DOI: 10.22092/vj.2017.114854.1346
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی واریته تخفیف حدت‌یافته نئوسپورا کنینوم به عنوان واکسن زنده تجربی در موش

• مریم صبوری
کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
• مهدی نام‌آوری (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی شعبه شیراز ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران
تاریخ دریافت: ۲۴-۰۵-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۰۸-۰۸-۱۳۹۶
Email: Namavari@yahoo.com

چکیده

تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم *(Neospora caninum)*، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل عفونی بروز سقط جنین در گله‌های گاو در سراسر جهان شناخته می‌شود و از این طریق خسارات بالایی را به صنعت گاوداری در جهان وارد می‌آورد. در حال حاضر بیشترین توجه در تحقیقات جهانی به سوی واکسن زنده معطوف گردیده است؛ در این تحقیق با ارزیابی واریته نئوسپورا کانینوم موسسه رازی در قالب واکسن سعی شده واکسن مؤثرتری برای عفونت نئوسپورا کانینوم یافت شود. ۱۶ موش ماده BALB/c بطور تصادفی به ۲ گروه مساوی شامل کنترل و گروه تخفیف حدت‌یافته تقسیم شدند و موش‌ها دو بار با واریته نئوسپورا کانینوم موسسه رازی ایمن شدند. بیست ویک روز بعد از ایمن سازی سرم از تمامی موشها جمع آوری گردید و آزمون‌های الیزا، گاما اینترفرون و PCR نیز بعد از چالش برای بررسی ایمنی ایجاد شده صورت پذیرفت. نتایج بررسی ایمنی هومورال و اینترفرون گاما نشان داد که در گروه ایمن شده پاسخ ایمنی ایجاد شد.کمترین نفوذ ژنوم تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم در بافت‌های این گروه را آزمون مولکولی نشان داد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که انجام تحقیقات روی سوش و واریته‌های تخفیف حدت یافته و غیر بیماری‌زای نئوسپورا کنینوم در راستای تهیه واکسن زنده محافظت‌کننده امید بخش می‌باشد.

کلمات کلیدی: نئوسپورا کانینوم، واکسن، تخفیف حدت‌یافته

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 116-122

Evaluation attenuated variety of *Neospora caninum* as experimental live vaccine in Mice

By: Saboury, M., MSC Microbiology, Islamic Azad University, Branch Shiraz, Iran. and Namavari, M., (Corresponding Author), Agriculture Research, Education and Extention Organization (AREEO), Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran.
Email: Namavari@yahoo.com

Received: 2017-08-15 **Accepted: 2017-10-30**

Neospora caninum is one of the most important agent cause abortion in cattle all around the world which can lead in economic loss in cattle herds. Currently, most attention is focused into the live vaccine . So far there is no effective vaccine against neosporosis since the aim of this study was to evaluate the attenuated variety of *N. caninum* as a potential live vaccine. Sixteen female mice BALB/c were divided randomly into conrtrol and attenuated groups. Twenty-one days after immunization, sera of all groups were taken and subjected for ELISA and gamma interferon (IFN-γ) tests. All mice were challenged by the NC-1 strain of *N. caninum*. One month after challenge tissue samples were collected for PCR. The results of ELISA and IFN-γ tests indicated that immune response generated in the vaccinated group. The results showed that the attenuated variety of *N. caninum* stimulated both humeral and cellular immune responses. The results indicated that investigations carried out on non-pathogenic strains and attenuated varieties of *Neospora caninum* to provide live and protective vaccine is promising.

Key words: *Neospora caninum*, Live vaccine, Attenuated

مقدمه

نئوسپورا کانینوم یک تک‌یاخته انگلی از شاخه‌اپی کمپلکسا (Apicomlexa)، می‌باشد که باعث ایجاد بیماری نئوسپوروزیس (Neosporosis) می‌گردد. این آلودگی به عنوان مهم‌ترین تک‌یاخته عامل سقط جنین و بیماری‌های تولیدمثلی در گاو و بیماری‌های عصبی ماهیچه‌ای در سگ محسوب می‌شود (۵). این تک یاخته شباهت‌های مورفولوژیکی و بیولوژیکی بسیاری به توکسوپلاسما گوندئی (*Toxoplasma gondii*) دارد (۶). انتشار این انگل محدود به منطقه جغرافیایی خاصی نمی‌شود و در سرتاسر جهان یافت می‌شود و تصور بر این است که در هر منطقه‌ای نشخوارکنندگان و سگ‌سانان وجود داشته باشند، این بیماری نیز شیوع دارد. در همین راستا به عنوان عامل اصلی و مهم سقط جنین در گله‌های گاو در بسیاری از کشورها از جمله ایران شناخته شده است (۱۹). گزارشات نشان می‌دهد سقط جنین گاو بدلیل آلودگی به نئوسپورا در نواحی مختلف ایران از ۱۵،۵ و ۱۸،۴ درصد بوده و در گزارشات اخیر این میزان تا ۳۳ درصد نیز اعلام گردیده است (۱۹، ۱۶، ۱۵). ضررهای اقتصادی که به دلیل این آلودگی رخ می‌دهد برای اولین بار توسط Dubey مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که خسارات ناشی از این تک یاخته در گله‌های گاو و صنایع گاوداری در سراسر جهان بسیار هنگفت می‌باشد (۲۰).

اخیرا با جمع‌آوری واکسن تجاری نئوگارد (Neoguard)، از بازار جهانی که یک واکسن کشته بود، توجهات به سوی تولید واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته معطوف گردیده است (۲۲). همچنان که در مورد سایر تک یاخته‌هایی که واکسن به مرحله تجاری رسیده مانند توکسوپلاسما، بابزیا، تیلریا و کوکسیدیا از واکسن‌های زنده استفاده شده است (۱۲). بهترین شاهد مثال واکسن توکسوواکس برای توکسو پلاسما می‌باشد که بیشترین شباهت را نیز با نئوسپورا کنینوم دارد (۴،۱۲). امروزه واکسن زنده به عنوان وسیله‌ای مناسب جهت جلوگیری از ایجاد برخی بیماری‌های انگلی از جمله نئوسپوروزیس می‌باشند (۲۴). استفاده از انگل زنده بدلیل تحریک ایمنی سلولی و هومورال مناسب می‌باشد؛ در مطالعه قبلی مشخص گردید که واریته نئوسپورا کانینوم موسسه رازی تخفیف حدت قابل ملاحظه ایجاد شده است (۳)، براین اساس در این تحقیق با ارزیابی این واریته تخفیف حدت‌یافته نئوسپورا کانینوم در قالب واکسن آزمایشی سعی شده قدرت محافظت‌کنندگی و همچنین پاسخ ایمنی این واریته مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و آماده‌سازی آنتی‌ژن

تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم (موجود در موسسه رازی شعبه شیراز) درون فلاسک کشت سلولی حاوی رده سلولی Vero همراه با محیط کشت DMEM، ۲ درصد سرم جنین گاو، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر و ضد قارچ آمفوتریسین ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیترکشت داده شدند. وقتی ۸۰

تا ۹۰ درصد تخریب سلولی مشاهده شد تاکی‌زوئایت‌ها برداشت شدند.. تاکی‌زوئایت‌های سوش حاد و تخفیف حدت یافته‌ی نئوسپورا کانینوم پس از جمع‌آوری از روی سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شدند تا دوزهای مورد نظر جهت تزریق آماده گردید (۳).

حیوانات و طرح آزمون

از موش‌های ماده BALB/c با سن ۳ تا ۴ هفتگی و وزن میانگین ۱۸ تا ۲۲ گرم استفاده شد. ۱۶ سر موش به صورت تصادفی به ۲ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. هر گروه در قفس‌های جداگانه قرار داده شد و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند، و از غذا و آب مخصوص حیوانات آزمایشگاهی برای تغذیه استفاده گردید. گروه‌های تزریقی به صورت گروه ایمن‌شده با واریته تخفیف حدت یافته در مقایسه با گروه کنترل مورد آزمون قرار گرفتند.

دوز تزریقی برای گروه واکسینه روی 5×10^{6} تنظیم گردید و در دو مرحله با فاصله دو هفته تزریق به صورت زیر پوستی انجام شد گروه کنترل نیز به همین روش دو نوبت محیط کشت سلولی دریافت کردند. تمامی موش‌ها به صورت روزانه بررسی و نشانه‌های بیماری و تلفات احتمالی موش‌ها ثبت می‌گردید. ۲۱ روز بعد از تزریق از تمامی موش‌های زنده مانده جهت انجام آزمایش الیزا خون‌گیری شد و سپس سرم آنها جدا شد. آزمایش ELISA بر اساس روشی که ویلیام و همکاران (۱۹۹۷) ارائه کردند، انجام گرفت (۲۳). در این روش از 2×10^{6} تاکی زوئایت نئوسپورا کانینوم کشته و فیکس شده توسط فرمالین در هر چاهك پلیت ELISA به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد و سرم‌ها نیز با رقت ۱/۵۰مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج، با دستگاه ELISA reader و طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

برای بررسی ایمنی سلولی نیز از کیت تجاری Shanghaicrystal برای اندازه‌گیری فاکتور ایمنی گاما اینترفرون استفاده شد و آزمون طبق دستورالعمل کیت مزبور انجام گرفت.

چالش

تمام موش‌ها یک ماه بعد از تزریق دوم با دوز $2/5\times10^{6}$ نئوسپورا کانینوم NC-۱ چالش شدند (۱۸) و به صورت روزانه تا آخر زمان پژوهش یعنی ۴ هفته پس از چالش مورد بررسی قرار گرفتند تا هرگونه تغییر در حالت موش‌ها و یا مرگ احتمالی آن‌ها ثبت گردد.

آزمون مولکولی PCR

جهت انجام واکنش PCR به منظور تشخیص حضور یا عدم حضور ژنوم انگل مورد نظر در بافت‌های مغز و کبد از جفت پرایمر Np21-plus :5'–gtg cgt cca atc ctg taa c– 3' و Np6-plus :5'–cag tca acc tac gtc ttc – 3' که از ناحیه ژنوم Nc-۵ تک یاخته نئوسپورا کنینوم می‌باشد استفاده شد (۲۵). بافت‌های مغز و کبد تمامی موش‌ها در روز ۲۸ پس از چالش برای آزموت مولکولی جمع‌آوری شد و در ابتدا DNA از بافت‌های مورد نظر استخراج گردید. استخراج از ۲۵ میلی‌گرم بافت و با استفاده از کیت DNP™ Kit) (CinnaGen انجام شد. سیکل‌های دمایی به ترتیب ذیل بود:

۱. ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه
۲. ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ ثانیه
۳. ۵۳ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ ثانیه برای هر سیکل (جمعا ۳۵ سیکل)
۴. ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه
۵. ۷۲درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه
۶. ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه

پس از اتمام واکنش محصول PCR برروی ژل آگار مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به این‌که نمونه مثبت بر روی ۳۲۸ جفت باز باند می‌دهند، نمونه‌های قرار گرفته در این باند مثبت ارزیابی گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از جمع‌آوری اطلاعات، داده‌ها شامل تیتر آنتی‌بادی و گاما اینترفرون با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ و آزمون t-test مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج مرگ و میر در گروه‌های مورد مطالعه

بعد از تزریق دوز چالش، هیچگونه مرگ و میری در گروه‌های مورد آزمایش بروز نداد. با این وجود، موش‌های گروه کنترل بعد از شروع هفته دوم

جدول ۱- نتایج آزمون مولکولی نمونه‌های بافتی. تعداد نمونه‌هایی که از نظر وجود ژنوم نئوسپورا کانینوم مثبت ارزیابی شده‌اند در جدول به تفکیک هر گروه مشخص شده است.

گروه‌ها / نمونه‌ها	موش‌های ایمن شده با واریته تخفیف حدت یافته	گروه کنترل
مغز	۰	۸
کبد	۲	۸

بعد از چالش علائمی مانند قوز کردن و ضخیم شدن پوشش بدن را نشان دادند ولی در گروه ایمن‌شده علائمی از بیماری نئوسپورزیس دیده نشد.

نتایج ایجاد ایمنی سلولی و هومورال

در انتهای هفته‌ی سوم آزمون الایزا جهت بررسی پاسخ ایمنی و تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم انجام شد. میانگین تیترهای سرمی بدست آمده در هر گروه با یکدیگر مقایسه شد. نتایج آزمایش سرمی الایزا نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در تیتر آنتی‌بادی گروه‌های دریافت کننده‌ی تاکی‌زوئایت نئوسپورا کانینوم تخفیف حدت یافته نسبت به گروه کنترل بود ($p < ۰/۰۵$)، (نمودار ۱).

همچنین نتایج گاما اینترفرون نشان داد که افزایش قابل ملاحضه‌ای در گروه ایمن شده با واریته تخفیف حدت‌یافته بوجود آمده (نمودار ۲). به علاوه در میزان گاما اینترفرون تولید شده در گروه واکسینه با گروه کنترل از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($p < ۰/۰۵$).

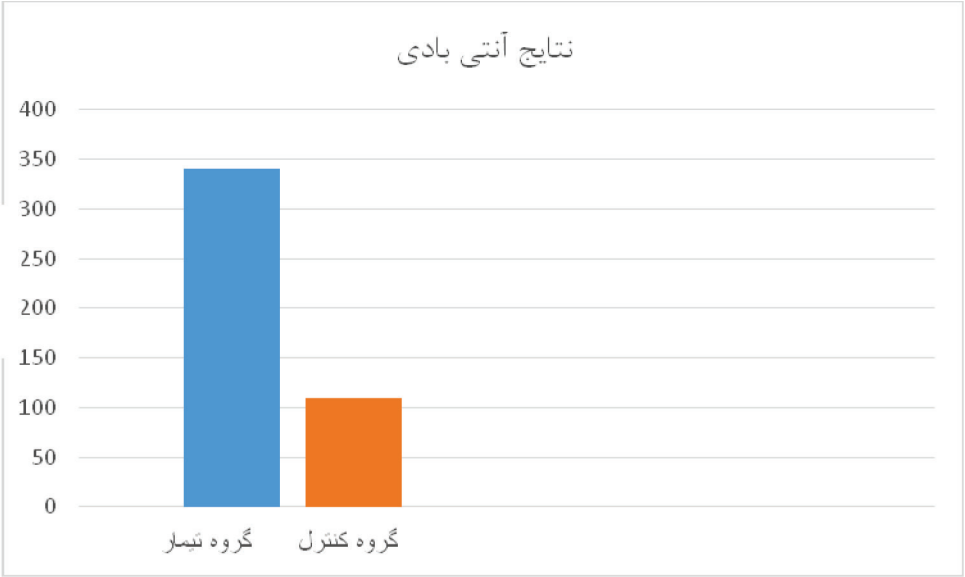
نتایج آزمون مولکولی

نتایج آزمون مولکولی در مرحله دوم در جدول ۱ نشان داده شده است. در موش‌های گروه ایمن شده با تک‌یاخته تخفیف حدت یافته نئوسپورا کانینوم، نتیجه تست مولکولی در بافت‌های مورد مطالعه منفی شد که این موضوع نشان می‌دهد این واکسن آزمایشی قادر به جلوگیری از نفوذ انگل و ایجاد ایمنی محافظت‌کننده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

برای بسیاری از بیماری‌های ناشی از تک‌یاخته‌های بیماری‌زا واکسن زنده به عنوان وسیله‌ای مناسب جهت جلوگیری از ایجاد بیماری‌های انگلی محسوب می‌شود (۱۲). به علاوه ثابت شده که سویه‌های تضعیف شده طبیعی برای جلوگیری از نئوسپوروزیس بسیار کارآمد می‌باشند (۲۴). مطالعات نشان می‌دهد مهم‌ترین روش انتقال نئوسپورا کانینوم انتقال عمودی می‌باشد و از این طریق باعث بروز سقط جنین در گاو می‌شود. محققان با آزمایش دو جدایه Nc-Nowra و NC-Spain IH بر روی موش نشان دادند که این دو جدایه از حدت پایین‌تری نسبت به بقیه جدایه‌ها برخوردارند و هیچ‌گونه علائم بیماری و مرگ و میر ناشی از آلودگی را بروز نمی‌دهند (۲۲،۱۳،۸). امروزه واکسن زنده به عنوان وسیله‌ای مناسب جهت جلوگیری از ایجاد برخی بیماری‌های انگلی از جمله نئوسپوروزیس می‌باشند (۱۲،۲۴)؛ لذا از این منظر انتخاب یک واریته غیر بیماری‌زا در قالب واکسن زنده در این پژوهش را تایید می‌کند.

در مطالعه حاضر نتیجه آزمون الیزا نشان داد که میزان آنتی‌بادی سرمی تولید شده در گروه تزریق‌شده با واریته تخفیف حدت یافته نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری بیشتر است که نشان‌دهنده ایجاد پاسخ ایمنی هومورال متعاقب تزریق واکسن می‌باشد. در مطالعات قبلی ثابت گردیده که در کنترل عفونت نئوسپورا کنینوم هم ایمنی هومورال و هم ایمنی سلولی نقش دارند (۲۴). همچنین نتیجه اینترفرون گاما نشان داد که پاسخ ایمنی سلولی نیز در گروه واکسینه تحریک شده است. باید

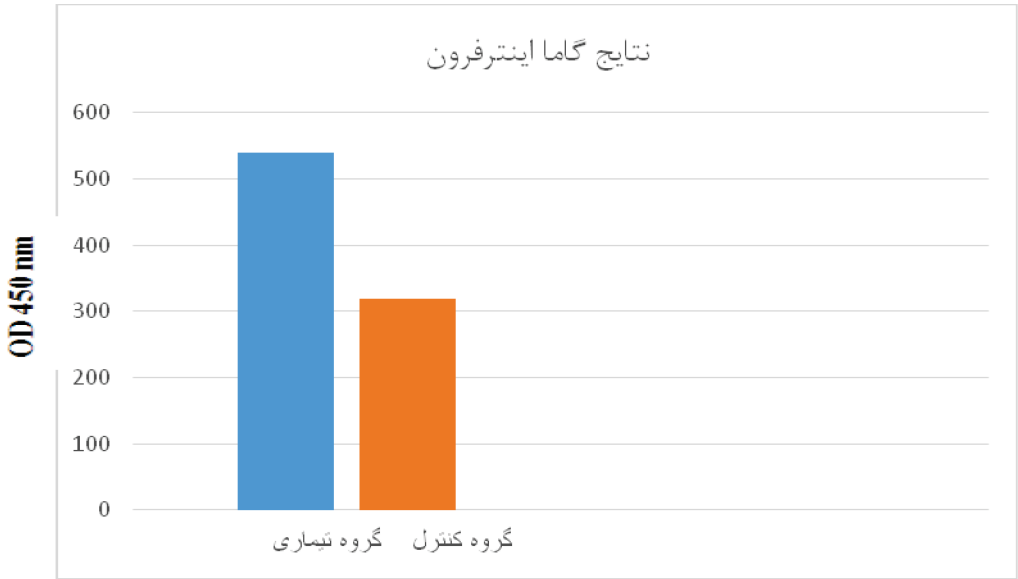


نمودار ۱- نتایج آزمون الیزا در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. در نمودار میزان ایجاد پاسخ ایمنی در گروه ایمن شده با تک یاخته تخفیف حدت یافته نئوسپورا کانینوم نسبت به گروه کنترل بالاتر است، و بالا بودن پاسخ ایمنی هومورال در این گروه نسبت به گروه کنترل بسیار بارزتر می‌باشد.

توجه داشت که همچون دیگر تک‌یاخته‌های بیماری‌زای داخل سلولی، پاسخ‌های ایمنی وابسته به سلول دارای نقش مهمی در جلوگیری از تکثیر نئوسپورا کانینوم در سلول‌های بدن میزبان هستند (۵). پاسخ‌های ایمنی Th۱ شامل انواع سیتوکین‌های التهابی مثل اینترفرون گاما، نقش مهمی در حفاظت از بدن مبزبان در برابر نئوسپورا کانینوم ایفاء می‌کنند (۱۷). به علاوه مطالعات نشان داده تولید سایتوکین‌های تنظیمی مثل اینترلوکین ۱۰ و گاما اینترفرون می‌تواند تعیین‌کننده مرگ یا زنده ماندن جنین باشند (۲).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که واریته تخفیف حدت یافته قادر است بخوبی هم پاسخ ایمنی هومورال و هم ایمنی سلولی تحریک کند .در مطالعات انجام شده مشخص شده که ترکیبی از پاسخ ایمنی هومورال و سلولی برای محافظت بر علیه نئوسپورا کانینوم در گاو و جلوگیری از سقط جنین الزامی است (۱۱،۱۰)؛ لذا در تحقیقات تولید واکسن بر علیه نئوسپوروزیس سعی بر تهیه واکسنی با قابلیت تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی می‌باشد. در پژوهش حاضر نیز این واریته از قابلیت تولید هر دو ایمنی سلولی و هومورال برخوردار بود و در هر دو حالت در میزان بالایی قرار داشت که در مقایسه با گروه کنترل، دارای تفاوت قابل ملاحظه و معنی‌داری بود.

واکنش زنجیره پلی‌مراز، دقت زیادی در تشخیص نئوسپورا کانینوم دارد (۲۵)؛ در این مطالعه نیز برای تشخیص نفوذ انگل در بافت‌ها مورد استفاده قرار گرفت که مشخص شد در گروه ایمن شده نفوذ تک‌یاخته حاد در اعضای حیاتی کبد و مغز متعاقب چالش بخوبی در مقایسه با گروه کنترل مهار شده است. برای بررسی ژنومی بافت مغز بیشتر مورد توجه است چرا که کیست‌های بافتی معمولا در بافت عصبی مثل مغز و نخاع تشکیل می‌شوند و می‌توانند تا مدت‌های طولانی بدون نشان دادن علائمی در بدن میزبان واسط باقی بمانند (۷)؛ لذا در صورت عدم نفوذ ژنوم به این بافت می‌توان تا حد زیادی به ایمن بودن واکسن اطمینان داشت. واریته تخفیف حدت‌یافته مورد استفاده در این مطالعه قبلا مشخص شده تا دوز ۲۰ میلیون تاکی زوئایت نیز منجر به مرگ و میر در موش نمیشود در حالیکه در مورد سوش حاد با این دوز تمامی موش‌های مورد ازمایش تلف شدند سوش حاد با حمله و تکثیر به اعضای حیاتی مانند قلب کبد مغز و تکثیر در این اندام‌ها باعث مرگ میر می‌گردد(۳) نتیجه این بررسی ضمن تایید مطالعات قبلی در غیر بیماریزا بودن این واریته نشان داد که این واریته با ایجاد ایمنی هومورال و سلولی توانسته موش‌ها را در مقابل چالش و نفوذ سوش حاد به اندامهای حیاتی مانند مغز و کبد بخوبی محافظت نماید و مانع از ایجاد تلفات و بیماری در گروه واکسینه گردد (۱،۳). در مطالعه دیگری همین واریته را در جلوگیری از ایجاد سقط جنین در موش باردار مورد مطالعه قرار دادند و مشخص گردیدکه این واریته توانایی جلوگیری از انتقال عمودی را نیز دارا می‌باشد. بطوری‌که بافت‌های بچه موش‌های متولد شده از مادر واکسینه و چالش شده با سوش حاد نیز در آزمون مولکولی برای شناسایی نئوسپورا منفی بودند (۹).



نمودار ۱- نتایج آزمون الیزا در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. در نمودار میزان ایجاد پاسخ ایمنی در گروه ایمن شده با تک یاخته تخفیف حدت یافته نئوسپورا کانینوم نسبت به گروه کنترل بالاتر است، و بالا بودن پاسخ ایمنی هومورال در این گروه نسبت به گروه کنترل بسیار بارزتر می‌باشد.

نتایج این مطالعه نظیر پژوهش‌های قبلی که روی سوش تخفیف حدت‌یافته موسسه رازی انجام شد نشان داد که این سوش می‌تواند با ایجاد ایمنی هومورال و سلولی و همچنین جلوگیری از نفوذ و انتقال عمودی نئوسپوراکنینوم زمینه مناسبی را برای انجام تحقیقات کاربردی در راستای تهیه واکسن زنده ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

هزینه انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی شعبه جنوب کشور (شیراز) در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره۹۵۰۰۶۱-۰۰۹-۱۸-۸۴-۲ تأمین گردیده است و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل اجرایی ان انجام گرفته است.

منابع مورد استفاده

1) Abdeyazdan A., Namavari M.M. 2015. Effect of inactivated *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on immune markers and transplacental transmission in pregnant BALB/c mice. *Online Journal of Veterinary Research.* 19:689-697.

2) Almeria, S., Araujo, R., Tuo, W., Lopez-Gatius, F., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., (2010). Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Veterinary Parasitology* 169, 304–311

3) Beigi P., Namavari M.M., Razmi N. 2017. Study on the attenuation of *Neospora caninum* after continuous passage on J774 cell line. *Veterinary Journal (Pajouhesh and Sazandegi)*, 115: 128-135.

4) Buxton D. 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitology Today*, 9: 335–337.

5) Dubey J.P., Schares G., Ortega-Mora L.M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum. Clinical Microbiology Revew*, 20:323-67.

6) Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals–the last five years. *Vet. Parasitol.* 180, 90–108.

7) Dubey, J.P., Lindsay, D.S., (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Veterinary Parasitology 67, 1–59.

8) Hecker Y.P., Venturini M.C., Campero C.M., Odeón A.C., Moore D.P. 2012. Avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis bovina. *Review Argentin Microbiology*, 44: 216-230.

9) Hemmati M. 1395. Study of experimental *Neospora caninum* vaccine in pregnant mice, Payam nour university, Tehran.

10) Innes, E.A. 2007. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum. Parasitology*, 134:1903–1910.

11) López-Gatius F., Hunter R.H., Garbayo J.M., Santolaria P., Yániz J., Serrano B., Ayad A., de Sousa N.M., Beckers J.F. 2007. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) in high producing dairy cows suffering early fetal loss during the warm season. *Theriogenology*. 67:1324-30.

12) McAllister M.M. 2014. Successful vaccines for naturally occurring protozoal diseases of animals should guide human vaccine research. A review of protozoal vaccines and their designs. *Parasitology,* 141:624-40.

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

14) Monney T., Debache K., Hemphill A. 2011. Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* Infection. *Animals*, 1: 306-325.

15) Namavari M., Mansourian M., Khodakaram Tafti A., Hosseini M.H., Rahimiyan A., Khordadmehr M., Lotfi M. 2012. Application of chicken embryonated eggs as a new model for evaluating the virulence of *Neospora caninum* tachyzoites. Seminested PCR for diagnosis of Neospora caninum infection in cattle, *Archive of Razi*, 59:55-64.

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

17) Omata H., Kamiya R., Kano Y., Kobayashi R., Maeda A., Saito. 2006. Footpad reaction induced by *Neospora caninum* tachyzoite extract in infected BALB/c mice. *Veterinary Parasitology*, 139:102–108.

18) Ramamoorthy, S., Lindsay, D.S., Schurig, G.G., Boyle, S.M., Duncan, R.B., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N. (2006) Vaccination with gamma-irradiated *Neospora caninum* tachyzoites protects mice against acute challenge with *N. caninum, Journal of Eukaryot Microbiology*. 53: 151-6.

19) 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: 755-757.

20) Reichel M.P., McAllister M.M., Pomroy W.E., Campero C., Ortega-Mora L.M., Ellis J.T. 2014. Control options for *Neospora caninum* - is there anything new or are we going backwards? *Parasitology*, 25:1-16.

21) Rojo-Montejo S., Collantes-Fernández E., Blanco-Murcia J., Rodríguez-Bertos A., Risco-Castillo V., and Miguel Ortega-Mora L. 2009. Experimental infection with a low virulence isolate of Neospora caninum at 70 days' gestation in cattle did not result in foetopathy. *Veterinary Research*, 40: 49.

22) Rojo-Montejo S, Collantes-Fernandez E, Perez-Zaballos F, Rodriguez-Marcos S, Blanco-Murcia J, Rodriguez-Bertos A, et al. (2013). Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous chal-

lenge in early and mid-gestation. *Veterinary Research*, 44:106-?.
23) Williams D. J. L., McGarry J., Guy F., Barber J. and Trees A. J. 1997. Novel ELISA for detection of Neospora-specific antibodies in cattle. *Veterinary Record*, 140: 328–331.
24) Williams D. J., Guy C. S., Smith R. F., Ellis J., Björkman C., Reichel M. P. and Trees, A. J. 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infection and Immunity*, 75: 1343–1348.
25) Yamage M., Flechtner O., Gottstein B. 1996. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Parasitology,* 82:272-279.