نشریه دامپزشکی در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109234

ارزیابی واریته تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* در تشخیص عفونت *نئوسپورا کنینوم* در گاو با روش آگلوتیناسیون

• **حمید رضا توانایی**
دانشجوی دانشگاه آزاد واحد جهرم
• **مهدی نام آوری (نویسنده مسئول)**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
تاریخ دریافت: تیر ۹۵ تاریخ پذیرش: مرداد ۹۵
Email: namavari@yahoo.com

چکیده

تک یاخته *نئوسپورا کانینوم* (***Neospora caninum***) عامل نئوسپوروزیس در میزبان‌های مختلف از جمله گاو، گوسفند، بز،گوزن، اسب، سگ، گربه و موش می‌باشد. پاساژ متوالی *نئوسپورا کانینوم* ثابت شده است که روی حدت و بیماریزایی آن تاثیر بسزایی دارد اما اینکه آیا این رویه روی ارزش تشخیصی واریته کاهش حدت یافته نیز تاثیر دارد موضوعی است که این مطالعه سعی در بررسی آن دارد لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی ارزش تشخیصی واریته تخفیف حدت *نئوسپورا کنینوم* با استفاده از روش آگلوتیناسیون در تشخیص نئوسپوروزیس در گاو می‌باشد. برای دستیابی به این هدف نمونه‌های سرمی ۱۸۴ عدد گاو از دامداری‌های استان فارس که دارای سابقه سقط طی یک سال گذشته بودند، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها برای تشخیص آنتی‌بادی علیه *نئوسپورا کنینوم* با کیت تجاری الیزا و روش آگلوتیناسیون با استفاده از تاکی زوایت تهیه شده از واریته تخفیف حدت یافته بررسی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که ۵۴ (۲۹/۳۴%) و ۵۹ (۳۲/۰۷%) سرم به ترتیب با روش آگلوتیناسیون و کیت تجاری الیزا مثبت تشخیص داده شدند .ارزیابی آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این دو روش وجود ندارد و براساس آزمون کاپا توافق این دو تست بسیار خوب بود. این مطالعه ثابت کرد که تک یاخته نئوسپورا تخفیف حدت داده شده از طریق پاساژ متوالی همچنان ارزش تشخیصی خود را در روش آگلوتیناسیون حفظ می کند.

کلمات کلیدی: *نئوسپورا کنینوم*، تست آگلوتیناسیون، گاو

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 153-157

Evaluation of attenuated variety of ***Neospora caninum*** for diagnosis of infection in cattle by agglutination test

By: Tavanaee, H.R., Student, Azad University of Jahrom Branch. and Namavari, M., Member of Board Scientific Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran.

Email: namavari@yahoo.com

Received: 2016-07-03 Accepted: 2016-07-26

The protozoan parasite *Neospora caninum* is a major cause of abortion in cattle worldwide. It has been found in various animal species such as dogs, cattle, horses, sheep and goats. This is conclusive proof that long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. But whether the attenuation procedure could reduces the diagnostic value of attenuated variety is the issue of the impact that this study tries to evaluate it. In other word the aim of this study was to evaluate the attenuated variety of *Neospora caninum* for diagnosis of neosporosis in cattle by agglutination method. The study was conducted with 184 sera collected from cattle with a history of abortion during the past year from the farms of Fars province. The sera were tested for the detection of antibodies against *Neospora caninum* with commercial ELISA kit and agglutination method. The results of this study showed that the positivity rate for the sera was 54 (29.34%) for agglutination method compared to 59(32.07 %) obtained by ELISA kit. The difference of agglutination method with ELISA kits according to the McNemar test was not significant and this result was also very good agreement with the Kappa test. This study proved that the attenuated variety of *Neospora caninum* still preserves its own diagnostic value.

Key words: *Neospora caninum*, Agglutination test, Cattle

مقدمه

نئوسپورا کنینوم (*Neospora caninum*) تک‌یاخته‌ای از شاخه آپی‌کمپلکسا (Apicomplexa) است. شاخه آپی‌کمپلکسا شامل بیش از ۵۰۰۰ گونه تک‌یاخته انگل می‌باشد (۱۲) و تقریباً همه گونه‌های آن بیماری‌زا هستند از جمله *نئوسپورا کنینوم*، *توکسوپلاسما گوندی* (*Toxoplasma gondii*)، *پلاسمودیوم فالسی‌پاروم* (*Plasmodium falciparum*) و *آ یمریا تنلا* (*Eimeria tenella*) (۱۳،۲۰،۲۲). *نئوسپورا کنینوم* ازنظر ساختمانی بسیار شبیه *توکسوپلاسما گوندی* بوده ولی ازنظر آنتی‌ژنی با آن متفاوت می‌باشد. میزبان‌های نهایی انگل، سگ و کایوت می‌باشند و طیف وسیعی از پستانداران ازجمله گاو، گوسفند، بز، اسب، الاغ، کرگدن، آهو و سایر حیوانات وحشی نیز میزبان واسط این انگل می‌باشند (۷). *نئوسپورا کنینوم* عامل بیماری نئوسپوروزیس (Neosporosis) بوده که یکی از عوامل عمده سقط عفونی و بیماری‌های مادرزادی در گاو می باشد و موجب سقط، مرده‌زایی، تولد گوساله ضعیف یا با عفونت دائمی و کاهش تولید شیر می‌شود(۱۷). در ایران نیز میزان سقط‌جنین به دلیل آلودگی به نئوسپورا در مشهد ۱۵/۵ و در گزارشات اخیر این میزان در جنوب ایران ۳۳/۳۳ درصد نیز اعلام شده است (۱۸،۱۴) بنابراین نئوسپوروزیس به‌عنوان یک بیماری مهم اقتصادی در صنعت دامپروری شناخته شده است.

تاکنون بارها تخفیف حدت تک یاخته‌های بیماری‌زا از طریق پاساژ دادن متوالی اثبات شده است، بطوریکه حتی برخی از واکسن‌های تجاری موجود در بازار نیز برهمین اساس تولید شده است (۹ و ۲۳). در مطالعه‌ی Bartley و همکاران (۲۰۰۶)، اثر تخفیف حدّت تاکی زوآیت *نئوسپورا کانینوم* طی پاساژهای متوالی در کشت سلولی Veroو تلقیح به موش مشاهده شده است (۱). مطالعه‌ی دیگری که توسط Namavari و همکاران (۲۰۱۱)، انجام شد، پاساژ متوالی نئوسپورا بر روی رده سلولی Vero باعث کاهش حدت این تک یاخته در تخم مرغ‌های جنین دار شد (۱۵). در مورد توکسوپلاسما تاثیر پاساژ متوالی و طولانی مدت و همچنین اثر نوع سلولی که برای کشت استفاده می شود بر ارزش تشخیصی تک یاخته بررسی شده است (۲۱،۵،۴) ولی تا کنون براساس اطلاعات در دسترس چنین مطالعاتی در مورد تک یاخته نئوسپورا کنینوم انجام نگرفته است. لذا هدف از مطالعه بررسی و ارزیابی ارزش تشخیصی واریته تخفیف حدت نئوسپورا کنینوم با استفاده از روش آگلوتیناسیون در تشخیص نئوسپوروزیس در گاو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دو رده سلولی J774 و Vero از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی

رازی کرج تهیه شد. کشت هر دو سلول با استفاده از محیط کشت DMEM و ۱۰درصد سرم جنین گاو به همراه آنتی بیوتیک با مقادیر ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر جنتامایسین و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر ضد قارچ آمفوتریسین انجام شد. در این مطالعه از ایزوله‌ی *نئوسپورا کنینوم* (Nc1) موجود در موسسه رازی شیراز استفاده شد و طبق روش Khor-dadmehr و همکاران (۲۰۱۳)، اقدام به کشت و تخفیف حدت Nc۱ روی رده‌ی سلولی J774 شد (۱۱) بدین صورت که بعد از اضافه کردن تک یاخته، کشت به صورت روزانه مشاهده می‌شد و وقتی ۸۰ تا ۹۰ درصد تخریب سلولی مشاهده شد تاکی‌زوآیت‌ها برداشت شد و در فلاسک جدید پاساژ داده می‌شدند . این روند روی سلول J774 به مدت یک سال ادامه داشت و محصول نهایی به عنوان سوش تخفیف حدت یافته درنظر گرفته شد. سپس با کشت انبوه سوش تخفیف حدت یافته، تاکی زوایتهای مورد نیاز برای تست اگلوتیناسیون جمع آوری گردید. آنتی ژن براساس روش Packham و همکاران (۱۹۹۸) تهیه شد (۱۶). پس ازسانتریفیوژ کردن محلول حاوی تاکی زوایت، محیط شناور بالایی دور ریخته شد. رسوب در ۳-۲ میلی لیتر فرمالدئید ۳۷% معلق و با PBS فیلتر شده غلظت فرمالدئید به ۶% کاهش داده شد. برای ثبوت، انگل تا روز بعد در ۴ درجه قرار داده شد. روز بعد سانتریفیوژ انجام گرفته و با PBS فیلتر شده ۳ مرتبه شستشو داده شد. رسوب در بافر قلیایی(۷/۲ گرم NaCl، ۳/۰۹ گرم H3Bo3 ، ۲۴ میلی لیتر NaOH ۱ نرمال، ۴ گرم آلبومین سرم اسب، ۵۰ میلی گرم ائوزین Y، سدیم آزاید ۰/۱ % ، آب دو با تقطیر تا حجم یک لیتر، pH۸,۷) معلق گردید به طوریکه غلظت نهایی تاکی زوایت ۳۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰ در میکرولیتر تنظیم شد. محلول آنتی ژن آماده استفاده دردمای ۴ درجه نگهداری شد.

انجام آزمایش اگلوتیناسیون طبق روش Packham وهمکاران (۱۹۹۸) انجام شد(۱۶). نحوه انجام تست بطور خلاصه بدین صورت است که رقت‌های مختلف سرم‌ها در PBS و ۲- مرکاپتواتانول(۰/۲ مولار) تهیه شد و به هر چاهک میکرو پلیت های ۹۶ خانه ای U bottom) (۵۰ میکرولیتر اضافه گردید و پس از آن به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی‌ژن *نئوسپورا کنینوم* و آلکالین بافر(۸ گرم NaCl ، ۰/۲ گرم Na2HPO4، ۰/۳۱گرم KH2PO4 در ۱ لیتر آب مقطر) اضافه و یک شب درانکوباسیون ۳۷ درجه قرار داده شد و روز بعد نتایج قرائت گردید. در هر بار آزمایش یک نمونه شاهد مثبت و یک نمونه منفی مورد آزمایش قرار می‌گرفت. در صورتی که کف چاهک کاملاً پوشیده از رسوب می‌شد نتیجه مثبت در نظر گرفته می‌شد. در ضمن از سرم های هایپر ایمن خرگوش به عنوان کنترل مثبت و خرگوش های غیر ایمن به عنوان کنترل منفی استفاده شد (خرگوش با استفاده از تاکی زوایت کشته و ادجوانت فروند ایمن شده بود).

نمونه های سرمی گاوها شامل ۱۸۴ نمونه های گاوهای ماده با سابقه سقط بودند که از گاوداریهای صنعتی اطراف شیراز جمع آوری شده بود. ابتدا تمامی نمونه ها با کیت تجاری الیزا نسبت به آنتی بادی ضد نئوسپورا کنینوم مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج به روشی که توسط شرکت سازنده شرح داده شده بود، محاسبه گردید. سپس سرم ها از نظر آنتی بادی ضد نئوسپورا کنینوم با تست آگلوتیناسیون بررسی شد. در این تست برای هر سرم رقت‌های سریالی دو برابر از ۱:۱۰ تا ۱:۸۰ میکرولیتر تهیه شد. سپس به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ته گرد ۲۵ میکرولیتر سرم و ۲۵ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول (2ME) اضافه گردید و مدت ۵ دقیقه منتظر می‌مانید تا پیوندهای دی سولفیدی از هم جدا شوند. پس از آن به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن نئوسپورا کنینوم تهیه شده در موسسه تحقیقات و واکسن سازی رازی شیراز اضافه و ۲۴ ساعت درانکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و روز بعد نتایج قرائت گردید. در هر پلیت تعداد ۴۶ (برای هر نمونه دو چاهک) نمونه سرم به همراه یک نمونه شاهد مثبت و یک نمونه منفی مورد آزمایش قرار می‌گرفت. مواردی که قطر چاهک کاملاً پوشیده از کدورت منتشر بود به عنوان مورد مثبت در نظر گرفته می‌شد و درصورتی که کف چاهک تکمه تشکیل شده بود نتیجه منفی تلقی می شد. با توجه به اینکه بیشترین انطباق نتایج روش اگلوتیناسیون با کیت تجاری الیزا در رقت ۱:۲۰ بود سرمهایی با این میزان رقت به بالا به عنوان نمونه سرمی نئوسپورا مثبت در نظر گرفته می‌شد.

نتایج حاصل از تست آگلوتیناسیون و الیزای غیر مستقیم در نهایت توسط دو تست آماری کاپا (Kappa Test) و مک نمار (McNemar) و با استفاده از نرم افزار گراف-پد مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

نتایج آزمون الیزا که توسط کیت تجاری الیزا بر روی ۱۸۴ نمونه سرم گاو انجام گرفت، نشان داد که تعداد ۵۹ رأس از گاوها ازنظر آنتی‌بادی ضد نئوسپورا کنینوم مثبت و ۱۲۵ رأس نیز منفی بودند. همچنین بر اساس نتایج تست آگلوتیناسیون که بر روی ۱۸۴ نمونه سرم گاو انجام گرفت، تعداد ۵۴ رأس از گاوها ازنظر آنتی‌بادی ضد *نئوسپورا کنینوم* مثبت و ۱۳۰ رأس نیز منفی تشخیص داده شد (شکل ۱).

بر اساس روش آماری آزمون کاپا دو روش مذکور دارای بسیار خوبی (Very good) در تشخیص آلودگی بودند و در ضمن در آزمون مک نمار نیز دو روش فوق‌الذکر در تشخیص موارد مثبت بیماری تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (دامنه اطمینان ۹۵%).

بحث

در این مطالعه از رده سلولی J774 جهت تخفیف حدت استفاده شد. مطالعات قبلی نشان داده که پاساژ متوالی *نئوسپورا کنینوم* در شرایط کشت سلولی می تواند روی کاهش بیماریزایی این تک یاخته تاثیر بگذارد (۱۵ و ۱). Khordadmehr و همکاران (۲۰۱۳) نیز تأثیر چشمگیر رده سلولی J۷۷۴در تخفیف حدت *نئوسپورا کانینوم* را با استفاده از تخم مرغ جنین دار به عنوان حیوان مدل آزمایشگاهی نشان دادند (۱۱). تا کنون از رده های سلولی مختلفی جهت جداسازی، تکثیر و تشخیص انگل *نئوسپورا کنینوم* به صورت گسترده ای استفاده شده است (۱۹ و ۷). از بین تمام سلول ها، سلول Vero متداول‌ترین رده سلولی استفاده شده جهت کشت *نئوسپورا کنینوم* می باشد (۱۰) با توجه به این که رده سلولی J774 معلق می‌باشد پاساژ دادن و تکثیر آن در مقایسه با رده‌های سلولی چسبنده مثل Vero آسان‌تر است ، تولید انبوه و آسان تاکی زوآیت *نئوسپورا کانینوم* نیاز اساسی در راستای ساخت واکسن زنده‌ی تخفیف حدّت یافته می‌باشد (۱۱). در مطالعه ای چامبرلند و کارنت (۱۹۹۰) تکی زوآیت های

توکسوپلاسما گوندئی را به فلاسک های کشت سلولی حاوی سل لاین J774 تلقیح کردند، تکثیر سریع تکی زوآیت های *توکسوپلاسما گوندئی* در رده سلولی ماکروفاژهای موش (J774) مشاهده کردند ، تعداد تکی زوآیت‌ها ۳۰۰ برابر شده بود (۳) در روشهای تشخیصی *نئوسپورا کنینوم* مانند الیزا، آگلوتیناسیون و روش آنتی‌بادی درخشان غیر مستقیم احتیاج به تاکی زوآیت های کامل تک یاخته به عنوان آنتی ژن است از اینرو استفاده از رده سلولی که بتواند بازده بیشتری در تکثیر *نئوسپورا کنینوم* داشته باشد حائز اهمیت است. مطالعات قبلی نشان داده که سل لاین J774 قابلیت خوبی در کشت *نئوسپورا کنینوم* دارد (۱۱،۳).

در این مطالعه ۱۸۴ نمونه سرمی از گاوهای با سابقه سقط جمع آوری شد چرا که احتمال وجود موارد مثبت *نئوسپورا کنینوم* در این گاوها بیشتر بود. سپس روش آگلوتیناسیون و کیت الیزای استاندارد تجاری برای تشخیص موارد مثبت و منفی *نئوسپورا کنینوم* در سرمهای گاو ارزیابی شد. لازم به ذکر است که روش‌های مختلف الیزا برای تشخیص آلودگی به این تک یاخته مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (۸ و ۲). روش آگلوتیناسیون قابلیت خود را به عنوان یک تست حساس، اختصاصی، ساده، سریع و ارزان با کاربردهای چندگانه نشان داده است (۱۶). همان گونه که از روش انجام آزمایش مشخص است، تست آگلوتیناسیون نیاز به هیچ گونه دستگاه گران قیمت برقی ندارد و به راحتی در هر آزمایشگاه ساده‌ای قابل انجام است. روش انجام آزمایش ساده بوده و به حداقل اطلاعات قبلی نیاز دارد. مقدار آنتی‌ژن لازم در غالب آزمایشاتی که از روش آگلوتیناسیون استفاده می‌کنند به ازای هر چاهک ۵۰ میکرولیتر می‌باشد (۶). به این ترتیب این روش در مورد سیستم‌های آنتی‌ژن- آنتی‌بادی که در آن‌ها مقدار آنتی‌ژن قابل دسترسی، بسیار کم است کاملاً مناسب و شاید بی‌رقیب باشد (۱۶). همچنین روش آگلوتیناسیون مستقیم بدلیل عدم نیاز به آنتی بادی ثانویه امکان بررسی گونه های مختلف حیوانی که ممکن است با *نئوسپورا کنینوم* آلوده شوند را به راحتی فراهم می‌سازد. تست آگلوتیناسیون اختصاصیت و حساسیت بالایی برای حیوانات آلوده شده به صورت تجربی و طبیعی دارد و قابلیت تکرار بالایی دارد. در مقایسه با نتایج به دست آمده با روش آنتی‌بادی درخشان غیر مستقیم به نظر می‌رسد که آگلوتیناسیون تستی قابل اعتماد برای تشخیص سرولوژیکی در گونه‌های مختلف حیوانی است و می تواند به عنوان تست دست اول در بسیاری از موقعیت ها جایگزین روش آنتی‌بادی درخشان غیر مستقیم شود (۱۶).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش آگلوتیناسیون در شناسایی میزان آلودگی به *نئوسپورا کنینوم* به خوبی با روش الیزای غیر مستقیم که با استفاده از کیت تجاری انجام شده بود رقابت می‌کند. البته شایان ذکر است که پکهام و همکاران ۱۹۹۸ نشان دادند این روش از حساسیت و اختصاصیت بیشتری نسبت به روش الیزا دارد (۱۶). بر اساس روش آماری آزمون کاپا دو روش مذکور دارای توافق بسیار خوب در تشخیص آلودگی بودند و در ضمن در آزمون مک نمار نیز دو روش فوق‌الذکر در تشخیص موارد مثبت و منفی تفاوت معنی-داری را نشان ندادند. نتایج نشان داد که دو روش در ۵۱ مورد مثبت دارای توافق و در ۱۱۸ مورد منفی نیز دارای تطابق بودند. در ۴ مورد تست آگلوتیناسیون نتیجه منفی نشان داده بود که در الیزای غیرمستقیم مثبت تشخیص داده شده بودند. همچنین در ۶ مورد تست آگلوتیناسیون نتیجه مثبت و در الیزای غیرمستقیم منفی تشخیص داده شده بود. لذا در مجموع با توجه به نتایج این پژوهش و گزارشات موجود می‌توان نتیجه گرفت که روش آگلوتیناسیون با استفاده از تاکی زوآیت تخفیف حدت یافته را به عنوان روشی مطمئن در تعیین میزان آلودگی به *نئوسپورا کنینوم* تلقی کرد.

نتیجه‌گیری نهایی

در جمع بندی نهایی نتیجه این مطالعه ثابت کرد که تاکی زوآیت تخفیف حدت یافته *نئوسپورا کنینوم* با استفاده از پاساژ طولانی روی رده سلولی همچنان ارزش تشخیصی دارد و میتوان از آن بعنوان آنتی ژن در روش اگلوتیناسیون برای تشخیص آلودگی *نئوسپورا کنینوم* استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

هزینه های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۱۱۱۶-۱۸-۸۴-۲ تامین گردیده است و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل اجرایی آن انجام گرفته است .

منابع مورد استفاده

1. Bartley, P.M., Wright, S., Sales, J., Chianini ,F., Buxton ,D ., and Innes, E.A.(2006). Long Term passage of tachyzoites in tissue

جدول ۱- نتایج مقایسه روش‌های الایزای غیرمستقیم و تست آگلوتیناسیون

روش مورد استفاده / نمونه	آگلوتیناسیون اصلاح شده(%)	الایزای غیر مستقیم (%)
نمونه‌های مثبت	۵۴(%۲۹/۳۴)	۵۹ (%۳۲/۰۷)
نمونه‌های منفی	۱۳۰(%۷۳/۹۱)	۱۲۵ (%۶۷/۹۳)
جمع کل	۱۸۴	۱۸۴

culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* Invivo. *Parasitology*, 133:421-432.

2. Bjo¨rkman, C., Alenius, S., Emanuelsson, U., Uggla, A., 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Veterinary Journal,* 159:201–206.

3. Chamberland, S., Current, L.W., 1990. Use of mouse macrophage cell lines for in vitro propagation of *Toxoplasma gondii* RH tachyzoites. Proceedings of the Society Experimental Biology Medicine, 150–157.

4. Değirmenci A1, Döşkaya M, Caner A, Ciçek C, Korkmaz M, Gürüz Y, Uner A. *Toxoplasma gondii* RH Ankara: production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Exp Parasitol*. 2011 May;128(1):1-8.

5. Döskaya M1, Degirmenci A, Ciçek C, Ak M, Korkmaz M, Gürüz Y, Uner A. Behaviour of *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain tachyzoites during continuous production in various cell lines. *Parasitology.* 2006 Mar;132(Pt 3):315-9. Epub 2005 Dec 1.

6. Dubey, J.P. Lindsay, D.S., Anderson, M.L., Davis, S.W., Shen, S.K. (1992). Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. J Am Vet Med Assoc, 201(5): 709-713.

7. Dubey, J.P., Buxton, D., and Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine Neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134: 267-289.

8. Dubey, J.P., Zarnke, R., Thomas, N.J., Wong, S. K., Van Bonn, W., Briggs, M., Davis, J.W., Ewing, R., Mensea, M., Kwok, O.C.H., Romand, S., Thulliez, P., 2003. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, Sarcocystis neurona, and Sarcocystis canis-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, 116:275–296.

9. Hall, R., Ilhan, T., Kivar, E., Wilkie, G., Preston, P. M., Darghouth, M., Somerville, R. and Adamson, R. (1999). Mechanism(s) of attenuation of *Theileria annulata* vaccine cell lines. *Tropical Medicine and International Health* 4, A78–A84.

10. Hemphill, A., Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., Keller, N., Riesen, M., Guetg, N., Srinivasan, S. and Alaeddine, F., 2009. Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. *Microscopy and Microanalysis*, 10: 602–620.

11. Khordadmehr , M., Namavari ,M , Khodakaram-Tafti ,A., Mansourian, M., Rahimian, A., and Daneshbod, Y.(2013). Comparison of use of Vero cell line and suspension culture of murine macrophageto attenuation of virulence of *Neospora caninum*. *Research in Veterinary Science*, vol, 95 , pp:515–521.

12. Levine, N.D., 1988a. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 35, 518–520

13. Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. *Toxoplasmosis.* Lancet 363, 1965–1976

14. Namavari M, Hosseini MH, Mansourian M, Shams Z, Amrabadi O, Tahamtan Y, Moazeni-Jula F., Screening for causative infectious agents of abortion in Iran, *Online JVet Res*., 16 (3):147-153, 2012.

15. Namavari, M., Mansourian, M., Khodakaram-Tafti, A., Hosseini, M.H., Rahimiyan, A., Khordadmehr, M., Lotfi, M., 2011. Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of *Neospora caninum* tachyzoites. *Comparative Clinical Pathology*, 1346–1349.

16. 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: 467-473.

17. Ramamoorthy, S., Duncan, R., Lindsay, D.S. and Sriranganathan, N. (2007). Optimization of the use of C57BL/6 mice as a laboratory animal model for *Neospora caninum* vaccine studies. *Veterinary Parasitology* 145: 253-259

18. Razmi, G.R., Maleki, M., Farzaneh, N., Talebkhan Garoussi M. and Fallah, A.H.(2007). First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. *Parasitology Research* 100(4): 755-757

19. Reichel, M.P., Ellis, J.T., Dubey, J. P., 2007. Neosporosis and hammondiosis in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48: 308–312.

20. Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y., Hay, S.I., 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. Mar 10;434:214-7.

21. Suresh K1, Mak JW, Yong HS. 1991 Long term maintenance of *Toxoplasma gondii* (Rh strain) in Vero cell line and use of harvested antigens for immunodiagnosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. Dec;22 Suppl:124-8.

22. Wallach, M., 2010. Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. *Trends in Parasitology* 26, 382–387

23. Wilkins, M.F.,O'Connell,E., and TePunga,W.A. (1988).Toxoplasmosis in sheep III. Further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection flowing an experimental oral challenge. *New Zealand Veterinary Journal*,36:86-89.