)

Abstract:

BACKGROUND: *Neospora caninum* is one of the most important pathogenic protozoan parasites causing bovine abortion around the world.

OBJECTIVES: The aim of this study was to detect the presence of *Neospora caninum* in the brain, cerebellum and medulla oblongata of aborted fetuses in cattle in Arak by means of molecular method.

METHODS: 38 samples of brain, cerebellum and medulla oblongata from aborted fetuses in dairy cattle of Arak were tested for the presence of *Neospora* with nested-PCR.

RESULTS: Survey findings indicated the presence of DNA in 26.3 % of aborted fetal brains. In the cerebellum and medulla oblongata samples no *Neospora caninum* DNA was detected. There was a significant relationship between neosporosis and maternal age (number of calvings), abortion history and the presence of dogs in the herd.

CONCLUSIONS: The results showed a significant association between the infection and the number of abortions in the examined cows; As a result it seems that neosporosis could be an important factor in epidemic abortions in Arak city's dairy farms which requires continuous monitoring and implementation of prevention programs in the dairy industry.

Keyword:

Neospora caninum, Dairy cattle, Foetus, PCR, Abortion

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primer sequences used for the detection of *N. caninum*.

Table 2. Farms and aborted foetuses history and the results of nested-PCR on the brain sample of aborted foetuses in Arak.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of Nested-PCR products with internal *N. caninum* specific primers. (Lanes 1, 2, 7, 10 and 13 negative & other lanes infected; Lane 8 1000 bp ladder).

