

"هَلْ يَسْتَوِي الَّذِينَ يَعْلَمُونَ وَالَّذِينَ لَا يَعْلَمُونَ"

(زمر٩)



ویرایش جدید کتاب نئوسپوروزیس با حمایت اداره کل دامپزشکی استان همدان منتشر شده است.

نگارنده بر خود لازم می داند از تمامی همکارانی که به هر نحو مشوق اینجانب بودند بخصوص

مدیرکل وقت جناب آقای دکتر امیرحسین نقی پور تشکر و قدردانی ویژه داشته باشد.

چاپ سوم-ویرایش جدید

نئوسپوروزیس

زیست‌شناسی- بیماری‌زایی- اپیدمیولوژی- تشخیص-کنترل

تالیف:

دکتر جمال قره خانی

متخصص انگل شناسی و بیماری‌های انگلی

دوره تکمیلی علوم آزمایشگاهی بالینی و تضمین کیفیت

(سازمان دامپزشکی کشور-همدان)

اداره کل دامپزشکی استان همدان

جمال قره خانی

***نئوسپورا کانینوم* و سقط جنین / جمال قره خانی**

همدان: نشر روز اندیش، ۱۳۸۹

۷۴ ص

۶۳۶/۰۸۹۶۹۶۲ SF ۸۱۰ /۵ ن ۴ ق

ISBN: 978-600-5090-65-9

- **نام کتاب:** نئوسپوروزیس (*نئوسپورا کانینوم* و سقط جنین)
- **تالیف:** جمال قره خانی
- **ناشر:** روزاندیش-همدان
- **طراحی جلد:** مهدی طبق چی (۰۹۳۵۹۶۳۷۷۲۲)
- **تیراژ:** ۱۰۰
- **قطع:** وزیری
- **نوبت چاپ:** سوم، ویرایش جدید (تابستان ۱۴۰۵)
- **شابک:** ۹۷۸-۶۰۰-۵۰۹۰-۶۵-۹
- **قیمت:** ۱۵/۰۰۰/۰۰۰ ریال (یک میلیون و پانصدهزار تومان)

➢ مقدمه استاد:

تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* جزو انگل‌هایی است که اگر چه بیش از ربع قرن از شناسایی آن نمی‌گذرد ولی در سال‌های اخیر توجه محققین ذیربط در جهان را به خود جلب کرده است طوریکه هر سال صدها مقاله از سراسر جهان در مورد ویژگی‌ها و پاتوژنز این انگل به چاپ می‌رسد. در چند سال اخیر متخصصان انگل‌شناسی کشورمان نیز بررسی و تحقیق در مورد این تک یاخته را در کشور در غالب چندین پایان نامه دوره‌های تخصصی و کارشناسی ارشد و طرح‌های تحقیقاتی آغاز کرده و شیوع گسترده آلودگی را در استان‌های مختلف کشور گزارش نموده‌اند. همچنین انگل در یک مورد از مغز جنین‌های سقط‌شده گاوان در گاوداری‌های اطراف تهران جدا شده است. اگرچه این مطالعات در کشور ما برای شروع می‌تواند قابل قبول ارزیابی شود ولی هنوز ناشناخته‌های زیادی در مورد این انگل در کشور ما وجود دارد. بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک انجام شده در گله‌های گاو شیری در برخی از استان‌های کشور رابطه مستقیم بین میزان سقط را با شیوع این انگل نشان داده است ولی از آنجا که تعیین علت واقعی سقط در گاوان نیازمند مطالعات گسترده و از جمله رد دخالت سایر عوامل احتمالی سقط می باشد، تلاش‌های گسترده‌تری در این زمینه مورد نیاز می باشد.

یکی از نکاتی که باید در ادامه تحقیقات در این زمینه در کشور مد نظر قرار گیرد، انتقال سریع یافته‌های تحقیقاتی محققین کشور به دامداری‌ها و جلب توجه کارشناسان دامپزشکی کشور به اهمیت این تک‌یاخته بخصوص در صنعت گاوداری می‌باشد. مجموعه حاضر که به همت همکار محترم آقای جمال قره‌خانی از فارغ التحصیلان رشته انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتشر شده تلاشی است در این راستا که باید مورد تقدیر قرار گیرد. برای آقای قره خانی و سایر محققین و دامپزشکان کشور که برای رمزگشایی پیچیدگی‌های مربوط به این انگل در کشور تلاش می‌کنند موفقیت روزافزون آرزو دارم.

دکتر حمیدرضا حدادزاده
استاد تمام انگل شناسی دانشگاه تهران-آبان ماه ۱۳۸۹

➢ مقدمه مولف (ویرایش جدید):

نئوسپوروزیس یک بیماری انگلی در دام‌ها بخصوص گاو شیری و سگ در سراسر جهان است که عامل آن، *نئوسپورا کانینوم*، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل سقط جنین در گاو شناخته می‌شود. از زمان توصیف این انگل در دهه ۱۹۸۰ میلادی، مطالعات گسترده‌ای در زمینه زیست‌شناسی، بیماری‌زایی، اپیدمیولوژی، ایمنی‌شناسی، تشخیص و کنترل آن انجام شده است و امروزه نئوسپوروزیس به عنوان یکی از چالش‌های مهم بهداشت و تولید دام در بسیاری از کشورها مطرح است. خسارات اقتصادی ناشی از سقط‌جنین، کاهش راندمان تولید، حذف دام‌های آلوده و هزینه‌های کنترل بیماری، اهمیت این انگل را بیش از پیش نمایان ساخته است. در طول سه دهه گذشته، پیشرفت‌های چشمگیری در شناخت *نئوسپورا کانینوم* حاصل شده است. توسعه روش‌های مولکولی پیشرفته، گسترش مطالعات ژنومی و پروتئومی، شناسایی عوامل مؤثر در بیماری‌زایی، بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌ها و تلاش برای تولید واکسن‌ها و داروهای مؤثر، افق‌های جدیدی را در پژوهش‌های نئوسپورا گشوده است. با این حال، نبود واکسن تجاری با کارایی مطلوب و محدودیت گزینه‌های درمانی مؤثر نشان می‌دهد که هنوز پرسش‌های مهمی در مورد زیست‌شناسی و کنترل این انگل بی‌پاسخ باقی مانده‌اند.

علاقه نگارنده به مطالعه *نئوسپورا کانینوم* به بیش از دو دهه قبل بازمی‌گردد. هر دو پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی و دکتری تخصصی با محوریت این انگل انجام شده‌اند و بخش عمده ای از فعالیت‌های پژوهشی، آموزشی و علمی نگارنده طی سال‌های گذشته بر این انگل متمرکز بوده است. انتشار مقالات پژوهشی و مروری، تألیف نخستین کتاب فارسی و جامع نئوسپوروزیس، نگارش فصل بین‌المللی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی *نئوسپورا*، همکاری با مجلات علمی بین‌المللی به عنوان داور و ویراستار، و مشارکت در پروژه‌های مختلف پژوهشی، بخشی از این مسیر علمی بوده است. همچنین فرصت همکاری علمی با پژوهشگران برجسته این حوزه و ارزیابی مقالات منتشرشده توسط گروه‌های پیشرو جهان، تجربه ارزشمندی در شناخت روند تکامل دانش این انگل فراهم کرده است. چاپ نخست این کتاب با هدف معرفی جامع بیماری نئوسپوروزیس و سقط‌جنین‌های ناشی از آن به جامعه علمی و دامپزشکی فارسی‌زبان منتشر شد و مورد استقبال دانشجویان، پژوهشگران و

متخصصان قرار گرفت. چاپ دوم با افزودن مطالب جدید و به‌روزرسانی بخش‌های مختلف کتاب، گامی دیگر در جهت تکمیل این مرجع علمی بود. اکنون چاپ سوم کتاب صرفاً یک بازنگری معمولی نیست، بلکه حاصل یک ویرایش گسترده و بازنویسی اساسی بر پایه جدیدترین یافته‌های علمی منتشرشده در سال‌های اخیر است. در این ویرایش، بیشتر مباحث به‌طور کامل بازنگری شده و مطالب جدیدی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی، اپیدمیولوژی مولکولی، ژنوتایپینگ، واکسن‌ها، روش‌های تشخیص نوین، درمان‌های نوظهور و چشم‌اندازهای آینده پژوهش به کتاب افزوده شده‌اند.

هدف از تدوین این کتاب، فراهم آوردن یک مرجع جامع به زبان فارسی، به‌روز و کاربردی برای دانشجویان، پژوهشگران، دامپزشکان و سایر علاقه‌مندان به این حوزه است. امید است این اثر بتواند ضمن انتقال دانش موجود، زمینه‌ساز شکل‌گیری پژوهش‌های جدید و توسعه همکاری‌های علمی در این حوزه باشد. این کتاب حاصل سال‌ها مطالعه، پژوهش، تدریس و علاقه‌مندی به یکی از مهم‌ترین انگل‌های دامپزشکی جهان است. نگارنده امیدوار است که چاپ سوم این اثر بتواند سهمی هرچند اندک در ارتقای دانش علمی، بهبود کنترل بیماری و حمایت از پژوهشگران نسل آینده داشته باشد. ویرایش جدید کتاب نئوسپوروزیس با حمایت اداره کل دامپزشکی استان همدان منتشر شده است. نگارنده بر خود لازم می داند از تمامی همکارانی که به هر نحو حامی و مشوق اینجانب بودند، بخصوص مدیرکل وقت جناب آقای دکتر امیرحسین نقی پور تشکر و قدردانی ویژه داشته باشد.

خدایاچنان کن سرانجام کار تو خشنود باشی و ما رستگار

دکتر جمال قره خانی (gharekhani_76@yahoo.com)

تابستان ۱۴۰۵

تقدیم به



پدر و مادرم

➢ **فهرست مطالب:**

مقدمه

۱- مقدمه ۱

زیست‌شناسی انگل

۱-۲-تاریخچه انگل ۵
۲-۲- طبقه بندی ۷
۳-۲- چرخه زندگی ۷
۴-۲- روش‌های انتقال انگل ۱۲
۵-۲- تفریق *نئوسپورا کانینوم* از سایر گونه‌های مشابه ۱۳
۱-۵-۲- *نئوسپورا هوقسی* ۱۳
۲-۵-۲- *توکسوپلاسما گوندی* ۱۳

ایمونولوژی و زیست شناسی مولکولی

۳-آنتی‌ژن‌ها و ایمونولوژی انگل..... ۱۵

بیماری‌زایی

۱-۴-بیماری زایی ۱۹
۲-۴- یافته های کالبدگشایی ۲۲
۳-۴- علائم بالینی ۲۳
۱-۳-۴- گاو ۲۳
۲-۳-۴- سگ ۲۴
۳-۳-۴- گوسفند و بز ۲۵
۴-۳-۴- اسب ۲۵
۵-۳-۴- گربه ۲۶
۶-۳-۴- انسان ۲۶

اپیدمیولوژی

۵- اپیدمیولوژی ۲۹
۵-۱- وضعیت آلودگی در ایران ۲۹
۵-۲- وضعیت آلودگی در جهان ۳۰
۵-۳-مقایسه وضعیت آلودگی (گاو و سگ) در جهان و بررسی فاکتورهای خطر مهم..... ۳۱
۵-۳-۱- گاو ۳۱
۵-۳-۲- سگ ۳۶
۵-۴- عوامل موثر بر آلودگی و سقط جنین ۴۸
۵-۴-۱-سن گله ۴۸
۵-۴-۲- حضور میزبان‌های مختلف ۴۸
۵-۴-۳- شرایط آب و هوایی منطقه و روش تغذیه ۴۹
۵-۴-۴- تراکم گله و نوع پرورش ۴۹
۵-۴-۵- آلودگی‌های هم زمان با سایر عوامل عفونی ۵۰
۵-۵-اپیدمیولوژی مولکولی ۵۳
۵-۶- خسارات اقتصادی نئوسپوروزیس ۵۴

تشخیص آزمایشگاهی

۶- روش‌های تشخیص ۵۷
۶-۱- سرولوژی و ایمونولوژی ۵۷
۶-۱-۱- ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم ۵۹
۶-۱-۲- الایزا ۵۹
۶-۱-۳- آگلوتیناسیون مستقیم ۶۱
۶-۲-روش‌های تشخیص بافتی ۶۲
۶-۲-۱- هیستوپاتولوژی ۶۲
۶-۲-۲- هیستوشیمی ۶۶
۶-۲-۳- ایمونوهیستوشیمی ۶۶
۶-۳- روش‌های مولکولی ۶۶

۱-۳-۶-روش استخراج DNA ۶۷
۶-۳-۲- روش PCR ۶۹
۶-۳-۳- Nested-PCR ۷۰
۴-۳-۶- توالی و سویه‌های مختلف ۷۳
۴-۶- حیوانات آزمایشگاهی ۸۴
۱-۴-۶-آزمون تلقیح زیستی ۸۴
۲-۴-۶-موش ها به عنوان مدل استاندارد ۸۴
۳-۴-۶-نقش حیوانات آزمایشگاهی در جداسازی سویه های جدید ۸۵
۴-۴-۶-محدودیت های استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ۸۶
۵-۴-۶-مدل های حیوانی نوین در تحقیقات *نئوسپورا کانینوم* ۸۶
۵-۶- کشت سلول ۸۸
۱-۵-۶-رده های سلولی پرکاربرد در تحقیقات *نئوسپورا*..... ۸۹
۲-۵-۶-پیشرفت های اخیر در کشت سلولی *نئوسپورا*..... ۹۰
۳-۵-۶-نقش کشت سلولی در تحقیقات امیکس..... ۹۰

کنترل و پیشگیری

۱-۷- درمان ۱۰۱
۱-۱-۷- درمان نئوسپوروزیس در سگ ۱۰۳
۲-۱-۷-درمان نئوسپوروزیس در گاو ۱۰۴
۳-۱-۷-اهداف دارویی جدید در ژنوم و متابولیسم *نئوسپورا کانینوم* ۱۰۴
۲-۷-کنترل و پیشگیری ۱۰۹
۱-۲-۷- میزبان های واسط ۱۱۰
۲-۲-۷- میزبان های اصلی ۱۱۰
۳-۷- واکسیناسیون ۱۱۲
۴-۷- پیشنهادات کاربردی ۱۱۶

چالش ها و آینده پژوهی

۱-۸-چالش ها و شکاف های دانشی در نئوسپوروزیس ۱۱۷

۱-۱-۸-چالش ها ۱۱۷
۲-۱-۸-شکاف های دانشی مهم ۱۱۹
۲-۸-آینده پژوهی و اولویت های تحقیقاتی ۱۲۰

منابع..... ۱۲۴

فصل ۱

مقدمه

۱- مقدمه:

نئوسپورا کانینوم تک‌یاخته انگلی است که علی‌رغم گذشت حدوداً سه دهه از تشخیص قطعی و معرفی آن، پیشرفت‌های علمی قابل ملاحظه‌ای را در حوزه‌های مختلف آن شاهد هستیم. طیف وسیعی از حیوانات و پرندگان به عنوان میزبانان این انگل معرفی شده‌اند؛ ولی سگ (میزبان نهایی) و گاو (میزبان واسط) مهم‌ترین نقش را در چرخه زندگی انگل دارند. انتقال عمودی انگل اصلی‌ترین راه ایجاد آلودگی در حیوانات بخصوص در گوساله‌های بدون علامت می‌باشد. انتقال عمودی از طریق جفت به جنین ممکن است تا چندین نسل به صوت متوالی صورت گیرد؛ اما انتقال افقی انگل از طریق خوردن موادغذایی و آب آلوده به اووسیست‌های هاگدار (اسپروله) هم نقش مهمی در انتشار آلودگی و ایجاد همه‌گیری‌های گسترده و طوفان سقطجنین‌های به ویژه در فضاهای بسته و دامداری‌های محصور دارد (Dubey et al., 2007, 2017).

نئوسپورا کانینوم با استقرار در اندام‌ها و بافت‌های مختلف میزبان باعث بروز علائم بالینی متفاوتی می‌شود. سقطجنین مهم‌ترین نشانه‌ی بیماری در گاو است که عمدتاً در سه

ماهه دوم آبستنی رخ می‌دهد. بروز سقط جنین به صورت اندمیک در سطح گله بیانگر آن است که انتقال عمودی مهم‌ترین روش آلودگی می‌باشد (Razmi et al., 2013). گوساله‌های آلوده دارای نشانه‌های عصبی بوده و قادر به ایستادن نمی‌باشند. عدم تعادل، کاهش رفلکس مفصل زانو و کاهش حس هوشیاری نیز از علائم نئوسپوروزیس است؛ ولی ۹۵ درصد از گوساله‌های متولد شده از مادران آلوده بدون علائم بالینی هستند (Riberio et al., 2019). عوامل متعددی سبب افزایش خطر ابتلاء به نئوسپوروزیس در دام‌ها بخصوص در گاوهای شیری می‌شود که یکی از مهم‌ترین آنها ارتباط سگ با سایر دام‌ها است. حضور سگ در گاوداری و ارتباط آن با گله خطر ابتلا به این بیماری در دام‌ها را افزایش می‌دهد؛ بنابراین حضور سگ و سایر میزبانان اصلی در محل دامداری بایستی محدود و یا از دسترسی آنها به محل زندگی و انبار خوراک دام‌ها ممانعت شود (Hall et al., 2005; Nicolino et al., 2015). نئوسپوروزیس به غیر از هزینه‌های سقط و ناباروری در گاو باعث ایجاد خسارات اقتصادی قابل توجهی از طریق کاهش تولید شیر در صنعت پرورش گاو شیری می‌شود. اطلاعات دقیق و مشخصی در ارتباط با میزان خسارات اقتصادی ناشی از نئوسپوروزیس در صنعت گاوداری ایران و جهان وجود ندارد؛ ولی براساس گزارش‌های موجود خسارت اقتصادی ناشی از سقط- جنین در کالیفرنیا ۳۵ میلیون دلار محاسبه شده است. این میزان در استرالیا و نیوزلند ۱۰۰ میلیون دلار، سوئیس ۹۸ میلیون یورو و انگلستان ۲۰۰ میلیون دلار برآورد شده است (Santos et al., 2016; Richel et al., 2013).

تشخیص آلودگی با استفاده از روش‌های مختلف آزمایشگاهی به همراه علائم بالینی صورت می‌گیرد که از بین آنها روش الایزا برای ارزیابی وضعیت سرمی و همچنین بررسی آلودگی شیر بالک تانک در غربالگری گله‌ای بسیار مناسب می‌باشد. امروزه روش‌های مولکولی با حساسیت و ویژگی بالا به ابزاری کارآمد و توانمند برای تشخیص نئوسپوروزیس تبدیل شده‌اند (Pare et al., 1995a,b; Michael, 1996). تشخیص مولکولی *نئوسپورا کانینوم* با استفاده از ژن Nc-5، روش مناسب و قابل اعتمادی می‌باشد؛ زیرا هیچگونه واکنش متقاطعی با

گونه‌های *توکسوپلاسما گوندی*[1]، *سارکوسیستیس کروزی*[2] و *هاموندیا هاموندی*[3] گزارش نشده است (Yamage et al., 1996). همچنین مطالعات فیلوژنی متعددی بر روی توالی‌های مختلف از جدایه‌های *نئوسپورا کانینوم* با استفاده از ژن Nc-5 صورت گرفته است (Costa et al., 2008; Biee et al., 2010; Abdoli et al., 2015; Arbabi et al., 2016). مولر و همکاران[4] (۲۰۰۱) با استفاده از این ژن، پنج ژنوتیپ مختلف از این انگل را گزارش نمودند. پرایمرهای NP1، NP4، NP6، NP7، NP8، NP21 و NP6 با ژن هدف Nc-5 مورد استفاده قرار گرفته است؛ ولیکن در ارزیابی‌های مختلف جفت پرایمرهای NP1/NP2 و NP6/NP21 مناسب‌ترین پرایمر معرفی شده‌اند (Yamage et al., 1996). جفت پرایمرهای $NP6^{+}$ و $NP21^{+}$ نسخه‌های اصلاح شده NP6 و NP21 هستند که بطور گسترده برای تشخیص در نمونه‌ها و میزبان‌های مختلف استفاده می‌شوند؛ این جفت پرایمر با حساسیت بسیار بالا توانایی تشخیص یک تاکی‌زوئیت در یک میلی‌گرم بافت آلوده را دارد (Muller et al., 1996). در یک مطالعه در ایران، محصول PCR مربوط به ژن NcSRS2 پس از تعیین توالی نوکلئوتیدها و ثبت در بانک‌ژن، ۸۰ تا ۱۰۰ درصد همانندی با دیگر جدایه‌های ثبت شده را نشان داد (Soltani et al., 2013).

مطالعات متعددی در زمینه *نئوسپورا کانینوم* بر روی میزبان‌های مختلف در کشورهای مختلف بخصوص ایران صورت گرفته است که بیشتر جنبه اپیدمیولوژی داشته و به بررسی میزان شیوع آلودگی و یا بیماری پرداخته است (Dubey et al., 2007). رزمی و همکاران (۲۰۰۷) اولین سقط‌جنین گاوی ناشی از *نئوسپورا کانینوم* در ایران را گزارش نمودند. در ادامه، جداسازی DNA *نئوسپورا کانینوم* از مغز جنین‌های سقط شده گاو به همراه کشت و تلقیح به حیوان آزمایشگاهی برای اولین بار در ایران توسط صالحی و همکاران (۲۰۱۲) صورت گرفت.

[1] -*Toxoplasma gondii*
[2] -*Sarcocystis cruzi*
[3] -*Hamondia hammondi*
[4] -Muller et al.,

انصاری‌لاری (۲۰۲۰) در یک بررسی متاآنالیز، میزان شیوع سرمی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* را در گاوهای ایران ۲۳/۶ درصد گزارش نمود (Ansari-Lari, 2020).

طی بیش از سه دهه گذشته، دانش ما درباره چرخه زندگی، میزبان‌ها، الگوهای انتقال و اهمیت اقتصادی نئوسپوروزیس به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است. با این حال، علی‌رغم انتشار هزاران مقاله علمی و سرمایه‌گذاری گسترده پژوهشی، هنوز بسیاری از پرسش‌های کلیدی درباره این بیماری بدون پاسخ باقی مانده‌اند. بررسی انتقادی دستاوردهای ۳۵ سال گذشته نشان می‌دهد که اگرچه پیشرفت‌های مهمی حاصل شده است، اما شکاف‌های دانشی متعددی همچنان مانع طراحی راهکارهای مؤثر برای کنترل پایدار بیماری در سطح جهانی شده‌اند. آینده تحقیقات *نئوسپورا* بیش از هر زمان دیگری به رویکردهای میان‌رشته‌ای، فناوری‌های نوین ژنومی و همکاری‌های بین‌المللی وابسته خواهد بود. شناسایی و رفع این شکاف‌های دانشی می‌تواند مسیر دستیابی به راهکارهای مؤثر برای کنترل پایدار نئوسپوروزیس در دام‌های اهلی را هموار سازد.

فصل ۲

زیست‌شناسی انگل

۱-۲- تاریخچه انگل:

پژوهشگران نروژی در سال ۱۹۸۴ در سگ‌های دارای نشانه‌های عصبی (آنسفالیت و فلجی اندام‌های حرکتی) تک یاخته‌های شبیه به *توکسوپلاسما گوندی* را گزارش نمودند. گروه دیگری از محققان در سال ۱۹۸۸ در یک بررسی گذشته‌نگر، علائم بالینی، مقاطع میکروسکوپی و نتایج آزمایشگاهی ثبت شده در پرونده ۲۳ سگ نروژی را مجدداً مورد بررسی قرار دادند که ۱۳ مورد از آنها *توکسوپلاسما گوندی* و ۱۰ مورد دیگر *نئوسپورا کانینوم* تشخیص داده شد. *نئوسپورا کانینوم* از لحاظ چرخه‌زندگی و ریخت‌شناسی مشابه با دیگر اعضای اسپوروزوآ بوده ولی از نظر ساختمانی و آنتی‌ژنیک متفاوت از *توکسوپلاسما گوندی* می‌باشد. این انگل به دلیل تشخیص برای اولین بار "انگل هاگ‌دار جدید" یا "*نئوسپورا*" نامیده شد (Dubey, 1998).

مدت‌ها پس از گذشت مطالعات مقدماتی، چرخه زندگی و همچنین میزبانان نهایی و واسط این تک‌یاخته مشخص نبود. پژوهشگران این حوزه برای یافتن میزبانان نهایی، تعداد

قابل توجهی از حیوانات را بطور تجربی آلوده به کیست انگل نمودند تا اینکه در یک بررسی دیگر اووسیست‌های انگل از دو قلاده سگ که به طور طبیعی آلوده شده بودند، جدا شد و سگ به عنوان میزبان نهایی معرفی گردید. پس از مدتی اووسیست‌های انگل از مدفوع چند قلاده کایوت (سگ-گرگ) جدا و کایوت نیز به عنوان میزبان نهایی معرفی شد (Dubey, 1998). در پژوهش‌های دیگر، گاو، گوسفند، بز، اسب، الاغ، کرگدن، آهو و تعداد زیادی از حیوانات وحشی به عنوان میزبانان واسط این انگل معرفی شدند. نکته قابل توجه اینکه سگ علاوه بر میزبان نهایی، می تواند نقش میزبان واسط برای *نئوسپورا کانینوم* را نیز داشته باشد (Dubey, 2003).

از سال ۱۹۸۴ تاکنون پیشرفت قابل توجهی در زمینه یافته‌های نوین *نئوسپورا* شده است؛ به طوری که تاکنون هزاران یافته در حوزه‌های مختلف نئوسپوروزیس از نقاط مختلف جهان منتشر شده است (Dubey et al., 2007) که مهم‌ترین آنها عبارتند از:

۱) بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۸۴ در سگ‌های نروژی تشخیص داده شد.
۲) این تک‌یاخته در سال ۱۹۸۸ از سگ‌های امریکایی گزارش شد.
۳) *نئوسپورا کانینوم* در سال ۱۹۸۸ از محیط کشت سلولی و موش جدا گردید و همچنین روش ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی برای تشخیص سرولوژیک آن استفاده شد.
۴) در سال ۱۹۸۹ نئوسپوروزیس به عنوان یکی از عوامل سقط‌جنین در گاوهای شیری معرفی و از روش ایمونوهیستوشیمی برای جداسازی انگل از بافت استفاده شد.
۵) در سال ۱۹۹۰مدل‌های آزمایشگاهی در موش بررسی و برای اولین بار از دارو برای کنترل عفونت استفاده شد.
۶) در سال ۱۹۹۱ از نام *نئوسپورا کانینوم* استفاده شد.
۷) *نئوسپورا کانینوم* برای اولین بار در سال ۱۹۹۳ از جنین‌های سقط شده گاو جدا شد.

۸) در سال ۱۹۹۴ از روش الایزا[1] برای تشخیص آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در سگ و گاو استفاده شد.

۹) اولین پروتئین نوترکیب *نئوسپورا کانینوم* با کاربرد تشخیصی در سال ۱۹۹۶ استخراج شد.

۱۰) مشخصات مربوط به ژنوم *نئوسپورا کانینوم* برای اولین بار در سال ۲۰۱۲ منتشر شد.

۲-۲- طبقه بندی[2]:

جنس[3] *نئوسپورا* در سلسله پروتیستا[4]، زیر سلسله پروتوزوآ[5]، شاخه اپی‌کمپلکسا[6]، دسته اسپوروزواسیدا[7]، زیر دسته کوکسیدیازینا[8]، راسته ایمریورینا[9] و خانواده توکسوپلاسماتیده[10] قرار دارد (Dubey et al., 2017).

۲-۳- چرخه زندگی:

نئوسپورا یک تک‌یاخته انگلی دو میزبانه اجباری می‌باشد. سگ و کایوت به عنوان مهم‌ترین میزبانان نهایی انگل معرفی شده‌اند. گاو و گونه‌های مختلفی از حیوانات از جمله سگ، گوسفند، بز، اسب و آهو میزبانان واسط این انگل هستند. با توجه به مطالعات سرم‌شناسی، گاومیش، روباه، شتر، کرگدن و کایوت هم می‌توانند به عنوان میزبان واسط مطرح باشند. متداول‌ترین چرخه آلودگی بین سگ و گاو می‌باشد (Dubey and Schares, 2011). این

[1] -ELISA
[2] -Taxonomy
[3] -Genus
[4] - Kingdom: Protista
[5] -Subkingdom: Protozoa
[6] -Phylum: Apicomplexa
[7] -Class: Sporozoasida
[8] -Subclass: Coccidiasina
[9] -Order: Eimeriorina
[10] -Family: Toxoplasmatidae

تک‌یاخته همانند *توکسوپلاسما گوندی* دارای سه مرحله تاکی‌زوئیت، برادی‌زوئیت و اووسیست در سیر تکاملی خود می‌باشد (شکل۱-۲). اووسیست‌ها به همراه مدفوع میزبان نهایی به بیرون منتشر شده و تحت شرایط مناسب اکسیژن، رطوبت و درجه‌حرارت پس از سه روز هاگ‌دار می‌شوند. در داخل هر اووسیست هاگ‌دار، دو اسپوروسیست و داخل هر اسپوروسیست، چهار اسپوروزوئیت تشکیل می‌گردد. میانگین اندازه اووسیست‌های هاگ‌دار و اسپوروزوئیت‌ها به ترتیب ۱۱/۷×۱۱/۳ و ۶/۵×۲ میکرون است. این اووسیست‌ها از نظر ریخت‌شناسی مشابه با اووسیست‌های *توکسوپلاسما گوندیی* و *هاموندیا هاموندی*[1] در مدفوع گربه و *هاموندیا هیدورنی*[2] در مدفوع سگ می‌باشند که جهت تفریق آنها از یکدیگر استفاده از روش‌های مولکولی ضروری است (Dubey et al., 2017).

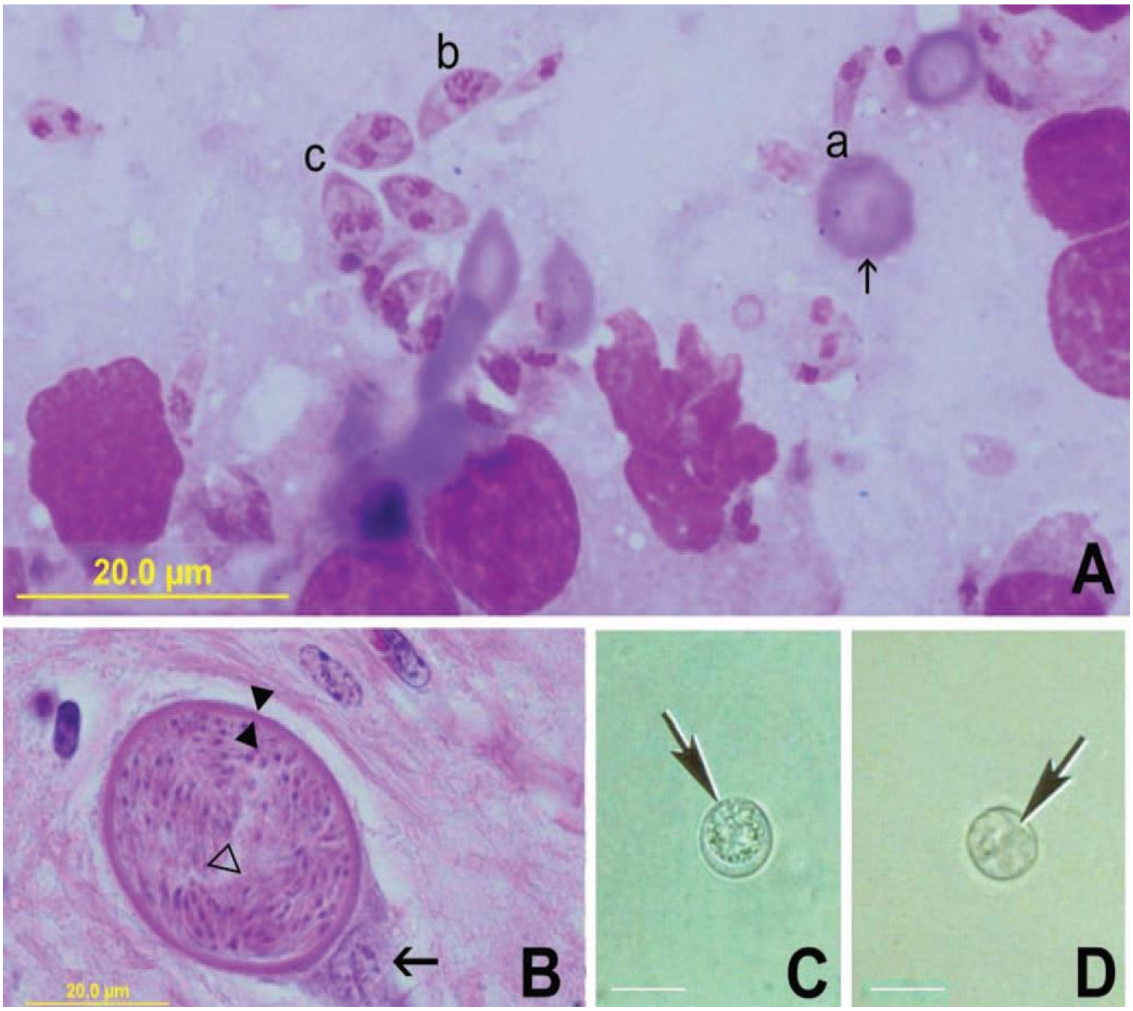
اووسیست‌های هاگ‌دار به همراه آب و موادغذایی وارد بدن میزبان واسط شده و پس از پاره شدن جدار آنها در روده، اسپوروزوئیت‌ها آزاد شده و با ورود به سلول‌های پوششی روده تبدیل به فرم تاکی‌زوئیت می‌شوند. تاکی‌زوئیت‌های هلالی شکل (۶×۲ میکرون) پس از تکثیر به روش آندودیوژنی، سلول‌های عصبی، اندوتلیال عروق، کبدی، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، میوکارد و تروفوبلاست را مورد تهاجم قرار می‌دهند. تاکی‌زوئیت‌ها می‌توانند از طریق جفت در حیوانات آبستن به جنین منتقل شوند (شکل۴-۲)(Dubey, 2003).

پس از آلوده شدن میزبان، سیستم ایمنی بر علیه تاکی‌زوئیت‌ها برانگیخته شده و باعث حذف و یا محدودشدن آنها از بافت‌ها می‌گردد؛ سپس تاکی‌زوئیت‌ها تبدیل به فرم داخل کیستی برادی‌زوئیت (۸-۷×۲ میکرون) می‌شوند. کیست‌های *نئوسپورا کانینوم* به اشکال گرد تا بیضی بوده و عمدتاً در سلول‌های عصبی یافت می‌شوند. اندازه قطر کیست‌ها تا ۱۷۰ میکرون و ضخامت دیواره آنها تا ۴ میکرون هم می‌رسد. برادی‌زوئیت‌ها درون کیست‌ها از پاسخ سیستم ایمنی میزبان در امان بوده و به حالت نهفته و بطئی زندگی می‌کنند؛ به همین دلیل

[1] -*Hamondia hamondi*
[2] -*H. hydorni*

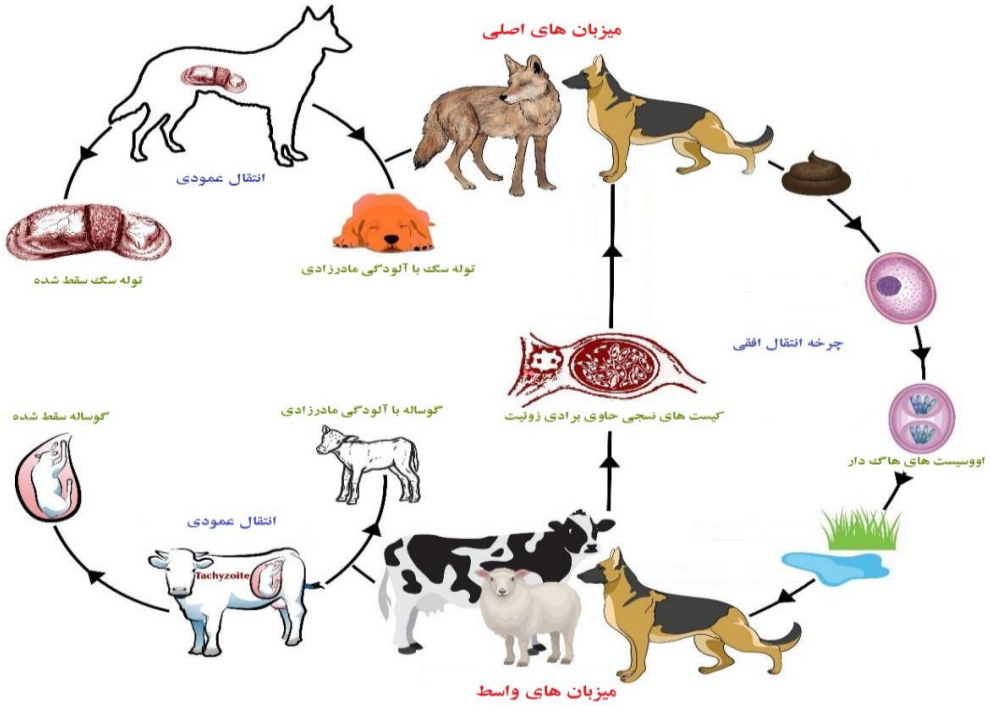
هیچ‌گونه واکنش ایمنی ایجاد نمی‌کنند. در صورتی‌که سیستم ایمنی بدن به هر دلیل تضعیف شود فرم برادی‌زوئیت مجدداً به تاکی‌زوئیت تبدیل می‌شود. کیست‌ها معمولاً در اندام‌های مغز، نخاع و شبکیه چشم یافت می‌شوند. تاکی‌زوئیت‌های موجود در جفت و همچنین کیست‌های بافت میزبان واسط منبع مهمی برای آلودگی سگ‌ها هستند. سگ‌ها به مدت ۷ تا ۱۵ روز پس از خوردن بافت‌های آلوده، اووسیست‌های انگل را با مدفوع خود دفع می‌کنند. مدت زمان دفع اووسیست‌ها توسط سگ و تناوب آنها به طور کامل مشخص نمی‌باشد؛ اما بعضی از پژوهشگران عقیده بر دفع اووسیست بیش از یک دوره دارند (Dubey et al., 2005).

تفاوت‌های بیولوژیکی در برخی از سویه‌ها گزارش شده‌است. دیواره کیست‌های نسجی در سویه Nc-Liverpool ضخیم‌تر از Nc-5 است. برادی‌زوئیت‌های سویه Nc-2 توانایی حیات در محلول پپسین–اسیدکلریدریک ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه را دارند، درحالی‌که برادی‌زوئیت‌های Nc-1 سریعاً قدرت حیات خود را از دست می‌دهند. همچنین میانگین اندازه تاکی‌زوئیت‌ها، اندازه کیست و ضخامت دیواره آن، اندازه اووسیست و تعداد اووسیست‌های دفعی از میزبان اصلی، تعداد راپتری و سرعت و میزان رشد در محیط کشت در سویه‌های مختلف متفاوت می‌باشد (Al-Qassab et al., 2010).

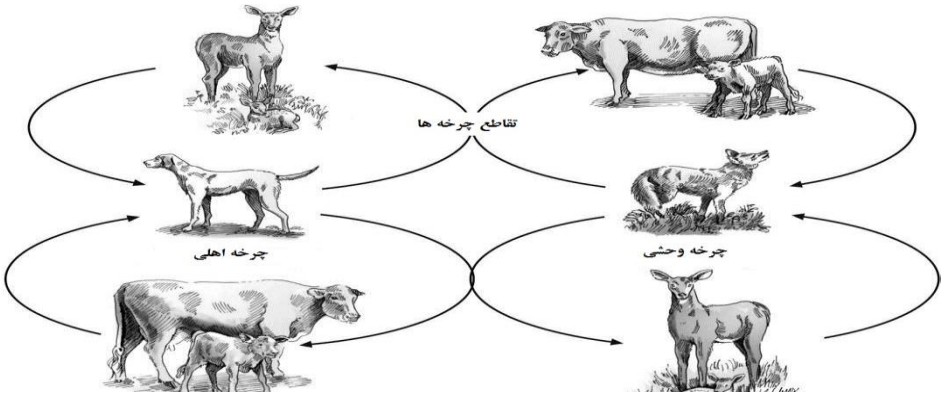


شکل ۱-۲- اشکال مختلف *نئوسپورا کانینوم* (Dubey et al., 2007).

(A): تاکی‌زوئیت با رنگ‌آمیزی گیمسا [a: فرم کشیده تاکی‌زوئیت b: تاکی‌زوئیت قبل از تکثیر c: تاکی-زوئیت در حال تقسیم]. (B): کیست نسجی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، به دیواره ضخیم کیست دقت شود. (C): اووسیست غیرهاگ‌دار. (D): اووسیست هاگ‌دار با دو اسپوروسیست تمایز یافته.



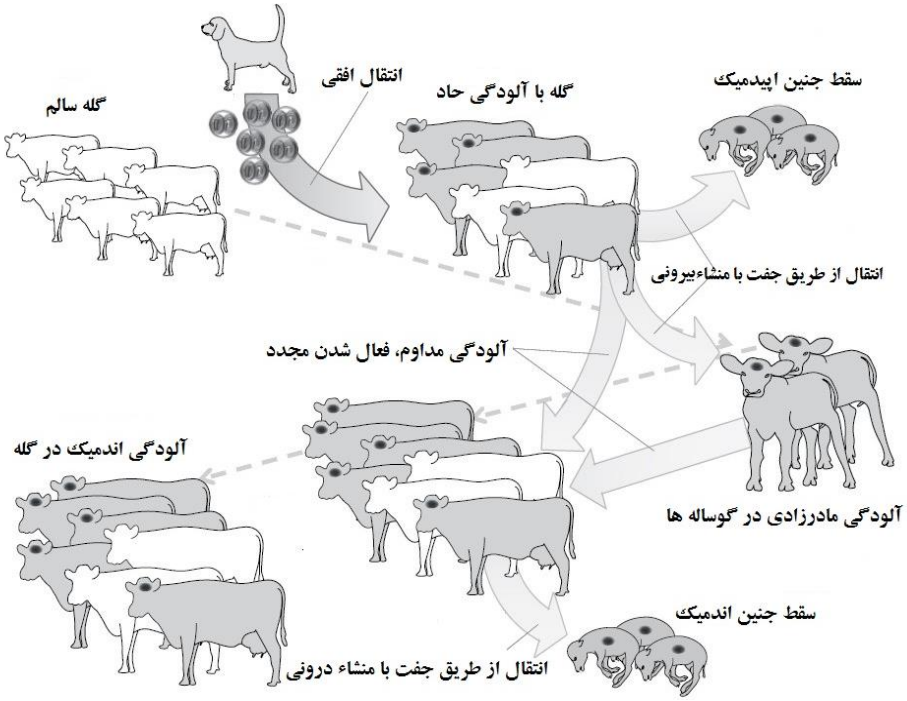
شکل ۲-۲- چرخه زندگی *نئوسپورا کانینوم* (Namavari, 2020).



شکل ۳-۲- چرخه انتقال *نئوسپورا کانینوم* در دام‌های اهلی و حیات وحش (Dubey et al., 2017**).** [انتقال در چرخه اهلی از گاو به کایوت و از آهو به سگ نشان داده شده است. احتمال انتقال بین کایوت و آهو؛ کایوت و گاو و همچنین سگ و آهو وجود دارد].

٤-٢- روش‌های انتقال انگل:

انتقال عمودی مهم‌ترین و اصلی‌ترین راه گسترش آلودگی (تا ۹۵ درصد) در حیوانات بخصوص در گاو می‌باشد (شکل۴-۲). همچنین انتقال افقی انگل از طریق اووسیست‌ها نیز نقش مهمی در همه‌گیری‌های شدید و گسترده دارد. طوفان سقط‌جنین در گله‌هایی که به تازگی آلوده شده‌اند، بیان‌گر انتقال *نئوسپورا کانینوم* از راه مدفوعی-دهانی است (Dijkstra et al., 2002; Benavides et al., 2012; Razmi et al., 2013). یافته‌های اپیدمیولوژیک نقش مهم سگ در چرخه‌زندگی این انگل را مطرح می‌کند. سگ‌ها به طور معمول از راه خوردن جنین-های سقط شده آلوده به انگل مبتلا می‌شوند (Dubey et al., 2007). DNA انگل از اسپرم و خون گاوهای نر آلوده جدا شده است؛ این موضوع بیانگر اهمیت انتقال آلودگی از طریق تلقیح مصنوعی می‌باشد (Doosti et al., 2015).



شکل ٤-٢- مراحل انتقال عمودی *نئوسپورا کانینوم* در گاو (Dubey et al., 2017).

۵-۲-تفریق *نئوسپورا کانینوم* از سایر گونه‌های مشابه:

امروزه بهترین و دقیق‌ترین ابزار تفریق گونه‌ای، استفاده از روش‌های مختلف مولکولی می‌باشد.

۱-۵-۲- *نئوسپورا هوقسی*[1]:

نئوسپورا هوقسی عامل ایجاد کننده انسفالیت پروتوزوایی در اسب می‌باشد. تاکی‌زوئیت‌های این گونه از نظر ریخت‌شناسی مشابه با *نئوسپورا کانینوم* ولیکن آنتی‌ژن‌های سطحی در آنها کاملاً متفاوت است. اندازه کیست بافتی در این گونه (۱۹/۳-۱۰/۷) × (۱۶-۶/۹) میکرون و ضخامت دیواره آن از ۰/۱۵ تا ۱ میکرون متغیر است. ژربیل‌ها نسبت به عفونت ناشی از *نئوسپورا هوقسی* مقاوم و به *نئوسپورا کانینوم* حساس هستند (Dubey et al., 2017).

۲-۵-۲- *توکسوپلاسما گوندی*:

میزبان نهایی در *نئوسپورا کانینوم* سگ و در *توکسوپلاسما گوندی* گربه است. بیشترین اهمیت نئوسپوروزیس ایجاد سقط‌جنین و فلجی در گاوهای شیری است؛ این در حالی است که توکسوپلاسموزیس از عوامل مهم ایجاد سقط‌جنین در گوسفند و همچنین انسان می‌باشد. راپتری در تاکی‌زوئیت‌های *توکسوپلاسما گوندی* دارای تراکم کمتری نسبت به *نئوسپورا کانینوم* بوده و شبیه به شان عسل (لانه زنبوری) است. ضخامت دیواره کیست در *نئوسپورا کانینوم* (۴ میکرون) نسبت به *توکسوپلاسما گوندی* بیشتر می‌باشد (Dubey, 2008).

[1] -*N. hughesi*

فصل ۳

ایمونولوژی وزیست شناسی مولکولی

۳- آنتی‌ژن‌ها و ایمونولوژی انگل:

با گسترش تحقیقات بر روی سنتز cDNA *نئوسپورا کانینوم*، دو کلون A و B ساخته شد که این کلون‌ها به ترتیب باعث تحریک پروتئین‌های ۳۵ و ۳۰ کیلودالتونی می‌شوند. این پروتئین‌های نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن در غربالگری به روش الایزا مورد استفاده قرار گرفته‌ است (Baszler et al., 2008). باربر و همکاران[1] (۱۹۹۵) نقشه آنتی‌ژنیکی دو جدایه (NC-1 و NC-Liv) *نئوسپورا کانینوم* را با هم مقایسه و باندهایی با وزن مولکولی بین ۸۰-۱۶ کیلودالتونی را شناسایی نمودند. بارتا و دوبی[2] (۱۹۹۲) تعداد ۲۰ پروتئین با اوزان بین ۸۰-۱۶ کیلودالتون را با استفاده از وسترن‌بلات شناسایی کردند. بژارکس و همکاران[3] (۱۹۹۴) ۴ آنتی‌ژن (۳۷، ۳۰،۲۹، ۱۷ کیلودالتون) را معرفی کردند. در تمامی نمونه‌های سرم گاوی که بطور طبیعی با *نئوسپورا کانینوم* آلوده شده بودند، یک آنتی‌ژن ۴۳ کیلودالتونی شناسایی شد. همچنین یک آنتی‌ژن ۶۵ کیلودالتونی با منشاء تاکی‌زوئیت‌های انگل که از مراحل اولیه عفونت

[1] -Barber et al.,
[2] -Barta and Dubey
[3] -Bjarkas et al.,

تا مراحل مزمن و یا پایانی قابل شناسایی بود، معرفی گردید. اخیراً NC-P43 به عنوان یکی از مهم‌ترین و بزرگ‌ترین پروتئین‌های سطحی که نقش اساسی در چسبیدن و تهاجم انگل به سلول‌های میزبان را دارد معرفی شده است؛ گزارش‌هایی دال بر وجود این پروتئین در هر دو مرحله تاکی‌زوئیت و برادی‌زوئیت انگل وجود دارد. پروتئین NC-P65 در آنزیم‌های پروتئولیتیک انگل شناسایی شد. *نئوسپورا کانینوم* در گاوهایی که آلودگی نهفته دارند توسط عوامل مختلفی نظیر آبستنی و عوامل کاهنده ایمنی فعال می‌شود. در موش‌هایی که آلودگی غیرفعال داشتند پس از اخذ داروهای کاهنده ایمنی، آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های مختلف انگل بخصوص پروتئین ۴۳ کیلودالتونی یافت شد (Dubey et al., 2017).

ایمنی‌سلولی پاسخ حفاظتی اصلی سیستم ایمنی به آلودگی در مقابل تک‌یاخته‌های داخل سلولی است. اینترفرون‌گاما، اینترلوکین-۱۲ و پاسخ لنفوسیت Th1 در کنترل عفونت‌های حاد نئوسپورایی نقش بسیار برجسته‌ای دارند. افزایش اینترفرون‌گاما با مکانیسم کاهش بیان BCL-2 منجر به بروز آپوپتوزیس سلول‌های آلوده می‌شود؛ این در حالی است که *نئوسپورا کانینوم* با افزایشBCL-2 باعث تداوم حیات در این سلول‌ها می‌گردد. فعال‌شدن ماکروفاژها توسط اینترفرون‌گاما منجر به مهار و کشته‌شدن *نئوسپورا کانینوم* به واسطه تولید نیتریک اکساید می‌شود. ماکروفاژها با عرضه آنتی‌ژن‌های *نئوسپورا کانینوم* از طریق مولکول‌های MHC class II باعث فعالیت اختصاصی لنفوسیت‌هایT می‌شوند. لنفوسیت‌های T، CD^{+4} توانایی حذف سلول‌های خودی آلوده به *نئوسپورا کانینوم* را از طریق فعال‌سازی مسیر پرفورین-گرانزیم دارند. لنفوسیت‌های Th1 با واسطه تولید انواع سایتوکاین‌ها و همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتریک اکساید باعث مرگ جنین می‌شوند. مرگ جنین عمدتاً در اوائل آبستنی به‌علت بروز پارازیتمی و آسیب به جفت و جنین اتفاق می‌افتد (Khan et al., 1997). پاسخ ایمنی هومورال به صورت اوج IgM و افزایش IgG (که در عرض ۶۰-۴۰ روز به حداکثر خود می‌رسد) هنگام تولد در گوساله‌ها ظاهر می‌شود. افزایش تیترIgG مادری تا یک‌سال ادامه دارد؛ در صورتی‌که در گوساله‌ها تیتر به آرامی افزایش یافته و پس از ۸ ماه مقاوم می‌گردد (Dubey et al., 2006; 2017).

پروتئین‌های سطحی *نئوسپورا کانینوم* نقش حیاتی در بقای آن ایفا می‌کنند، چون آنها تعاملات بین پاتوژن و مولکول‌های سطحی سلول‌های میزبان و همچنین پاسخ ایمنی میزبان را آغاز می‌کنند. سطح این انگل از پروتئین‌های مرتبط با گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول پوشیده شده است. اتصال انگل به سلول‌های میزبان و تعامل با پاسخ ایمنی میزبان توسط پروتئین های سطحی برای بیماری‌زایی آن لازم است. پروتئین‌های متصل به سطح، میکرونیم‌ها، راپتری‌ها و گرانول‌های متراکم نقش حیاتی در چرخه لیتیک داخل سلولی نئوسپورا کانینوم دارند. پروتئین گرانولی NcGRA7 به عنوان پروتئین ایمنی غالب معرفی شده است. NcROP2 و NcROP40 عمدتاً در رپتری‌ها قرار دارند، در حالی که NcGRA7 و NcNTPase در گرانول‌های متراکم انگل یافت می‌شوند. پروتئین روپتری NcROP2 به عنوان کاندیدای واکسن در موش‌ها آزمایش شده است. افزایش سطح پروتئین های NcRP40 و NcNTPase در سویه‌های *نئوسپورا کانینوم* با بیماری‌زایی شدید گزارش شده است. آنتی‌ژن‌های ۳۷ و ۳۰/۲۹ کیلو دالتون (P37 و P29/30) رایج‌ترین آنتی‌ژن‌های شناسایی شده هستند که به عنوان اهداف اصلی برای تشخیص سرولوژیکی در نظر گرفته می‌شوند. همچنین N54، NcDG1، NcDG2 و NcGRA2 آنتی‌ژن‌های کلون شده‌ای هستند که در آزمایشات سرولوژیکی کاربرد دارند. آنتی‌ژن‌های سطحی مانندNcSAG1 و NcSRS2 امکان تعامل اولیه بین *نئوسپورا* و میزبان را فراهم می‌کنند (Pastor-Fernández et al., 2016; Gharekhani and Ebrahimi, 2025; Gharekhani, 2026).

جدول ۱-۳- آنتی‌ژن‌های مهم شناسایی شده *نئوسپورا کانینوم* (Atkinson et al., 2000).

نوع آنتی‌ژن		منشاء
Native	p37	dense granule, parasitophorous vacuole
	p29/30	dense granule, parasitophorous vacuole
	Ncp35	cell membrane
	Ncp29	cell membrane
	p16/17	rhoptry
	p46	unknown
	Ncp43	cell membrane, dense granule, rhoptry
	Ncp36	cell membrane, dense granule
	p33	dense granule
	p65	cell membrane
Recombinant	NCDG1/N57 (NcGRA7)	dense granule
	NCDG2 (NcGRA6)	dense granule
	N54	unknown
	recNcp43	cell membrane, dense granule
	NcSAG1	cell membrane
	NcSAG2	cell membrane
	NcGRA1	unknown
	NcGRA2	unknown

فصل ۴

بیماری زایی

۱-٤- بیماری‌زایی:

نئوسپورا کانینوم توانایی تهاجم به بافت‌های مختلف را دارد؛ ولیکن بیشتر سیستم اعصاب مرکزی، میوکارد، عضلات اسکلتی و اندوتلیوم را درگیر می‌کند. آنسفالومیلیت و پلی‌میوزیت مهم‌ترین یافته‌های آسیب‌شناسی می‌باشند. تاکی‌زوئیت‌های انگل با تکثیر داخل سلولی باعث ایجاد کانون‌های نکروزه و مرگ سلولی می‌شوند. کیست‌های حاوی برادی‌زوئیت عمدتاً در بافت مغز تشکیل می‌شود. نکروزهای چندکانونی و آنسفالومیلیت غیرچرکی ضایعات اصلی در جنین‌های سقط شده می‌باشد. آلودگی مادرزادی در بره‌ها با علائم آنسفالیت و در کره اسب-های سقط شده با ضایعات ریوی همراه است. با تهاجم انگل به عروق خونی جفت، التهاب جفت و واسکولیت در جنین ایجاد شده که پس از دژنره شدن کوریوالانتویس، نکروز وسیعی در سطح جفت تشکیل می‌گردد (Sasani et al., 2013).

در کشت سلول‌های عصبی بیشترین تهاجم انگل در آستروسیت‌ها مشاهده شده است. از آنجایی که آستروسیت‌ها نقش مرکزی در متابولیسم انرژی مغز داشته و ذخایر گلیکوژنی را تامین می‌کنند؛ لذا تهاجم انگل به این سلول‌ها یک امتیاز برای انگل محسوب می‌شود.

اینترفرون گاما با مکانیسم غیر وابسته به نیتریک اکساید (محرومیت از آهن و یا محرومیت از تریپتوفان) تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها را در آستروسیت‌ها مهار می‌کند. اسیدسیالیک موجود در سطح سلول‌های میزبان روند تهاجم تاکی‌زوئیت *نئوسپورا کانینوم* را تحت تاثیر قرار می‌دهد. خارج ساختن اسیدسیالیک از سلول‌ها شدت تهاجم را افزایش داده و درمان انگل با مهارکننده آنزیم سیالیداز را مهار می‌کند. پروتئین ۴۳ دالتونی (P43) نقش مهمی در اتصال و تهاجم تاکی‌زوئیت انگل به سلول‌های میزبان دارد. همچنین پروتئین ۶۵ کیلودالتونی (P65) موجود در آنزیم‌های پروتئولیتیک انگل، در بیماری‌زایی آن اهمیت دارد (Dubey et al., 2006; 2017; Khan et al., 2020).

اختلاف قابل توجهی در ژنوتیپ و فنوتیپ سویه‌های مختلف *نئوسپورا کانینوم* گزارش شده‌است. علی‌رغم وجود نظرات مختلف در مورد تنوع ژنتیکی و مکانیسم بیماری‌زایی انگل، ولیکن ارتباط دقیق این دو به طور دقیق مشخص نمی‌باشد (Pérez-Zaballos et al., 2005). جدایه‌های گزارش شده از گوساله و یا گوسفندان بدون علائم (JAP1, Nc-Sheep, Nc-Nowra, Nc-Spain 1H, Nc-Goiás) حدت بیماری‌زایی کمتری در مقایسه با جدایه‌هایی که از گوساله‌های دارای علائم بالینی (گوساله‌های بیمار یا سقط کرده) داشتند. در ارزیابی آزمایشگاهی سویه Nc-Goias1 برزیل، تمامی موش‌های آلوده شده بدون ظهور علائم بالینی زنده ماندند؛ به همین دلیل به عنوان یک سویه با حدت بیماری‌زایی کم (در مقایسه با Nc-1 و Nc-Liverpool) معرفی شده است (García-Melo, et al., 2009). مایلر و همکاران[1] (۲۰۰۲) در استرالیا، Nc-Nowra را یک سویه با حدت بیماری‌زایی کم معرفی نموده و آن را کاندید مناسبی برای واکسن پیشنهاد نمودند. سویه Nc-Liverpool در گاو شدیداً بیماری‌زا بوده و باعث مرگ جنین می‌شود. این سویه در مدل موشی آسیب بافتی شدیدتری در سیستم اعصاب مرکزی در مقایسه با Nc-SweB1 و Nc-Nowra ایجاد نمود

[1] - Miller et al.,

(Williams et al., 2000). در مطالعه آلمریا و همکاران[1] (۲۰۱۰)، سویه Nc-Illinois باعث مرگ جنین در اواسط آبستنی گاو شد. پیرو گزارش القصاب و همکاران[2] (۲۰۰۹)، رابطه بین بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی در همه سویه‌ها مصداق ندارد. نکته مهم این‌که بیشتر جدایه و سوش‌ها قبل از ارزیابی در محیط کشت‌های سلولی نگهداری می‌شوند و پاساژهای طولانی می‌تواند بیماری‌زایی آنها را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین با توجه به اینکه سنجش و یا ارزیابی بیماری‌زایی سوش‌های مختلف انگل عمدتاً در شرایط آزمایشگاهی صورت می‌پذیرد، حساسیت گونه‌های مختلف حیوانات آزمایشگاهی نیز بایستی مد نظر قرار گیرد (Bartley et al., 2006).

سویه Nc-Liverpool دارای حدت بیماری‌زایی شدید بوده و باعث مرگ جنین در گاوهای آبستن می‌شود. این در حالی است که سویه Nc-Nowra به دلیل حدت کم برای واکسن‌های تخفیف حدت یافته استفاده می‌شود. در تحقیقات آزمایشگاهی بر روی مدل موش، سویه Nc-Liverpool با ایجاد نئوسپوروزیس شدید باعث بروز علائم انسفالیت، فلجی و کاهش وزن شدید شده است. Nc-SweB1 یک سویه معرفی شده از گاوهای سوئدی است که علائم و بیماری‌زایی مختصری دارد. Nc-1 یک سویه شناخته شده‌ای است که علائم بالینی بسیار شدید و آشکاری مثل مرگ جنین در گاوهای آبستن و همچنین پلی‌میوزیت گرانولوماتوز[3] و پلی‌رادیکولونورایتیس[4] در سگ‌های آلوده دارد. مطالعات محدودی در مقایسه رفتار سویه‌های مختلف در گاو انجام شده است و بیشتر تفاوت بیماری‌زایی آنها در مدل‌های موشی بررسی شده است. در مقایسه سویه‌های BPA1 و Nc-Spain1H، سویهBPA1 باعث مرگ جنین در روز ۱۱۸ از آبستنی در گوساله‌ها شده است. همچنین در مقایسه دو سویه با حدت بیماری‌زایی بالا، Nc-Spain7 در مقایسه باNc-1 باعث مرگ و سقط‌جنین بیشتر و

[1] - Almeria et al.,
[2] - Al-Qassab et al.,
[3] - Granulomatous polymyositis
[4] - Polyradiculoneuritis

پاسخ آنتی‌بادی سریع‌تر و بیشتر بود (Rojo-Montejo et al., 2009; Calarco et al., 2018).

۲-٤- یافته‌های کالبدگشایی:

جنین‌های سقط شده عمدتاً دچار اتولیز شده و به همراه تجمع خونابه‌ای شکل در حفرات بدن دیده می‌شود. گاهاً کانون‌های سفید سرسوزنی به صورت ماکروسکوپی در عضلات مشاهده می‌شوند. شایع‌ترین آسیب بافتی شامل التهاب جفت، آنسفالیت کانونی غیرچرکی، میوکاردیت غیرچرکی، میوزیت و نفوذ گسترده سلول‌های آماسی غیرچرکی در سایر بافت‌ها می‌باشد (Dubey et al., 2017).



شکل ۱-٤- آسیب‌های نئوسپوروزیس در جنین گاو (Dubey et al., 2017).

[a) اتولیز در ماه هفتم آبستنی b,c) جنین مومیایی شده در ماه سوم آبستنی]

۳-٤- علائم بالینی:

۱-۳-٤- گاو:

سقط‌جنین مهم‌ترین نشانه بالینی در گاوهای آبستن است. اغلب سقط‌جنین‌ها درسه ماهه دوم آبستنی (عمدتاً ماه پنجم و ششم) رخ می‌دهد. جنین‌ها عمدتاً اتولیز شده و در رحم یا به صورت مرده و مومیائی شده بوده و یا بازجذب می‌شوند. آلودگی پیش از۲۰ هفتگی منجر به جذب مجدد جنین یا سقط می‌شود، در صورتی‌که آلودگی پس از ۲۰ هفتگی منجر به مرده‌زایی یا عفونت مادرزادی می‌گردد. در الگوی سقط‌جنین اندمیک، سقط‌جنین در ۳ تا ۵ درصد گله در طول سال بدون هیچ‌گونه افزایش ناگهانی رخ می‌دهد؛ در حالی‌که در سقط اپیدمیک در مدت ۲ماه بیش از ۱۲/۵ درصد از دام‌های آبستن دچار سقط می‌شوند. گاهاً عفونت نئوسپورایی در جنین منجر به تولد گوساله‌هایی می‌شود که دوره آبستنی را بطورکامل طی نموده ولیکن بعد از تولد علائم بالینی ظاهر می‌شود. علائم بالینی عمدتاً در گوساله‌هایی با سن کمتر از ۲ ماه دیده می‌شود. علائم بالینی با منشاء آسیب‌های عصبی مثل آتاکسی، کاهش رفلکس کشکک زانو، عملکرد نامطلوب اندام‌های حرکتی، لرزش همراه با نقص سیستم اعصاب مرکزی تا فلجی کامل در اثر آنسفالومیلیت چندکانونی دیده می‌شود. وزن کم، عدم توانایی در برخاستن و مشکلات اندام‌های حرکتی خلفی یا قدامی نیز دیده می‌شود (شکل ۲-۴). اگزوفتالمی، چشم-های ناقرینه، اختلالات رشد در سیستم اعصاب مرکزی مانند هیدروسفالوس و باریکی طناب نخاع از علائم نادر نئوسپوروزیس هستند. خطر سقط‌جنین در آبستنی اول در مقایسه با آبستنی دوم بیشتر است؛ همچنین سقط‌جنین در مراحل اولیه آبستنی شایع‌تر است که احتمالاً به علت تکامل سیستم ایمنی و اثر حفاظتی آن در دام‌های آلوده می‌باشد (Bowman, 2015; Riberio et al., 2019).



شکل ۲-٤- فلجی در گوساله مبتلا به نئوسپوروزیس (Dubey et al., 2017**).**

۲-۳-٤- سگ:

شایع‌ترین یافته بالینی در سگ‌های مبتلا به نئوسپوروزیس فلجی ناقص پاهای عقب است که در نهایت به فلجی کامل و پیشرونده منتهی می‌شود (شکل ۳-۴). نشانه‌های عصبی بستگی به محل درگیری دارد. پاهای عقب بیشترین درگیری را داشته که در این حالت پاها کشیده و سفت می‌شوند. کشیدگی بیش از حد پاهای خلفی به دلیل فلجی اعصاب حرکتی بالایی و التهاب عضلات است که باعث انقباض پیشرونده و فیبروزی شدن عضلات و سفت شدن مفاصل می‌گردد. بیماری ممکن است بصورت محدود و کانونی و یا گسترده و عمومی باشد که در این‌صورت باعث درگیری تمامی اندام‌ها از جمله پوست می‌شود (Dubey et al., 1998; Beugnet et al., 2018).



شکل ۳-٤- فلجی اندام خلفی در یک سگ مبتلا به نئوسپوروزیس (Dubey et al., 2017**).**

۳-۳-٤- گوسفند و بز:

نئوسپوروزیس باعث تولد بره‌های مبتلا به آنسفالیت در آلودگی‌های مادرزادی می‌شود. مرگ جنین، جذب یا سقط‌جنین در میش‌هایی که در روزهای ۴۵، ۶۵ و۹۰ آبستنی از طریق بلع اووسیست آلوده شده بودند، گزارش شده است. علائم نئوسپوروزیس در بز مشابه با گوسفند می‌باشد (Gharekhani et al., 2013b, 2016, 2018).

٤-۳-٤- اسب:

نئوسپورا هوقسی گونه ای مشابه با *نئوسپورا کانینوم* است که در اسب باعث ایجاد ناتوانی پیشرونده در سیستم عصبی و فلجی با شروع ناگهانی می‌شود (Gharekhani et al., 2013c; Namavari, 2020).

۵-۳-٤- گربه:

آلودگی تجربی گربه‌ها به *نئوسپورا کانینوم*، باعث بروز میوزیت و آنسفالیت شده است (Dubey et al., 2017).

٦-۳-٤- انسان:

در مورد نئوسپوروزیس در انسان، گروه‌های مختلفی (افراد سالم بالغ، نوزادان، افراد ایدزی و دارای بیماری عصبی) مورد بررسی سرمی قرار گرفته‌اند که نتایج حاکی از وجود مقادیر مختلفی از تیتر آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در این افراد به ویژه بیماران مبتلا به ایدز و دارای نشانه‌های عصبی می‌باشد (Dubey et al., 2007; Duart et al., 2020).

با توجه به اینکه فرضیه مشترک بودن نئوسپوروزیس بین انسان و حیوانات به دلیل ارتباط نزدیک بیولوژیکی بین *نئوسپورا کانینوم* و *توکسوپلاسما گوندی* تاکنون رد نشده است و همچنین گزارشات متعددی از تیتر آنتی‌بادی ضد انگل در افراد مختلف بخصوص افراد با نقص سیستم ایمنی وجود دارد (جدول ۱-۳)، ولی هنوز این نگرانی در مورد آلوده‌شدن افرادی که در ارتباط مستقیم با سگ‌ها هستند (همانند دامپزشکان، دامداران و کارگران) برطرف نشده است (McCann et al., 2008).

بر اساس نتایج مطالعات صورت گرفته، آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا* در افراد بررسی شده از کشورهای مختلف بین صفر تا ۳۷/۷ درصد گزارش شده است. میزان شیوع سرمی به این انگل در افراد ایدزی به دلیل نقص سیستم ایمنی در مقایسه با سایر افراد بطور معنی‌داری بیشتر است. فرم آلودگی و عوارض آن در دوران بارداری (همانند توکسوپلاسموزیس؟) مشخص نیست. ولیکن انجام آزمایشات تشخیصی تخصصی به غربالگری‌های روتین پیش از تولد، به ویژه در افراد با سیستم ایمنی ضعیف، کمک می‌کند. شناسایی آنتی‌بادی ضد*نئوسپورا* در انسان نشان می‌دهد که افراد در معرض این انگل قرار گرفته اند. مطالعات پژوهشی جامع با تاکید بر بیولوژی مولکولی و بررسی‌های ژنوتیپی بر روی جدایه‌های *نئوسپورا کانینوم* برای

روشن شدن عوامل خطر مرتبط با این آلودگی در انسان ضروری است (Gharekhani et al., 2021).

جدول ۱-۳-گزارشات آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در انسان (Gharekhani et al., 2021).

کشور	منبع نمونه ها	روش تشخیصی	تعداد نمونه (مثبت٪)	منبع
کره جنوبی	اهداکنندگان خون (توکسوپلاسموز مثبت)	ایمونوفلورسانس، الایزا و ایمونوبلات	۱۷۲ (۶/۷)	(Nam et al.,1998)
	اهداکنندگان خون (توکسوپلاسموز منفی)	ایمونوفلورسانس، الایزا و ایمونوبلات	۱۱۰ (۰/۹)	
ایرلند	اهداکنندگان خون	ایمونوفلورسانس	۱۹۹ (۵/۵)	(Graham et al.,1999)
	کارگران دامداری	ایمونوفلورسانس	۴۸ (۴/۲)	
دانمارک	زنان با سابقه سقط جنین مکرر	ایمونوفلورسانس، الایزا و ایمونوبلات	۷۶ (۰)	(Petersen et al.,1999)
امریکا	اهداکنندگان خون	ایمونوفلورسانس	۱۰۲۹ (۶/۷)	(Tranas et al., 1999)
برزیل	افراد ایدزی	ایمونوفلورسانس، الایزا و ایمونوبلات	۶۱ (۳۷/۷)	(Lobato et al., 2006)
	افراد با علایم عصبی		۵۰ (۱۸)	
	نوزادان		۹۱ (۵/۵)	
	افراد بدون علامت		۵۴ (۵/۶)	
	کشاورزان بدون علامت	ایمونوفلورسانس	۷۶ (۱۰/۵)	(Benetti et al., 2009)
	افراد ایدزی	ایمونوفلورسانس	۳۴۲ (۲۶/۶)	(Oshiro et al., 2015)
	زنان باردار	ایمونوفلورسانس و روش مولکولی	۲۰۱ (۲۴ سرمی و ۱ مولکولی)	(Duarte et al., 2020)
بریتانیا	کارگران دامداری و زنان با سابقه سقط	ایمونوفلورسانس	۴۰۰ (۰)	(Trees and Williams, 2000)
	مراجعین به آزمایشگاه	ایمونوفلورسانس و الایزا	۳۲۳۲ (۰)	(McCann et al., 2008)
	کارگران دامداری	ایمونوفلورسانس و الایزا	۵۱۸ (۰)	
مصر	زنان باردار	الایزا	۱۰۱ (۷/۹)	(Ibrahim et al., 2009)
فرانسه	افراد ایدزی	ایمونوفلورسانس	۴۰۰ (۱)	(Robert-Gangneux and Klein, 2009)
	زنان سالم	ایمونوفلورسانس	۵۰۰ (۰)	
اسپانیا	افراد با علایم توکسوپلاسموزیس	روش مولکولی	۶۰۰ (۰)	(Calero-Bernal et al., 2019)

فصل ۵

اپیدمیولوژی

۵- اپیدمیولوژی:

نئوسپوروزیس یک بیماری با گسترش جهانی است. مطالعات انجام شده در میزبان‌های مختلف نشان از وجود انگل و همچنین مقادیر مختلفی از آنتی‌بادی ضدانگل در اکثر مناطق جهان است (Dubey et al., 2007, 2017).

۵-۱- وضعیت آلودگی در ایران:

برای اولین بار آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* از گاوهای شیری منطقه مشهد توسط صدربزاز و همکاران گزارش گردید (Sadrebazzaz et al., 2004). اکنون گزارشات متعددی درمورد میزان آلودگی به این انگل از میزبان‌های مختلف بخصوص گاو و سگ در ایران در دسترس می‌باشد (Namavari, 2020). در یک گزارش متاآنالیز، شیوع سرمی *نئوسپورا کانینوم* در گاوهای ایران ۲۳/۶ درصد گزارش و ارتباط آماری معنی‌داری بین میزان آلودگی و سابقه سقطجنین مشاهده شد؛ این ارتباط در متغیرهای سن و نژاد معنی‌دار نبود (Ansari-Lari,

2020). در گزارشی جدید از وضعیت آلودگی در ایران، این میزان در جمعیت گاوی ۳/۸ تا ۷۶/۲ درصد، سگ‌ها صفر تا ۵۴/۶ درصد، گوسفندان ۰/۹ تا ۹/۹ درصد، بزها ۶/۲ تا ۱۰/۸ درصد، گاومیش ۱۹/۲ تا ۵۵/۹ درصد، اسب ۲۰ تا ۴۲/۲ درصد، الاغ ۵۲ درصد، شتر ۳/۲ تا ۲۷ درصد، گربه ۱۴ تا ۱۹ درصد، جوندگان صفر تا ۲۰/۴ درصد، مرغ ۱۷/۳ درصد، کبوتر ۹/۸ تا ۳۰/۴ درصد، گنجشک ۲/۸ تا ۳/۷ درصد و در کلاغ ۹/۹ درصد محاسبه شده است (Gharekhani et al., 2020a). جهت سهولت در دسترسی به نتایج، تمامی مطالعات انجام شده در ایران بر اساس منطقه و میزبان در جداول ۱–۵ تا ۵–۵ خلاصه شده است.

۲-۵- وضعیت آلودگی در جهان:

گزارشات بسیار متعدد و متفاوتی از میزبان‌های مختلف در مورد آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* منتشر شده است (جدول ۶–۵) که با توجه چرخه زندگی انگل، نقش سگ و گاو در میان سایر میزبانان برجسته می‌باشد (Dubey et al., 2007, 2017). در یک بررسی تجمعی میزان آلودگی در جمعیت سگ‌ها ۱۷/۱۴ درصد (بیشترین آلودگی ۴۱/۳۶ درصد در بلژیک و کمترین ۱/۶۲ درصد در گرنادا) گزارش شد. میزان آلودگی در نرها ۱۵/۸۴ درصد و در ماده‌ها ۱۵/۱۸ درصد محاسبه شد. همچنین بر اساس منطقه جغرافیایی، میزان آلودگی در افریقا ۲۶/۵۹ درصد، استرالیا ۲۱/۳۵ درصد، آسیا ۱۹ درصد، اروپا ۱۷/۷۲ درصد و امریکا ۱۵ درصد گزارش گردید (Anvari et al., 2020).

در بررسی مقالات منتشر شده در کشورهای مختلف، آلودگی تجمعی در جمعیت گاوها ۲۰ درصد گزارش شده است (قاره امریکا ۲۰ درصد، آسیا ۱۸ درصد، اروپا ۱۵ درصد، افریقا ۱۳ درصد و استرالیا ۸ درصد). میزان آلودگی در گاوهای شیری بیشتر از گوشتی و همچنین در گاوهای با سابقه سقطجنین ۱/۶ برابر بیشتر از بدون سابقه سقطجنین بود. همچنین ارتباط آماری معنی‌داری بین آلودگی و سن گاوها گزارش نشد (Ribeiro et al., 2019).

۳-۵- مقایسه وضعیت آلودگی در جهان و بررسی فاکتورهای خطرمهم:

۱-۳-۵-گاو:

نئوسپوروزیس به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده سقط جنین در گاو در مناطق مختلف جهان شناخته شده است. گونه‌های مختلفی از حیوانات اهلی و وحشی به عنوان میزبان‌های اصلی و واسط *نئوسپورا کانینوم* معرفی شده‌اند؛ ولی سگ و گاو بیشترین نقش را در تکمیل و تکرار چرخه‌ی زندگی انگل و همچنین بروز خسارات اقتصادی دارند (Dubey et al., 2007). آگاهی از وضعیت آلودگی و همچنین شناسایی عوامل خطر در یک منطقه در نحوه مدیریت برنامه‌های کنترل، پیشگیری و کاهش مواجهه با عوامل خطر بسیار موثر است. بررسی این عوامل در یک جمعیت کنترل شده همانند دامداری‌های محصور می‌تواند علاوه بر کاهش خطاهای پژوهشی، بسیاری از واقعیت‌های پنهان و دور از دسترس را برای ما آشکار سازد و روابط بین انگل و میزبان‌های مختلف، نحوه گردش و تعامل آنها در محیط را مشخص کند.

فراوانی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گاوهای مناطق مختلف دنیا ۲۰ درصد و در گاوهای ایران ۲۳/۶ درصد گزارش شده است (Riberio et al., 2019; Ansari-Lari, 2020). میزان شیوع آلودگی در گاوهای شیری ایران بین ۷۶/۲-۳/۸ درصد است (Binaei, 2016; Noori et al., 2019). در مطالعه قره خانی و یخچالی (۲۰۱۹) در استان همدان، فراوانی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گاوهای آبستن گله‌های گاو شیری استان همدان بر اساس ارزیابی‌های سرمی و مولکولی تا حدودی نزدیک به گزارش‌ها از گاوهای شیری آبستن در شیراز (۳۰/۴ درصد) و تهران (۳۸/۸ درصد) بود (Salehi et al., 2010; Ansari-Lari et al., 2017)؛ و نیز مشابه سایر کشورها نظیر برزیل (۲۵ درصد)، ایتالیا (۲۴/۴ درصد) و نیوزیلند (۲۵/۲ درصد) بود (Magnino et al., 1999; Patitucci et al., 1999; Martins et al., 2011). میزان فراوانی آلودگی بر اساس نوع نمونه، آب و هوای منطقه و روش‌های تشخیصی متفاوت است (Dubey et al., 2017). شرایط اقلیمی و تفاوت‌های آب و هوایی یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار در میزان شیوع متفاوت *نئوسپورا کانینوم* است. به طور معمول در

مناطق بارانی به دلیل رطوبت بالا میزان آلـودگی بیشـتر از منـاطق گـرم و خشـک اسـت. در مطالعات قبلی میزان فراوانی آلودگی در استان سیستان و بلوچسـتان ۳/۸ درصـد و در نـواحی شمال ایران ۵۷/۳ درصد گزارش شد (Youssefi et al., 2010; Noori et al., 2019).

در پژوهش قره خانی و همکاران (۲۰۱۹) فراوانی بین گله‌ای تا حدودی مشابه با نتـایج یک بررسی در تایلند (۴۶ –۰ درصد) بود (Chanlun et al., 2002). البته گزارشات متفـاوتی از مشهد (۱۹/۶–۱۵/۷ درصد) و همـدان (۵۰ –۰ درصـد) در ایـران (Sadrebazzaz et al., 2004; Gharekhani et al., 2014)، اسـترالیا و نیوزلنـد (۳۵–۳۱ درصـد)، ویتنـام (۳۵–۱۶ درصد) و اسپانیا (۹۴ –۰ درصد) نیـز در دسـترس مـی‌باشـد (Dubey et al., 2007,2017). گستره تفاوت در فراوانی آلودگی بین گله‌ای می‌تواند مربوط به شرایط متفاوت مدیریتی، تعداد نمونه و روش نمونه‌گیری از گله باشد.

گزارشات مختلفی از نقش و تأثیر سن دام در فراوانی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در دام‌ها در دسترس می‌باشد. در پژوهش قره خانی و یخچالی (۲۰۱۹)، میزان فراوانی آلودگی در گروه‌های سنی مختلف علی‌رغم افزایش فراوانی آلودگی با افزایش سن دام، ولیکن معنی‌دار نبود. این یافته با گزارش حیدری و همکاران (۲۰۱۴)، قره‌خانی و حیدری (a ۲۰۱۴) و نورالهی‌فرد و همکاران (۲۰۰۸) هم‌خوانی داشت. رزمی و همکاران (۲۰۰۶) و قره‌خانی و همکاران (۲۰۱۳a) ارتباط معنی‌داری بین آلودگی و سن دام را گزارش نمودند. در مطالعه یوسفی و همکاران (۲۰۱۰) افزایش قابل توجه فراوانی آلودگی در گروه سنی ۵–۴ سال گزارش شد. ولی در مطالعه صدربزاز و همکاران (۲۰۰۴) سطح یکسانی از آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در تمامی گروه‌های سنی گزارش شد. افزایش میزان فراوانی سرمی این انگل با افزایش سن دام متأثر از تعداد نمونه مورد مطالعه است (Gharekhani and Heidari, 2014a,b). در گزارشی تیتر سرمی پایین آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در گروه‌های سنی بیش از ۲ سال بود که می‌تواند به دلیل آلودگی مادرزادی باشد (Dubey et al., 2007). انتقال عمودی *نئوسپورا کانینوم* در گاوهای با آلودگی مزمن در گروه‌های سنی پایین بیشتر است (Dubey et al., 2007). به دلیل اختلاف آلودگی در گروه‌های سنی و عدم ارتباط

معنی‌دار در این مطالعه، هر دو راه انتقال آلودگی (عمودی و افقی) در واحدهای گاوداری وجود داشت.

در مطالعه قره خانی و یخچالی (۲۰۱۹)، فراوانی آلودگی در دام‌های نژاد اصیل هلشتاین بیشتر از نژاد دورگ و معنی‌دار بود. در مطالعه قره‌خانی و همکاران (۲۰۱۳a) ارتباط آماری معنی‌داری بین میزان آلودگی گاوهای بومی (۲۰ درصد)، گوشتی (۱۹/۸ درصد) و شیری (۱۲/۸ درصد) گزارش گردید. در بررسی همفیل و گاتستین[1] (۲۰۰۰) و قره‌خانی و طاووسی‌دانا (۲۰۱۳) از مقایسه آلودگی در دو گروه از دام‌های هلشتاین و دورگ ارتباط معنی‌داری یافت نشد. میزان حساسیت گاوهای شیری به نئوسپوروزیس ۱/۶ برابر بیشتر از گاوهای پرواری نژاد گوشتی گزارش شد و یکی از دلایل آن تفاوت در نوع سیستم پرورشی بود (Riberio et al., 2019).

سقطجنین مهم‌ترین نشانه بالینی نئوسپوروزیس در گاو می‌باشد (Dubey, 2003). ارتباط مستقیمی بین میزان تیتر آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در گاو مادر و بروز سقطجنین وجود دارد (De Meerschman et al., 2002). خطر سقطجنین در دام‌های مبتلا به نئوسپوروزیس ۱۴/۳ درصد تخمین زده شده است (Reichel et al., 2013). خطر سقطجنین در گاوهای شیری در مقایسه با گوشتی بیشتر است (Benavides et al., 2012). احتمال سقطجنین در مادران سرم مثبت ۲۶-۱/۶ برابر بیشتر از مادران سرم منفی است (Schares et al., 2004; Razmi et al., 2006; Ribeiro et al., 2019; Lefkaditis et al., 2020). میزان سقطجنین‌های ناشی از نئوسپوروزیس در ایران ۶۶/۷ -۷/۸ درصد گزارش شده است و از ۶۶/۷-۱۱ درصد از جنین‌های سقط شده DNA انگل جدا شده است (Sadrebazzaz et al., 2004; Habibi et al., 2005; Razmi et al., 2006; Salehi et al., 2010; Nematollahi et al., 2011a; Rafati and Jafarian, 2014; Gharekhani et al., 2014; Ansari-Lari et al., 2017). انصاری لاری و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تا ۳۰ درصد از سقطجنین‌ها را می‌توان با مدیریت و کنترل این بیماری در سطح گله محدود کرد.

[1] - Hemphill and Gottstein

حذف دام‌های سرم مثبت با سابقه سقط‌جنین در کاهش آلودگی گله و متعاقب آن کاهش خسارات اقتصادی ناشی از این آلودگی نقش مهمی دارد (Ansari-Lari et al., 2017). در مطالعات قره‌خانی و حیدری (۲۰۱۴a) و حسینی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۷) ارتباط معنی‌داری بین فراوانی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* و سابقه سقط‌جنین گزارش شد. در گزارش یوسفی و همکاران (۲۰۱۰)، درصد قابل توجهی از دام‌های سقط کرده (۴۵/۲ درصد در گرمسار و ۵۷/۳ درصد در بابل) از نظر آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* مثبت بودند. بیشترین فراوانی آلودگی در سه ماهه دوم آبستنی و با سابقه ۳ یا بیش از ۳ بار آبستنی گزارش شده است (Jensen et al., 1999). خطر آلودگی با افزایش تعداد و مرحله آبستنی در دام افزایش می‌یابد. با افزایش سن دام بخصوص در دامداری‌های دارای سگ، نقش انتقال افقی انگل برجسته‌تر می‌شود (Dubey et al., 2007).

اسپرم نقش مهمی در انتقال آلودگی در گاو دارد (Canada et al., 2006). ارزیابی آلودگی اسپرم به *نئوسپورا کانینوم* قبل از تلقیح و گاوهای نر قبل از جفت‌گیری در پیشگیری از بروز آلودگی موثر است. در گزارشات شریف‌زاده و همکاران (۲۰۱۲) و دوستی و همکاران (۲۰۱۵)، ۷/۴–۱۰/۵ درصد از اسپرم‌های مورد استفاده برای تلقیح مصنوعی آلوده به *نئوسپورا کانینوم* بودند. در مطالعه قره‌خانی و یخچالی (۲۰۱۹)، ۳۳/۷ درصد از دام‌های آلوده به روش تلقیح‌مصنوعی آبستن شده بودند که در مقایسه با روش توام تلقیح‌مصنوعی و گاونر معنی‌دار بود. در گزارشاتی از اسپانیا و ایران، فراوانی آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در دام‌های آبستن به روش تلقیح مصنوعی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر روش‌ها گزارش شد (Ortega-Mora et al., 2003; Sharifzadeh et al., 2012). فراوانی آلودگی در دامداری‌های برزیل که فقط از روش باروری تلقیح مصنوعی استفاده می‌کردند ۲ برابر بیشتر از سایر روش‌ها بود (Snak et al., 2018). در گزارش اوکومو و همکاران[1] (۲۰۱۹)، میزان سقط‌جنین در گاوهای شیری کنیا با سابقه تلقیح با اسپرم‌های وارداتی به طور معنی‌داری بیشتر بود. لوپزگاتیوس و

[1] - Okumu et al.,

همکاران[1] (۲۰۰۵)، استفاده از اسپرم گاوهای نر گوشتی برای تلقیح گاوهای شیری را به دلیل دورگه‌گیری یک عامل محافظت‌کننده معرفی نمودند.

انتقال عمودی یا انتقال از طریق جفت *نئوسپورا کانینوم* از مهم‌ترین عوامل خطر نئوسپوروزیس در گاو است که فراوانی آن تا ۹۳/۷ درصد گزارش شده است (Dubey et al., 2007). این روش انتقال نقش مهمی در بقای آلودگی در گله و همچنین انتقال آلودگی به نسل‌های بعدی دارد (Japa et al., 2019). انتقال عمودی انگل همانند سقط‌جنین ارتباط مستقیمی با تیتر آنتی‌بادی‌های ضد *نئوسپورا کانینوم* در مادران آبستن دارد (Razmi et al., 2013). در این پژوهش میزان انتقال عمودی انگل در دام‌های آبستن ۱۳/۶ درصد بود که این میزان کمتر از گزارشات قبلی در شمال شرق ایران (۵۲ درصد) و تایلند (۳۶/۵ درصد) بود (Razmi et al., 2013; Japa et al., 2019). تفاوت‌های آب و هوایی در مناطق مورد مطالعه، روش‌های تشخیص آزمایشگاهی و همچنین نوع مدیریت حاکم در دامداری‌ها از علل اصلی اختلاف نتایج است (Dubey et al., 2017).

سن دام و مرحله آبستنی در سطح آنتی‌بادی ضدانگل در بدن دام آبستن موثر است (Razmi et al., 2013). بیشترین موارد سقط‌جنین در این مطالعه با اختلاف معنی‌داری در دام‌های آبستن زیر ۲ سال بود که ممکن است به دلیل وجود مقدار کم آنتی‌بادی محافظ ضدانگل و سطح ایمنی بدن دام‌های آبستن و همچنین نقش برجسته انتقال افقی در گله باشد. رایبریو و همکاران[2] (۲۰۱۹) ارتباط معنی‌داری بین سقط‌جنین و سن دام گزارش نکردند. در این تحقیق، سقط‌جنین در دام‌های اصیل هلشتاین بیشتر از دام‌های دورگ بود که مشابه با گزارشاتی از آرژانتین، ونزوئلا و اتیوپی بود (Dubey et al., 2007; Dubey and Schares, 2011). تمامی سقط‌جنین‌ها در دام‌های آبستن در سه ماهه دوم رخ داد. در حالی‌که مارکوس و همکاران[3] (۲۰۱۰) بیشترین میزان سقط‌جنین را در سه ماهه سوم گزارش کردند. خطر انتقال

[1] - López-Gatius et al.,
[2] -Riberio et al.,
[3] - Marques et al.,

عمودی آلودگی با افزایش زمان مواجهه در دوره آبستنی و همچنین تعداد اووسیست‌های بلعیده شده ارتباط مستقیم دارد (Gondim et al., 2004).

۲-۳-۵-سگ:

سگ‌ها نقش مهمی در بقای آلودگی و همچنین وقوع طوفان سقط‌جنین در گله‌های گاو شیری دارند (Dubey et al., 2007). سگ‌های بالغ مبتلا به نئوسپوروزیس علائم مختلف عصبی از خود نشان می‌دهند؛ در حالی‌که توله‌های آلوده معمولاً بدون علائم متولد می‌شوند (Dubey et al., 2005). فلجی پیشرونده بعد از هفته سوم تولد یک علامت شایع و مهم در توله‌های آلوده است (Barber and Trees, 1996). میزان آلودگی سگ‌های مناطق مختلف ایران به *نئوسپورا کانینوم* با توجه به روش تشخیص و نژاد دام صفر تا ۵۴/۶ درصد است (Razmi, 2009; Khordadmehr et al., 2012). این میزان از مناطق مختلف جهان بین ۱ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده‌است (Dubey and Schares, 2011). فراوانی سرمی *نئوسپورا کانینوم* در کشورهای مختلف ۱۷/۱ درصد گزارش گردید (Anvari et al., 2020). در مطالعه حاضر فراوانی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در سگ‌های گاوداری پایین بود. در حالی‌که آنتونی و ویلیامسون[1] (۲۰۰۳) فراوانی این آلودگی در سگ‌های دامداری‌های نیوزلند را ۷۴/۵ درصد گزارش نمودند. آلودگی زیاد در سگ‌های دامداری‌ها در مقایسه با سایر تیپ‌های سگ به دلیل امکان دسترسی مستقیم آنها به دام‌های آلوده، جنین سقط شده و همچنین سایر مواد آلوده از آن‌ها می‌باشد (Dubey et al., 2007). حضور سگ‌های آلوده در واحدهای گاوداری و ارتباط آن‌ها با گله و قسمت‌های مختلف مثل انبار خوراک‌دام یک عامل خطر مهم در شیوع نئوسپوروزیس است (Ribeiro et al., 2019). تردد سگ‌ها بین واحدهای گاوداری و مناطق روستایی نیز در انتشار آلودگی بسیار مهم است. در بررسی قره خانی و یخچالی (۲۰۱۹)، به دلیل اینکه تمامی واحدهای گاوداری محصور نبوده و امکان تردد سگ و همچنین سایر سگ‌سانان وحشی به عنوان یک مخزن مهم آلودگی وجود داشت، این حیوانات با تغذیه از جفت و

[1] - Antony and Williamson

محتویات سقط‌جنین آلوده و یا دفع مدفوع در مناطق مختلف گاوداری چرخه‌ی زندگی انگل را تسهیل و آلودگی را گسترش دادند (Haddadzadeh et al., 2007; Malmasi et al., 2007). ارتباط مستقیم سگ‌های گله با دام‌های سرم مثبت نیز احتمال آلودگی را افزایش می‌دهد (Hossininejad and Hosseini, 2011).

سن در ابتلای سگ‌ها به *نئوسپورا کانینوم* نقش مهمی دارد. وقوع آلودگی در توله‌ها نشان از آلودگی به روش مادرزادی در آن‌ها است. با افزایش سن دام احتمال آلودگی در اثر استفاده از مواد آلوده و یا غذای آلوده افزایش می‌یابد. به این دلیل بیشتر سگ‌ها بعد از تولد آلوده می‌باشند (Dubey et al., 2017). در مطالعه قره خانی و یخچالی (۲۰۱۹)، بیشترین میزان آلودگی در سگ‌های بیشتر از ۲ سال بود. این یافته با یافته‌های سایر محققین در ایران مشابه بود (Haddadzadeh et al., 2007; Malmasi et al., 2007; Yakhchali et al., 2010, 2017).

در اکثر گزارشات میزان فراوانی آلودگی در سگ‌های نر بیشتر از سگ‌های ماده است (Malmasi et al., 2007; Yakhchali et al., 2010; Sharifdini et al., 2011). در ایران، کشاورزان و دامداران اغلب تمایل به نگهداری سگ نر دارند. بنابراین به این دلیل میزان آلودگی در این گروه از سگ‌ها بیشتر است (Malmasi et al., 2007; Khanmohammadi and Fallah, 2011). در مطالعه قره خانی و یخچالی (۲۰۱۹)، فراوانی آلودگی به‌طور معنی‌داری در سگ‌های نر بیشتر از سگ‌های ماده بود. همچنین در گزارش متاآنالیز، میزان فراوانی آلودگی در سگ‌های نر (۱۵/۸ درصد) در مقایسه با سگ‌های ماده (۱۵/۲ درصد) بیشتر بود (Anvari et al., 2020). سگ‌های ماده نسبت به آلودگی *نئوسپورا کانینوم* حساس‌تر هستند؛ زیرا تغییرات هورمون‌های جنسی در زمان آبستنی نقش مهمی در تضعیف سیستم ایمنی دام ماده دارند. استروژن باعث افزایش تولید آنتی‌بادی می شود و آندروژن‌ها پاسخ ایمنی لنفوسیت‌های T و B را سرکوب می‌کنند (Alexander and Stinson, 1998). سد ایمنی در برابر *نئوسپورا کانینوم* می‌تواند در مواردی تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند تغذیه، سن، بارداری و تغییرات محیطی شکسته شود (Gharekhani et al., 2019).

سگ‌سانان وحشی بخصوص سگ‌گرگ و روباه از میزبان‌های اصلی *نئوسپورا کانینوم* هستند که در انتشار انگل بخصوص در حیات‌وحش نقش بسیار مهمی دارند (Dubey et al., 2017). تمامی واحدهای دامپروری بخصوص واحدهای با ظرفیت بالا به دلیل مساحت زیاد محصور نیستند، بنابراین امکان تردد سگ و سایر سگ‌سانان وحشی به محیط دامداری و تماس با گله وجود دارد. همچنین تعداد سگ‌های نگهداری شونده در یک واحد ارتباط مستقیمی با فضای داخلی آن و همچنین ظرفیت گله دارد (Dubey and Schares, 2011). در مطالعه قره خانی و یخچالی (۲۰۱۹)، تعداد موارد مثبت در واحدهایی که تردد سگ‌سانان وحشی در آنها ثبت شده بود به طور معنی‌داری بیشتر از سایر واحدها بود. در مطالعه قره‌خانی و همکاران (۲۰۱۴) میزان آلودگی در دامداری‌های دارای سگ (۱۷/۲ درصد) بطور معنی‌داری از دامداری‌های بدون سگ بیشتر بود. آلودگی در دامداری‌هایی که امکان وجود سگ‌سانان وحشی (سگ گرگ، روباه و یا شغال) وجود داشت (۲۰/۹ درصد) نیز بیشتر از سایر واحدها بود. این یافته با گزارشی از ایالت تگزاس در امریکا مشابه بود (Barling et al., 2001). برخی از محققین بر این باورند که حضور سگ در گاوداری به تنهایی اهمیتی ندارد ولی ارتباط آن با گله با اهمیت است و منشاء آلودگی دیگر گله به غیر از سگ، سگ‌سانان وحشی است. احتمال تغذیه از علوفه و مواد غذایی آلوده در بیرون از گاوداری و انتقال عمودی انگل نیز مهم می‌باشد (Pitel et al., 2001; Kyaw et al., 2004). حدادزاده و همکاران (۲۰۰۷) و ملماسی و همکاران (۲۰۰۷) استفاده از جنین‌های سقط شده برای تغذیه سگ‌ها بخصوص سگ‌های داخل دامداری را عامل بسیار مهمی در افزایش انتقال افقی انگل و انتشار بیماری به دامداری‌های همسایه و یا روستاهای نزدیک معرفی کردند.

جدول ۱-۵- فراوانی آلودگی *نئوسپورا کانینوم* در جمعیت گاوی مناطق مختلف ایران.

ناحیه/منطقه	نوع نمونه	روش آزمایش	تعداد نمونه	درصد مثبت	منبع
مشهد	خون (گاو شیری)	ایمونوفلورسانس	۸۱۰	۱۵/۲	(Sadrebazzaz et al., 2004)
	خون (گاو شیری)	الایزا	۳۳۷	۴۶/۳	(Razmi et al., 2006)
	مغز جنین سقط شده	مولکولی	۱۰۰	۱۳	(Razmi et al., 2007)
	مغز جنین سقط شده	مولکولی	۱۵۱	۱۱/۹	(Razmi et al., 2010)
	مایعات جنین سقط شده	الایزا	۱۵۱	۹/۹	
	خون (گاو شیری)	الایزا	۲۰۰	۱۹	(Razmi et al., 2013)
	مغز جنین سقط شده	مولکولی	۲۰۰	۱۱/۵	(Razmi et al., 2013)
	خون (گاو شیری)	الایزا	۱۱۶	۲۴/۳	(Mikhchi et al., 2013)
	شیر (بالک تانک)	الایزا	۱۲۵	۳۵	(Razmi and Barati, 2017)
نیشابور	خون	الایزا	۱۰۰	۲۶	(Nourollahifard et al., 2017)
اهواز	خون	الایزا	۵۵۷	۲۱	(Hajikolaei et al., 2008)
استان گلستان	خون (گاو شیری)	الایزا	۸۰۰	۱۳/۴	(Sattari et al., 2011)
بابل (مازندران)	خون	الایزا	۲۳۷	۳۲	(Youssefi et al., 2009)
گرمسار (سمنان)	خون	الایزا	۱۰۴	۳۸/۵	(Ranjbarbahadori et al., 2010)
اراک	مغز جنین سقط شده	مولکولی	۳۸	۲۶/۳	(Khani et al., 2018)
تهران	خون (گاو شیری آبستن)	الایزا	۷۶۸	۳۸/۸	(Salehi et al., 2010)
کرمان	خون	الایزا	۲۸۵	۱۲/۶	(Nourollahifard et al., 2008)
مغان (اردبیل)	جنین سقط شده	مولکولی	۸۲	۴۱/۵	(Hoseini et al., 2018)
تبریز	خون (گاو شیری)	الایزا	۲۶۶	۱۰/۵	(Nematollahi et al., 2011a)
	خون	الایزا	۲۳۶	۱۷/۸	(Gharedaghi, 2012a)
	خون (گاوهای سقط کرده)	الایزا	۷۶	۱۸/۴	(Nematollahi et al., 2013)
	مغز جنین سقط شده	مولکولی	۱۴	۴۲/۸	

شیراز	خون (گاو شیری آبستن)	الایزا	۲۵۳	۳۰/۴	(Ansari Lari et al., 2017)
	خون (گاو شیری)	الایزا	۱۸۰	۳۲/۱	(Tavanaee and Namavari, 2017)
اصفهان	خون (گاو شیری)	الایزا	۶۱۱	۳۲/۱	(Morovati and Noaman, 2016)
	خون (گاو شیری)	الایزا	۱۵۰۰	۲۶/۳	(Hosseininejad et al., 2017)
	خون (گاو شیری)	الایزا	۲۱۶	۱۹	(Noaman and Nabinejad, 2020)
لرستان	خون (گاو شیری)	الایزا	۳۴۷	۹/۸	(Nayebzadeh et al., 2015)
شهرکرد	مغز جنین سقط شده	مولکولی	۱۰۰	۱۱	(Rafati and Jaafarian, 2014)
	شیر (گاوهای بومی)	مولکولی	۱۰۰	۱۰	(Shakerian et al., 2015)
	شیر (گاوهای بومی)	مولکولی	۱۰۰	۲۴	(Alipour et al., 2018)
همدان	خون (گاوهای بومی)	الایزا	۴۰۰	۲۰	(Gharekhani et al., 2012)
	خون	الایزا	۱۴۰۶	۱۷/۴	(Gharekhani et al., 2013a)
همدان و سنندج	خون (گاوهای بومی)	الایزا	۷۶۸	۱۴/۲	(Gharekhani and Heidari, 2014a)
سنندج	خون (گاو شیری)	الایزا	۳۳۶	۱۷/۶	(Adhami et al., 2014)
کردستان	خون (کشتارگاه)	الایزا	۳۶۸	۷/۸	(Heidari et al., 2014)
سیستان	خون (گاو شیری)	الایزا	۱۸۴	۳/۸	(Noori et al., 2019)
مناطق مختلف ایران	مایع منی	مولکولی	۹۰	۹/۷	(Sharifzadeh et al., 2012)
	مایع منی	مولکولی	۸۵	۷/۴	
	مغز جنین سقط شده	مولکولی	۳۹۵	۴۵	(Kamali et al., 2014)
	مایع منی منجمد	مولکولی	۵۷	۱۰/۵	(Doosti et al., 2015)

جدول ۲-۵- فراوانی آلودگی *نئوسپورا کانینوم* در جمعیت سگ‌های مناطق مختلف ایران.

نوع حیوان	ناحیه/منطقه	نوع نمونه	روش آزمایش	تعداد نمونه	درصد مثبت	منبع
سگ بدون صاحب	تهران	خون	الایزا	۴۲	۲/۲	(Pouramini et al., 2017)
	چهارمحال و بختیاری	خون	ایمونوفلورسانس	۵۰	۴۶	(Hosseininejad et al., 2010a)
	چهارمحال و بختیاری، اصفهان و خوزستان	خون	الایزا	۳۱۷	۴۳/۳	(Hosseininejad and Hosseini, 2011)
	ارومیه	خون	ایمونوفلورسانس	۱۳۵	۲۶/۶	(Yakhchali et al., 2010)
	تبریز	خون	ایمونوفلورسانس	۱۰۰	۳۱	(Gharedaghi, 2012b)
	همدان	خون	ایمونوفلورسانس	۲۰۰	۵۲/۸	(Gharekhani et al., 2013a)
	همدان	خون	الایزا	۱۸۰	۵	(Gharekhani et al., 2019)
سگ خانگی*	تهران	خون	ایمونوفلورسانس	۵۰	۲۰	(Malmasi et al., 2007)
	مشهد	مدفوع	مولکولی	۸۵	۰	(Razmi, 2009)
	چهارمحال و بختیاری	خون	ایمونوفلورسانس	۵۰	۲۰	(Hosseininejad et al., 2010a)
	چهارمحال و بختیاری، اصفهان و خوزستان	خون	الایزا	۲۳۱	۸/۷	(Hosseininejad and Hosseini, 2011)
	همدان	خون	الایزا	۱۸۴	۴/۹	(Gharekhani et al., 2020b)
	تهران	خون	ایمونوفلورسانس	۵۰	۴۶	(Malmasi et al., 2007)

سگ دامداری#	تهران	خون	ایمونوفلورسانس	۵۰	۲۸	(Haddadzadeh et al., 2007)
	مشهد	مدفوع	مولکولی	۸۹	۲/۲	(Razmi, 2009)
	اصفهان	خون	ایمونوفلورسانس	۱۱۳	۱۷/۷	(Hosseininejad et al., 2017)
	لرستان	مدفوع	مولکولی	۴۲۸	۲/۱	(Dalimi et al., 2014)
سگ مناطق روستایی	مشکین شهر (اردبیل)	خون	الایزا	۱۷۱	۳۰/۴	(Sharifdini et al., 2011)
	سراب (آذربایجان شرقی)	خون	ایمونوفلورسانس	۳۸۴	۱۰/۷	(Khanmohammadi and Fallah, 2011)
ارجاعی به درمانگاه	اصفهان	خون	ایمونوفلورسانس	۲۳۳	۱۰/۳	(Hosseininejad et al., 2010b)
	اهواز	خون	الایزا	۱۰۰	۱۸	(Hosseininejad et al., 2018)

*=Pet #= Farm dog

جدول ۳-۵- فراوانی آلودگی *نئوسپورا کانینوم* در پرندگان نواحی مختلف ایران.

گونه	منطقه /ناحیه	نوع نمونه	روش آزمایش	تعداد نمونه	درصد مثبت	منبع
مرغ[a]	شیراز	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۵۰	۱۷/۳	(Sayari et al. 2016)
کبوتر[b]	اهواز	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۰۲	۳۰/۴	(Bahrami et al. 2016)
		بافت مغز	مولکولی	۱۰۲	۹/۸	
گنجشک[c]	اهواز	بافت مغز	مولکولی	۲۱۰	۲/۸	(Bahrami et al. 2015)
	تهران	بافت مغز	مولکولی	۲۱۷	۳/۷	(Abdoli et al. 2015)
کلاغ[d]	تهران	بافت مغز	مولکولی	۵۵	۹/۹	(Abdoli et al. 2018)

a= Gallus domesticus; b= Columba livia; c= Passer domesticus; d= Corvus cornix

جدول ٤-٥- فراوانی آلودگی *نئوسپورا کانینوم* در جمعیت گوسفندان و بزهای مناطق مختلف ایران.

گونه	ناحیه/منطقه	نوع نمونه	روش آزمایش	تعداد نمونه	درصد مثبت	منبع
گوسفند	الشتر (لرستان)	خون	الایزا	۵۸۶	۱/۵	(Ezatpour et al., 2013)
	تبریز	خون	الایزا	۷۰	۵/۷	(Asadpour et al., 2013)
		بافت مغز	مولکولی	۷۰	۸/۵	
	میانه (آذربایجان شرقی)	خون	الایزا	۳۱۷	۴/۱	(Vajdi et al., 2014)
			ایمونوفلورسانس	۳۱۷	۲/۵	
	تهران	بافت مغز و قلب	مولکولی	۳۳۰	۳/۹	(Arbabi et al., 2016)
	همدان	خون	الایزا	۳۵۸	۲/۲	(Gharekhani et al., 2013b)
	مشهد	بافت مغز	مولکولی	۷۱	۹/۹	(Razmi and Naseri, 2017)
	استان خوزستان	خون	الایزا	۵۵۰	۶/۸	(Gharekhani et al., 2018)
	مناطق مختلف ایران	بافت مغز	مولکولی	۱۰۹	۰/۹	(Sasani et al., 2013)
بز	همدان	خون	الایزا	۴۵۰	۶/۲	(Gharekhani et al., 2016)
	استان خوزستان	خون	الایزا	۱۵۸	۱۰/۸	(Gharekhani et al., 2018)

جدول ۵-۵- فراوانی آلودگی *نئوسپورا کانینوم* در گربه، شتر، گاومیش، تک سمی و جوندگان در مناطق مختلف ایران.

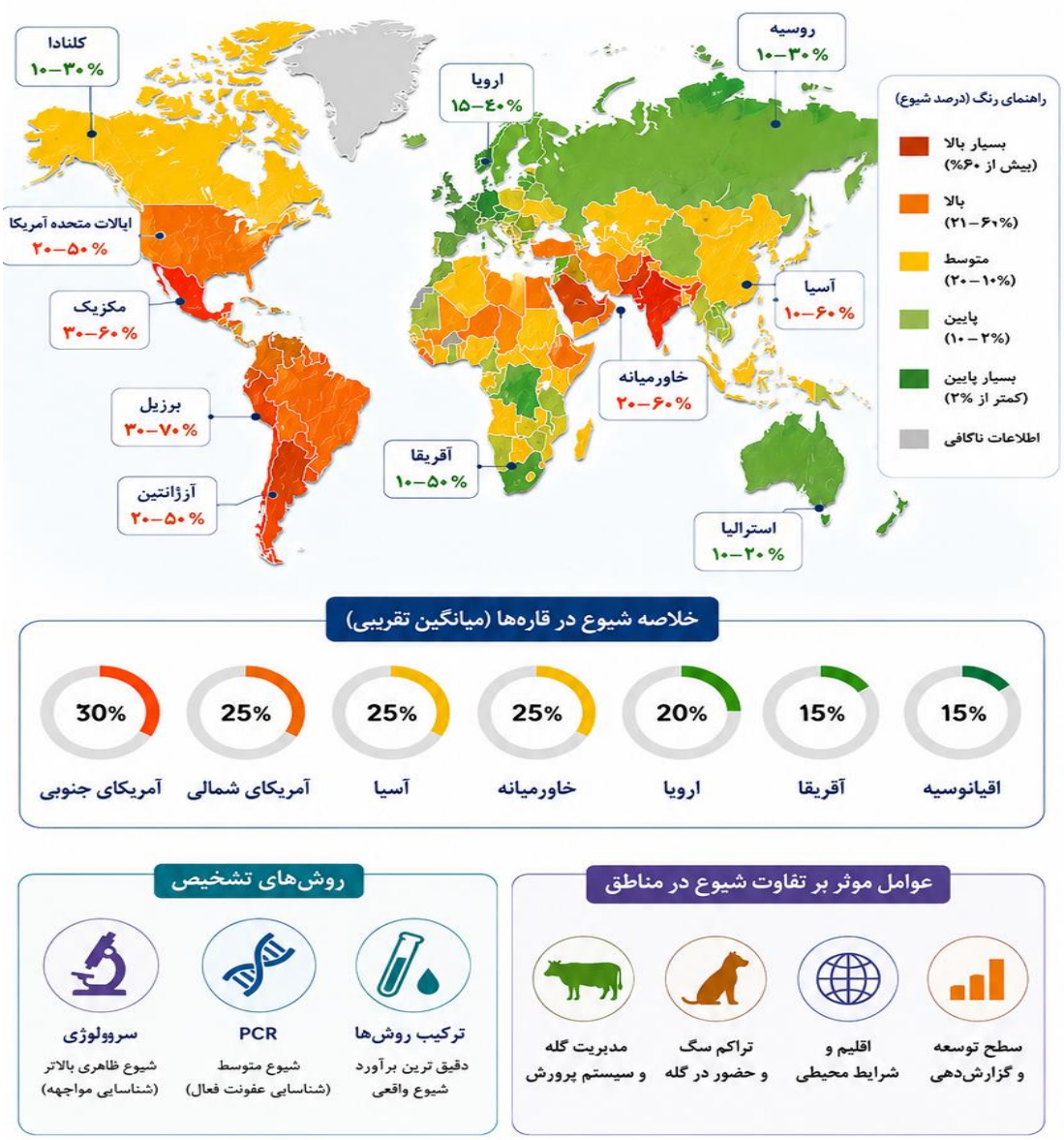
گونه	ناحیه/منطقه	نوع نمونه	روش آزمایش	تعداد نمونه	درصد مثبت	منبع
گربه	اهواز	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۰۰	۱۹	(Hamidinejat et al., 2011a)
	اهواز	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۰۰	۱۴	(Hamidinejat et al., 2011b)
جوندگان	اهواز	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۵۰	۶	(Mosallanejad et al., 2018b)
	مشکین شهر (اردبیل)	مغز	مولکولی	۷۰	۰	(Nazari et al., 2019)
		خون	ایمونوفلورسنت آنتی- بادی غیرمستقیم	۱۵۷	۲۰/۴	(Nazari et al., 2020)
شتر	مشهد	خون	ایمونوفلورسنت آنتی- بادی غیرمستقیم	۱۲۰	۵/۸	(Sadrebazzaz et al., 2006)
	اصفهان	خون	ایمونوفلورسنت آنتی- بادی غیرمستقیم	۳۱۰	۳/۲	(Hosseininejad et al., 2009)
	یزد	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۲۵۴	۳/۹	(Hamidinejat et al., 2013)
	بوشهر	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۹۲	۲۷	(Namavari et al., 2017)
گاومیش	اهواز	خون	الایزا	۱۸۱	۳۷	(Hajikolaei et al., 2007)
	اهواز	خون	الایزا	۱۸۸	۵۵/۹	(Pourmahdi-Borujeni et al., 2015)
	ارومیه	خون	الایزا	۸۳	۱۹/۲	(Rezvan et al., 2019)
اسب	تبریز	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۰۰	۲۸	(Gharedaghi, 2011)
	شیراز	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۲۰۰	۴۰	(Moraveji et al., 2011)
	مشهد	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۵۰	۳۰	(Hosseini et al., 2011)
	همدان	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۲۰	۴۰/۸	(Gharekhani et al., 2013c)
	اهواز	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۲۳۵	۲۰	(Tavalla et al., 2015)
الاغ	همدان	خون	آگلوتیناسیون مستقیم	۱۰۰	۵۲	(Gharekhani et al., 2013c)

جدول ٦-٥- فراوانی آلودگی تجمعی سرمی به *نئوسپورا کانینوم* در جمعیت گاوی و سگ-های مناطق مختلف جهان (Ribeiro et al., 2019; Anvari et al., 2020**).**

منطقه		میزان آلودگی (درصد)		محدوده آلودگی (درصد)	
قاره	کشور	گاو	سگ	گاو	سگ
افریقا	افریقای جنوبی	۸/۹	N	۳/۴-۱۹/۳	۱۷/۸-۴۸
	الجزیره	۱۷/۴	۲۲		
	مصر	۱۹/۳	N		
	اتیوپی	۱۴/۳	N		
	موروکو	۸/۵	N		
	نیجریه	۳/۴	N		
	سنگال	۱۷/۹	۴۸		
	سودان	۱۰/۷	N		
	تانزانیا	N	۲۲/۴		
	اوگاندا	N	۲۷/۵		
	کنیا	N	۱۷/۸		
امریکا	کانادا	۱۲/۶	N	۱۱/۳-۵۷/۵	۲/۲-۳۷/۹
	کاستاریکا	۴۱/۳	۳۷/۹		
	مکزیک	۳۵/۸	۲۵/۱		
	ایالات متحده	۱۹	۲/۲		
	آرژانتین	۱۸/۱	۳۷/۸		
	برزیل	۲۲/۳	۱۴/۵		
	شیلی	۱۷/۸	۱۷/۹		
	کلمبیا	۵۷/۵	N		
	پاراگوئه	۲۹/۸	N		
	پرو	۱۹/۶	۱۴		
	اروگوئه	۱۵/۵	۲۰		
	ونزوئلا	۱۱/۳	N		
	چین	۲۰	۱۴	۶/۴-۴۳/۴	۳/۴-۲۳/۵
	هندوستان	۱۱/۸	۱۶/۸		
	ژاپن	۶/۴	۱۰/۷		
	اندونزی	۱۶/۶	۳/۴		
	کره	۱۳/۷	۱۱/۹		
	اردن	۳۵/۲	N		
	پاکستان	۴۳/۴	۲۳/۵		

آسیا	فیلیپین	۱۶/۷	N		
	تایلند	۱۳/۲	۴/۴		
	ترکیه	۱۲/۶	۲۰/۵		
	ویتنام	۲۲/۷	N		
اروپا	آندورا	۷/۴	N	۳-۳۴/۹	۲/۹-۳۱/۸
	آلبانی	N	۱۷/۲		
	آلمان	N	۹/۱		
	بلژیک	۱۰/۳	۲۶/۵		
	پرتغال	N	۱۷/۶		
	جمهوری چک	۱/۷	۴/۹		
	کرووواسی	۵/۸	N		
	دانمارک	۱۶	۱۵/۳		
	انگلستان	۷/۲	۱۲/۹		
	فرانسه	۱۱/۳	N		
	مجارستان	۲/۵	۲/۹		
	ایرلند	۹/۴	N		
	ایتالیا	۲۳/۵	۱۴/۵		
	لهستان	۱۹/۵	۲۰/۲		
	رومانی	۳۴/۹	۳۱/۸		
	اسکاتلند	۱۳/۶	N		
	صربستان	۱۵/۴	۱۶/۲		
	اسپانیا	۲۳/۱	۲۹/۲		
	اطریش	N	۳/۶		
	سوئد	۳	N		
	سوئیس	۱۱/۵	۷/۳		
	هلند	N	۱۱/۱		
اقیانوسیه	استرالیا	۸/۱	۲۱/۵	۸/۱-۹/۶	۲۱/۵-۴۰/۳
	نیوزلند	۹/۶	۴۰/۳		

N: اطلاعات در دسترس نیست



شکل ۱-۵- پراکنش و میزان شیوع کلی نئوسپوروزیس گاوی در کشورهای مختلف.

٤-٥- عوامل موثر بر آلودگی و سقطجنین:

عوامل متعددی در افزایش خطر ابتلاء به نئوسپوروزیس در دام‌ها نقش دارند. همچنین نتایج مطالعات متعدد حاکی از وجود ارتباط مستقیم بین شیوع سرمی *نئوسپورا کانینوم* در گله‌ها و افزایش خطر سقطجنین می‌باشد. انتقال عمودی از طریق جفت مهم‌ترین راه آلودگی در گاو است که در این صورت گاوهای آلوده توانایی انتقال انگل تا چندین نسل به جنین خود را دارند (Hall et al., 2005; Nicolino et al., 2015).

١-٤-٥- سن گله:

میزان آلودگی و همچنین افزایش تیتر سرمی متناسب با افزایش سن و یا تعداد آبستنی در گاوهای شیری افزایش می‌یابد. افزایش سن، شانس ابتلا و یا آلوده‌شدن به روش افقی را در گله افزایش می‌دهد (Hemphill and Gottstein, 2000).

٢-٤-٥- حضور میزبان‌های مختلف:

سگ‌ها به عنوان مهم‌ترین میزبان نهایی با آلوده‌کردن آب و علوفه دام‌ها با مدفوع آلوده به اووسیست باعث انتشار آلودگی در میزبان‌های واسط می‌شوند. نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گرفته در بسیاری از گله‌ها، حضور سگ و همچنین تعداد آنها را به عنوان عوامل مهم خطر در افزایش آلودگی معرفی کرده است. افزایش تعداد سگ در داخل گله احتمال آلوده‌شدن خوراک دام‌ها را با مدفوع و همچنین احتمال استفاده از جنین‌های سقطی به عنوان خوراک سگ‌ها را بالا می‌برد (Dubey et al., 2005). حضور برخی از گوشتخوارن وحشی مثل کایوت در انتقال و یا انتشار انگل به داخل گله و همچنین به حیات وحش بسیار موثر است. گربه‌ها با خوردن برخی از جوندگان میزبان واسط به ماندگاری و بقای انگل در گله کمک می‌کنند. جداشدن DNA *نئوسپورا کانینوم* از موش‌ها حاکی از آن است که این حیوانات می‌توانند منبع مهمی از آلودگی برای میزبان‌های نهایی گوشتخوار باشند. در پژوهش‌های گذشته، وجود خرگوش، اردک و ماکیان در داخل گله به عنوان عامل خطر آلودگی در گاوهای شیری

گزارش شده است (Dubey et al., 2007). ارتباط معنی‌داری بین حضور و تعداد پرندگان موجود در دامداری و میزان سقط‌جنین وجود دارد. نقش پرندگان به عنوان میزبان واسط به طور کامل شفاف نمی‌باشد؛ ولیکن به عنوان مخزن آلودگی و یا ناقلین مکانیکی در انتشار آلودگی به ویژه در محیط‌های بسته نقش قابل توجهی دارند (Barros et al., 2018). آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گونه‌های متعددی از حیوانات حیات‌وحش از جمله آهو، گوزن، کرگدن، روباه، راکون و شتر نیز گزارش شده است. چرخه زندگی انگل در حیات‌وحش نقش مهمی در اپیدمیولوژی انگل و گسترش آلودگی به حیوانات اهلی دارد؛ زیرا کنترل آلودگی در این حیوانات بسیار مشکل و در بعضی از موارد ناممکن می‌باشد (Dubey and Schares, 2011).

۳-٤-٥- شرایط آب و هوایی منطقه و روش تغذیه:

مهم‌ترین تأثیر آب و هوا در ایجاد شرایط محیطی مناسب جهت هاگ‌دار شدن اووسیست‌های دفعی و بقای آنها در محیط می‌باشد. اووسیست‌های هاگ‌دار منتشر شده در چراگاه، خوراک‌دام و آب به عنوان منابع بالقوه آلودگی، در انتقال انگل به روش افقی و ایجاد طوفان سقط‌جنین بسیار حائز اهمیت هستند (Youssefi et al., 2010). گوساله‌های تازه متولد شده با تغذیه از شیر مادران سرم مثبت که حاوی تاکی‌زوئیت انگل است آلوده می‌شوند. خوردن آغوز حاوی ایمونوگلوبولین ضد *نئوسپورا کانینوم* یک عامل حفاظتی بر علیه این آلودگی می‌باشد (Hurkova et al., 2005). همچنین تغذیه دام‌ها بصورت دستی در فضای بسته و یا در مراتع نامحدود از عوامل موثر تعیین کننده در الگوی انتشار آلودگی هستند (Dubey et al., 2007).

٤-٤-٥- تراکم گله و نوع پرورش:

تراکم بالای جمعیت به عنوان یک عامل خطر بالقوه برای مثبت شدن و افزایش تیتر سرمی می‌باشد. در یک مطالعه، افزایش اندازه مزرعه یک عامل حفاظتی در شیوع سرمی در گله معرفی شد. توجیه فرضیه بر این استوار بود که در مزرعه‌های کوچک دسترسی سگ‌ها به جنین‌های سقط شده و اووسیست‌های آلوده، نسبت به مزارع بزرگتر، بیشتر و راحت‌تر است.

میزان آلودگی و شیوع سرمی *نئوسپورا کانینوم* با توجه به شیوه‌های مختلف پرورش متفاوت است. اعمال مدیریت مدرن و انتخاب شیوه پرورش مناسب و همچنین نژادهای مقاوم در کاهش میزان ابتلای گله به نئوسپوروزیس نیز حائز اهمیت است (Dubey et al., 2007; Gharekhani et al., 2014).

۵-٤-۵- آلودگی‌های هم زمان با سایر عوامل عفونی:

در مطالعات پیشین ارتباط آماری معنی‌داری بین آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* و ویروس اسهال گاوی و همچنین هرپس ویروس تیپ-۱ گاوی گزارش شده است (Dubey et al., 2007; 2017). آلودگی‌های هم‌زمان *نئوسپورا کانینوم* با سایر عوامل عفونی می‌تواند باعث افزایش موارد سقط در گاو شود. در یک گزارش، آلودگی هم‌زمان *نئوسپورا کانینوم* با هرپس-ویروس تیپ-۱ (۱۲ درصد) بیشتر از آلودگی در دام‌های بدون درگیری با هرپس‌ویروس تیپ-۱ (۶/۹ درصد) بود. همچنین در موردی مشابه تشدید آلودگی با اسهال ویروسی گاوان[1] نیز گزارش شده است (Noaman and Nabinejad, 2020).

فعال‌شدن مجدد عفونت مزمن در گاوهای آبستن شرایط را برای انتقال عمودی به دلیل افزایش آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد *نئوسپورا کانینوم* و همچنین افزایش وقوع سقط‌جنین فراهم می‌کند (Lefkaditis et al., 2020). مکانیسم فعال‌شدن مجدد عفونت مزمن به طور دقیق مشخص نمی‌باشد (Dubey, 2003). استفاده از خوراک دام آلوده به سموم قارچی، قرار گرفتن در شرایط استرس و همراهی سایر عوامل عفونی می‌تواند باعث تضعیف سیستم ایمنی و متعاقب آن فعال‌شدن مجدد عفونت مزمن گردد (Yaniz et al., 2010). آلودگی هم‌زمان *نئوسپورا کانینوم* با *کوکسیلا بورنتی* در ۱۴/۷ درصد از دام‌های اکوادور با سابقه سقط‌جنین گزارش شد (Changoluisa et al., 2019). همچنین اوکومو و همکاران[2] (۲۰۱۹) آلودگی هم‌زمان اسهال ویروسی گاوان با *نئوسپورا کانینوم* را یک عامل خطر در افزایش بروز سقط-

[1]- Bovine viral diarrhea virus infection (BVDV)
[2] - Okumu et al.,

جنین معرفی نمودند. سقطجنین‌های ناشی از نئوسپوروزیس می‌تواند در آبستنی‌های بعدی نیز تکرار شود و امکان تکرار سقطجنین در ۵ درصد از دام‌ها وجود دارد (Anderson et al., 1995). در این پژوهش، ۹۴/۱ درصد از دام‌های سرم مثبت و ۴۲/۴ درصد از دام‌هایی که دچار سقطجنین شدند، پیشتر دارای سابقه سقطجنین بودند. بنابراین وجود دام‌های سرم مثبت با سابقه سقطجنین یک عامل خطر مهم در بروز سقطجنین جدید در دام و همچنین در گله است. بنابراین برای کنترل سقطجنین در گاوداری‌های با خطر بالا، باید زنجیره انتقال عمودی انگل با انتخاب گوساله‌های سرم منفی شکسته شود (Davison et al., 1999).



شکل ۲-۵- مهمترین عوامل خطر سقط‌جنین در گاو.

۵-۵-اپیدمیولوژی مولکولی:

اغلب مطالعات *نئوسپورا کانینوم* در ایران جنبه اپیدمیولوژیک داشته و کمتر به مطالعه ژنومی انگل، بررسی جدایه‌های در گردش و توالی آنها توجه شده است (Gharekhani et al., 2020a). سویه‌های مختلفی در بررسی‌های ژنومی و تعیین توالی‌های صورت گرفته از مناطق مختلف جهان گزارش شده است؛ ولیکن اطلاعات دقیقی از نقشه ژنتیکی انگل در دسترس نمی‌باشد (Schock et al., 2001; Goodswen et al., 2013). در مطالعه قره‌خانی و همکاران (۲۰۲۲)، تعداد ۳۱ جدایه *نئوسپورا کانینوم* که در بانک ژن ثبت گردیدند دارای هفت توالی مختلف بودند که بر اساس میزان تشابه در دو خوشه A و B گروه‌بندی شدند. جدایه‌ها از میزبان‌های مختلف (سگ و گاو) و نمونه‌های مختلف شامل بافت مغز، شیر، خون و اسپرم در گاو و خون در سگ و از محل‌های جغرافیایی مختلف استان همدان (همدان، ملایر، بهار و کبودرآهنگ) بودند. هفت توالی شناسایی شده در سگ‌های مورد مطالعه وجود داشتند که می‌تواند به دلیل محدود نبودن این میزبان بخصوص در گاوداری‌هایی که به طور کامل محصور نبودند و امکان تردد سگ‌ها از محیط بیرون به فضای گاوداری و یا برعکس وجود داشت. زیرا سگ‌های آلوده می‌توانند به راحتی آلودگی را از بیرون گاوداری به داخل گاوداری منتقل نمایند (Dubey et al., 2007, 2017). اپیدمیولوژی مولکولی در تعیین نقش هر یک از روش‌های انتقال عمودی و افقی و نیز تعیین منشاء آلودگی بسیار مهم است (Khan et al., 2020). تشابه توالی‌ها از جمعیت سگ و گاوهای یک واحد دامداری نقش انتقال افقی انگل (سگ به گاو) و بروز طوفان سقط‌جنین را برجسته‌تر می‌کند که البته آلودگی سگ‌ها از طریق مواد و ترشحات سقطی نیز بایستی مدنظر قرار گیرد. این در حالی است که در واحدهایی که توالی‌های متفاوتی از سگ و گاوها گزارش شده انتقال عمودی نقش مهم‌تری داشت (Al-Qassab et al., 2010). با توجه به گزارش آلودگی و تعیین توالی‌های انگل از اسپرم‌های مورد استفاده در تلقیح‌مصنوعی، می توان این روش را یکی از پتانسیل‌های مهم انتقال آلودگی و همچنین گردش توالی‌ها دانست (Gharekhani et al., 2022).

در مقایسه توالی‌های گزارش شده از ایران (Gharekhani et al.,2022) با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن میزان تشابه ۹۹/۳-۹۴/۹ درصد بود. بیشترین میزان تشابه در جدایه شماره ۱ (۹۴/۹ درصد) با جدایه‌ها از جوندگان ایتالیا (شماره دسترسی EF202081) و گاو در چین (شماره دسترسی JN106450) بود. صالحی و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از ژن‌های Nc5 و ITS1 دو سویه Nc-Iran-1 و Nc-Iran-2 را از ایران گزارش نمودند. در این مطالعه توالی این دو سویه اختلاف قابل توجهی با سویه‌های Nc-Liverpool، Nc-SweB1، Nc-GER1، KBA1 و KBA2 داشتند. علی‌رغم مطالعات محدود در ایران در مورد ژنوم و تنوع ژنتیکی *نئوسپورا کانینوم*، جدایه‌های مختلفی از انواع بافت‌ها و میزبان (مغز جنین سقطی گوساله از مشهد با شماره دسترسی MH410658، مغز جنین سقطی گوساله از شمال ایران با شماره دسترسی MH795879، مغز گنجشک از تهران با شماره دسترسی KP702736، مغز کلاغ از تهران با شماره دسترسی KR106185، قلب گوسفند از تهران با شماره دسترسی KR106181، مغز جنین سقطی گوسفند از شمال ایران با شماره دسترسی MH680821، مغز گربه از شیراز با شماره دسترسی KY124531، روده سگ از شیراز با شماره دسترسی KY124529) در بانک ژن ثبت شده است. اغلب جدایه‌های ایران در زیر شاخه سویه لیورپول (شماره دسترسی LN714476) قرار گرفتند. جدایه‌های قره خانی و همکاران (۲۰۲۲)، در مقایسه با سایر کشورها در زیر شاخه اسلواکی (شماره دسترسی GU300774) قرار گرفتند. ریشه و اجداد آن‌ها نیز خیلی شبیه به جدایه‌های اسلواکی (مغز گاو شیری با شماره دسترسی GU300774) و امریکا (مدفوع گرگ با شماره دسترسی KF649847) بود.

٦-٥- خسارات اقتصادی نئوسپوروزیس:

اطلاعات کاملی در ارتباط با خسارات ناشی از نئوسپوروزیس در صنعت گاوداری در جهان وجود ندارد. بیشترین خسارات اقتصادی ناشی از *نئوسپورا کانینوم* مربوط به سقط‌جنین است.

همچنین علاوه بر خسارات مستقیم ناشی از سقط‌جنین، خسارات غیرمستقیم شامل هزینه‌های ناشی از آزمایش‌های تخصصی، گاوهای با سابقه فحلی مجدد، کاهش مقدار شیر و هزینه جایگزینی گاوهای سقط کرده (در گاوداری‌هایی که سیستم حذف را رعایت می‌کنند) نیز قابل ملاحظه می‌باشد (Santos et al., 2016). گاوهای دارای تیتر آنتی بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* به طور متوسط یک کیلوگرم کمتر از گاوهای سرم منفی شیر تولید می‌کنند. همچنین گاوهای شیری در معرض خطر آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* حدوداً ۴-۳ درصد کاهش شیر دارند که باعث خسارات ۱۲۸ دلاری به ازای هر رأس گاو در یک دوره شیرواری می‌شود (Dubey et al., 2007, 2017). طبق مطالعات صورت گرفته فقط ۲۴ درصد از گاوهای سرم مثبت در گاوداری باعث ایجاد خسارات اقتصادی می‌شوند که میانگین خسارات آن به ازای هر گاوداری سالیانه ۲۰۰۰ یورو محاسبه شده است. حدوداً ۶۰ درصد از خسارات اقتصادی مربوط به گاوهای شیری است. برآورد خسارات سالیانه ناشی از سقط‌جنین از ۱/۱ میلیون دلار در نیوزلند تا ۵۴۶ میلیون دلار در امریکا متغیر می‌باشد. این خسارات به طور کلی با در نظر گرفتن هزینه های تشخیصی و همچنین کاهش تولید شیر ۲۳۸۰ میلیون دلار گزارش شده است (Richel et al., 2013).

بیشترین خسارات اقتصادی ناشی از نئوسپوروزیس در گاو ناشی از کاهش تولید شیر، سقط‌جنین و حذف دام‌های آلوده[1] می‌باشد. این مقدار برای هر گاوداری شیری به‌طور متوسط ۱۶۰۰ دلار در سال محاسبه شده است (Santos et al. 2016; Gharekhani et al., 2020a). به گزارش ریچل و همکاران[2] (۲۰۱۳)، سالیانه ۴۶/۴ میلیون رأس گاو در جهان در خطر بروز سقط‌جنین ناشی از نئوسپوروزیس هستند که میزان خسارات ناشی از آن بطور میانگین سالیانه ۱/۳ بیلیون دلار تخمین زده شده است. بارلینگ و همکاران[3] (۲۰۰۰) کاهش

[1] - Culling
[2] - Richel et al.,
[3] - Barling et al.,

معنی‌داری در وزن‌گیری روزانه و وزن لاشه هنگام ذبح در گاوهای سرم مثبت نسبت به گاوهای سرم منفی را گزارش نمودند.

فصل ۶

تشخیص آزمایشگاهی

٦- روش‌های تشخیص:

از ابتدای گزارش *نئوسپورا کانینوم* تاکنون از روش‌های مختلفی برای تشخیص و یا ردیابی آن در میزبان‌های مختلف استفاده شده است. سرولوژی و ایمونولوژی، تشخیص بافتی، استفاده از حیوانات آزمایشگاهی، کشت سلولی و تکنیک‌های مختلف مولکولی از روش‌های کاربردی در تشخیص این انگل هستند. تشخیص دقیق سقط‌های نئوسپورایی با درنظر گرفتن زمان سقط و آسیب‌های بافتی با استفاده از روش‌های مختلف آزمایشگاهی و همچنین رد سایر عوامل مسبب سقط حاصل می‌شود (Michael, 1996).

٦-١- سرولوژی و ایمونولوژی:

استفاده از روش‌های تشخیص مبتنی بر سنجش آنتی‌بادی، عمدتاً جزو روش‌های ارزیابی اولیه در گله بوده و برای غربالگری استفاده می‌شوند. بررسی سرولوژی بهترین کاربرد را در ارزیابی تماس گله با آلودگی و همچنین عوامل خطر دارد. حساسیت و ویژگی در این آزمون‌ها بر

اساس نوع روش متفاوت است که بایستی برای هر کدام از آزمون‌ها با استفاده از نتایج نمونه-های استاندارد یک معیار تشخیص[1] در نظر گرفته شود (Pare et al., 1995a). سطح IgG ضد *نئوسپورا کانینوم* از هفته اول تا ۶-۳ ماه پس از آلودگی دارای سیر صعودی می‌باشد؛ در حالی‌که مقدار IgM پس از ۲ هفته به اوج خود می‌رسد. بعد از آلوده‌شدن میزبان یک افزایش اولیه در IgG_1 رخ می‌دهد که با یک موج تاخیری IgG_2 همراه می‌باشد. آزمون‌های سرولوژی برای ارزیابی وضعیت آلودگی در جنین نیز به کار می‌رود؛ زیرا نمونه‌های خون، سرم آغشته به خون موجود در پرده جنب، مایع صفاقی و محتویات شیردان درصورت آلوده بودن دارای آنتی-بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* هستند. حضور آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در جنین‌های سقط شده دلیل بر آلودگی آنها می‌باشد، اما نتایج منفی فاقد ارزش تشخیصی هستند؛ زیرا تولید آنتی‌بادی در جنین عمدتاً بستگی به سن آبستنی و فاصله بین آلودگی جنین تا سقط دارد. گوساله‌های تازه متولد شده بایستی قبل از مصرف آغوز بررسی شوند، زیرا IgG موجود در آغوز ممکن است باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب شود (Pare et al., 1995a).

آزمایش بالک تانک به دلیل سهولت در نمونه‌گیری، هزینه کم و جواب سریع به‌صورت معمول برای تشخیص آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در گاوداری‌های شیری انجام می‌شود (Hurkova et al., 2005). ایمونوگلوبولین G_1 مهم‌ترین و بیشترین آنتی‌بادی اختصاصی *نئوسپورا کانینوم* است که توانایی دفع از طریق شیر دام آلوده را دارد. ارتباط معنی‌داری بین سطح آنتی‌بادی سرم و شیر در دام‌های آلوده وجود دارد (Sekiya et al., 2013). بیشترین میزان سقط‌جنین در گاوداری‌های بالک تانک مثبت در مقایسه با بالک تانک منفی گزارش شده است (Schares et al., 2004). در مطالعه قره‌خانی و یخچالی (۲۰۱۹)، در حدود نیمی از گاوداری‌های شیری غربال شده از نظر بالک تانک آلوده بودند. در حالی‌که این فراوانی در جمهوری چک ۱ درصد، آلمان ۷/۹ درصد و تایلند ۴۶ درصد گزارش شد (Chanlun et al., 2002; Hurkova et al., 2005; Schares et al., 2004). در مطالعات قبلی در ایران،

[1] -Cut off

میزان آلودگی نمونه شیرهای بررسی شده ۹۵/۲-۱۰ درصد بود (Shakerian et al., 2015; Binaei, 2016). در یک بررسی تمامی گاوداری‌هایی که سقط‌جنین بالایی داشتند از نظر بالک تانک مثبت بودند (Gharekhani and Yakhchali, 2019).

۱-۱-٦- ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم:

برخی از محققین بر این باورند که روش ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم، متداول‌ترین و مناسب ترین روش برای تشخیص آلودگی با *نئوسپورا کانینوم* بوده و دارای ویژگی بسیار بالایی می‌باشد. این روش عمدتاً مبتنی بر استفاده از تاکی‌زوئیت‌های مستخرج از کشت انگل می‌باشد. جهت تشخیص آلودگی در دام‌های بالغ تیتر سرمی ۱:۶۴۰ پیشنهاد می‌گردد. در گوساله‌هایی که آغوز مصرف نکرده‌اند و همچنین در جنین‌های سقط شده، تیتر ۱:۶۴ دارای ارزش تشخیصی است؛ در صورتی‌که در گوساله‌هایی که مصرف آغوز داشته‌اند تیتر سرمی ۱:۵۱۲۰ مثبت تلقی می‌گردد (Pare et al., 1995b).

۲-۱-٦- الایزا:

امروزه روش الایزا به دلیل ارائه نتایج یکسان و تسریع در فرآیند آزمایش محبوبیت زیادی پیدا کرده است. به همین دلیل شرکت‌های مختلفی در سراسر دنیا موفق به ساخت کیت‌های الایزا برای تشخیص *نئوسپورا* با برندهای مختلف نمودند که در هنگام استفاده از آنها بایستی دستورالعمل انجام هر کدام از آن‌ها مورد توجه قرار بگیرد. روش آویدیتی الایزا[1] قابلیت تفریق آلودگی‌های جدید را از مزمن دارد. این روش بر اساس میل ترکیب آنتی‌بادی با آنتی‌ژن توسعه یافته است؛ طوری‌که هر چه از زمان تولید آنتی‌بادی بگذرد میل ترکیبی آن با آنتی‌ژن بیشتر شده و میزان IgG آویدیتی افزایش می‌یابد. وجود مقادیر زیادی از IgG آویدیتی دلیل بر

[1] -Avidity ELISA

آلودگی مزمن و IgG آویدیتی کم دلیل بر آلودگی جدید و یا فعال می‌باشد (Bjorkman et al., 1999).

دستورالعمل یک کیت تجاری الایزا مربوط به شرکت آی–دی–وت[1] به عنوان نمونه به شرح ذیل توضیح داده می شود:

الف- روش آماده‌سازی محلول‌ها

۱) تمامی محتویات کیت قبل از انجام مراحل آزمایش با دمای آزمایشگاه هم دما شوند.
۲) محلول شستشو با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر ۲۰ برابر رقیق شود.
۳) محلول کونژوگه با استفاده از بافر شماره ۳ به میزان ۲۰ برابر رقیق شود.

ب- مراحل آزمایش برای نمونه‌های سرم

۱) در تمامی چاهک های میکروپلیت ۹۰ میکرولیتر از بافر شماره ۲ بریزید.
۲) در تمامی چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم اضافه شدئ و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه گردد.
۳) در هر پلیت دو چاهک کنترل منفی و دو چاهک کنترل مثبت می باشد که به جای نمونه در این چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر کنترل اضافه می گردد.
۴) پس از انکوباسیون، چاهک‌ها را تخلیه کرده و با محلول شستشو آب‌کشی نمایید (۳ بار تکرار شود).
۵) در تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه رقیق شده ریخته و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شود.
۶) پس از انکوباسیون، چاهک ها را تخلیه و با محلول شستشو آب‌کشی نمایید (۳ بار تکرار شود).

[1] - ID Screen®Neosporosis indirect multi-species; ID-Vet company, France

۷) در تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا ریخته و ۱۵ دقیقه در فضای تاریکی در آزمایشگاه انکوبه گردد.
۸) در تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استاپ اضافه شود.
۹) پلیت را در دستگاه الایزا ریدر[1] قرار داده و با طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت نمایید.

ج- مراحل آزمایش نمونه‌های شیر

۱) کنترل‌های مثبت و منفی با استفاده از محلول شستشو بصورت ۱ به ۴۰ رقیق شوند.
۲) مقادیر هر یک از کنترل‌ها در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر می باشد.
۳) ۵۰ میکرولیتر از شیر با ۵۰ میکرولیتر از محلول شستشو رقیق شود. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده به داخل چاهک‌ها منتقل شود.
۴) مراحل انکوباسیون و ادامه روش کار مانند نمونه‌های سرمی بود.

تفسیر نتایج الایزا بر اساس محاسبه S/P[2] طبق دستورالعمل کیت می‌باشد. S/P بزرگتر یا مساوی ۵۰ در نمونه‌های سرم و بزرگتر یا مساوی از ۳۰ در نمونه‌های شیر مثبت در نظر گرفته شد. روش محاسبه مقادیر S/P بر اساس فرمول زیر می‌باشد.

S/P= (OD نمونه[3] - OD کنترل منفی) /(OD کنترل مثبت - OD کنترل منفی) ×۱۰۰

۳-۱-٦- آگلوتیناسیون مستقیم:

روش آگلوتیناسیون مستقیم به راحتی قابل دسترس بوده و یکی از روش‌های ارزان برای ارزیابی میزان آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کانینوم* در حیوانات مختلف می‌باشد. نتایج معتبر و قابل اطمینانی در تشخیص سرولوژیک نئوسپوروزیس با روش آگلوتیناسیون مستقیم در مقایسه با

[1] - ELISA Reader
[2] -Sample to positive
[3] -Optical density of sample

ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی گزارش شده است. حساسیت (۱۰۰ درصد) و ویژگی (۹۷ درصد) این روش بیشتر از الایزا (به ترتیب ۹۴ درصد و ۷۴ درصد) بوده و در مقایسه با ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی دارای حساسیت (۹۹ درصد) بیشتر و ویژگی کمتری (۹۸ درصد) است (Ramond et al., 1998).

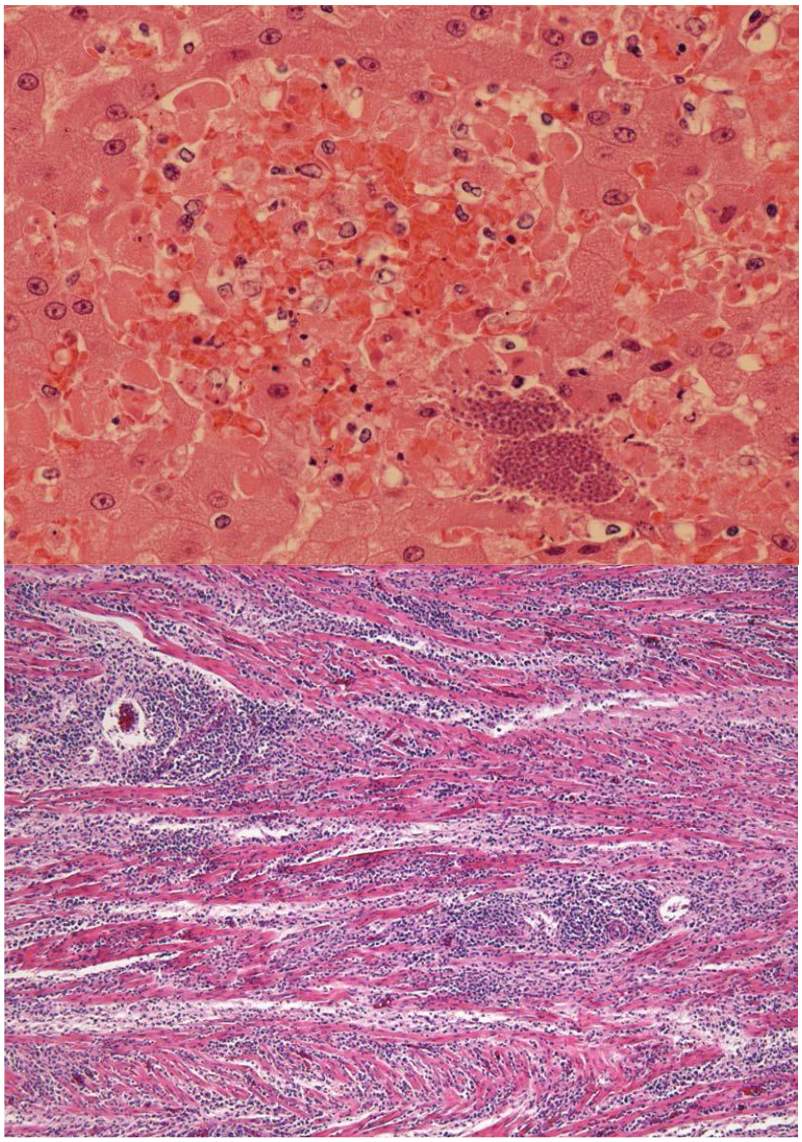
۲-٦-روش‌های تشخیص بافتی:

۱-۲-٦- هیستوپاتولوژی:

جنین‌های سقطی به دلیل نئوسپوروزیس عمدتاً دچار اتولیز شده و تجمع وسیعی از مایعات خونابه‌ای در حفرات بدن دیده می‌شود. کانون‌های ماکروسکوپی به رنگ سفید سرسوزنی در عضلات اسکلتی و قلب قابل مشاهده هستند. کانون‌های نکروزه در مغز مشخص‌ترین آسیب بافتی هستند. اپی‌کاردیت غیرچرکی، میوکاردیت، میوزیت کانونی غیرچرکی و هپاتیت پورتال از دیگر آسیب‌های بافتی هستند که ممکن است با کانون‌های نکروتیک در کبد و پنومونی بینابینی غیرچرکی همراه شوند. برای تأیید قطعی نئوسپوروزیس، آسیب‌های بافتی بایستی با روش‌های سنجش آلودگی مانند سرولوژی و مولکولی نیز مطابقت شوند (Cabral et al., 2009).

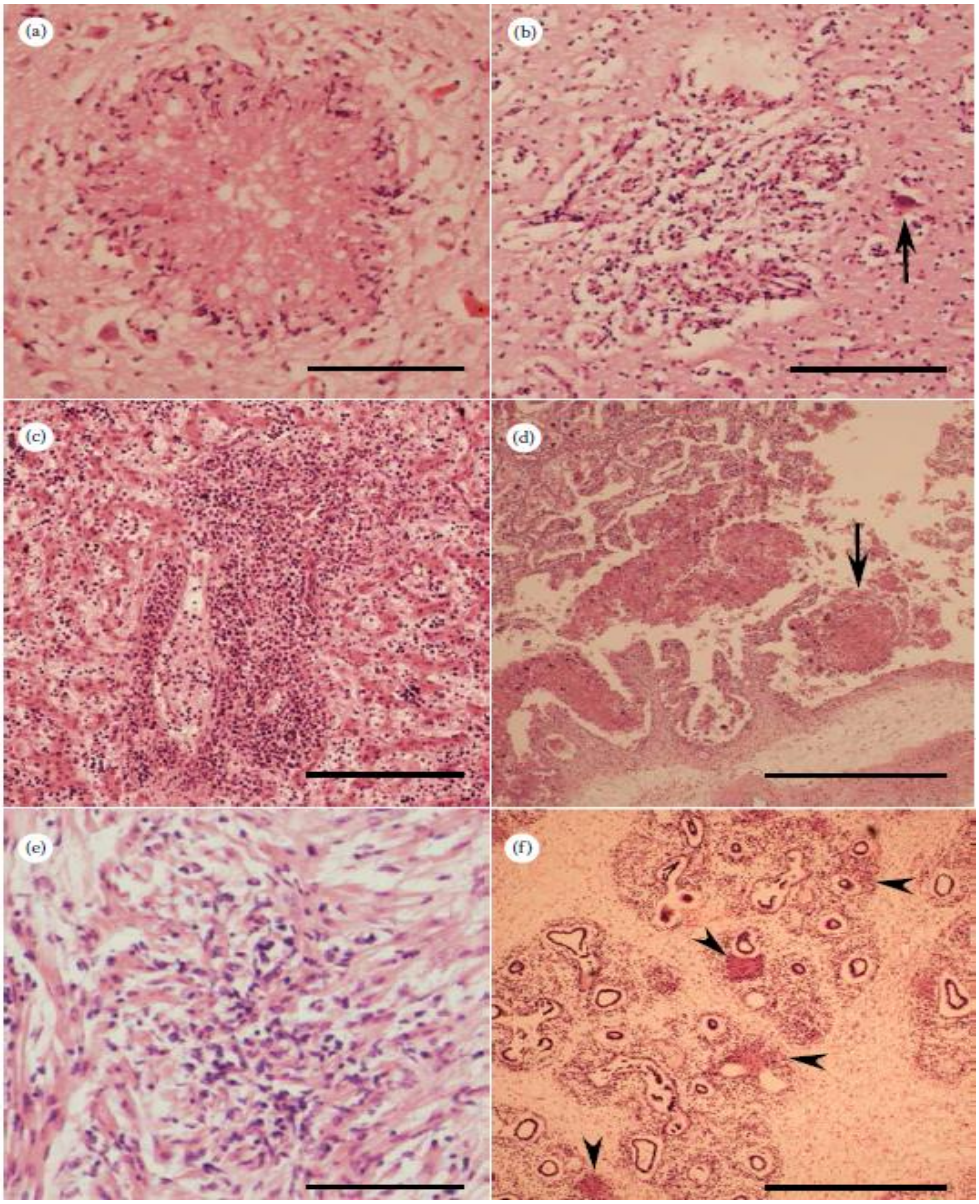
مهم‌ترین یافته‌های هیستوپاتولوژی، کانون‌های پراکنده‌ای از نفوذ سلول‌های التهابی غیرچرکی به همراه کانون‌های نکروزه در مغز است. اغلب ضایعات مغزی در نیمکره‌های مخ (عمدتاً قشر مخ)، مخچه و مغز میانی ایجاد می‌شود. کیست‌های بافتی در اغلب موارد فاقد واکنش التهابی هستند که در صورت مشاهده التهاب در اطراف کیست، احتمالاً پارگی دیواره کیست و نشت محتویات آن رخ داده است. با افزایش سن جنین‌های سقط شده، نفوذ لنفوسیت‌ها به اطراف عروق رخ می‌دهد که بیانگر بلوغ سیستم ایمنی به عنوان یک عامل مهم در بیماری‌زایی و سقط‌جنین می‌باشد. خونریزی در پارانشیم نیمکره‌های مغزی نیز قابل توجه است. بیشتر آسیب‌های بافت مغز بصورت مننگوآنسفالیت غیرچرکی در ماده سفید و خاکستری

به همراه نکروز، گلیوز و تجمع سلول‌های تک‌هسته‌ای در اطراف عروق است. کانون‌هایی از تجمع سلول‌های التهابی لنفوئیدی در میومتر نیز دیده می‌شود. با تهاجم تاکی‌زوئیت‌ها به دیواره کارانکول و ویلی‌های جفت، تخریب دیواره‌سلولی و دژنره‌شدن حاد پرزهای جفتی-جنینی اتفاق می‌افتد که اغلب با نشت سرم و تخریب عروق همراه است (Hall et al., 2005; Donahoe et al., 2015).



شکل ۱-٦- آسیب‌های بافتی ناشی از نئوسپوروزیس در سگ (Dubey et al., 2017).

[بالا: خونریزی به همراه نکروز در کبد پائین: میوکاردیت شدید در جنین سقط شده]



شکل ۲-٦- آسیب‌های بافتی نئوسپوروزیس در جنین سقطی گاو پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (Dubey et al., 2017). [a) نکروز کانونی در مغز b) ارتشاح کانونی سلول‌های تک هسته‌ای در مغز c) التهاب سلول‌های کبدی اطراف عروق پورت d) نکروز کانونی در جفت e) کانون‌های التهابی در میوکارد f) نقاط التهابی و نکروزه در بافت ریه]

۲-۲-٦- هیستوشیمی:

کیست‌های انگل با دیواره ضخیم در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین قابل تشخیص هستند. در رنگ‌آمیزی پریودیک اسیدشیف[1]، کیست‌ها PAS مثبت بوده و از سایر بافت‌ها به خوبی متمایز می‌شوند (Lindsay and Dubey, 1989).

۳-۲-٦- ایمونوهیستوشیمی:

این روش با ویژگی بالا، در سالیان گذشته به عنوان تست طلایی[2] در تشخیص آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* مطرح بوده است. در این روش، آلودگی با استفاده از سرم ضد *نئوسپورا* قابل تفریق می‌باشد. اغلب گزارشات نئوسپوروزیس در حیوانات مختلف بر اساس رنگ‌آمیزی اختصاصی *نئوسپورا کانینوم* با استفاده از سرم پلی‌کلونال استخراج شده از خرگوش‌های ایمن‌شده با تاکی‌زوئیت حاصل از کشت سلولی صورت پذیرفته است. تشخیص اختصاصی *نئوسپورا* با استفاده از آنتی‌ژن‌های مشترک در تاکی‌زوئیت و برادی‌زوئیت (مثل پروتئین ۴۳ کیلودالتونی) و آنتی‌بادی ضد آن در مقاطع ایمونوهیستوشیمی انجام می‌شود. این روش جهت بررسی وضعیت حضور اشکال مختلف انگل در بافت آلوده مناسب می‌باشد. با توجه به اینکه این روش بر روی مقاطع محدودی از بلوک‌های پارافینه بافت میزبان انجام می‌گردد، نتایج منفی کاذب دور از انتظار نیست (Lindsay and Dubey, 1989; Petersa et al., 2001).

۳-٦- روش‌های مولکولی:

روش‌های مولکولی از امتیازات ویژه‌ای همانند حساسیت و ویژگی بالا برخوردار هستند. در این روش‌ها با تکثیر مقدار اندکی از ژنوم انگل (بافت‌های تازه، منجمد، فیکس شده با فرمالین و بلوک‌های پارافینه) امکان شناسایی آنها فراهم می‌شود. با توجه به امکان تشخیص اووسیست‌

[1] -Periodic Acid Schiff (PAS)
[2] -Gold Standard

های دفعی از میزبان نهایی، این روش در بررسی‌های اپیدمیولوژیک نیز ابزاری قدرتمند و قابل اعتماد می‌باشد. همچنین، روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1] جهت شناسایی توالی‌های مختلف نوکلئوتیدی در *نئوسپورا کانینوم* استفاده می‌شود. ژن‌ها و نواحی مختلفی از ژنوم میکروارگانیسم در این روش مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به ژن NC5 و ناحیه ITS-1 اشاره کرد (Muller et al., 1996).

۱-۳-٦- روش استخراج DNA :

استخراج DNA با استفاده از کیت های تجاری و براساس کیت دستورالعمل انجام مـی شـود. بطور مثال دستورالعمل کیت شرکت تکاپوزیست[2] عبارتند از:

الف- روش آماده‌سازی محلول‌ها:

۱) مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب فاقد نوکلئاز به محتویات تیوب پروتئیناز K اضافه شود.
۲) بافر شستشوی شماره ۱ با ۱۲ میلی‌لیتر اتانول مطلق رقیق شود.
۳) بافر شستشوی شماره ۲ با ۴۸ میلی‌لیتر اتانول مطلق رقیق شود.

ب- مراحل استخراج DNA:

۱) نمونه‌ها قبل از شروع مراحل اسـتخراج DNA در دمـای آزمایشـگاه قـرار داده شوند.
۲) بافر رهاسازی در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شود. در صورت مشاهده رسوب در بافر اتصال، آن را همانند بافر رهاسازی در بن‌ماری۵۶ درجه سـانتی- گراد قرار داده تا رسوب کاملاً حل شود.

[1] -Polymerase Chain Reaction (PCR)
[2] - DynaBio™ Blood/Tissue DNA Extraction Mini Kit

۳) برای اطمینان از صحت مراحل استخراج و عدم بروز آلودگی در حین کار، عمل استخراج روی یک نمونه منفی (آب تزریقی) و یک نمونه مثبت تأیید شده انجام شود.
۴) به تعداد نمونه‌ها، میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل آماده کرده و داخل هر کدام ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز کا[1] بریزید.
۵) به هر میکروتیوب (با توجه به شماره نمونه)، ۲۰۰ میکرولیتر/میلی‌گرم از نمونه (خون یا بافت) اضافه شود.
۶) به تمامی میکروتیوب‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بافر اتصال اضافه شود.
۷) میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شود و پس از۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۶ درجه به مدت ۱۰ ثانیه چرخان (اسپاین)[2] گذاشته شود.
۸) ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق به هر نمونه اضافه و ۱۰ ثانیه ورتکس گردد.
۹) تمامی محتویات هر میکروتیوب با دقت به داخل ستون (میکروتیوب‌های فیلتردار) منتقل و سانتریفیوژ (یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه) شود.
۱۰) ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشوی شماره ۱ به ستون اضافه کرده و سانتریفیوژ (یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه) گردد.
۱۱) ستون‌ها به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل شوند.
۱۲) ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشوی شماره ۲ به ستون اضافه شده و سانتریفیوژ (۳ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه) گردد.
۱۳) ستون‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل شوند.

[1] - Proteinase K
[2] - Spine (mini centrifuge)

۱۴) مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر رهاسازی در ستون‌ها ریخته و پس از بستن درب ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شوند. سپس ستون‌ها سانتریفیوژ (۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) شوند.

۱۵) در مرحله نهایی، محلول زیر ستون حاوی DNA برای انجام مراحل بعدی آزمایشات مولکولی می باشد.

۱۶) توصیه می شود تمامی نمونه‌ها قبل از ادامه مراحل مولکولی از نظر کمیت DNA استخراج شده بوسیله نانودرآپ[1] ارزیابی شوند.

برای استخراج DNA از نمونه های شیر (طبق دستورالعمل کیت)، ۱۵ میلی‌لیتر از نمونه با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردد. سپس چربی و محتویات رویی را جدا کرده و با اضافه کردن محلول بافر فسفات[2] استریل رسوب ته لوله را شستشو دهید. پس از سانتریفیوژ نهایی (۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه)، به رسوب باقیمانده ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر مولکولی اضافه کرده و از آن برای ادامه پروتوکل استخراج استفاده نمایید.

۲-۳-٦-روش PCR :

برای تشخیص مولکولی *نئوسپورا کانینوم* به روش کلاسیک، از یک جفت پرایمر با توالی نوکلئوتیدی اختصاصی برای تکثیر قطعه bp ۳۰۰ از ژن Nc5 استفاده می‌شود (جدول ۱-۶). مقدار حجم واکنش در داخل میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری، ۲۵ میکرولیتر به شرح ذیل می‌باشد (Muller et al., 1996):

مقدار ۶/۵ میکرولیتر آب مولکولی[3]، ۱۲/۵ میکرولیتر ماستر (۲×)[4]، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر پرایمر و ۴ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از DNA استخراج شده پس از میکس-

[1] - Nanodrop
[2] - Phosphate Buffer Solution (PBS)
[3] - D/W, Nuclease-Free water

کردن جهت انجام فرایند تکثیر به ترمال سایکلر[1] منتقل گردد. جهت تأیید صحت انجام کار از کنترل‌های منفی و مثبت استفاده شود. در تنظیم برنامه دمایی ترمال سایکلر، واسرش‌سازی اولیه[2] به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شود. پس از انجام ۳۸ سیکل (واسرش‌سازی[3] ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، اتصال[4] ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه و تکثیر[5] ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه)، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه تکثیر نهایی[6] انجام شود. ۱۰ میکرولیتر از هر محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد به همراه مارکر bp ۱۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه در ۸۵ ولت الکتروفورز گردد. ژل پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید[7] (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) بایستی بوسیله ژل داکیومنت بررسی گردد.

۳-۳-۶- Nested-PCR :

محصول PCR مربوط به نمونه‌های مثبت جهت تأیید نهایی به روش Nested-PCR بررسی می‌شوند. در این روش از یک جفت پرایمر اختصاصی برای تکثیر قطعه bp ۱۰۰ از محصول PCR استفاده می شود (جدول ۱-۶). مقدار ۹/۵ میکرولیتر آب مولکولی، ۱۲/۵ میکرولیتر ماستر (۲×)، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر پرایمر و ۱ میکرولیتر از محصول PCR پس از میکس‌کردن (۲۵ میکرولیتر حجم نهایی) به ترمال سایکلر منتقل می شود. واسرش‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه انجام می‌گردد. سپس ۳۵ سیکل حرارتی (واسرشت-سازی ۶۰ ثانیه در ۹۵ درجه، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای ۵۴ درجه و تکثیر ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه)

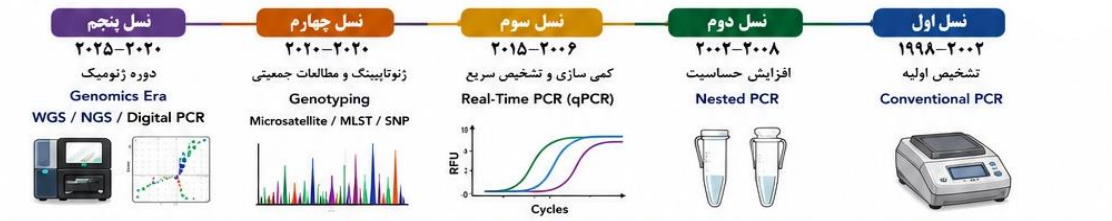
---

4 - Red load Tag Master®
1 - Thermal cycler
2 - Primary denaturation
3 - Denaturation
4 - Annealing
5 - Extension
6 - Final extension
7 - Ethidium bromide

و یک تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه صورت می گیرد (Barbosa de Macedo et al., 2013).

جدول ۱-٦-پرکاربردترین پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص مولکولی *نئوسپورا کانینوم*.

منبع	پرایمر		اندازه قطعه شناسایی شده (bp)	روش ملکولی
	نام	توالی		
(Muller et al., 1996)	Np21+	5'-cccagtgcgtccaatcctgtaac-3'	۳۳۰	PCR
	Np6+	5'-ctcgccagtcaacctacgtcttct-3'		
(Barbosa de Macedo et al., 2013)	Fn	5'-gtgttgctctgctgacgtgt-3'	۱۰۰	Nested-PCR
	Rn	5'-taccaactccctcggttcac-3'		



مارکرهای مولکولی پرکاربرد در تشخیص و تحقیقات نئوسپورا

ردیف	مارکر	نوع مارکر	ژن / ناحیه هدف	ویژگی‌ها	کاربرد اصلی	حساسیت	اختصاصیت
۱	Nc5	تکراری غیرکدکننده	توالی اختصاصی ژنوم نئوسپورا	بسیار تکثیرشونده Neospora caninum	تشخیص روتین در بافت‌ها و مایعات	بسیار بالا ■■■■■■	بسیار بالا
۲	ITS1	ریبوزومی (ITS)	Internal Transcribed Spacer 1	وجود در چند کپی تنوع کم بین سویه‌ها	تأیید تشخیص و مطالعات فیلوژنتیک	بالا ■■■■■□	بالا
۳	18S rRNA	ریبوزومی	18S rRNA gene	منطقه محافظت شده موجود در تمام آپیکوآسبدا	تشخیص عمومی و مطالعات فیلوژنتیک	متوسط ■■■□□□	متوسط
۴	SAG1	ژن کدکننده پروتئین سطحی	Surface Antigen 1	متغیر وایمنوژنیک موجود در یک کپی	تشخیص، ژنوتایپینگ و مطالعات اپیدمیولوژیکی	بالا ■■■■■■	بالا
۵	SAG3	ژن کدکننده پروتئین سطحی	Surface Antigen 3	متنوع بین سویه‌ها مناسب مطالعات جمعیتی	ژنوتایپینگ، تنوع ژنتیکی و مطالعات اپیدمیولوژیکی	بالا ■■■■■■	بالا
۶	GRA6	ژن کدکننده پروتئین گرانولی	Dense Granule Protein 6	جند آلیلی مفید برای تمایز سویه‌ها	ژنوتایپینگ و مطالعات تنوع ژنتیکی	متوسط ■■■□□□	متوسط
۷	Microsatellite (MS)	توالی‌های تکراری چندمکانه	بخش‌های میکروساتلایت در ژنوم	بسیار پلی‌مورفیک قدرت تفکیک بسیار بالا	مطالعات اپیدمیولوژیکی، رشد بیماری و مقایسه بابی	بسیار بالا ■■■■■■	بسیار بالا
۸	WGS / SNP	کل ژنوم	Whole Genome / SNPs	بالاترین قدرت تفکیک اطلاعات کامل ژنوم	اپیدمیولوژی مولکولی، مطالعات تکاملی	بسیار بالا ■■■■■■	بسیار بالا

پرایمرهای پرکاربرد برای تشخیص *Neospora caninum*

Nc5 (تکراری اختصاصی)		ITS1 (ریبوزومی)		18S rRNA (ریبوزومی)		SAG1 (ژن سطحی)		SAG3 (ژن سطحی)		GRA6 (پروتئین گرانولی)	
Np21+	5'-CCCAGTGCGTCC AATCCTGTAAC-3'ا	NN1	5'-TCAACCTTTGA ATCCCAA-3'ا	JB1	5'-AGGAATGCCACG GTAGTCCAATAC-3'ا	SAG1-F	5'-ATGTCGTCCCAGT GCGTCCA-3'ا	SAG3-F	5'-GACACGTTGTGTTG CCGGAT-3'ا	GRA6-F	5'-ATGGCTGTCGTTTG GTGTCT-3'ا
Np6+	5'-CTCGCCAGTCA ACCTACGTCTCT-3'ا	NN2	5'-CGAGCCAAGACA TCCATT-3'ا	JB2	5'-GCTGAAGGAGTT GGTGTACCG-3'ا	SAG1-R	5'-TCACGCGACACGTT GTTGAG-3'ا	SAG3-R	5'-TTGGTTGTTGGTTG GTGTGT-3'ا	GRA6-R	5'-TTGGTGTTGGTGTT GTTGTCT-3'ا
محصول: ۳۲۸ bp		محصول: ۱۰۰–۱۰۰ bp~		محصول: ۱۱۰۰ bp~		محصول: ۶۸۹ bp~		محصول: ۳۶۲ bp~		محصول: ۶۱۹ bp~	

کاربردهای اصلی مارکرهای مولکولی

- تشخیص دقیق و سریع عفونت نئوسپورا
- افزایش حساسیت و اختصاصیت تشخیص
- تمایز سویه‌ها و ژنوتایپینگ
- مطالعات اپیدمیولوژیک و مسیر انتقال
- پایش و کنترل برنامه‌های بهداشتی
- تحقیقات پیشرفته ژنومی و تکاملی

نمونه‌های مورد استفاده

جفت، قلب، مغز، شیر، مایع آمنیوتیک، خون

مقایسه روش‌های مولکولی

روش	زمان انجام	حساسیت	کاربرد
Conventional PCR	۴–۳ ساعت	★★★	تشخیص اولیه
Nested PCR	۶–۵ ساعت	★★★	افزایش حساسیت
qPCR (Real-Time PCR)	۲–۱.۵ ساعت	★★★★★	تشخیص سریع و کمی
Digital PCR (dPCR)	۳–۲ ساعت	★★★★★	تشخیص کمی مطلق

شکل ۳–۶– چکیده مارکرهای مولکولی و پرایمرهای تشخیصی نئوسپوروزیس (۲۰۲۵–۱۹۹۸).

٤-٣-٦- توالی و سویه‌های مختلف:

با استفاده از آنالیز DNA و بررسی توالی جدایه‌های مختلف، سویه‌های متفاوتی از *نئوسپورا کانینوم* از مناطق مختلف دنیا و میزبان‌های متنوع (عمدتاً گاو و سگ) معرفی شده است. سویه‌های مختلف با تنوع ژنتیکی دارای اختلافات بیولوژیکی و همچنین حدت بیماری‌زایی متفاوتی می‌باشند (Al-Qassab et al., 2009, 2010). جدایه‌های مختلف از نظر ساختار زیست‌شناختی و ریزبینی اختلاف بسیار کمی با یکدیگر داشته ولی از نظر بیماری‌زایی متفاوت هستند. سویه Nc-1 اولین موردی بود که از سگ‌ها در امریکا گزارش شد (Dubey et al., 1998). اولین سویه‌های گزارش شده از گاو نیز از امریکا BPA1 و BPA2 بودند (Conrad et al., 1993). اولین جدایه و همچنین آنالیز توالی *نئوسپورا کانینوم* در ایران توسط صالحی و همکاران (۲۰۱۲) از جنین‌های سقط شده گاو گزارش شد (سویه Nc-Iran با شماره ثبت FJ655914). در بررسی خصوصیات بیولوژیکی سویه‌های مختلف، تفاوت قابل توجهی در بیماری‌زایی و ویژگی‌های رشد آنها به دلیل تنوع ژنتیکی گزارش شده است. تنوع ژنتیکی نقش مهمی در بقاء و سازگاری سویه‌های مختلف *نئوسپورا کانینوم* دارد که متعاقب آن بر علائم بالینی نئوسپوروزیس موثر بوده و می‌تواند به طور مستقیم با سایر ویژگی‌های مهم اپیدمیولوژیک مانند پتانسیل انتقال نیز ارتباط داشته باشد (Al-Qassab et al., 2009).

بیشترین جهش و یا تفاوت در توالی سوش‌های مختلف در انتهای توالی‌های آن‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی اتفاق می‌افتد (Goodswen et al., 2013). تنوع ژنتیکی، اختلاف در بیولوژی مولکولی بین جدایه‌ها و سوش‌ها و بیماری‌زایی آن‌ها در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (عمدتاً موش بالب-سی[1]) و به‌صورت محدود در میزبان‌هایی مثل گاو و سگ بررسی شده است (Qian et al., 2016). از روش‌های مولکولی مختلفی برای مطالعات ژنتیکی در *نئوسپورا کانینوم* استفاده شده است که از آنها می-

[1] -BALB/c

توان به RAPD-PCR [1] و سایر روش‌های مولکولی مبتنی بر نواحی هدف ITS1, ss rDNA, Nc5 و ژن‌های آلفا و بتا توبولین[2] اشاره نمود (Al-Qassab et al., 2010). ژن Nc5 در توالی *نئوسپورا کانینوم* دارای تکرار زیادی می‌باشد؛ به همین دلیل در تشخیص آلودگی به *نئوسپورا* دارای حساسیت و ویژگی بالایی می‌باشد. اخیراً نشانگرهای مینی و میکروستلایت[3] برای مطالعات پلی‌مورفیسم ژنومی بر روی جدایه‌های مختلف *نئوسپورا کانینوم* استفاده شده است. اگرچه تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های *نئوسپورا کانینوم* قابل توجه به نظر می‌رسد، ولیکن هیچ ارتباط مشخصی بین پروفایل DNA و بیماری‌زایی یا موقعیت‌های جغرافیایی که از آن جدا شده وجود ندارد (Al-Qassab et al., 2009). میکروستلایت سکونسینگ یک روش بسیار مناسب برای بررسی پلی‌مورفیسم معرفی شده‌است. مطالعه بر روی نشانگرهای میکروستلایت سکونسینگ لوکوس‌های[4] متنوعی را شناسایی نموده که بیشترین تنوع ژنتیکی در ۷ لوکوس از آنها (MS4, MS5, MS6A, MS7, MS8, MS10, MS12) گزارش شده است (Regidor-Cerrillo et al., 2006). تنوع ژنتیکی معمولاً به صورت تغییر در تعداد تکرار کپی و همچنین تغییر در توالی نوکلئوتیدی واحدهای تکرار شونده نمایان می‌شود. یکی از اولین تکرارهایی که با جزئیات مورد مطالعه قرار گرفته است تکرار Nc-5 می‌باشد. در مقایسه سویه‌های ثبت شده در پایگاه داده‌ها[5]، تشابه ۹۵ تا ۱۰۰ درصدی بین توالی‌ها گزارش شده است (Al-Qassab et al., 2010).

[1]- Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)
[2] - α and β-tubulin genes
[3] - Mini and Microsatellite
[4] - Alleles
[5] - NCBI

جدول ۲-٦- مهم‌ترین سویه‌های *نئوسپورا کانینوم* معرفی شده از مناطق مختلف جهان (Al-Qassab et al., 2010).

جدایه	نوع نمونه	میزبان	کشور
Nc-1	مغز	سگ با آلودگی مادرزادی	امریکا
Nc-2	عضله	سگ	امریکا
Nc-3	مغز و نخاع	سگ	امریکا
Nc-4, Nc-5	مغز	سگ با آلودگی مادرزادی	امریکا
Nc-6, Nc-7, Nc-8	مغز و عضله	توله سگ	امریکا
Nc-9	مغز	توله سگ با آلودگی مادرزادی	امریکا
CN1	مغز و نخاع	سگ با آلودگی مادرزادی	امریکا
Nc-Liverpool	مغز	توله سگ با آلودگی مادرزادی	بریتانیا
Nc-LivB1	مغز	جنین مرده گوساله	بریتانیا
Nc-LivB2	مغز	جنین سقط شده گاو	بریتانیا
Nc-Bahia	مغز	سگ	برزیل
Nc-6 Argentina	مدفوع	سگ	آرژانتین
WA-K9	ضایعات پوستی	سگ	استرالیا
CZ-4	مدفوع	سگ	جمهوری چک
Nc-GER1	مغز و نخاع	توله سگ با آلودگی مادرزادی	آلمان
Nc-P1	مدفوع	سگ با آلودگی مادرزادی	پرتغال
BPA1, BPA2	مغز	جنین سقط شده گاو	امریکا
BPA3, BPA4	مغز	گوساله با آلودگی مادرزادی	امریکا
Nc-Beef	مغز	گاو گوشتی	امریکا
Nc-Illinois	مغز	گوساله	امریکا
VMDL1	مغز	جنین سقط شده گاو	امریکا
Nc-Porto1	مغز	جنین سقط شده گاو	پرتغال
Nc-Sp1	مغز	جنین سقط شده گاو	اسپانیا
Nc-Spain 1H	مغز	گوساله بدون علامت	اسپانیا
JAP1	مغز و نخاع	گوساله با آلودگی مادرزادی	ژاپن

BT-2	مغز	گوساله با آلودگی مادرزادی	ژاپن
Nc-Sheep	مغز	گوسفند آبستن	ژاپن
Nc-SweB1	مغز	جنین مرده گوساله	سوئد
Nc-VP1	مغز	گوساله با آلودگی مادرزادی	ایتالیا
Nc-Iran1, Nc-Iran2	مغز	جنین سقط شده گاو	ایران
NCPG1	مغز و جفت	گوساله	ایتالیا
Nc-MalB1	مغز	گوساله با آلودگی مادرزادی	مالزی
KBA-1	مغز	گوساله با آلودگی مادرزادی	کره جنوبی
KBA-2	مغز	جنین سقط شده گاو	کره جنوبی
Nc-Kr2	مغز	گاو شیری	کره جنوبی
BNC-PR1	مغز	گوساله نابینا مادرزادی	برزیل
Nc-Nowra	مغز و نخاع	گوساله با آلودگی مادرزادی	استرالیا
NcNZ1	مغز	گاوشیری	نیوزیلند
NcIs580	مغز	جنین سقط شده گاو	اسرائیل
Nc-PolB1	مغز	گوساله	لهستان
NcBr-Buf	مغز	گاومیش	برزیل
Nc-Bj	مغز	جنین سقط شده گاو	چین
Nc-deer1	مغز	گوزن دم سفید	امریکا
Nc-WTDVA-1	مغز	گوزن دم سفید	امریکا

جدول ۳-٦- شماره دسترسی برخی از جدایه‌های ثبت شده از ایران در بانک‌ژن به تفکیک میزبان و محل نمونه‌برداری (Gharekhani et al., 2022).

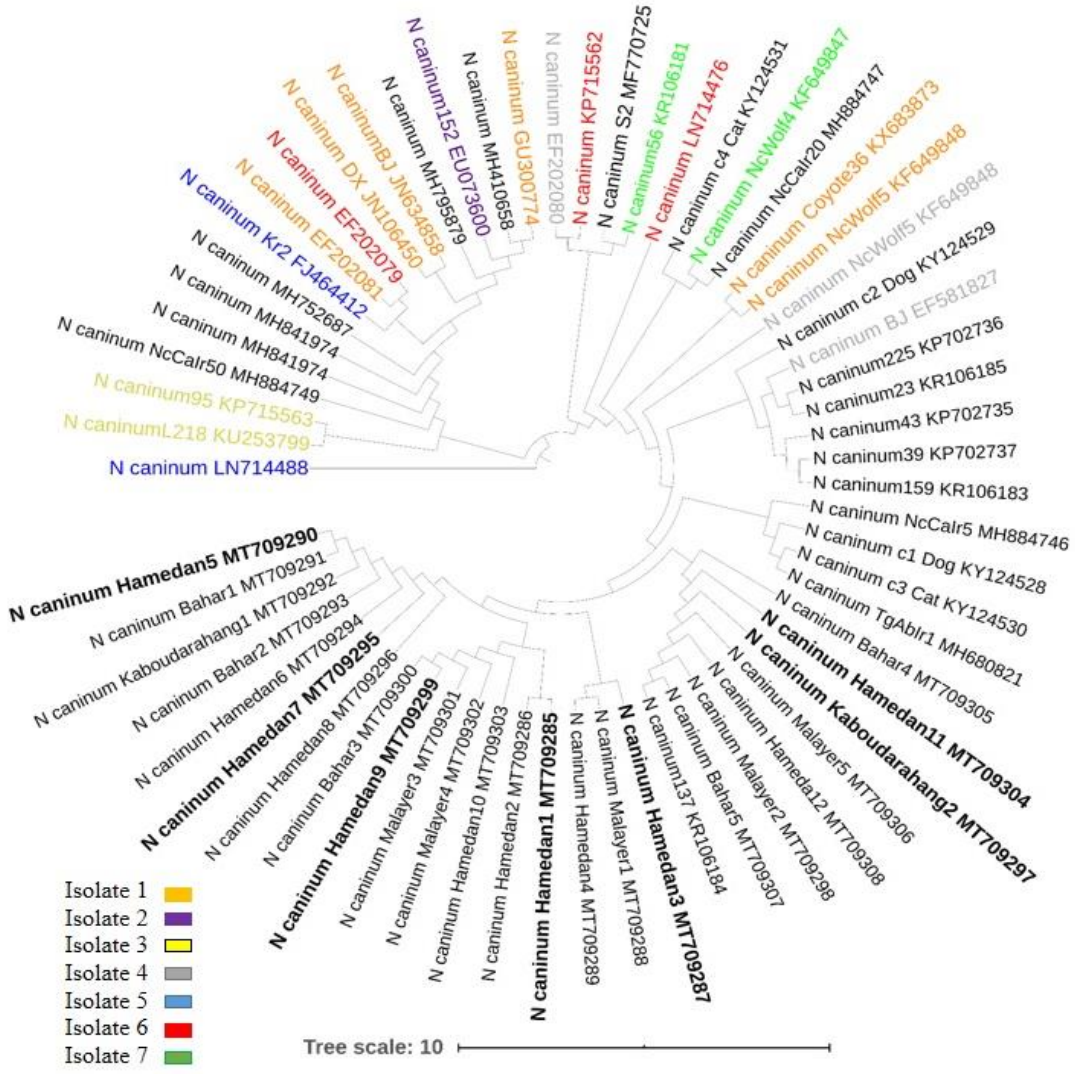
ردیف	شماره ثبت	میزبان	نوع نمونه	محل نمونه برداری	جدایه
۱	MT709285	گاو شیری	بافت مغز	همدان	۱
۲	MT709286	گاو شیری	شیر	همدان	۱
۳	MT709287	گاو شیری	خون	همدان	۲
۴	MT709288	گاو شیری	خون	ملایر	۲
۵	MT709289	سگ	خون	همدان	۲
۶	MT709290	سگ	خون	همدان	۳
۷	MT709291	سگ	خون	بهار	۳
۸	MT709292	سگ	خون	کبودرآهنگ	۳
۹	MT709293	گاو شیری	خون	بهار	۳
۱۰	MT709294	گاو شیری	بافت مغز	همدان	۳
۱۱	MT709295	گاو شیری	شیر	همدان	٤
۱۲	MT709296	سگ	خون	همدان	٤
۱۳	MT709297	گاو شیری	شیر	کبودرآهنگ	٥
۱۴	MT709298	سگ	خون	ملایر	٥
۱۵	MT709299	گاو شیری	خون	همدان	٦
۱۶	MT709300	سگ	خون	بهار	٦
۱۷	MT709301	گاو شیری	بافت مغز	ملایر	٦
۱۸	MT709302	گاو شیری	شیر	ملایر	٦
۱۹	MT709303	سگ	خون	همدان	٦
۲۰	MT709304	گاو شیری	خون	همدان	۷
۲۱	MT709305	سگ	خون	بهار	۷
۲۲	MT709306	گاو شیری	خون	ملایر	۷
۲۳	MT709307	گاو شیری	شیر	بهار	۷
۲۴	MT709308	سگ	خون	همدان	۷
۲۵	MT955653	گاو نر	مایع منی	همدان	۱
۲۶	MT955654	گاو نر	مایع منی	همدان	۲
۲۷	MT955655	گاو نر	مایع منی	همدان	۳
۲۸	MT955656	گاو نر	مایع منی	همدان	٤
۲۹	MT955657	گاو نر	مایع منی	همدان	٥
۳۰	MT955658	گاو نر	مایع منی	همدان	٦
۳۱	MT955659	گاو نر	مایع منی	همدان	۷

جدول ٤-٦- تشابه ۷ توالی از جدایه‌های *نئوسپورا کانینوم* ایران با جدایه‌های ثبت شده در بانک‌ژن(Gharekhani et al., 2022).

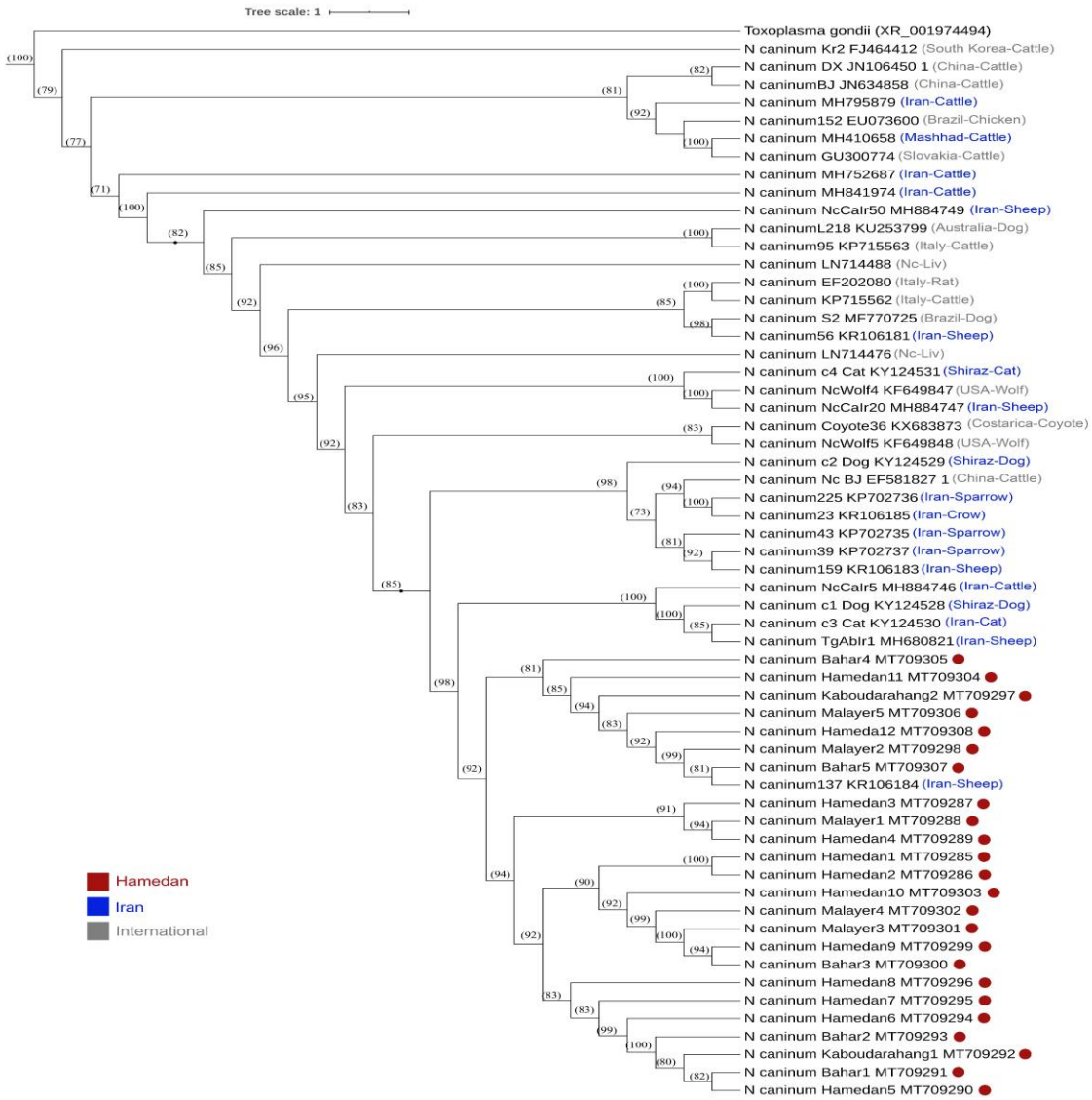
شماره دسترسی	کشور	نمونه/میزبان	میزان تشابه (درصد)	جدایه
KX683873	کوستاریکا	مدفوع کایوت	۹۷/۴	۱
KF649848	امریکا	مغز گرگ	۹۷/۴	
GU300774	اسلوواکی	مغز گاو شیری	۹۹/۲	
FR823382	ژن کامل سویه لیورپول (Nc-Liv)		۹۶	
JN634858	چین	مغز گاوشیری	۹۷/۷	
EF202081	ایتالیا	کلیه رت	۹۴/۹	
JN106450	چین	مغز گاو	۹۸/۶	
EU073600	برزیل	مغز جوجه	۹۶/۸	۲
KP715593	ایتالیا	ماهیچه گاو	۹۵/۶	۳
KU253799	استرالیا	مدفوع سگ	۹۸/۳	
EF581827	چین	مغز جنین سقطی گاو	۹۵/۵	٤
KF649848	امریکا	مغز گرگ	۹۹	
EF202080	ایتالیا	عضله رت	۹۷	
LN714488	ژن کامل سویه لیورپول (Nc-Liv)		۹۹	٥
FJ464412	کره جنوبی	مغز گاو	۹۸/۳	
LN714476	ژن کامل سویه لیورپول (Nc-Liv)		۹۷/۶	٦
EF202079	ایتالیا	مغز جونده	۹۵	
KP715562	ایتالیا	مغز گاو	۹۶/۲	
KF649847	امریکا	مدفوع گرگ	۹۹/۳	۷
MF770725	برزیل	مایع منی سگ	۹۸/۲	



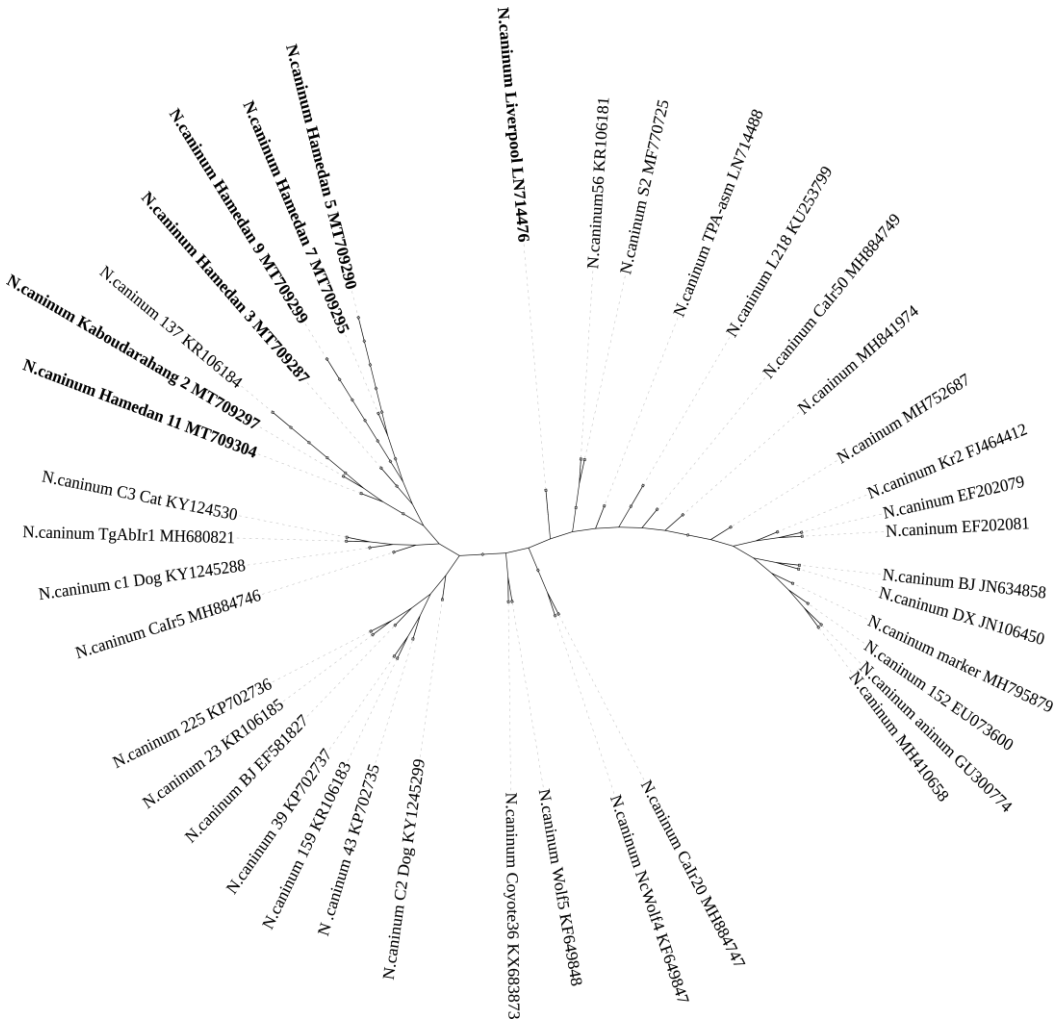
شکل ٤-٦- اختلاف توالی‌های هفت جدایه *نئوسپورا کانینوم* از ایران (استان همدان) با سویه استاندارد لیورپول (NcLiv: LN714476) (Gharekhani et al., 2022).



شکل۵-٦- موقعیت جدایه‌های *نئوسپورا کانینوم* از ایران و جهان در درخت فیلوژنی (Gharekhani et al., 2022**).**



شکل ٦-٦- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های *نئوسپورا کانینوم* گاو و سگ بدست آمده در استان همدان و بازیافت از ژن بانک بر اساس توالی نوکلئوتید به روش آنالیز آماری Neighbor joining و با استفاده از الگوی Tamura 3-parameter model in MEGA X. Bar,، به ازاء هر نوکلئوتید ترسیم شد. طول شاخه‌ها نشان دهنده مقدار تغییر فاصله ژنتیکی بین توالی‌های مختلف می‌باشد. روش حذف گپ‌ها deletion و تست درخت فیلوژنی بر اساس bootstrap با تکرار ۱۰۰۰ انجام گردید.



شکل ۷-٦- نگاره ریشه و منشاء جدایه‌های *نئوسپورا کانینوم* ایران با چندسویه مهم معرفی شده در جهان.



شکل ۸-٦- نقشه جامع ژن‌های مورد استفاده در تشخیص و ژنوتیپینگ *نئوسپورا*.

٤-٦- حیوانات آزمایشگاهی:

پیش از توسعه روش‌های مولکولی و کشت سلولی، استفاده از حیوانات آزمایشگاهی یکی از ابزارهای اصلی برای تأیید حضور *نئوسپورا کانینوم* در نمونه‌های بالینی محسوب می‌شد. در دهه اخیر، روش‌های مولکولی و تکنیک‌های مبتنی بر توالی‌یابی تا حد زیادی جایگزین مدل‌های حیوانی در تشخیص شده‌اند. با این حال، حیوانات آزمایشگاهی همچنان برای جداسازی سویه‌های جدید، ارزیابی بیماری‌زایی، آزمون‌های داروها و واکسن‌ها و بررسی انتقال عمودی نقش کلیدی دارند. حساسیت بالای برخی حیوانات آزمایشگاهی به آلودگی نئوسپورا موجب شده است که این مدل‌ها نقش مهمی در شناسایی انگل از نمونه‌های دارای بار انگلی پایین ایفا کنند (Correia et al., 2013; Aguado-Martínez et al., 2017).

١-٤-٦-آزمون تلقیح زیستی (Bioassay):

تلقیح زیستی یکی از قدیمی‌ترین روش‌های تأیید حضور انگل در نمونه‌های بافتی است. در این روش، هموژنات تهیه‌شده از مغز، قلب، جفت یا سایر بافت‌های مشکوک به آلودگی به حیوان آزمایشگاهی حساس تزریق می‌شود. در صورت وجود انگل زنده، تکثیر *نئوسپورا* در بدن حیوان رخ داده و پس از مدتی امکان شناسایی انگل با استفاده از روش های سرولوژی، مولکولی و یا هیستوپاتولوژیک فراهم می‌شود. اگرچه این روش زمان‌بر است، اما همچنان یکی از معتبرترین راهکارها برای اثبات زنده بودن انگل محسوب می‌شود. پیشرفت روش‌های مولکولی موجب کاهش وابستگی به Bioassay شده است، اما این روش همچنان به عنوان استاندارد طلایی برای اثبات زنده بودن انگل در برخی مطالعات تحقیقاتی شناخته می‌شود.

٢-٤-٦-موش‌ها به عنوان مدل استاندارد:

موش‌ها رایج‌ترین حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده در مطالعات *نئوسپورا* هستند. سویه‌های مختلف موش از نظر حساسیت به عفونت تفاوت قابل توجهی دارند. موش‌های فاقد سیستم ایمنی مؤثر(Nude mice، SCID mice و IFN-γ knockout mice) حساسیت بالایی به

نئوسپورا نشان می‌دهند و برای جداسازی سویه‌های با بار انگلی پایین بسیار ارزشمند هستند. در بسیاری از مطالعات، تلقیح نمونه‌های جنینی یا جفتی به این موش‌ها امکان جداسازی موفق سویه‌های جدید *نئوسپورا* را فراهم کرده است. تاکنون هیچ مدل حیوان آزمایشگاهی مناسبی جهت ارزیابی زیستی و مطالعه اووسیست‌های *نئوسپورا کانینوم* در مدفوع سگ‌ها گزارش نشده است. موش‌های فاقد ژن اینترفرون گاما نسبت به تلقیح تاکی‌زوئیت و کیست‌های نسجی انگل حساس هستند. یک گونه از ژربیل‌ها بنام *مریونس انگوئی‌کولاتوس*[1] نسبت به آلودگی اووسیست حساس است. همچنین *مریونس تریس‌ترامی*[2] و موش صحرایی *پساموميس اوبسوس*[3] به آلودگی تاکی‌زوئیت‌ها حساس هستند. موش‌های بالب–سی تحت درمان با متیل–پردنیزولون[4] برای آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در شرایط آزمایشگاهی نیز مناسب هستند. جربیل‌ها و همسترها در برخی مطالعات به عنوان مدل‌های جایگزین مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این حیوانات نسبت به برخی سویه‌های *نئوسپورا* حساسیت بالایی نشان می‌دهند و می‌توانند علائم عصبی و ضایعات بافتی مشابه بیماری طبیعی ایجاد کنند. به همین دلیل در ارزیابی بیماری‌زایی سویه‌های مختلف و مطالعات دارویی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Dubey et al., 2017).

۳-٤-٦-نقش حیوانات آزمایشگاهی در جداسازی سویه‌های جدید:

یکی از مهم‌ترین کاربردهای مدل‌های حیوانی، جداسازی ایزوله‌های جدید *نئوسپورا کانینوم* از نمونه‌های میدانی است. در بسیاری از موارد، میزان انگل موجود در نمونه برای کشت مستقیم کافی نیست. در این شرایط، ابتدا نمونه به حیوان حساس تلقیح می‌شود و پس از تکثیر انگل، امکان جداسازی و انتقال به کشت سلولی فراهم می‌شود. این رویکرد نقش مهمی در ایجاد بانک‌های سویه‌ای و مطالعات ژنوتایپینگ ایفا کرده است.

---

[1] -*Meriones unguiculatus*
[2] -*Meriones tristrami*
[3] -*Psammoomyss ubesus*
[4] -Methyl Prednisolone

٤-٤-٦- محدودیت‌های استفاده از حیوانات آزمایشگاهی:

با وجود مزایای متعدد، استفاده از حیوانات آزمایشگاهی با محدودیت‌هایی مثل هزینه نگهداری و مراقبت، زمان طولانی انجام آزمون، نیاز به امکانات تخصصی، مسائل اخلاقی مرتبط با استفاده از حیوانات و جایگزینی تدریجی توسط روش‌های مولکولی پیشرفته همراه است. به همین دلیل امروزه استفاده از Bioassay عمدتاً به مراکز تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های مرجع محدود شده است.

٥-٤-٦- مدل‌های حیوانی نوین در تحقیقات *نئوسپورا کانینوم*:

مدل‌های حیوانی طی بیش از سه دهه گذشته نقش اساسی در شناخت زیست‌شناسی، بیماری‌زایی، ایمنی و راهکارهای کنترل نئوسپوروزیس ایفا کرده‌اند. اگرچه گاو به عنوان میزبان اصلی بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، اما محدودیت‌های اقتصادی، اخلاقی و اجرایی استفاده از دام‌های بزرگ موجب شده است که پژوهشگران به توسعه مدل‌های حیوانی جایگزین روی آورند. در سال‌های اخیر، ظهور فناوری‌های مهندسی ژنتیک، ویرایش ژنوم و مدل‌های انسانی‌شده (Humanized Models) افق‌های جدیدی را در تحقیقات *نئوسپورا* گشوده است.

١. موش‌های Knockout

موش‌های Knockout حیواناتی هستند که یک یا چند ژن خاص در آنها غیرفعال شده است. این مدل‌ها امکان بررسی نقش دقیق مولکول‌های ایمنی در کنترل عفونت را فراهم می‌کنند. مهم‌ترین مدل‌ها این نوع از موش ها عبارتند از:

الف- IFN-γ Knockout

حذف ژن اینترفرون گاما موجب حساسیت شدید به *نئوسپورا* می‌شود. از این مدل عمدتاً برای بررسی نقش ایمنی سلولی، مطالعه مکانیسم‌های مقاومت میزبان و ارزیابی بیماری‌زایی سویه‌ها استفاده می شود.

ب- IL-12 Knockout

در این مدل، تولید پاسخ Th1 مختل می‌شود. مطالعه آغاز پاسخ ایمنی و بررسی تعامل انگل و سیستم ایمنی از کاربردهای اساسی این مدل است.

ج. TLR Knockout Models

این مدل‌ها برای مطالعه نقش گیرنده‌های ذاتی ایمنی استفاده می‌شوند.

۲. موش‌های Humanized

در این حیوانات بخشی از سیستم ایمنی انسان جایگزین سیستم ایمنی موش می‌شود. امکان مطالعه پاسخ‌های ایمنی شبه‌انسانی علیه *نئوسپورا* را فراهم می‌کنند. ارزیابی واکسن، مطالعه ایمنی سلولی و کشف بیومارکرهای جدید از کاربردهای این مدل است.

۳. مدل‌های آبستنی تجربی

مهم‌ترین خسارت اقتصادی نئوسپوروزیس ناشی از سقط‌جنین است. بنابراین مدل‌های بارداری یکی از حیاتی‌ترین ابزارهای پژوهشی محسوب می‌شوند. از موش‌های آبستن برای مطالعه انتقال عمودی، بررسی آسیب‌های جنینی و ارزیابی واکسن‌ها استفاده می شود.

٤. مدل‌های مبتنی بر CRISPR-Cas9

فناوری CRISPR امکان حذف یا تغییر ژن‌های خاص را فراهم کرده است. شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی، تعیین ژن‌های ضروری بقا، بررسی مکانیسم تهاجم سلولی و طراحی سویه‌های ضعیف‌شده از کاربردهای این مدل است.

۵. مدل‌های گزارشگر فلورسنت (Reporter Models)

در این روش، انگل با ژن‌های فلورسنت مهندسی می‌شود. مشاهده زنده انگل، پایش گسترش عفونت و ارزیابی سریع داروها از مزایای استفاده از این مدل است.

٦. مدل‌های چندسویه‌ای (Comparative Strain Models)

امروزه پژوهشگران از مدل‌های حیوانی برای مقایسه سویه‌های مختلف *نئوسپورا* استفاده می‌کنند. از این مدل برای اهداف مقایسه بیماری‌زایی، بررسی انتقال عمودی و مطالعه تنوع ژنتیکی استفاده می شود.

٥-٦- کشت سلول:

کشت سلولی طی سه دهه گذشته یکی از مهم‌ترین ابزارهای تحقیقاتی در مطالعه *نئوسپورا کانینوم* بوده است. نخستین جداسازی‌های موفق انگل در دهه ۱۹۹۰ نشان داد که تاکی‌زوئیت‌های انگل قادرند در طیف وسیعی از سلول‌های پستانداران تکثیر یابند. این قابلیت موجب شد کشت سلولی به ستون اصلی مطالعات زیست‌شناسی، بیماری‌زایی، ایمنی‌شناسی، داروشناسی و ژنتیک مولکولی *نئوسپورا* تبدیل شود. فناوری‌های نوظهور مانند ارگانوئیدهای جفتی و سیستم‌های اندام–تراشه (Organ-on-a-Chip) احتمالاً نسل آینده تحقیقات *نئوسپورا* را شکل خواهند داد و نقش مهمی در کاهش وابستگی به مدل‌های حیوانی خواهند داشت. در سال‌های اخیر، پیشرفت فناوری‌های سلولی و مولکولی موجب شده است که نقش کشت سلولی از تکثیر ساده انگل فراتر رفته و به بستری برای مدل‌سازی دقیق تعامل انگل و میزبان تبدیل شود. سیستم‌های اندام–تراشه دستاورد بزرگی در مطالعات پزشکی و دارویی محسوب می شود و منجر به این می شود که مطالعات از شرایط ساده آزمایشگاهی و اتاق‌های کشت و میزهای کار وارد بازارهای تجاری شود. این سیستم درواقع ابزارهای کشت سلول بسیار کوچکی هستند که با استفاده از تکنولوژی ساخت میکروچیپ ها تولید می‌شوند و اندازه‌ای معادل قطعه حافظه کامپیوتر دارند و شامل کانال های توخالی است که با سلول ها و بافت‌های زنده پوشیده شده‌اند و فیزیولوژی بدن را تقلید می‌کنند. این ابزارها سطوح عملکردی از بافت و اندام را ایجاد می‌کنند که با استفاده از سیستم‌های کشت متداول این امکان وجود ندارد و اجازه آنالیزهای بیوشیمیایی، ژنتیکی و فعالیت های متابولیکی درون یک سلول منفرد را مهیا می سازند. این پلت فرم می‌تواند گامی مهم برای پیش بینی بهتر و اندازه گیری مفیدتر کارایی و

امنیت دارو و مواد شیمیایی جدید باشد و از طرف دیگر نیاز به مطالعات جانوری متداول را کاهش می‌دهد. این اندام تراشه‌ها با سلول‌های بنیادی مشتق از بیماران پوشیده شده و می‌توانند در آینده راهی را برای ایجاد درمان های شخصی و تخصصی ارائه دهند (Tomasina et al., 2023).

برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ که *نئوسپورا کانینوم* از یک سگ جدا شد، برای کشت آن از سلول‌های مونوسیت و بافت پوششی سرخرگ قلبی- ششی گاو استفاده گردید. امروزه برای کشت این انگل عمدتاً از تیره‌های سلولی FF[1]، MDBK[2] و مغز جنین موش استفاده می‌گردد. پاساژهای متوالی از تاکی‌زوئیت‌ها تا ۸ سال قدرت عفونت‌زایی ارگانیسم در موش را حفظ می‌کند. همچنین تاکی‌زوئیت‌های نگهداری شده در نیتروژن مایع قدرت عفونت‌زایی خود را برای کشت سلولی حفظ می‌کنند (Tunev et al., 2002; Khordadmehr et al., 2014). با وجود مزایای فراوان، کشت سلولی دارای محدودیت‌هایی چون عدم بازسازی کامل شرایط درون بدن، فقدان پاسخ ایمنی سیستمیک، تفاوت بافتی با میزبان طبیعی و دشواری مطالعه عفونت مزمن نیز هست. به همین دلیل نتایج کشت سلولی باید همراه با مطالعات حیوانی و میدانی تفسیر شوند.

۱-۵-٦-رده‌های سلولی پرکاربرد در تحقیقات *نئوسپورا*:

۱-۱-۵-٦- سلول‌های Vero

سلول‌های Vero مشتق از کلیه میمون سبز آفریقایی، همچنان پرکاربردترین رده سلولی برای تکثیر آزمایشگاهی *نئوسپورا* محسوب می‌شوند. رشد یکنواخت، حساسیت بالا به آلودگی، تولید تعداد زیاد تاکی‌زوئیت و سهولت نگهداری از ویژه‌گی‌های مزایای آن است. به همین دلیل اغلب سویه‌های مرجع مانند NC-1 در این سلول‌ها نگهداری می‌شوند.

[1] -Forskin Fibroblast
[2] -Madian Darby Bovin Kidney

۲-۱-۵-٦- سلول‌هایMARC-145

این رده سلولی در برخی مطالعات برای افزایش بازده تکثیر انگل مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات نشان داده‌اند که برخی سویه‌های *نئوسپورا* در MARC-145 سرعت تکثیر بیشتری نسبت به Vero دارند.

۳-۱-۵-٦-سلول‌هایMDBK

سلول‌های کلیوی گاوی(Madin-Darby Bovine Kidney) به دلیل نزدیکی زیستی بیشتر به میزبان طبیعی، مطالعه تعامل اختصاصی انگل و سلول‌های گاوی و بررسی بیان ژن‌های بیماری‌زایی دارای اهمیت می باشند.

٤-۱-۵-٦- سلول‌های جفتی گاوی

در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های تروفوبلاست و اپیتلیوم جفتی گاو به شدت افزایش یافته است. این مدل‌ها امکان مطالعه تهاجم انگل به جفت، انتقال عمودی و پاسخ ایمنی موضعی را فراهم می‌کنند.

۲-۵-٦-پیشرفت‌های اخیر در کشت سلولی *نئوسپورا*:

۱). مدل‌سازی تهاجم سلولی

مطالعات جدید نشان داده‌اند که کشت سلولی نقش کلیدی در شناسایی مراحل مختلف تهاجم نئوسپورا (اتصال اولیه، ترشح پروتئین‌های MIC، تشکیل واکوئل انگلی، تکثیر داخل سلولی و خروج از سلول) را دارد. کشت سلولی امکان تصویربرداری زنده این فرایندها را نیز فراهم کرده است.

۲). ارزیابی بیماری‌زایی سویه‌ها

امروزه بسیاری از مطالعات ژنوتایپینگ با ارزیابی رشد سویه‌ها در کشت سلولی همراه هستند. سرعت تهاجم، نرخ تکثیر، اندازه پلاک و زمان لیز سلولی از شاخص‌های مورد ارزیابی در بیماری‌زایی انگل هستند.

۳). غربالگری داروها

یکی از مهم‌ترین کاربردهای کشت سلولی در دهه اخیر، غربالگری داروهای جدید است. بیشتر داروهای امیدبخش ضد *نئوسپورا* ابتدا در کشت سلولی ارزیابی شده‌اند. کشت سلولی امکان بررسی IC50 داروها (غلظتی است که در آن ۵۰ درصد از سلول‌ها دچار مرگ می‌شوند)، سمیت سلولی، اثر بر تکثیر انگل و اثر بر تهاجم سلولی را فراهم می‌کند.

٤). مطالعه مقاومت دارویی

یکی از حوزه‌های جدید پژوهشی، بررسی احتمال ایجاد مقاومت دارویی در *نئوسپورا* است. کشت‌های طولانی‌مدت و پاساژهای مکرر امکان مطالعه تغییرات ژنتیکی مرتبط با مقاومت را فراهم کرده‌اند.

۳-۵-٦- نقش کشت سلولی در تحقیقات اُمیکس (Omics)

اومیکس به مطالعه‌ی جامع مجموعه‌ای از مولکول‌های زیستی اشاره دارد. هدف امیکس توصیف جمعی و تعیین کمیت مجموعه‌ای از مولکول‌های بیولوژیکی است که به ساختار، کارکرد و پویایی یک ارگانیسم یا جانداران تبدیل می‌شوند. چهار شاخه‌ی اصلی آن شامل موارد زیر است:

-ژنومیکس (Genomics): مطالعه‌ی کامل DNA .

-ترنسکریپتومیکس (Transcriptomics): بررسی RNA های رونویسی‌شده.

-پروتئومیکس (Proteomics) : تحلیل کل پروتئین‌های سلولی.

-متابولومیکس (Metabolomics) : بررسی مولکول‌های متابولیکی کوچک.

درک این چهار حوزه و به‌ویژه ادغام داده‌های چنداومیکسی (Multi-Omics Integration)، اساس پزشکی مولکولی دقیق و درمان‌های هدفمند در آینده را تشکیل می‌دهد.
هر شاخه از اومیکس بخشی از پازل عملکرد سلول را روشن می‌کند:
-ژنومیکس: چه چیزی ممکن است رخ دهد (پتانسیل ژنتیکی).
-ترنسکریپتومیکس: چه چیزی در حال رونویسی است.
-پروتئومیکس: چه چیزی بیان و فعال شده است.
-متابولومیکس: پیامد نهایی این فعالیت‌ها.
ادغام داده‌های این چهار حوزه، دیدی چندلایه از بیولوژی ارائه می‌دهد.

۱-۳-۵-٦-ترنسکریپتومیکس

ترنسکریپتومیکس به مطالعه‌ی کلRNA های رونویسی‌شده از ژنوم می‌پردازد؛ از جملهmRNA، rRNA، tRNA وRNA های غیرکدکننده مانند miRNA و lncRNA می‌پردازد. فناوری‌های مهم در ترنسکریپتومیکس عبارتند از:
- RNA-Seq: ابزار اصلی برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها.
- Microarray RNA : مقایسه‌ی الگوی بیان هزاران RNA .
- Single-cell Transcriptomics: بررسی بیان ژن در سطح تک‌سلول برای تحلیل ناهمگونی سلولی.

کاربردهای کلیدی ترنسکریپتومیکس شناسایی الگوهای بیان ژن در سلول‌های سالم و بیمار، بررسی پاسخ سلولی به داروها و استرس، کشف بیومارکرهای RNA برای تشخیص زودهنگام بیماری‌ها و مطالعه‌ی شبکه‌های تنظیمی RNAهای غیرکدکننده است. امروزه RNA-seq روی انگل‌های رشد یافته در کشت سلولی اطلاعات ارزشمندی درباره ژن‌های بیماری‌زایی، ژن‌های مرتبط با تهاجم و پاسخ به داروها را ارائه می‌دهد.

۲-۳-۵-٦- پروتئومیکس

پروتئومیکس علم مطالعه‌ی جامع پروتئین‌ها است. برخلاف ژنوم که ثابت است، پروتئوم با شرایط سلولی، بافتی و محیطی تغییر می‌کند. فناوری‌های پیشرفته در پروتئومیکس:

۱). LC-MS/MS (Mass Spectrometry): شناسایی و کمی‌سازی دقیق پروتئین‌ها.

۲). 2D Gel Electrophoresis: جداسازی پروتئین‌ها بر اساس بار و وزن مولکولی.

۳). Protein Microarrays : بررسی برهم‌کنش‌های پروتئینی در مقیاس بالا.

از این روش برای کشف بیومارکرهای پروتئینی در سرطان و بیماری‌های مزمن، تحلیل تغییرات پس‌ترجمه‌ای یا Post-Translational Modifications (PTMs) مانند فسفوریلاسیون و گلیکوزیلاسیون و طراحی واکسن‌ها و داروهای هدفمند و مطالعه‌ی شبکه‌های پروتئین–پروتئین برای درک تعاملات سلولی استفاده می شود. در این روش مطالعه پروتئین‌های ترشحی *نئوسپورا* عمدتاً در محیط کشت سلولی انجام می‌شود.

۳-۳-۵-٦-متابولومیکس

متابولومیکس به بررسی مولکول‌های کوچک و متابولیت‌ها (مانند اسیدهای آمینه، قندها، لیپیدها و نوکلئوتیدها) می‌پردازد. متابولیت‌ها درواقع نتیجه‌ی نهایی فعالیت‌های ژنتیکی و پروتئینی سلول هستند. فناوری‌های کلیدی در این روش:

۱). GC-MS و LC-MS : شناسایی دقیق متابولیت‌ها با کروماتوگرافی جرمی.

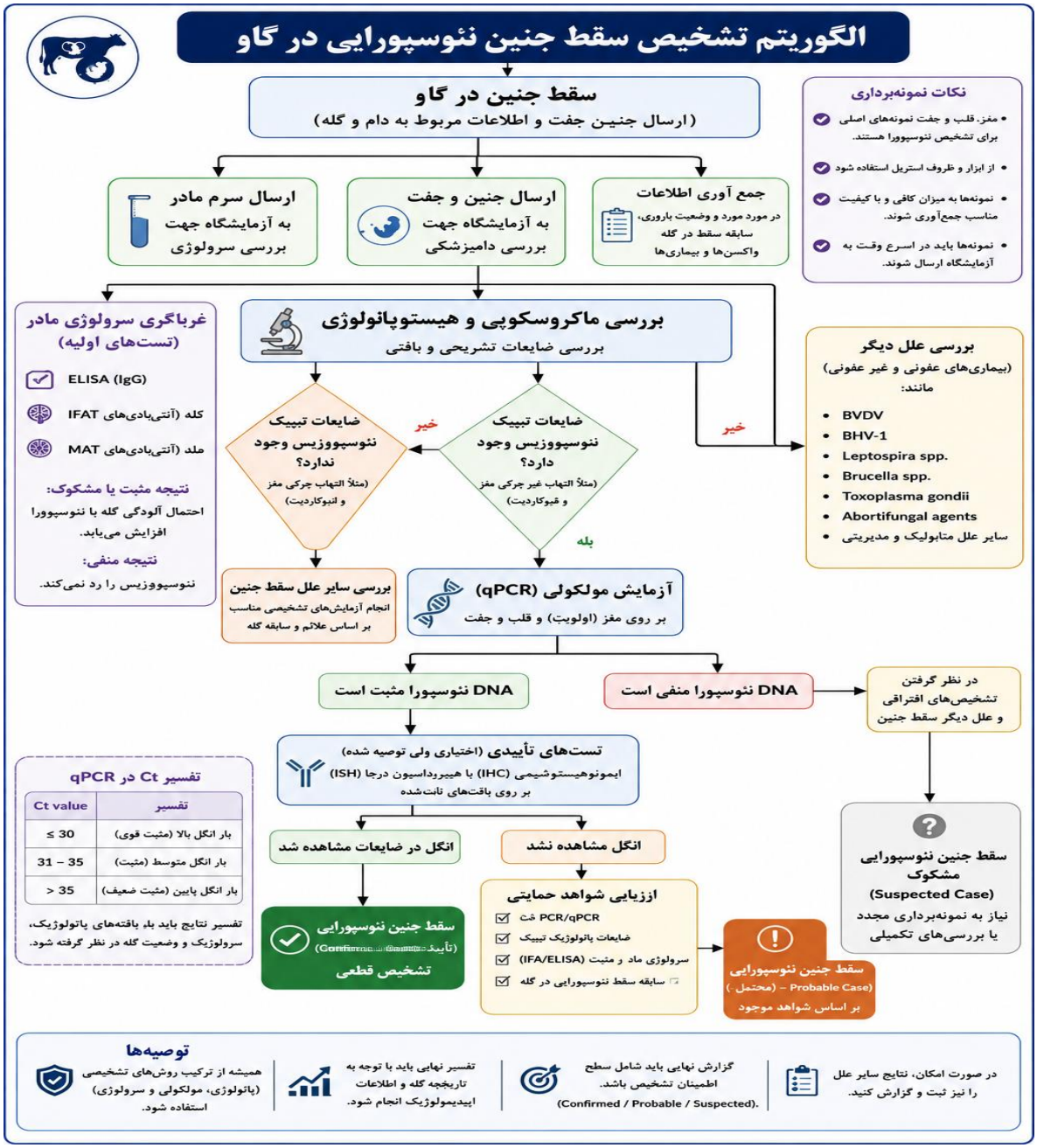
۲). NMR Spectroscopy: تعیین ساختار و غلظت ترکیبات متابولیکی.

۳). Metabolic Flux Analysis: بررسی مسیرهای متابولیکی در سلول.

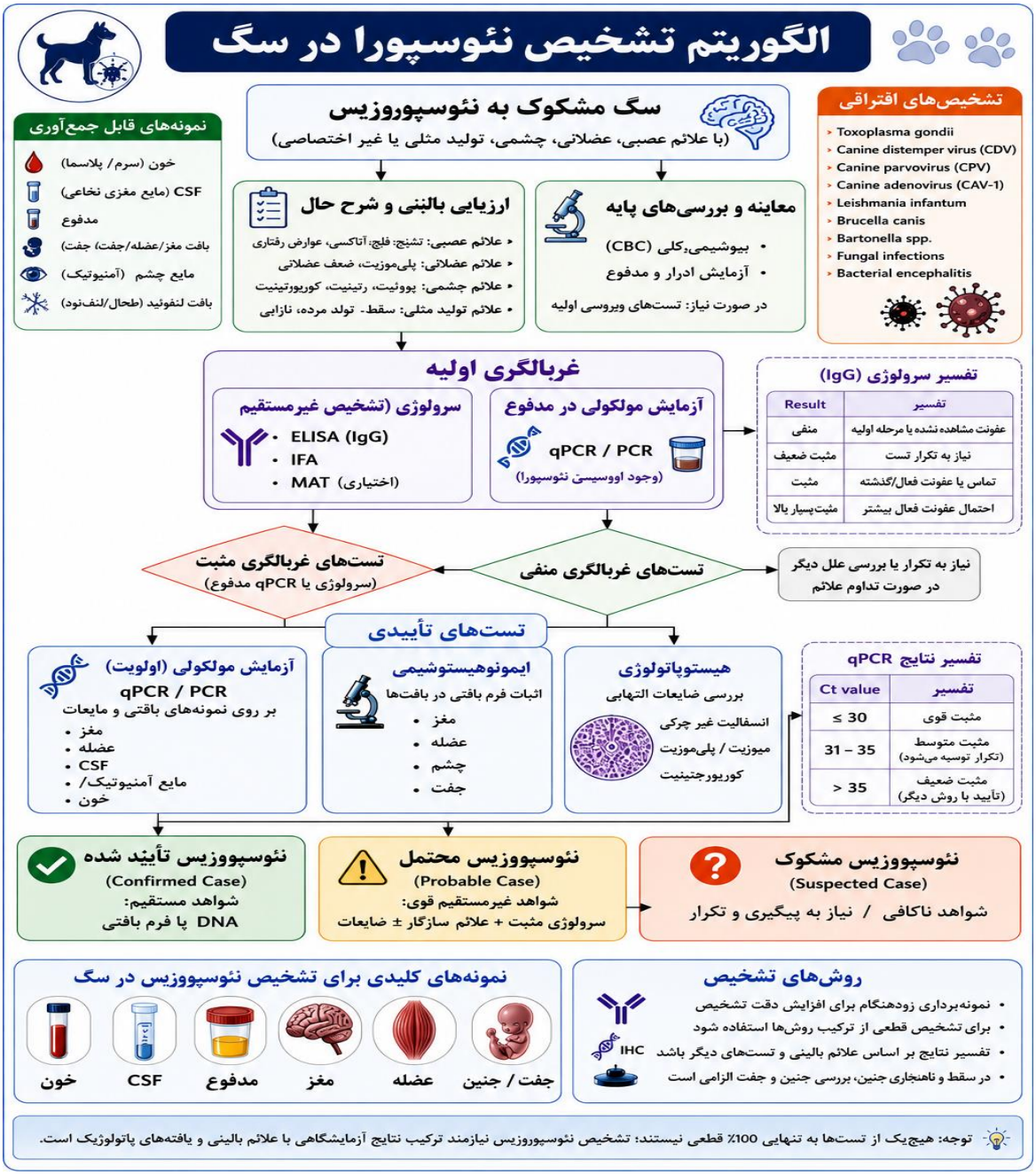
تشخیص زودهنگام بیماری‌ها بر اساس پروفایل متابولیتی، بررسی بیماری‌های متابولیک مانند دیابت، تحلیل فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک داروها، کاربرد در علوم تغذیه و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی از کاربردهای متابولومیکس است.

جدول ۵-٦- رده‌های سلولی مورد استفاده در تحقیقات *نئوسپورا کانینوم*.

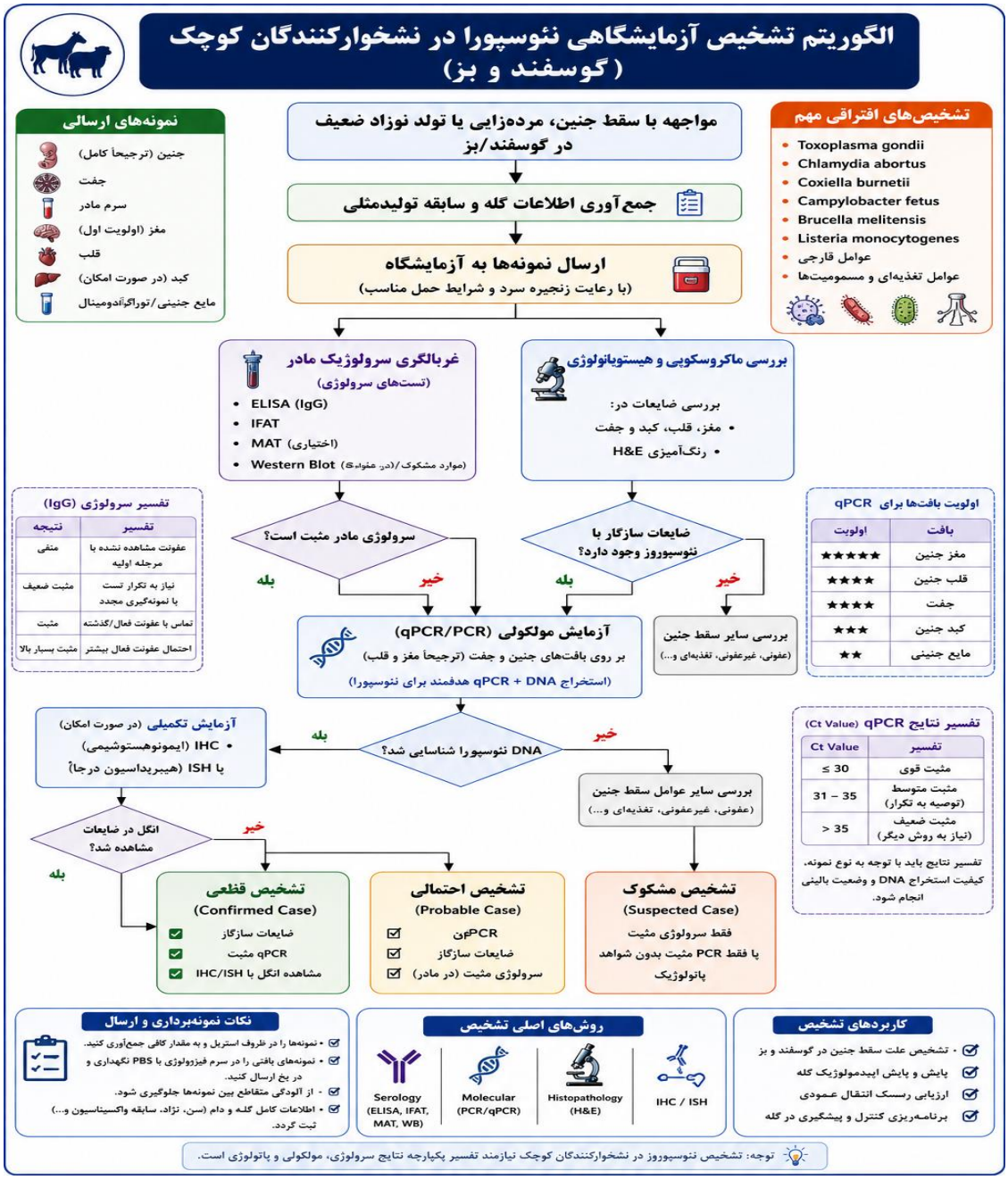
رده سلولی / مدل	محدودیت‌ها	مزایا	مهم‌ترین کاربردها	منشأ سلولی
Vero	فاصله زیستی با میزبان طبیعی	رشد سریع، حساسیت بالا، استاندارد طلایی کشت نئوسپورا	تکثیر روتین انگل، نگهداری سویه‌ها، تولید آنتی‌ژن، مطالعات تهاجم	کلیه میمون سبز آفریقایی
MARC-145	غیرگاوی بودن	بازده تکثیر مناسب، حفظ خصوصیات برخی ایزوله‌ها	نگهداری ایزوله‌های میدانی، مقایسه بیماری‌زایی سویه‌ها	کلیه میمون
MA-104	کاربرد کمتر نسبت به Vero	حساسیت مشابه Vero در برخی مطالعات	تکثیر انگل و مطالعات رشد	کلیه جنین میمون رزوس
MDBK	تکثیر انگل کمتر از Vero	منشأ گاوی	مطالعات اختصاصی میزبان گاوی، بررسی پاسخ سلولی	کلیه گاوی
RK-13	حساسیت پایین به نئوسپورا	سهولت کشت	ارزیابی حساسیت سلولی و مقایسه میزبان‌ها	کلیه خرگوش
MDCK	تکثیر ضعیف انگل	منشأ سگی	مطالعات محدود میزبان نهایی	کلیه سگ
سلول‌های اولیه ریه گاوی	دشواری تهیه و نگهداری	شباهت بیشتر به میزبان طبیعی	جداسازی اولیه و بیماری زایی	ریه جنین گاوی
سلول‌های بیضه گاوی	تنوع بین نمونه‌ها	حساسیت به آلودگی	تکثیر و جداسازی ایزوله‌ها	بافت بیضه
HBMEC	هزینه و نگهداری دشوار	مناسب بیماری عصبی	مطالعه عبور از سد خونی–مغزی	سلول‌های اندوتلیال مویرگی مغز انسان
HeLa	ارتباط محدود با بیماری طبیعی	رشد آسان	مطالعات مولکولی و تهاجم سلولی	سلول اپی‌تلیالی انسانی
BeWo	تفاوت با جفت نشخوارکنندگان	مطالعه تعامل انگل–جفت	مدل انتقال عمودی	سلول تروفوبلاست انسانی
F3	دسترسی محدود به رده سلولی	مدل بسیار نزدیک به شرایط طبیعی گاو	بررسی انتقال جنینی و عفونت جفت	تروفوبلاست گاوی
BCEC-1	نیاز به شرایط کشت تخصصی	مدل اختصاصی جفت گاوی	مطالعه سد مادری–جنینی	اپی‌تلیوم کارانکول گاوی
سلول‌های اندومتریال گاوی	تنوع پاسخ بین رده‌ها	ارتباط مستقیم با سقط	مطالعه استقرار انگل در دستگاه تولیدمثل	رحم گاو
ماکروفاژهای گاوی	عمر کوتاه در کشت	شبیه‌سازی دفاع میزبان	مطالعه پاسخ ایمنی و التهاب	سیستم ایمنی ذاتی
سلول‌های دندریتیک	تهیه دشوار	مناسب برای مطالعات واکسن	بررسی ارائه آنتی‌ژن و پاسخ ایمنی	سیستم ایمنی



شکل ۹-۶- فلوچارت تشخیص سقط جنین ناشی از نئوسپوروزیس در گاو.



شکل ۱۰-٦- فلوچارت تشخیص نئوسپوروزیس در سگ.



شکل ۱۱-٦- فلوچارت تشخیص نئوسپوروزیس در نشخوارکنندگان کوچک.



شکل ۱۲-٦- تکامل مدل های کشت سلولی *نئوسپورا کانینوم* از ۱۹۹۰ تا ۲۰۲۵.



شکل ۱۳-۶-کاربرد فناوری‌های اُمیکس در مطالعه زیست‌شناسی، بیماری‌زایی، تشخیص و کنترل *نئوسپورا کانینوم*.

فصل ۷

کنترل و پیشگیری

۱-۷- درمان:

نئوسپورا کانینوم به دلیل توانایی ایجاد عفونت پایدار، تشکیل کیست‌های بافتی و انتقال عمودی، چالش‌های درمانی قابل توجهی ایجاد می‌کند. مطالعات آزمایشگاهی و فارمی نشان داده‌اند که هیچ راهکار درمانی واحدی تاکنون موفق به حذف کامل انگل نشده است. بنابراین پژوهش‌ها بر شناسایی اهداف مولکولی جدید، بهبود دسترسی دارو به بافت‌ها و توسعه ترکیبات با سمیت کمتر متمرکز شده‌اند. این موضوع در سال‌های اخیر محور بسیاری از مطالعات و پژوهشگران بوده است. برخلاف بسیاری از بیماری‌های باکتریایی و انگلی که درمان دارویی می‌تواند منجر به حذف کامل عامل بیماری‌زا گردد، در نئوسپوروزیس هدف اصلی درمان غالباً کاهش تکثیر انگل، محدود کردن ضایعات بافتی و بهبود علائم بالینی است. توانایی انگل در استقرار داخل سلولی، تشکیل کیست‌های بافتی و ایجاد عفونت‌های مزمن موجب شده است که حذف کامل عامل بیماری از بدن میزبان به‌سختی امکان‌پذیر باشد. راهبردهای درمانی در نئوسپوروزیس بر سه اصل مهار تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها، کاهش آسیب‌های التهابی ناشی از عفونت و پیشگیری از پیشرفت ضایعات عصبی و عضلانی استوار هستند. موفقیت درمان تا حد زیادی

به مرحله بیماری، شدت ضایعات بافتی، وضعیت سیستم ایمنی میزبان و زمان شروع درمان بستگی دارد. ترکیبات دارویی لازالوسید[1]، مونسین[2]، پیریترکسین[3]، پیریمتامین[4] و تریمتوپریم[5] از تکثیر تاکی‌زوئیت‌های *نئوسپورا کانینوم* ممانعت می‌کنند ولیکن بر روی کیست‌های نسجی و برادی‌زوئیت‌ها بی‌تأثیر هستند. هم افزایی اثر داروها در هنگام استفاده از سولفانامیدها[6] به همراه پیریمتامین، تریمتوپریم و یا دیاوریدین[7] بر علیه تاکی‌زوئیت‌های انگل در محیط‌کشت سلولی گزارش شده است. در رابطه با این موضوع که آیا درمان گاوهای آلوده از نظر اقتصادی به صرفه می‌باشد یا خیر، هنوز جای سوال وجود دارد؛ ولیکن به علت ایجاد باقیمانده‌های دارویی در محصولاتی مانند شیر و گوشت و همچنین هزینه‌های سنگین تشخیص و درمان، این کار کمتر مورد استقبال قرار گرفته است (Hemphill and Müller, 2015; Sánchez-Sánchez et al., 2018). در حال حاضر داروی انتخابی در سگ‌ها کلیندامایسین[8] و ترکیبات سولفانامیدی می‌باشد (Silva and Machado, 2016). استقرار داخل سلولی انگل، تشکیل کیست‌های بافتی پایدار، فعال شدن مجدد عفونت در دوران آبستنی، نبود داروهای اختصاصی با قدرت نفوذ مناسب به کیست‌ها و محدود بودن کارآزمایی‌های بالینی در مقیاس بزرگ از عوامل نقص در درمان نئوسپوروزیس هستند. سیر تحقیقات دارویی *نئوسپورا* طی ۳۵ سال گذشته نشان می‌دهد که مسیر پژوهش از استفاده تجربی داروهای ضدتک‌یاخته متداول به سمت طراحی داروهای هدفمند مبتنی بر زیست‌شناسی مولکولی انگل حرکت کرده است. اگرچه تاکنون درمان قطعی برای نئوسپوروزیس در دسترس نیست، اما پیشرفت‌های اخیر در حوزه ژنومیک، غربالگری دارویی و زیست‌شناسی مولکولی امیدهای تازه‌ای برای توسعه

[1] -Lasalocid
[2] -Monensin
[3] -Piritrexin
[4] -Pyrimethamin
[5] -Trimethuporium
[6] -Sulfanamides
[7] -Diaveridin
[8] -Clindamycin

درمان‌های مؤثر در دهه آینده ایجاد کرده‌اند. آپیکوپلاست، میتوکندری، پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم و مسیرهای متابولیک اختصاصی، نانوحامل‌های دارویی، ایمونوتراپی، واکسن‌های درمانی و فناوری‌های ژنومی و ویرایش ژنی از مهم‌ترین اهداف دارویی نسل آینده محسوب می‌شوند و احتمالاً نقش کلیدی در توسعه درمان‌های مؤثر علیه نئوسپوروزیس در دهه پیش رو خواهند داشت (Muller et al., 2011; Hemphill & Müller, 2015). تحقیقات آینده احتمالاً بر محورهای زیر متمرکز خواهند بود:

۱. داروهای مبتنی بر ژنوم انگل: شناسایی ژن‌های ضروری برای بقا و تکثیر انگل و طراحی مهارکننده‌های اختصاصی.

۲. داروهای هدفمند آپیکوپلاست: آپیکوپلاست یکی از جذاب‌ترین اهداف درمانی در آپی‌کمپلکساها محسوب می‌شود.

۳. نانوداروها: استفاده از نانوذرات برای افزایش نفوذ دارو به بافت‌های آلوده و کیست‌های بافتی.

۴. ایمونوتراپی: تقویت پاسخ ایمنی محافظتی میزبان در کنار درمان دارویی.

۵. درمان‌های ترکیبی: استفاده همزمان از چند دارو با مکانیسم‌های اثر متفاوت.

۶. هوش مصنوعی در کشف دارو: پیش‌بینی مولکول‌های ضد*نئوسپورا* با استفاده از الگوریتم‌های یادگیری ماشین.

۱-۱-۷-درمان نئوسپوروزیس در سگ:

کلیندامایسین متداول‌ترین داروی مورد استفاده در درمان نئوسپوروزیس سگ‌ها است. ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، هر ۱۲ ساعت به مدت حداقل ۴ تا ۸ هفته استفاده می شود. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که شروع زودهنگام درمان می‌تواند موجب بهبود قابل توجه علائم بالینی شود. تری‌متوپریم ـ سولفادیازین از پرکاربردترین گزینه‌های درمانی در موارد عصبی محسوب می‌شود. ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تری‌متوپریم همراه با ۷۵ میلی‌گرم بر

کیلوگرم سولفادیازین هر ۱۲ ساعت به مدت حداقل ۲ هفته استفاده می شود. ترکیب پیریمتامین و سولفونامیدها نیز نتایج امیدوارکننده‌ای نشان داده است، هرچند خطر سرکوب مغز استخوان استفاده طولانی‌مدت از این داروها را محدود می‌سازد (Muller et al., 2011; Hemphill & Müller, 2015).

۲-۱-۷-درمان نئوسپوروزیس در گاو:

برخلاف سگ‌ها، درمان انفرادی گاوهای آلوده در شرایط عملی دامداری به دلایل مزمن بودن عفونت، هزینه بالای درمان، احتمال باقی ماندن کیست‌های بافتی و عدم جلوگیری کامل از انتقال عمودی معمولاً توصیه نمی‌شود. تاکنون هیچ داروی تأییدشده‌ای برای درمان روتین نئوسپوروزیس گاو در سطح تجاری وجود ندارد. دکوئینات (Decoquinate) با مکانیسم مهار تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها و تولترازوریل (Toltrazuril) با اثرات ضدتکثیری علیه *نئوسپورا* از گزینه‌های بالقوه ضدکوکسیدیایی برای درمان نئوسپوروزیس در گاو هستند (Muller et al., 2011; Hemphill & Müller, 2015).

۳-۱-۷- اهداف دارویی جدید در ژنوم و متابولیسم *نئوسپورا کانینوم*:

پیشرفت‌های حاصل در تعیین توالی ژنوم این انگل و توسعه فناوری‌های ژنومیکس، ترنسکریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس، فرصت‌های جدیدی برای شناسایی اهداف دارویی اختصاصی فراهم کرده‌اند. در گذشته، اغلب داروهای مورد استفاده علیه *نئوسپورا* بر اساس تجربیات حاصل از درمان توکسوپلاسموز یا سایر بیماری‌های انگلی انتخاب می‌شدند. اما امروزه رویکردهای نوین بر شناسایی مسیرهای زیستی حیاتی و مولکول‌های اختصاصی مورد نیاز برای بقا و تکثیر انگل متمرکز شده‌اند. هدف اصلی این راهبردها، توسعه داروهایی است که ضمن اثربخشی بالا، کمترین اثرات جانبی را بر سلول‌های میزبان داشته باشند.

۱). آپیکوپلاست(Apicoplast)

آپیکوپلاست یک اندامک اختصاصی در انگل‌های شاخه اپی‌کمپلسا است که در سلول‌های پستانداران وجود ندارد. پس به دلیل نبود آپیکوپلاست در سلول‌های میزبان، این اندامک یکی از جذاب‌ترین اهداف دارویی محسوب می‌شود. این اندامک در فرایندهای سنتز اسیدهای چرب، سنتز ایزوپرنوئیدها، متابولیسم لیپیدها و تولید کوفاکتورهای ضروری نقش دارد. توسعه مهارکننده‌های اختصاصی مسیرهای متابولیک آپیکوپلاست می‌تواند نسل جدیدی از داروهای ضد *نئوسپورا* را ایجاد کند. کلیندامایسین، آزیترومایسین، اسپیرامایسین، داکسی‌سیکلین از داروهای مورد مطالعه این گروه می باشند.

۲). میتوکندری انگل

میتوکندری *نئوسپورا* مسئول تولید انرژی و حفظ زنجیره انتقال الکترون است. کمپلکسIII، سیتوکروم bc1 و مسیرهای فسفوریلاسیون اکسیداتیو از اهداف دارویی هستند. از داروهای مورد مطالعه می‌توان آتواکون و بپارواکون را نام برد.

۳). مسیر سنتز اسیدهای چرب(FAS II)

نئوسپورا برای ساخت غشای سلولی و تکثیر نیازمند سنتز اسیدهای چرب است. برخی از آنزیم‌های این مسیر در سلول میزبان وجود ندارند یا ساختار متفاوتی دارند. Enoyl-ACP reductase و Ketoacyl synthase از اهداف این گروه از ترکیبات هستند.

٤). مسیر سنتز ایزوپرنوئیدها

ایزوپرنوئیدها در رشد انگل، تقسیم سلولی و انتقال سیگنال نقش اساسی دارند. هدف اصلی مهار مسیر(Methylerythritol phosphate pathway) MEP است که در پستانداران

وجود ندارد. داروهای مهارکننده این مسیر می‌توانند اختصاصیت بالایی علیه انگل داشته باشند.

۵). پروتئین‌های ترشحی ریزاندامک‌ها

نئوسپورا برای ورود به سلول میزبان از مجموعه‌ای از پروتئین‌های اختصاصی استفاده می‌کند که مهمترین آنها پروتئین های MIC، ROP و GRA هستند. مهار این مولکول‌ها می‌تواند از تهاجم سلولی، تشکیل واکوئل انگلی و تکثیر داخل سلولی جلوگیری کند.

٦). پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم(CDPKs)

این آنزیم‌ها در حرکت انگل، تهاجم و خروج از سلول نقش حیاتی دارند. پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم در پستانداران وجود ندارند.

۷). مسیرهای اپی‌ژنتیکی

مطالعات جدید نشان داده‌اند که تنظیم بیان ژن‌ها در *نئوسپورا* تحت کنترل مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی قرار دارد. Histone deacetylases (HDACs) و Histone acetyltransferases از اهداف این گروه هستند.

۸). فناوری CRISPR و ژن‌های ضروری بقا

استفاده از فناوری CRISPR-Cas9 امکان شناسایی ژن‌های ضروری برای بقا و بیماری‌زایی *نئوسپورا* را فراهم کرده است. شناسایی اهداف دارویی جدید، طراحی واکسن‌های زنده ضعیف‌شده و مطالعه عملکرد ژن‌ها از کاربردهای این روش هستند.

جدول ۱-۷- اطلاعات داروهای آزمایش‌شده علیه *نئوسپورا کانینوم* (۲۰۲۵-۱۹۸۸).

مهم‌ترین نتایج	مدل مطالعه	سال‌های مطالعه	گروه دارویی	دارو / ترکیب
متداول‌ترین درمان در نئوسپوروزیس عصبی و مؤثر در مراحل اولیه بیماری	سگ	۱۹۹۰ تاکنون	لینکوزامید	کلیندامایسین
بهبود نسبی علائم عصبی و عضلانی	سگ	۱۹۹۰ تاکنون	سولفونامید	تری‌متوپریم–سولفادیازین
مهار تکثیر انگل	سگ / آزمایشگاهی	۱۹۹۰ تاکنون	ضدفولات	پیریمتامین + سولفونامید
مهار تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها	آزمایشگاهی / موش	۲۰۰۰ تاکنون	ضدکوکسیدیوز	دکوئینات
کاهش تکثیر انگل	In vitro	۲۰۰۰ تاکنون	تریازینون	تولترازوریل
مهار رشد انگل	In vitro	۲۰۰۰ تاکنون	متابولیت تولترازوریل	پونازوریل(Ponazuril)
کاهش انتقال عمودی و مهار شدید تکثیر انگل	In vitro / موش آبستن	۲۰۱۵ تاکنون	هیدروکسی‌نفتوکینون	بپارواکون(Buparvaquone)
کاهش علائم عصبی و بار انگل؛ نتایج امیدوارکننده	In vitro / جربیل	۲۰۱۲	مشتق آرتمیسینین	آرتمیسون(Artemisone)
فعالیت ضد نئوسپورایی	In vitro	۲۰۱۵–۲۰۱۶	مشتق آرتمیسینین	آرتِمیساید(Artemiside)
اثر مهاری متوسط بر تکثیر انگل	In vitro	۲۰۱۵–۲۰۱۶	ضد مالاریا	مفلوکین(Mefloquine)
هدف قرار دادن میتوکندری انگل	In vitro	۲۰۲۱	هیدروکسی‌نفتوکینون	آتواکون(Atovaquone)
مهار رشد انگل در کشت سلولی	In vitro	۲۰۲۱	آنتی‌بیوتیک	تتراسایکلین
اثر مهاری محدود تا متوسط	In vitro	۲۰۲۱	ضد مالاریا	پریماکین
فعالیت محدود ضد انگل	In vitro	۲۰۲۱	ضد مالاریا	کینین
مهار رشد انگل در غلظت‌های پایین	In vitro	۲۰۱۶	ضد مالاریا / ضداکسیداسیون	متیلن بلو
فعالیت آزمایشگاهی مطلوب ولیکن عدم موفقیت در مدل حیوانی	In vitro / موش	۲۰۱۵	ترکیب گیاهی	کورکومین
مهار تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها	In vitro	۲۰۱۵	مشتق آرتمیسینین	آرتمتر(Artemether)



شکل۱-۷- نکات مهم در درمان نئوسپوروزیس در گاو.

۲-۷- کنترل و پیشگیری:

روش‌های کنترل آلودگی در دامداری‌ها در دو گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند. روش‌ها و برنامه‌های کنترلی مبتنی بر کاهش آلودگی در میزبان‌های اصلی که با هدف محدودکردن زنجیره انتقال افقی انگل به کار می‌روند و همچنین روش‌هایی که برای کاهش آلودگی در میزبان‌های واسط، انتقال عمودی انگل و کاهش خسارات اقتصادی ناشی از آن استفاده می‌شوند. واکسیناسیون نیز یک روش کنترلی در هر دو گروه از میزبان‌ها است. این روش بسیار پرهزینه بوده و برای همگان در دسترس نمی باشد (Dubey et al., 2017).

در مطالعه قره‌خانی و یخچالی (۲۰۲۲)، اقدامات ذیل برای کنترل سقطجنین در واحدهای گاوداری انجام و مثبت ارزیابی گردید:

۱) حذف گاوهای سرم مثبت و گاوهای با سابقه سقطجنین بیش از ۲ بار بصورت متوالی.
۲) اعمال قرنطینه و ممانعت از ورود گربه، سگ‌سانان وحشی و دام‌های جدید سرم مثبت به گاوداری.
۳) ارزیابی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در اسپرم *امنی* قبل از باروری (تلقیح مصنوعی و یا جفت گیری نرها).
۴) کنترل منظم جمعیت جوندگان در مزارع با استفاده از تله گذاری.
۵) درمان سگ‌های داخل گاوداری با سولفونامیدها و ترکیبات پیریمتامین (۱ میلی لیتر زیرجلدی به ازای هر ۱۰ کیلوگرم وزن بدن به مدت ۵ روز و تکرار این پروتکل پس از یک ماه). ارزیابی سرمی سگ‌ها بعد از مرحله درمان و خارج کردن سگ های سرم مثبت از گاوداری.
۶) برای بهبود بهداشتی پناهگاه سگ‌ها، کف، دیوارها، سقف و فضاهای استراحت با سیمان پوشش داده شد. پاک سازی روزانه مدفوع انجام می شد؛ پناهگاه و اطراف آن روزانه با محلول فرمالدهید ۱۰ درصد ضدعفونی می شد.

۷) ممانعت از دسترسی سگ‌ها به دام‌ها و همچنین آب و موادغذایی آن ها.
۸) دفن بهداشتی جنین های سقط شده (سوزاندن در کوره لاشه سوز).
۹) نصب تورهایی در اطراف پناهگاه سگ‌ها برای جلوگیری از دسترسی پرندگان (گنجشک و کبوتر) به مدفوع و موادغذایی آن ها.

۱-۲-۷- میزبان‌های واسط:

موثرترین و سریع‌ترین روش کنترل آلودگی در یک گله، حذف سالیانه دام‌های سرم مثبت است. برای محدود ساختن انتقال عمودی انگل، ممنوعیت ورود دام‌های آلوده و استفاده از روش انتقال جنین در گاوهای سرم منفی توصیه می‌شود. با استفاده از روش انتقال جنین، امکان تولد گوساله‌های سالم و عاری از آلودگی از مادران مبتلا به نئوسپوروزیس امکان پذیر می‌باشد. گاوهای مبتلا به سقط‌جنین‌های مکرر بایستی از گله جدا و از آبستن‌شدن آنها جلوگیری نمود (Macchi et al., 2020). خارج ساختن و دفن بهداشتی کلیه بافت‌های آلوده از قبیل جنین‌های سقط شده و جفت از محیط دامداری الزامی است (Lagomarsino et al., 2012).

۲-۲-۷- میزبان‌های اصلی:

سگ‌های آلوده قادر به دفع اووسیست بیش از یک مرتبه هستند؛ لذا بایستی تمامی آن‌ها به عنوان پتانسیل نهفته جهت انتشار آلودگی به گاوها مدنظر قرار گیرند حتی اگر از نظر سرمی منفی باشند. دسترسی سگ‌های گله به بافت‌های جنینی باعث برقراری مجدد چرخه زندگی انگل می‌شود؛ بنابراین برای تغذیه آنها باید از خوراک‌های آماده و یا پخته شده استفاده کرد. بایستی از تردد حیوانات، بخصوص سگ سانان وحشی به محوطه داخلی دامداری و همچنین از آلودگی خوراک دام و آب آشامیدنی توسط مدفوع آن‌ها ممانعت شود. مهم‌ترین هدف در مدیریت گله‌های آلوده، پیشگیری از سقط‌جنین و کاهش انتقال افقی و عمودی آلودگی می‌باشد (Anderson et al., 2000).



شکل ۲-۷- الگوریتم کنترل و مدیریت نئوسپوروزیس در گله های گاو شیری.

۳-۷- واکسیناسیون:

از زمان شناسایی این انگل، توسعه واکسن به عنوان یکی از مهم‌ترین راهبردهای کنترل بیماری مطرح بوده است. هدف اصلی واکسیناسیون، کاهش موارد سقط جنین، جلوگیری از انتقال عمودی و کاهش خسارات اقتصادی است. ایمنی مؤثر علیه *نئوسپورا* عمدتاً وابسته به پاسخ‌های سلولی Th1 است. اینترفرون گاما (IFN-γ)، اینترلوکین ۱۲ و فعال‌سازی ماکروفاژها نقش کلیدی در محدود کردن تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها دارند. در مقابل، پاسخ‌های هومورال به تنهایی برای ایجاد حفاظت کامل کافی نیستند (Marugan-Hernandez, 2017). لیدل و همکاران[1] (۱۹۹۹) موش بالب-سی را با عصاره تاکی زوئیت‌های *نئوسپورا کانینوم* لیز شده همراه با اجوانت ایمونو ماکسر[2] واکسینه کردند. سپس موش‌ها جفت‌گیری کرده و موش‌های آبستن در روز ۱۲-۱۰ آبستنی با تاکی زوئیت *نئوسپورا کانینوم* مورد چالش قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که یک دوز تلقیح باعث القای حفاظت کامل بر علیه انتقال عفونت به نسل بعد می‌گردد. باسلر و همکاران[3] (۲۰۰۰) واکسیناسیون موش بالب-سی را با آنتی‌ژن محلول *نئوسپورا کانینوم* با دو روش استفاده از مواد غیر یونی و ادجوانت کامل فروند انجام دادند. در این پژوهش به دلیل بروز علائم عصبی در موش‌ها و افزایش ترشح اینترلوکین-۴ و افزایش نسبت IgG_1 به IgG_2 پاسخ ایمنی مناسبی مشاهده نشد. اندریاناریوو و همکاران[4] (۱۹۹۹) چهار اجوانت مختلف را با تاکی‌زوئیت کشته در گاوها آزمایش کرده و پاسخ‌های ایمنی را در عفونت تجربی (با استفاده از تاکی‌زوئیت‌های تکثیر شده در کشت سلول) با هم مقایسه کردند. پاسخ‌های ایمنی هومورال با استفاده از آزمایش پادتن‌های درخشان غیرمستقیم سنجیده شد که غالباً پاسخ ها در گاوهای ایمن شده نسبت به گاوهایی که به طور تجربی آلوده شده بودند کمتر بود. پاسخ‌های ایمنی‌سلولی با استفاده از دو اجوانت همراه با تاکی‌زوئیت در گاوهای

[1] -Liddel et al.,
[2] -Immuni MAXSR
[3] -Baszler et al.,
[4] -Andrianarivo et al.,

ایمن‌شده دارای سطح تولید اینترفرون مشابهی با حیوانات آلوده داشتند. اندریاناریوو و همکاران (۲۰۰۰) اثرات یک واکسن کشته حاصل از تاکی‌زوئیت‌های *نئوسپورا کانینوم* را در گاوهای آبستن با استفاده از ادجوانت پلی‌ژن مورد بررسی قرار دادند. گاوها در روزهای ۳۵ و ۶۵ آبستنی واکسینه شدند و پس از چهار هفته، به‌صورت وریدی و یا عضلانی با تاکی‌زوئیت‌های انگل مورد چالش قرار گرفتند. در گاوهای ایمن شده هر دو پاسخ هومورال و سلولی مشاهده شد که با افزایش تولید اینترفرون گاما و IgG_1 همراه بود. به دنبال چالش با تاکی‌زوئیت‌ها پاسخ معنی‌داری از ایمنی سلولی دیده نشد. تمامی جنین‌ها اعم از گروه شاهد و ایمن شده جراحات ناشی از *نئوسپورا کانینوم* را نشان داده و لذا عدم کارایی این نوع واکسن در گاوهای آبستن مشخص گردید. در یک مطالعه از حامل ویروس زنده توام با آنتی‌ژن‌های $NcSAG_1$ و $NcSRS_2$ *نئوسپورا کانینوم* در موش استفاده شد که این واکسن از انتقال عمودی انگل ممانعت نمود. همچنین ایمنی‌زایی این نوع واکسن در سگ‌ها نیز مشاهده گردید (Nishikawa et al., 2001).

واکسن‌های کشته نخستین نسل واکسن‌های *نئوسپورا* بودند. NeoGuard شناخته‌شده‌ترین نمونه تجاری محسوب می‌شود. این واکسن‌ها ایمنی بالایی دارند اما معمولاً پاسخ سلولی ضعیفی ایجاد می‌کنند و تأثیر محدودی بر انتقال عمودی دارند. واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته بیشترین میزان حفاظت را در مطالعات تجربی نشان داده‌اند. سویه‌هایی مانند Nc-Nowra و Nc-Spain 1H توانسته‌اند ایمنی قوی و کاهش قابل توجهی در سقط جنین را ایجاد کنند. با این حال نگرانی‌های ایمنی زیستی، پایداری ژنتیکی و تولید صنعتی مانع استفاده گسترده شده است. در واکسن‌های نوترکیب، آنتی‌ژن‌های سطحی و ترشحی شامل SAG1، SRS2، MIC1، MIC3، ROP2 و GRA7 بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند. این واکسن‌ها ایمن و استانداردپذیر هستند اما اغلب به ادجوانت‌های قوی و فرمولاسیون‌های پیشرفته نیاز دارند. در واکسن‌های DNA، ژن‌های منتخب انگل به پلاسمیدهای بیان‌کننده منتقل می‌شوند. مزیت اصلی، تحریک همزمان پاسخ‌های سلولی و

هومورال است. با وجود نتایج امیدوارکننده در مدل‌های موشی، شواهد کافی برای موفقیت در گاو در دسترس نمی باشد. در واکسن‌های چندآنتی‌ژنی، ترکیب چند آنتی‌ژن می‌تواند حفاظت وسیع‌تری ایجاد کند. راهبردهای مبتنی بر SAG1، MIC3 و GRA7 از امیدبخش‌ترین گزینه‌ها برای نسل آینده واکسن‌ها محسوب می‌شوند (Horcajo et al., 2016; Hemphill et al., 2024). واکسن‌های تخفیف حدت یافته توانایی جلوگیری از سقط‌جنین در گاوهای آبستن را دارد (Williams et al., 2000). نتایج جالب و امیدوار کننده‌ای با استفاده از انگل کشته شده و یا محصولات مشتق آن برروی موش بدست آمده است. واکسیناسیون موش‌ها قبل از آبستنی با استفاده از تاکی‌زوئیت‌های کشته شده *نئوسپورا کانینوم* توانایی جلوگیری از انتقال عمودی انگل در طی آبستنی را دارد. واکسن کشته *نئوسپورا کانینوم* به صورت تجارتی (نئوگارد[1]، اینتروت[2]) در ایالات متحده جهت جلوگیری از نئوسپوروزیس بالینی در گاو مورد استفاده قرار می‌گیرد. این واکسن در گاوهای آبستن قابل مصرف و بی‌ضرر می‌باشد (Hemphill and Müller, 2015).

پیشرفت‌های ژنومیک، ترنسکریپتومیک و پروتئومیک امکان شناسایی اهداف جدید واکسنی را فراهم کرده‌اند. واکسن‌های mRNA، سامانه‌های ناقل ویروسی، CRISPR/Cas9 و Reverse Vaccinology از مهم‌ترین حوزه‌های نوظهور هستند. پیچیدگی چرخه زندگی، تفاوت سویه‌ها، نبود همبسته قطعی ایمنی محافظتی و محدودیت مطالعات میدانی از مهم‌ترین موانع توسعه واکسن مؤثر علیه *نئوسپورا* هستند. انتظار می‌رود واکسن‌های چندآنتی‌ژنی مبتنی بر داده‌های اُمیکس و فناوری‌های نوین انتقال آنتی‌ژن نقش مهمی در کنترل نئوسپوروز گاوی در آینده داشته باشند (Marugan-Hernandez, 2017).

[1] -Neogard®
[2] -Intervet®



شکل ۳-۷- چکیده اطلاعات مربوط به واکسن های نئوسپوروزیس در سگ و گاو.

٤-٧- پیشنهادات کاربردی:

۱) استفاده از روش‌های مدیریتی به روز با استفاده از نرم افزارهای اطلاعاتی دام‌ها جهت افزایش سطح بهداشت درگله و پیشگیری از انواع عفونت‌ها.
۲) ارائه اطلاعات لازم در مورد بیماری به مدیریت واحد و همچنین کارگران و سایر دامداران.
۳) برنامه غربال‌گری منظم بالک تانک در گاوداری‌ها.
۴) حذف دام‌های سرم مثبت با سابقه سقط‌جنین از گله.
۵) اعمال قرنطینه و محدودیت‌های تردد در گاوداری‌ها.
۶) عدم نگهداری سگ و یا حدالامکان ممانعت از تماس آنها با گله.
۷) عدم تغذیه سگ‌ها از جفت و بافت‌های جنین‌های سقط شده.
۸) اقدامات بهداشتی در دفع مدفوع و ضدعفونی آشیانه سگ‌ها به صورت مدون و مداوم.
۹) دفن بهداشتی و یا استفاده از کوره لاشه سوز برای جنین‌های سقط شده.
۱۰) مطالعه بر روی سایر ویژگی‌های سویه‌های در گردش همانند تفاوت‌های بیولوژیکی، بیوشیمیایی و آنزیم‌ها.
۱۱) مطالعه و استفاده از سوش‌های در گردش برای تولید واکسن.
۱۲) مطالعه و معرفی نژادهای مقاوم و پیشنهاد عملی برای استفاده از آنها جهت کاهش خسارات اقتصادی.

فصل ۸

چالش‌ها و آینده پژوهی

۱-۸- چالش‌ها و شکاف‌های دانشی در نئوسپوروزیس:

۱-۱-۸- چالش‌ها:

از زمان شناسایی *نئوسپورا کانینوم* به عنوان یک عامل بیماری‌زا در سگ‌ها و معرفی آن به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل سقط جنین در گاوها، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه زیست‌شناسی، اپیدمیولوژی، ایمنی‌شناسی، تشخیص و کنترل این انگل انجام شده است. طی بیش از سه دهه گذشته، دانش ما درباره چرخه زندگی، میزبان‌ها، الگوهای انتقال و اهمیت اقتصادی نئوسپوروزیس به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است. با این حال، علی‌رغم انتشار هزاران مقاله علمی و سرمایه‌گذاری گسترده پژوهشی، هنوز بسیاری از پرسش‌های کلیدی درباره این بیماری بدون پاسخ باقی مانده‌اند. بررسی انتقادی دستاوردهای ۳۵ سال گذشته نشان می‌دهد که اگرچه پیشرفت‌های مهمی حاصل شده است، اما شکاف‌های دانشی متعددی همچنان مانع طراحی راهکارهای مؤثر برای کنترل پایدار بیماری در سطح جهانی شده‌اند. آینده تحقیقات *نئوسپورا* بیش از هر زمان دیگری به رویکردهای میان‌رشته‌ای، فناوری‌های نوین ژنومی و همکاری‌های بین‌المللی وابسته خواهد بود. شناسایی و رفع این شکاف‌های

دانشی می‌تواند مسیر دستیابی به راهکارهای مؤثر برای کنترل پایدار نئوسپوروزیس در دام‌های اهلی را هموار سازد.

یکی از مهم‌ترین دستاوردهای تحقیقاتی *نئوسپورا*، اثبات نقش محوری انتقال عمودی در بقای عامل بیماری در جمعیت گاوها بوده است. برخلاف بسیاری از بیماری‌های عفونی که بقای آنها وابسته به انتقال افقی است، *نئوسپورا* قادر است نسل‌های متوالی دام را از طریق انتقال مادر به جنین آلوده سازد. این یافته موجب تغییر اساسی در راهبردهای کنترل بیماری شد و نشان داد که حذف صرف منابع آلودگی محیطی برای ریشه‌کنی بیماری کافی نیست. با وجود این پیشرفت، هنوز مشخص نیست که چرا برخی گاوهای آلوده سال‌ها بدون سقط باقی می‌مانند، در حالی که برخی دیگر به‌طور مکرر سقط جنین را تجربه می‌کنند.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که بین آلودگی و بیماری بالینی تفاوت قابل‌توجهی وجود دارد. در بسیاری از گله‌ها، درصد بالایی از دام‌ها دارای آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا* هستند، اما تنها بخشی از آنها سقط جنین را تجربه می‌کنند. این مشاهده نشان می‌دهد که عوامل دیگری از جمله وضعیت ایمنی میزبان، ژنتیک دام، سویه انگل، عوامل محیطی و استرس‌های مدیریتی در بروز بیماری نقش دارند. بنابراین یکی از مهم‌ترین چالش‌های آینده، شناسایی عوامل تعیین‌کننده تبدیل آلودگی خاموش به بیماری بالینی است.

پیشرفت روش‌های سرولوژیک و مولکولی موجب شده تشخیص آلودگی نسبتاً ساده شود. با این حال، تشخیص قطعی اینکه *نئوسپورا* علت مستقیم سقط بوده است، همچنان یکی از دشوارترین بخش‌های تشخیص بیماری محسوب می‌شود. وجود آنتی‌بادی یا حتی DNA انگل در نمونه‌ها لزوماً به معنای نقش مستقیم آن در بروز سقط نیست. این موضوع یکی از مهم‌ترین چالش‌های تشخیصی در مطالعات اپیدمیولوژیک و میدانی است.

طی سه دهه گذشته واکسن‌های متعددی شامل واکسن‌های مختلفی با طراحی‌های متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. با وجود نتایج امیدوارکننده برخی مطالعات آزمایشگاهی، تاکنون هیچ واکسن تجاری موفق و پایدار که بتواند به‌طور مؤثر از انتقال عمودی و سقط‌جنین

جلوگیری کند، در سطح جهانی توسعه نیافته است. این موضوع یکی از بزرگ‌ترین ناکامی‌های پژوهشی در حوزه نئوسپوروزیس محسوب می‌شود.

۲-۱-۸-شکاف‌های دانشی مهم:

۱). ارتباط بین ژنوتیپ و بیماری‌زایی

اگرچه تنوع ژنتیکی سویه‌های *نئوسپورا* اثبات شده است، ولیکن هنوز مشخص نیست که کدام ژن‌ها یا ژنوتیپ‌ها مسئول افزایش بیماری‌زایی، سقط جنین یا انتقال عمودی هستند.

۲). بیومارکرهای پیش‌بینی‌کننده سقط

در حال حاضر هیچ شاخص زیستی معتبر و کاربردی برای پیش‌بینی سقط نئوسپورایی در گاوهای آلوده وجود ندارد. توسعه چنین بیومارکرهایی می‌تواند مدیریت گله‌های آلوده را متحول سازد.

۳). ایمنی محافظتی

اگرچه پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال تا حد زیادی مطالعه شده‌اند، اما هنوز مشخص نیست کدام مؤلفه‌های ایمنی قادر به ایجاد حفاظت پایدار در برابر عفونت یا سقط هستند.

٤). نقش حیات وحش

اهمیت واقعی گونه‌های مختلف حیات وحش در چرخه اپیدمیولوژیک *نئوسپورا* هنوز به‌طور کامل روشن نشده است.

٥). اپیدمیولوژی مولکولی جهانی

کمبود داده‌های ژنومی از مناطق مختلف جهان موجب شده درک ما از تکامل، پراکنش و جابه‌جایی سویه‌های *نئوسپورا* محدود باقی بماند.

۲-۸-آینده‌پژوهی و اولویت‌های تحقیقاتی:

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه تشخیص، اپیدمیولوژی و زیست‌شناسی مولکولی، هنوز چالش‌های مهمی در زمینه کنترل، پیشگیری، واکسیناسیون و درک مکانیسم‌های بیماری‌زایی وجود دارد. انتظار می‌رود پژوهش‌های آینده *نئوسپورا* از تشخیص سنتی فراتر رفته و به سمت ژنومیک، واکسن‌های نوین، هوش مصنوعی و مدیریت یکپارچه بیماری حرکت کنند. این بخش با رویکرد آینده‌پژوهی، مهم‌ترین مسیرهای تحقیقاتی آتی را بررسی می‌کند (Debache and Hemphill, 2026).

۱) توسعه واکسن‌های نسل جدید

نبود واکسن تجاری مؤثر همچنان یکی از بزرگ‌ترین محدودیت‌های کنترل بیماری است. واکسن‌های mRNA، واکسن‌های چندآنتی‌ژنی، ناقل‌های ویروسی، واکسن‌های DNA و واکسن‌های DIVA از مهم‌ترین حوزه‌های پژوهشی آینده محسوب می‌شوند. هدف اصلی، کاهش انتقال عمودی و پیشگیری از سقط جنین است.

۲) ژنومیک و پساژنومیک

فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید امکان مطالعه کامل ژنوم انگل را فراهم کرده‌اند. در آینده، مطالعات پان‌ژنوم، مقایسه ژنوم سویه‌ها، تحلیل پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism) و بررسی ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی اهمیت بیشتری خواهند یافت.

۳) اپیدمیولوژی مولکولی

بررسی ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ، مسیرهای انتشار سویه‌ها و الگوهای انتقال در مناطق مختلف جهان از اولویت‌های اصلی پژوهش خواهد بود. استفاده از مارکرهای میکروستلایت وتوالی یابی کل ژنوم (Whole Genome Sequencing) نقش مهمی در این حوزه دارد.

٤) نقش حیات وحش

اطلاعات موجود درباره نقش میزبان‌های وحشی هنوز محدود است. بررسی نقش گرگ، روباه، شغال و سایر گوشتخواران در چرخه انتقال بیماری از موضوعات کلیدی آینده است.

٥) هوش مصنوعی

کاربرد هوش مصنوعی در تحلیل داده‌های اپیدمیولوژیک، تصاویر پاتولوژی و مدل‌سازی خطر بیماری می‌تواند تحول مهمی در مدیریت نئوسپوروزیس ایجاد کند.

٦) بیومارکرهای نوین

مطالعه microRNAها، پروتئومیکس، متابولومیکس و اگزوزوم‌ها می‌تواند به توسعه نسل جدید آزمون‌های تشخیصی منجر شود.

٧) فناوری‌های نوین تشخیص

Digital PCR، فناوری‌های CRISPR و سامانه‌های Point-of-Care از مهم‌ترین ابزارهای تشخیصی آینده خواهند بود.

٨) برهم‌کنش میزبان- انگل

شناخت مکانیسم‌های مولکولی عبور از جفت، فرار ایمنی و پاسخ‌های سلولی و هومورال میزبان از مهم‌ترین چالش‌های علمی باقی‌مانده است.

٩) اقتصاد بیماری

تحلیل خسارات اقتصادی مستقیم و غیرمستقیم و ارزیابی هزینه- سود برنامه‌های کنترل برای سیاست‌گذاری دامپزشکی ضروری است.

۱۰) رویکرد سلامت واحد (One Health)

ادغام مطالعات دام، سگ، حیات وحش و محیط زیست می‌تواند چارچوب جامعی برای کنترل بیماری ارائه دهد. همچنین در مورد زئونوز بودن بیماری و بررسی نحوه رفتار انگل با انسان مطالعات جامعی مورد نیاز است.



شکل ۱-۸- رویکرد سلامت واحد (One Health) در نئوسپوروزیس.

- منابع:

Abdoli, A., Arbabi, M., Dalimi, A., Pirestani, M., (2015). Molecular detection of *Neospora caninum* in house sparrows (*Passer domesticus*) in Iran. *Avian Pathology*, 44 (4), 319-322.

Abdoli, A. et al., (2018). Molecular assessment of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in hooded crows (*Corvus cornix*) in Tehran, Iran. *Comarative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 57, 69-73.

Adhami, G., Hoghooghi, R., Dalimi, A., (2014). The seroepidemiological investigation into *Neospora caninum* in cattle in Sanandaj, Kordestan province. *Journal of Veterinary Microbiology,* 10 (2), 83-92.

Aguado-Martínez, A., Basto, AP., Leitão, A., Hemphill, A., (2017). *Neospora caninum* in non-pregnant and pregnant mouse models: cross-talk between infection and immunity. *International Journal of Parasitology,* 47(12), 723-735.

Alexander, J., Stinson, W.H., (1988). Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitology Today*, 4, 189-93.

Alipour, M., Shakerian, A., Rahimi, E., (2018). Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in different types of raw milk and traditional dairy product samples. *Journal of Food Safety*, e12575.

Almeria, S. et al., (2010). Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Veterinary Parasitology*, 169, 304–311.

Al-Qassab, S., Reichel, M.P., Ellis J.T., (2010). On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. *Diversity*, 2, 411-438.

Al-Qassab, S., Reichel, M.P., Ivens, A., Ellis, J.T., (2009). Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Molecullar and Cellular Probes*, 23,132-139.

Anderson, M.L., Andrivo, A.G., Conrad, P., (2000). Neosporosis in cattle. *Reproductive Science*, 60, 417-431.

Anderson, M.L. et al., (1995). Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 207, 1206-1210.

Andrianarivo, A.G. et al., (1999). Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *International Journal Parasitology*, 29, 1613–1625.

Andrianarivo, A.G. et al., (2000). A Polygen-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *International Journal Parasitology*, 30, 985–990.

Ansari-Lari, M., (2020). Bovine neosporosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine,* 176, 104913.

Ansari-Lari, M. et al., (2017). Association of *Neospora caninum* with reproductive performance in dairy cows: a prospective study from Iran. *Veterinary Research Forum*, 8 (2), 109-114.

Antony, A., Williamson, N.B., (2003). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 51(3), 232–237.

Anvari, D. et al., (2020). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dog population Worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Acta Parasitologica*, 65, 273-290.

Arbabi, M., Abdoli, A., Dalimi, A., Pirestani, M., (2016). Identification of latent neosporosis in sheep in Tehran, Iran by polymerase chain reaction using primers specific for the Nc-5 gene. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 83 (1), 1-7.

Asadpour, R., Jafari-Joozani, R., Salehi, N., (2013). Detection of *Neospora caninum* in ovine abortion in Iran. *Journal Parasitic Diseases*, 37 (1), 105-109.

Atkinson R, Harper P, Reichel M, Ellis J., (2000). Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitology Today*, 16(3), 110-114.

Bahrami, S. et al., (2016). A molecular and serological study of *Neospora caninum* infection in pigeons from southwest Iran. *Veterinary Arhive*, 86 (6), 815-823.

Bahrami, S., Hamidinejat, H., Mayahi, M., Baloutaki, M., (2015). A survey of *Neospora caninum* infection in sparrows (*Passer domesticus*) in Khuzestan province, Iran. *Archive Razi Institute*, 70 (4), 279-281.

Barber, J.S. et al., (1995). Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology*, 111, 563–568.

Barbosa de Macedo, C.A. et al., (2013). *Neospora caninum*: evaluation of transplacental transmission in slaughtered dairy cows. *Brazilian Journal Veterinary Parasitology*, 22, 13-17.

Barling, K.S. et al., (2000). Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *Journal American Veterinary Medicine Association*, 217, 1356–1360.

Barling, K.S., Mc-Neill, J.W., and Paschal, J.C., (2001). Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 52, 53-61.

Barros, L.D., Miura, A.C., Minutti, A.F., Vidotto, O., (2018). *Neospora caninum* in birds: a review. *Parasitology International*, 67, 397-402.

Barta, J.R., Dubey, J.P., (1992). Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by Western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitology Research*, 78, 689-694.

Baszler, T.V. et al., (2008). Bovine Immune Response to Inoculation with *Neospora caninum* Surface Antigen SRS2 Lipopeptides Mimics Immune Response to Infection with Live Parasites. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15 (4), 659–667.

Baszler, T.V., McElwain, T.F., Mathison, B.A., (2000). Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. *Clinical Diagnosis Laboratory Immunology*, 7, 893–898.

Benetti, AH., et al., (2009). Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. *Rev Bras Parasitology Veterinary*, 18(1), 29-33.

Bowman, D.D., (2015). Georgis parasitology for veterinarians. 10th edition, Elsevier publication, Netherland.

Benavides, J. et al., (2012). High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Veterinary Research*, 43, 83.

Beugnet, F., Halos, L., Guillot, J., (2018). Textbook of clinical parasitology in dogs and cats. Servet editorial - Grupo Asís Biomedia, S.L. France.

Bieé, J., Moskwa, B., Cabaj, W., (2010). In vitro isolation and identification of the first *Neospora caninum* isolate from European bison (*Bison bonasus bonasus*). *Veterinary Parasitology*, 173, 200–205.

Bjerkås, I., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., (1994). Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 1, 214–221.

Björkman, C. et al., (1999). An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, 11, 41–44.

Cabral, A.D., Camargo, C.N., Galleti, N., Okuda, L., (2009). Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Revista Brasilian Veterinary Parasitology*, 18(4), 14-19.

Calarco, L., Barratt, J., Ellis, J., (2018). Genome wide identification of mutational hotspots in the apicomplexan parasite *Neospora caninum* and the implications for Virulence. *Genome Biology Evolution*, 10(9), 2417–2431.

Calero-Bernal, R. et al., (2019). Absence of *Neospora caninum* DNA in Human Clinical Samples, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 25(6), 1226-1227.

Canada, N., Meireles, C.S., Ferreira, P., (2006). Artificial insemination of cows in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 139, 109-114.

Changoluisa, D. et al., (2019). Serology for Neosporosis, Q fever and Brucellosis to assess the cause of abortion in two dairy cattle herds in Ecuador. *BMC Veterinary Research*, 15, 194.

Chanlun, A., Naslund, K., Aiumlamai, S., (2002). Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Veterinary Parasitology*, 110, 35-44.

Conrad, P.A. et al., (1993). In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. *Parasitology*, 106, 239-249.

Correia, A., Ferreirinha, P., Costa, AA. et al., (2013). Mucosal and systemic T cell response in mice intragastrically infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Veterinary Research,* 44, 69.

Costa, K.S. et al., (2008). Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *International Journal Parasitology*, 38, 157–159.

Dalimi, A., Sabevarinejad, G., Ghafarifar, F., Forouzandeh-Moghadam, M., (2014). Molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected dogs in Lorestan province, West of Iran. *Archive Razi Institute*, 69 (2), 185-190.

Davison, H., Otter, A., Treesa, A., (1999). Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, 29(10), 1683-1689.

Debache, K,. Hemphill, A., (2026). *Neospora caninum*: Recent Progress in Host-Pathogen Interactions, Molecular Insights, and Control Strategies. Microorganisms, 14(2), 338.

Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., (2002). Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Veterinary Parasitology*, 105, 99-104.

Donahoe, S.L., et al., (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal Parasitology: Parasites Wildlife,* 4(2), 216-238.

Doosti, A., Khamesipour, F., Nekoei, S., Lutvikadic, I., (2015). Survey for the presence of *Neospora caninum* in frozen bull's semen samples by PCR assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(1), 7-12.

Duarte, P.O. et al., (2020). Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. *Science Reproduction*, 10, 9043.

Dubey, J.P., (1998). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(9), 1269.

Dubey, J.P., (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*, 41(1), 1-16.

Dubey, J.P., (2008). The history of *Toxoplasma gondii*-The first 100 years. *Journal of Eukaryot Microbiology*, 55(6), 467-475.

Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W., (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134(4), 267-89.

Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., (1998). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of American Veterinary*, 193, 1259-1263.

Dubey, J.P., Hemphill, A., Schares, G., Calero-Bernal, R., (2017). Neosporosis in animals. CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, USA.

Dubey, J.P., Knickman, E., Greene, C.E., (2005). Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. *Acta Parasitologica*, 50 (2), 176–179.

Dubey, J.P., Schares, G., (2011). Neosporosis in animals-The last five years. *Veterinary Parasitology*, 180, 90-108.

Dubey, J.P., Schares, G., and Ortegamora, L.M., (2007). Epidemiology and control of Neosporosis and *N. caninum*. *Clinical of Microbiology Review*, 20, 323-369.

Duarte, PO., et al., (2020). Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. *Scientific Report*, 10, 9043.

Ezatpour, B. et al., (2013). The first report of *Neospora caninum* prevalence in aborted and healthy sheep from West of Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 24(1), 19-22.

Fakheri, A., (2019). Study on *Neospora caninum* infection in stool of dogs from Tabriz using Coproscopy and PCR. DVM thesis in Veterinary School of Tabriz University, Iran.

Fooroghi-Pardenjani, M., (2013). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle from Shahrekord using ELISA. DVM thesis, Veterinary School of Shahrekord University, Iran.

García-Melo, D.P. et al., (2009). Isolation and biological characterization of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. *Acta Parasitologica*, 54(2), 180–185; ISSN 1230-2821.

Gharedaghi, Y., (2011). Seroepidemiology of *Neospora* sp., in horses in East-Azerbaijan province of Iran. *Research Journal of Biological Science*, 6 (5), 224-226.

Gharedaghi, Y., (2012a). Seroepidemiology of *Neospora caninum* in cattle in East-Azerbaijan province, North-West Iran. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11 (5), 645-648.

Gharedaghi, Y., (2012b). Seroprevalence of *Neospora caninum* in stray dogs of Tabriz Iran. *Journal of Animal and Veterinary Advances,* 11 (6), 723-726.

Gharekhani, J., (2014). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in aborted cattle in Hamedan, Iran. *Journal of Advance Veterinary and Animal Research*, 1 (2), 32-35.

Gharekhani, J., (2026). *Neospora caninum*: A Review on Molecular Biology and Pathogenesis [Internet]. *Modern Strategies in Parasitology* [Working Title], IntechOpen, https://doi.org/10.5772/intechopen.1013162.

Gharekhani, J., Ebrahimi, MA., (2025). Mini Review on *Neospora Caninum*: Updates and Epidemiology in Iran. *Avicenna Veterinary Research,* 1(4), 11-19.

Gharekhani, J. et al., (2016). Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Iranian goats. *Annal of Parasitology*, 62 (2), 111-114.

Gharekhani, J., Haddadzadeh, H., Bahonar, A., (2014). Prevalence of immunoglobulin G (IgG) antibody to *Neospora caninum* in dairy cattle of Hamedan province, West of Iran. *Veterinary Research Forum*, 5 (2), 149-152.

Gharekhani, J., Heidari, H., (2014a). Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in Iranian native cattle. *Journal of Advance Veterinary and Animal Research*, 1 (4), 228-231.

Gharekhani, J., Heidari, H., (2014b). Serology-based comprehensive study of *Neospora* infection in domestic animals in Hamedan province, Iran. *Journal of Advance Veterinary and Animal Research*, 1 (3), 119-124.

Gharekhani, J., Heidari, H., Akbarein, H., (2012). Seroepidemiology of *Neospora caninum* in Iranian native and crossbreed cattle: a cross-sectional study. *Journal of Veterinary Research*, 67 (4), 325-329.

Gharekhani, J., Tavoosidana, G., (2013). Serological survey of *Neospora caninum* (Sarcocystidae) infection in beef cattle from western Iran. *Scientia Parasitologica*, 14, 95-98.

Gharekhani, J., Tavoosidana, G., Akbarein, H., (2013a). Serological study of *Neospora caninum* infection in dogs and cattle from West of Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 23 (5), 1203-1207.

Gharekhani, J., Tavoosidana, G.R., Naderisefat, G.R., (2013c). Seroprevalence of *Neospora* infection in horses and donkeys in Hamedan province, Western Iran. *Veterinary World*, 6 (9), 620-622.

Gharekhani, J., Tavoosidana, G.R., Zandieh, M., (2013b). Seroprevalence of *Neospora caninum* in sheep from western Iran. *Veterinary World*, 6 (10), 709-710.

Gharekhani, J., and Yakhchali, Y., (2019). *Neospora caninum* infection in dairy farms with a history of abortion in West of Iran. *Veterinary and Animal Science*, 8, 100071.

Gharekhani, J., Yakhchali, M., Abbasi-Doulatshahi, E., Barati, E., (2019). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in stray dogs of Hamadan suburb, West of Iran, 2018. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 6 (2), 57-60.

Gharekhani, J., Yakhchali, M., Berahmat, R., (2020a). *Neospora caninum* infection in Iran (2004–2020): a review. *Journal Parasitic Diseases*, 44 (4), 671-684.

Gharekhani, J. et al., (2018). Seroprevalence and risk factors of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Southwest of Iran. *Archive of Razi Institute*, 73 (4), 305-310.

Gharekhani, J. et al., (2021). A literature review of *Neospora caninum* infection in humans. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 8(3), 113-116.

Gharekhani J., Yakhchali, M., (2022). Control measures to reduce *Neospora caninum* abortions in dairy farms: a pilot study in Iran. *Veterinaria Italiana*, 58 (2), 237-244.

Gharekhani, J., Yakhchali, M., Heidari, R., (2022). Molecular detection and phylogenetic analysis of *Neospora caninum* in various hosts from Iran. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 80, 101737.

Gharekhani, J., Yakhchali, M., Khaltabadi-Farahani, R., (2020b). Prevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatidae) in pet dogs from Hamadan, West of Iran, 2016. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 7(1), 22-26.

Gondim, L.F.P., et al., (2004). Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *Journal Parasitology*, 90(6), 1394-1400.

Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T., (2013). A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution*, 13, 133-150.

Goździk, K., Wrzesień, R., Wielgosz-Ostolska, A., (2011). Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dogs from urban areas in central Poland. *Parasitology Research*, 108, 991–996.

Graham, DA., et al., (1999). Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *Veterinary Record*,144, 672-673.

Guido, S., Katzer, F., Nanjiani, I., (2016). Serology-based diagnostics for the control of bovine Neosporosis. *Trend Parasitology*, 32 (2), 131-143.

Habibi, G.R. et al., (2005). Semi-Nested PCR for diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Archive of Razi Institute*, 59, 55-64.

Hadadi, M.R. et al., (2018). Evaluation of anti-*Neospora caninum* antibody presence in cow's milk in Kashan. *Feyz,* 22 (3), 333-338.

Haddadzadeh, H. et al., (2007). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from rural and urban environments in Tehran, Iran. *Parasitology Research*, 101 (6), 1563-1565.

Hajikolaei, M.R.H. et al., (2007). Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the South-western region of Iran. *Bull Veterinary Institute Pulawy*, 51 (2), 233-235.

Hajikolaei, M.H., Hamidinejat, H., Ghorbanpoor, M., Goraninejad, S., (2008). Serological study of *Neospora caninum* infection in cattle from Ahvaz area, Iran. *International Journal Veterinary Research*, 2 (1), 63-127.

Hall, C.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T., (2005). Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary Parasitology*, 128, 231-241.

Hamidinejat, H. et al., (2013). Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in camels (*Camelus dromedarius*) in the center of Iran. *Turkey Journal of Veterinary and Animal Science*, 37, 277-281.

Hamidinejat, H. et al., (2011a). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Ahvaz feral cats, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4 (4), 217-222.

Hamidinejat, H. et al., (2011b). Prevalence of *Neospora caninum* in domestic cats from Ahvaz, Iran. *Parasite*, 1 (10), 8-9.

Heidari, H., Mohammadzadeh, A., Gharekhani, J., (2014). Seroprevalence of *Neospora caninum* in slaughtered native cattle in Kurdistan province, Iran. *Veterinary Research Forum*, 5 (1), 69-72.

Hemphill, A et al., (2024). Working towards the development of vaccines and chemotherapeutics against neosporosis-Looking ahead. Advances in *Parasitology*,124, 91–154.

Hemphill, A., Gottstein, B., (2000). A European perspective on *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 30, 877-924.

Hemphill, A., Müller, J., (2015). Vaccines and drugs against *Neospora caninum*, an important apicomplexan causing abortion in cattle and other farm animals. *Reports in Parasitology*, 4, 31-41.

Hoseini, A. et al., (2018). Comparison of *Neospora caninum*-infected tissues in aborted fetal bovine by PCR. *Journal of Veterinary Research*, 73(3), 377-382.

Horcajo, P., et al., (2016). Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. *Parasite Immunology,* 38, 709-723.

Hosseini, M.H. et al., (2011). Seroprevalence of *Neospora* spp. in horses in North-East of Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 6 (2), 64-68.

Hosseininejad, M., Hosseini, F., (2011). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in dogs from West and Central parts of Iran

using two indirect ELISA tests and assessment of associate risk factors. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 12 (1), 46-51.

Hosseininejad, M., Hosseini, F., Auobei, S., (2018). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs in Ahwaz, Iran. *Veterinary Research and Biological Production*, 122, 97-100.

Hosseininejad, M. et al., (2010a). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dogs in Chaharmahal-va-Bakhtiari province, Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 19(3), 269-270.

Hosseininejad, M. et al., (2010b). Development of an indirect ELISA test using an affinity-purified surface antigen (p38) for serodiagnosis of canine *Neospora caninum* infection. *Veterinary Parasitology*, 171 (3), 337-342.

Hosseininejad, M., Mahzounieh, M., Shams Esfandabadi, N., (2017). *Neospora caninum* Suspects as one of the most important causes of abortion in large dairy farms in Isfahan, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 12 (3), 408-412.

Hosseininejad, M., Pirali-Kheirabadi, K., Hosseini, F., (2009). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in camels (*Camelus dromedarius*) in Isfahan province, Center of Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 4 (4), 61-64.

Huang, C.C., Yang, V.H., Watanabe, Y., (2004). Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat. *Veterinary Research*, 35, 283-290.

Hughes, J.M., Williams, R.H., Morley, E.K., (2006). The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal population. *Parasitology*, 132, 29-36.

Hurkova, L., Halova, D., Modry, D., (2005). The prevalence of *Neospora caninum* antibodies in bulk milk of dairy herds in the Czech Republic: a case report. *Veterinary Medicine*, 50 (12), 549-552.

Ibrahim, HM., et al., (2009). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene,* 80(2), 263-267.

Japa, O., Nuangmek, A., Prakhammin, K., Flynnd, R., (2019). Prevalence of transplacentally transmitted *Neospora caninum* amongst beef cattle in Phayao, Thailand. *Parasitology International*, 70, 98-101.

Jensen, A.M., Bjorkman, C., Kjeldsen, A.M., (1999). Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 40, 151-163.

Kamali, A. et al., (2014). Histopathological and molecular study of *Neospora caninum* infection in bovine aborted fetuses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (12), 990-994.

Khan, I., Schwartzman, J., Fonseka, S., Kasper, L., (1997). *Neospora caninum*: Role for immune cytokines in host immunity. *Experimental Parasitology*, 85, 24–34.

Khan, A. et al., (2020). Neosporosis: An overview of its molecular epidemiology and Pathogenesis. *Engineering*, 6, 10–19.

Khani, M., Arabkhazaeli, F., Hosseini, S.D., Shayan, P., (2018). Molecular detection of *Neospora caninum* in aborted fetuses of cattle farms in Arak. *Journal of Veterinary Research*, 73 (4), 457-463.

Khanmohammadi, M., Fallah, E., (2011). Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in shepherd dogs in Sarab district, East-Azerbaijan province, Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (28), 5062-5066.

Khordadmehr, M. et al., (2012). Seroprevalence of *Neospora caninum* in farm and household dogs determined by ELISA. *Online Journal of Veterinary Research*, 16 (4), 172-181.

Khordadmehr, M., Namavari, M., Khodakaram-Tafti, A., (2014). Susceptibility of various cell lines to *Neospora caninum* tachyzoites cultivation. *Archive Razi Institute*, 69(1), 57-62.

Kyaw, T., Virakul, P., Muangyai, M., Suwimonteerabutr, J., (2004). *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle in central Thailand. *Veterinary Parasitology*, 121, 255–263.

Lagomarsino, H. et al., (2019). Controlling endemic *Neospora caninum*-related abortions in a dairy herd from Argentina. *Front Veterinary Science*, 6, 446.

Lefkaditis, M. et al., (2020). *Neospora caninum*, a potential cause of reproductive failure in dairy cows from Northern Greece. *Veterinary Parasitology: Regional study and Reports,* 19, 100365.

Liddell, S., Jenkins, M.C., Collica, C.M., Dubey, J.P., (1999). Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *Journal Parasitology*, 85, 1072–1075.

Lindsay, D.S., Dubey, JP., (1989). Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue section. *American Journal of Veterinary Research*, 50(11), 1981-1983.

Lobato, J., et al., (2006). Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clinical Vaccine Immunology*, 13(1), 84-89.

López-Gatius, F. et al., (2005). The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in N*eospora*-seropositive dairy cows. *Journal of Veterinary Medicine*, 52, 88–92.

Macchi, M.V. et al., (2020). Epidemiological study of neosporosis in Uruguayan dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 179, 105022.

Magnino, S. et al., (1999). Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. *Veterinary Record*, 144, 456.

Malmasi, A. et al., (2007). Serologic study of anti-*Neospora caninum* antibodies in household dogs and dogs living in dairy and beef cattle farms in Tehran, Iran. *Parasitology Research*, 100, 1143-1145.

Marques, F.A. et al., (2010). *Neospora caninum*: evaluation of transplacental transmission in slaughtered beef cows. *Parasitology Research*, 108(4), 1015-1019.

Martins, N.É. et al., (2011). Occurrence of anti *Neospora caninum* antibodies in lactating cows from the municipality of Araguaiana, Tocantins state, Brazil. *Revista Pathology Tropical*, 40, 231–238.

McCann, C.M. et al., (2008). Lack of Serologic Evidence of *Neospora caninum* in Humans, England. *Emerging Infection Diseases*, 14(6), 978-80.

Michael, S.Y.H., (1996). Identification of bovine *Neospora*. *Journal of Clincal Microbiology*, 34(5), 1203-1208.

Mikhchi, A., Jafarabadi, G.A., Torshizi, M.E., (2013). Seroprevalence of *Neospora caninum* in Holstein dairy cattle in Northeast of Iran. *Research Opinion of Animal and Veterinary Science,* 3 (12), 453-456.

Miller, C.M., Quinn, H.E., Windsor, P.A., Ellis, J.T., (2002). Characterization of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Australian Veterinary Journal*, 80 (10), 620–625.

Moraveji, M. et al., (2011). Seroprevalence of *Neospora* spp. in horses in South of Iran. *Tropical Biomedicine*, 28 (3), 514-517.

Marugan-Hernandez, V., (2017). *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. *Journal of Comparative Pathology,* 157, 193–200.

McCann, CM., et al., (2008). Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. *Emerging Infectious Diseases*, 14(6), 978-980.

Morovati, H., Noaman, V., (2016). Seroepidemiology of *Neospora caninum* in dairy cattle farms with a history of abortion in Isfahan province, Iran. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry,* 4 (3), 304.

Mosallanejad, B., Bahrami, S., Hamidinejat, H., and Ghanavati, S., (2018a). A serological survey of *Neospora caninum* infection in urban and rural dogs in Ahvaz district, Southwest of Iran. *Archive Razi Institute*, 73 (3), 215-221.

Mosallanejad, B., Razi Jalali, M.H., Hamidinejat, H., Peighambari, E., (2018b). A serological survey on *Neospora caninum* infection in wild rats (*Rattus rattus*) in Ahvaz district, Iran. *Journal of Zoonosis Diseases*, 3 (1), 1-9.

Motamedi, A., Keihani, P., Momtaz, H., (2020). Molecular detection of *Neospora caninum* in infected dogs of Isfahan, Iran. *Journal of Zoonosis Diseases,* 4(1), 35-42.

Müller, N. et al., (2001). Comparative molecular investigation of Nc5-PCR amplicons from *Neospora caninum* NC-1 and *Hammondia heydorni*-Berlin-1996. *Parasitology Research*, 87, 883–885.

Müller, J., Müller, N., Hemphill, A., (2011). Drugs and Drug Targets in *Neospora caninum* and Related Apicomplexans. In Apicomplexan Parasites (eds P.M. Selzer and K. Becker). https://doi.org/10.1002/9783527633883.ch19.

Müller, N., Zimmermann, V., Hentrich, B., Gottstein, B., (1996). Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *Journal Clinical Microbiology*, 34, 2850–2852.

Nam, H., Kang, S., Choi, W., (1998). Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. Korean Journal of Parasitology, 36(4), 269-275.

Namavari, M.M., (2020). Neosporosis in Iran; recent evidences and perspective. *Journal of Zoonotic Diseases*, 2020, 4 (2), 1-24.

Namavari, M. et al., (2017). High seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in Camels (*Camelus dromedarius*) in the South of Iran. *Applied Animal Science and Research Journal*, 24, 57-62.

Nayebzadeh, H. et al., (2015). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in West of Iran. *Istanbul Veterinary Journal*, 41 (2), 162-166.

Nazari, N. et al., (2019). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in brain tissue of rodents in North-West Iran. *Veterinary Medicine and Research Reproduction*, 10, 223-227.

Nazari, N. et al., (2020). Serological survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* co-infection in rodents in Northwestern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 15(2), 253-258.

Nematollahi, A., Jaafari, R., Moghaddam, G., (2011a). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Tabriz, Northwest Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 6 (4), 95-98.

Nematollahi, A., Jafari Jozani, R., Zaboli, N., (2011b). Adaptation of Dot-ELISA for serodiagnosis of *Neospora caninum* infestation in aborted cows. *Global Veterinary,* 7 (2), 149-152.

Nematollahi, A. et al., (2013). Study on outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in dairy cows in Tabriz (Northwest Iran) by serological, molecular and histopathologic methods. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,* 6 (12), 942-946.

Nicolino, R.R. et al., (2015). Estimating the abortion risk difference in *Neospora caninum* seropositive dairy cattle in Brazil. *Ciência Rural*, 45, 1629-1633.

Nicolino, R.R., Oliveira, C.S., Lopes, L.B., (2017). Prevalence and risk factors associated with anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy herds in the Central region of Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Study and Reports*, 10, 71-74.

Nishikawa, Y., Mishima, M., Nagasawa, H., Igarashi, I., (2001a). Interferon gamma induced apoptosis in host cell infected with *Neospora caninum*. *Parasitology*, 123(1), 25-31.

Nishikawa, Y. et al., (2001b). In the absence of endogenous Gamma Interferon, mice acutely with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophage. *Clinical and Vaccine Immunology*, 8(4), 811-817.

Nishikawa, Y. et al., (2001). Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine*, 19, 1710–1716.

Noaman, V., Nabinejad, A., (2020). Seroprevalence and risk factors assessment of the three main infectious agents associated with abortion in dairy cattle in Isfahan province, Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 2001-2009.

Noori, M., Rasekh, M., Ganjali, M., Nourollahi-Fard, S.R., (2019). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection and associated risk factors in cattle of Sistan areas, Southeastern Iran in 2016. *Iranian Journal of Parasitology*, 14 (2), 340-346.

Nourollahifard, S.R., Khalili, M., Aminzadeh, A., (2008). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in cattle in Kerman province, South East Iran. *Veterinary Arhive*, 78 (3), 253-259.

Norollahifard, S.R. et al., (2017). Seroprevalence of *Neospora caninum* in cattle of Neishabour, Northeast Iran. *Slovenian Veterinary Research*, 54(1): 5-9.

Oshiro, LM., et al., (2015). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers. *Rev Bras Medicine Tropical,* 48(5), 568-572.

Okumu, T.A. et al., (2019). Seroprevalence of antibodies for bovine viral diarrhoea virus, *Brucella abortus* and *Neospora caninum*, and their roles in the incidence of abortion/foetal loss in dairy cattle herds in Nakuru District, Kenya. *BMC Veterinary Research*, 15, 95.

Ortega-Mora, L.M., Ferre, I., Del-Pozo, I., (2003). Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Veterinary Parasitology*, 117, 301-308.

Pare, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C., (1995a). ELISA for serological diagnosis of *Neospora* sp. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, 7, 352-359.

Paré, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C., (1995b). Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation,* 7, 273–275.

Pastor-Fernández, I., Regidor-Cerrillo, J., Jimenez-Ruiz, E., et al., (2016). Characterization of the *Neospora caninum* NcROP40 and NcROP2Fam-1 rhoptry proteins during the tachyzoite lytic cycle. *Parasitology,* 143(1), 97–113.

Patitucci, A.N. et al., (1999). Serological study of a dairy herd with a recent history of *Neospora abortion*. *New Zealand Veterinary Journal*, 47, 28–30.

Pérez-Zaballos, F.J. et al., (2005). Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell culture changes: An argument in favour of its clonal population structure. *Journal Parasitology*, 91, 507-510.

Petersa, M., Lütkefels, E., Heckeroth, A., Schares, G., (2001). Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 31(10), 1144-1148.

Petersen, E., et al., (1999). *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerg Infection Diseases,* 5(2), 278-280.

Pitel, P.H. et al., (2001). Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: Detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Veterinary Parasitology*, 102, 269–277.

Pouramini, A. et al., (2017). Molecular and serological detection of *Neospora caninum* in multiple tissues and CSF in asymptomatic infected stray dogs. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 11 (2), 105-112.

Pourmahdi-Borujeni, M., Hamidinejat, H., Ghorbanpour, M., Asefi, H., (2015). Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal Veterinary Microbiology*, 11 (1), 19-26.

Qian, W. et al., (2016). Occurrence and first multilocus microsatellite genotyping of *Neospora caninum* from naturally infected dogs in dairy farms in Henan, Central China. *Parasitology Research*, 115, 3267–3273.

Raeisi, A., (2010). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from Chaharmahal-va-Bakhtiari province using IFA. PhD thesis in the Veterinary School of Shahrekord University, Iran.

Rafati, N., Jaafarian, M., (2014). The determination of prevalence of in aborted fetuses in dairy cattle of Shahrekord area, Chaharmahal-va Bakhtiari province, by Nested-PCR. *Journal of Veterinary Laboratory Research*, 6 (1), 45-50.

Ramond, S., Thullier, P., Dubey, J.P., (1998). Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research*, 84, 50-53.

Ranjbar Bahadori, S., Motevaselian, A., Bokaie, S., Yousefi, M., (2010). Serological study of *Neospora caninum* in aborted dairy cattle in Garmsar. Iran. *Comparative Biopathology*, 2, 249-254.

Razmi, G.R., (2009). Faecal and molecular survey of *Neospora caninum* in farm and household dogs in Mashhad area, Khorasan province, Iran. *Korean Journal of Parasitology*, 47 (4), 417-420.

Razmi, G., Barati, M., (2017). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in bulk milk of dairy cattle, Mashhad, Iran. *Archive Razi Institute,* 72(3), 265-269.

Razmi, G.R. et al., (2007). First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. *Parasitology Research*, 100 (4), 755-757.

Razmi, G.R. et al., (2006). Seroepidemiology of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Mashhad area, Iran. *Veterinary Parasitology*, 135 (2), 187-189.

Razmi, G.R., Naseri, Z., (2017). Molecular detection of *Neospora caninum* infection in ovine aborted foetuses in the Mashhad area, Iran. *Annals of Parasitology*, 63 (1), 45-47.

Razmi, G.R., Zarea, H., Naseri, Z., (2010). A survey of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in large dairy farms of Mashhad, Iran. *Parasitology Research,* 106, 1419-1423.

Razmi, G.R., Zarae, H., Norbakhsh, M.F., Naseri, Z., (2013). Estimating the rate of transplacental transmission of *Neospora caninum* to aborted fetuses in seropositive dams in Mashhad area, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 7(4), 253-256.

Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Diaz, S., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., (2006). Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *Journal Parasitology*, 92, 517–524.

Reichel, M.P., Ayanegui-Alcérreca, M.A., Gondim, L.F.P., Ellis, J.T., (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle–the billion-dollar question? *International Journal of Parasitology*, 43, 133-142.

Reichel, M.P., McAllister, M.M., Nasir, A., Moore, D.P., (2015). A review of *Neospora caninum* in Water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Parasitology*, 212, 75-79.

Rezvan, H., Khaki, A., Namavari, M., Abedizadeh, R., (2019). An investigation of the concurrency of anti-*Neospora* antibody and parasitemia in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northwest of Iran. *Veterinary Research Forum*, 10 (1), 79-84.

Ribeiro, C.M. et al., (2019). Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. *Tropical Animal Health Production*, 51 (7), 1783-1800.

Robert-Gangneux, F., Klein, F., (2009). Serologic screening for *Neospora caninum*, France. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 987-988.

Rojo-Montejo, S., et al., (2009). Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Veterinary Parasitology*, 159, 7–16.

Sadrebazzaz, A., Habibi, G., Haddadzadeh, H., Ashrafi, J., (2007). Evaluation of bovine abortion associated with *Neospora caninum* by different diagnostic techniques in Mashhad, Iran. *Parasitology Research*, 100 (6), 1257-1260.

Sadrebazzaz, A. et al., (2004). Serological prevalence of *Neospora caninum* in healthy and aborted dairy cattle in Mashhad, Iran. *Veterinary Parasitology*, 124 (3), 201-204.

Sadrebazzaz, A., Haddadzadeh, H., Shayan, P., (2006). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in camels (*Camelus dromedarius*) in Mashhad, Iran. *Parasitology Research*, 98 (6), 600-601.

Salehi, N. et al., (2010). Serological study of *Neospora caninum* in pregnant dairy cattle in Tehran, Iran. *International Journal of Veterinary Research*, 4 (2), 113-116.

Salehi, N., Haddadzadeh, H., Shayan, P., and Koohi, M.K., (2012). Isolation of *Neospora caninum* from an aborted fetus of seropositive cattle in Iran. *Veterinary Arhive*, 82(6), 545-553.

Salehi, N., Gottstein, B., Haddadzadeh, H.R., (2015). Genetic diversity of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite markers. *Parasitology International*, 64, 357-361.

Sánchez-Sánchez, R., Vázquez, P., Ferre, I., Ortega-Mora, I., (2018). Treatment of Toxoplasmosis and Neosporosis in Farm Ruminants: State of Knowledge and Future Trends. *Current Topical Medicine Chemistery*,18(15), 1304–1323.

Santos, T., Simões, R., Mateus, T., Lopes, A., (2016). Updates on *Neospora caninum* – economic impact. *Experimental Pathology Health Science*, 8 (1), 49-50.

Sasani, F. et al., (2013). *Neospora caninum* as causative agent of ovine encephalitis in Iran. *Pathology Discovery*, 1 (1), 1-5.

Sattari, A., Moshiri, F., Musavi, S., (2011). The seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle herds in Golestan province, Iran. *Journal Veterinary Microbiology,* 7 (1), 60-64.

Sayarim, M., Namavarim, M., Mojaver, S., (2016). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in free-ranging Chickens (*Gallus domesticus*). *Journal Parasitic Diseases,* 40 (3), 845-847.

Sekiya, M., Zintl, A., Doherty, M.L., (2013). Bulk milk ELISA and the diagnosis of parasite infections in dairy herds: a review. *Irish Veterinary Journal*, 66,14.

Schares, G., Bärwald, A., Staubach, C., (2004). Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology*, 129, 301-309.

Schares, G. et al., (2004). Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Veterinary Parasitology*, 120, 55-63.

Schock, A. et al., (2001). Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 123, 13-23.

Shahi, M., (2016). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in ewes from Golpayegan using ELISA. MSc thesis in Veterinary Parasitology, Veterinary School of Shahrekord University, Iran.

Shakerian, A., Sherafati, R., Rafati, N., Sharifzadeh, A., (2015). Detection of *Neospora caninum* in raw milk of cattle in Shahrekord using PCR. *Journal of Tropical Infection Diseases*, 70, 9-14.

Sharifdini, M. et al., (2011). *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in domestic dogs (*Canis familiaris*) in Meshkin-shahr district, Northwestern Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 1 (3), 60-68.

Sharifzadeh, A., Doosti, A., Dehkordi, P.G., (2012). PCR assay for detection of *Neospora caninum* in fresh and frozen semen specimens of Iranian bulls. *World Applied Science Journal*, 17, 742-749.

Silva, R.C., Machado, G.P., (2016). Canine neosporosis: perspectives on pathogenesis and management. *Veterinary Medicine: Research and Reports,* 6(7), 59-70.

Snak, A. et al., (2018). *Neospora caninum* in properties in the west region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 27(1), 51-59.

Soltani, M., Sadrebazzaz, A., Nassiri, M., Tahmoorespoor, M., (2013). Cloning, Nucleotide sequencing and Bioinformatics study of NcSRS2 Gene, an Immunogen from Iranian isolate of *Neospora caninum*. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(1), 114-128.

Taheri Lak, k., Sadraeii, J., Dalimi, A., (2017). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in milk samples from dairy farms in the Shahriyar. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi),* 115, 142-146.

Tavalla, M. et al., (2015). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. Infections in Arab horses, Southwest of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8 (3), e14939.

Tavanaee, H.R., Namavari, M., (2017). Evaluation of attenuated variety of *Neospora caninum* for the diagnosis of infection in cattle by agglutination test. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi),* 115, 153-157.

Thrusfield, M., (2018). Veterinary Epidemiology. 4nd Ed. John Wiley & Sons Ltd Press, London, England, 457-492.

Tomasina, R., González, FC., Echeverría, S., Cabrera, A., Robello, C., (2023). Insights into the Cell Division of *Neospora caninum*. *Microorganisms,* 28, 12(1), 61.

Tranas, J., et al., (1999). Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology,* 6(5), 765-767.

Trees, AJ., Williams, DJL., (2000). Neosporosis in the United Kingdom. *International Journal of Parasitology*, 30, 891-893.

Tunev, S., McAllister, M., Anderson-Sprecher, R., and Weiss, L., (2002). *Neospora caninum* in vitro: evidence that the destiny of a parasitophorous vacuole depends on the phenotype of the progenitor zoite. *Journal Parasitology*, 88(6), 1095–1099.

Vajdi, H.R., Khanmohammadi, M., Moniri, S.M., (2014). Seroprevalence of *Neospora caninum* in Miyaneh sheep (Azarbayejan-e-Sharghi province) by competitive ELISA and IFA methods. *Journal of Clinical Large Animals*, 7 (1), 59-66.

Williams, D.J.L. et al., (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: The time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121, 347–358.

Yaniz, J.L. et al., (2010). Some factors affecting the abortion rate in dairy herds with a high incidence of *Neospora*–associated abortions are different in cows and heifers. *Reproductive Domestic Animal*, 45, 699-705.

Yakhchali, M., et al., (2017). The enzymes and electrolytes profiles in sera of Iranian stray dogs naturally infected with *Neospora caninum*. *Annals of Parasitology*, 63 (1), 63-68.

Yakhchali, M., Javadi, S., Morshedi, A., (2010). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in stray dogs of Urmia, Iran. *Parasitology Research*, 106, 1455-1458.

Yamage, M., Flechtner, O., Gottstein, B., (1996). *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally-infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal Parasitology*, 82, 272–279.

Youssefi, M.R., Arabkhazaeli, F., Tabar Molla, H., (2009). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in rural and industrial cattle in Northern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 4 (1), 15-18.

Youssefi, M.R., Ebrahimpour, S., Esfandiari, B., (2010). Survey of *Neospora caninum* antibody in aborting cattle from three climate regions of Iran. *World Applied Science Journal,* 10, 1448-1451.