عزل وتشخيص جزيئة الدنا للبوغة الجديدة الكلبية من الأبقار في سوريا

تم جمع أعضاء(دماغ، قلب، عضلات هيكلية) من ٢٥ جنينا مجهضا و ١٤ عجلا إضافة إلى جمع عينات دم من العجول، و ٣٩ عينة دم ومشيمة من أبقار مجهضة ، وذلك بهدف عزل طفيلي البوغة الجديدة الكلبية على خلايا الزرع الخلوي والكشف عن ذراري البوغة الجديدة الكلبية من خلال تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي ، وباستخدام ٣ أزواج من المشرعات للذراري ، حيث تبين من خلال تنمية العينات على خلايا الزرع الخلوي ظهور تأثيرات مرضية خلوية تتمثل بظهور فجوات، تمزق الخلايا وظهور الحيوانات التسرعية ، حيث كانت متباينة الشدة بين الأعضاء وبعدد التمريرات.وعند إجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي على قوالب جزيئه الدنا المستخلصة من المزارع الخلوية التي أظهرت نموا للطفيلي تبين وجود منحنيات تألق إيجابية ازدادت تدريجيا للعينات الايجابية ، حيث تبين أن أعلى نسبة للإصابة في المزارع الخلوية المأخوذة من الأدمغة والعضلات الهيكلية للأجنة المجهضة والقلب والعضلات الهيكلية للعجول ، بينما أظهرت عينات المشيمة للأبقار المجهضة التي تم إنماءها على المزارع الخلوية نسبة اقل مما هو عليه الحال من عينات الدم. وتباينت العلاقة ما بين العلامات المرضية الظاهرة على الحيوانات المصابة ونسبة الإصابة بالطفيلي ، بينت نتائج فحص الدنا للطفيلي للكشف عن ذراري البوغة الجديدة الكلبية، إن نسبة إصابة بالذراري متباينة حسب نوع الذرية ونوع العضو الذي تم عزل الطفيلي فيه.

الكلمات المفتاحية: البوغة الجديدة الكلبية –خلايا كلية اجنة القرود الافريقية الخضراء–التأثير المرضي الخلوي–تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي–ذراري–الدنا.

وردللنشر : قبل للنشر

المقدمة Introduction

تعد البوغة الجديدة الكلبية من الأكريات الطفيلية Coccidian parasite ، عرف الطفيلي لأول مرة في عام ١٩٨٤ م في النرويج في الكلاب صغيرة العمر من نوع Boxer dog، تعاني من علامات التهاب الدماغ Encephalomyelitis والتهاب العضلات Myositis والعرج Lameness (Bjerkas *et al.*,1984) ، ومن الجدير بالذكر بأنه وجد منذ عام ١٩٨٨ م أن للطفيلي علاقة وطيدة بالمشاكل التناسلية في الأبقار فضلا عن تسببه في ظهور أعراضا" عصبية في العجول المولودة حديثا(Jessica *et al.*,2011) ، وتتعلق هذه الأعراض بغزو الحيوانات النسرعية للطفيلي Tachyzoitesلأنسجة الأم والجنين ،حيث وجدت في أنسجة مختلفة في جسم الثوي خلال الطور الحاد للمرض بينما وجدت الأكياس النسجية Tissue cyst في الطورين الحاد والمزمن وخصوصا في الدماغ(Timothy *et al.*,1999) ، ويعد تشخيص طفيلي البوغة الجديدة الكلبية صعبا" نظرا"

لعدم وجود أعراضا" مرضية متخصصة في الأبقار وكذلك عدم وجود اختبارات طفيلية تشخيصية لها القدرة لتمييزها، (Habibi *et al.*,2005).

ويعتمد تشخيص البوغة الجديدة الكلبية على عده جوانب منها، التقصي عن الأضداد المتخصصة للطفيلي في مصول الحيوانات المصابة من خلال عدة اختبارات مصلية (Dubey *et al.*,2007)،أو من خلال الكشف عن الطفيلي زرعيا" بإنماء الطفيلي على خلايا الزرع الخلوي وذلك نظرا" لقدرة الحيوانات التسرعية على النمو على عدة أنواع من خلايا الزرع الخلوي منها(خلايا كلية أجنة القرود الإفريقية الخضراء ، خلايا بطانة الشريان الرئوي والخلايا وحيدة النواة للأبقار) ، حيث تستخدم هذه الخلايا بصورة واسعة في تنمية الحيوانات التسرعية وذلك بغرض إكثار أعدادها ، ودراسة البنية المستدقة ، والدراسات الجزيئية والمستضدية ، ودراسة قدرة وحيوية الحيوانات التسرعية على الالتصاق على الخلايا وآلية ذلك ، ومن ثم تحقيق الهدف الرئيسي ألا وهو تشخيص الطفيلي (Katarina *et al.*,2011) ، لذلك اتجهت الأبحاث في السنوات الماضية إلى تقنية متقدمة تهدف إلى الكشف عن الدنا للطفيلي من خلال تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز Polymerase Chain Reaction(PCR) ، حيث تعتبر طريقة حساسة للكشف ، وذلك من خلال تضخيم لمورث محدد للطفيلي ومن ثم تحديده (Norbert *et al.*,2002) ، حيث يعد المورث Nc5 أكثرها شيوعا ، وتتمتع هذه التقنية بميزات عديدة منها الحساسية العالية ، الدقة ، الكشف عن الطفيلي حتى لو كان بأعداد قليلة ،هذا بالإضافة للكشف عن الطفيلي في المزارع الخلوية ، وأنسجة الجنين وألام، والسوائل الجنينية ، والكشف عن الدنا للحيوانات التسرعية ،والحيوانات البطيئة Bradyzoites والكيسة البيضية oocyst، وكذلك القدرة عن الكشف عن الطفيلي في أنوياء متعددة لتشمل الحيوانات المختبرية أيضا(Esther *et al.*,2002) ، وطورت هذه التقنية لتشمل أنواعا دقيقة جدا مثل (ذات الوقت الحقيقي Real Time ،المتداخل Nested ، نصف المتداخل Seminested ، الكمي التنافسي Quantitive –Competitive والنوع التقليدي للتقنية(Classic PCR) والتي لها فوائد أخرى منها تشخيص الذراري المتعددة للطفيلي من خلال استخدام أنواع متخصصة لكل ذرية من المشرعات Primers(Salehi *et al.*,2009).

ولعدم وجود دراسة إلى هذا الوقت تتضمن الكشف عن الطفيلي وذراريه في سوريا فقد أنجزت هذه الدراسة لأول مرة في سوريا وذلك لتحقيق الأهداف التالية:

١- عزل طفيلي البوغة الجديدة الكلبية من أنسجة الأبقار،العجول والأجنة المجهضة على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الإفريقية الخضراء .

٢-الكشف عن ذراري البوغة الجديدة الكلبية من خلال تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقيReal Time PCR.

طرائق ومواد البحث Material and Methods

١-جمع العينات:

تم جمع عينات من ٢٥ جنينا مجهضا وبأعمار مختلفة، فضلا عن جمع عينات من ١٤ عجلا ولدت ضعيفة ويعاني البعض منها من أعراض عصبية وعدم القدرة على الوقوف، حيث جمعت العينات بعد نفوق العجول إضافة إلى جمع المشيمة وعينات الدم من ٣٩ بقرة تعاني من الإجهاض وبفترات حمل مختلفة .

وضع الدم في أنابيب اختبار حاوية على مانع تخثر (هيبارين) أضيف لها حجم مماثل من الفايكول ومن ثم وضعت في جهاز المثقلة ٢٠٠٠ دورة /دقيقة ، ٤ م ه ، ١٠ دقائق سحبت طبقة الخلايا اللمفاوية(Buffy Coat) وحفظت في ٤ م ه لحين إجراء إنماء الطفيلي، وتم إجراء الصفة التشريحية على الأجنة المجهضة والعجول النافقة باستخدام أدوات جراحية معقمة واخذ منها الدماغ ، أجزاء من العضلات الهيكلية والقلب بالإضافة إلى أجزاء من المشيمة من الأبقار، وقد وضعت أجزاء من هذه الأعضاء في قوارير معقمة معدة مسبقا لهذا الغرض حيث تكون حاوية على محلول دارئة الفوسفات(PBS) متعادل والحاوي على ١٠٠ وحدة دولية / ١ مليلتر من البنسلين ج (Penicillin G) ، سلفات الستربتومايسين بمقدار ٥٠ مايكروغرام/ ١ مليلتر (Streptomycin Sulfate) وسلفات الجنتاميسين (Gentamicine Sulfate) بمقدار ٥٠ ملغم/ ١ لتر وصادات فطور متمثلة لمفوتريسين ب (Amphotericin B) بمقدار ٢,٥ ملغم/ ١ لتر وذلك لغرض عزل الطفيلي على خلايا الزرع الخلوي (Masumi *et al.*,2000).

٢-عزل الطفيلي:

تم أخذ ٢٠ غراما" من الأعضاء المضاف إليها محلول داريء الفوسفات الحاوية على الصادات الحيوية كل عضو على حده ، وقطعت في هاون خزفي معقم إلى قطع صغيرة باستخدام مقص جراحي معقم، ونقلت العينة بعد ذلك إلى حوجلة الهضم بالتربسين (Trypsinized Flask) ، ووضع معها قطعة من مغناطيس معقم ومن ثم أضيف إليها ٤٠ مليلتر من محلول دارئة حاوي على ٠,٢٥% ترسين و ٠,٠٢٥ % من ملح EDTA (Ethylene Diamin Tetraacetic Acid) ،حيث حضنت بدرجة ٣٧م ه لمدة ٤٥ دقيقة مع التحريك المستمر باستخدام جهاز المزج المغناطيسي ، ثم وضع المزيج في أنابيب معقمة ووضعت في جهاز المثقلة المبردة (٤ م ه) ٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق ، وتم التخلص من الرائح ، ثم أضيف ١٠ مليلتر من الوسط الزرعي للنمو MEM (Minimal Essential Media) ،إلى الراسب وتم مزجهما جيدا ومن ثم وضع المزيج في جهاز المثقلة، تم تكرار هذه العملية ثلاث مرات لغرض غسل الراسب ومن ثم علق هذا الراسب في ١٠ مليلتر من الوسط الزرعي للنمو MEM ليحفظ في درجة حرارة ٤ م ه لحين إجراء الإنماء على خلايا الزرع الخلوي(Nathalie ,2003).

٣-إنماء الطفيلي:

تم إتباع طريقة (Yamane *et al* .,1997) ، حيث تم مزج العالق الذي تم تحضيره مسبقا في عملية عزل الطفيلي ب ١٠ مليلتر من خلايا كلية أجنة القرود الخضراء الأفريقية ومن ثم حضنت لمدة ٤ ساعات بدرجة حرارة ٣٧ م ه ووضع المزيج في أنابيب معقمة في جهاز المثقلة ٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق ومن ثم تم التخلص من الراشح، وغسل الراسب الحاوي على الخلايا ثلاث مرات بمحلول دارئة الفوسفات المعقمة و الذي يكون بدرجة حرارة ٣٧ م ه ، ونقلت الخلايا فيما بعد إلى الحوجلة الخاصة للزرع الخلوي(Falcon سعة ٥٠ مليلتر) ومن ثم أضيف إليها وسط النمو(Growth media) ، تم تحضين الخلايا في ٣٧ م ه ، ٥% CO2، وتم مراقبة الخلايا يوميا بفحصها تحت المجهر ويراعى استبدال الوسط كل ٥ أيام وإجراء تمريره واحدة كل ٤٠ يوما من التحضين ولستة تمريرات.

٤-استخلاص الدنا DNA Extraction:

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

-استخلاص الدنا للطفيلي DNA من المزارع الخلوية:

تم حصاد الخلايا من حوجلة الزرع الخلوي باستخدام مكشطة الخلايا المطاطية cell scraper،ثم تم غسل الخلايا ثلاث مرات باستخدام محلول دارئة الفوسفات البارد(٤م ه) ، وتم تعليقها في دارئة الفوسفات البارد (٤ م ه) ١٨٠ مايكروليتر ،ومن ثم إضافة ٢٠ مايكروليتر من إنزيم بروتينازK (Proteinase K) (25 mg /ml) ،ومزج جيدا وحضن في الحمام المائي الهزاز ٥٥ م ه لمدة ١٠ دقائق ، وتم بعد ذلك نقل العينة في أنابيب ابندورف Eppendorf حجم ١,٥ مليلتر معقمة ، وبالتالي إضافة ٢٠٠ مايكروليتر من دارئة MSL ومزج جيدا وحضن ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٧٠ م ه، وترك الأنبوب في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق ، ثم أضيف الايثانول المطلق ١٠٠% بمقدار ٢٦٠مايكروليتر مع ١٠ مايكروليتر من الجزيئات المغناطيسية Mag –Bind Particles و ١٠ مايكروليتر من دارئة LPA ،ومزج جيدا وحضن لمدة ٥ دقائق في درجة الغرفة ، ووضع الأنبوب فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق ، ثم أزيل السائل الراشح باستخدام ماصة دقيقة ، وتم إضافة ٤٠٠ مايكروليتر من دارئة MP ومزج جيدا" ، وحضن بعد ذلك لمدة٣ دقائق في درجة حرارة الغرفة ووضع الأنبوب فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق و تم التخلص من الراشح باستخدام ماصة دقيقة وأضيف ٤٠٠ مايكروليتر من محلول دارئة الغسل SPM Wash Buffer مع المزج الجيد وحضن ٣ دقائق في درجة حرارة الغرفة ،ووضعت بعدها الأنبوبة على جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق ، وتم التخلص من الراشح باستخدام ماصة دقيقة، وأعيدت عملية الغسل بدارئة الغسل SPM Wash Buffer ٤٠٠ مايكروليتر، ثم تم التأكد من خلو الأنبوبة من أي كمية من الراشح وأضيف دارئة الشطف Elution Buffer ٢٠٠ مايكروليتر لشطف الدنا عن الجزيئات المغناطيسية مع مراعاة المزج الجيد ومن ثم تم التحضين ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة ، ووضعت الأنبوبة بعدها فوق جهاز الفصل المغناطيسي لمدة ٧ دقائق و سحب الراشح

الحاوي على جزيئات الدنا المستخلصة ونقل إلى أنبوبة ابنـــدورف Eppendorf حجـــم ١,٥ مليلتـــر معقمة أخرى، وحفظ الأنبوب في -٧٠ م ه لحين إجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليمريز عليه.

٥-تفاعل سلسلة البوليمريز -ذو الوقت الحقيقي Real Time PCR

تم استخدام العتيدة المنتجـــة مـــن قبـــل شـــركة (Genekam Biotechnology AG Germany) (الشكل-١-) والتي تعتمد على صبغات ومضانية Fluorogenic

٥-١-المحاليل والمواد المستخدمة في تفاعل البوليمريز

عبارة عن مزيج تفاعل يحتوي على كل مكونات التفاعل مع المشرعات وقالب الدنا المراد اختبـــاره، ويتكون مزيج التفاعل لكل عينة حجم ٢٥ مايكروليتر من المواد التالية:

ت	اسم المادة	الكمية(ul)	التركيز النهائي
-١	10X PCR Buffer	٢,٥	1X
-٢	dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, & dTTP	0.5	200uM
-٣	Mgcl2	٣,٢٥	1.5mM
-٤	Taq DNA-Polymerase	0.125	2.5 units
-٥	Dyes	0.25	100nM
-٦	Primer A	٠,٢	800nM
-٧	Primer B	٠,٢	800nM
-٨	DNA Template	٥	-
-٩	RNA Free Water	١٢,٩٧٥	-

٥-٢- المشرعات أو البادئات: Primers

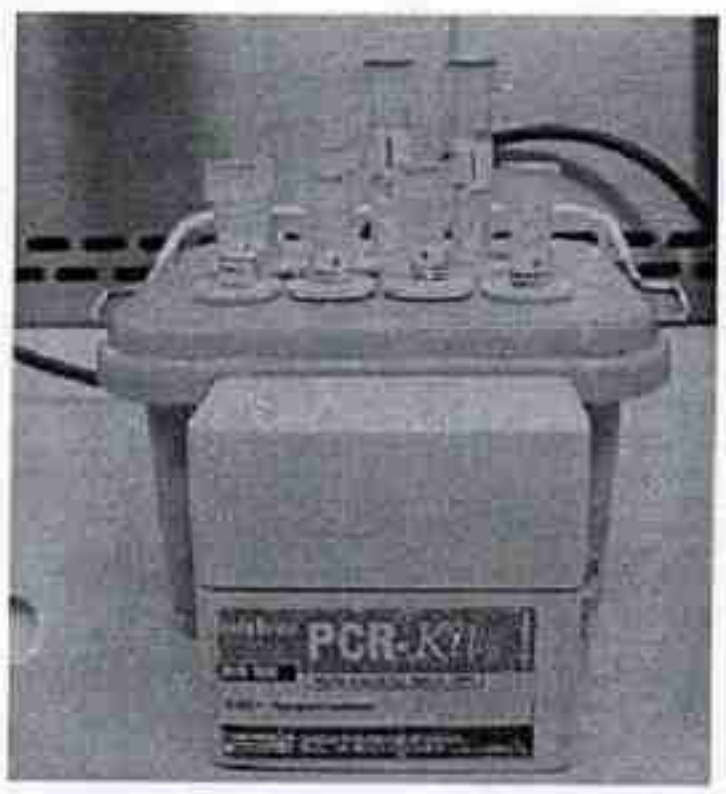
صنعت هذه المشرعات من قبل شركة GenBank Accession،وتم انتقاء هذه المشرعات من أجـــل تضخيم المورثات لكل مـــن الـــذراري(NC-5, Nc1 and BPA-4) (Nathalie, 2003)، وقـــد تضمنت ٣ أزواج من المشرعات وكما يلي:

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

٥-٣-خطوات عمل تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي:

أجري اختبار تفاعل البوليمريز المتسلسل ذو الوقت الحقيقي حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Esther *et al.*,2002) حيث أجري الأختبار في حجم تفاعل كلي من ٢٥ مايكروليتر في طبق الاختبار الحاوي على ٩٦ حفرة (Plate) حيث أضيف في كل حفرة ٠,٢ مايكروليتر من كل بادئ من البادئات Primers و ٥ مايكروليتر من وقالب الدنا Template DNA وباقي الحجم من محلول مزيج التفاعل الجاهز Master mix الحاوي على جميع مكونات التفاعل باستثناء البادئات وقالب الدنا، ثم وضع بعد ذلك طبق الاختبار في المبلمر الحراري (Thermocycler) (الشكل-٢-). وأجريت عملية التضاعف Amplification بواسطة جهاز المبلمر الحراري المبرمج على خمسين دورة بعد خطوة المسخ Denaturating ٩٥°م لمدة ١٠ دقائق. وقد شملت كل دورة مسخ عند درجة حرارة ٩٤ °م لمدة خمسة ثواني ٢٥ دورة ، ارتباط Annealing البادئ أو المشرع بدرجة ٦٠ °م لمدة١٥ ثانية ، و استطالةElongation عند درجة حرارة ٧٢ °م لمدة ١٥ ثانية، ثم ٢٥ دورة مسخ ٩٤ °م لمدة ٥ ثواني ، ارتباط ٦٦ °م لمدة ٥ ثواني ، استطالة ٧٢ °م لمدة ٤٥ ثانية

.



الشكل-١-عتيدة تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي

الشكل-٢-جهاز المبلمر الحراري الخاص لتفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت

النتائج Results

تبين من خلال تنمية الأعضاء المختلفة المأخوذة من الأجنة المجهضة ،العجول والأبقار على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء(شكل-٣-) ولستة تمريرات وجود تمريرات عمياء(Blind passage) حيث كانت متباينة حسب مصدر ونوع العضو المراد عزل الطفيلي منه ، ومن ثم ظهور تأثير مرضي على الخلايا Cyto Pathic Effect(CPE) متمثلة بظهور فجوات بين الخلايا Vacule (شكل-٤-) وتمزق في الخلايا Rupture (شكل-٥-)وظهور

الحيوانات التسرعية (شكل-٦-)حيث كانت هذه التأثيرات متباينة الشدة بين الأعـضاء والتمريـرات وازدادت شدة بزيادة التمريرات ،جدول-١-.

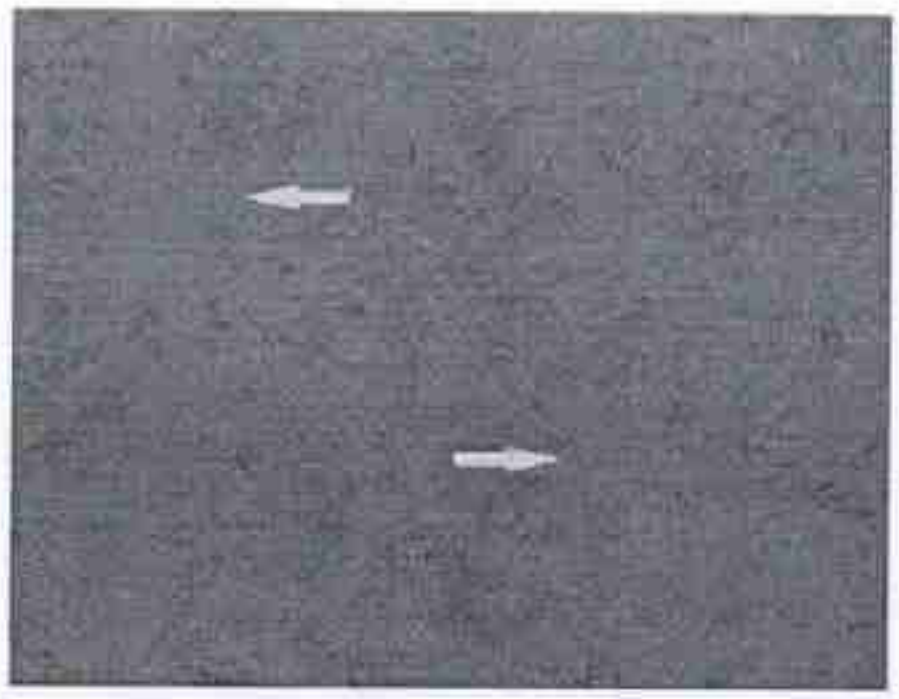
جدول-١- يبين التغيرات المرضية الخلوية Cyto Pathic Effect على خلايا الزرع الخلوي لخلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء

ث	مصدر العينة	التأثير المرضي الخلوي	ظهور فجوات			تمزق الخلايا			ظهور الطفيلي		
		رقم التمريرة	أجنة مجهضة	عجول	أبقار	أجنة مجهضة	عجول	أبقار	أجنة مجهضة	عجول	أبقار
١	مشيمة	الأولى			-			-			-
		الثانية			-			-			-
		الثالثة			-			-			-
		الرابعة			+			+			
		الخامسة			+			+			+
		السادسة			+			+			+
٢	دم	الأولى		-	-		-	-		-	-
		الثانية		-	-		-	-		-	-
		الثالثة		-	-		-	-		-	-
		الرابعة		-	-		-	-		-	-
		الخامسة		-	+		-	-		-	-
		السادسة		-	+		-	+		-	+
٣	دماغ	الأولى	-	-	-	-	-		-	-	
		الثانية	-	-	-	-	-		-	-	
		الثالثة	-	-	-	-	-		-	-	
		الرابعة	-	-	-	-	+		-	-	
		الخامسة	+	-	+	+	+		-	+	
		السادسة	+	+	+	+	+		+	+	
٤	القلب	الأولى	-	-	-	-	-		-	-	
		الثانية	-	-	-	-	-		-	-	
		الثالثة	+	-	+	+	-		-	-	
		الرابعة	+	-	+	+	+		+	-	
		الخامسة	+	+	+	+	+		+	+	
		السادسة	+	+	+	+	+		+	+	
٥	العضلات الهيكلية	الأولى	-	-	-	-	-		-	-	
		الثانية	-	-	-	-	-		-	-	
		الثالثة	-	-	-	-	-		-	-	
		الرابعة	-	-	-	-	-		-	-	
		الخامسة	-	+	+	+	+		+	+	

	+	+		+	+		+	+	السادسة	

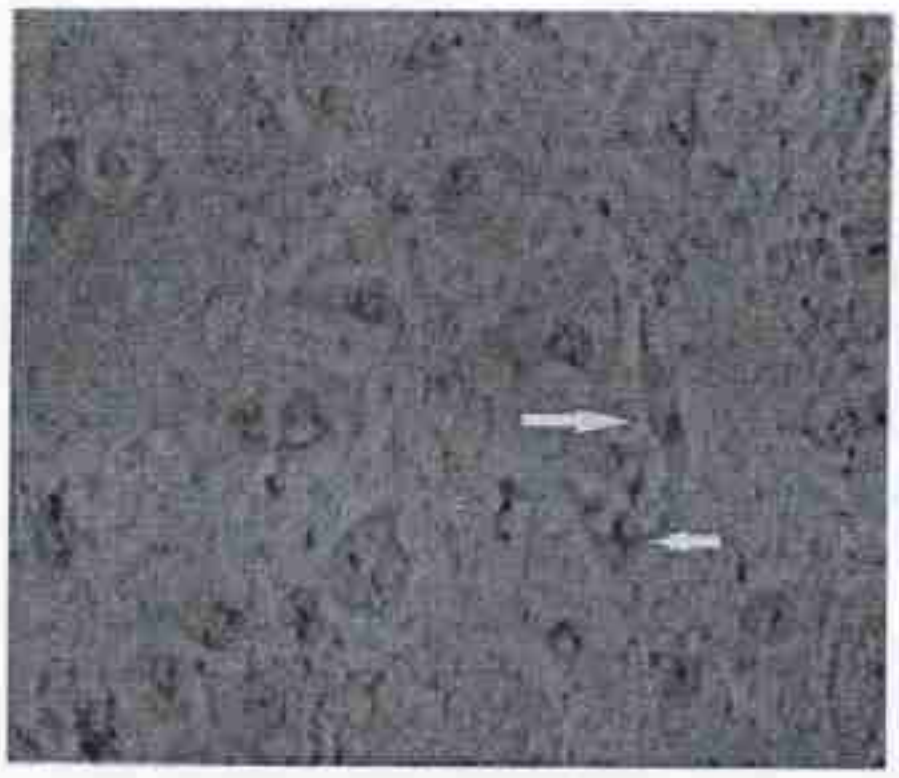
الإشارات التالية (–)عدم ظهور تأثير خلوي ،(+) ظهور تأثير خلوي

شكل(٣)خلايا كلية لجنة القرود الافريقية الخضراء



شكل(٤)ظهور التأثير المرضي الخلوي (الفجوات) في خلايا الزرع الخلوي

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



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

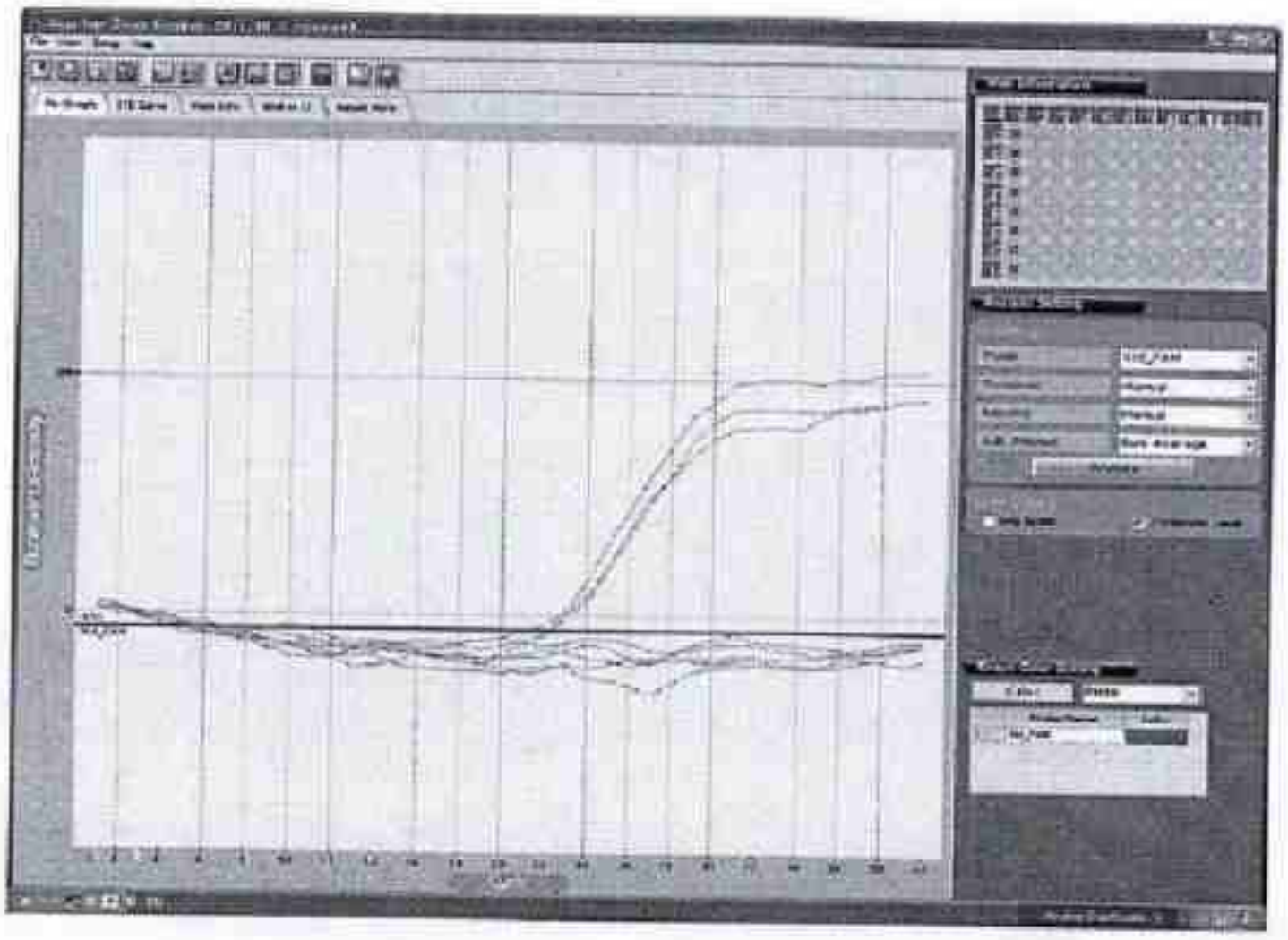
تبين من خلال تنمية أعضاء الأجنة المجهضة على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء أن أول ظهور للتأثيرات المرضية للخلايا كان في التمريرة الثالثة لعينات القلب، بينما كان أول ظهور للتأثيرات المرضية للخلايا في عينات العجول حديثة الولادة كان ذلك للتمريرة الرابعة لعينات القلب والدماغ سوياً"، في حين لم يظهر أي تأثير مرضي للخلايا لعينات دم

العجول، فيما كان أول ظهور للتأثيرات المرضية الخلوية في التمريرة الرابعة لمشيمة الأبقار ، جدول-٢-.

جدول(٢) يبين عدد التمريرات على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء للأعضاء التي تم جمعها

ت	مصدر العينة	رقم التمريرة	أجنة مجهضة(٢٥)		عجول(١٤)		أبقار(٣٩)	
			عدد العينات الايجابية	عدد العينات السلبية	عدد العينات الايجابية	عدد العينات السلبية	عدد العينات الايجابية	عدد العينات السلبية
١	مشيمة	الأولى	-	-	-	-	٠	٣٩
		الثانية	-	-	-	-	٠	٣٩
		الثالثة	-	-	-	-	٠	٣٩
		الرابعة	-	-	-	-	٧	٣٢
		الخامسة	-	-	-	-	١٠	٢٩
		السادسة	-	-	-	-	١٠	٢٩
٢	دم	الأولى	-	-	٠	١٤	٠	٣٩
		الثانية	-	-	٠	١٤	٠	٣٩
		الثالثة	-	-	٠	١٤	٠	٣٩
		الرابعة	-	-	٠	١٤	٠	٣٩
		الخامسة	-	-	٠	١٤	١	٣٨
		السادسة	-	-	٠	١٤	٢	٣٧
٣	دماغ	الأولى	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثانية	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثالثة	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الرابعة	١	٢٤	٤	١٠	-	-
		الخامسة	٥	٢٠	٤	١٠	-	-
		السادسة	٦	١٩	٥	٩	-	-
٤	القلب	الأولى	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثانية	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثالثة	٢	٢٣	٠	١٤	-	-
		الرابعة	٣	٢٢	١	١٣	-	-
		الخامسة	٤	٢١	٢	١٣	-	-
		السادسة	٤	٢١	٣	١١	-	-
٥	العضلات الهيكلية	الأولى	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثانية	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الثالثة	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الرابعة	٠	٢٥	٠	١٤	-	-
		الخامسة	١	٢٤	١	١٣	-	-
		السادسة	٣	٢٢	١	١٣	-	-

وعند إجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي باستخدام ثلاث مشرعات للذراري(BPA4،NC-5،Nc1) بينت نتائج الاختبار لمسبر DNA المصمم للمورث NC5 للبوغة الجديدة الكلبية بملاحظة منحنى التألق لدورات تضخيم تفاعل البلمرة، حيث ظهرت النتيجة الايجابية بالارتفاع التدريجي المتزايد لمنحنى التألق ، (شكل ٧).



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

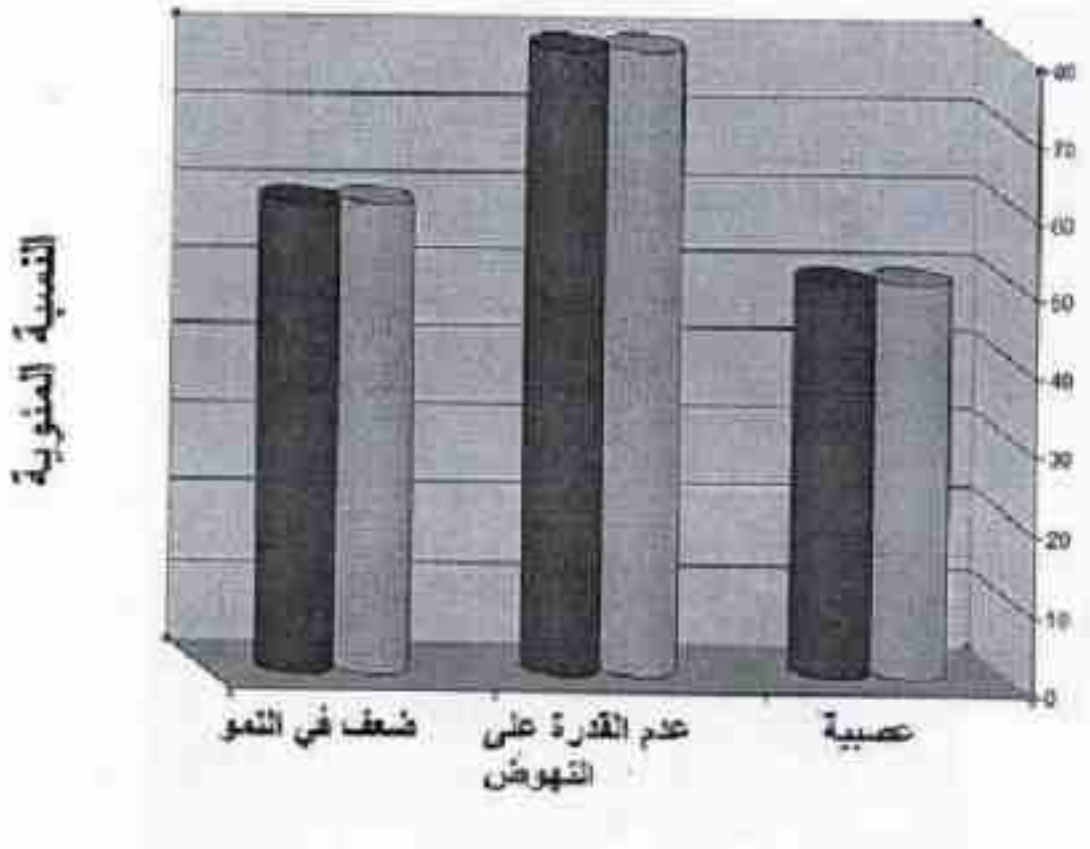
فيما بينت نتائج الكشف عن الدنا للطفيلي في المزارع الخلوية باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي أن أعلى نسبة للإصابة في للمزارع الخلوية المأخوذة من الأجنة ،كانت لعينات للدماغ والعضلات الهيكلية (١٠٠%) ، أما بالنسبة للمزارع الخلوية التي تمت عليها تنمية عينات العجول فبلغ أعلى نسبة إصابة لعينات القلب والعضلات الهيكلية (١٠٠%)، بينما تبين أن عينات مشيمة(٩٠%) التي تم إنمائها على المزارع الخلوية كانت نسبتها أقل مما هو عليه الحال بالنسبة لعينات الدم (١٠٠%)، جدول(٣).

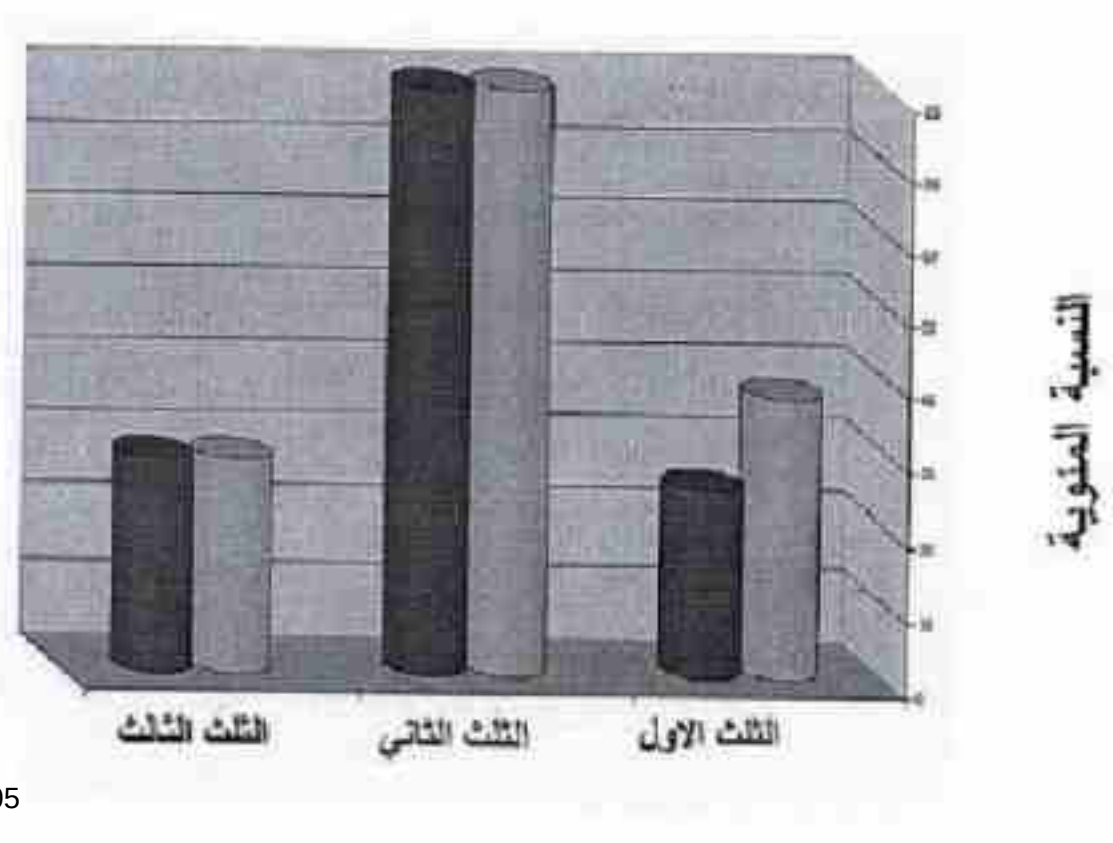
جدول(٣) يبين نتائج تفاعل سلسلة البوليمريز ذات الوقت الحقيقي لخلايا الزرع الخلوي المصابة بالطفيلي

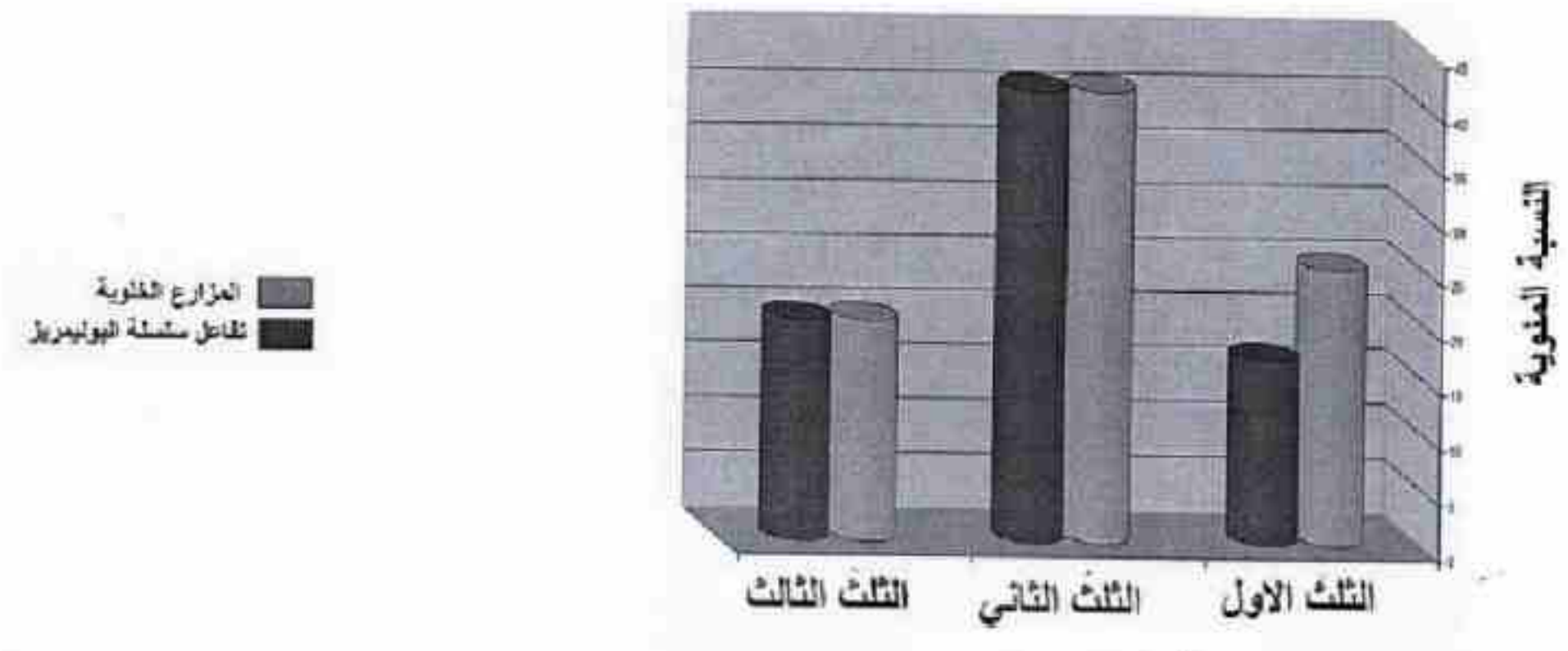
ت	مصدر العينة	أجنة مجهضة		عجول		أبقار	
		عدد العينات الايجابية	النسبة المئوية %	عدد العينات الايجابية	النسبة المئوية %	عدد العينات الايجابية	النسبة المئوية %
١	مشيمة	–	–	–	–	٩	٩٠
٢	دم	–	–	•	•	٢	١٠٠
٣	دماغ	٦	١٠٠	٤	٨٠	–	–
٤	القلب	٣	٧٥	٣	١٠٠	–	–
٥	العضلات الهيكلية	٣	١٠٠	١	١٠٠	–	–

الإشارة التالية (•)عدم حصول نمو على المزارع الخلوية

بينت نتائج تنمية الطفيلي في المزارع الخلوية وتشخيصه باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي في الحيوانات المختلفة بالمقارنة مع العلامات المرضية التي تعاني منها ، ظهور أعلى نسبة إصابة في الأجنة المجهضة التي أُجهضت في (الثلث الثاني) ، حيث بلغت ٨٠% في كلا الطريقتين (شكل-٨-)، فيما ظهرت اقل نسبة للإصابة في العجول التي عانت من أعراض عصبية حيث بلغت ٥٠%(شكل-٩-) ،أما الأبقار فقد سجلت فيها أعلى نسبة إصابة ٤١,١٧% التي أجهضت في(الثلث الثاني من الحمل) ، (شكل-١٠-)







الشكل-١٠-

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

بينت نتائج تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي للكشف عن ٣ ذراري للبوغة الجديدة الكلبيـــة (BPA4،Nc1،NC-5) وجود الدنا للطفيلي في أنسجة الأبقار للذرية NC-5، حيث سجل أعلى نسبة لها في الدم مقارنة بالمشيمة ، أما الدنا للطفيلي الذي تم الكشف عنه في أنسجة العجول للذريـــة NC5 فتبين أن أعلى نسبة كان في عينات الدماغ فيما انعدم في عينات الدم والعضلات الهيكلية، في حـــين بينت نتائج فحص أنسجة الأجنة المجهضة للذرية NC5 إن أعلى نسبة كـــان فـــي أنـــسجة الـــدماغ والعضلات الهيكلية.

فيما أظهرت نتائج فحص الدنا للذرية Nc1 للعينات التي تم أخذها من الأبقار أن أعلى نسبة كان فـــي أنسجة المشيمة وقد انعدمت النتائج في الدم ،فيما بينت نتائج الفحص في أنسجة العجول انعدام وجـــود الذرية فيما عدا أنسجة القلب، أما أنسجة الأجنة المجهضة فتم الكشف عن الدنا للذرية أنفة الذكر فقـــط في أنسجة الدماغ.

أما بالنسبة للذرية BPA4 فقد تبين من خلال فحص الدنا في أنسجة الأبقار أن أعلى نسبة إصابة لهذه الذرية كانت في الدم مقارنة بالمشيمة، في حين سجلت أعلى نسبة إصـــابة للذريـــة BPA4 للعجـــول والأجنة في أنسجة العضلات الهيكلية، جدول-٤-.

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

أسم الذرية	مصدر العينة	نوع العينة	تفاعل سلسلة البوليمريز ذات الوقت الحقيقي	
			عدد العينات الايجابية(النسبة المئوية%)	عدد العينات السلبية(النسبة المئوية%)
NC-5	أبقار	مشيمة	٣(٣٠)	٧(٧٠)
		دم	١(٥٠)	١(٥٠)
	عجول	دم	*	*
		دماغ	٢(٤٠)	٣(٦٠)
		القلب	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
		العضلات الهيكلية	٠(٠)	١(١٠٠)
	أجنة مجهضة	دماغ	٢(٣٣,٣٣)	٤(٦٦,٦٧)
		القلب	١(٢٥)	٣(٧٥)
		العضلات الهيكلية	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
Nc1	أبقار	مشيمة	٢(٢٠)	٨(٨٠)
		دم	٠(٠)	٢(١٠٠)
	عجول	دم	*	*
		دماغ	٠(٠)	٥(١٠٠)
		القلب	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
		العضلات الهيكلية	٠(٠)	١(١٠٠)
	أجنة مجهضة	دماغ	١(١٦,٦٦)	٥(٨٣,٣٤)
		القلب	٠(٠)	٤(١٠٠)
		العضلات الهيكلية	٠(٠)	٣(١٠٠)
BPA4	أبقار	مشيمة	٤(٤٠)	٦(٦٠)
		دم	١(٥٠)	١(٥٠)
	عجول	دم	*	*
		دماغ	٢(٤٠)	٣(٦٠)
		القلب	١(٣٣,٣٣)	٢(٦٦,٦٧)
		العضلات الهيكلية	١(١٠٠)	٠(٠)
	أجنة مجهضة	دماغ	٣(٥٠)	٣(٥٠)
		القلب	٢(٥٠)	٢(٥٠)
		العضلات الهيكلية	٢(٦٦,٦٦)	١(٣٣,٣٤)

الإشارة التالية (*)عدم حصول نمو على المزارع الخلوية

المناقشة Discussion

بينت نتائج هذه الدراسة الكشف عن طفيلي البوغة الجديدة الكلبية في محطات الأبقار في سوريا من خلال عزله من أنسجة الحيوانات المصابة على خلايا الزرع الخلوي من نوع خلايا كلية أجنة القرود الأفريقية الخضراء ، حيث أظهرت الأنسجة (الدماغ ،عضلة القلب ،العضلات الهيكلية، المشيمة والدم) ، التي تم هضمها بالتربسين والمنتقاة من الحيوانات المصابة(أجنة مجهضة ،عجول مولودة حديثا والأبقار) ، إذ لوحظ نمو على خلايا الزرع الخلوي وبنسب متفاوتة ، حيث أظهرت المزارع الخلوية بعد حقنها بمستخلص النسيج وجود تغيرات مرضية خلوية وازدادت بتقدم التمريرة وفترة ظهورها ، إن هذه الاختلافات تعود لقابلية الذراري للبوغة الجديدة الكلبية للنمو بفترات زمنية مختلفة ، حيث بين (Katarina *et al.*,2011) ، حصول نمو للذرية(NC-SKB1) ، بعد ١١ تمريرة، بينما بين (Sawada *et al.*,2000) ، حصول نمو للذرية (BT-3) ، بعد ٦ تمريرات. ويمكن تفسير هذا التباين بقابلية كل ذرية لسرعة تكيفها ونموها على خلايا الزرع الخلوي وملائمة نوع الخلايا لها (Gozdzik and Cabaj,2007) ،وقد تباينت التغيرات المرضية الخلوية في سرعة ظهورها وأشكالها حيث كانت متمثلة بظهور فجوات ، تمزق الخلايا وظهور الحيوانات التسرعية حيث ازدادت بتقدم التمريرة واختلاف الأعضاء والحيوانات ، إن هذه الاختلافات تعود إلى الاختلاف في عدد الحيوانات التسرعية في العينات حيث أنه كلما ازداد عددها زادت سرعة ظهورها إضافة إلى الاختلافات في ضراوة ذراري البوغة الجديدة الكلبية (Okeoma *et al.*,2004) ،وقد بينت نتائج الكشف عن الدنا باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي للبوغة الجديدة الكلبية في المزارع الخلوية التي ظهر عليها النمو،حيث كان بنسبة عالية في أنسجة الأدمغة والعضلات الهيكلية للأجنة المجهضة،والقلب والعضلات الهيكلية للعجول حديثة الولادة ،بينما كان في الأبقار بنسبة متقاربة في الدم والمشيمة ، إن الاختلاف في نسب ظهور ونمو البوغة الجديدة الكلبية في المزارع الخلوية للأعضاء المختلفة قد يعود لعدة أسباب منها : إن أنسجة المشيمة والأجنة تظهر فيها نسبة إصابة منخفضة نتيجة تعرضها للتلف أو للتحلل الذاتي مما يقلل من فرصة تشخيصها بصورة صحيحة (Collantes *et al.*,2005) ، بينما بينت دراستنا أن نسبها عالية نتيجة التعامل المباشر والاني مع العينة دون اللجوء إلى حفظها ومعاملاتها بعد فترة زمنية من الحفظ ،فيما بين آخرون (Wisniewski *et al.*,2002) ،أن نسبة الإصابة تكون متباينة حسب موقع المشرع ونوعه حيث تبين أن المشرع للجين Nc5 يكون ذو حساسية عالية للكشف عن هذا الطفيلي نتيجة عدم تواجده في الاوالي التي تمتلك علاقة مستضدية مع البوغة الجديدة الكلبية (*Toxoplasma gondii* ,*Hammondoia hammondi* ,*Sarcocystis SPP*) ،مما يرفع من دقة التشخيص.

وأظهرت النتائج عدم حصول نمو في عينات الدم للعجول وكذلك تواجد الطفيلي بنسب منخفضة في دم الأبقار، وقد يعود السبب في ذلك إلى مرحلة تطور وانتقال الطفيلي داخل الثوي المتوسط ،حيث أنه يكون بأعداد كبيرة في مرحلة الطفيليمية دون المراحل الأخرى مما يؤثر على نسب الإصابة (Aline *et al.*,2009) ، وبينت النتائج كذلك وجود الدنا للطفيلي في المزارع الخلوية بنسب عالية

ومرتفعة، وقد يعود السبب في ذلك لاستخدامنا أكثر من مشرع للكشف عن ذراري البوغة الجديدة الكلبية ،وهذا يختلف عن ما ذكره (Salehi *et al.*,2009) حيث كانت النسبة منخفضة نتيجة لاستخدامه نوع واحد من المشرعات ، وقد فسر سبب النسب المنخفضة من قبل باحثين آخرين (Medina,2006) ، باستخدام المشرع ITS1 والذي يمتلك حساسية أقل مما هو عليه حال بالنسبة للذي يتمتع به المشرع Nc5.

بينت نتائج هذه الدراسة العلاقة ما بين الأعراض المرضية و عدد العينات الايجابية لكل من المزارع الخلوية وتفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي، حيث أن هناك تباينا" ما بين المجاميع ، حيث بينت نتائج الفحص للأجنة المجهضة أن أعلى نسبة إصابة لكلا الطريقتين كانت في الأجنة التي اجهضت في (الثلث الثاني) ،وقد يعود السبب في ذلك إلى أن الأجنة في الثلث الأول من الحمل في حال كونها مصابة تكون الإصابة في بداية تكونها وعدد الحيوانات المتسرعية فيها قليلا ، في حين أن الأجنة في الثلث الأخير من الحمل تكون الحيوانات المتسرعية في أنسجتها قليلة نتيجة قابلية جهازها المناعي لتكوين استجابة مناعية ، بالإضافة إلى الاستجابة المناعية لأجساد أمهاتها مما قد يقلل من تكاثر وانتشار الطفيلي في أنسجتها (Corbellini ,2002) ،أما العجول فكانت أعلى نسبة إصابة في تلك التي أظهرت عدم قدرتها على النهوض مع أعراض تظهر فشلا عضليا وعصبيا، وقد يعود السبب في ذلك لظهور أعراض على هذه العجول ناجمة عن إصابة بالبوغة الجديدة الكلبية فضلا عن ضعف النمو في أجسادها مما قد يساعد في انتشار وتقدم الإصابة (Hemphill *et al.*,2000) ، أما عند الأبقار فلوحظ أن أعلى نسبة إصابة كانت في أبقار التي أجهضت (الثلث الثاني من الحمل) ، وقد يعود السبب في ذلك إلى دور الإصابة المزمنة حيث أن الإصابة تنشط نتيجة تحطم الأكياس النسجية وتحول الحيوانات البطيئة إلى الحيوانات التسرعية نتيجة لعملية تسمى (Bradyzoites-to-Tachyzoites Reconversion) ، وذلك نتيجة أي خلل في الجهاز المناعي أو الحمل، وإن إعادة تنشيط الإصابة المزمنة يأخذ فترة من الزمن مما قد يقلل من فرصة حدوث الإجهاض في الثلث الأول من الحمل نتيجة الإصابة بالبوغة الجديدة الكلبية (Guy *et al.*,2001) ، في حين أن الثلث الأخير من الحمل تقل فيه نسبة الإصابة نتيجة للاستجابة المناعية والتي تقلل من أعداد الحيوانات التسرعية في المشيمة (Bergeron *et al.*,2000).

وقد بينت نتائج الكشف عن أنواع الذراري المعزولة في خلايا الزرع الخلوي والتي جرى الكشف عنها وتصنيفها باستخدام ثلاثة أزواج من المشرعات للذراري(BPA4،Nc1،NC-5) ، باستخدام تفاعل سلسلة البوليمريز ذو الوقت الحقيقي وجود تباين في نسب تواجدها في الأعضاء والحيوانات حيث كانت أعلى نسبة للذرية NC-5 في عينات الأبقار التي تم العزل منها، في حين سجلت الذرية BPA4 أعلى نسبة إصابة لكل من العجول والأجنة، إن هذا التباين يعود لعدد أسباب منها،الاختلاف في ضراوة الذراري المسببة للإصابة حيث إن الدراسات لم تثبت إلى حد ألان مدى ضراوة جميع الذراري للبوغة الجديدة الكلبية في الأبقار،وذلك نظرا للكلفة المادية العالية لإجراء ذلك فيما عدا استخدام الحيوانات المخبرية بالإضافة إلى أن للبوغة الجديدة الكلبية قابلية لإصابة أعضاء دون

الأخرى ،لكل ذرية حسب خصائصها الحيوية(البيولوجية) والجينيـــة، لـــذلك فـــان نـــسب انتـــشارها وتواجدها في الأعـــضاء تكـــون متباينـــة (Al-Qassab *et al.*,2010) ، فيمـــا ذكـــر آخـــرون (Alexander *et al.*,2011) ، أن ذراري البوغة الجديدة الكلبية التي تصيب الكلاب تصيب الأبقار على حد سواء .

وقد أكد(Sager,2001) أن تشخيص البوغة الجديدة الكلبية يتطلب استخدام أكثـــر مـــن اختبـــار، ويتعلق ذلك بمبدأ الحساسية والنوعية للتشخيص .

References المراجع

Alexandre,D.M.,Ana,P.P.J., and Rosangela,Z.M.(2011).Bovine abortion Associated with *Neospora caninum* :Diagnosis and Epidemiological Aspects of a dairy cattle herd in the Northeast region of Sao Paulo State,Brazil. Brazilian Journal Of Veterinary Parthology ,4(2):112-116.

Aline,D.C.,Clarice,N.C.,Nara,T.C.,Liria,H.O.,Edviges,M.P.,and Claudia, D.F.(2009).Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses Histology,Immunohistochemistry , and nested –PCR.Rev Bras Parasitol Vet ,18(4):14-19.

Al-Qassab,S.E.,Michael,P.R., and John,T.E.(2010).On the biological and Genetic diversity in *Neospora caninum*. Diversity,2 :411-438.

Bergeron,N.,Girard,C.,Pare,J.,Fecteau,G.,Robinson,J.,and Baillargeon,P. (2000).Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from Seropostive dams giving birth to full-term calves .J Vet Diag Invest ,13:1169-172.

Bjerkas,I.,Mohn,S.F.,and Piesthus,J.(1984).Unidentified cyst –forming Sporozoan causing Encephalomyelitis and Myocystitis in dogs. Z Parasitinkd,70:271-274.

Collantes,F.E.,Rodriguez,B.A.,Arnaiz,S.I.,Moreno,B.,Aduriz,G.,and

Ortega,L. (2006).Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* Distribution parasite loads and lesion in aborted bovine fetuses. Theriogenology ,10:629–641.

Corebellini ,L.C.(2002).Neosporosis as acause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul ,Southern braail.Veterinary Parasitology , 103(3):195–202.

Dubey ,J.P.,Schares,G., and Ortega–Mpra,L.M.(2007). Epidemiology And control of neosporosis and *Neospora caninum* . Clinical Microbiology Review,20(2):323–367.

Esther,C.F.,Angel,Z.,Gema,A.G.,and Luis,M.O.(2002).Quantitative detection Of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimental Infected Mice by Real–Time PCR.Journal Of Clinical Microbiolog ,40(4):1194–1198.

Gozdzik,K., and cabaj,W.(2007).Characterization of the first Polish isolate Of *Neospora caninum* from cattle.Acta Parasitologica ,52:295–297.

Guy,C.S.,Williams,D.J.L.,Kelly,D.F.,McGarry ,J.W.,Guy,F.,Bjorkman,C., Smith ,R.F.,and Trees,A.J.(2001) .*Neospora caninum* in persistently Infected pregnant cows:spontaneous transplacental infection is Associated with an acute increase in maternal antibody. Vet Rec, 149:443–453.

Habibi,G.R.,Hashemi,F.R.,Sadrebazzaz,A.,Bozorgi,S., and Bordbar,N.(2005) Seminested PCR for diagnosis of *Neospora caninum* infection in Cattle.Arch Razi Ins ,59:55–64.

Hemphill,A.,Gottstein,B.,and Conraths,F.J.(2000).A European perspective on *Neospora caninum* .Int J Parasitol ,30:877–924.

Jessica,S.K.,Bronwyn,M.,Derek,S.S.,Scott,A.L.,Lada,H.H.,Ashile,H., Sarwat ,E.L.,John,T.E., and Jan,S.(2011).Extensive production Of *Neospora caninum* tissue cysts in a carnivorous marsupial Succumbing to experimental neosporosis.Vet Res ,42(1):75-86.

Katarina,R.,Silvia,S.,Andrea,C., and Rastislav,M.(2011).First in vitro Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected adult dairy Cow in Slovakia.Acta Parasitologica ,56(2):111-115.

Masumi,S.,Hisayo,K.,Yukiko,T.,Chun-Ho,P.,Takehito,M.,Akinori,S., And Takashi,U.(2000).Isolation of *Neospora caninum* from The brain of a naturally infected adult dairy cow. Veterinary Parasitology ,90:247-252.

Medina,L.(2006).Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in Aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes,Mexico. Veterinary Parasitology ,136(4):187-191.

Nathalie,V.(2003).Hiding inside the host: Development and application Of *Neospora caninum* bradyzoites in vitro culture .PhD Thesis, University of Basel,Germany, PP:29-34.

Norbert,M.,Nathalie,V.,Christian,G.,Stephen,L.L., and Andrew,H.(2002). Application of Real-Time fluorescent PCR for Quantitative Assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic Slice cultures of rat central nervous system tissue .J Clinic Microbiology ,40(1):252-255.

Okeoma,C.M.,Williamson,N.B.,Pomroy,W.E.,Stowell,K.M., and Gillespite,L.M (2004).Isolation and molecular characterization of *Neospora caninum* In cattle in New Zealand. New Zealand

Veterinary Journal,52:364-370.

Sager,H.(2001).A Swiss case –control study to assess *Neospora caninum* Associated bovine abortions by PCR ,histopathology and serology. Veterinary parasitology ,102(1):1-15.

Salehi,N.,Haddadzadeh,H.,Ashrafihelan,J.,Shayan,P., and Sadrebazzaz,A. (2009).Molecular and pathological study of bovine aborted fetuses And placenta from *Neospora caninum* infected dairy cattle. Iranian J Parasitol,4(3):40-51.

Sawada,M.,Kondo,H.,Tomioka,Y.,Park,C.H.,Morita,T.,Shimada,A.,and Umemura ,T.(2000).Isolation of *Neospora caninum* from the Brain a naturally infected adult dairy cow. Veterinary Parasitology ,90:247-252.

Timothy,V.B.,Lawrence,J.C.G.,Maureen,T.L., and Bruce,A.M.(1999). Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissue from Spontaneous bovine abortions. Journal of Clinical Microbiology, 37(12):4059-4064.

Yamane,I.,Kokuho,T.,Shimura,K.,Eto,M.,Shibahara,T.,Haritani,M.,Ouchi Y.,Sverlow,K., and Conrad ,P.A.(1997).In Vitro isolation and Characterization of a bovine *Neospora* Species in Japan.Res Vet Sci, 63:77-80.

Wisniewski,M.,Cabaj,W.,Moskwa,B., and Wedrychowicz,H.(2002).The First detection of *Neospora caninum* DNA in brains of calves in Poland .Acta Veterinaria ,52(6):393-400.

ISOLATION AND DIAGNOSIS OF *NEOSPORA CANINUM* DNA FROM CATTLE IN SYRIA

AL-Obaidii ,W., Katranji,M.M., AL-Khaled,A.

ABSTRACT

In order to isolate *Neospora caninum* in cell culture (Vero cell) and diagnosis the strains by using Real Time Polymerase Chain Reaction by using three different primers pairs(NC-5,Nc1 and BPA4) from the tissue(brain, heart , skeletal muscle, placenta and blood) of 25 aborted fetus ,14 new borne calves and 39 cattle which suffer from abortion ,the study showed from culturing of tissue sample extract in tissue culture , Cyto Pathic Effect(CPE) this effect manifested by Vacule,Rupture in cell and presence of tachyzoites , when application the PCR technique in DNA template which extracted from infected cell culture ,showed presence increased fluorescent curve which indicate positive to *Neospora caninum* DNA,the highest percentage of infection in cell culture which infected with brain and skeletal muscle of Aborted fetus and Heart, skeletal muscle of calves ,while cell culture which infected with placenta of cow showed lowest percentage than blood sample the result show variance between clinical signs which appear in infected animals with the percentage of infection , the results of DNA detection of strains appear variation depending on the strain, sample, animal

Key words : *Neospora caninum* –Vero cell –Cyto Pathic Effect – Real Time Polymerase Chain Reaction–Strains–DNA.

Accepted: Received