مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۴، ۱۴۰۰، ۳۸۸-۳۸۱
مقاله پژوهشی

مطالعه میزان شیوع *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های اطراف تبریز به روش‌های آزمایش مدفوع و مولکولی

احمد نعمت‌الهی[۱]، **پریسا شهبازی**[۱]، **آرمین فاخری**[۲]

[۱] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران*
[۲] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران*

تاریخ دریافت: ۳۱ شهریور ماه ۱۴۰۰، **تاریخ پذیرش:** ۱ آذر ماه ۱۴۰۰

10.22059/jvr.2021.318712.3135 20.1001.1.20082525.1400.76.4.1.5

چکیده

زمینهٔ مطالعه: نئوسپوروزیس (Neosporosis) بیماری است که توسط تک‌یاخته *نئوسپورا کانینوم* (*Neospora caninum*) ایجاد می‌شود و با سقط جنین در گاو و فلج عصبی و عضلانی اندام‌های مختلف به‌خصوص اندام‌های خلفی سگ شناخته می‌شود. تشخیص نئوسپوروزیس اغلب به‌واسطه تست‌های سرولوژیک و آزمایشات مولکولی می‌باشد.

هدف: مطالعه حاضر برای ارزیابی حضور اووسیست‌های *نئوسپورا کانینوم* در مدفوع سگ‌های اطراف تبریز انجام گرفت.

روش‌کار: تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع از سگ‌های خانگی و خارج خانه در طول سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ در اطراف تبریز جمع‌آوری گردید. اطلاعات مربوط به سن، محل نگه‌داری و سابقه درمان ضد انگل سگ‌ها در پرسشنامه مخصوص ثبت گردید. ابتدا نمونه‌های مدفوعی برای ارزیابی اووسیست‌های *نئوسپورا* به شکل میکروسکوپی بررسی شدند. بعد از شکستن اووسیست‌های جمع‌آوری شده به روش فریز-دفریز و سونیکاسیون، DNA محتویات اووسیست‌ها استخراج شد و با روش PCR بررسی شدند.

نتایج: در مطالعه حاضر با میکروسکوپ نوری در ۴۵ مورد (۴۵ درصد) از نمونه‌های مدفوع بررسی شده اووسیست رؤیت گردید. در بررسی به روش PCR ۲۱ مورد از ۴۵ مورد قبلی از نظر آلودگی به *نئوسپورا* مثبت بودند (۲۱ درصد). تمام موارد مثبت آلودگی در بررسی مولکولی در سگ‌های بالای ۱ سال مشاهده شد. موارد مثبت در سگ‌های خانگی ۲ درصد، سگ‌های ولگرد ۸ درصد، سگ‌های پرورشگاه ۶ درصد و سگ‌های روستایی ۵ درصد ثبت گردید. همچنین ۱۹ درصد سگ‌های آلوده سابقه درمان ضدانگلی نداشتند و فقط ۲ درصد آنان سابقه درمان ضدانگل داشتند. نتایج بررسی آماری نشان داد که میزان آلودگی سگ‌های اطراف تبریز به *نئوسپورا کانینوم* ارتباط معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با محیط زندگی حیوان و سابقه درمان ضدانگل دارند اما این میزان با سن حیوان رابطه معنی‌داری ندارد.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به میزان بالای آلودگی با *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های منطقه تبریز لزوم اعمال روش‌های پیشگیری در گاوداری‌های سنتی و صنعتی اطراف تبریز و همچنین استفاده از روش‌های تشخیص سریع بیماری در آن‌ها توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: *نئوسپورا کانینوم*، سگ، PCR، آزمایش مدفوع، شیوع

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: احمد نعمت‌الهی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
پست الکترونیکی: anemat@tabrizu.ac.ir

مقدمه

نئوسپوروزیس بیماری نسبتاً جدیدی است که توسط تک‌یاخته‌ای به نام *نئوسپورا کانینوم* (*Neospora caninum*) ایجاد می‌شود که با سقط جنین در گاو و فلج عصبی و عضلانی اندام‌های مختلف به‌خصوص اندام‌های خلفی سگ شناخته می‌شود. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۸۴ در نروژ مورد شناسایی قرار گرفت. سگ تنها میزبان اصلی (و هم‌چنین میزبان واسط) تک‌یاخته می‌باشد و آلودگی در گاو، گوسفند، بز، اسب و گوزن نیز دیده می‌شود. اهمیت این بیماری در

ارتباط با ایجاد سقط جنین در نشخوارکنندگان (مخصوصاً گاو) و خسارات اقتصادی ایجاد شده در دامداری‌های صنعتی می‌باشد (۵).

در طبیعت، آلودگی در سگ، گاو، گوسفند، بز، اسب و گوزن دیده شده است و به‌طور تجربی نیز عفونت ناشی از *نئوسپورا کانینوم* را در موش رت، سگ، روباه، بز، گربه، گوسفند، کایوت (Coyotes)، خوک، ژربیل (Gerbils)، خرگوش و میمون ایجاد کرده است. سگ می‌تواند به عنوان میزبان واسط نیز در چرخه زندگی تک‌یاخته نقش داشته باشد. پرندگان گوشت‌خوار همانند باز شکاری، کرکس و جغد می‌توانند به عنوان مخزن و منشأ انتشار نئوسپوروزیس در مزرعه باشند. انتقال بیماری عمودی است. به‌عبارت دیگر انتقال در حیوان آبستن از طریق جفت به جنین صورت می‌گیرد و انتقال بیماری در آبستنی‌های بعدی نیز تکرار می‌گردد (۶).

گاوهای شیری بیشتر از گاوهای گوشتی به این انگل آلوده می‌شوند. خسارات اقتصادی بیماری شامل سقط جنین، مرده‌زایی و تولد گوساله‌های ضعیف (به صورت مستقیم) و هزینه‌های تشخیص، بازپروری دام و از دست دادن امکان تولید شیر (به‌طور غیرمستقیم) می‌باشد (۴).

مطالعات فراوانی در ایران در مورد سرواپیدمیولوژی این بیماری در گاوهای شیری و سگ انجام پذیرفته است (۱۱،۱۳،۱۶،۲۱). همچنین عفونت نئوسپورایی به عنوان عامل مطرح در سقط جنین در گاوداری‌های شیری از طریق روش‌های سرولوژیک و مولکولی بررسی شده است (۹،۱۸،۲۱،۲۳،۲۴). در ایران گمان برده می‌شود که میزان انتقال از طریق جفت در گاوهای شیری ۵۲ درصد می‌باشد (۲۲). اما نکته قابل توجهی که در این مطالعات مغفول مانده است، عدم توجه به نقش و دخالت سگ‌های اطراف محل پرورش گاوها به عنوان عامل اصلی گسترش اووسیست‌های نئوسپورایی می‌باشد. مطالعات کمی در مورد آلودگی سگ‌های ولگرد و سگ‌های موجود در اطراف گاوداری‌ها در ایران وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی میزان آلودگی مدفوع سگ‌های منطقه به اووسیست *نئوسپورا کانینوم* و نقش سگ‌های محیط‌های مختلف به‌عنوان میزبان نهایی این انگل در آلوده ساختن دام‌های منطقه می‌باشد.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر ۵ گرم نمونه مدفوع به‌صورت تصادفی از هر ۱۰۰ قلاده سگ شامل سگ‌های خانگی، سگ‌های ولگرد، سگ‌های پرورشگاه و سگ‌های اطراف گاوداری‌ها جمع‌آوری گردید و در کنار یخ و در سریع‌ترین زمان ممکن به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز منتقل گردید. مشخصات سگ‌ها از قبیل سن، جنس و محل زندگی آنان ثبت گردید.

تمام نمونه‌ها ابتدا توسط محلول فرمالین و اتر (به نسبت ۳ به ۷) مخلوط شد و از صافی رد گردید و در دور ۲۵۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از انجام سانتریفوژ قسمت رویی لوله‌ها دور ریخته شد و عمل فلوتاسیون با شکر بر روی رسوب لوله‌ها انجام گرفت و اووسیست‌ها در قسمت رویی محلول جمع گردید. سپس از نمونه‌ها گسترش مستقیم تهیه گردید و اووسیست‌ها زیر میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی ۴۰۰ مشاهده شدند.

جهت دسترسی به اسپوروزوئیت‌های موجود در اووسیست‌ها شکستن جداره اووسیست‌ها با سونیکاسیون و همچنین فریز - دفریز انجام گرفت. عمل سونیکاسیون با دستگاه مدل UP400S (Hielscher CO) بر روی نمونه‌ها انجام پذیرفت. بدین منظور نمونه‌ها در سیکل ۰/۵ و دامنه ۶۰ درصد به مدت ۲ دقیقه سونیک شدند و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس برای هر نمونه ۱۰ بار، فریز و دفریز کردن با استفاده از تانک ازت مایع (دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) به‌منظور شکستن اووسیست‌ها و خروج زوئیت‌ها انجام پذیرفت.

برای اطمینان از شکسته‌شدن اووسیست‌ها و خروج زوئیت‌ها گسترش مستقیم از هر نمونه انجام شد و رنگ‌آمیزی گیمسا به‌منظور مشاهده زوئیت‌ها انجام پذیرفت.

در مطالعه حاضر استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNPTM (شرکت سیناژن، ایران) انجام گرفت و آزمون PCR بر روی ژن NC5 انجام پذیرفت و از آنجا که این ژن فقط در *نئوسپورا* وجود دارد و موارد مثبت کاذب وجود ندارد، احتیاجی به کنترل مثبت نبود. با این وجود جهت اطمینان بیشتر، کنترل مثبت از آزمایشگاه موسسه رازی شعبه شیراز تهیه گردید. آزمایش PCR با استفاده از یک زوج پرایمر NP6 و NP21 انجام گرفت که توالی نوکلئوتیدهای آن‌ها در جدول ۱ و برنامه زمانی ترموسایکلر در جدول ۲ آورده شده است. در صورت آلوده بودن نمونه‌ها، باندی به جرم ۳۳۷ bp مشاهده می‌شود.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ردیابی *نئوسپورا کانینوم*.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
(NP6)	5'- CAGTCAACCTACGTCTTCT -3'
(NP21)	5'- GTGCGTCCAATCCTGAAC -3'

جدول ۲. برنامه زمانی ترموسایکلر برای PCR.

واکنش‌ها	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشتی اولیه DNA	۹۵	۵	-
واسرشتی ثانویه DNA	۹۴	۱	
اتصال آغازگر	۶۱	۱	۳۵
گسترش آغازگر	۷۲	۱	
گسترش نهایی	۷۲	۱۰	-
ذخیره	۱۰	۵	-

نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نرم‌افزار SPSS_Ver25 مورد ارزیابی قرار گرفت و اثر تجویز داروی ضدانگل، سن و محل زندگی سگ‌ها بر میزان آلودگی به *نئوسپورا* از طریق آزمون آماری Mann-Whitney-u و Kruskal-Wallis بررسی شد و مقادیر کمتر از ($P<۰/۰۵$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بعد از انجام فلوتاسیون بر روی تمام نمونه‌ها، گسترش مستقیم از آن‌ها تهیه شد که در مطالعه حاضر ۴۵ مورد (۴۵ درصد) از نظر وجود اووسیست مثبت بود. اووسیست‌های مشاهده شده ۱۴-۱۱ میکرومتر قطر داشت (تصویر ۱). این موارد می‌توانست اووسیست‌های مربوط به *نئوسپورا*، *توکسوپلاسما* یا *هاموندیا* باشد که از نظر ظاهری کاملاً شبیه به‌هم هستند و برای تفریق باید بررسی مولکولی (PCR) صورت می‌پذیرفت.

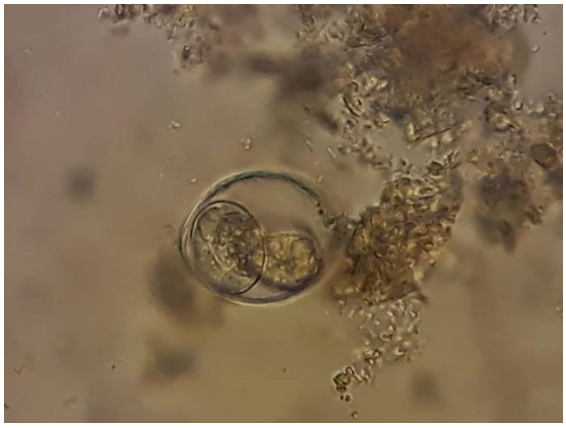
با توجه به این‌که بعد از سونیکاسیون و فریز-دفریز، انتظار می‌رفت تا اووسیست‌ها شکسته شده و اسپوروزوئیت‌ها آزاد شوند لذا بعد از سونیکاسیون در رنگ‌آمیزی گیمسا از گسترش‌های مرطوب نمونه‌های اسپوروزوئیت مشاهده شد (تصویر ۲).

نهایتاً تکثیر DNA استخراج شده با استفاده از یک زوج پرایمر اختصاصی ژن (NC5) انجام شد. برای ارزیابی نتیجه PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. بر اساس نتایج حاصل ۲۱ درصد نمونه‌ها (۲۱ نمونه از ۱۰۰ نمونه) دارای ژن (NC5) بودند که باند مربوط به اندازه bp۳۳۷ در تصویر قابل مشاهده می‌باشد (تصویر ۳).

از بین ۱۰۰ نمونه مدفوع اخذ شده از سگ‌ها ۳۴ نمونه دارای سن مشخص بودند که در این میان ۲۸ قلاده بالای ۱ سال و ۸ قلاده زیر ۱ سال بودند. مجموعاً ۲ مورد مثبت (۷ درصد) در بین سگ‌های بالای ۱ سال مشاهده شد و آلودگی در سگ‌های زیر ۱ سال مشاهده نشد. در بررسی‌های آماری ارتباط معنی‌داری بین سن سگ‌ها و آلودگی به انگل نشان مشاهده نشد.

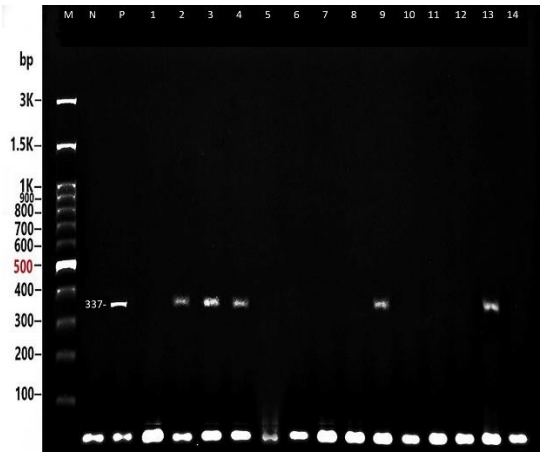
در ارزیابی انجام شده، نمونه‌گیری از چهار گروه سگ (سگ‌های آپارتمانی ۳۴ قلاده، سگ‌های ولگرد ۲۴ قلاده، سگ‌های پرورشگاه ۱۹ قلاده و سگ‌های حیاط/روستا ۲۳ قلاده) انجام شد که میزان آلودگی به‌ترتیب ۲، ۸، ۶ و ۵ درصد بود. مشخص شد که میزان آلودگی در سگ‌های ولگرد بیش از سگ‌های محیط‌های دیگر بود و بررسی آماری ارتباط معنی‌داری بین آلودگی و محیط زندگی سگ‌ها نشان داد.

از بین ۱۰۰ نمونه اخذ شده، ۳۴ نمونه مورد درمان ضدانگلی قرار گرفته بودند و ۶۶ مورد، درمان ضدانگلی نداشتند. میزان آلودگی در گروه اول ۲ درصد و در گروه دوم ۱۹ درصد بود. بررسی آماری ارتباط معنی‌داری بین آلودگی و درمان ضدانگلی سگ‌ها نشان داد.



تصویر ۱. اووسیست ایزوسپورایی در گسترش مرطوب مدفوع (×۱۰۰۰).

تصویر ۲. اسپوروزوئیت‌های آزاد شده از اووسیست‌ها بعد از شکسته شدن جدار آن‌ها و رنگ آمیزی با گیمسا (×۱۰۰۰).



تصویر ۳. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل از تکثیر ژن. ستونM- مارکر مولکولی ۳۰۰۰ -۱۰۰ زوج باز (شرکت MSOBIO). ستون N- کنترل منفی (آب مقطر). ستون P- کنترل مثبت (*نئوسپورا کانینوم*) با اندازه ۳۳۷ زوج باز. ستون‌های ۱ تا ۱۴- محصول PCR نمونه‌های استخراج شده.

بحث

بیماری نئوسپوروزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گاو (میزبان واسط) در مناطق مختلف جهان است که باعث سقط‌جنین در گاوها (شیری و گوشتی) می‌شود.

مطالعات زیادی در جهان و ایران در مورد *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌ها انجام شده است که بیشتر آنان متکی به روش‌های سرواپیدمیولوژیک بوده است. این مطالعات مشخص نموده است که مثبت بودن سرم در این بیماری نشانگر برخورد حیوان با انگل در گذشته یا حال بوده است و همبستگی با دفع اووسیست توسط حیوان ندارد. به‌طوری‌که حتی بعد از آلودگی تجربی سگ و دفع اووسیست توسط چنین سگ‌هایی نتیجه آزمایشات سرولوژیک آن‌ها مثبت نمی‌باشد. بنابراین جهت تشخیص آلودگی سگ احتیاج به آزمایش دفع اووسیست وجود دارد. اما شاید مشکلات نمونه‌گیری از مدفوع سگ و ریسک ناشی از برخورد با مدفوع سگ مخصوصاً سگ‌های بدون صاحب، تعداد مقالات منتشر شده در ایران و جهان را در این مورد محدود نموده است (۲،۱۴،۱۵).

مطالعات اولیه نشان داد که جدا نمودن اووسیست‌های *نئوسپورا کانینوم* از اووسیست تک‌یاخته‌های مشابه از طریق روش‌های مولکولی قابل انجام است. به‌طوری‌که Slapeta و همکاران در سال۲۰۰۲ در جمهوری چک ارزیابی در مورد پخش اووسیست *نئوسپورا کانینوم* و تشخیص آن با روش مولکولی PCR روی مدفوع یک قلاده سگ انجام دادند. در این مطالعه اووسیست‌های مربوط به *نئوسپورا کانینوم* توسط آزمایش مولکولی PCR از *هاموندیا* و *توکسوپلاسما* تفریق داده شدند (۲۵).

مطالعات انجام یافته در ایران برای تشخیص نئوسپوروزیس اکثراً متکی به آزمایشات سرولوژیک برای تشخیص آنتی‌بادی علیه بیماری در گاو می‌باشد. Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از کیت الایزای تجاری میزان آلودگی را در گاوهای منطقه مشهد ۴۶ درصد اعلام نمودند (۲۱). Sadrebazzaz و همکاران در سال ۲۰۰۴، در طی مطالعه‌ای در شهر مشهد از ۸۰۶ راس گاو شیری نمونه خونی گرفتند و به بررسی سرولوژیک (IFAT) برای *نئوسپورا* پرداختند. آن‌ها میزان آلودگی به *نئوسپورا* را در گاوهای شیری مشهد ۱۸/۱۵ درصد اعلام نمودند (۲۳). نتیجه مطالعه میزان آلودگی گاوهای منطقه اهواز در ارزیابی Hajikolaei و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از روش سرولوژیک ۲۱ درصد اعلام کردند (۱۱). Nourollahifard و همکاران در سال ۲۰۰۸ به مطالعه سنجش سرولوژیک *نئوسپورا کانینوم* در گاوهای شیری

در منطقه کرمان پرداختند. در این مطالعه تعداد ۲۸۵ نمونه خونی از گاوهای شیری اخذ گردید که برای آنتی‌بادی‌های ضد *نئوسپورا* تست شدند. در این مطالعه که از روش الایزا استفاده شد، تعداد ۳۶ نمونه (۱۲/۶ درصد) آلوده تشخیص داده شد. این ارزیابی اولین مطالعه در مورد *نئوسپورا* در منطقه کرمان محسوب می‌شود. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که سن و جنسیت حیوان هیچ نقشی در بروز آلودگی نداشت (۱۹). Ansari-Lari و همکاران در سال ۲۰۱۷ برای بررسی *نئوسپورا کانینوم* در گاو شیری، طی یک بررسی سرولوژیک (ELISA) که در روی ۲۵۳ رأس گاو آبستن شیری انجام گرفت، نشان دادند که ۳۰/۴ درصد از گاوها سروپوزیتیو می‌باشند. در این مطالعه نتیجه‌گیری شد که آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* هیچ ارتباط معنی‌داری با جنسیت گاوهای و بروز سخت‌زایی در حین زایمان ندارد (۱). Gharekhani و Heidariدر سال ۲۰۱۴ در یک بررسی جامع بر روی ۲۲۵۴ نمونه (گاو، گوسفند، اسب، الاغ و سگ) مطالعه سرولوژیکی راجع به *نئوسپورا* انجام دادند. در این مطالعه که با روش N-MAT و IFAT انجام شد، ۱۷/۴ درصد گاوهای شیری (۲۴۵ نمونه از ۱۴۰۶)، ۲/۲ درصد گوسفندان (۸ نمونه از ۳۵۸)، ۴۰ درصد اسب‌ها (۴۹ نمونه از ۱۲۰)، ۵۲ درصد الاغ‌ها (۵۲ نمونه از ۱۰۰) و ۲۷ درصد سگ‌ها (۷۳ نمونه از ۲۷۰) سروپوزیتیو (آلوده به *نئوسپورا*) بودند (۸). در مطالعه دیگر در تهران میزان شیوع سرمی *نئوسپورا* در ۱۰۳ سگ با استفاده از روش IFAT بر پایه سنجش IgG ۱۹/۴ درصد ذکر شده است که میزان آلودگی وابسته به جنسیت سگ نبوده اما همبستگی بالایی با سن سگ‌ها داشته است (۱۰).

همان‌طور که ذکر شد مطالعات مربوط به آلودگی مدفوع سگ به اووسیست *نئوسپورا* در ایران و جهان محدود می‌باشد. Razmi در سال ۲۰۰۹ بر روی ۱۷۴ نمونه مدفوع از سگ‌های فارم‌های اطراف مشهد مطالعه کرد. در این مطالعه، ارزیابی مولکولی به شکل PCR بر روی نمونه‌ها انجام گرفت که ۲ مورد از آن‌ها مثبت بودند (۱/۱ درصد) و بدین طریق اولین گزارش آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در میزبان اصلی (سگ) در اطراف مشهد ثبت گردید (۲۲). همچنین Dalimi و همکاران در سال ۲۰۱۴ در سگ‌های استان لرستان فقط ۹ مورد آلودگی در بین ۴۲۸ (۲/۱ درصد) نمونه مدفوع را گزارش کردند (۳).

با مقایسه میزان آلودگی در مطالعات مذکور و مطالعه حاضر مشخص شد که میزان آلودگی به *نئوسپورا* در سگ‌های اطراف تبریز بسیار بالاتر می‌باشد (۲۱ درصد در تبریز، ۱/۱ درصد در مشهد و۲/۱ درصد در لرستان). شاید یکی از علل تفاوت در این میزان‌ها به حیوانات مورد ارزیابی مربوط باشد. در مطالعه Razmi در سال ۲۰۰۹ میزان آلودگی به *نئوسپورا* در سگ‌های فارم و خانگی مورد سنجش قرار گرفته است (۲۲). همچنین در مطالعه Dalimi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نمونه‌های مدفوعی از سگ‌های نگه‌داری شده در گاوداری‌های شیری کوچک تهیه شده است (۳). درحالی‌که در مطالعه حاضر، سگ‌های ولگرد سهم بیش‌تری از نمونه برداری و آلودگی را به خود اختصاص داده‌اند که طبیعتاً بالاتر بودن میزان آلودگی در سگ‌های ولگرد نسبت به سگ‌های فارم قابل پیش‌بینی و قابل توجیه می‌باشد. نکته دیگر، با توجه به سابقه بررسی سرولوژیک در منطقه که در آن میزان آنتی‌بادی *نئوسپورا کانینوم* را در گاوهای سقط کرده ۱۸/۴ درصد ذکر شده بود و هم‌چنین آلودگی در مغز گوساله‌های سقط شده به روش PCR رقم بسیار بالایی (۴۲/۸ درصد) نشان داد، میزان بالای آلودگی در سگ‌های منطقه نیز قابل توجیه می‌باشد (۱۷،۱۸).

میزان بسیار بالای آلودگی در مطالعه حاضر قابل مقایسه با مطالعه Jianhua و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مدفوع سگ‌های شانگهای چین است؛ که با روش آزمایش مولکولی PCR انجام پذیرفت تعداد ۲۱۲ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت که ۷۴ مورد (۳۴/۹ درصد) از آن‌ها از نظر آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* مثبت بودند. آن‌ها اعلام کردند که آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* هیچ ارتباطی به سن حیوان و جنسیت سگ‌های مورد ارزیابی ندارد (۱۲). این مطالعات با نتایج بررسی مطالعه حاضر که نشان داد آلودگی به *نئوسپورا* ارتباطی با سن سگ ندارد منطبق بود.

Ghalmi و همکاران در سال ۲۰۰۸ حضور *نئوسپورا کانینوم* را در ارگان‌های سگ با روشReal time PCR ارزیابی کردند. در این مطالعه ۸۷ قلاده سگ که هیچ‌کدام علائم نئوسپوروزیس را نداشتند به شکل تصادفی انتخاب شده و آسان‌کشی شدند. از ۸۷ قلاده سگ، تعداد ۲۸ قلاده (۳۲ درصد) حداقل در یک ارگان آلوده بودند. از این ۲۸ مورد مثبت در Real time PCR فقط ۹ مورد از لحاظ سرمی مثبت بودند. با مقایسه درصد آلودگی فوق و درصد آلودگی سگ‌های مورد آزمایش در این مطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های اطراف تبریز تقریباً مشابه آلودگی مذکور می‌باشد (۷).

اما مقایسه میزان آلودگی گزارش شده در مطالعه حاضر با مقادیر ارائه شده توسط Palavicini و همکاران در سال ۲۰۰۷ در کاستاریکا هم‌خوانی ندارد. در این مطالعه که ۲۵۶ نمونه مدفوع از ۳۴ قلاده سگ گرفته شده بود، تعداد ۴ مورد آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* به طریق آزمایش PCR یافت شد. نکته جالب توجه این

بود که هیچ‌کدام از ۴ نمونه مثبت علی‌رغم مثبت بودن، در زیر میکروسکوپ اووسیست نشان ندادند که گمان می‌رود علت این امر به دلیل تعداد بسیار کم دفع اووسیست *نئوسپورا کانینوم* باشد (۲۰).

در طی این مطالعه مشخص شد که آلودگی‌های سگ‌های ولگرد بیش از سگ‌های دیگر به *نئوسپورا* می‌باشد. این یافته با نتیجه‌گیری Dalimi و همکاران در سال ۲۰۱۴ که نقش سگ‌های ولگرد را در اشاعه این بیماری با اهمیت می‌دانند هم‌خوانی دارد (۳).

همچنین در این مطالعه مشخص شد که آلودگی در سگ‌هایی که قبلاً مورد درمان ضدانگلی قرار گرفته‌اند به‌طور معنی‌داری کمتر از حیوانات درمان نشده است. بررسی مشابهی در ایران و جهان برای مقایسه این نتایج مشاهده نشد اما به‌طور کلی درمان ضدانگلی بر آلودگی محیط توسط تخم کرم‌ها و اووسیست‌ها مؤثر می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به میزان بالای آلودگی با *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های منطقه تبریز و اثبات قبلی بالا بودن تیتر آنتی‌بادی در گاوهای منطقه و در گاوهای سقط کرده و هم‌چنین اثبات حضور انگل *نئوسپورا کانینوم* در ترشحات و مقاطع بند ناف جنین‌های سقط شده در گاوداری‌های اطراف تبریز، به نظر می‌رسد که انگل *نئوسپورا کانینوم* را می‌توان یکی از عوامل مهم همه‌گیری‌های سقط‌جنین در گاوداری‌های شیری اطراف تبریز محسوب کرد. با در نظر گرفتن این موضوع، لزوم اعمال روش‌های پیشگیری در گاوداری‌های سنتی و صنعتی اطراف تبریز و همچنین استفاده از روش‌های تشخیص سریع بیماری در آن‌ها توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله از نتایج طرح مربوط به پایان‌نامه مصوب دانشگاه تبریز به شماره ۴۳/۴۰۲۸/د وکد اخلاقی شماره ۲۲۰-د استخراج شده است و نویسندگان از مساعدت‌های معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Ansari-Lari, M., Rowshan-Ghasrodashti, A., Jesmani, H., Masoudian, M., Badkoobeh, M. (2017). Association of *Neospora caninum* with reproductive performance in dairy cows: A prospective study from Iran. Vet Res Forum, 8, 109-115. PMID: 28785385
2. 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, 612-618. https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0612:FIONCF]2.0.CO;2 PMID: 11426726
3. Dalimi, A., Sabevarinejad, G., Ghafarifar, F., Forouzandeh-Moghadam, M. (2014). Molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected dogs in Lorestan province, West of Iran. Arch Razi Inst, 69, 185-190.
4. Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F.J., Wouda, W., Barkema, H.W. (2001). Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. Int J Parasitol, 31, 747-752. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00230-2 PMID: 11403764
5. Dubey, J.P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol, 41, 1-16 https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1 PMCID: 2717477
6. Dubey, J.P. (2003). Neosporosis in cattle. J Parasitol, 89, 42-56.
7. Ghalmi, F., China, B., Kaidi, R., Daube, G., Losson, B. (2008). Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. Vet Parasitol, 155, 161-167. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.007
8. Gharekhani, J., Heidari, H. (2014). Serology based comprehensive study of *Neospora* infection in domestic animals in Hamedan province, Iran. J Adv Vet Anim Res, 1,119-124. https://doi.org/10.5455/javar.2014.a23
9. Gharekhani, J., Yakhchali, M., Khaltabadi-Farahani, R. (2020). Prevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatidae) in pet dogs from Hamadan, West of Iran. Avicenna J Clin Microbiol Infect, 7, 22-26. https://doi.org/10.34172/ajcmi.2020.04
10. Haddadzadeh, H., Sadrebazzaz, A., Malmasi, A., Ardakani, H.T., Nia, P.K., Sadreshirazi, N. (2007). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from rural and urban environments in Tehran, Iran. Parasitol Res, 101, 1563-1565. https://doi.org/10.1007/s00436-007-0678-5 PMID: 17687566
11. Hajikolaei, H., Rahim, M., Hamidinejat, H., Ghorbanpoor, M., Goraninejad, S. (2008). Serological study of *Neospora caninum* infection in cattle from Ahvaz area, Iran. Iranian J Vet Med, 2, 63-66. https://dx.doi.org/10.22059/ijvm.2008.27367
12. Jianhua, L.i., Pengfei, H., Yanhui, Y., Ling, D., Pengtao, G., Guocai, Z., Xichen, Z. (2014). Detection of Neospora caninum-DNA in feces collected from dogs in Shenyang (China) and ITS1 phylogenetic analysis. Vet Parasitol, 205, 361-364. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.036
13. Malmasi, A., Hosseininejad, M., Haddadzade, H., Badii A., Bahonar A. (2006). Serologic study of anti-Neospora caninum antibodies in household dogs and dogs living in

dairy and beef cattle farms in Tehran, Iran. Parasitol Res, 100, 1143-114. https://doi.org/10.22092/ARI.2018.120218.1186

14. Mc Garry, J.W., Stockton, C.M., Williams, D.J.L., Trees, A.J. (2003). Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. J Parasitol, 89, 628-630. https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0628:psooon]2.0.co;2 PMID: 12880273
15. McInnes, L.M., Irwin, P., Palmer, D.G., Ryan, U.M. (2006). In vitro isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. Vet Parasitol, 137,355-363. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.018 PMID: 16487658
16. Namavari, M.M. (2020). Neosporosis in Iran; recent evidences and perspectives. J Zoonotic Dis, 4, 1-20. https://dx.doi.org/10.22034/jzd.2020.10722
17. Nematollahi, A., Jaafari, R., Moghaddam, G. (2011). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Tabriz, Northwest Iran. Iran J Parasitol, 6, 95-98. PMID: 3279911
18. Nematollahi, A., Moghaddam, G.H., Jaafari, R., Helan, J, Norouzi, M. (2013). Study on outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in dairy cows in Tabriz (Northwest Iran) by serological, molecular and histopathologic methods. Asia Pac J Trop Med, 6, 942-946. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60168-6 PMID: 24144024
19. Nourollahifard, S.R., Khalili, M., Aminzadeh, A. (2008). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in cattle in Kerman province, South East Iran. Vet Arhive, 78, 253-259.
20. Palavicini, P., Romero, J.J., Dolz, G., Jimenez, A.E., Hill, D.E., Dubey, J.P. (2007). Fecal and serological survey of Neospora caninum in farm dogs in Costa Rica. Vet Parasitol, 149, 265-70. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.007 PMID: 17868998
21. 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, Iran. Vet Parasitol, 135, 187-189. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.004 PMID: 16289861
22. Razmi, G. (2009). Fecal and molecular survey of *Neospora caninum* in farm and household dogs in Mashhad area, Khorasan province, Iran. Korean J Parasitol, 47, 417-20. https://dx.doi.org/10.3347%2Fkjp.2009.47.4.417
23. Sadrebazzaz, A., Haddadzadeh, H., Esmailnia, K., Habibi, G., Vojgani, M., Hashemifesharaki, R. (2004). Serological prevalence of *Neospora caninum* in healthy and aborted dairy cattle in Mashhad, Iran. Vet Parasitol, 124, 201-204. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.027 PMID: 15381300
24. Salehi, N., Haddadzadeh, H.R., Shayan, P., Vojgani, M., Bolorchi, M. (2010). Serological study of *Neospora caninum* in pregnant dairy cattle in Tehran, Iran. Iranian J Vet Res, 4, 113-116.
25. Slapeta, J.R., Modry, D., Kyselova, I., Horejs, R., Lukes, J., Koudela, B. (2002). Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. Vet Parasitol, 109, 157-167. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00273-x PMID: 12423929

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 76, Number 4, 2022
Original Article

Study on Prevalence Rate of *Neospora caninum* in Dogs Around Tabriz Through Fecal and Molecular Methods

Ahmad Nematollahi[1], Parisa Shahbazi[1], Armin Fakheri[2]

[1] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran*
[2] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran*

10.22059/jvr.2021.318712.3135

Received: *22 September 2021,* ***Accepted:*** *22 November 2021*

Abstract

BACKGROUND: Neosporosis is a disease caused by the protozoan *Neospora caninum*, which is characterized by abortion in cattle and neuromuscular paralysis of various organs, particularly the hind limbs of dogs. The diagnosis of neosporosis is often made by serological molecular tests.

OBJECTIVES: This study was conducted to investigate the presence of *N. caninum* oocysts in the feces of dogs.

METHODS: A total of 100 fecal samples were collected from indoor and outdoor dogs during 2018-2019 around Tabriz. Information about age, location, and history of antiparasitic treatment of the dogs were recorded in a questionnaire. Primarily, fecal samples were examined microscopically for *Neospora* ocysts. After breaking the collected oocysts through freeze-thaw and sonication, DNA contents of the oocysts were extracted and analyzed via PCR.

RESULTS: In a light microscopic study, oocysts were observed in 45 (45 %) of the fecal samples. In the PCR study, 21 of the 45 cases tested positive for *Neospora* infection (21 %). All the positive cases of infection were observed in molecular examination in dogs older than one year. The positive cases were observed in 2 % of the domestic dogs, 8 % of the stray dogs, 6 % of the kennel dogs, and 5 % of the rural dogs. Furthermore, 19 % of the infected dogs had no history of antiparasitic treatment; only 2% had a history of antiparasitic treatment. The results of statistical analysis showed that the rate of infection in dogs around Tabriz with *Neospora caninum* was significantly ($P<0.05$) related to the animal's living environment and history of antiparasitic treatment. However, this rate was found to have no significant relationships with the age of the animals.

CONCLUSIONS: Due to the high rate of infection with *Neospora caninum* in dogs in Tabriz, it is necessary to apply preventive methods in traditional and industrial farms around this city and use rapid diagnosis methods in them.

Keywords: *Neospora caninum*, Dog, PCR, Fecal examination, Prevalence

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: anemat@tabrizu.ac.ir Tel/Fax: 041-36378744

How to cite this article:

Nematollahi, A., Shahbazi, P., Fakheri, A. (2022). Study on Prevalence Rate of *Neospora caninum* in Dogs Around Tabriz Through Fecal and Molecular Methods. J Vet Res, 76(4), 381-388. https://doi.org/10.22059/jvr.2021.318712.3135

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sequence of the primers used to detect *Neospora caninum.*
Figure 1. *Isospora* oocysts in wet stool spread (1000 ×).
Figure 2. Sporozoites released from oocysts after rupture of the wall and staining with *Giemsa* (1000 ×).
Figure 3. Electrophoresis of the product of a PCR resulting from gene amplification.