Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره اول، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۰: ۲۶-۱۹

# مقایسه روش‌های تشخیص سرولوژیکی تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* در گاومیش

**مهدی پورمهدی بروجنی[1*]، حسین حمیدی نجات[2]، مسعود قربانپور[3]، هدیه آصفی[4]**

*۱- دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*

*۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*

*۳- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*

*۴- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*

تاریخ دریافت: ۱۳ مهر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۲ خرداد ۱۳۹۳

**چکیده**

*در این تحقیق با مراجعه تدریجی به کشتارگاه اهواز طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰، نمونه‌ی سرم ۱۸۸ رأس گاومیش کشتار شده در کشتارگاه اهواز جمع آوری گردید و ارزیابی توسط دو کیت الیزای تجاری (IDEXX و ID VET) و روش NAT انجام گرفت. شیوع سرمی نئوسپورا کانینوم در کیت الیزای تجاری IDEXX و ID VET و روش NAT به ترتیب ۵۵/۹، ۶۶/۵ و ۵۶/۹ درصد بود که اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) و کیت الیزای ID VET با کیت الیزای IDEXX و روش NAT تفاوت معنی‌داری داشت، اما تفاوت معنی‌داری میان کیت IDEXX و روش NAT مشاهده نگردید. توافق کیت الیزای ID VET با کیت الیزای IDEXX و روش NAT ضعیف بود و مقدار آماره کاپا به ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۲۶ بود اما توافق کیت IDEXX با روش NAT متوسط بود و مقدار آماره کاپا ۰/۵۹ بود. شیوع سرمی نئوسپورا کانینوم بر اساس کیت الیزای IDEXX در گاومیش‌های نر و ماده به ترتیب ۵۳/۷٪ و ۵۹/۷٪ و در گاومیش های با سن ۲سال و کمتر ۵۷/۳٪ و در گاومیش‌های بالای ۲ سال ۵۳/۱٪ بود که ارتباط معنی‌داری بین جنس و سن و آلودگی وجود نداشت (P>۰/۰۵).*

***کلمات کلیدی:*** *تشخیص، نئوسپورا کانینوم، گاومیش*

**نویسنده مسئول: مهدی پورمهدی بروجنی*

*آدرس: دانشیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز،اهواز، ایران. تلفن: ۳۳۳۰۰۷۳-۰۶۱۱*

*پست الکترونیک: Pourmahdim@gmail.com*

**مقدمه**

*نئوسپورا کانینوم* تک‌یاخته داخل سلولی اجباری و بسیار شبیه *توکسوپلاسما گونده ای* است که اولین بار در سال ۱۹۸۴ توسط Bjerkas و همکاران در سگ‌های نروژی و سپس در سال ۱۹۸۷ در گوساله‌های مبتلا به میلوآنسفالیت مشاهده شد، اما جداسازی و نامگذاری آن در سال ۱۹۸۸ صورت گرفت. علت نام گذاری این انگل به *نئوسپورا*، تشابه سیرتکاملی و ریخت شناسی آن با سایر اعضای دسته اسپوروزوا بود و چون برای اولین بار تشخیص داده می‌شد، انگل هاگ دار جدید یا *نئوسپورا* نام گرفت. این انگل می‌تواند بیماری بالینی جدی در سگ‌ها ایجاد کند و موجب سقط در گاو و ندرتاً در بز، گوسفند، گوزن، کرگدن، لاما و آلپاکا شود (۶، ۸، ۹ و ۱۸). تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* در شاخه آپی کمپلکسا، رده اسپوروزوا، راسته اوکوکسیدیدا، خانواده سارکوسیستیده، تحت خانواده توکسوپلاسمینه و جنس نئوسپورا قرار دارد (۱۶). *نئوسپورا کانینوم* چرخه زندگی دو میزبانه دارد و سگ و کایوت تنها میزبان نهایی شناخته شده برای آن هستند. سگ‌ها می‌توانند، هم میزبان واسط و هم میزبان نهایی انگل باشند. چرخه زندگی انگل به سه مرحله تاکی زوئیت، برادی‌زوئیت و اووسیست تقسیم می‌شود. تاکی زوئیت و برادی‌زوئیت در بافت‌های میزبان واسط و نهایی ایجاد می‌شوند و هر دو داخل سلولی هستند. در حالی که اسپوروزوئیت در اووسیست‌هایی که از مدفوع میزبان نهایی دفع می‌شود حضور دارند. میزبانان حساس می‌توانند با خوردن آب و غذای آلوده به اووسیست-های *نئوسپورا کانینوم* موجود در مدفوع سگ‌ها، مبتلا شوند (۸، ۹ و ۱۱). گاومیش به عنوان میزبان طبیعی مهمی برای *نئوسپورا کانینوم* محسوب می‌شود و این تک‌یاخته به عنوان یکی از عوامل مسبب سقط و ناهنجاری‌های جنینی در این حیوان مطرح است (۱۴ و ۲۲).

با توجه به اهمیت این عامل در گاومیش، تاکنون در زمینه ارزیابی روش‌های تشخیصی مرسوم برای آن تحقیقی انجام نگرفته است، لذا این تحقیق به منظور ارزیابی دو کیت الیزا و روش آگلوتیناسیون در تشخیص *نئوسپورا کانینوم* در گاومیش انجام گرفت، ضمناً به تعیین شیوع آلودگی و عوامل میزبانی مؤثر بر آن نیز پرداخته شد.

## مواد و روش کار

در این مطالعه مقطعی با مراجعه تدریجی به کشتارگاه اهواز طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰، نمونه‌ی خون ۱۸۸ رأس گاومیش کشتار شده در کشتارگاه اهواز جمع آوری گردید. خونگیری از ورید وداج با استفاده از ونوجکت صورت گرفت. نمونه‌های خون جهت تشکیل لخته به مدت یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن توسط اپلیکاتور، لخته جدا شده و پس از سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سرم جدا شد و سرم حاصله توسط سمپلر به داخل میکروتیوب‌های شماره گذاری شده انتقال داده شد. پس از اتمام کار، میکروتیوب‌ها به فریز منتقل و تا زمان انجام آزمایش الیزا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ضمناً سن و جنس تمام گاومیش‌های تحت بررسی یادداشت گردید.

جهت تشخیص پادتن ضد *نئوسپورا کانینوم* دو کیت تجاری الیزا ساخت شرکت IDEXX و شرکت ID VET و همچنین از روش NAT استفاده شد. تمام مراحل آزمایش طبق توصیه های شرکت‌های سازنده کیت‌ها و روش معمول انجام NAT، صورت گرفت.

به منظور بررسی توافق بین روش‌های تشخیصی آماره کاپا محاسبه گردید و مقایسه‌ی کیفی و کمی کیت‌های تشخیصی به کمک آزمون مک‌نمار، آزمون t برای دو نمونه‌ی وابسته، تحلیل همبستگی و آزمون کوکران انجام شد. ارتباط فاکتورهای تحت بررسی با آلودگی به کمک رگرسیون لاجستیک و آزمون مربع کای مشخص شد. α=۰/۰۵ مبنای قضاوت آماری لحاظ گردید.

## نتایج

شیوع سرمی *نئوسپورا کانینوم* در کیت الیزای ID VET ۶۶/۴۹ درصد (فاصله اطمینان ۹۵٪ ۷۳/۱۹-۵۹/۷۹ درصد)، در کیت الیزای IDEXX ۵۵/۸۵ درصد (فاصله اطمینان ۹۵٪، ۶۲/۹۵-۴۸/۷۵ درصد) و در روش NAT ۵۶/۹۱ درصد (فاصله اطمینان ۹۵٪، ۶۴/۰۱-۴۹/۸۱ درصد) بود.

آزمون مک‌نمار نشان داد تفاوت معنی‌داری بین دو کیت الیزا وجود دارد (P=۰/۰۱۲) و مقدار آماره کاپا ۰/۳۶ بود (P<۰/۰۰۱) (جدول ۱). در نمودار جعبه و خط شماره ۱ توزیع مقادیر دانسیته نوری در کیت های IDEXX و ID VET ارائه گردیده است. بررسی این نمودار نشان می‌دهد که مقادیر دانسیته نوری در کیت IDEXX به ترتیب در ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد موارد کمتر از ۰/۷۱، ۰/۵۵ و ۰/۲۳ است و در کیت ID VET به ترتیب در ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد موارد کمتر از ۱/۵۴، ۱/۰۷ و ۰/۳۲ است. میانگین و خطای معیار OD در کیت IDEXX ۰/۴۹۴±۰/۰۱۸ و در کیت ID VET ۱/۰۱±۰/۰۴۶ بود که آزمون t برای دو نمونه وابسته نشان داد این اختلاف از نظر آماری معنی دار است (P<۰/۰۰۱). ارتباط مستقیم و ضعیفی بین مقادیر دانسیته‌ی نوری این دو کیت وجود داشت ($r_{sp}$=۰/۲۷ و P<۰/۰۰۱).

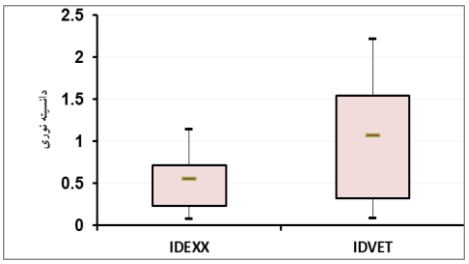
آزمون مک‌نمار نشان داد تفاوت معنی‌داری بین کیت IDEXX و NAT وجود ندارد (P=۰/۸۷) و آماره کاپا بین دو روش تشخیصی ۰/۵۹ بود (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲). آزمون مک‌نمار نشان داد تفاوت معنی‌داری بین دو روش NAT و کیت ID VET وجود دارد (P=۰/۰۳۶) و آماره کاپا بین دو روش ۰/۲۶ بود (P<۰/۰۰۱) (جدول ۳).

در جدول شماره۴ توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی به تفکیک جنس بر اساس کیت IDEXX ارائه گردیده است. شیوع سرمی *نئوسپورا* در جنس نر و ماده‌ی گاومیش به ترتیب ۵۳/۷٪ (۶۵ نمونه از ۱۲۱ نمونه) و ۵۹/۷٪ (۴۰ نمونه از ۶۷ نمونه) بود که این اختلاف‌ها از نظر آماری معنی دار نمی‌باشند (P>۰/۰۵) و شانس ابتلای گاومیش ماده ۱/۲۸ برابر گاومیش نر (فاصله اطمینان ۹۵٪ ۲/۳۴ـ۰/۷) بود.

در جدول شماره ۵ توزیع فراوانی *نئوسپورا کانینوم* به تفکیک سن ارائه گردیده است. فراوانی نسبی آلودگی در گاومیش‌های ۲ ساله و کوچکتر ۵۷/۳٪ (۷۱ نمونه از ۱۲۴ نمونه) و در گاومیش‌های بالای ۲ سال ۵۳/۱٪ (۳۴ نمونه از ۶۴ نمونه) بود. این اختلاف از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد (P>۰/۰۵) و شانس ابتلای گاومیش‌های ۲ ساله و کوچکتر ۱/۱۸ برابر بالای ۲ سال (فاصله اطمینان ۹۵٪ ۲/۱۷-۰/۶۵) بود (P>۰/۰۵).

**جدول ۱- مقایسه کیت الیزا ID VET و IDEXX در تشخیص *نئوسپورا***

| VET ID | IDEXX | | جمع |
|---|---|---|---|
| | مثبت | منفی | |
| مثبت | ۸۶ | ۳۹ | ۱۲۵ |
| منفی | ۱۹ | ۴۴ | ۶۳ |
| جمع | ۱۰۵ | ۸۳ | ۱۸۸ |




**نمودار ۱- مقایسه میانه، چارک اول و سوم دانسیته نوری کیت‌های IDEXX و ID VET**

**جدول ۲- مقایسه روش NAT و کیت IDEXX در تشخیص *نئوسپورا***

| NAT | IDEXX | | جمع |
|---|---|---|---|
| | مثبت | منفی | |
| مثبت | ۸۷ | ۲۰ | ۱۱۷ |
| منفی | ۱۸ | ۶۳ | ۸۱ |
| جمع | ۱۰۵ | ۸۳ | ۱۸۸ |

**جدول ۳- مقایسه کیت ID VET و روش NAT در تشخیص *نئوسپورا***

| NAT | ID VET | | جمع |
|---|---|---|---|
| | مثبت | منفی | |
| مثبت | ۸۳ | ۲۴ | ۱۰۷ |
| منفی | ۴۲ | ۳۹ | ۸۱ |
| جمع | ۱۲۵ | ۶۳ | ۱۸۸ |

**جدول ٤- توزیع فراوانی سرمی موارد مثبت و منفی *نئوسپورا کانینوم* به تفکیک جنس**

| فراوانی / جنس | مثبت | | منفی | | جمع | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی |
| نر | ۶۵ | ۵۳/۷ | ۵۶ | ۴۶/۳ | ۱۲۱ | ۶۴/۳۶ |
| ماده | ۴۰ | ۵۹/۷ | ۲۷ | ۴۰/۳ | ۶۷ | ۳۵/۶۴ |
| جمع | ۱۰۵ | ۵۵/۸۵ | ۸۳ | ۴۴/۱۵ | ۱۸۸ | ۱۰۰ |

## بحث

تشخیص قطعی سقط مرتبط با *نئوسپورا کانینوم* برپایه آزمایش جنین سقط شده، شامل مشاهده ضایعات همراه با ردیابی تک‌یاخته در بافت‌های جنینی به روش ایمونوپراکسیداز و PCR است، البته در بسیاری اوقات جنین سقط شده در دسترس نمی‌باشد و ردیابی آنتی-بادی *ضدنئوسپورا کانینوم* از طریق روش‌های سرولوژی بایستی انجام گیرد تا امکان مواجهه مشخص گردد.

**جدول ۵- توزیع فراوانی سرمی موارد مثبت و منفی *نئوسپورا کانینوم* به تفکیک سن**

| فراوانی / سن | مثبت | | منفی | | جمع | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی |
| ≤۲ | ۷۱ | ۵۷/۳ | ۵۳ | ۴۲/۷ | ۱۲۴ | ۶۵/۹۵ |
| >۲ | ۳۴ | ۵۳/۱ | ۳۰ | ۴۶/۹ | ۶۴ | ۳۴/۰۵ |
| جمع | ۱۰۵ | ۵۵/۸۵ | ۸۳ | ۴۴/۱۵ | ۱۸۸ | ۱۰۰ |

روش‌های سرولوژی متعددی جهت تشخیص در دسترس است، البته تفسیر نتایج به دست آمده از آزمایشگاه های مختلف بایستی با احتیاط انجام شود و به کیفیت روش سرولوژی و نقطه برش به کار گرفته شده توجه گردد. روش‌های سرولوژی این مزیت را دارند که قبل از مرگ دام می‌توان از آنها استفاده کرد و اطلاعات کافی در مورد مرحله آلودگی به دست آورد (۲ و ۳).

Romand و همکاران (۱۹۹۸) و Packham و همکاران (۱۹۹۸) از آزمایش آگلوتیناسیون اصلاح شده (NAT) برای تشخیص آلودگی به این انگل استفاده نمودند. مقایسه نتایج به دست آمده نشان داده است که، حساسیت و ویژگی NAT با IFAT قابل مقایسه است. همچنین انجام آن آسان بوده و یکی از روش‌های ارزان قیمت برای ارزیابی میزان آنتی‌بادی *ضدنئوسپورا کانینوم* در حیوانات است (۲، ۲۱ و ۲۳).

در حال حاضر روش الیزا هم در بررسی‌های تشخیصی و هم در تحقیقات، به علت حساسیت و ویژگی بالای آزمایش، سهولت کار، سریع و ارزان بودن به عنوان روش غالب، جایگزین IFAT شده است و از روش‌های مختلف آن مانند الیزای غیر مستقیم و الیزای رقابتی برای تشخیص آلودگی به این انگل استفاده می‌شود (۲، ۷ و ۱۹).

در مطالعه حاضر ارزیابی دو کیت الیزای تجاری (IDEXX و ID VET) و روش NAT در تشخیص

سرمی *نئوسپورا کانینوم* با استفاده از ۱۸۸ سرم گاومیش که وضعیت مثبت یا منفی آنها مشخص نبود، انجام گرفت. نقطه برش توصیه شده توسط شرکت سازنده به منظور تعیین موارد مثبت و منفی در ۲ کیت الیزا استفاده گردید. شیوع سرمی در کیت الیزای تجاری IDEXX و ID VET و روش NAT به ترتیب ۵۵/۹، ۶۶/۵ و ۵۶/۹ درصد بود که اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) و کیت الیزای ID VET با کیت الیزای IDEXX و روش NAT تفاوت معنی‌داری داشت، اما تفاوت معنی‌داری میان کیت IDEXX و روش NAT مشاهده نگردید. توافق کیت الیزای ID VET با کیت الیزای IDEXX و روش NAT ضعیف بود و مقدار آماره کاپا به ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۲۶ بود اما توافق کیت IDEXX با روش NAT متوسط بود و مقدار آماره کاپا ۰/۵۹ بود. شیوع سرمی *نئوسپورا کانینوم* در گاومیش در چین صفر درصد، مصر ۶۸٪، ایتالیا ۳۴/۶٪، پاکستان ۵۴/۷٪، برزیل ۷۰/۹٪، هند ۹/۹۷٪، ویتنام ۱/۵٪، ایران ۳۷٪ و آرژانتین ۶۴/۹٪ گزارش گردیده است (۵،۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷، ۲۰، ۲۴ و ۲۷). Fujii و همکاران (۲۰۰۱) در جنوب شرقی برزیل شیوع سرمی به روش IFAT و NAT در نمونه‌ی سرم ۲۲۲ رأس گاومیش ماده را به ترتیب ۶۴ درصد و ۵۳ درصد گزارش نمودند (۱۲). Wapenaar و همکاران (۲۰۰۷) روش‌های الیزا، ایمونوبلات، ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و آگلوتیناسیون در تشخیص *نئوسپورا کانینوم* در روباه و کایوت را ارزیابی نمودند و نشان دادند که توافق میان این روش‌ها از ۰/۱۷ تا ۰/۹۷ متغیر است. بیشترین توافق را میان الیزا و ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم و کمترین توافق را میان آگلوتیناسیون و سایر روش‌ها گزارش نمودند (۲۵). Wapenaar و همکاران(۲۰۰۷) ارزیابی ۳ کیت الیزا ( Competitive ELISA-VMRD Inc، Indirect ELISA-Biovet Inc و Indirect ELISA-Herdchek IDEXX Corp)، ۲ روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم ( IFAT VMRD Inc و IFAT in-house USDA) و روش NAT در تشخیص *نئوسپورا کانینوم* در گاو را انجام دادند. آنها روش IFAT VMRD Inc را به عنوان استاندارد طلایی لحاظ نمودند و سایر روش‌های تشخیصی را با آن مقایسه نمودند و نشان دادند که آماره کاپا اصلاح شده برای شیوع و تورش میان این روش‌ها از ۰/۰۶ تا ۰/۹۹ متغیر است. حساسیت تمام روش‌های تشخیصی به غیر از NAT بیش از ۸۹ درصد بود و در این روش ۶۶ درصد بود و ویژگی تمام روش‌های تشخیصی بجز Indirect ELISA-Biovet Inc بیش از ۹۴ درصد، و در این روش ۵۲ درصد بود (۲۶). محمدعلی‌گل (۱۳۸۹) ۱۷۸ نمونه سرم گاو را توسط دو روش الیزای غیر مستقیم و الیزای نقطه‌ای مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند در روش الیزای غیر مستقیم و در روش الیزای نقطه‌ای به ترتیب تعداد ۹۵ (۵۳/۳٪) و ۹۷ رأس گاو مثبت (۵۴/۴٪) از گاوها از نظر آنتی‌بادی ضد*نئوسپورا کانینوم* مثبت هستند. آماره کاپا نشان داد ۲ روش مذکور دارای توافق مناسبی در تشخیص آلودگی بودند و آزمون مک‌نمار نیز نشان داد اختلاف معنی-داری بین ۲ روش تشخیصی وجود ندارد(P>۰/۰۵) (۱). سرم ۲۸۵ گاو نر در اسپانیا توسط Caetano-da-Silvaو همکاران (۲۰۰۴) توسط روش IFAT و ۲ کیت تجاری الیزا مورد بررسی قرار گرفت و نشان دادند شیوع سرمی *نئوسپورا کانینوم* بسته به روش آزمایش استفاده شده بین ۱۱/۲٪ تا ۱۳/۳٪ است. تفاوت معنی-داری بین سن گاوها و میزان آلودگی مشاهده نشد و توافق بسیار خوبی بین روش‌های سرولوژی استفاده شده در این تحقیق وجود داشت (۴).

این بررسی نشان داد که کیت‌های الیزای تجارتی موجود در بازار توافق ضعیفی در ردیابی آنتی‌بادی ضدنئوسپورا دارند لذا توصیه می‌شود در مواقعی که تعیین شیوع بیماری بمنظور تعیین بار آن بر جامعه مدنظر است بایستی به اعتبار کیت تشخیصی توجه جدی شود.

با توجه به میزان بالای آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گاومیش‌های تحت مطالعه و افزایش شیوع آن نسبت به مطالعه Haji Hajikolaei و همکاران (۲۰۰۵) در اهواز و با توجه به باقی ماندن کیست‌های این انگل در بافت‌های میزبان واسط به مدت طولانی و امکان انتقال به نسل‌های بعدی و خسارات اقتصادی قابل توجه‌ای که به دلیل سقط، نازائی و کاهش تولید بر صنعت دامپروری وارد می نماید به نظر می‌رسد که باید به این بیماری توجه جدی نمود و راهکارهای مناسبی را جهت کنترل آن به کار گرفت.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز بخاطر تأمین هزینه اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

۱. محمد علی گل، س. (۱۳۸۹). طراحی روش دات-الیزا جهت تشخیص آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در گاو و مقایسه آن با کیت تجاری الیزا. پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی از دانشگاه شهید چمران اهواز، شماره ۸۹۹۱۱۵.

2. Aguiar, D.M.,Cavalcante, G.T., Rodrigues, A.A.R., Labruna. M.B., Camargo, L.M.A. Camargo, E.P., Gennari, S.M. (2006). Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Veterinary Parasitology* **142**: 71-7.
3. Bjorkman, C., Uggla, A. (1999). Serological diagnosis or *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology* **29**: 1497-507.
4. Caetano-da-Silva, A., Ferre, I., Aduriz, G., Alvarez-Garcia, G., Del-Pozo, I., Atxaerandio, R., Regidor-Cerrillo, J., Ugarte-Garagalza, C., Ortega-Mora, L.M. (2004). *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. *Veterinary Parasitology* **124**:19-24.
5. Campero, C.M., Perez, A., Moore, D.P., Crudeli, G., Benitez, D., Draghi, M.G., Cano, D., Konrad, J.L., Odeon, A.C. (2007). Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four ranches in Corrientes province, Argentina. *Veterinary Parasitology* **150**: 155-8.
6. Dubey, J.P. (1999). Neosporosis-the first decade of research. *International Journal for Parasitology* **29**: 1485-8.
7. Dubey, J.P. (2003). Neosporosis in cattle. *Journal of Parasitology* **89**: 842-56.
8. Dubey, J.P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animal. *The Korean Journal of Parasitology* **41**: 1-16.
9. Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparetive Pathology* **134**: 267-89.
10. 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 Medicine Associations* **193**: 1259-63.
11. Dubey, J.P., Schares, G. (2006). Diagnosis of Bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology* **140**: 1-34.
12. Fujii, T.U., Kasai, N., Nishi, S.M., Dubey, J.P., Gennari, S.M. (2001). Sroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southastern region of Brasil. *Veterinary Parasitology* **99**: 331-4.
13. Gennari, S.M., Rodrigues, A.A.R., Vianna, R.B., Cardoso, E.C. (2005). Occurrence of anti- *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the northern region of Brazil. *Veterinary Parasitology* **134**: 169-71.

14. Guarino, A., Fusco, G., Savini, G., Di Francesco, G., Cringoli, G. (2000). Neosporosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Veterinary Parasitology* **91**: 15-21.
15. Haji Hajikolaei, M.R., Goraninejad, S., Hamidinejat, H., Ghorbanpour, M., Paryab, R. (2007). Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southwestern region of Iran. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **51**: 233-5.
16. Hemphill, A. (1999). *The host parasite relationship in neosporosis.* In: Backer, J.R., Muller, R., and Rollinson, D. (Eds). *Advances in Parasitology.* Vol. 43, Academic Press, London, pp: 47-104.
17. Huong, L.T.T., Ljungstorm, B.L., Uggla, A., Bjorkman, C. (1998). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in Southern Vietnam. *Veterinary Parasitology* **75**: 53-7.
18. Innes, E.A., Wright, S., Bartly, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban, R. I., Buxton, D. (2005). The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **108**: 29-36.
19. Morales, E., Trigo, F.J., Ibarra, F., Puenta, E., Santacruz, M. (2001). Neosporosis in Mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *Journal of Comparative Pathology* **125**: 58-63.
20. Nasir, A., Ashraf, M., Khan, M.S., Yaqub, T., Javeed, A., Avais, M., Akhtar, F. (2011). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy buffaloes in Lahore district, Pakistan. *Journal of Parasitology* **97**: 541-3.
21. Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A. (1998). A modifed agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **5**: 467-73.
22. Rodrigues, A.A.R., Gennary, S.M., Aguiar, D.M., Sreekumar, C., Hill, D.E., Miska, K.B., Vianna, M.C., Dubey, J.P. (2004). Shedding of *Neospora caninum* oocyts by dogs fed tissue from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Veterinary Parasitology* **124**: 139-50.
23. Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J.P. (1998). Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research* **84**: 50-3.
24. Sengupta, P.P., Balumahendiran, M., Raghavendra, A.G., Honnappa, T.G., Gajendragad, M.R., Prabhudas, K. (2012). Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle and water buffaloes and associated abortions in the plateau of Southern Peninsular India. *Journal of Tropical Animal Health and Production* **125**: 192-3.
25. Wapenaar, W., Barkema, H.W., Schares, G., Rouvinen-Watt, K., Zeijlemaker, B., Poorter, B., O'Handley, R., Kwok, O.C.H., Dubey, J.P. (2007). Evaluation of four serological techniques to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*) on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology* **145**: 51-8.
26. Wapenaar, W., Barkema, H.W., VanLeeuwen, J.A., McClure, J.T., Ohandley, R.M., Kwok, O.C.H., Thulliez, P., Dubey, J.P., Jenkins, M.C. (2007). Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Veterinary Parasitology* **143**: 166-73.
27. Yu, J., Xia, Z., Liu, Q., Liu, J., Ding, J., Zhang, W. (2007). Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the people's Republic of China. *Veterinary Parasitology* **143**:79-85.

*Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 1, 2015*

# Comparison of Serological Methods for the Diagnosis of *Neospora caninum* Infection in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*)

***Pourmahdi-Borujeni, M.[1]*, Hamidinejat, H.[1], Ghorbanpour, M.[2], Asefi, H.[3]***

*1- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
*2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
*3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
*4- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

*Received date: 5 October 2013* *Acceptance date: 2 June 2014*

***Abstract:*** *In this study, serum samples from 188 slaughtered water buffaloes were collected from Ahvaz abattoir during 2010-2011. The collected sera were analyzed by two commercial Elisa kits (IDEXX and ID VET) and NAT method. Seroprevalence of N. caninum in commercial kits IDEXX and ID VET and NAT method were 55.9%, 66.5% and 56.9% respectively, which was significantly higher in ID VET Elisa kit in comparison with IDEXX Elisa Kit and NAT method, but there was no significant difference between IDEXX Elisa Kit and NAT method. Agreement between ID VET Elisa kit and IDEXX Elisa kit and NAT method was weak, and Kappa statistic for these associations were 0.36 and 0.26 respectively, but agreement between IDEXX Elisa kit and NAT method was moderate ( Kappa statistic = 0.59). Seroprevalence of neosporosis according to IDEXX Elisa kit in female and male water buffaloes were 59.7% and 53.7% respectively. Seroprevalence of neosporosis in water buffaloes with age of 2 years and lower and with age of more than 2 years were 57.3% and 53.1% respectively. Relationship between age and sex of water buffaloes and infection with N. caninum was not significant (P>0.05).*

***Keywords:*** *Diagnosis, Neospora caninum, Buffalo*

**Corresponding author*: Pourmahdi Borujeni, M.
*Address: Department of food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Tel: 0611-3330073.*
*E-mail: Pourmahdim@gmail.com.*