

Neospora caninum 국내 분리주의 마우스 감염실험

배지선 · 김재훈* · 허 권 · 김기석* · 황우석 · 최양규** · 현병화** · 김대용

서울대학교 수의과대학
국립수의과학검역원* · 생명공학연구소**
(2000년 2월 25일 접수)

Experimental infection of Korean *Neospora caninum* isolates in mice

Ji-seon Bae, Jae-hoon Kim*, Kwon Hur, Ki-suk Kim*, Woo-suk Hwang,
Yang-kyu Choi**, Byung-hwa Hyun**, Dae-yong Kim

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
National Veterinary Research and Quarantine Service*
Korea Research Institute of Biosciences and Biotechnology**

(Received Feb. 25, 2000)

Abstract : This study was carried out to investigate the pathogenicity of Korea *N. caninum* isolates, KBA-1 and KBA-2 on SCID mouse following 3 different routes of infection. NC-1 was served as reference isolate. The pathogenicity was evaluated by progression of clinical signs, histopathology and immunohistochemistry. Pathogenicity of KBA-2 appears to be stronger than that of KBA-1 but weaker than that of NC-1. Progress of clinical signs and lesion distribution and pattern of each isolates were similar when the isolates were infected either subcutaneously or intraperitoneally. However, oral inoculation of tachyzoites failed to induce the infection.

Key words : *Neospora caninum*, SCID mice, infection, pathogenicity.

서 론

Neospora(N) caninum 은 분류학상 Apicomplexa문, Coccidia아강, Sarcocystidae과에 속하는 원충으로서 소와 개 등에서 유산과 신경증상 등을 일으키는 것으로 알려져

있고 이외에도 염소, 양, 말, 사슴 등에서 자연발생이 확인되었다. 또한 고양이, 마우스, 돼지, 원숭이 등에서 실험감염이 보고되었다¹. 이중 소의 neosporosis는 전 세계적일 발생분포를 나타내고 있으며, 한국에서는 김 등²이 젖소 유산태아에서 *N. caninum* 감염을 최초로 보고한 바 있으며, 김 등³은 본 원충감염으로 인한 동일한 소

본 연구는 농림부 기획과제(399002-3)에 의해 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Dae-yong Kim, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea. E-mail : daeyong@plaza.snu.ac.kr

의 반복 유산을 증명하기도 하였다. 또한 허 등⁴은 국내 사육젓소에 대해 *N. caninum* 항체 보유율을 조사 보고하였다.

*N. caninum*은 Bjerkås *et al*⁵에 의해 부전마비를 보이다가 폐사한 개로부터 처음으로 발견되었으며, Dubey *et al*⁶에 의해 *N. caninum*으로 명명되었고 같은 해 Dubey *et al*⁷은 후구마비를 보인 개에서 본 원충을 처음으로 분리하였다. 지금까지 미국과 영국에서 개로부터 원충을 분리해내었으며^{7,8} 미국과 스웨덴, 일본, 한국 및 영국에서 소로부터 원충을 분리보고 하였다⁹⁻¹³. 한편 Marsh *et al*¹⁴은 말에서 원충을 분리, *N. caninum*과의 분자생물학적 차이를 들어 *N. hughesi*라는 새로운 species로 보고한 바 있으나 현재까지는 *N. hughesi*가 진정한 의미에서의 *N. caninum*인지 논란이 많다.

현재 이들 분리주들에 대한 병원성과 항원성 그리고 분자생물학적 특성 등에 대한 연구가 진행되고 있다. Lindsay *et al*¹⁵은 개 유래 분리주인 NC-1과 NC-2의 병원성을 비교하여 NC-1이 NC-2에 비해 병원성이 높은 것을 확인한 바 있으며, Lindsay *et al*¹⁶은 NC-1과 NC-3의 병원성을 비교하여 NC-1이 NC-3에 비해 병원성이 높은 것을 확인하였다. 또한 Atkinson¹⁷은 개 유래 분리주인 NC-Liv와 스 유래 분리주인 NC-SweB1의 병원성을 비교하여 NC-Liv이 NC-SweB1에 비해 병원성이 높은 것을 확인하였다. 한편 Lindsay¹⁸은 각 감염경로별로 원충의 생활환의 일부를 이루고 있는 tachyzoite와 bradyzoite의 병원성을 비교한 바 있다.

국내에서는 김 등¹²이 처음으로 국내 젓소의 유산 태아로부터 본 원충을 분리하였으며 변역조직화학 염색과 전자현미경적 특성과 IFA를 통한 항원성 시험 등을 통해 본 원충이 *T. gondii* 등 다른 유사 원충과는 구별되는 *N. caninum*임을 확인한 바 있다. 본 실험은 *N. caninum* 국내 분리주의 마우스에 대한 병원성을 확인하기 위해서 수행되었다.

재료 및 방법

공시원충 및 tachyzoite 준비 : *N. caninum*의 국내 분리주로서는 KBA-1과 KBA-2를 사용하였으며, 외국 분리주로서는 NC-1을 사용하였다. 원충은 원충이 신장 단층 세포(Vero cell; CRL6318, ATCC, MD)에서 5일에서 7일간격으로 계대 유지되었으며, 배지로는 Minimum Essential

Medium(MEM;GIBCO BRL, Grand Island, NY)에 10% 말혈청(GIBCO BRL, Grand Island, NY), 4mM L-glutamine MEM vitamin solution(GIBCO BRL, Grand Island, NY), MEM essential amino acid solution(GIBCO BRL, Grand Island, NY), MEM non-essential amino acid solution(GIBCO BRL, Grand Island, NY), antibiotic-antimycotic(100 unit/ml penicillin G, 100)4/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B; GIBCO BRL, Grand Island, NY), 7.5% sodium bicarbonate를 첨가하여 사용하였다. 배양조건은 37℃, 5% CO₂를 유지하였다.

마우스에 접종할 tachyzoite는 *N. caninum*이 약 75% 정도 감염되어 있는 vero cell을 cell scraper로 긁어 수확한 후 주사바늘로 세포를 2~3회 붓피시키고 5µm filter로 세포붕괴물을 제거한 후 차가운 0.01M PBS(Phosphate Buffered Saline)에 2,000rpm에서 5분간 원심, 세척하였다. 혈구 계산판을 이용하여 tachyzoite의 수를 측정하였으며 감염력을 유지하기 위하여 접종은 1~2시간 내에 수행되었다.

실험동물 : 대상 마우스는 생명공학연구소에서 분양 받은 4~5주령의 20~25g 되는 SCID 마우스를 1주일간 실험실에서 순화시킨 후 사용하였으나 알 수 격리시켜 대조군과 함께 동거 사육시켰다. Positive rack(살광)에서 온도는 22±2℃, 습도는 55±10%로 유지시키고 멸균사료와 121℃에서 20분간 고온 멸균처리된 수돗물을 자유 섭취하도록 하였다. 모든 실험은 cage, 깔짚 온도 역시 동일한 조건으로 고온 멸균처리하였다.

실험동물 접종 : 2×10⁶개/ml의 KEA-1, KBA-2와 NC-1 tachyzoite를 HBSS에 부유하여 각각 2마리의 마우스에 복강 접종하였으며 2마리의 마우스는 HBSS(Hanks balanced salt solution, GIBCO BRL, Grand Island, NY)만 부강 투여하여 대조군으로 삼았다. 또한 국내 분리주의 접종경로별 감염양상을 비교 확인하고자 동량의 tachyzoites를 마우스에 복강 및 피하접종하였으며 경구접종의 경우에는 접종량을 달리 2×10⁶개/ml, 10⁷개/ml, 2×10⁷개/ml의 감염력 있는 tachyzoite를 각각 마우스에 경구 감염시켰다.

임상증상 및 폐사양상 관찰 : 접종후 매일 신장증상의 발현 등 임상증상을 관찰하였으며 폐사 여부를 확인하였다.

병리조직학적 검사 : 폐사되거나 폐사 직전 마우스를 안락사 시켜 부검을 실시하였으며 경구접종의 경우에는 임상증상의 발현없이 건강하게 살아남은 마우스는 각각 26, 27, 40일째 부검을 실시하였다. 일반적인 부검술식을

따라 부검하여 육안병변을 관찰한 후 뇌, 척수, 폐장, 심장, 횡격막, 간장, 비장, 췌장, 위, 장, 신장, 부신, 근육, 침샘, 눈, 피부, 난소, 자궁, 고환, 부고환, 전립샘 등의 전장기를 채취하여 10% 중성 포르말린에 24시간 고정하였다. 일반적 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 4 μ m로 박절하여 hematoxylin과 eosin(H&E)으로 염색하였다.

면역조직화학적 검사 : 위 장기들을 4 μ m로 박절한 후 탈파라핀시키고 3% H₂O₂가 함유된 methanol에서 5분, 0.1% pronase로 37℃에서 10분간 처리한 후 0.1% gelatin에 희석한 5% 정상 토끼 혈청으로 37℃ 습상에서 20분간 반응시켰다. 일차항체는 1:3,000으로 희석한 *N. caninum* hyperimmune serum(VMRD, Inc., Pullman, USA)을 37℃에서 30분간 처리한 다음 차가운 10% Triton-X 함유 Tris buffer(TTBS-HS/Tx)로 수세하였다. 이차항체는 biotinylated anti-goat IgG(Vector Lab Inc., Burlingame, USA)를 1:200으로 희석하여 37℃ 습상에서 20분간 반응시간 뒤 avidin-biotin complex 용액에 20분간 작용시키고, 3,3'-diaminobenzidine으로 발색시켰다.

결 과

임상증상 및 폐사양상 관찰결과 : 폐사양상을 비교 확인하고자 국내 분리주 KBA-1과 KBA-2를 복강 접종한 군은 각각 접종후 21일에서 29일과, 15일에서 25일 사이에 모두 폐사하였으며 외국 분리주 NC-1은 15일에서 21일 사이에 모두 폐사하였다. 국내 분리주의 접종경로별 감염양상을 비교 확인하고자 KBA-1을 복강 접종한 군은 접종후 17일경부터 피모가 거칠어지고 활동성이 둔해지다가 22일에서 26일 사이에 신경증상없이 서서히 쇠약해지면서 기동이 없어지다 폐사되거나 임상증상이 심해서 안락사 시켰다. KBA-2를 접종한 군은 복강 접종후 14일경부터 피모가 거칠어지고 수척해지면서 19일경부터 활동성이 둔감해졌고, 군으로부터 이란, 침울 등의 모습을 보였으며, 20일에서 27일 사이에 주종한 10마리 모두 조측 또는 우측으로 전회, 경련, 좌측 또는 우측 전지 마비, 좌측 또는 우측으로 사경 등의 신경증상과 거립불능, 혼수상태 등의 증상을 보이다가 일부는 폐사되거나 일부는 죽기 직전 안락사 시켰다.

피하접종군은 KBA-1과 KBA-2 모두 복강 접종군과 비슷한 시기에 폐사되었으나 경구접종한 군은 접종량에 상관없이 별다른 임상증상을 발현하지 않았다.

병리학적 검사 및 면역조직화학적 검사결과 : 복강 혹은 피하접종한 마우스는 *N. caninum* 분리주에 상관없이 전신 장기에서 병변이 관찰되었으며 병변의 분포와 양상이 서로 유사하였고 두 분리주 모두 특히 췌장과 뇌, 부신에서 병변이 심하게 관찰되었다. 췌장의 실질은 다발성으로 혹은 광범위하게 괴사되어 있었으며 괴사부와 췌장 간질에 임파구와 혈질세포가 심하게 침윤되어 있거나 대식구 침윤과 함께 섬유아세포가 증식되어 있었다(Fig 1A). 일부 acinar cell의 세포질 내에 원충이 감염되어 분열증식하고 있는 것이 관찰되었다.

뇌는 대뇌 회색질과 백색질, 소뇌의 백색질과 뇌줄기에 함께 병묘한 비화농성 괴사소가 다수 존재하였으며 일부의 소뇌 백색질은 해면화 되어 있기도 하였다(Fig 1B, 1C). 대체로 괴사소는 혈관 주변부에서 주로 관찰되었으며 괴사부 주변의 신경세포 세포질 내에서 집락을 형성하고 있는 원충을 확인할 수 있었으며 괴사부 실질에서도 다수의 tachyzoites가 침윤되어 있는 것이 면역조직화학 염색으로 확인되었다. 이 외에도 일부 가체에서는 위관성 원형세포 침윤과 뇌 기저막하강의 비화농성 괴막일 소견을 관찰할 수 있었다. 전형적인 두꺼운 벽으로 둘러싸여 있는 tissue cyst는 관찰되지 않았으나 염증세포의 동반없이 원충이 분열증식하면서 집락을 형성하고 있는 psuedocyst는 소수 관찰되기도 하였다. 한편 척추에서도 비화농성의 괴사성 뇌위조직은 관찰할 수 있었다. 부신은 피질과 수질에 걸쳐 국소적으로 한계 병묘한 괴사소가 존재하였으며 괴사소 주변으로 경미한 임파구 침윤과 부신세포의 세포질 내에서 분열증식하는 원충의 집락이 다수 관찰되었다(Fig 1D).

심근, 골격근, 횡격막에 중정도의 임파구, 혈질세포 등이 국소적으로 침윤되어 있었으며 간심유의 위축 및 괴사도 관찰되었다. 또한 위장관의 근육층 및 고유층에 경미하게 임파구가 침윤되어 있었으며 근육층과 고유 집막층 및 장 상피세포 세포질 내에 원충이 침윤, 분열증식하고 있었다. 이 외에도 폐장의 폐포벽에 원충이 집락을 형성하여 폐포강 내로 돌출되어 있기도 하였으며(Fig 1E), 간장의 문맥삼각주 주변, 전립샘 외벽 및 침샘에 경미하게 임파구 등이 침윤되어 있었다. 신장과 피부에서는 병변이 관찰되지 않았다.

병리조직학적 관찰시 병변이 확인되었던 모든 조직에서 면역조직화학 염색을 통해 괴사부 주변 실질에 tachyzoite가 침윤되어 있거나 염증반응이 동반되지 않은

실질의 세포질 내에 tachyzoite가 분열 증식하여 cluster를 형성하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 병리조직학적으로 병변이 관찰되지 않았던 난소와 자궁근(Fig 1F) 및 비장내 대식구 등에서도 원충이 감염되어 있는 것이 동일 방법을 통해 추가적으로 확인되었다.

그러나 경구 감염시켰던 군 및 동거 사육하였던 대조군은 병리조직학적으로 아무런 병변도 관찰할 수 없었으며 면역조직화학 염색시에도 원충을 확인할 수 없었다.

고 찰

마우스에 접종실험을 실시하여 병원성을 확인하고 비교해 본 결과, 두 분리주 모두 병원성이 확인됐으며, 두 분리주중 KBA-2가 KBA-1에 비해 병원성이 다소 높은 것으로 나타났다. 이는 복강 및 피하접종시 비록 KBA-1과 KBA-2의 폐사시기가 서로 유사하였으며 병리조직학적 조건도 KBA-1과 KBA-2가 유사하였으나 임상증상의 발현에 있어 KBA-2가 더 빨리 그리고 더 심하게 진행된 것으로 보아 KBA-2가 KBA-1에 비해 병원성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

외국에서는 Lindsay¹⁵가 마우스에 대한 임상증상의 발현시기와 감염여부 등에 따라 개 유래 분리주인 NC-1이 NC-2에 비해 병원성이 높은 것을 확인하였고, Lindsay¹⁶은 임상증상의 발현시기와 뇌 병변의 심한 정도로 보아 NC-1이 NC-3에 비해 병원성이 높은 것을 확인하였다. 같은 Apicomplexa문에 속하는 유사 원충인 *T gondii*는 대부분의 경우 마우스에 대해 병원성이 적은 편이라고 보고되어 있다. 그러나 Jacobs *et al*¹⁸은 양에서 분리된 *T gondii*는 마우스에 대해 병원성이 없었으나 돼지에서 분리해낸 *T gondii*는 마우스에 병원성을 나타내었다고 보고하였으며, Dubey¹⁹는 염소에서 분리한 *T gondii*가 마우스에 대해 병원성을 나타내었다고 보고하였다. 즉, 대부분의 *T gondii*의 경우 마우스에 대해 병원성이 적은 편이나 돼지나 염소 등 몇몇 동물에서 분리된 분리주는 병원성이 높게 나타나는 것으로 보아 이들 *T gondii*는 유래된 동물에 따라 마우스에 대한 병원성이 다른 것을 알 수 있다.

본 실험에서는 특히 개 유래 분리주인 NC-1이 국내 분리주에 비해 이른 폐사시기와 병리조직학적으로 심한 괴사성 병변을 보임으로써 현저히 높은 병원성을 보였다. 이는 Atkinson *et al*¹⁷이 Balb/C 마우스에 대한 개 유

래 분리주 NC-Liv와 소 유래 분리주 NC-SweB1의 병원성을 비교해 본 결과 체중감소의 정도 및 증상의 발현 정도가, NC-Liv이 NC-SweB1에 비하여 심하게 나타났으며 병리조직학적으로도 NC-Liv이 NC-SweB1에 비해 괴사성 병변과 염증반응이 더욱 심하게 나타나는 것을 확인한 것과 유사하였다. 그러나 또한 Atkinson *et al*¹⁷은 뇌 병변의 심한 정도로 보아 소 유래 분리주인 NC-SweB1이 개 유래 분리주인 NC-3 보다 병원성이 높은 것으로 추정하여 마우스에 대한 병원성의 발현유무가 유래된 동물에 따른 차이로만 볼 수 없음을 시사하였다. 따라서 본 연구에서도 개 유래 분리주가 소 유래 분리주에 비해 병원성이 높게 나타났으나 그 차이가 원충이 분리된 동물에 따른 차이라고 보기는 힘들며 이에 대해 언급하기 위해서는 다양한 동물로부터 분리동정된 원충의 수가 다수 확보되어 비교 연구되어야 할 것이다.

접종경로별 감염양상을 관찰해본 결과, 피하접종과 복강접종이 폐사시기, 임상증상의 발현, 상가별 병변의 양상 등에 있어 서로 유사한 감염양상을 띄었으나 경구 접종은 접종량에 상관없이 감염이 이루어지지 않았음을 확인할 수 있었다. 그러나 Lindsay *et al*¹은 methylprednisolone acetate(MPA)를 처리한 Swiss white mice에서 피하와 복강내 접종으로 감염을 유도하였을 뿐만 아니라 NC-1과 NC-2 tachyzoite와 bradyzoite를 경구투여하여 감염이 이루어진 것을 확인하였다. 또한 본 실험결과와는 달리 경구접종과 피하접종이 유사한 감염양상을 띄고 복강접종이 경구접종과 피하접종보다 더 빨리 폐사를 유발한다고 하였다. 경구접종은 위에서 분비되는 pepsin에 의해 tachyzoite가 죽기 때문에 실제적으로 tachyzoite에 의한 경구로의 원충감염은 힘든 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 KBA-1, KBA-2의 tachyzoite가 pepsin에 의해 감염력을 소실하여 감염이 이루어지지 않은 것으로 사료된다. 하지만 본 실험은 NC-1, NC-2 등 개 유래 분리주와 소 유래 국내 분리주간의 병원성 차이 및 pepsin에 대한 저항성 차이 때문일 수도 있으며 대부분의 경우 본 실험에서의 같이 tachyzoite에 의한 경구감염은 이루어지지 않은 것으로 보고되고 있다는 점을 고려하였을 때 병리조직학적으로 확인이 되었다고는 하나 실제로 접종중에 다른 경로를 통하여 감염이 이루어졌을 수도 있을 것이다. 그러나 bradyzoite가 tachyzoite 보다 pepsin에 저항성이 있다는 것을 고려해 볼 때 bradyzoite에 의한 경구투여는 감염이 가능할 것으로 사료되며 이는 앞으로

로 oocyst, bradyzoite, tachyzoite의 마우스에 대한 병원성을 비교함으로써 확인할 수 있을 것이다.

결론

국내에서 분리된 *N. caninum* 분리주, KBA-1과 KBA-2에 대한 마우스 감염실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 두 분리주 모두 마우스에 병원성을 나타냈으나 임상증상의 발현시기, 정도 및 병리조직학적 병변을 비교

해 보았을 때 KBA-2가 KBA-1에 비해서 병원성이 다소 높은 것을 확인할 수 있었으며, NC-1 보다는 병원성이 낮았다.

2. 접종경로에 따라서는 복강 및 피하접종시 폐사시기, 임상증상의 발현, 장기별 병변의 양상 등에 있어 서로 유사하였으나 경구접종의 경우에는 접종량에 상관없이 감염이 이루어지지 않았다.

3. 병리조직학적으로는 췌장과 뇌 부신에서 괴사성 병변이 가장 심하게 관찰되었다.

Legend for figures

Fig 1. A. Pancreas of mouse infected with *N. caninum* (KBA-2) showing severe subacute lymphoplasmocytic pancreatitis. H & E, $\times 200$. B. Brain of mouse infected with *N. caninum* (KBA-2) showing focal nonsuppurative necrotizing encephalitis. H & E, $\times 200$. C. Note cluster of *N. caninum* within necrotizing lesion of the brain. H & E, $\times 400$. D. Adrenal gland of mouse infected with *N. caninum* (KBA-1) showing severe nonsuppurative necrotizing inflammation. H & E, $\times 400$. Note intracytoplasmic cluster of *N. caninum* tachyzoites. E. Lung of mouse infected with *N. caninum* (KBA-1). Note the cluster of tachyzoites in the alveolar wall. ABC, $\times 400$. F. Uterus of mouse infected with *N. caninum* (NC-1). Note the cluster of tachyzoites in the endometrium. ABC, $\times 400$.

참 고 문 헌

1. Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol*, 84:349-367, 1999.
2. 김대용, 황우석, 김재훈 등. *Neospora* 에 의한 소 유산 발생. *대한수의학회지*, 37:607-612, 1997.
3. 김재훈, 황의경, 손현주 등. *Neospora caninum* 에 의한 젖소의 반복유산. *대한수의학회지*, 38:853-858, 1998.
4. 허 권, 김재훈, 황우석 등. 간접형광항체법을 이용한 국내 젖소의 *Neospora caninum* 에 대한 혈청역학적 연구. *대한수의학회*, 38:859-866, 1998.
5. Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd*, 70:271-274, 1984.
6. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *JAVMA*, 192:1269-1285, 1988.
7. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *JAVMA*, 193:1259-1263, 1988.
8. Barber JS, Trees AJ, Owen M, et al. Isolation of *Neospora caninum* from a British dog. *Vet Rec*, 133:531-532, 1993.
9. Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, et al. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitol*, 106:239-249, 1993.
10. Stenlund S, Björkman C, Holmdahl OJM, et al. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, 83:214-219, 1997.
11. Yamane I, Kohuho T, Shimura K, et al. *In vitro* isolation and characterization of a bovine *Neospora caninum* in Japan. *Res Vet Sci*, 63:77-80, 1997.
12. 김재훈, 손현주, 황의경 등. 국내 소에서 *Neospora caninum* 의 분리. *대한수의학회지*, 38:139-145, 1998.
13. Davison HC, Guy F, Trees AJ, et al. *In vitro* isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Res Vet Sci*, 67:103-105, 1999.
14. Marsh AE, Barr BC, Packham AE, et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcosistidae). *J Parasitol*, 84:983-991, 1998.
15. Lindsay DS, Dubey JP. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J Parasitol*, 76:410-413, 1990.
16. Lindsay DS, Lenz SD, Cole RA, et al. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J Parasitol*, 81:313-315, 1995.
17. Atkinson R, Harper PAW, Ryce C, et al. Comparison of the biological characterizations of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitol*, 118:363-370, 1999.
18. Jacobs L, Remington JS, Meiton ML. A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J Parasitol*, 46:23-28, 1960.
19. Dubey JP. Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. *Am J Vet Res*, 41(3):427-429, 1980.