Assiut Vet. Med. J. Vol. 58 No. 134 July 2012

COMPARATIVE STUDY OF *NEOSPORA CANINUM* STRAINS (NC-5, Nc1, BPA4) INFECTION IN NATURALLY INFECTED CATTLE IN SYRIA

W.A. AL-OBAIDII; M.M. KATRANJI and A. AL-KHALED
Dept of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Al-Baath University, Syria Arab Republic.

ABSTRACT

Received at: 11/6/2012

Accepted: 25/8/2012

In order to isolate *Neospora caninum* in cell culture (Vero cell) and diagnosis the strains by using Real Time Polymerase Chain Reaction by using three different primers pairs(NC-5,Nc1 and BPA4) from the tissue of 25 aborted fetus, 14 new borne calves and 39 cattle which suffer from abortion in different stages of pregnancy, the study showed from culturing of tissue sample extract in tissue culture, Cyto Pathic Effect this effect manifested by Vacule, Rupture in cell and presence of tachyzoites, and this effect variance in density between samples and passages, the first CPE appear in 3rd passage of aborted fetus heart, in 4th passage of calves brain and heart, and cow placenta. When application the PCR technique in DNA template which extracted from infected cell culture ,showed presence increased fluorescent curve which indicate positive sample, the highest percentage of infection in cell culture which infected with brain and skeletal muscle of Aborted fetus and Heart, skeletal muscle of calves, and blood sample of cow, the highest percentage in 2nd trimester aborted fetus, in calves which suffer from recumbence, and in cow which aborted in 2nd trimester. The high percentage of NC-5 strain in blood sample of cow, brain of calves, brain and skeletal muscle of aborted fetus, Nc1 strain not appear in blood sample of cow, calves and brain of calves in additional of brain and skeletal muscle of aborted fetus, while highest percentage of BPA4 strain appear in skeletal muscle of calves and aborted fetus and blood of cow

Key Words: *Neospora caninum, Real Time PCR, Strains, Vero cell.*

دراسة مقارنة الإصابة بذراري البوغة الجديدة الكلبية (BPA4 , Nc1 , NC-5) في الأبقار المصابة طبيعيا في سوريا

وسن امجد العبيدي ، محمد محسن قطرنجي ، عبد الكريم الخالد

تم جمع أعضاء (دماغ، قلب، عضلات هيكلية) من ٢٥ جنينا مجهضا و ١٤ عجلا إضافة إلى جمع عينات دم من العجول، و ٣٩ عينة دم ومشيمة من أبقار مجهضة ، وذلك بهدف عزل طفيلي البوغة الجديدة الكلبية على خلايا الزرع الخلوي (خلايا كلية أجنة القرود الإفريقية الخضراء) والكشف عن ذراريه بتقنية تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي ، وباستخدام ٣ أزواج من المشرعات للذراري (NC-5,Nc1,BPA4) ، وتبين من خلال تنمية الأعضاء على خلايا الزرع الخلوي ظهور تأثيرات مرضية خلوية ، تباينت بالشدة بين الأعضاء والتمريرات ، وإن أول ظهور للتأثيرات كان في التمريرة الثالثة لعينات القلب للأجنة ، وفي التمريرة الرابعة لعينات القلب والدماغ للعجول و لمشيمة الأبقار. وعند إجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليمريز على قوالب جزيئه الدنا التي تم استخلاصها من المزارع الخلوية التي أظهرت نموا للطفيلي تبين وجود منحنيات تألق ايجابية ، سجلت أعلى نسبة للإصابة في المزارع الخلوية لادمغة والعضلات الهيكلية للأجنة والقلب والعضلات الهيكلية للعجول ، ودم الأبقار. وظهرت أعلى نسبة للإصابة في الأجنة المجهضة في الثلث الثاني من الحمل ، العجول التي تعاني من عدم القدرة على النهوض وفي الابقار التي أجهضت في الثلث الثاني ، وتبين من خلال فحص الدنا للطفيلي للكشف عن ذراري البوغة الجديدة الكلبية، إن أعلى نسبة إصابة للذرية NC-5 في عينات الدم للأبقار ، ودماغ العجول ، وفي ادمغة والعضلات الهيكلية للأجنة ،أما الذرية Nc1 فكانت نسب الإصابة فيها منخفضة في دم الأبقار والعجول وأدمغة العجول وللدماغ والعضلات الهيكلية للأجنة ، وأظهرت الذرية BPA4 أعلى نسبة إصابة في العضلات الهيكلية للعجول والأجنة ودم الأبقار.

INTRODUCTION
المقدمة

تعد البوغة الجديدة الكلبية من الأكريات الطفيلية Coccidian parasite ، عرف الطفيلي لأول مرة في عام ١٩٨٤ م في النرويج في الكلاب من نوع Boxer dog litter والتي كانت بأعمار ٢-٦ أشهر، تعاني من علامات التهاب الدماغ Encephalomyelitis والتهاب العضلات Myositis والعرج Lameness حيث سمي في ذلك الحين باسم Toxoplasma like protozoan (Bjerkas *et al.*,1984)، ومن الجدير بالذكر بأنه وجد منذ عام ١٩٨٨ م أن للطفيلي علاقة وطيدة بالمشاكل التناسلية في الأبقار فضلا عن تسببه في ظهور أعراضا" عصبية في العجول المولودة حديثا (Jessica *et al.*, 2011) ، وتتعلق هذه الأعراض بغزو الحيوانات التسرعية للطفيلي Tachyzoites لأنسجة الأم والجنين ، حيث وجدت في أنسجة مختلفة في جسم الثوي خلال الطور الحاد للمرض بينما وجدت الأكياس النسجية Tissue cyst في الطورين الحاد والمزمن

وخصوصا في الدماغ (Timothy *et al.*, 1999) ، ويعد تشخيص طفيلي البوغة الجديدة الكلبية صعبا " نظرا" لعدم وجود أعراضا "مرضية متخصصة في الأبقار وكذلك عدم وجود اختبارات طفيلية تشخيصية لها القدرة لتمييزها، بالإضافة إلى ذلك فان السيطرة على البوغة الجديدة الكلبية يفتقر لوجود لقاح ناجح أو علاج له القدرة على تقليل تكاثر الطفيلي في الأنسجة (Habibi *et al.*, 2005).

ويعتمد تشخيص البوغة الجديدة الكلبية على عدة جوانب منها، التقصي عن الأضداد المتخصصة للطفيلي في مصول الحيوانات المصابة من خلال عدة اختبارات مصلية منها تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم ELISA ، اختبار الومضان المناعي غير المباشر IFAT ، اختبار التراص المباشر DAT (Dubey *et al.*, 2007)، أو من خلال الكشف عن الطفيلي زرعيا " بإنمائه الطفيلي على خلايا الزرع الخلوي وذلك نظرا" لقدرة الحيوانات التسرعية على النمو على عدة أنواع من خلايا الزرع الخلوي منها (خلايا كلية أجنة القرود الإفريقية الخضراء ، خلايا بطانة الشريان الرئوي والخلايا وحيدة النواة للأبقار) ، حيث تستخدم هذه الخلايا بصورة واسعة في تنمية الحيوانات التسرعية وذلك بغرض إكثار أعدادها ، ودراسة البنية المستدقة ، والصفات المستضدية ، والدراسات الجزيئية ، ودراسة قدرة الحيوانات التسرعية على الالتصاق على الخلايا وآلية ذلك (ميكانيكيتها) ، ودراسة حيوية الحيوانات التسرعية ومن ثم تحقيق الهدف الرئيسي ألا وهو تشخيص الطفيلي (Katarina *et al.*, 2011) ، لذلك اتجهت الأبحاث في السنوات الماضية إلى تقنية متقدمة تهدف إلى الكشف عن الدنا للطفيلي من خلال تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز Polymerase Chain Reaction (PCR) ، حيث تعتبر طريقة حساسة للكشف ، وذلك من خلال تضخيم لمورث محدد للطفيلي ومن ثم تحديده (Norbert *et al.*, 2002) ، حيث يعد المورث Nc5 أكثرها شيوعا، إلا انه وفي الآونة الأخيرة تم استخدام المورث ITS1 أيضا، وتتمتع هذه التقنية بميزات عديدة منها الحساسية العالية ، الدقة ، الكشف عن الطفيلي حتى لو كان بأعداد قليلة ، هذا بالإضافة للكشف عن الطفيلي في المزارع الخلوية ، وأنسجة الجنين وألام، والسوائل الجنينية ، والكشف عن الدنا للحيوانات التسرعية ، والحيوانات البطيئة Bradyzoites والكيسة البيضية oocyst، وكذلك القدرة عن الكشف عن الطفيلي في أثوياء متعددة لتشمل الحيوانات المختبرية أيضا (Esther *et al.*, 2002) ، وطورت هذه التقنية لتشمل أنواعا دقيقة جدا مثل (ذات الوقت الحقيقي Real Time ، المتداخل Nested ، نصف المتداخل Seminested ، الكمي التنافسي Quantitive –Competitive التي تعتبر ذات قدرة عالية وسريعة لتقدير كمية ونوعية الطفيلي في الأنسجة وفضلا عن ذلك يوجد النوع التقليدي للتقنية (Classic PCR) والتي لها فوائد أخرى منها تشخيص الذراري المتعددة للطفيلي من خلال استخدام أنواع متخصصة لكل ذرية من المشرعات Primers (Salehi *et al.*, 2009).

ولعدم وجود دراسة إلى هذا الوقت تتضمن الكشف عن الطفيلي وذراريه في سوريا فقد أنجزت هذه الدراسة لأول مرة في سوريا وذلك لتحقيق الأهداف التالية:

١- عزل طفيلي البوغة الجديدة الكلبية من أنسجة الأبقار،العجول والأجنة المجهضة على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الإفريقية الخضراء.

٢- المقارنة بين نسب الإصابة بذراري البوغة الجديدة الكلبية من خلال تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي Real Time PCR.

MATERIALS and METHODS
المواد وطرق البحث

١-جمع العينات:
تم جمع عينات من ٢٥ جنينا مجهضا وبأعمار مختلفة، فضلا عن جمع عينات من ١٤ عجلا ولدت ضعيفة ويعاني البعض منها من أعراض عصبية وعدم القدرة على الوقوف، حيث جمعت العينات بعد نفوق العجول إضافة إلى جمع المشيمة وعينات الدم من ٣٩ بقرة تعاني من الإجهاض وبفترات حمل مختلفة .

وضع الدم في أنابيب اختبار حاوية على مانع تخثر (هيبارين) أضيف لها حجم مماثل من الفايكول ومن ثم وضعت في جهاز المثقلة ٢٠٠٠ دورة /دقيقة ، ٤ م ه ، ١٠ دقائق سحبت طبقة الخلايا اللمفاوية (Buffy Coat) وحفظت في ٤ م ه لحين إجراء إنماء الطفيلي، وتم إجراء الحصة التشريحية على الأجنة المجهضة والعجول النافقة باستخدام أدوات جراحية معقمة واخذ منها الدماغ ، أجزاء من العضلات الهيكلية والقلب بالإضافة إلى أجزاء من المشيمة من الأبقار، وقد وضعت أجزاء من هذه الأعضاء في قوارير معقمة معدة مسبقا لهذا الغرض حيث تكون حاوية على محلول دارئة الفوسفات (PBS) متعادل والحاوي على ١٠٠ وحدة دولية / ١ مليلتر من البنسلين ج (Penicillin G) ، سلفات الستربتومايسين بمقدار ٥٠ مايكروغرام/ ١ مليلتر (Streptomycin Sulfate) وسلفات الجنتاميسين (Gentamicine Sulfate) بمقدار ٥٠ ملغم/ ١ لتر وصادات فطور متمثلة امفوتريسين ب (Amphotericin B) بمقدار ٢,٥ ملغم/ ١ لتر وذلك لغرض عزل الطفيلي على خلايا الزرع الخلوي (Masumi *et al.*, 2000).

٢- عزل الطفيلي:
تم أخذ ٢٠ غراما" من الأعضاء المضاف إليها محلول داريء الفوسفات الحاوية على الصادات الحيوية كل عضو على حده ، وقطعت في هاون خزفي معقم إلى قطع صغيرة باستخدام مقص جراحي معقم، ونقلت العينة بعد ذلك إلى حوجلة الهضم بالتربسين (Trypsinized Flask) ، ووضع معها قطعة من مغناطيس معقم ومن ثم أضيف إليها ٤٠ مليلتر من محلول دارئة حاوي على ٠,٢٥% تربسين و ٠,٠٢٥ % من ملح EDTA (Ethylene Diamin Tetraacetic Acid) ،حيث حضنت بدرجة ٣٧م ه لمدة ٤٥ دقيقة مع التحريك المستمر باستخدام جهاز المزج المغناطيسي ، ثم وضع المزيج في أنابيب معقمة ووضعت في جهاز المثقلة المبردة (٤ م ه) ٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق ، وتم التخلص من الراشح ، ثم أضيف ١٠ مليلتر من الوسط الزرعي للنمو Minimal Essential Media)MEM) ،إلى الراسب وتم مزجهما جيدا ومن ثم وضع المزيج في جهاز المثقلة، تم تكرار هذه العملية ثلاث مرات لغرض غسل الراسب ومن ثم علق هذا الراسب في ١٠ مليلتر من الوسط الزرعي للنمو MEM ليحفظ في درجة حرارة ٤ م ه لحين إجراء الإنماء على خلايا الزرع الخلوي (Nathalie, 2003).

٣- تحضير الوسط الزرعي للنمو Growth Media:
تم إضافة ١٠,٦٩ غرام من الوسط الزرعي مع ١٠ غرام من مرق التربتوز الفوسفاتي Tryptose phosphate broth ،٠,٥٨٤ من الكلوتامين L-glutamine ، ١,٥ غرام بيكاربونات الصوديوم NaHCO3(2H2O) ، ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية بنسلين ج Penicillin G، ١٠٠ملغرام سلفات الستربتومايسين Streptomycin Sulfate، ٥٠ ملغرام سلفات الجنتاميسين Gentamicine sulfate ، ٢,٥ ملغرام امفوتريسين ب Amphotericin B ، تم إذابة الخليط في ماء مقطر ثنائي التقطير وخال من الكهارل (٩٠٠ مليلتر) ويتم التأكد من الباء هاء (PH=7.2) ، ومن ثم رشح تحت ضغط موجب (٢٠ مايكرون) تم إضافة ١٠٠ مليلتر من مصل الجنين البقري وحفظ في ٤ م ، (Rai,2008).

٤- خلايا الزرع الخلوي المستمر :
تم استخدام خلايا زرع خلوي من نوع خلايا كلية جنين القرود الخضراء الأفريقية Vero cell، حيث تم الحصول عليها من قسم اللقاحات- مديرية الصحة الحيوانية التابعة لوزارة الزراعة في دمشق ، وتم الإنماء والإكثار للطفيلي.

٥- إنماء الطفيلي:
تم إتباع طريقة (Yamane *et al.*, 1997) ، حيث تم مزج العالق الذي تم تحضيره مسبقا في عملية عزل الطفيلي ب ١٠ مليلتر من خلايا كلية أجنة القرود الخضراء الأفريقية ومن ثم حضنت لمدة ٤ ساعات بدرجة حرارة ٣٧ م ه ووضع المزيج في أنابيب معقمة في جهاز المثفلة ٢٠٠٠ دورة لمدة ١٠ دقائق ومن ثم تم التخلص من الراشح، وغسل الراسب الحاوي على الخلايا ثلاث مرات بمحلول دارئة الفوسفات المعقمة والذي يكون بدرجة حرارة ٣٧ م ه ، ونقلت الخلايا فيما بعد إلى الحوجلة الخاصة للزرع الخلوي (Falcon سعة ٥٠ مليلتر) ومن ثم أضيف إليها وسط النمو (Growth media) ، تم تحضين الخلايا في ٣٧ م ه ، ٥% CO2، وتم مراقبة الخلايا يوميا بفحصها تحت المجهر ويراعى استبدال الوسط كل ٥ أيام وإجراء تمريره واحدة كل ٤٠ يوما من التحضين ولستة تمريرات.

٦- استخلاص الدنا DNA Extraction:
تم إجراء استخلاص الدنا حسب تعليمات الشركة المصنعة للعتيدة (OMEGA bio-ket)

- تحضير المحاليل:
*** تحضير إنزيم البروتيناز K(Proteinase K):** تم إذابة الإنزيم والبالغة كميته ١٢٠ ملغم في ٤,٨ مليلتر من دارئة حفظ إنزيم البروتيناز Proteinase storage buffer.

*** تحضير دارئة الغسل SPM Wash buffer:** تم إضافة ٤٢ مليلتر من الايثانول المطلق ١٠٠% إلى ٦٠ مليلتر من دارئة الغسل لتكون جاهزة للاستخدام.

***تحضير دارئة MP:** تم إضافة ٦٠ مليلتر من الايثانول المطلق ١٠٠% إلى ٤٠ مليلتر من دارئة MP لتكون جاهزة للاستخدام.

- استخلاص الدنا للطفيلي DNA من المزارع الخلوية:

تم حصاد الخلايا من حوجلة الزرع الخلوي باستخدام مكشطة الخلايا المطاطية cell scraper،ثم تم غسل الخلايا ثلاث مرات باستخدام محلول دارئة الفوسفات البارد(٤م ه) ، وتم تعليقها في دارئة الفوسفات البارد (٤ م ه) ١٨٠ مايكروليتر ،ومن ثم إضافة ٢٠ مايكروليتر من إنزيم بروتيناز K (Proteinase K) (25 mg /ml) ،ومزج جيدا وحضن في الحمام المائي الهزاز ٥٥ م ه لمدة ١٠ دقائق ، وتم بعد ذلك نقل العينة في أنابيب ابندورف Eppendorf حجم ١,٥ مليلتر معقمة ، وبالتالي إضافة ٢٠٠ مايكروليتر من دارئة MSL ومزج جيدا وحضن ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٧٠ م ه، وترك الأنبوب في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق ، ثم أضيف الايثانول المطلق ١٠٠% بمقدار ٢٦٠مايكروليتر مع ١٠ مايكروليتر من الجزيئات المغناطيسية Mag –Bind Particles و ١٠ مايكروليتر من دارئة LPA ،ومزج جيدا وحضن لمدة ٥ دقائق في درجة الغرفة ، ووضع الأنبوب فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق ، ثم أزيل السائل الراشح باستخدام ماصة دقيقة ، وتم إضافة ٤٠٠ مايكروليتر من دارئة MP ومزج جيدا" ، وحضن بعد ذلك لمدة٣ دقائق في درجة حرارة الغرفة ووضع الأنبوب فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق و تم التخلص من الراشح باستخدام ماصة دقيقة وأضيف ٤٠٠ مايكروليتر من محلول دارئة الغسل SPM Wash Buffer مع المزج الجيد وحضن ٣ دقائق في درجة حرارة الغرفة ،ووضعت بعدها الأنبوبة على جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق ، وتم التخلص من الراشح باستخدام ماصة دقيقة، وأعيدت عملية الغسل بدارئة الغسل SPM Wash Buffer ٤٠٠ مايكروليتر، ثم تم التأكد من خلو الأنبوبة من أي كمية من الراشح وأضيف دارئة الشطف Elution Buffer ٢٠٠ مايكروليتر لشطف الدنا عن الجزيئات المغناطيسية مع مراعاة المزج الجيد ومن ثم تم التحضين ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة ، ووضعت الأنبوبة بعدها فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق و سحب الراشح الحاوي على جزيئات الدنا المستخلصة ونقل إلى أنبوبة ابندورف Eppendorf حجم ١,٥ مليلتر معقمة أخرى، وحفظ الأنبوب في -٧٠ م ه لحين إجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليمريز عليه.

٧- تفاعل سلسلة البوليمريز -ذو الوقت الحقيقي Real Time PCR
تم استخدام العتيدة المنتجة من قبل شركة (Genekam Biotechnology AG Germany) (الشكل-١-) والتي تعتمد على صبغات ومضانية Fluorogenic

(Carboxy –fluorescein (quencher)) -
(6-carboxy tetramethyl rhodamine(reporter)).

٧-١- المحاليل والمواد المستخدمة في تفاعل البوليمريز
عبارة عن مزيج تفاعل يحتوي على كل مكونات التفاعل مع المشرعات وقالب الدنا المراد اختباره، ويتكون مزيج التفاعل لكل عينة حجم ٢٥ مايكروليتر من المواد التالية:

ت	اسم المادة	الكمية(ul)	التركيز النهائي
-١	10X PCR Buffer	2.5	1X
-٢	dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, & dTTP	0.5	200uM
-٣	Mgcl2	3.25	1.5mM
-٤	Taq DNA-Polymerase	0.125	2.5 units
-٥	Dyes	0.25	100nM
-٦	Primer A	0.2	800nM
-٧	Primer B	0.2	800nM
-٨	DNA Template	5	-
-٩	RNA Free Water	12.975	-

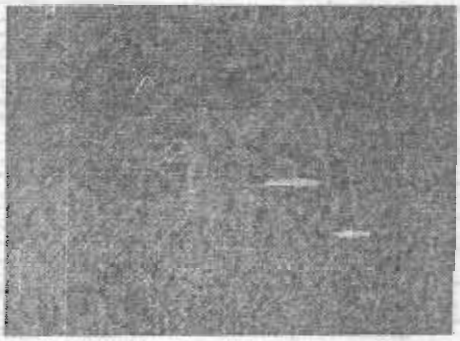
٧-٢- المشرعات أو البادئات: Primers

صنعت هذه المشرعات من قبل شركة GenBank Accession، وتم انتقاء هذه المشرعات من أجل تضخيم المورثات لكل من الفيروس (Nathalie, 2003) (NC-5, Nc1 and BPA-4)، وقد تضمنت ٣ أزواج من المشرعات وكما يلي:

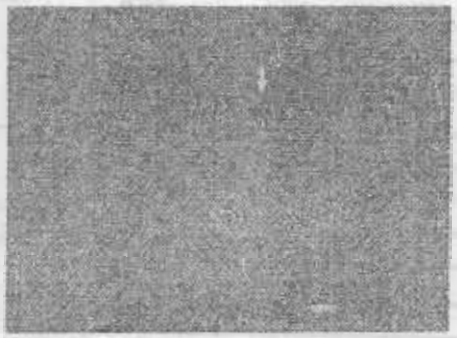
ت	اسم الذرية	تسلسل البادئة الوراثي ٥'-٣'	الحجم (bp)
١	NC-5	'٣CACAAGTCGCACGGAGGTCA'٥	٧٦
		'٣AAGGAGAACGCTTCGTAACAA'٥	
٢	BPA-4	'٣CACACACTTGCCCACTTGGCTCCCT'٥	٣٣٧
		'٣ACCATCGCCACTCTCCACCCTATGCAC'٥	
٣	Nc1	'٣AATGTCCTAACCTGCGTGACCC '٥	٢٢٧
		'٣TCTTCTGCATCCAACTGACCGCTC '٥	

٧-٣- خطوات عمل تفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي:

أجري اختبار تفاعل البوليميريز المتسلسل ذو الوقت الحقيقي حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Esther *et al*.,2002) حيث أجري الأختبار في حجم تفاعل كلي من ٢٥ مايكروليتر في طبق الاختبار الحاوي على ٩٦ حفرة (Plate) حيث أضيف في كل حفرة ٢,٠ مايكروليتر من كل بادئ من البادئات Primers و ٥ مايكروليتر من وقالب الدنا Template DNA وباقي الحجم من محلول مزيج التفاعل الجاهز Master mix الحاوي على جميع مكونات التفاعل باستثناء البادئات وقالب الدنا، ثم وضع بعد ذلك طبق الاختبار في المبلمر الحراري (Thermocycler)(الشكل-٢-). وأجريت عملية التضاعف Amplification بواسطة جهاز المبلمر الحراري المبرمج على خمسين دورة بعد خطوة المسخ Denaturating ٩٥°م لمدة ١٠ دقائق. وقد شملت كل دورة مسخ عند درجة حرارة ٩٤ °م لمدة خمسة ثواني ٢٥ دورة، ارتباطAnnealing البادئ أو المشرع بدرجة ٦٠ °م لمدة١٥ ثانية، واستطالة Elongation عند درجة حرارة ٧٢ °م لمدة ١٥ ثانية، ثم ٢٥ دورة مسخ ٩٤ °م لمدة ٥ ثواني ، ارتباط ٦٦ °م لمدة ٥ ثواني ، استطالة ٧٢ °م لمدة ٤٥ ثانية .



الشكل (١) عتيدة تفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي



الشكل (٢) جهاز البلمرة الخاص لتفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي

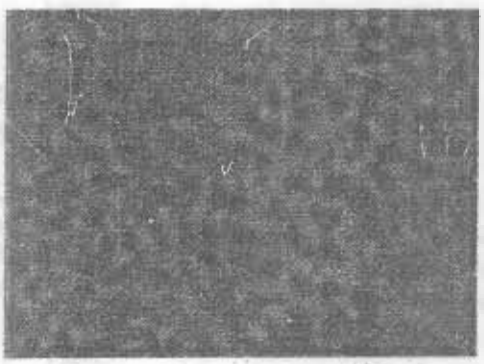
RESULTS
النتـــائج

تبين من خلال تنمية الأعضاء المختلفة المأخوذة من الأجنة المجهضة ،العجول والأبقار على خلايا المزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء(شكل-٣-) ولستة تمريرات وجود تمريرات عمياء (Blind passage) حيث كانت متباينة حسب مصدر ونوع العضو المراد عزل الطفيلي منه ، ومن ثم ظهور تأثير مرضي على الخلايا Cyto Pathic Effect (CPE) متمثلة بظهور فجوات بين الخلايا Vacuie (شكل-٤-) وتمزق في الخلايا Rupture (شكل-٥-) وظهور الحيوانات التسرعية (شكل-٦-) حيث كانت هذه التأثيرات متباينة الشدة بين الأعضاء والتمريرات وازدادت شدة بزيادة التمريرات ، جدول-١-.

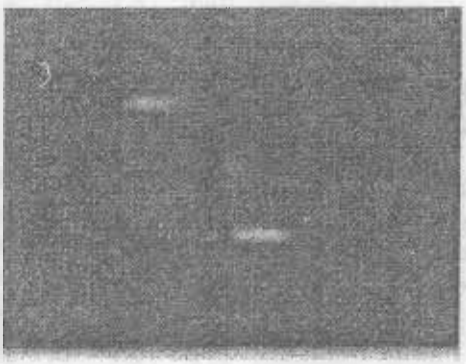
جدول ١: يبين التغيرات المرضية الخلوية Cyto Pathic Effect على خلايا الزرع الخلوي لخلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء

ت	مصدر العينة	التأثير المرضي الخلوي / رقم التمريرة	ظهور فجوات: أجنة مجهضة	ظهور فجوات: عجول	ظهور فجوات: أبقار	تمزق الخلايا: أجنة مجهضة	تمزق الخلايا: عجول	تمزق الخلايا: أبقار	ظهور الطفيلي: أجنة مجهضة	ظهور الطفيلي: عجول	ظهور الطفيلي: أبقار
١	مشيمة	الأولى			-			-			-
		الثانية			-			-			-
		الثالثة			-			-			-
		الرابعة			+			+			-
		الخامسة			+			+			+
		السادسة			+			+			+
٢	دم	الأولى		-	-		-	-		-	-
		الثانية		-	-		-	-		-	-
		الثالثة		-	-		-	-		-	-
		الرابعة		-	-		-	-		-	-
		الخامسة		-	+		-	-		-	-
		السادسة		-	+		-	+		-	+
٣	دماغ	الأولى	-	-		-	-		-	-	
		الثانية	-	-		-	-		-	-	
		الثالثة	-	-		-	-		-	-	
		الرابعة	-	-		-	+		-	-	
		الخامسة	+	-		+	+		-	+	
		السادسة	+	+		+	+		+	+	
٤	القلب	الأولى	-	-		-	-		-	-	
		الثانية	-	-		-	-		-	-	
		الثالثة	+	-		-	-		-	-	
		الرابعة	+	-		+	+		+	-	
		الخامسة	+	+		+	+		+	+	
		السادسة	+	+		+	+		+	+	
٥	العضلات الهيكلية	الأولى	-	-		-	-		-	-	
		الثانية	-	-		-	-		-	-	
		الثالثة	-	-		-	-		-	-	
		الرابعة	-	-		-	-		-	-	
		الخامسة	-	+		+	+		+	+	
		السادسة	+	+		+	+		+	+	

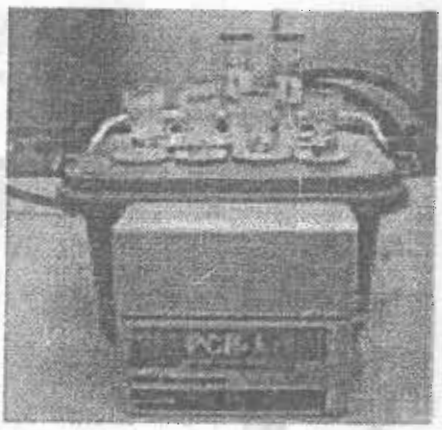
الإشارات التالية (-) عدم ظهور تأثير خلوي ،(+) ظهور تأثير خلوي



شكل (٣) خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء قبل حقنها بالطفيلي.



شكل (٤) ظهور التأثير المرضي الخلوي (الفجوات) في خلايا الزرع الخلوي



شكل (٥) ظهور التأثير المرضى الخلوى
(تمزق الخلايا) فى خلايا الزرع الخلوى

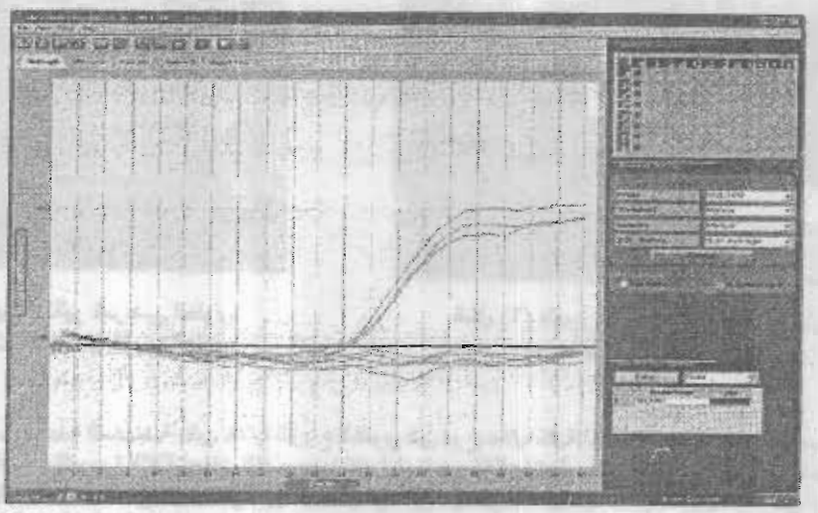
شكل (٦) ظهور الحيوانات التمرعية للطفيلى
فى خلايا الزرع الخلوى

تبين من خلال تنمية أعضاء الأجنة المجهضة على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء أن أول ظهور للتأثيرات المرضية للخلايا كان في التمريرة الثالثة لعينات القلب، بينما كان أول ظهور للتأثيرات المرضية للخلايا في عينات العجول حديثة الولادة كان ذلك للتمريرة الرابعة لعينات القلب والدماغ سويا"، في حين لم يظهر أي تأثير مرضي للخلايا لعينات دم العجول، فيما كان أول ظهور للتأثيرات المرضية الخلوية في التمريرة الرابعة لمشيمة الأبقار ، جدول -٢-.

جدول ٢: يبين عدد التمريرات على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء للأعضاء التي تم جمعها

ت	مصدر العينة	رقم التمريرة	أجنة مجهضة (٢٥)		عجول (١٤)		أبقار (٣٩)	
			عدد العينات الايجابية	عدد العينات السلبية	عدد العينات الايجابية	عدد العينات السلبية	عدد العينات الايجابية	عدد العينات السلبية
١	مشيمة	الأولى	-	-	-	-	٠	٣٩
		الثانية	-	-	-	-	٠	٣٩
		الثالثة	-	-	-	-	٠	٣٩
		الرابعة	-	-	-	-	٧	٣٢
		الخامسة	-	-	-	-	١٠	٢٩
		السادسة	-	-	-	-	١٠	٢٩
٢	دم	الأولى	-	-	٠	١٤	٠	٣٩
		الثانية	-	-	٠	١٤	٠	٣٩
		الثالثة	-	-	٠	١٤	٠	٣٩
		الرابعة	-	-	٠	١٤	٠	٣٩
		الخامسة	-	-	٠	١٤	١	٣٨
		السادسة	-	-	٠	١٤	٢	٣٧
٣	دماغ	الأولى	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثانية	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثالثة	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الرابعة	١	٢٤	٤	١٠	-	-
		الخامسة	٥	٢٠	٤	١٠	-	-
		السادسة	٦	١٩	٥	٩	-	-
٤	القلب	الأولى	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثانية	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثالثة	٢	٢٣	٠	١٤	-	-
		الرابعة	٣	٢٢	١	١٣	-	-
		الخامسة	٤	٢١	٢	١٢	-	-
		السادسة	٤	٢١	٣	١١	-	-
٥	العضلات الهيكلية	الأولى	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثانية	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثالثة	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الرابعة	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الخامسة	١	٢٤	١	١٣	-	-
		السادسة	٣	٢٢	١	١٣	-	-

وعند إجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي باستخدام ثلاث مشرعات للذراري(BPA4،NC-5،Nc1) بينت نتائج الاختبار لمسبر DNA المصمم للمورث NC5 للبوغة الجديدة الكلبية بملاحظة منحنى التألق لدورات تضخيم تفاعل البلمرة، حيث ظهرت النتيجة الايجابية بالارتفاع التدريجي المتزايد لمنحنى التألق ، (شكل ٧).



شكل (٧) يبين نتائج تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي
Real Time PCR

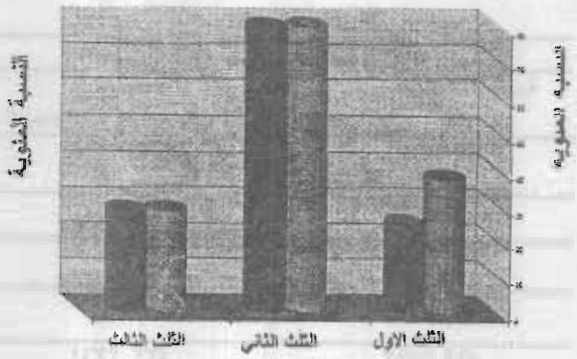
فيما بينت نتائج الكشف عن الدنا للطفيلي في المزارع الخلوية باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي أن أعلى نسبة للإصابة في للمزارع الخلوية المأخوذة من الأجنة ، كانت لعينات الدماغ والعضلات الهيكلية (١٠٠%) ، أما بالنسبة للمزارع الخلوية التي تمت عليها تنمية عينات العجول فبلغ أعلى نسبة إصابة لعينات القلب والعضلات الهيكلية (١٠٠%)، بينما تبين أن عينات مشيمة (٩٠%) التي تم إنمائها على المزارع الخلوية كانت نسبتها أقل مما هو عليه الحال بالنسبة لعينات الدم (١٠٠%)، جدول(٣).

جدول ٣: يبين نتائج تفاعل سلسلة البوليمريز ذات الوقت الحقيقي لخلايا الزرع الخلوي المصابة بالطفيلي

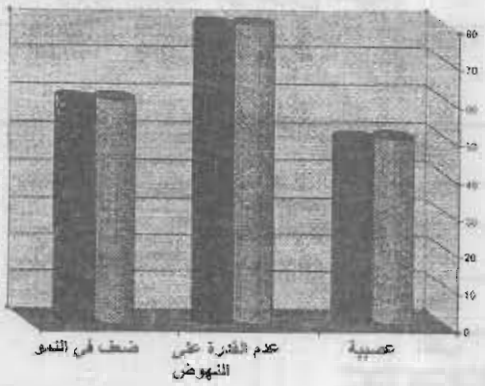
ت	مصدر العينة	أجنة مجهضة		عجول		أبقار	
		عدد العينات الايجابية	النسبة المئوية %	عدد العينات الايجابية	النسبة المئوية %	عدد العينات الايجابية	النسبة المئوية %
١	مشيمة	-	-	-	-	٩	٩٠
٢	دم	-	-	*	*	٢	١٠٠
٣	دماغ	٦	١٠٠	٤	٨٠	-	-
٤	القلب	٣	٧٥	٣	١٠٠	-	-
٥	العضلات الهيكلية	٣	١٠٠	١	١٠٠	-	-

الإشارة التالية (*) عدم حصول نمو على المزارع الخلوية

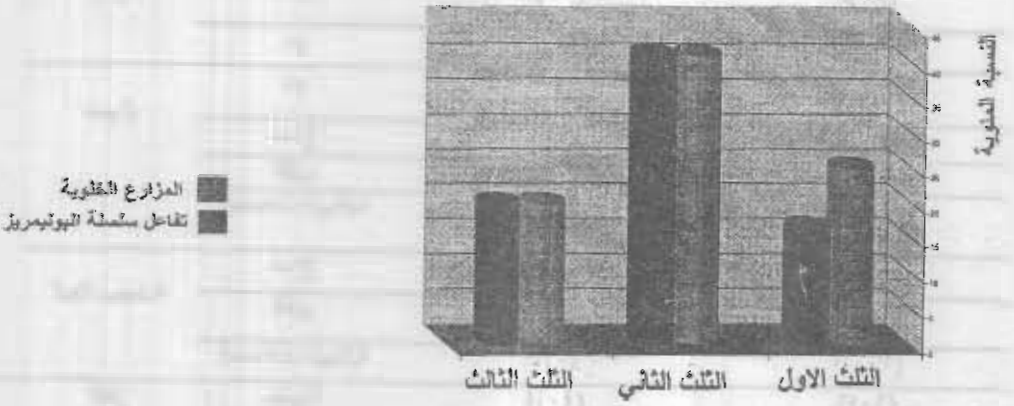
بينت نتائج تنمية الطفيلي في المزارع الخلوية وتشخيصه باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي في الحيوانات المختلفة بالمقارنة مع العلامات المرضية التي تعاني منها ، ظهور أعلى نسبة إصابة في الأجنة المجهضة التي أجهضت في (الثلث الثاني) ، حيث بلغت ٨٠% في كلا الطريقتين (شكل-٨-)، فيما ظهرت اقل نسبة للإصابة في العجول التي عانت من أعراض عصبية حيث بلغت ٥٠%(شكل-٩-) ،أما الأبقار فقد سجلت فيها أعلى نسبة إصابة ٤١,١٧% التي أجهضت في(الثلث الثاني من الحمل) ، (شكل-١٠-)



عمر الإجهاض
الشكل (٨)



الأعراض بعد الولادة
الشكل (٩)



فترة الإجهاض
الشكل (١٠)

الأشكال (٨،٩،١٠) ، تبين نسبة الإصابة بالبوغة الجديدة الكلبية باستخدام المزارع الخلوية واختبار تفاعل سلسلة البوليمريز وعلاقتها بالعلامات المرضية الظاهرة
(شكل-٨- أجنة مجهضة ، شكل-٩-عجول، شكل-١٠-الأبقار)

بينت نتائج تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي للكشف عن ٣ ذراري للبوغة الجديدة الكلبية (BPA4،Nc1،NC-5) وجود الدنا للطفيلي في أنسجة الأبقار للذرية NC-5، حيث سجل أعلى نسبة لها في الدم مقارنة بالمشيمة ، أما الدنا للطفيلي الذي تم الكشف عنه في أنسجة العجول للذرية NC5 فتبين أن أعلى نسبة كان في عينات الدماغ فيما انعدم في عينات الدم والعضلات الهيكلية، في حين بينت نتائج فحص أنسجة الأجنة المجهضة للذرية NC5 إن أعلى نسبة كان في أنسجة الدماغ والعضلات الهيكلية.

فيما أظهرت نتائج فحص الدنا للذرية Nc1 للعينات التي تم أخذها من الأبقار أن أعلى نسبة كان في أنسجة المشيمة وقد انعدمت النتائج في الدم ،فيما بينت نتائج الفحص في أنسجة العجول انعدام وجود الذرية فيما عدا أنسجة القلب، أما أنسجة الأجنة المجهضة تم الكشف عن الدنا للذرية أنفة الذكر فقط في أنسجة الدماغ.

أما بالنسبة للذرية BPA4 فقد تبين من خلال فحص الدنا في أنسجة الأبقار أن أعلى نسبة إصابة لهذه الذرية كانت في الدم مقارنة بالمشيمة، في حين سجلت أعلى نسبة إصابة للذرية BPA4 العجول والأجنة في أنسجة العضلات الهيكلية، جدول -٤-.

جدول ٤: نتائج اختبار تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي يبين أنواع الذراري التي تم عزلها من الأعضاء المختلفة للأبقار ، العجول والأجنة المجهضة في المزارع الخلوية

أسم الذرية	مصدر العينة	نوع العينة	تفاعل سلسلة البوليمريز ذات الوقت الحقيقي	
			عدد العينات الايجابية(النسبة المئوية%)	عدد العينات السلبية(النسبة المئوية%)
NC-5	أبقار	مشيمة	٣(٣٠)	٧(٧٠)
		دم	١(٥٠)	١(٥٠)
	عجول	دم	*	*
		دماغ	٢(٤٠)	٣(٦٠)
		القلب	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
		العضلات الهيكلية	٠(٠)	١(١٠٠)
	أجنة مجهضة	دماغ	٢(٣٣,٣٣)	٤(٦٦,٦٧)
		القلب	١(٢٥)	٣(٧٥)
		العضلات الهيكلية	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
Nc1	أبقار	مشيمة	٢(٢٠)	٨(٨٠)
		دم	٠(٠)	٢(١٠٠)
	عجول	دم	*	*
		دماغ	٠(٠)	٥(١٠٠)
		القلب	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
		العضلات الهيكلية	٠(٠)	١(١٠٠)
	أجنة مجهضة	دماغ	١(١٦,٦٦)	٥(٨٣,٣٤)
		القلب	٠(٠)	٤(١٠٠)
		العضلات الهيكلية	٠(٠)	٣(١٠٠)
BPA4	أبقار	مشيمة	٤(٤٠)	٦(٦٠)
		دم	١(٥٠)	١(٥٠)
	عجول	دم	*	*
		دماغ	٢(٤٠)	٣(٦٠)
		القلب	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
		العضلات الهيكلية	١(١٠٠)	٠(٠)
	أجنة مجهضة	دماغ	٣(٥٠)	٣(٥٠)
		القلب	٢(٥٠)	٢(٥٠)
		العضلات الهيكلية	٢(٦٦,٦٦)	١(٣٣,٣٤)

الإشارة التالية (*) عدم حصول نمو على المزارع الخلوية

DISCUSION
المناقشة

بينت نتائج هذه الدراسة الكشف عن طفيلي البوغة الجديدة الكلبية في محطات الأبقار في سوريا من خلال عزله من أنسجة الحيوانات المصابة على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء ، حيث أظهرت الأنسجة (الدماغ ،عضلة القلب ،العضلات الهيكلية، المشيمة والدم) ، التي تم هضمها بالتربسين والمنتقاة من الحيوانات المصابة (أجنة مجهضة ، عجول مولودة حديثا والأبقار) ، إذ لوحظ نمو على خلايا الزرع الخلوي وبنسب متفاوتة ، حيث أظهرت المزارع الخلوية بعد حقنها بمستخلص النسيج وجود تغيرات مرضية خلوية وازدادت بتقدم التمريرة وفترة ظهورها ، إن هذه الاختلافات تعود لقابلية الذراري للبوغة الجديدة الكلبية للنمو بفترات زمنية مختلفة ، حيث بين (Katarina *et al.*, 2011) ، حصول نمو للذرية (NC-SKB1) ، بعد١١ تمريرة، بينما بين (Sawada *et al.*, 2000) ، حصول نمو للذرية (BT-3) ، بعد ٦ تمريرات. ويمكن تفسير هذا التباين بقابلية كل ذرية لسرعة تكيفها ونموها على خلايا الزرع الخلوي وملائمة نوع الخلايا لها (Gozdzik and Cabaj, 2007) ،وقد تباينت التغيرات المرضية الخلوية في سرعة ظهورها وأشكالها حيث كانت متمثلة بظهور فجوات ، تمزق الخلايا وظهور الحيوانات التسرعية حيث ازدادت بتقدم التمريرة واختلاف الأعضاء والحيوانات ، إن هذه الاختلافات تعود إلى الاختلاف في عدد الحيوانات التسرعية في العينات حيث أنه كلما ازداد عددها زادت سرعة ظهورها إضافة إلى الاختلافات في ضراوة ذراري البوغة الجديدة الكلبية

(Okeoma *et al.*, 2004) ، وقد بينت نتائج الكشف عن الدنا باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي للبوغة الجديدة الكلبية في المزارع الخلوية التي ظهر عليها النمو ، حيث كان بنسبة عالية في أنسجة الأدمغة والعضلات الهيكلية للأجنة المجهضة ،والقلب والعضلات الهيكلية للعجول حديثة الولادة ،بينما كان في الأبقار بنسبة متقاربة في الدم والمشيمة ، إن الاختلاف في نسب ظهور ونمو البوغة الجديدة الكلبية في المزارع الخلوية للأعضاء المختلفة قد يعود لعدة أسباب منها : إن أنسجة المشيمة والأجنة تظهر فيها نسبة إصابة منخفضة نتيجة تعرضها للتلف أو للتحلل الذاتي مما يقلل من فرصة تشخيصها بصورة صحيحة (Collantes *et al.*, 2006) ، بينما بينت دراستنا أن نسبها عالية نتيجة التعامل المباشر والآني مع العينة دون اللجوء إلى حفظها ومعاملاتها بعد فترة زمنية من الحفظ ، فيما بين آخرون (Wisniewski *et al.*, 2002) ، أن نسبة الإصابة تكون متباينة حسب موقع المشرع ونوعه حيث تبين أن المشرع للجين Nc5 يكون ذو حساسية عالية للكشف عن هذا الطفيلي نتيجة عدم تواجده في الاوالي التي تمتلك علاقة مستضدية مع البوغة الجديدة الكلبية(*Toxoplasma gondii, Sarcocystis SPP, Hammondoia hammondi*) ،مما يرفع من دقة التشخيص.

وأظهرت النتائج عدم حصول نمو في عينات الدم للعجول وكذلك تواجد الطفيلي بنسب منخفضة في دم الأبقار، وقد يعود السبب في ذلك إلى مرحلة تطور وانتقال الطفيلي داخل الثوي المتوسط ،حيث أنه يكون بأعداد كبيرة في مرحلة الطفيليمية دون المراحل الأخرى مما يؤثر على نسب الإصابة (Aline *et al.*, 2009) ، وبينت النتائج كذلك وجود الدنا للطفيلي في المزارع الخلوية بنسب عالية ومرتفعة، وقد يعود السبب في ذلك لاستخدامنا أكثر من مشرع للكشف عن ذراري البوغة الجديدة الكلبية ، وهذا يختلف عن ما ذكره (Salehi *et al.*, 2009) ،حيث كانت النسبة منخفضة نتيجة لاستخدامه نوع واحد من المشرعات ، وقد فسر سبب النسب المنخفضة من قبل باحثين آخرين (Medina, 2006) ، باستخدام المشرع ITS1 والذي يمتلك حساسية أقل مما هو عليه حال بالنسبة للذي يتمتع به المشرع Nc5.

بينت نتائج هذه الدراسة العلاقة ما بين الأعراض المرضية و عدد العينات الايجابية لكل من المزارع الخلوية وتفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي، حيث أن هناك تباينا" ما بين المجاميع ، حيث بينت نتائج الفحص للأجنة المجهضة أن أعلى نسبة إصابة لكلا الطريقتين كانت في الأجنة التي اجهضت في (الثلث الثاني) ، وقد يعود السبب في ذلك إلى أن الأجنة في الثلث الأول من الحمل في حال كونها مصابة تكون الإصابة في بداية تكونها وعدد الحيوانات التسرعية فيها قليلا ، في حين أن الأجنة في الثلث الأخير من الحمل تكون الحيوانات التسرعية في أنسجتها قليلة نتيجة قابلية جهازها المناعي لتكوين استجابة مناعية ، بالإضافة إلى الاستجابة المناعية لأجساد أمهاتها مما قد يقلل من تكاثر وانتشار الطفيلي في أنسجتها (Corbellini, 2002) ،أما العجول فكانت أعلى نسبة إصابة في تلك التي أظهرت عدم قدرتها على النهوض مع أعراض تظهر فشلا عضليا وعصبيا، وقد يعود السبب في ذلك لظهور أعراض على هذه العجول ناجمة عن إصابة بالبوغة الجديدة الكلبية فضلا عن ضعف النمو في أجسادها مما قد يساعد في انتشار وتقدم الإصابة (Hemphill *et al.*, 2000) ، أما عند الأبقار فلوحظ أن أعلى نسبة إصابة كانت في أبقار التي اجهضت (الثلث الثاني من الحمل) ، وقد يعود السبب في ذلك إلى دور الإصابة المزمنة حيث أن الإصابة تنشط نتيجة تحطم الأكياس النسجية وتحول الحيوانات البطيئة إلى الحيوانات التسرعية نتيجة لعملية تسمى (Bradyzoites-to-Tachyzoites Reconversion) ، وذلك نتيجة أي خلل في الجهاز المناعي أو الحمل، وإن إعادة تنشيط الإصابة المزمنة يأخذ فترة من الزمن مما قد يقلل من فرصة حدوث الإجهاض في الثلث الأول من الحمل نتيجة الإصابة بالبوغة الجديدة الكلبية (Guy *et al.*, 2001) ، في حين أن الثلث الأخير من الحمل تقل فيه نسبة الإصابة نتيجة للاستجابة المناعية والتي تقلل من أعداد الحيوانات التسرعية في المشيمة (Bergeron *et al.*, 2000).

وقد بينت نتائج الكشف عن أنواع الذراري المعزولة في خلايا الزرع الخلوي والتي جرى الكشف عنها وتصنيفها باستخدام ثلاثة أزواج من المشرعات للذراري (BPA4،Nc1،NC-5) ، باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي وجود تباين في نسب تواجدها في الأعضاء والحيوانات حيث كانت أعلى نسبة للذرية NC-5 في عينات الأبقار التي تم العزل منها، في حين سجلت الذرية BPA4 أعلى نسبة إصابة لكل من العجول والأجنة، إن هذا التباين يعود لعدد أسباب منها،الاختلاف في ضراوة الذراري المسببة للإصابة حيث إن الدراسات لم تثبت إلى حد الآن مدى ضراوة جميع الذراري للبوغة الجديدة الكلبية في الأبقار،وذلك نظرا للكلفة المادية العالية لإجراء ذلك فيما عدا استخدام الحيوانات المخبرية بالإضافة إلى أن للبوغة الجديدة الكلبية قابلية لإصابة أعضاء دون الأخرى ، لكل ذرية حسب خصائصها الحيوية (البيولوجية) والجينية، لذلك فان نسب انتشارها وتواجدها في الأعضاء تكون متباينة (Al-Qassab *et al.*, 2010) ، فيما ذكر آخرون (Alexander *et al.*, 2011) ، أن ذراري البوغة الجديدة الكلبية التي تصيب الكلاب تصيب الأبقار على حد سواء .

وقد أكد (Sager, 2001) أن تشخيص البوغة الجديدة الكلبية يتطلب استخدام أكثر من اختبار، ويتعلق ذلك بمبدأ الحساسية والنوعية للتشخيص .

REFRENCES
المصـــادر

*Alexandre, D.M.; Ana, P.P.J. and Rosangela, Z.M. (2011):*Bovine abortion Associated with *Neospora caninum* : Diagnosis and Epidemiological Aspects of a dairy cattle herd in the Northeast region of Sao Paulo State, Brazil. Brazilian Journal Of Veterinary Parthology, 4(2): 112-116.

Aline, D.C.; Clarice, N.C.; Nara, T.C.; Liria, H.O.; Edviges, M.P. and Claudia, D.F. (2009): Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses Histology, immunohistochemistry, and nested –PCR.Rev Bras Parasitol. Vet., 18(4): 14-19.

Al-Qassab, S.E.; Michael, P.R. and John, T.E. (2010): On the biological and Genetic diversity in *Neospora caninum*. Diversity, 2: 411-438.

Bergeron, N.; Girard, C.; Pare, J.; Fecteau, G.; Robinson, J. and Baillargeon, P. (2000): Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from Seropostive dams giving birth to full-term calves. J. Vet. Diag Invest, 13: 1169-172.

Bjerkas, I.; Mohn, S.F. and Piesthus, J. (1984): Unidentified cyst –forming Sporozoan causing Encephalomyelitis and Myocystitis in dogs. Z Parasitinkd, 70: 271-274.

Collantes, F.E.; Rodriguez, B.A.; Arnaiz, S.I.; Moreno, B.; Aduriz, G. and Ortega, L. (2006): Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* Distribution parasite loads and lesion in aborted bovine fetuses. Theriogenology, 10: 629-641.

Corebellini, L.C. (2002): Neosporosis as acause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern braail. Veterinary Parasitology, 103(3): 195-202.

Dubey, J.P.; Schares, G. and Ortega-Mpra, L.M. (2007): Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clinical Microbiology Review, 20(2): 323-367.

Esther, C.F.; Angel, Z.; Gema, A.G. and Luis, M.O. (2002): Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimental Infected Mice by Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiolog, 40(4): 1194-1198.

Gozdzik, K. and Cabaj, W. (2007): Characterization of the first Polish isolate of *Neospora caninum* from cattle. Acta Parasitologica, 52: 295-297.

Guy, C.S.; Williams, D.J.L.; Kelly, D.F.; McGarry, J.W.; Guy, F.; Bjorkman, C.; Smith, R.F. and Trees, A.J. (2001): Neospora caninum in persistently Infected pregnant cows spontaneous transplacental infection is Associated: with an acute increase in maternal antibody. Vet. Rec., 149: 443-453.

Habibi, G.R.; Hashemi, F.R.; Sadrebazzaz, A.; Bozorgi, S. and Bordbar, N. (2005): Seminested PCR for diagnosis of *Neospora caninum* infection in Cattle. Arch Razi Ins, 59: 55-64.

Hemphill, A.; Gottstein, B. and Conraths, F.J. (2000): A European perspective on *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol, 30: 877-924.

Jessica, S.K.; Bronwyn, M.; Derek, S.S.; Scott, A.L.; Lada, H.H.; Ashile, H.; Sarwat, E.L.; John, T.E. and Jan, S. (2011): Extensive production of *Neospora caninum* tissue cysts in a carnivorous marsupial Succumbing to experimental neosporosis.Vet. Res., 42(1): 75-86.

Katarina, R.; Silvia, S.; Andrea, C. and Rastislav, M. (2011): First in vitro Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected adult dairy Cow in Slovakia. Acta Parasitologica, 56(2): 111-115.

Masumi, S.; Hisayo, K.; Yukiko, T.; Chun-Ho, P.; Takehito, M.; kinori, S.; and Takashi, U. (2000): Isolation of *Neospora caninum* from The brain of a naturally infected adult dairy cow. Veterinary Parasitology, 90: 247-252.

Medina, L. (2006): Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in Aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. Veterinary Parasitology, 136(4): 187-191.

Nathalie, V. (2003): Hiding inside the host: Development and application of *Neospora caninum* bradyzoites in vitro culture. PhD Thesis, University of Basel, Germany, PP: 29-34.

Norbert, M.; Nathalie, V.; Christian, G.; Stephen, L.L. and Andrew, H. (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. Clinic Microbiology, 40(1): 252-255.

Okeoma, C.M.; Williamson, N.B.; Pomroy, W.E.; Stowell, K.M. and Gillespite, L.M. (2004): Isolation and molecular characterization of *Neospora caninum* In cattle in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal, 52: 364-370.

Rai, A. (2008): Laboratory manual of cell culture and animal virology, Indian Veterinary research Institute, India, PP: 8-12.

Sager, H. (2001): A Swiss case –control study to assess *Neospora caninum* Associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. Veterinary Parasitology, 102(1): 1-15.

Salehi, N.; Haddadzadeh, H.; Ashrafihelan, J.; Shayan, P. and Sadrebazzaz, A. (2009): Molecular and pathological study of bovine aborted fetuses And placenta from *Neospora caninum* infected dairy cattle. Iranian J. Parasitol, 4(3): 40-51.

Sawada, M.; Kondo, H.; Tomioka, Y.; Park, C.H.; Morita, T.; Shimada, A. and Umemura, T. (2000): Isolation of *Neospora caninum* from the Brain a naturally infected adult dairy cow. Veterinary Parasitology, 90: 247-252.

Timothy, V.B.; Lawrence, J.C.G.; Maureen, T.L. and Bruce, A.M. (1999): Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissue from Spontaneous bovine abortions. Journal of Clinical Microbiology, 37(12):4059-4064.

Yamane, I.; Kokuho, T.; Shimura, K.; Eto, M.; Shibahara, T.; Haritani, M.; Ouchi, Y.; Sverlow, K. and Conrad, P.A. (1997): In Vitro isolation and Characterization of a bovine *Neospora* Species in Japan. Res. Vet. Sci., 63: 77-80.

Wisniewski, M.; Cabaj, W.; Moskwa, B. and Wedrychowicz, H. (2002): The First detection of *Neospora caninum* DNA in brains of calves in Poland. Acta Veterinaria, 52(6): 393-400.