

## 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:

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 3<sup>rd</sup> passage of aborted fetus heart, in 4<sup>th</sup> 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 2<sup>nd</sup> trimester aborted fetus, in calves which suffer from recumbence, and in cow which aborted in 2<sup>nd</sup> 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 (NC-5, Nc1, BPA4) في الأبقار المصابة طبيعياً 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 القروود 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 ولمشيمة الأبقار. وعند إجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليمريز على قوالب جزيئه الدنا التي تم استخلاصها من المزارع الخلوية التي أظهرت نموا للطفيلي تبين وجود منحنيات تآلق 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 الأبقار 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 وادمغة العجول والدماغ 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 والمرض 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 أعراضاً عصبية في العجول المولودة حديثاً (Jessica et al., 2011) ، وتتعلق هذه الأعراض بغزو الحيوانات التسرع للطفيلي Tachyzoites لأنسجة الأم والجنين ، حيث وجدت في أنسجة مختلفة في جسم الثوي خلال الطور الحاد للمرض بينما وجدت الأوكياس النسيجية Tissue cyst في الطورين الحاد والمزمن

وخصوصا في الدماغ (Timothy et al., 1999)، وبعد تشخيص طفيلي البوغة الجديدة الكلبية صعبا " نظرا " لعدم وجود أعراض مرضية متخصصة في الأبقار وكذلك عدم وجود اختبارات طفيلية تشخيصية لها القدرة لتمييزها، بالإضافة إلى ذلك فإن السيطرة على البوغة الجديدة الكلبية يفترق 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 " بإمائه الطفيلي على خلايا الزرع الخلوي وذلك نظرا " لقدرة الحيوانات التسرع على النمو على عدة أنواع من خلايا الزرع الخلوي منها (خلايا كلية أجنة القروء الإفريقية الخضراء، خلايا بطانة الشريان الرئوي والخلايا وحيدة النواة للأبقار)، حيث تستخدم هذه الخلايا بصورة واسعة في تنمية الحيوانات التسرع وذلك بغرض إكثار أعدادها، ودراسة البنية المستدقة، والصفات المستدقية، والدراسات الجزيئية، ودراسة قدرة الحيوانات التسرع على الالتصاق على الخلايا وآلية ذلك (ميكانيكيتها)، ودراسة حيوية الحيوانات التسرع 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 البوليميريز 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 أنه وفي الأونة 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 والأم، والسوائل الجينية، والكشف عن الدنا للحيوانات التسرع، والحيوانات البطيئة Bradyzoites والكيسة البيضية oocyst، وكذلك القدرة عن الكشف عن الطفيلي في أنثوياء متعددة لتشمل الحيوانات المختبرية أيضا (Esther et al., 2002)، وطورت هذه التقنية لتشمل أنواعا دقيقة جدا مثل (ذات الوقت الحقيقي Real Time PCR، المتداخل Nested، نصف المتداخل Seminedsted، الكمي التنافسي Quantitative-Competitive التي تعتبر ذات قدرة عالية وسريعة لتقدير كمية ونوعية الطفيلي في الأنسجة فضلا 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 المشرات (Salehi et al., 2009) Primers.

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 القروء الإفريقية الخضراء.

٢- المقارنة بين نسب الإصابة بذراري البوغة الجديدة الكلبية من خلال تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز 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، ١٠ دقائق سحبت طبقة الخلايا للمفاوية (Buffy Coat) وحفظت في ٤ م ه لحين إجراء إتمام الطفيلي، وتم إجراء الصفة 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 دائرة 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 بالتريبسين (Trypsinized Flask)، ووضع معها قطعة من مغناطيس معقم ومن ثم أضيف إليها ٤٠ مليلتر من محلول دائرة حاوي على ٠.٢٥% تريبين و ٠.٠٢٥% ملح EDTA (Ethylene Diamin Tetraacetic Acid)، حيث حضنت بدرجة ٣٧ م 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 الزرع لل نمو (Minimal Essential Media) MEM، إلى الراشب وتم مزجها جيدا ومن ثم وضع المزيج في جهاز المثقلة، تم تكرار هذه العملية ثلاث مرات لغرض غسل الراشب ومن ثم علق هذا الراشب في ١٠ مليلتر من الوسط الزرع للنمو MEM ليحفظ في درجة حرارة ٤ م ه لحين إجراء الإنماء على خلايا الزرع الخلوي (Nathalie, 2003).

#### ٣- تحضير الوسط الزرع للنمو Growth Media:

تم إضافة ١٠.٦٩ غرام من الوسط الزرع مع ١٠ غرام من مرق التريبوز الفوسفاتي Tryptose phosphate broth، ٠.٥٨٤، من الكلوتامين L-glutamine، ١.٥ غرام بيكاربونات الصوديوم NaHCO<sub>3</sub>(2H<sub>2</sub>O)، ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية بنسلين ج Penicillin G، ١٠٠ ملغرام 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 رش تحت ضغط موجب (٢٠ مايكرون) تم إضافة ١٠٠ مليلتر من مصل الجنين البقري وحفظ في ٤ م ه (Rai,2008).

٤- خلايا الزرع الخلوي المستمر :

تم استخدام خلايا زرع خلوي من نوع خلايا كلية جنين القروء 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 القروء الخضراء الأفريقية ومن ثم حضنت لمدة ٤ ساعات بدرجة حرارة ٣٧ م ه ووضع المزيج في أنابيب معقمة في جهاز المثقلة ٢٠٠٠ دورة لمدة ١٠ دقائق ومن ثم تم التخلص من الراشح، وغسل الراشح الحاوي على الخلايا ثلاث مرات بمحلول دارنة الفوسفات المعقمة والذي يكون بدرجة حرارة ٣٧ م ه ، ونقلت الخلايا فيما بعد إلى الحويصلة الخاصة للزرع الخلوي (Falcon سعة ٥٠ مليلتر) ومن ثم أضيف إليها وسط النمو (Growth media) ، تم تحضير الخلايا في ٣٧ م ه ، ٥% CO<sub>2</sub>، وتم مراقبة الخلايا يوميا بفحصها تحت المجهر ويراعى استبدال الوسط كل ٥ أيام وإجراء تمريره واحدة كل ٤٠ يوما من التحضين ولسته تمريرات.

٦- استخلاص الدنا DNA Extraction:

تم إجراء استخلاص الدنا حسب تعليمات الشركة المصنعة للعتيدة (OMEGA bio-ket)

- تحضير المحاليل:

\* تحضير إنزيم البروتينازK(Proteinase K): تم إذابة الإنزيم والبالغة كميته ١٢٠ ملغم في ٤.٨ مليلتر من دارنة حفظ إنزيم البروتيناز Proteinase storage buffer.

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

\*تحضير دارنة MP: تم إضافة ٦٠ مليلتر من الايتانول المطلق ١٠٠% إلى ٤٠ مليلتر من دارنة MP لتكون جاهزة للاستخدام.

- استخلاص الدنا للطفيلي DNA من المزارع الخلوية:

تم حصاد الخلايا من حويصلة الزرع الخلوي باستخدام مكشطة الخلايا المطاطية cell scraper، ثم تم غسل الخلايا ثلاث مرات باستخدام محلول دارنة الفوسفات البارد(٤ م ه) ، وتم تعليقها في دارنة الفوسفات البارد (٤ م ه) ١٨٠ مايكروليتر ،ومن ثم إضافة ٢٠ مايكروليتر من إنزيم بروتينازK (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 ايندورف Eppendorf حجم ١.٥ مليلتر معقمة ، وبالتالي إضافة ٢٠٠ مايكروليتر من دارنة MSL ومزج جيدا وحضن ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٧٠ م ه ، وترك الأنبوب في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق ، ثم أضيف الايتانول المطلق ١٠٠% بمقدار ٢٦٠ مايكروليتر مع ١٠ مايكروليتر من الجزيئات المغناطيسية Mag –Bind Particles و ١٠ مايكروليتر من دارنة 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 دارنة MP ومزج جيدا" ، وحضن بعد ذلك 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 دارنة 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 بدارنة الغسل SPM Wash Buffer ٤٠٠ مايكروليتر، ثم تم التأكد من خلو الأنبوبة من أي كمية من الراشح وأضيف دارنة 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 وسحب الراشح الحاوي على جزيئات الدنا 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.

٧- تفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي Real Time PCR

تم استخدام العتيدة المنتجة من قبل شركة (Genekam Biotechnology AG Germany) (الشكل-١) والتي تعتمد على صبغات ومضائية Fluorogenic

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

١-٧- المحاليل والمواد المستخدمة في تفاعل البوليميريز

عبارة عن مزيج تفاعل يحتوي على كل مكونات التفاعل مع المشروعات 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      | -               |

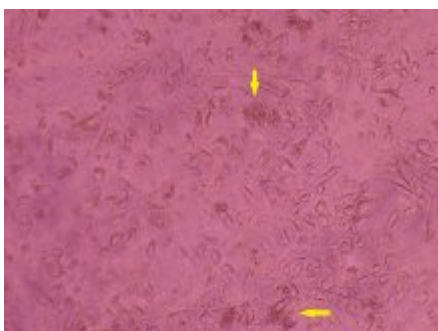
## ٢-٧- المشرعات أو البادئات: Primers

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:

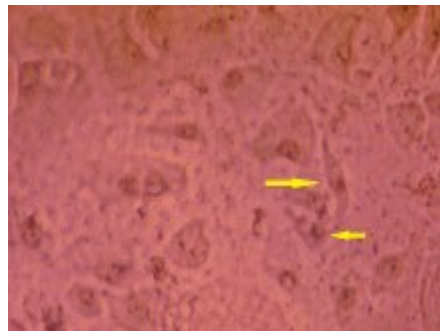
| ت | اسم الذرية | تسلسل البادئة الوراثي ٣'-٥'                                      | الحجم (bp) |
|---|------------|--|------------|
| ١ | NC-5       | '٥CACAAGTCGCACGGAGGTCA'٣<br>'٥AAGGAGAACGCTTCGTAACAA'٣            | ٧٦         |
| ٢ | BPA-4      | '٥CACACACTTGCCCACTTGCTCCCT'٣<br>'٥ACCATCGCCACTCTCCACCCCTATGCAC'٣ | ٣٣٧        |
| ٣ | Nc1        | '٥AATGTCTTAACCTGCGTGACCC'٣<br>'٥TCTTCTGCATCCAACCTGACCGCTC'٣      | ٣٢٧        |

## ٣-٧- خطوات عمل تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي:

أجري اختبار تفاعل البوليمريز المتسلسل ذو الوقت الحقيقي حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Esther *et al.*, 2002) حيث أجري الاختبار في حجم تفاعل كلي من ٢٥ مايكروليتر في طبق الاختبار الحاوي على ٩٦ حفرة (Plate) حيث أضيف في كل حفرة ٠.٢ مايكروليتر من كل بادئ من البادئات Primers و ٥ مايكروليتر من قالب 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 المبلر الحراري (Thermocycler) (الشكل-٢). وأجريت عملية التضاعف Amplification بواسطة جهاز المبلر الحراري المبرمج على خمسين دورة بعد خطوة المسخ Denaturing ٩٥م لمدة ١٠ دقائق. وقد شملت كل دورة 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 ٧٢م لمدة ١٥ ثانية، ثم ٢٥ دورة مسخ ٩٤م لمدة ٥ ثواني، ارتباط ٦٦م لمدة ٥ ثواني، استطالة ٧٢م لمدة ٤٥ ثانية.



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



الشكل (١) عتيدة تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي

## RESULTS

## النتائج

تبين من خلال تنمية الأعضاء المختلفة المأخوذة من الأجنة المجهضة، العجول والأبقار على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القروود 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 Vacule (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 القروود الأفريقية الخضراء

| ت | مصدر العينة      | التأثير المرضي الخلوي | ظهور فجوات |      |       | تمزق الخلايا |      |       | ظهور الطفيلي |       |
|---|------------------|-----------------------|------------|------|-------|--------------|------|-------|--------------|-------|
|   |                  |                       | أجنة مجهضة | عجول | أبقار | أجنة مجهضة   | عجول | أبقار | عجول         | 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 (٤) ظهور التأثير المرضي الخلوي (الفجوات) في خلايا الزرع الخلوي



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



شكل (٦) ظهور الحيوانات التسرعية للطفيلي في خلايا الزرع الخلوي



شكل (٥) ظهور التأثير المرضي الخلوي (تمزق الخلايا) في خلايا الزرع الخلوي

تبين من خلال تنمية أعضاء الأجنة المجهضة على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القروود 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 سوياً، 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 القروود الأفريقية الخضراء للأعضاء التي تم جمعها

| ت | مصدر العينة      | رقم التمريرة | أجنة مجهزة (٢٥)       |                     | عجول (١٤)             |                     | أبقار (٣٩)            |                     |
|---|------------------|--------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
|   |                  |              | عدد العينات الإيجابية | عدد العينات السلبية | عدد العينات الإيجابية | عدد العينات السلبية | عدد العينات الإيجابية | 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 مشروعات للذري (BPA4،NC-5،Nc1) بينت نتائج الاختبار لمسير DNA المصمم للمورث NC5 للبوغة الجديدة الكلبيية بملاحظة منحنى التآلق لدورات تضخيم تفاعل البلمرة، حيث ظهرت النتيجة الايجابية بالارتفاع التدريجي المتزايد لمنحنى التآلق ، (شكل ٧).



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

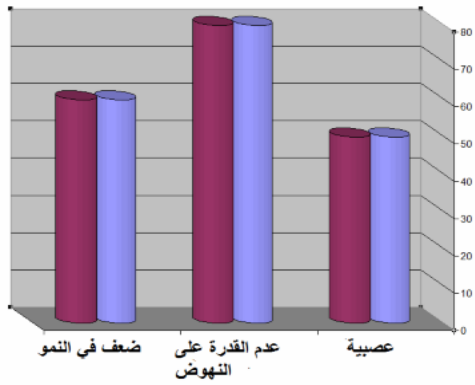
فيما بينت نتائج الكشف عن الدنا للطفيلي في المزارع الخلوية باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي أن أعلى نسبة للإصابة في للمزارع الخلوية المأخوذة من الأجنة ، كانت لعينات للدماغ والعضلات الهيكلية (١٠٠%) ، أما بالنسبة للمزارع الخلوية التي تمت عليها تنمية عينات العجول فبلغ أعلى نسبة إصابة لعينات 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

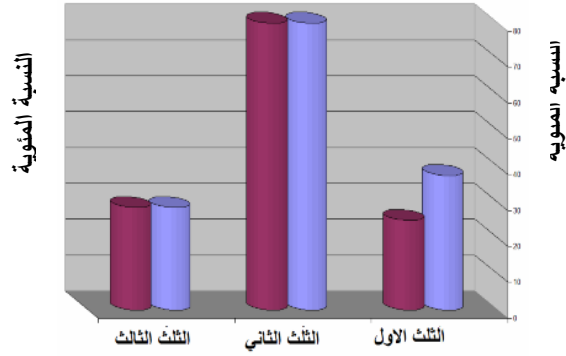
| ت | مصدر العينة           | أجنة مجهضة       | عجول                  | أبقار            |
|---|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|
|   | عدد العينات الايجابية | النسبة المئوية % | عدد العينات الايجابية | النسبة المئوية % |
| ١ | مشيمة             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

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 (الثالث الثاني) ، حيث بلغت ٨٠% في كلا الطريقتين (شكل-٨)، فيما ظهرت أقل نسبة للإصابة في العجول التي عانت من أعراض عصبية حيث بلغت ٥٠% (شكل-٩-)، أما الأبقار فقد سجلت فيها أعلى نسبة إصابة ١٧.٤١% التي أجهضت في (الثالث الثاني من الحمل) ، (شكل-١٠-)

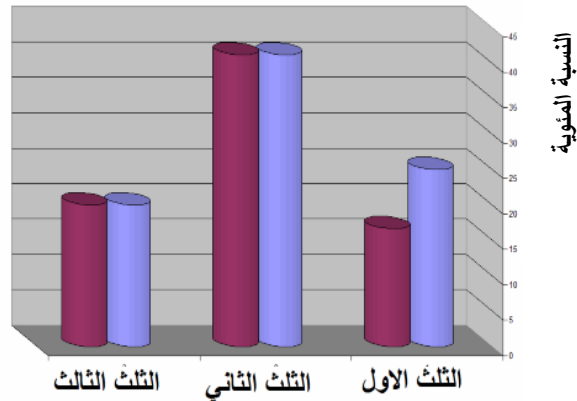


الأعراض بعد الولادة  
الشكل (٩)



عمر الإجهاض  
الشكل (٨)

المزارع الخلوية  
تفاعل سلسلة البوليميريز



فترة الإجهاض  
الشكل (١٠)

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

بينت نتائج تفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي للكشف عن ٣ ذراري البوغة الجديدة الكلوية (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 فتم 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 للعجول والأجنة في أنسجة العضلات الهيكلية، جدول-٤- .



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

| تفاعل سلسلة البوليميريز ذات الوقت الحقيقي | نوع العينة                             | مصدر العينة      | أسم الذرية |
|---|--|------------------|------------|
| عدد العينات السلبية(النسبة المئوية%)      | عدد العينات الإيجابية(النسبة المئوية%) |                  |            |
| ٧(٧٠)                                     | ٣(٣٠)                                  | مشيمة            | أبقار      |
| ١(٥٠)                                     | ١(٥٠)                                  | دم               |            |
| *   | *                                      | دم               |            |
| ٣(٦٠)                                     | ٢(٤٠)                                  | دماغ             | عجول       |
| ٢(٦٦.٦٧)                                  | ١(٣٣.٣٣)                               | القلب            |            |
| ١(١٠٠)                                    | ٠(٠)                                   | العضلات الهيكلية |            |
| ٤(٦٦.٦٧)                                  | ٢(٣٣.٣٣)                               | دماغ             | أجنة مجهضة |
| ٣(٧٥)                                     | ١(٢٥)                                  | القلب            |            |
| ٢(٦٦.٦٧)                                  | ١(٣٣.٣٣)                               | العضلات الهيكلية |            |
| ٨(٨٠)                                     | ٢(٢٠)                                  | مشيمة            | أبقار      |
| ٢(١٠٠)                                    | ٠(٠)                                   | دم               |            |
| *   | *                                      | دم               |            |
| ٥(١٠٠)                                    | ٠(٠)                                   | دماغ             | عجول       |
| ٢(٦٦.٦٧)                                  | ١(٣٣.٣٣)                               | القلب            |            |
| ١(١٠٠)                                    | ٠(٠)                                   | العضلات الهيكلية |            |
| ٥(٨٣.٣٤)                                  | ١(١٦.٦٦)                               | دماغ             | أجنة مجهضة |
| ٤(١٠٠)                                    | ٠(٠)                                   | القلب            |            |
| ٣(١٠٠)                                    | ٠(٠)                                   | العضلات الهيكلية |            |
| ٦(٦٠)                                     | ٤(٤٠)                                  | مشيمة            | أبقار      |
| ١(٥٠)                                     | ١(٥٠)                                  | دم               |            |
| *   | *                                      | دم               |            |
| ٣(٦٠)                                     | ٢(٤٠)                                  | دماغ             | عجول       |
| ٢(٦٦.٦٧)                                  | ١(٣٣.٣٣)                               | القلب            |            |
| ٠(٠)                                      | ١(١٠٠)                                 | العضلات الهيكلية |            |
| ٣(٥٠)                                     | ٣(٥٠)                                  | دماغ             | أجنة مجهضة |
| ٢(٥٠)                                     | ٢(٥٠)                                  | القلب            |            |
| ١(٣٣.٣٤)                                  | ٢(٦٦.٦٦)                               | العضلات الهيكلية |            |

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 القروذ الأفريقية الخضراء ، حيث أظهرت الأنسجة (الدماغ ، عضلة القلب ، العضلات الهيكلية ، المشيمة والدم) ، التي تم هضمها بالتريبسين والمنقاة من الحيوانات المصابة (أجنة مجهضة ، عجول مولودة حديثاً والأبقار) ، إذ لوحظ نمو على خلايا الزرع الخلوي وينسب 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) ، بعد ١١ 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 وملانمة 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 البوليميريز ذو الوقت الحقيقي للبوغة الجديدة الكلبيية في المزارع الخلوية التي ظهر عليها النمو، حيث كان نسبة 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 الكلبيية في المزارع الخلوية للأعضاء المختلفة قد يعود لعدة أسباب منها: إن أنسجة المشيمة والأجنة تظهر فيها نسبة إصابة منخفضة نتيجة تعرضها للتلف أو التحلل الذاتي مما يقلل من فرصة تشخيصها بصورة صحيحة (Collantes *et al.*, 2006)، بينما بينت دراستنا أن نسبها عالية نتيجة التعامل المباشر والاتي مع العينة دون اللجوء إلى حفظها ومعاملتها 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 للجنين Nc5 يكون ذو حساسية عالية للكشف عن هذا الطفيلي نتيجة عدم تواجده في الاوالي التي تمتلك علاقة مستضدية مع البوغة الجديدة الكلبيية (*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 الطفيلية 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 الكلبيية، وهذا يختلف عن ما ذكره (Salehi *et al.*, 2009)، حيث كانت النسبة منخفضة نتيجة لاستخدامه نوع واحد من المشروعات، وقد فسّر 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 الإيجابية لكل من المزارع الخلوية وتفاعل سلسلة البوليميريز ذو الوقت الحقيقي، حيث أن هناك تبايناً ما بين المجاميع، حيث بينت نتائج الفحص للأجنة المجهضة أن أعلى نسبة إصابة لكلا الطريقتين كانت في الأجنة التي أجهضت في (الثالث الثاني)، وقد يعود السبب في ذلك إلى أن الأجنة في الثالث الأول من الحمل في حال كونها مصابة تكون الإصابة في بداية تكونها وعدد الحيوانات التسرية فيها قليلاً، في حين أن الأجنة في الثالث الأخير من الحمل تكون الحيوانات التسرية في أنسجتها قليلة نتيجة قابلية جهازها المناعي لتكوين استجابة مناعية، بالإضافة إلى الاستجابة المناعية لأجسام 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 فشلاً عضلياً وعصبياً، وقد يعود السبب في ذلك لظهور أعراض على هذه العجول ناجمة عن إصابة بالبوغة الجديدة الكلبيية فضلاً عن ضعف النمو في أجسامها مما قد يساعد في انتشار وتقدم الإصابة (Hemphill *et al.*, 2000)، أما عند الأبقار ف لوحظ أن أعلى نسبة إصابة كانت في أبقار التي أجهضت (الثالث الثاني من الحمل)، وقد يعود السبب في ذلك إلى دور الإصابة المزمنة حيث أن الإصابة تنشيط نتيجة تحطم الأيكياس النسجية وتحول الحيوانات البطيئة إلى الحيوانات التسرية نتيجة لعملية تسمى (Bradyzoites-to-Tachyzoites Reconversion)، وذلك نتيجة أي خلل في الجهاز المناعي أو الحمل، وإن إعادة تنشيط الإصابة المزمنة بأخذ فترة من الزمن مما قد يقلل من فرصة حدوث الإجهاض في الثالث الأول من الحمل نتيجة الإصابة بالبوغة الجديدة الكلبيية (Guy *et al.*, 2001)، في حين أن الثالث الأخير من الحمل تقل فيه نسبة الإصابة نتيجة للاستجابة المناعية والتي تقلل من أعداد الحيوانات التسرية 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 المشروعات للذراري (BPA4،Nc1،NC-5)، باستخدام تفاعل سلسلة البوليميريز 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 الكلبيية في الأبقار، وذلك نظراً للكلفة المادية العالية لإجراء ذلك فيما عدا استخدام الحيوانات المخبرية بالإضافة إلى أن للبوغة الجديدة الكلبيية قابلية لإصابة أعضاء دون الأخرى، لكل ذرية حسب خصائصها الحيوية (البيولوجية) والجينية، لذلك فإن نسب انتشارها وتواجدها في الأعضاء تكون متباينة (AI-Qassab *et al.*, 2010)، فيما ذكر آخرون (Alexander *et al.*, 2011)، أن ذراري البوغة الجديدة الكلبيية التي تصيب الكلاب تصيب الأبقار على حد سواء.

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

## REFERENCES

### المصادر

- 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.
- AI-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 Seropositive 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 a cause 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.