بررسی میزان شیوع انگل *نئوسپورا کنینوم* در شیر گاوان استان یزد به روش Nested-PCR در تابستان سال ۱۴۰۰

نصیر رفعتی[۱*]، محسن جعفریان[۲]

۱. دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *nasir.rafati@gmail.com*

تاریخ دریافت::۱۴۰۰/۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۶

چکیده

نئوسپوروزیس عامل اصلی سقط جنین گاو در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد که به وسیله تک یاخته انگلی به نام *نئوسپورا کنینوم* ایجاد می‌شود. اثرات اقتصادی نئوسپوروزیس شامل کاهش میزان تولید شیر و گوشت در گاو است. انتقال *نئوسپورا کنینوم* از طریق راه‌های عمودی و افقی امکان پذیر است. هدف از این مطالعه بررسی وجود ژنوم *نئوسپورا کنینوم* در شیر خام گاو با استفاده از روشNested-PCR جهت بررسی انتقال عمودی این انگل بوده است. در این مطالعه ۳۰۰ نمونه شیر خام گاو از گاوداری‌های سنتی استان یزد جمع‌آوری شد. نتایج این مطالعه نشان‌داد که ۵۴ مورد (۱۸ درصد) از ۳۰۰ نمونه شیر گاو به ژنوم *نئوسپورا کنینوم* آلوده بوده‌اند. یافته‌های مطالعه حاضر نشان دهنده حضور از عفونت *نئوسپورا کنینوم* بوده و نشان داد که شیر گاو آلوده نقش مهمی در انتقال نئوسپوروزیس در گوساله‌های تازه متولد شده دارد. بر اساس این یافته‌ها، برنامه‌های کنترلی و ریشه‌کنی از جمله واکسیناسیون جهت جلوگیری و کاهش تلفات اقتصادی این عفونت تک یاخته‌ای در گاو ضروری است.

کلید واژه ها: شیر،گاو شیری، *نئوسپورا کنینوم*، پاتوژن‌های غذایی، Nested-PCR.

مقدمه

نئوسپورا کنینوم یک انگل تک یاخته‌ای و اجباری داخل سلولی و از شاخه اپی‌کمپلکسا است که عامل اصلی سقط جنین در گاوهای شیری محسوب می‌شود. نئوسپوروزیس در بسیاری از نقاط جهان از جمله آمریکای شمالی، مکزیک، اروپا، آسیا، آفریقا، استرالیا و آمریکای جنوبی شناسایی شده است (Asmarea et al., 2014; Medina et al, 2006). این انگل می‌تواند بسیاری از گونه‌های پستانداران را در سراسر جهان از جمله سگ، گربه، گاو، گوسفند، اسب، موش، روباه، بز، لاما، آهو، شتر و سایر حیوانات را آلوده کند (Bassoa et al., 2014; Moskwa and Cabaj, 2007). نئوسپورا کنینوم دارای یک چرخه حیات دو میزبانی است که در آن سگ و کایوت میزبانان نهایی هستند. طیف وسیعی از حیوانات خونگرم نیز به عنوان میزبان واسط شناسایی شده‌اند(Dubey et al., 2014; Goodswen et al., 2013). این انگل می‌تواند به صورت افقی و عمودی منتقل شود. انتقال افقی زمانی اتفاق می‌افتد که گاوها اووسیست‌های این انگل را می‌بلعند. انتقال عمودی، به عنوان انتقال مادرزادی مطرح می‌شود، که در زمان آبستنی از گاو آلوده به گوساله منتقل می‌شود (Bacigalupe et al., 2013; Marques et al., 2011; Magalhães et al., 2014). مطالعه انجام شده توسط موسکوا و کاباج در سال ۲۰۰۷ نشان داد که ژنوم نئوسپورا کنینوم در شیر گاوهایی که از لحاظ سرولوژی مثبت بوده، وجود دارد و این یافته احتمال انتقال نئوسپورا کنینوم از طریق شیر یا اغوز را تایید می‌کند (Moskwa and Cabaj, 2007). یکی از آزمایش‌های تشخیص سریع،

روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای‌پلیمراز(PCR) است که برای تشخیص نئوسپورا کنینوم استفاده می‌شود. PCR یک آزمایش حساس و اختصاصی را برای حضور ژنوم نئوسپورا کنینوم در نمونه‌های بافتی، خون و شیر فراهم می‌کند(Borel et al., 2014; Okeoma et al., 2004). شیر نقش مهمی در انتقال نئوسپوروزیز در گوساله تازه متولد شده دارد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژنوم نئوسپورا کنینوم در شیر برای شناسایی یکی از راه‌های مهم انتقال این انگل در گاوداری‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌کار

در این تحقیق توصیفی مقطعی که در تابستان سال ۱۴۰۰ در استان یزد انجام شد، در مجموع ۳۰۰ نمونه شیر از گاوداری‌های سنتی (جدول ۱) جمع آوری شد. نمونه‌ها از گاوانی که درابتدای شیرواری بوده و از گاوان تازه‌زا نیز آغوز به مقدار ۱۰ سی‌سی به روش خوشه‌ای اخذ گردید. نمونه‌ها در شرایط استریل جمع آوری شده و بلافاصله در دمای۴- درجه سلسیوس به همراه بستههای یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. تمام نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا انجام فرایند آزمایش نگهداری شدند.

جدول ۱- توزیع فراوانی مناطق آلوده به ژنوم نئوسپورا کنینوم در استان یزد

شهرستان	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت
اردکان	۸۲	۱۱
میبد	۳۳	۵
خاتم	۳۶	۵
ابرکوه	۳۸	۷
اشکذر	۳۰	۹
بهاباد	۲۸	۹
بافق	۲۴	۵
تفت	۳۱	۶
جمع	۳۰۰	۵۴(۱۸٪)

به منظور استخراج DNA ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه شیر با ۱۰۰میکرولیتر پروتئاز بافر، با ۵ میکرولیتر آنزیم پروتئاز داخل تیوپهای۱/۵ میلی لیتری سانتریفیوژ مخلوط و به مدت۳-۱ ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۳-۱ ساعت در دمای۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. به تیوپ ها ۴۰۰ میکرولیتر Lysis solution اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به آنها ۳۰۰ میکرولیترPrecipitation solution اضافه و پس از ۵ ثانیه ورتکس شدن، تیوپها به مدت ۱۰ دقیقه در۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از آن محتویات تیوپها را خالی نموده و ۱۰۰۰ میکرولیت wash buffer به آنها اضافه شد و پس از ۳-۵ ثانیه ورتکس کردن، تیوپها را در ۵ دقیقه در۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و نهایتا به محتویات قبلی اضافه شدند. محتویات داخل تیوپ ها به مدت ۵ دقیقه در۶۵ درجه سلسیوس خشک و با ۵۰ میکرولیتر از Solven buffer مخلوط شده و به آرامی تکان داده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس محتویات دیواره تیوپ ها مخلوط شده و به مدت ۳۰ ثانیه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند که در نهایت استخراج DNA صورت گرفت.

برای اجرایPCR از پرایمرهای اختصاصی نئوسپورا با توالی های جدول ۱ استفاده شد. انجام واکنش PCR از دستگاه (Mastercycler Gradient) ساخت شرکت(Ependorf، آلمان) استفاده شد و واکنشPCR در حجم

نهایی ۲۵ میکرو لیتر واجد ۲۰ نانو گرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq و ۲۰۰ میکرومولار Mix dNTPS انجام گرفت. در هر واکنش از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و برای کنترل مثبت از نمونه ی استاندارد نئوسپورا کنینوم AF340224 استفاده شد. شرایط دمایی برای تکثیر ژن شامل یک سیکل حرارتی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. دو میکرولیتر ازمحصول PCR دور اول به عنوان یک الگو برای دور دوم PCR مورد استفاده قرار گرفت. که با نسبت ۱ به صد رقیق می گردد. دور دوم PCR با پرایمرهای های قبلی الیگونوکلئوتید برای ۲۵ چرخه با همان غلظت از معرف ها و وضعیت دمای انجام شد(Rafati and Jaafarian, 2014) پرایمرهای بکار رفته برای تعیین توالی ژن ITS1همان پرایمرهایPCR بودند. توالی‌ها با اطلاعات نوکلئوتیدی نئوسپورا کنینوم های تعیین توالی شده براساس ITS1که در سایت (http://www. ncbi.nlm.nih.gov/BLASTNCBI) دردسترس می‌باشند، مقایسه و بلاست شدند. محصولاتPCR به دست آمده به میزان مساوی ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز و از ژل حاصله تصویربرداری و ثبت گردید. DNA ladder ۱۰۰ جفت باز (ساخت شرکت Fermentaz آلمان) برای تعیین طول قطعه تکثیر شده به عنوان یک مارکر وزن مولکولی مورد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزارSPSS نسخه۲۱ انجام گرفت. در این آنالیز آماری درجه معنی داری با میزان-*p* value کمتر از۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

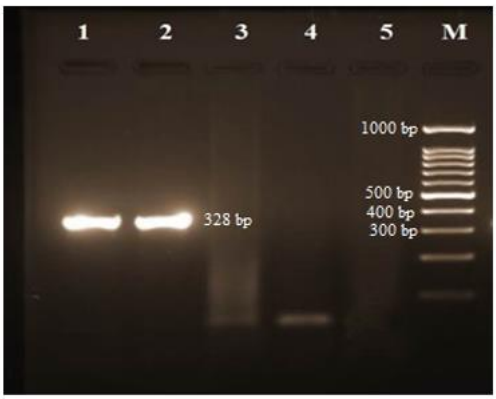
جدول۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای شناسایی نئوسپورا کنینوم

هدف (ژن)	اندازه قطعه	توالی پرایمر	
		NF1	5'-GTCCCTCGTGGACCC-3'
ITS1	۳۲۸	NS2	5'-CATGTGGATATTTTGCA-3'
		NR1	5'-AAACTCCTGGAAGTTAAAG-3'
		SR1	5'-AACCTCTCTCAGAGATCG-3'

نتایج

تعداد ۳۰۰ نمونه شیر اخذ شده از گاوداری‌های سنتی استان یزد به منظور ارزیابی آلودگی به نئوسپورا کنینوم با هدف ردیابی ژن ITS1 در نمونه ها به روش Nested-PCR بررسی شدند که از این تعداد، ۵۴ مورد (۱۸ درصد) واجد قطعه ژنی مربوطه بودند.

ژل حاصل از الکتروفورز ژن ITS1 نئوسپورا کنینوم در شکل ۱ نشان داده شده است که نمونه های مثبت واجد باند ۳۲۸ جفت بازی را نشان می‌دهد.



شکل۱- الکتروفورز ژل آگارز به منظور تشخیص عفونت *نئوسپورا کنینوم* در نمونه‌های شیر. ستون M، ladder(۱۰۰ جفت باز، ساخت شرکت فرمنتاز آلمان)، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون۲ نمونه مثبت، ستون‌های ۳،۴،۵ نمونه‌های منفی

بحث

خسارت اقتصادی سالیانه ناشی از آلودگی به نئوسپورا کنینوم در صنعت گاوداری در سرتاسر جهان ۱ بیلیون دلار از نظر گوساله‌زایی و کاهش میزان تولید شیر تخمین زده شده که از این رقم حدود۸۰۰ میلیون دلار مربوط به ضرر گاوداری‌های شیری می‌باشد (Hemphill and Gottstein, 2006). بیشتر مطالعات انجام گرفته در ایران به منظور بررسی میزان آلودگی به نئوسپورا کنینوم در گاوها مبتنی بر جستجوی آنتی بادی‌های ضد انگل در سرم خون بوده و مطالعات محدودی روی شیر انجام شده است (Hadadi et al., 2018). هدف از این مطالعه شناسایی آلودگی شیرهای خام به نئوسپورا کنینوم بود. در مطالعه حاضر که احتمالاً جزء اولین گزارشات آلودگی شیر خام گاو ها به روش ملکولی در استان یزد بوده است، مشخص گردید که می‌توان از روش واکنش زنجیره¬ای پلی مراز به عنوان یک روش سریع و با دقت بالا در شناسایی این تک یاخته در شیر استفاده کرد. همچنین میزان آلودگی شیر های خام برابر ۱۸ درصد بود که متعاقب آن می توان گفت جمعیت گاوهای شیری آلودگی نسبتاً بالایی به نئوسپورا کنینوم داشتند. آگاهی داشتن از میزان شیوع نئوسپوروزیس درجمعیت‌های دامی می‌تواند کمک کننده در مبارزه با عوامل بیماری زا و ریشه کنی بیماری‌ها باشد که برای رسیدن به این منظور طی کردن مراحل شناسایی و درمان ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از شیرخام برای ردیابی و شناسایی نئوسپورا کنینوم در گاوداری‌ها، این امکان را به ما می‌دهد که اولا گاوهای مبتلا به نئوسپورا کنینوم را شناسایی و ثانیاً از انتقال آلودگی به گوساله‌ها جلوگیری به عمل آورد. این تک یاخته در انسان نیز می تواند آلودگی نئوسپوروزیس را ایجاد کند. در مطالعات گذشته یکی از مهمترین مواد غذایی انتقال دهنده این تک یاخته به انسان را شیر خام و شیر های آلوده شده در مراکز جمع آوری شیر دانسته اند (Moskwa and Cabaj, 2007). اگر چه که هنوز اطلاعات زیادی در مورد نئوسپوروزیس در انسان در جهان گزارش نشده است ولی نتایج نشان داده‌اند که پریماتها به غیر از انسان (میمون رزوس) حساس به نئوسپورا کنینوم بوده‌اند (Barr et al., 1994). در مطالعات دیگری درکشور کره جنوبی از ۱۷۲ نفر ۶/۷ درصد(Nam et al, 1998)، ایرلند شمالی از ۲۴۷ نفر۸ درصد(Graham et al., 1992) و در آمریکا از ۱۰۲۹ نفر ۶/۷ درصد از نظر سرولوژیکی آلودگی نسبت به *نئوسپورا کنینوم* را نشان دادند(Tranas et al., 1992). در مطالعات مشابه گذشته نشان داده اند که شیر خام و آغوزگاوهایی که از نظر سرولوژیکی آلودگی به *نئوسپورا کنینوم* بوده‌اند حاوی

DNAتک یاخته می‌باشند (Moskwa and Cabaj, 2007). در مطالعه دیگری برای اولین بار *نئوسپورا کنینوم* را به روش ملکولی در خرس قهوه‌ای اروپایی نشان دادند(Čobádiová et al., 2013). در مطالعات مشابه دیگر شناسایی آنتی بادی های علیه *نئوسپورا کنینوم* به روش الایزا در گوزن شمالی۲/۷درصد و به روش PCR ۲ درصد نمونه‌ها مثبت گزارش گردید(De et al., 2011). هورکووا و همکاران با بررسی شیر ۱۹۳ گاوداری به روش الایزا، شیرهای ۳ گاوداری دارای آنتی بادی مثبت به این انگل بوده‌اند(Hurkova et al., 2005). در مطالعه دیگری در مصر ۷/۹۲ درصد انسان‌ها و ۲۰/۳ درصد گاوها آنتی بادی ضد *نئوسپورا کنینوم* را داشتند(Ibrahim et al., 2009). در بررسی دیگری آلودگی سرولوژیکی گاوهای شیری در شهر تبریز را ۱۰/۵ درصد گزارش نمودند(Nematollahi et al., 2011). در مطالعه دیگری توسط رفعتی و جعفریان آلودگی جنین‌های سقط شده گاو به *نئوسپورا کنینوم* را به روش Nested PCR، ۱۱درصد گزارش کردند(Rafati and Jaafarian, 2014).در مطالعه دیگری توسط دوستی و همکاران آلودگی مایع منی منجمد شده گاوها در ایران را ۱۰/۵۳درصد گزارش کردند(Doosti et al., 2015). در مطالعه حاضر میزان آلودگی شیرهای خام ۱۸ درصد بود. بر اساس گزارش‌ها، مشخص شده که بین سن و سقط جنین در دام ها ارتباط وجود دارد بیشترین میزان سقط جنین در دام‌ها در بین سال‌های ۴ تا ۶ سالگی صورت می‌گیرد (Nematollahi et al., 2011). همچنین سقط در گاوها معمولاً پس از ۳ ماهگی آبستنی صورت می‌گیرد (Dubey., 2003). عوامل زیادی در گسترش وسیع این تک یاخته اثر گذار است از جمله اکوسیستم، دما و تراکم جمعیتی حیوانات میزبان می باشد. از مهمترین روش انتقال تک یاخته در بین گاوداری‌های گوشتی و شیری عمدتاً روش عمودی بوده است (Reiterová et al., 2009). گزارشات گذشته نشان داده است که وجود تاکی زوآینت های موجود در شیر خام می‌تواند سبب آلودگی گوساله‌های تازه متولد شده شود. با این حال استفاده گوساله‌ها از شیر گاوهایی که آلودگی سرولوژیکی به این تک‌یاخته نداشتند، سبب جلوگیری از آلودگی نئوسپوروزیس در گوساله‌ها شده است (Davison et al., 2001). در یک مطالعه‌ای نیز استفاده از آغوز را به عنوان یک فاکتور بالقوه در انتقال بیماری گزارش کرده‌اند (Corbellini et al., 2006). نئوسپوروزیس در گله‌های شیری کالیفرنیای آمریکا سبب شده است که در گاوهایی که از نظر سرولوژیکی مثبت بوده‌اند تولید شیری حدود یک کیلوگرم کمتر نسبت به گاوهای سالم داشته باشند (Dubey., 2007). در بررسی دیگری کاهش ۳ تا ۴ درصدی تولید شیر گزارش کرده اند (Hernandez et al., 2001). در بررسی بارتلز و همکاران در گاوهایی که از نظر سرولوژیکی نسبت به *نئوسپورا کنینوم* مثبت بودند، بیشترین کاهش تولید شیر را در ۱۰۰ روز اول شیرواری، یکسال پس از اپیدمی سقط در گله مشاهده کردند. البته هنوز پاتوفیزیولوژی اثر *نئوسپورا کنینوم* در کاهش تولید شیر مشخص نشده است (Bartels et al., 2006).

نتیجه گیری کلی

با توجه به آمارهای ارائه شده در این مقالات، گسترش و شیوع این انگل رقم بالایی را به خود اختصاص داده و نشان دهنده گسترش و شیوع گسترده این انگل می‌باشد. بنابراین با توجه حالت زئونوتیک بودن، افزایش سقط جنین و کاهش تولید شیر که از جمله معضلات گاوداری‌های صنعتی و سنتی می باشد و از طرف دیگرتولید فراورده های سنتی شیر از جمله تولید پنیرهای محلی حاصل از شیر خام و اهمیت آن در بهداشت مواد غذایی لذا اجرای دقیق برنامه‌های کنترلی و سیاست‌های پیشگیرانه لازم و ضروری می باشد.

منابع

1. Asmarea K., Skjerveb E., Bekelea J., and Sheferawa D. 2014. Molecular identification of Neospora caninum from calf/foetal brain tissue and among oocysts recovered from faeces of naturally infected dogs in southern Ethiopia. Acta Trop. 130 (1): 88-93.

2. Bacigalupe D., Basso W., Caspe S.G., Moré G., and Lischinsky L. 2013. Neospora caninum NC-6 Argentina induces fetopathy in both serologically positive and negative experimentally inoculated pregnant dams. ParRes. 112(3): 2585-92.
3. Barr B.C., Conrad PA., Sverlow KW., Tarantal AF., and Hendrickx AG. 1994. Experimental fetal and transplacental Neospora infection in the nonhuman primate. Lab Invest. 71(2): 236-242.
4. Bartels C.J.M., van Schaik G., Veldhuisen J.P., van den Borne B.H.P., Wouda W., and Dijkstra T. 2006. Effect of Neospora caninum-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of Neospora caninum associated abortion epidemics. Prev. Vet. Med. 77:186–198.
5. Bassoa W., Moréb G., Quirogad M.A., and Balducchie D. 2014. Neospora caninum is a cause of perinatal mortality in axis deer (Axis axis). VETPAR. 199(5): 255-258.
6. Borel N., Frey C., Gottstein B., and Hilbe M. 2014. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. VETPAR. 200(2): 218-229.
7. Čobádiová A., Víchová B., Majláthová V., and Reiterová K. 2013. First molecular detection of Neospora caninum in European brown bear (Ursus arctos). Vet Parasitol. 197(1): 346-349.
8. Corbellini L.G., Smith D.R., Pescador C.A., Schmitz M., Correa A., Steffen D.J., and Driemeier D. 2006. Herd-level risk factors for Neospora caninum seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. Prev Vet Med. 74:130–141.
9. Davison H.C., Guy C.S., McGarry J.W., Guy F., Williams D.J.L., Kelly. D.F., and Trees A.J. 2001. Experimental studies on the transmission of Neospora caninum between cattle. Res Vet Sci. 70:163–168.
10. De Craeye S., Speybroeck N., Ajzenberg D., Dardé M.L., Collinet F., and Tavernier P. 2011. Toxoplasma gondii and Neospora caninum in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae. Vet Parasitol. 178(1): 64-69.
11. Doosti A., Khamesipour F., Nekoei S., and Lutvikadic I. 2015. Survey for the presence of Neospora caninum in frozen bull's semen samples by PCR assay. Asian Pac J Trop Dis. 5(1): 7-12.
12. Dubey J. P., Lindsay D.S., and Speer C.A. 1998. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology of tissue cysts. Clin. Micro.Rev. 11(2): 267-299.
13. Dubey J.P., Jenkinsa M.C., Ferreiraa L.R., and Choudharya S. 2014. Isolation of viable Neospora caninum from brains of wild gray wolves (Canis lupus). VETPAR. 201(1-2): 150-153.
14. Dubey J.P. 2003. Neosporosis in cattle. J Parasitol. 89: 42-56.
15. Dubey J.P., Schares G., and Ortega-Mora L.M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum. Clin Microbiol Rev. 20(2): 323-67.
16. Goodswen Stephen J., Kennedy Paul J., and Ellis John T. 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of Neospora caninum. VETPAR. 13(4): 133-150.
17. Graham D.A., Calvert V., Whyte M., and Marks J. 1999. Absence of serological evidence for human Neospora caninum infection. Vet Rec. 144(24): 672-673.
18. Hadadi M., Sherafati R., Delavari M., Arbabi M., Gilasi H.R., and Abed A. 2018. Evaluation of anti-Neospora caninum antibody presence in cow's milk in Kashan. Journal of Kashan University of Medical Sciences. 22(3): 333-338.
19. Hemphill A., and Gottstein B. 2006. Neospora caninum and neosporosisrecent achievements in host and parasite cell

biology andtreatment. Acta Parasitol. 51(1): 15-25.
20. Hernandez J., Risco C., and Donovan A. 2001. Association between exposure to Neospora caninum and milk production in dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 219: 632–635.
21. Ibrahim H.M., Huang P., Salem T.A., Talaat R.M., Nasr M.I., Xuan X., and Nishikawa Y. 2009. Prevalence of Neospora caninum and Toxoplasma gondii antibodies in northern Egypt. Am J Trop Med Hyg. 80(2): 263-267.
22. Hurkova L., Halova D., and Modry D. 2005. The prevalence of Neospora caninum antibodies in bulk milk of dairy herds in the Czech Republic: a case report. Vet. Med – Czech. 50(12): 549-552.
23. Magalhães Vanessa C., Oliveira U., Lopo C., Sonia C. 2014. Transmission paths of Neospora caninum in a dairy herd ofcrossbred cattle in the northeast of Brazil. VETPAR. 202(3-4): 257-264.
24. Marques F.A., Headley A.S., Figueredo V., Taroda A., and Barros L.D. 2011. Neospora caninum: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (Bos indicus). ParRes. 108(4): 1015-19.
25. Medina L., Cruz-Va´zquez C., Quezada E., Morales T., and Garcı´a-Va´zquez Z. 2006. Survey of Neospora caninum infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. VETPAR. 136(3-4): 187-191.
26. Moskwa B., and Cabaj W. 2007. The role of the colostrum and milk in Neospora caninum transmission. Helminthologia. 44(3): 126 – 129.
27. Nam H.W., Kang S.W., and Choi W.Y. 1998. Antibody reaction of human anti-Toxoplasma gondii positive and negative sera with Neospora caninum antigens. Korean J Parasitol. 36(4): 269-275.
28. Nematollahi A., Jaafari R., and Moghaddam G. 2011. Seroprevalence of Neospora caninum infection in dairy cattle in Tabriz. Northwest Iran. Iran J Parasitol. 6(4): 95.
29. Okeoma C.M., Williamson N.B., Pomroy W.E., Stowell K.M. 2004. The use of PCR to detect Neospora caninum DNA in the blood of naturally infected cows. VETPAR. 122(4): 307-315.
30. Rafati N., and Jaafarian M. 2014. The determination of prevalence of Neospora caninum in aborted fetuses in dairy cattle of Shahrekord area, Chahar Mahal Bakhtiari province, by Nested-PCR. Journal of Veterinary Laboratory Research. 6(1): 45-50.
31. Reiterová K., Špilovská S., Antolová D., Dubinský P. 2009. Neospora caninum, potential cause of abortions in dairy cows: the current serological follow-up in Slovakia. Vet Parasitol. 159(1): 1-6.
32. Salehi N., Haddadzadeh H.R., Shayan P., Vodjgani M., and Bolourchi M. 2010. Serological study of Neospora caninum in pregnant dairy cattle in Tehran, Iran. Int.J.Vet.Res. 4(2): 113-116.
33. Tranas J., Heinzen R.A., Weiss L.M., McAllister M.M. 1999. Serological evidence of human infection with the protozoan Neospora caninum. Clin Diagn Lab Immun. 6(5): 765-767.
34. Uggla A., Stenlud S., Holmadahl O.J.M., Jakubek E.B., Thebo P., and Kindahl H. 1998. Oral Neospora caninum inoculation of neonatal calves. Int. J.Parasitol. 28(5):1467-72.
35. Yamage M., Flechtner O., and 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). J. Parasitol. 82(2): 272-279.

The determination of prevalence of *Neospora caninum* in cow's milk in Yazd Province by Nested-PCR assay in summer 2021

Rafati N[1], Jafarian M[*2]

1. Graduated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Department of 2.Clinical Phatology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

[*]**corresponding author**: *nasir.rafati@gmail.com*

Received: 24 December 2021 Accepted: 05 April 2022

Abstract

Neosporosis, which is caused by a parasitic protozoan *Neospora caninum* is the main cause of abortion in cattle in Iran and other parts of the world. The economic effects of Neosporosis have reduced milk and meat production in cattle. Transmission of *N.caninum* is through vertical and horizontal routes. Some studies have been conducted on the importance of vertical transmission during infancy, through colostrum and milk. Most studies in Iran to investigate the incidence of *N.caninum* in cattle are based on the search for anti-parasitic antibodies in the blood serum and limited studies have been performed on milk. The aim of this study was to investigate the presence of *N.caninum* in raw cow milk using PCR method to evaluate the vertical transmission of this parasite. In this study, 300 samples of raw cow's milk were collected from traditional farms in Yazd Province. The results of this study showed that 54 cases (18%) of 300 samples of cow milk were infected with *N.caninum* genome. The findings of the present study indicated the high presence of *N.caninum* infection and showed that infected cow's milk plays an important role in the transmission of Neosporosis in newborn calves. Based on these findings, control and eradication programs, including vaccination, are necessary to prevent and reduce the economic losses of this protozoan infection in cattle.

Key words: milk, cow milk, *N.caninum*, Foodborne pathogens, Nested-PCR.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.