

Dept. of Microbiology,
Faculty of Veterinary Medicine,
Al-Baath University, Syria Arab Republic.

EXPERIMENTAL INFECTION STUDY OF *NEOSPORA* *CANINUM* STRAINS IN MICE

(With 5 Tables and 8 Photos)

By

W.A. AL-OBAIDII; M.M. KATRANJI and A. AL-KHALED

(Received at 15/12/2011)

دراسة الخمج التجريبي بذراري البوغة الجديدة الكلبية في الفئران

وسن أمجد العبيدي ، محمد محسن قطرنجي ، عبد الكريم الخالد

تم إجراء إصابة تجريبية بفئران مخبرية (سويسرية بيضاء) بالحيوانات التسرعية لذراري البوغة الجديدة الكلبية (NC-5, Nc1, BPA4) ، والمنماة مسبقا على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القروذ الأفريقية الخضراء وذلك لغرض معرفة مدى أمراضية هذه الذراري ولدراسة الأعراض المرضية والتغيرات النسجية التي تحدثها ، حيث تم حقن الطفيلي في التجويف الصفاقي ومن ثم تم مراقبة الحيوانات لمدة ٩٠ يوما بعد الحقن، وتم جمع عينات (الدم، الدماغ ، العضلات الهيكلية، القلب) من الفئران بفترات متباينة لتشخيص وجود الطفيلي باستخدام المزارع الخلوية وتفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي والمقاطع النسجية ، مع ملاحظة الأعراض السريرية الظاهرة على الحيوانات المصابة تجريبيا. تبين من خلال النتائج ظهور أعراض مرضية متمثلة (خشونة في الشعر ، تحذب الجسم ، فقدان الوزن ، علامات عصبية مثل ميلان الرأس وضعف في الحركة)، حيث كانت هذه الأعراض متباينة حسب نوع الذرية ، حيث ظهرت بفترات مبكرة للذريتين NC-5، BPA4 مقارنة بالذرية Nc1 ، وقد بينت نتائج تنمية الطفيلي من الأعضاء التي تم جمعها من الفئران المحقونة بالذراري تبينا في التغيرات المرضية الخلوية على خلايا الزرع الخلوي ، حيث ظهرت التغيرات في التمريرة الثالثة لكل من NC-5، BPA4 مقارنة بالذرية Nc1 التي ظهرت فيها التغيرات في التمريرة الرابعة وبمعايير مرتفعة للذرية BPA4 مقارنة بالذريتين الاخرتين ، كما تبين ظهور الطفيلي في خلايا الزرع الخلوي في عينات الدم بعد ١٤ يوما من الإصابة للذرية NC-5 مقارنة بباقي الذراري والأعضاء ، وبينت نتائج تفاعل سلسلة البوليميريز وجود نتائج ايجابية في المزارع الخلوية وبصورة مبكرة للذريتين NC-5، BPA4 مقارنة بالذرية Nc1 . فيما أظهرت المقاطع النسجية وجود الأكياس النسجية مع استكفاف وعائي ووجود بؤر لتجمعات الخلايا الدبقية ، فقدان اللبد العصبي مع ارتشاح خلايا أحادية النواة في الدماغ ، أما في

العضلات الهيكلية فتبين وجود الخلايا اللمفاوية والبلازمية وبعض الخلايا البلعمية ، بينما اظهرت المقاطع النسجية للقلب وجود ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية المتمثلة بالخلايا اللمفاوية والبلازمية، حيث ظهرت هذه الأفات بفترات زمنية متأخرة مقارنة بالمزارع الخلوية وتفاعل سلسلة البوليمريز.

SUMMARY

In order to investigate the pathogenicity, histopathological changes and clinical signs in white Swiss mice infected intraperitoneally with 3 different strains (NC-5, BPA4 and Nc1) of *Neospora caninum*, mice were kept under observation for 90 days after infection. The samples (blood, brain, skeletal muscle and heart) were collected at different times for diagnosis of the parasite by using Tissue culture (Vero cell, Real Time PCR and Histological sections) with observation of the clinical signs. The results showed clinical signs which manifested coat roughening, body hunching, weight loss, head tilting and impaired movement which were variable according to strain. The earlier signs appear in mice infected with NC-5 and BPA4 when comparison with mice infected with Nc1, the result of propagation of parasite from the organs collected from infected mice showed variation in Cyto Pathic Effect (CPE) in vero cell, the CPE appear in the 3rd passage in BPA4 and NC-5 when comparison with Nc1 (4th) passage with higher titer in BPA4 when compared with other strains, the parasite appear in the blood sample in vero cell after 14 days of infected mice with NC-5 strain, the Real Time PCR result showed appearance of positive reaction in the infected cells culture infected with NC-5 and BPA4 strains. The histopathological changes appear presence of tissue cyst with prevascular cuffing and aggregation of glial cell, loss of Neuropil and infiltration of mononuclear cell in brain, the skeletal muscle showed presence of lymphocytes and plasma cell with some macrophage, the heart section showed heavy infiltration by inflammatory cells (plasma cell and lymphocytes), this histopathological changes appear delayed when compared with tissue culture and Real Time PCR.

Key words: *Neospora caninum*, mice, experimental infection.

INTRODUCTION

المقدمة

تعد البوغة الجديدة الكلبية من الاوالي الطفيلية التي تعيش داخل الخلايا ، ويصيب هذا الطفيلي الكلاب التي تعد ثويا " نهائيا" والابقار التي تعتبر ثويا "متوسطا"، وتسبب البوغة الجديدة الكلبية خسائر اقتصادية في الأبقار نظرا لما تسببه من فقدان في الأجنة نتيجة الإجهاض وموت العجول حديثة الولادة ، وقلة في إنتاج الحليب (Dubey *et al.*, 2007)، بالإضافة إلى ذلك تصيب البوغة الجديدة الكلبية حيوانات أخرى مثل الجاموس، الغزلان ، الأغنام ، الماعز والقيوط ، أما الحيوانات المخبرية فتختلف درجة حساسيتها للإصابة تبعا لنوعها، تعتبر الفئران المخبرية من أكثر الحيوانات الحساسة للإصابة التجريبية ومع تنوعها تختلف مدى قدرة البوغة الجديدة الكلبية لإحداث آفات مرضية فيها ، تعد الفئران السويسرية البيضاء والفئران العارية *Nude mice* من أكثر الأنواع حساسية للإصابة ، وهكذا فإن الفئران من أهم الحيوانات المخبرية المستخدمة لدراسة البوغة الجديدة الكلبية من عدة نواحي منها : ضراوة الذراري ، آلية حدوث المرض ، ودراسة مدى مقدار الحماية التي يوفرها اللقاح ضد الطفيلي ، حيوية الطفيلي، ودراسة الانتقال العمودي للاخماج اضافة الى دراسة مدى نجاح العلاجات ضد الطفيلي، وكذلك الدراسات المناعية والدراسات النسجية (Beck *et al.*, 2009) . وتعتمد شدة العلامات المرضية والآفات التي تسببها البوغة الجديدة الكلبية في الفئران على عدة عوامل منها: الاختلاف في ضراوة الذراري ، جرعة الخمج ، عدد التمريرات المستخدمة في إنماء الطفيلي على خلايا الزرع الخلوي قبل الحقن (الخمج التجريبي) (Collantes-Fernandez *et al.*, 2006)، تتمثل العلامات المرضية بخشونة في الشعر *coat roughening* ، وتحذب الجسم *body hunching* ، وفقدان الوزن *weight loss* ، وعلامات عصبية مثل ميلان الرأس *head tilting* ، ضعف في الحركة *impaired movement* ، أو أن تكون حركة الحيوان دائرية *Circling*، وشلل في الأطراف الخلفية *paralysis* وموت في الحيوانات والتي يمكن أن تظهر على الفئران خلال (ن ١٤-٣٠) يوما (Quinn *et al.*, 2002) ، أما الآفات المرضية التي يمكن أن تسببها الإصابة فتتمثل بالتهاب الدماغ *Encephalitis* ، التهاب رئوي *Pneumonia* ، التهاب العضلات *Myositis*، التهاب البنكرياس *Pancreatitis* والتهاب الجذور والأعصاب *(Collantes-) Radiculoneuritis* (Fernandez *et al.*, 2004) ، وتتباين هذه الآفات والأعراض حسب الذرية المستخدمة في الخمج الجريبي وضراوتها ، إذ إن ضراوة ذراري البوغة الجديدة الكلبية لم تعرف جميعا بعد (Hemphill *et al.*, 2006) ، إلا أن باحثين ذكروا وجود ذراري للبوغة الجديدة الكلبية ضعيفة الضراوة مثل (NC3، NC-NOWRA، NC-، NC-، Spain 1H ، Nc3،Nc2) في حين عدت الذراري (Nc1 ، NC-5، BPA4، NC-، NC-Liverpool، BPA1) ذراري مرتفعة الضراوة (Barber *et al.*, 1995) ، وبالرغم من الدراسات التي توضح الاختلافات في ضراوة هذه الذراري إلا أن الجدل

القائم هو عن مدى قدرتها على إحداث الامراضية ونوعها في الحيوانات المختلفة (Rojo-Montejo *et al.*, 2009).

وانطلاقا مما ورد أنفا" فقد هدفت هذه الدراسة إلى إجراء خمج تجريبي بالفئران المختبرية بذراري الطفيلي (BPA4,NC-5,Nc1) للتعرف عن الأعراض المرضية ، والآفات النسجية بالإضافة إلى إعادة عزل الطفيلي منها لمعرفة وقت ظهوره في الأعضاء المختلفة وتشخيصه باستخدام اختبار تفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي.

MATERIALS and METHODS

المواد وطرائق البحث

١- **حيوانات التجربة:** تم تربية عدد من الفئران من نوع Swiss White mice بعد التأكد من خلوها من الطفيلي، ومن ثم تم إكثارها وانتقاء ٨٠ أنثى فأر مخبري بعمر ٦ أسابيع ، اقسمت هذه الفئران إلى ٤ مجموعات كل منها ٢٠ فأرا" ووضعت كل مجموعة منها ضمن قفص تربية مخصص لها .

٢- **الطفيلي:** تم الحصول على ثلاثة ذراري للبوغة الجديدة الكلبية من الباحث (العبيدي وآخرون، ٢٠١١) ، والتي تضمنت (NC-5,Nc1,BPA4) ، حيث عزلت من قبل الباحث أنف الذكر على خلايا الزرع الخلوي لخلايا كلية القروود الأفريقية الخضراء Vero cell ، شخضت وصنفت ضمن اختبار تفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي وباستخدام ثلاث مشرعات للذراري المذكوره سابقا.

٣- **الخمج التجريبي:** تم حقن كل مجموعة بذرية واحدة عن طريق الحقن بالتجويف الصفاقي Intraperitoneally بجرعة قدرها (2×10^5 / ٢٠٠ مايكروليتر) من الحيوانات التسرعية لكل فأر ، بينما حقنت المجموعة الرابعة وبنفس الطريقة بدائرة فوسفات معقمة إذ كونها مجموعة شاهد ، وخضعت الفئران تحت المراقبة لمدة ٩٠ يوما" بعد الحقن وذلك بهدف ملاحظة أية أعراض مرضية أو حصول موت فيها (Chantal *et al.*, 2004).

٤- **جمع العينات:** تم جمع العينات من مجموعات الفئران بإجراء الصفة التشريحية لفأرين تظهر عليهما أعراضا" مرضية في الأيام (٠,٧,١٤,٢١,٢٨,٦٠,٩٠) بعد الحقن ، وقد تضمنت العينات (عينات دم وضعت في أنابيب حاوية على الهيبارين أضيف لها حجم مماثل من الفايكول ومن ثم وضعت في جهاز المثقلة ٢٠٠٠ دورة /دقيقة، بدرجة حرارة ٤ م ه ، لمدة ١٠ دقائق سحبت طبقة الخلايا للمفاوية (Buffy Coat) وحفظت في ٤ م ه حتى إجراء إنماء الطفيلي) ، والأعضاء (الدماغ، القلب، العضلات الهيكلية) ، وتم ملاحظة الآفات العيانية الظاهرة على الأعضاء ومن ثم قسمت إلى نصفين ، النصف الأول: أخذ جزء من كل من هذه الأعضاء بمقدار ١ غرام ووضعت في محلول دائرة فورمالين ١٠% لغرض الفحص النسيجي المرضي ، في حين احتفظ بالجزء الثاني في زجاجات معقمة معدة مسبقا لهذا الغرض حيث تكون

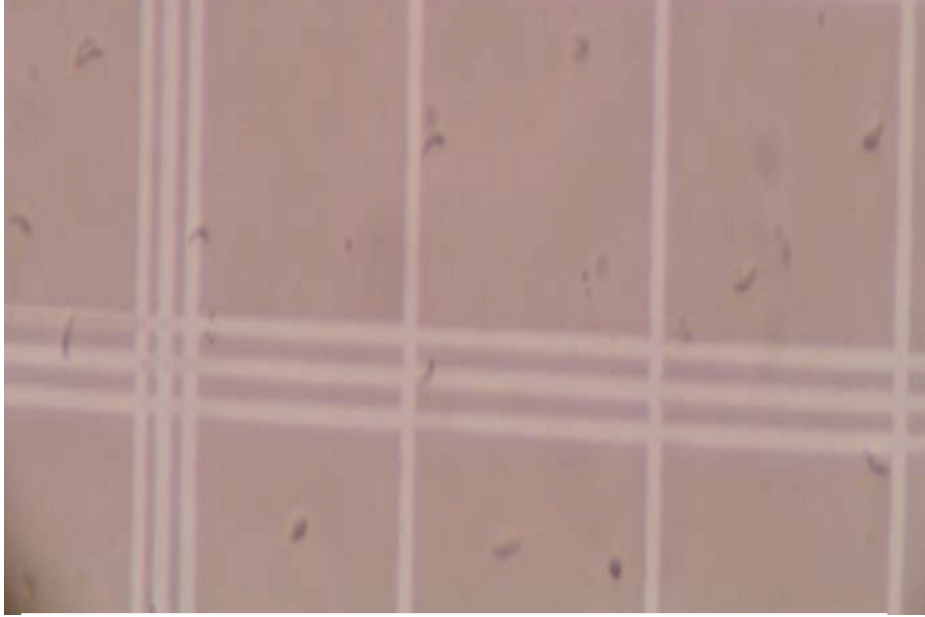
محتوية على محلول دارئة الفوسفات (PBS) متعادل والحاوي على ١٠٠ وحدة دولية / ١ مل من البنسلين ج (Penicillin G) ، الستربتومايسين بمقدار ٥٠ مايكرو غرام/ ١ مل (Streptomycin) ، وسلفات الجنتاميسين Gentamicine Sulfate بمقدار ٥٠ ملغم/لتر وصادات فطور متمثلة امفوتريسين ب Amphotericin B بمقدار ٢.٥ ملغم/ لتر وذلك لغرض عزل الطفيلي على خلايا الزرع الخلوي (Masumi *et al.*, 2000).

٥- عزل الطفيلي: تم أخذ ١ غرام من الأعضاء المضاف إليها محلول دارئ الفوسفات الحاوية على الصادات الحيوية ولكل عضو على حده ، وقطعت في هاون خزفي معقم إلى قطع صغيرة باستخدام مقص جراحي معقم ، ونقلت العينة بعد ذلك إلى أنبوبة زجاجية معقمة، أضيف إليها ٢ مليلتر من محلول دارئة حاوي على ٠.٢٥% تريبسين و ٠.٢٥% من ملح EDTA (Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid) ، ووضعت الأنبوبة فوق المجانسة لستة مرات ، كل مرة لمدة ٢ دقيقة، حيث حضنت بدرجة ٣٧ م ه ، ثم وضع المزيج في أنابيب معقمة ووضعت في جهاز المثقلة المبردة ٢٠٠٠ دورة/دقيقة ٤ م ه لمدة ١٠ دقائق ، وتم التخلص من الراشح وتم إضافة ٢ مليلتر من الوسط الزراعي للنمو MEM (Minimal Essential Media) إلى الراسب ، وتم مزجهما جيدا ومن ثم وضع المزيج في جهاز المثقلة، وتم إعادة هذه العملية ثلاث مرات لغرض غسل الراسب ومن ثم علق الراسب في ١٠ مليلتر من الوسط الزراعي للنمو MEM ليحفظ في ٤ م ه لحين إجراء الإنماء على خلايا الزرع الخلوي (Nathalie, 2003).

٦- 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 في دمشق ، وتم إنماءها وإكثارها لغرض إنماء الطفيلي.

٧- 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 جنين القرود الخضراء الأفريقية ومن ثم حضنت لمدة ٤ ساعات بدرجة ٣٧ م ه وضع المزيج في أنابيب معقمة في جهاز المثقلة بمعدل ٢٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة 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) الحاوي على ١٠% مصل جنين بقري و ١٠ غرام من مرق التربتوز الفوسفاتي/لتر Tryptose phosphate broth والكلوتامين Glutamine ٠.٨٥٤ غرام/لتر ، بيكاربونات الصوديوم ١.٥ غرام/لتر ، بنسلين ج ١٠٠ وحدة دولية/١ مل والستربتومايسين ١٠٠ مايكرو غرام/ ١ مل وسلفات الجنتاميسين Gentamicine Sulfate بمقدار ٥٠ ملغم/لتر وصادات فطور من امفوتريسين ب Amphotericin B بمقدار ٢.٥ ملغم/ لتر ، وتم تحضين الخلايا في

٣٧ م ه ، ٥% CO₂، وتم مراقبة الخلايا يوميا بفحصها تحت المجهر المعكوس ، ويراعى استبدال الوسط كل ٥ أيام وبعد ذلك يتم حصاد الطفيلي باستخدام المكشطة الخاصة بإزالة الخلايا ومن ثم يتم وضع الوسط الحاوي على الطفيلي في أنبوبة معقمة ويثقل ٢٠٠٠ دورة /دقيقة ٤ م ه لمدة ١٠ دقائق، ويهمل الراشح ويعلق الراسب في ١ مليلتر من دارئة فوسفات معقمة ويمرر السائل في محقنة طبية معقمة سعة ١ مليلتر وذات إبرة رفيعة ، ومن ثم يوضع السائل في المثقلة بمعدل ٥٠٠ دورة /دقيقة لمدة ١٠ دقائق ٤ م ه ويهمل الراسب ومن ثم يتم تعداد كمية الحيوانات التسرعية في الراشح باستخدام شريحة تعداد كريات الدم الحمر (شكل-١) ، حيث يتم إجراء تمريره واحدة كل ٢٠ يوما من التحضين ولسته تمريرات.



شكل ١ : يبين الحيوانات التسرعية في شريحة عد كريات الدم الحمر

- ٨- استخلاص ألدنا DNA Extraction: تم إجراء استخلاص ألدنا حسب تعليمات الشركة المصنعة للعتيدة (OMEGA bio kit).
- تحضير المحاليل:
 - * تحضير أنزيم البروتيناز K: تم إذابة الأنزيم والبالغة كميته ١٢٠ ملغم في ٤.٨ مليلتر من دارئة حفظ أنزيم البروتيناز Proteinnase storage buffer.
 - * تحضير دارئة الغسل SPM Wash buffer: تم إضافة ٤٢ مليلتر من الايتانول المطلق ١٠٠% إلى ٦٠ مليلتر من دارئة الغسل لتكون جاهزة للاستخدام.

* تحضير دائرة MP: تمت إضافة ٦٠ مليلتر من الايتانول المطلق ١٠٠% إلى ٤٠ مليلتر من دائرة MP لتكون جاهزة للاستخدام.

- استخلاص ألدنا للطفيلي DNA من المزارع الخلوية:

تم حصاد الخلايا من حوجلة الزرع الخلوي باستخدام مكشطة الخلايا المطاطية cell scraper، وتم غسل الخلايا ثلاث مرات باستخدام محلول دائرة الفوسفات البارد (٤م ه)، وتم تعليقها في دائرة الفوسفات البارد (٤ م ه) ١٨٠ مايكروليتر، ثم أضيف ٢٠ مايكروليتر من إنزيم بروتييناز K (Proteinase K) (25 mg /ml)، ومزج جيدا وحضن في الحمام المائي الهزاز ٥٥ م ه لمدة ١٠ دقائق، ثم نقلت العينة في أنابيب ايندورف Eppendorf حجم ١.٥ مليلتر معقمة، وتم إضافة ٢٠٠ مايكروليتر من دائرة MSL ومزج جيدا وحضن ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٧٠ م ه، ثم ترك الأنبوب في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق، وأضيف الايتانول المطلق ١٠٠% بمقدار ٢٦٠ مايكروليتر مع إضافة ١٠ مايكروليتر من الجزيئات المغناطيسية – Mag Bind Particules و ١٠ مايكروليتر من دائرة LPA مزج جيدا وحضن لمدة ٥ دقائق في درجة حرارة الغرفة، وبعد ذلك وضع الأنبوب فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق، تم إزالة السائل الراشح باستخدام ماصة دقيقة، وإضافة ٤٠٠ مايكروليتر من دائرة MP ومزج جيدا ثم حضن لمدة ٣ دقائق في درجة حرارة الغرفة ووضع الأنبوب فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق وتم التخلص من الراشح باستخدام ماصة دقيقة وأضيف ٤٠٠ مايكروليتر من محلول دائرة 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 بدائرة الغسل SPM Wash Buffer ٤٠٠ مايكروليتر، وتم التأكد من خلو الأنبوبة من أي كمية من الراشح وأضيف دائرة الشطف Elution Buffer ٢٠٠ مايكروليتر لشطف ألدنا عن الجزيئات المغناطيسية مع مراعاة المزج الجيد ومن ثم حضنت ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة، وضعت الأنبوبة بعدها فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق وسحب الراشح الحاوي على جزيئات ألدنا المستخلصة ونقل إلى أنبوبة ايندورف Eppendorf حجم ١.٥ مليلتر معقمة أخرى، وحفظ الأنبوب في -٧٠ م ه لحين إجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليميريز عليه.

٩- تفاعل سلسلة البوليميريز -ذو الوقت الحقيقي Real Time PCR

تم استخدام العتيدة المنتجة من قبل شركة (Genekam Biotechnology AG Germany) والتي تعتمد على صبغات ومضائية Fluorogenic بنوعين هما:

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

٩-١- المحاليل والمواد المستخدمة في تفاعل البوليميريز

عبارة عن مزيج تفاعل يحتوي على كل مكونات التفاعل مع المشروعات وقالب ألدنا المراد اختباره، ويتكون مزيج التفاعل لكل عينة حجم ٢٥ ميكرو لتر من المواد التالية:

ت	اسم المادة	الكمية (ul)	التركيز النهائي
-١	10X PCR Buffer	٢.٥	1X
-٢	dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, & dTTP)	0.5	200uM
-٣	Mgcl2	٣.٢٥	1.5mM
-٤	Taq DNA-Polymerase	0.125	2.5 units
-٥	Dyes	0.25	100nM
-٦	Primer A	٠.٢	800nM
-٧	Primer B	٠.٢	800nM
-٨	DNA Template	٥	-
-٩	RNA Free Water	١٢.٩٧٥	-

٢-٩- المشرعات أو البادئات: Primers

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

ت	اسم الذرية	تسلسل البادئة الوراثي ٣'-٥'	الحجم (bp)
١	NC-5	'٣CACAAGTCGCACGGAGGTCA'٥ '٣AAGGAGAACGCTTCGTAACAA'٥	٧٦
٢	BPA-4	'٣CACACACTTGCCCACTTGGCTCCCT'٥ '٣ACCATCGCCACTCTCCACCCTATGCAC'٥	٣٣٧
٣	Nc1	'٣AATGTCCTAACCTGCGTGACCC'٥ '٣TCTTCTGCATCCAACCTGACCGCTC'٥	٣٢٧

٣-٩- خطوات عمل تفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي:

أجري اختبار تفاعل البوليميريز المتسلسل المتعدد حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Esther *et al.*, 2002)، حيث اجري الاختبار في حجم تفاعل كلي من ٢٥ ميكرو لتر داخل أنابيب سعة ٢٠٠ ميكرو لتر وأضيف إليها ٠.٢ ميكرو لتر من كل بادئ من البادئات Primers و٥ ميكرو لتر من قالب ألدنا DNA Template وباقي الحجم من محلول مزيج التفاعل الجاهز Master mix الحاوي على جميع مكونات التفاعل باستثناء البادئات وقالب ألدنا. وبعد ذلك وضعت الأنابيب في المبلمر الحراري (Thermocycler). وأجريت عملية التضاعف Amplification بواسطة جهاز المبلمر الحراري المبرمج على خمسين دورة بعد خطوة المسخ Denaturing ٩٥م لمدة ١٠ دقائق. كل دورة شملت مسخ عند درجة حرارة ٩٤م لمدة خمسة ثواني ٢٥ دورة، ارتباط Annealing البادئ أو المشرع بدرجة ٦٠م لمدة ١٥ 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.

١- الفحص النسيجي المرضي:

تم إجراءه حسب الطريقة التي ذكرها (Shibahara et al., 1999) ، باستخدام صبغة الهيماتوكسلين والايوسين.

RESULTS

النتائج

١- العلامات المرضية :

تبين من خلال مراقبة مجاميع الفئران لمدة ٩٠ يوما والتي خمدت بذراري البوغة الجديدة الكلبية ظهور أعراض مرضية مختلفة متمثلة (خشونة في الشعر coat roughening ، تحذب الجسم body hunching ، فقدان الوزن weight loss ، علامات عصبية مثل ميلان الرأس head tilting وضعف في الحركة impaired movement) (الأشكال ١، ٢، ٣) وذلك حسب نوع الذرية التي تم بها الخمج التجريبي بالإضافة إلى حصول موت لبعض الفئران ، أما مجموعة الشاهد والتي تم إعطاءها دائرة الفوسفات فلم يظهر عليها أي أعراض مرضية. جدول-١-.

جدول ١: يبين الأعراض المرضية الظاهرة على مجاميع الفئران المحقونة بذراري البوغة الجديدة الكلبية

الذرية	الأيام	٠	٧	١٤	٢١	٢٨	٦٠	٩٠
NC-5	الأعراض المرضية							
	خشونة في الشعر	-	-	+	+	+	+	+
	تحذب الجسم	-	-	-	+	+	+	+
	فقدان الوزن	-	-	-	+	+	+	+
	علامات عصبية	-	-	-	-	+	+	+
الموت	-	-	-	+	+	-	-	-
Ne1	خشونة في الشعر	-	-	-	+	+	+	+

+	+	+	-	-	-	-	تحذب الجسم	
+	+	+	+	-	-	-	فقدان الوزن	
-	+	-	-	-	-	-	علامات عصبية	
-	-	+	-	-	-	-	الموت	
+	+	+	+	+	-	-	خشونة في الشعر	BPA4
+	+	+	+	-	-	-	تحذب الجسم	
+	+	+	-	-	-	-	فقدان الوزن	
+	+	-	-	-	-	-	علامات عصبية	
-	-	-	+	-	-	-	الموت	

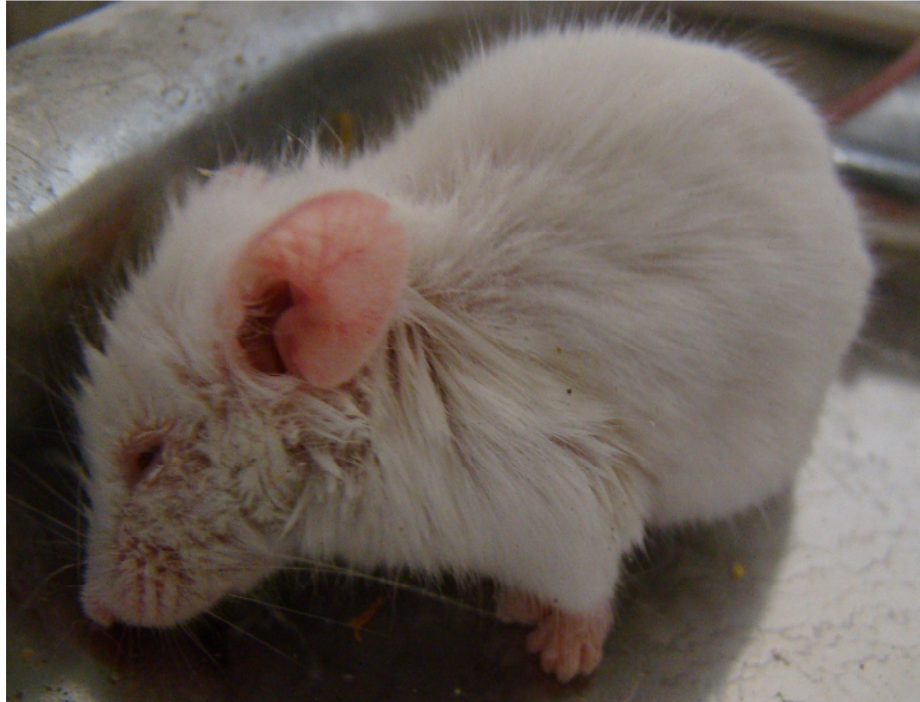
العلامات التالية تعني (-) عدم ظهور الأعراض المرضية المبينة، (+) ظهور الأعراض المرضية المبينة



شكل ١: يبين الضعف العام وخشونة الشعر في الفئران المحقونة بالطيفيلي



شكل ٢: يبين تحذب الظهر في الفئران المحقونة بالطفيلى



شكل ٣: يبين ميلان الرأس في الفئران المحقونة بالطفيلى

٢-تنمية الطفيلي:

بينت نتائج تنمية الأعضاء المختلفة لمجاميع الفئران التي حققت بالذراري الثلاثة على خلايا الزرع الخلوي ، ظهور أفات مرضية خلوية وتمريرات متباينة حسب العضو والذرية ، حيث بينت النتائج ظهور فجوات في خلايا الزرع الخلوي للذريتين NC5 و BPA4 ابتداء من التمريرة الثالثة ، أما الذرية Nc1 فظهرت الفجوات في خلايا الزرع الخلوي وذلك في التمريرة الرابعة ، أما التمزق في الخلايا فظهر في التمريرة الرابعة للذريتين NC5 و BPA4 ، في حين ظهر الطفيلي في التمريرة الرابعة للذريتين NC5 و BPA4 ، وفي التمريرة الخامسة للذرية Nc1 ، وبين معيار الذرية وجود ارتفاعا "متباينا" بين الذراري حيث كان أعلى معيار للذرية NC5 ابتداء في التمريرة الرابعة ، تليه الذرية BPA4 ، في حين كان اقل معيار للذرية Nc1 ابتداء من التمريرة الخامسة ، جدول-٢.-

جدول ٢: يبين التغيرات المرضية الخلوية Cyto Pathic Effect على خلايا الزرع الخلوي لخلايا كلية أجنة القروود الأفريقية الخضراء المحقونة بالذراري الثلاثة

الذرية	الأثر المرضي الخلوي التمريرة	ظهور فجوات	تمزق الخلايا	ظهور الطفيلي	معيار الذرية/٢٠٠ مايكروليتر
NC5	الأولى	-	-	-	-
	الثانية	-	-	-	-
	الثالثة	+	-	-	-
	الرابعة	+	+	+	2×10^2
	الخامسة	+	+	+	2×10^3
	السادسة	+	+	+	2×10^5
Nc1	الأولى	-	-	-	-
	الثانية	-	-	-	-
	الثالثة	-	-	-	-
	الرابعة	+	-	-	-
	الخامسة	+	+	+	2×10^2
	السادسة	+	+	+	2×10^3
BPA4	الأولى	-	-	-	-
	الثانية	-	-	-	-
	الثالثة	+	-	-	-

2×10^3	+	+	+	الرابعة
2×10^4	+	+	+	الخامسة
2×10^6	+	+	+	السادسة

بينت نتائج الكشف عن الطفيلي في المزارع الخلوية بعد حقنها بأعضاء الفئران المصابة بالذراري الثلاث ، حيث تبين وجود للطفيلي للذرية NC5 في الدم بعد (١٤, ٢١, ٢٨) يوما من الحقن، بينما لوحظ وجوده في بقية الأعضاء (الدماغ ، القلب والعضلات الهيكلية) بعد ٢٨ يوما من الحقن ، كما لوحظ وجود الطفيلي في الفئران التي تم حقنها بالذرية Nc1 في عينات الدم بعد ٢٨ يوما من الحقن ، في حين لوحظ وجود الطفيلي في بقية الأعضاء بعد ٦٠ يوما من الحقن ، أما بالنسبة الذرية BPA4 فلوحظ وجود الطفيلي في الفئران المحقونة بها بعد ٢١ يوما من الحقن في عينات الدم ، بينما ظهر في بقية الأعضاء بعد ٢٨ يوما من الحقن، جدول-٣.

جدول ٣: يبين ظهور الطفيلي في الأعضاء المختلفة للفئران قبل وبعد الحقن بالذراري الثلاث باستخدام المزارع الخلوية

الأيام	٠	٧	١٤	٢١	٢٨	٦٠	٩٠	
العضو								
الدماغ	-	-	-	-	+	+	+	NC5
القلب	-	-	-	-	+	+	+	
العـضلات الهيكلية	-	-	-	-	+	+	+	
الدم	-	-	+	+	+	-	-	
الدماغ	-	-	-	-	-	+	+	Nc1
القلب	-	-	-	-	-	+	+	
العـضلات الهيكلية	-	-	-	-	-	+	+	
الدم	-	-	-	-	+	-	-	
الدماغ	-	-	-	-	-	+	+	BPA4
القلب	-	-	-	-	-	+	+	
العـضلات الهيكلية	-	-	-	-	-	+	+	
الدم	-	-	-	+	-	-	-	

٣- تفاعل سلسلة البوليمريز:

في حين بينت نتائج الكشف عن الدنا للطفيلي باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي في المزارع الخلوية المحقونة بأعضاء الفئران المصابة بالذريّة الثلاثية ، حيث تبين وجود الدنا للطفيلي في الدم بعد ١٤ يوما من الحقن بالذرية NC5 ، في حين أظهرت الأعضاء (الدماغ والعضلات الهيكلية) نتيجة ايجابية بعد ٢١ يوما من الحقن بالذرية أنفة الذكر ، بينما أظهرت عينات القلب نتيجة ايجابية بعد ٢٨ يوما.

أما الذرية Nc1 فأظهرت النتائج أن الدنا للطفيلي ظهر في عينات (الدم ، الدماغ والقلب) بعد ٢١ يوما من الحقن ، في حين ظهر في اليوم ٢٨ بعد الحقن في عينات العضلات الهيكلية .

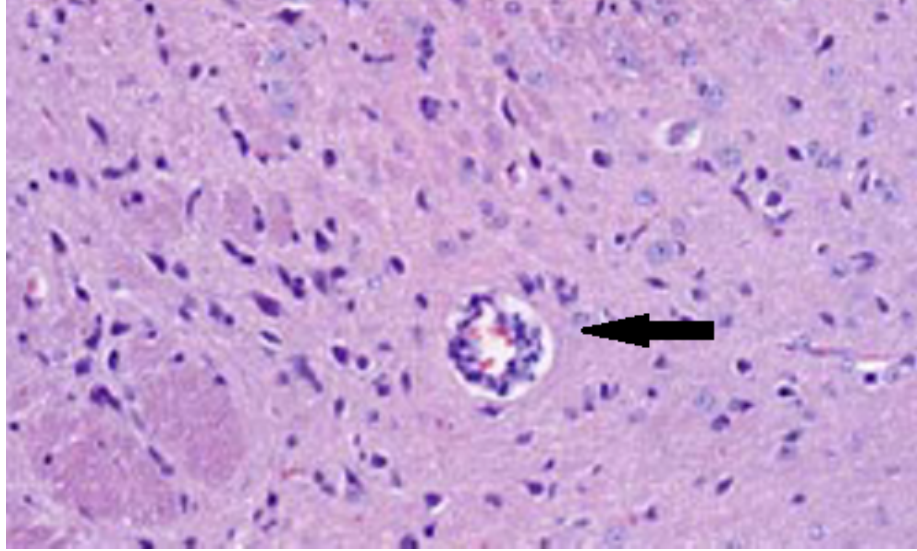
وأظهرت نتائج الكشف عن الدنا للطفيلي للذرية BPA4 وجود نتائج ايجابية بعد ١٤ يوما للحقن في عينات الدم ، بينما أظهرت النتائج وجود الدنا للذرية أنفة الذكر في عينات القلب والعضلات الهيكلية بعد ٢١ يوما من الحقن ، أما عينات الدماغ فأظهرت نتائج ايجابية للدنا للطفيلي بعد ٢٨ يوما من الحقن ، الجدول-٤-.

جدول ٤: يبين ظهور الطفيلي في الأعضاء المختلفة للفئران قبل وبعد الحقن بالذريّة الثلاث باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي

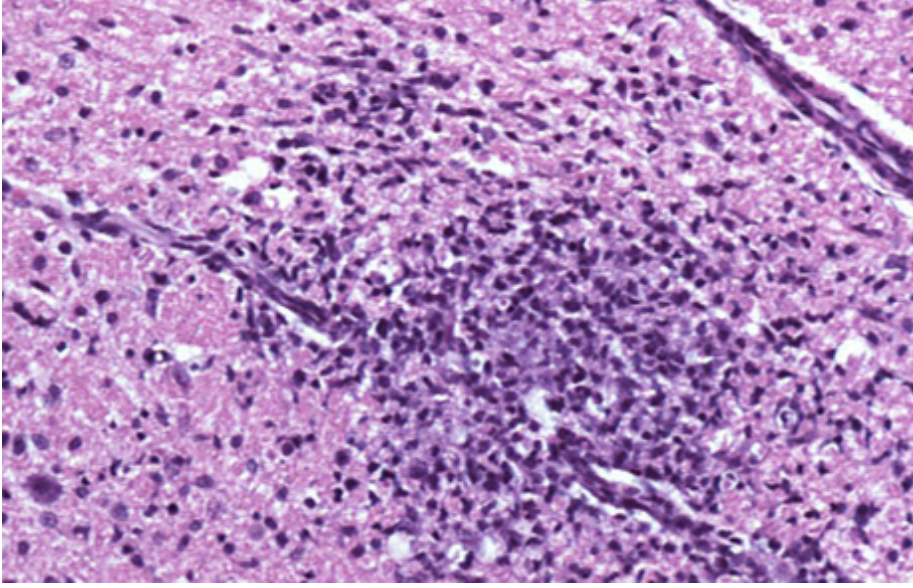
الأيام / العضو	٠	٧	١٤	٢١	٢٨	٦٠	٩٠
NC5	الدماغ	-	-	-	+	+	+
	القلب	-	-	-	-	+	+
	العضلات الهيكلية	-	-	-	+	+	+
	الدم	-	-	+	+	+	-
Nc1	الدماغ	-	-	-	+	+	+
	القلب	-	-	-	+	+	+
	العضلات الهيكلية	-	-	-	-	+	+
	الدم	-	-	-	+	+	-
BPA4	الدماغ	-	-	-	-	+	+
	القلب	-	-	-	+	+	+
	العضلات الهيكلية	-	-	-	+	+	+
	الدم	-	-	+	+	+	-

٤- الفحص النسيجي المرضي:

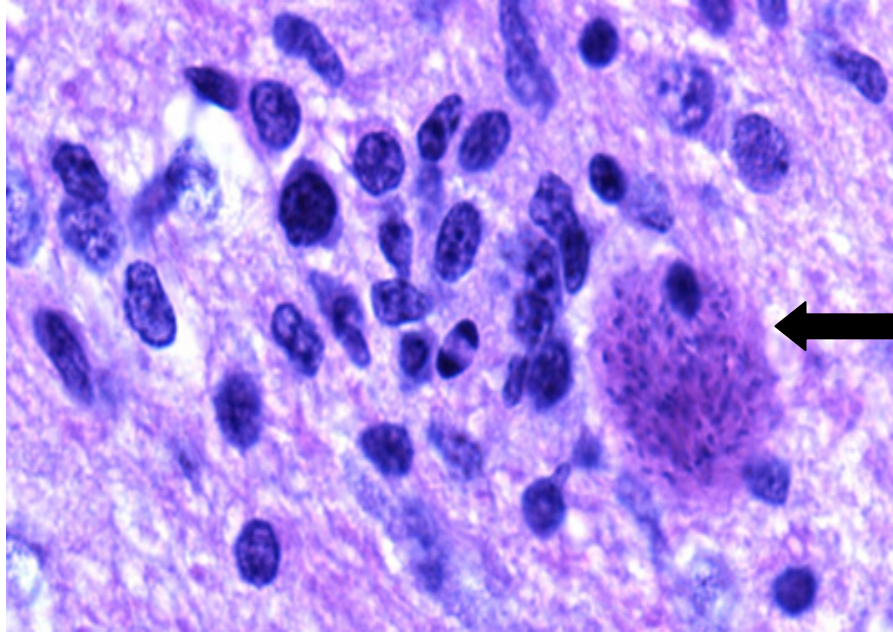
بينت نتائج الفحص النسيجي لأعضاء الفئران التي تم جمع الأعضاء منها والمحقونة بالذراري الثلاث وجود آفات نسية متباينة الشدة بالإضافة إلى التباين في وقت ظهورها حسب الذرية والعضو ، تمثلت هذه الآفات في الدماغ بوجود الأكياس النسية مع استكفاف وعائي prevascular cuffing ووجود بؤر لتجمعات الخلايا الدبقية Multifocal gliosis وخلايا أحادية النواة مع فقدان اللبد العصبي Neuropil (الأشكال ٤, ٥, ٦) ، أما في العضلات الهيكلية فقد تبين وجود تجمعات من الخلايا اللمفاوية والبلازمية وبعض الخلايا البلعمية (الشكل ٧) بينما كانت آفات القلب متمثلة بوجود ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية المتمثلة بالخلايا اللمفاوية والبلازمية (الشكل ٨)، جدول (٥)



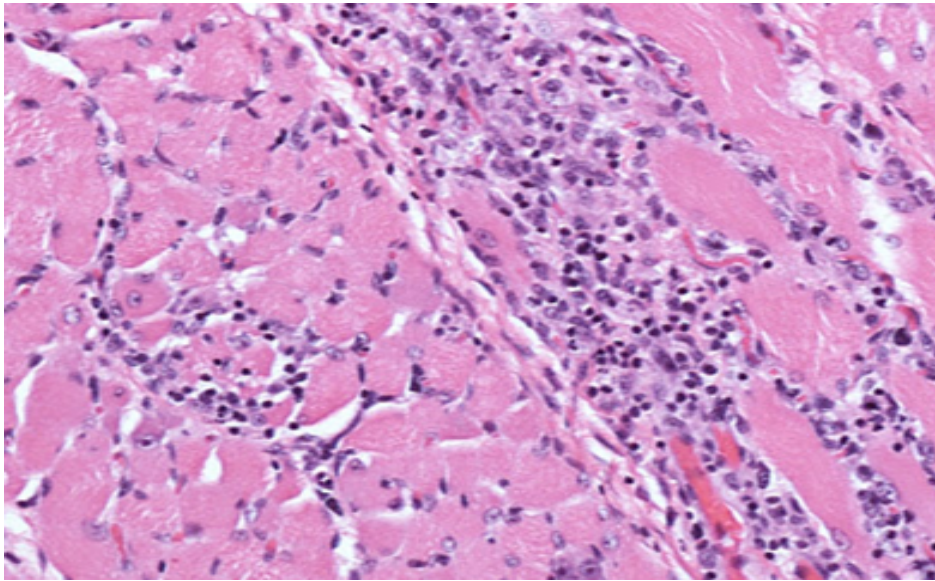
شكل ٤: مقطع نسيجي لدماغ فأر يبين الاستكفاف الوعائي مع ارتشاح عدد من الخلايا الدبقية



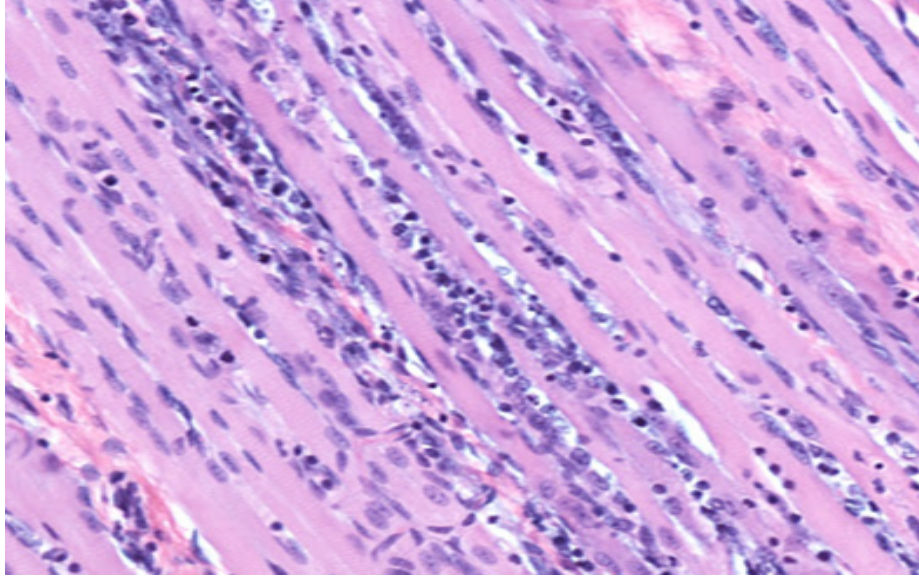
شكل ٥: مقطع نسيجي لدماع فأر يبين فقدان اللبد العصبي Neuropil مع تجمع كثيف من الخلايا الدبقية وارتشاح خلايا أحادية النواة



شكل ٦: مقطع نسيجي لدماع فأر يبين ظهور الكيس النسيجي للطفيلي



شكل ٧: مقطع نسيجي لعضلات هيكلية فأر يبين وجود تجمعات من الخلايا اللمفاوية والبلازمية وبعض الخلايا البلعمية



شكل ٨: مقطع نسيجي لقلب فأر يبين وجود ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية المتمثلة بالخلايا اللمفاوية والبلازمية

جدول ٥: يبين ظهور الطفيلي في الأعضاء المختلفة للفئران قبل وبعد الحقن بالذراري الثلاث باستخدام الفحص النسيجي

الأيام	٠	٧	١٤	٢١	٢٨	٦٠	٩٠	
عضو								
الدماغ	-	-	-	-	-	+	+	NC5
القلب	-	-	-	-	-	+	+	
العضلات الهيكلية	-	-	-	-	-	+	+	
الدماغ	-	-	-	-	-	-	+	Nc1
القلب	-	-	-	-	-	+	+	
العضلات الهيكلية	-	-	-	-	-	-	+	
الدماغ	-	-	-	-	-	-	+	BPA4
القلب	-	-	-	-	-	+	+	
العضلات الهيكلية	-	-	-	-	-	+	+	

DISCUSSION

المناقشة

بينت نتائج هذه الدراسة ظهور علامات مرضية متباينة على مجموعات الفئران التي طبق عليها الخمج التجريبي ، حيث تم حقن حيوانات التجربة (الفئران) بالذرياتي الثلاث للبوغة الجديدة الكلبيية ، حيث عانت الفئران المحقونة بالذرية NC5 حصول خشونة بالشعر بعد ١٤ يوم من الإصابة وظهرت العلامات العصبية بعد ٢٨ يوما من الإصابة ، مع حدوث موت بعد ٢١ أو ٢٨ يوما" من تطبيق الخمج التجريبي ، أما الذرية NC1 فعانت مجموعة الفئران المحقونة فيها من علامات مرضية متأخرة بعض الشيء عن الذريتين الأخرتين ، حيث أظهرت الفئران علامات مرضية بعد ٢١ يوما" من الخمج ، والموت في اليوم ٢٨ من تطبيق الخمج ، أما مجموعة الفئران التي حقنت بالذرية BPA4 فقد عانت من خشونة في الشعر بعد ١٤ يوما" ، بينما ظهرت الأعراض العصبية بعد ٦٠ يوما.

إن هذه التباينات ما بين الذرياتي في قابلية إحداثها للعلامات المرضية يعود للاختلاف في ضراوتها بالإضافة إلى قدرة كل ذرية في الانتشار والتكاثر والتفاعل مع أنسجة جسم الثوي المتوسط ، حيث ذكر الباحثون (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010)، إن لذراري البوغة الجديدة الكلبيية اختلافات في قابلية إحداثها للأمراضية بسبب الانماط المتعددة للضراوة ، علما" أن الذرياتي التي شملتها الدراسة كانت معزولة من نفس المنطقة الجغرافية ، هذا إضافة إلى الاختلاف في الضراوة عند تغيير الثوي المخبري المستخدم في الدراسة مما يعطي رؤية أوسع عن مدى تأثير ذلك بطروف التجربة. وبينت نتائج تنمية أعضاء الفئران ولست تمريرات على خلايا الزرع الخلوي والتي خضعت للخمج التجريبي ، ظهور اختلاف في سرعة ظهور الآفات الخلوية المرضية مع الاختلاف في معايير كل ذرية ، وهذا يتفق مع ما ذكره (Barley *et al.*, 2006) ، حيث بين وجود اختلافات ما بين بعض ذرياتي البوغة الجديدة الكلبيية بسبب الاختلاف في قابليتها لغزو خلايا الزرع الخلوي بالإضافة إلى تأثير كل ذرية بنوع خلايا الزرع الخلوي المستخدمة في التنمية ، وهذا ما يمكن أن يشير إلى وجود انساب أو صلات وعلاقات مختلفة لخصوصية ذرياتي البوغة الجديدة الكلبيية للنمو على خلايا الزرع الخلوي المختلفة بالإضافة إلى الاختلاف في قابلية إحداث الذرية للتغيرات المرضية الخلوية على خلايا الزرع الخلوي، إذ بين (Cheah *et al.*, 2004) ، في دراستهم الاختلاف ما بين نوعين من الذرياتي للكشف عن الاختلافات فيما بينهما لإحداث تمزق خلايا الزرع الخلوي، حيث وجد أن تأخر الذرية لإحداث ذلك يؤثر على سرعة انتشار الذرية في خلايا الزرع الخلوي مما يؤخر ظهور الآفات بسرعة. بينت النتائج في مجموعة الفئران ظهور للطفيلي بالدم باستخدام خلايا الزرع الخلوي بعد ١٤ يوم بالنسبة للذريتين NC5 و BPA4، أما فيما يتعلق بالذرية NC1 فكان أول ظهور للطفيلي بعد ٢٨ يوما" من تطبيق الخمج ، وتم الكشف عن الطفيلي في باقي الأعضاء

بعد ذلك الوقت ، إن هذه الاختلافات في زمن ظهور الطفيلي في الأعضاء يعود إلى الاختلاف في قابلية الذراري لغزو خلايا المضيف لكل عضو على حده ، هذا بالإضافة إلى الاختلاف في قابلية كل ذرية لإكمال دورة تكاثرية كاملة مما يؤثر على سرعة ظهوره بالأعضاء المختلفة (Javier *et al.*, 2011) ، إن ظهور الطفيلي في الدم أولاً" وقبل الأعضاء يعود إلى أن هذا السائل يعد طريق الانتشار الرئيس للحيوانات التسرعية إلى بقية أعضاء الجسم ، حيث ذكر (Long *et al.*, 1998) ، وجود الحيوانات التسرعية بعد ١٤ يوماً" في بطانة الأوعية الدموية، أما الاختلاف في وقت ظهور الطفيلي في الأعضاء ، فيتعلق بقابلية الذراري للانتشار في الأعضاء المختلفة استناداً لقابلية للانتشار والتكاثر فيها بالإضافة إلى قدرتها على اختراق الموانع الحيوية في أنسجة جسم الثوي كالمانع الدموي – الدماغى Blood-Brain Barrier (Lopez-) (Perez *et al.*, 2006). أما نتائج الكشف عن ألدنا للطفيلي في المزارع الخلوية المحقونة بالأعضاء المختلفة لمجوعات الفئران والتي تم جمع النماذج منها بأيام مختلفة ، فقد بينت النتائج وجود تباينات بين الذراري بالإضافة إلى وجود تباينات عن المزارع الخلوية، حيث كانت العينات الايجابية أعلى باستخدام تفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي ، ويعود السبب في ذلك للدقة والحساسية العالية التي يتمتع بها هذا الاختبار حيث بين (Pinikiatisakul *et al.*, 2008) ، إن هذا الاختبار له القدرة على الكشف عن ٠.١ من الحيوانات التسرعية لكل تفاعل والتي تعادل 10fg من قالب ألدنا للبوغة الجديدة الكلبية ، حيث بين وجود عينات سلبية للبوغة الجديدة الكلبية باستخدام ثلاث طرائق تشخيصية هي (المزارع الخلوية، الكيمياء النسيجية المناعية والفحص النسيجي المرضي) ، إلا أن هذه العينات أعطت نتائج ايجابية باستخدام تفاعل سلسلة البوليميريز.

فيما بينت نتائج الفحص النسيجي لأعضاء الفئران المحقونة تأخراً في ظهور الآفات النسجية وتباينا في وقت ظهورها حسب نوع الذرية ، وهذا يختلف عما ذكره (Barley *et al.*, 2009) ، ويعود السبب في ذلك إلى نوع الذرية المستخدمة وحجم الجرعة التي خمج بها من الحيوانات التسرعية.

أن عدم التوافق في نتائج الكشف عن ضراوة الذراري المختلفة مع دراسات أخرى قد يفسر بأسباب عديدة منها : الاختلاف سواء في نوع الفئران أو في ظروف التجربة ، ويلجأ بعض الباحثين إلى استخدام مثبتات مناعية وبغرض ضمان إحداث الأمراض أو لتوضيحها بصورة اكبر بالإضافة إلى أن تأثير ذراري البوغة الجديدة الكلبية بنوع المزارع الخلوية المنماة عليها بعدد التميريرات قبل إحداث الاخماج التجريبية يلعب دوراً "جوهرياً" ومهما" في هذا الجانب.

REFERENCES

المراجع

المراجع العربية Arabic References

العبيدي، وسن، القطرنجي، محمد محسن والخالد، عبد الكريم (٢٠١١): عزل وتشخيص جزيئة الدنا للبوغة الجديدة الكلبية من الأبقار المصابة طبيعيا لأول مرة في سوريا. قيد النشر مجلة جامعة الفرات.

المراجع الانكليزية English References:

- Barber, J.S.; Holmdahl, O.J.; Owen, M.R.; Guy, F.; Uggla, A. and Trees, A.J. (1995):* Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 111: 563-568.
- Barley, P.M.; Wright, S.; Sales, G.; Chianin, F.; Buxton, D. and Innes, E.A. (2006):* Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can Attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. *Parasitology*, 133: 421-432.
- Beck, H.P.; Blake, D.; Darde, M.L.; Flager, I.; Pedraza-Diaz, S.; Regidor-Cerrillo, J.; Gomez-Bautista, M.; Ortega-Mora, L.M.; Putignani, L.; Shiels, B.; Tait, A. and Weir, W. (2009):* Molecular approach To diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol*, 39: 175-189.
- Chanatal, R.; Thierry, L.; Francois, D.M.; Charles, F. and Bertrand, L. (2004):* Survival, immune responses and tissue cyst Production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) Strains of mice experimentally infected with *Neospora Caninum* tachyzoites. *Vet. Res*, 35: 225-232.
- Cheah, T.S.; Mattsson, J.G.; Zaini, M.; Sani, R.A.; Jakubek, E.B.; Uggla, A.; and Chandraawathani, P. (2004):* Isolation of *Neospora caninum* From a calf in Malaysia. *Vet. Parasitol*, 29: 263-269.
- Collantes-Fernandez, E.; Alvarez-Garcia, G.; Perez-Perez, V.; Pereira-Bueno, J. and Ortega-Mora, L.M. (2004):* Characterization and pathology and parasite load in outbred and inbred Mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. *J. Parasitol.*, 90: 579-583.
- Collantes-Fernandez, E.; Lopez-Petez, I.; Alvarez-Garcia, G. and Ortega-Mora, L.M. (2006):* Tempral distribution and

- parasite Load kinetics in blood and tissue during *Neospora caninum* Infection in mice. Infect Immune, 74: 2491-2494.
- Dubey, J.P.; Schares, G. and Ortega-Mora, L.M. (2007): Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol. Rev., 20: 232-367.
- 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.
- Hemphill, A.; Vanbufen, N. and Naguleswaran, A. (2006): Cellular and Immunological basis of the host parasite relationship During infection with *Neospora caninum*. Parasitology, 133: 261-278.
- Javier, R.; Mercedes, G.; Itsaso, S.; Gorka, A.; Gema, A.; Itziar, D. and Luis, M.A. (2011): In vitro invasion efficiency and intracellular and Proliferation rate comprise virulence – related phenotypic Traits of *Neospora caninum*. Vet. Res., 42: 41-52.
- Long, M.T.; Bszler, T.V. and Mathison, B.A. (1998): Comparison of Intracerebral parasite load, lesion development, and systemic Cytokins in mouse strains infected with *Neospora caninum*. J. Parasitol., 90: 579-583.
- Lopez-Petez, C.; Risco-Castillo, V.; Collantes-Fernandez, E. and Ortega-Mora, L.M. (2006): Comparative effect of *Neospora caninum* Infection in balb/c mice at three different gestation period. J. parasitol, 92: 1286-1291.
- Masumi, S.; Hisayo, K.; Yukiko, T.; Chun-Ho, P.; Takehito, M.; Akinori, S. and Takashi, U. (2000): Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. Veterinary Parasitology, 90: 247-252.
- 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.

- Pinikiattisakul, S.; Mattsson, J.G. and Lunden, A. (2008): A quantitative Analysis of parasite DNA in blood of immunized and native Mice after infection with Neospora caninum. Parasitology, 135: 175-182.*
- Quinn, H.F.; Miller, C.M.; Ryce, C.; Windsor, P.A. and Ellis, J.T. (2002): Characterization of an outbred pregnant mouse model of Neospora caninum infection. J. Prarsitol, 88: 691-696.*
- Regidor-Cerrillo, J.; Gomez-Bautista, M.; Del Poza, I.; Jimenez-Ruiz, E.; Aduriz, G. and Ortega-Mora, M. (2010): Influence of Neospora Caninum intra-specific variability in the outcome of infection in a Pregnant Balb/c mouse model. Vet. Res., 41: 52-58.*
- Rojo-Montejo, S.; Collantes-Fernandez, E.; Regidor-Cerrillo, J.; Alvarez-Garcia, G.; Marugan-Hernandez, V.; Pedraza-Diaz, S.; Blanco-Murcia, J.; Prenafeta, A. and Ortega-Mora-L. M. (2009): Isolation and characterization of bovine isolate of Neospora Caninum with low virulence. Vet. Parasitol, 159: 7-16.*
- 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.*
- Shibahara, T.; Kokuho, M.; Eto, M.; Haritani, T.; Hamaoka, K.; Shimura, K.; Nakamura, Y. and Yamane, I. (1999): Pathological and Immunological finding of athymic nude and congenic wild Type Balb/c mice experimentally infected with Neospora Caninum. Vet. Pathol., 36: 321-327.*