

Neospora caninum 국내 분리주의 경시적 변화

배지선 · 김재훈* · 이종근 · 이병천 · 최양규** · 현병화** · 김대용

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

Sequential pathologic change of Korean *Neospora caninum* isolates in mice

Ji-seon Bae, Jae-hoon Kim*, Jung-keun Lee, Byung-chun Lee
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 Bioscience and Biotechnology**

(Received Feb 25, 2000)

Abstract : This study was performed to study the sequential clinical and pathologic changes of Korean isolate KBA-2 of *Neospora caninum* in SCID mice following intraperitoneal infection. Also the results of PCR and *in vitro* isolation was compared during the study. The infection appears to be disseminated hematogenously, when the infection was chased every 3 days up to 21 days following infection. The PCR method was determined to be more effective than *in vitro* isolation regarding early detection of the organism following infection.

Key words : *Neospora caninum*, PCR, isolation, dissemination, pathogenesis.

서 론

Neospora(N) caninum 은 *Toxoplasma gondii* 와 같이 cyst 를 형성하는 원충으로서 분류학상으로는 Apicomplex문, Coccidia아강, Sarcocystidae과에 속한다. *N. caninum* 은 소

와 개 등에서 유산과 신경증상 등을 일으키는 것으로 밝혀졌으며 고양이, 마우스, 랫드, 돼지와 원숭이 등에서 실험감염이 확인된 바 있다¹. 특히 소에 있어서 neosporosis는 전세계적인 발생분포를 나타내고 있으며 경제적으로도 큰 손실을 주고 있다. 한국에서는 김 등²에 의해서 *N. caninum* 감염에 의한 젖소의 유산증을 최초로 보

본 연구는 농림부 기획과제(399002-3)에 의해 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

Address reprint requests to Dr. Dae-yong Kim, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

고한 바 있으며, 김 등³은 원충감염으로 인한 동일한 소의 반복유산을 증명하기도 하였다. *N. caninum* 은 Dubey *et al*⁴에 의해 *N. caninum* 으로 명명되었고 같은 해 Dubey *et al*⁵은 후구마비를 보인 개에서 본 원충을 처음으로 분리하였다.

지금까지 미국과 스웨덴, 일본, 영국, 한국 등에서 소로부터 원충을 분리하는데 성공하였다⁶⁻¹⁰. 현재까지 각 분리주의 병원성과 항원성 및 ITS-1 region과 rRNA sequence, RAPD-PCR(Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction) 등의 기법을 통한 분자생물학적 특성에 관한 연구가 폭넓게 수행되고 있다^{7,11-14}.

*N. caninum*의 감염경로로는 현재까지 수직감염에 관한 연구가 많이 보고되어 왔다. 소, 마우스, 원숭이 등에서 모체로부터 태자로의 태반감염이 보고된 바 있으며 실험적으로 유즙에 의해 수직감염될 수 있음이 보고된 바 있으며 송아지에서 tachyzoite를 짐가한 사육을 경우 투여한 송아지에서 *N. caninum*에 감염된 바 있다¹⁵⁻²¹. 한편 Sawada *et al*²²은 *Neospora* 감염에 의해 유사한 경험이 있거나 혈청검사 결과 *Neospora* 양성을 보인 적이 있는 젖소 복장의 개 48두와 도시 개 198두의 혈청검사를 실시한 결과 각각 31.3%와 7.1%의 항체양성을 확인함으로써 개와 소 사이에 수평감염 가능성을 제시한 바 있다. 최근 개의 분변에서 oocyst를 확인함으로써 개가 *N. caninum*의 종속주인이 밝혀졌다²³. 따라서 *N. caninum*에 감염이 있는 숙주는 개의 분변에 오염된 음수나 사료의 섭취를 통해 수평감염될 수 있음을 설명할 수 있게 되었다.

본 실험은 *N. caninum* 국내 분리주를 SCID 마우스의 복강에 접종한 후 3일 간격으로 경시적인 변화를 관찰함으로써 국내 분리주의 감염후 병변의 과급양상 및 기전을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 : 대상 마우스는 생명공학연구소에서 분양 받은 4-5주령이 20~25g 되는 SCID 마우스를 1주일간 실험실에서 순화시킨 후 사용하였으며 암·수 격리시켜 대조군과 함께 동거 사육시켰다. Positive rack(삼광)에서 온도는 22±2℃, 습도는 55±10%로 유지시키고 멸균사료와 121℃에서 20분간 고온 멸균처리된 수돗물을 자유급식하도록 하였다. 모든 반입되는 cage, 깔짚 등도 역시 동일한 조건으로 고온 멸균처리하였다.

실험동물 접종 : 2×10⁵개/ml이 감염력 있는 KBA-2 tachyzoite를 21마리 마우스에 복강 접종하였으며 대조군으로는 2마리는 HBSS만을 복강 투여하여 동거 사육시켰다. 원충은 김 등¹¹의 방법에 준하여 vero cell을 이용하여 계대하였다.

병리조직학적 및 면역조직화학적 검사 : 3일 간격으로 7회 3마리씩 ether로 안락사시킨 후 뇌, 척수, 폐장, 심장, 횡격막, 간장, 비장, 췌장, 위, 장, 소장, 부신, 근육, 침샘, 눈, 피부, 난소, 자궁, 소환, 부고환 전립선 등의 장기를 채취하여 일부는 병리조직학적 검사 및 면역조직화학적 검사를 위해 10% 중성 포르말린에 24시간 고정하였으며 일부는 DNA 추출을 위하여 액체질소에 급속 냉각시켜 -70℃에 보관하였다. 또한 뇌의 일부는 원충의 재분리를 위하여 무균적으로 채취하여 antibiotic-antimycotic(100unit/ml penicillin, G, 100μl/ml streptomycin, 0.25μg/ml amphotericin B : GIBCO BRL, Grand Island, NY)이 첨가된 차가운 0.01M 멸균 PBS에 보관하였다.

DNA 추출 : 조직 약 100mg당 1ml의 DNA extraction buffer(1M Tris-HCl, 0.5M EDTA, 10% SDS, pH 8.0)를 첨가하여 37℃에서 overnight 한 후 등량의 phenol과 수어 12,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 수거하고 등량의 phenol/chloroform를 첨가하여 다시 12,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 수거한 후 25:24:1의 phenol/chloroform/isoamyl을 동량 첨가한 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 1:10 용량의 3M sodium acetate와 2배 용량의 차가운 100% ethanol을 첨가하여 -20℃에서 1시간동안 정치시켜 DNA를 침전시킨 후 원심을 통해 DNA pellet을 얻고 70% ethanol로 충분히 수세하여 준 후 상온에서 말리고 TE buffer(1M Tris-HCl, 0.5M EDTA, pH 8.0)에 pellet을 잘 용해시켜 냉장 보관하였다.

PCR : PCR을 위한 primer는 Genomic DNA중 *N. caninum* specific DNA fragment에 해당하는 Np21plus(5'-CCCAGT-GCGTCCAATCCTGTAAC-3')과 Np6plus(5'-CTCGCCAGT-CAACCTACGTCTTCT-3')을 사용하였다²⁴. PCR mixtur의 조성은 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5μM primer, 0.2mM nucleotide triphosphates(d-NTPs), 1.0 unit Taq polymerase(Bioneer), 50ng의 template DNA로 구성되었다. PCR은 Perkin-Elimer Thermocycler 9600(Perkin-Elimer, Foster City, CA)을 이용하여 수행하였으며, 반응 조건은 94℃에서 2분간 predenaturation 하였으며 94℃에서 10초간 denaturation, 55℃에서 40초간 annealing, 72℃

에서 50초간 extension 하는 과정을 40회 반복하고 마지막으로 72℃으로 2분간 extension 하였다. 증폭산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하였으며 ethidium bromide로 염색하여 UV light (254nm)하에서 DNA 증폭산물을 확인하였다. 양성 대조군으로서 vero cell에서 계대 배양되고 있던 KBA-2를 수확하여 사용하였고 음성 대조군으로서는 vero cell을 이용하였다.

원충 재분리 : 무균적으로 채취한 뇌를 멸균된 막자사발에 갈아 유제액으로 만든 후 100% monolayer를 이루고 있는 vero cell에 감염시키고 2~5시간 후에 새 배지로 교체하여 주었다. 감염시킨 vero cell은 계대하지 않고

3일 간격으로 배지를 교체해 주었으며 매일 원충의 출현 유무를 확인하였다.

결 과

임상증상 관찰 : 접종후 15일경부터 피모가 거칠어지고 수척해졌으며 18일경부터는 활동성이 둔해졌고 점차 군으로부터 이탈, 침울 등의 모습을 보였다.

병리조직학적 및 면역조직화학적 검사 : 3일 간격으로 7회 부검을 실시하여 병리조직학적 및 면역조직학적 검사를 실시한 결과 Table 1과 같은 결과를 얻었다.

Table 1. Lesion distribution in mice infected with *N. caninum*

Organs	Days post infection						
	3	6	9	12	15	18	21
Pancreas	-	-	3/2*	3/3	3/3	3/3	3/3
Diaphragm	-	-	1/1	1/1	1/1	3/-	1/3
Brain	-	-	-	1/1	2/2	2/2	3/3
Stomach	-	-	-	1/2	-/1	2/3	3/3
Intestine	-	-	-	-/1	-/1	-/2	-/3
Lung	-	-	-	-	-/2	1/3	2/3
Adrenal gl.	-	-	-	-	1/1	1/1	1/1
Salivary gl.	-	-	-	-	-/1	-/-	2/3
Ovary	-	-	-	-	-/1	-/1	-/1
Uterus	-	-	-	-	-/2	-/1	-/1
Prostate	-	-	-	-	-	-/1	-/1
Spleen	-	-	-	-	-	-/1	-/1
Spinal cord	-	-	-	-	-	1/1	2/2
Heart	-	-	-	-	-	-	2/2
Tongue	-	-	-	-	-	-	1/1
Muscle	-	-	-	-	-	-	2/3
Liver	-	-	-	-	-	-	-
Skin	-	-	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-	-

* No. of mice showing tachyzoites(H & E)/No. of mice positive against anti-*N. caninum* hyperimmune serum(ICH).

접종 9일째 췌장과 횡격막에서 가장 먼저 병변이 관찰되었다. 췌장 실질의 acinar cell에 원충이 침윤되어 국소적인 경미한 괴사부가 존재하였으며 시간이 경과됨에 따라 병변이 심화되어 다발성 혹은 광범한 괴사소가 관찰되었고 괴사부와 췌장 간질에 임파구와 형질세포가 심하게 침윤되어 있거나 대식구 침윤과 함께 섬유아세포가 증식되어 있었다(Fig 1A). 일부 acinar cell의 세포질 내에 원충이 감염되어 분열증식하고 있는 것이 면역조직화학 염색을 통해 확인되었다(Fig 1B).

뇌는 접종 12일째 혈관 주변부의 원충집락과 경미한 괴사소가 관찰되기 시작하여 시간이 경과됨에 따라 대뇌 회색질과 백색질, 소뇌의 백색질과 뇌줄기에 함께 명료한 비화농성 괴사소가 다수 관찰되었고 일부의 소뇌 백색질은 해면화되어 있었다(Fig 1C). 한편 척수는 접종 후 18일째에서야 비화농성의 괴사성 척수인 소견을 관찰할 수 있었다. 위장관은 접종 12일째 장점막에 원충이 침윤되어 분열 증식하다가 시간이 경과되면서 가벼운 임파구 침윤을 동반하며 고유층과 장 상피세포로 침윤되어 가는 것이 관찰되었다(Fig 1D). 이외에도 부신은 피질과 수질에 걸쳐 국소적으로 한계 명료한 괴사소가 존재하였으며 괴사소 주변으로 경미한 임파구 침윤과 부신세포의 세포질 내에서 분열 증식하는 원충의 집락이 다수 관찰되었다(Fig 1E). 접종 15일째 이후로 폐장, 침샘, 난소, 자궁, 전립선, 비장 등에서 면역조직화학 염색을 통하여 원충이 분열 증식하여 집락을 형성하고 있는 것을 확인할 수 있었으며 시간이 경과되면서 일부는 가벼운 임파구 침윤을 동반하는 것이 관찰되었다. 접종 21일째 근육에 경미하게 임파구, 형질세포 등이 국소적으로 침윤되어 있었다(Fig 1F).

PCR : 감염 6일째 췌장, 뇌, 위장관, 폐장, 비장 등의 장기에서 328bps의 *N. caninum* specific DNA 증폭산물을 얻을 수 있었다. 또한 감염 12일째 근육과 침샘에서, 감염 18일째 신장에서 DNA 증폭산물을 얻을 수 있었다. 다음은 뇌와 폐장에서 검출된 *N. caninum* 증폭산물이다 (Fig 2).

원충의 재분리 : 12, 15, 18 및 21일째 안락사시킨 마우스의 뇌 유체액을 접종한 vero cell에서 접종 후 7일에서 10일 사이에 vero cell의 세포질내에 원충의 집락을 관찰할 수 있었으며 일부는 세포질 외부로 돌출하여 배지상에서 선회운동을 하는 것도 관찰되었다.

고 찰

마우스에 *N. caninum* 을 감염시켜 정기적으로 병리조직학적, 면역조직화학적 검사를 실시한 결과, 복강감종을 통해 일단 복강내에 감염된 tachyzoite는 우선적으로 복강장기중 췌장과 위장관의 장나층, 횡격막에 감염된 것으로 사료된다. 시간이 경과됨에 따라 복강장기 이외에도 12일째 뇌에 다발성의 한계명료한 괴사소가 관찰되었고 15일째 폐장과 침샘에서 면역조직화학 염색을 통하여 원충이 확인되었으며 18일째 척수 실질에서 괴사소가 관찰되었고 21일째 심근과 골격근 등에서 임파구 침윤 등이 관찰되는 등 전신장기에서 괴사성 병변과 원충이 관찰되었다. 특히 뇌의 병리조직학적 검사결과 감염초기에는 혈관으로부터 소수의 임파구가 유주되어 뇌 실질에 침윤되어 있거나 혈관 주변부에서 분열 증식하고 있는 원충이 소수 관찰되었고 괴사소도 경미하게 관찰되었으나 시간이 경과될수록 뇌 부위와는 상관없이 다발성의 광범위한 괴사소가 관찰되기도 하였다.

혈관 주변부에서 분열 증식하는 원충이 다수 관찰되고 있다는 점, 접종경로별로 감염양상을 살펴본 결과 피하와 복강으로 접종경로를 달리 하였으나 폐사시기가 비슷하였던 점 등으로 미루어 보다 혈류를 통해 원충이 전신장기에 퍼졌을 것으로 사료된다. 즉, 본 실험에서는 복강장기에 감염된 원충이 분열 증식과 주변 조직으로의 침윤을 통해 혈관에 도달하여 혈류를 따라 전신장기에 감염된 것으로 생각되며 따라서 복강으로부터 피하로든 일단 감염되어 혈관에만 도달하면 감염정도나 감염양상은 유사하게 나타날 것으로 판단된다. 이에 비해 경구감염이 이루어진다고 하였을 경우 상당수의 tachyzoite가 소실된 상태에서 장의 점막에서 분열 증식하여 혈관에 이르기까지 시간이 소요되므로 복강, 피하접종시 보다 늦게 폐사를 유발할 것으로 생각된다. Shibahara *et al*²⁵ 은 괴사소에서 발견되는 tachyzoite 대부분이 혈관내피세포에 분포하고 있고 혈관내 단핵구 등에서 관찰되는 것을 확인하여 원충이 혈류를 따라 전신감염되었을 것이라고 추정하였다. 그에 반해 SawaJa *et al*²⁶ 은 척수신경을 통해 척수에 감염된 원충이 뇌 척수액을 따라 뇌에 감염되어 병변을 일으킬 것이라고 보고한 바 있다.

Barr *et al*²⁷이 소 유산태아 82두에 대한 병리조직학적 검사를 실시한 결과 뇌염과 심근염이 100%, 부신염 80%,

단염 72%, 신장염 66%, 간염 62%, 태반염 53%, 폐렴 44% 등의 순으로 관찰되었다고 한다. 따라서 소와 개에서와 같이 마우스에서도 *N. caninum* 이 중추신경계에 장기 친화성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 마우스에서 체강과 병변이 심하게 나타내는 것은 주목할만 하다. 이는 Shibahara *et al*²⁵과 Sawada *et al*²⁶의 연구결과와 일치한다.

현재까지는 *N. caninum* 감염의 병인론을 연구하기에 적합한 동물모델이 확립되어 있지 않다. 그러나 현재까지 알려진 바에 의하면 Oubred Swiss Webster 마우스는 *N. caninum* 에 대해 저항성이 있어 tissue cyst를 얻어내기 위해 유라하머⁵ inbred BALB/c 마우스는 비교적 *N. caninum* 에 대해 감수성이 있는 편이다¹⁸. 최근 interferon gamma가 *N. caninum* 감염에 억제효과를 내는 것이 알려지면서 interferon gamma knock-out 마우스가 원충분리에 이용되기도 하였다²⁹. 본 실험에 사용된 SCID 마우스는 활성상태의 T 임파구와 B 임파구가 결핍되어 있으나 감염이 이루어지면 정상상태에서와 같이 성숙 임파구들이 생성된다는 점에서 급성 감염실험에 적합한 모델이다.

국내 분리주를 Outbred Swiss Webster 마우스에 접종하여 만성 감염을 유도함으로써 tissue cyst를 얻거나 개의 분변으로부터 oocyst를 얻어 중간숙주와 종숙주에 감염

을 유도하여 원충의 체내 생활환을 규명할 수 있을 것이며 더욱 효과적으로 병인론을 연구할 수 있을 것이다.

경시적으로 PCR과 원충의 재분리 효율을 비교해본 결과 PCR의 경우에는 병리조직학적으로 병변이 유발되기 전인 감염후 6일째에 여러 장기에서 원충의 감염을 확인할 수 있었다. 하지만 원충의 재분리 경우는 뇌에서 괴사성 병변을 보였던 집종 12일째 되어서야 본 원충을 처음으로 분리할 수 있었다. 따라서 진단적인 측면에서 볼 때 원충의 재분리보다는 PCR 방법이 더 효율이 높은 것으로 판단된다.

결론

N. caninum 의 국내분리주 KBA-2를 마우스에 복강접종한 후 3일 간격으로 21일까지 경시적 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 복강접종후 원충은 복강장기에 감염된 후 혈류에 따라 뇌, 폐장, 침샘, 심근과 골격근 등 전신장기에 급성으로 감염이 이루어진 것으로 사료된다.
2. 진단적 측면에서 원충의 재분리보다는 PCR 방법이 더 효율이 높은 것으로 판단된다.

Legend for figures

- Fig 1. A. Pancreas of mouse infected with *N. caninum* showing severe subacute lymphoplasmocytic pancreatitis. H&E, × 200. B. Note cluster of *N. caninum* within acinar cell. ABC, × 400. C. Brain of mouse infected with *N. caninum* showing focal nonsuppurative necrotizing encephalitis. H&3, × 200. D. Intestine of mouse infected with *N. caninum*. Note the cluster of tachyzoites in the epithelial cell. ABC, × 400. E. Adrenal gland of mouse infected with *N. caninum* showing severe nonsuppurative necrotizing inflammation. H&E, × 400. Note intracytoplasmic cluster of *N. caninum* tachyzoites. F. Heart of mouse infected with *N. caninum* showing mild nonsuppurative myocarditis.
- Fig 2. Amplification of *N. caninum* DNA from brains and lungs after inoculation by PCR. Lane M : Molecular weight marker, lane 1 : *N. caninum* positive control, lane 2 : 3 days PI, lane 3 : 6 days PI, lane 4 : 9 days PI, lane 5 : 12 days PI, lane 6 : 15 days PI, lane 7 : 18 days PI, lane 8 : 21 days PI.

Fig 1.

Fig 2.

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. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *JAVMA*, 192:1269-1285, 1988.
5. Dubey JP, Hatel AL, Lindsay DS, et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *JAVMA*, 193:1259-1263, 1988.
6. 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.
7. Stenlund S, Björkman C, Holmdahl OJM, et al. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, 83:214-219, 1997.
8. 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.
9. 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.
10. 김재훈, 손현주, 황의경 등. 국내 소에서 *Neospora caninum*의 분리. 대한수의학회지, 38:139-145, 1988.
11. Barber JS, Holmdahl OJM, Owen MR, et al. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitol*, 111:563-568, 1995.
12. Marsh AE, Barr BC, Packham AE, et al. Description of a new *Neospora* species(Protozoa: Apicomplexa: Sarcosistidae). *J Parasitol*, 84:983-991, 1998.
13. Atkinson R, Harper PAW, Rycc C, et al. Comparison of the biological characterizations of two isolates of

- Neospora caninum*. *Parasitol*, 118:363-370, 1999.
14. Guo ZG, Johnson AM. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitol Res*, 81:365-370, 1995.
 15. Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, *et al.* Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 210:709-713, 1992.
 16. Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, *et al.* Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolates. *J Vet Diagn Invest*, 6:207-215, 1994.
 17. Cole RA, Lindsay DS, Blagburn BL, *et al.* Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J Parasitol*, 81:730-732, 1995.
 18. Linddel S, Jenkins MC, Dubey JP. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by PCR detection. *J Parasitol*, 85(3):550-555, 1999.
 19. Jensen L, Jensen TK, Lind P, *et al.* Experimental porcine neosporosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, 106:475-482, 1998.
 20. Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, *et al.* Experimental fetal and transplacental Neospora infection in the nonhuman primate. *Lab Invest*, 71:236-242, 1994.
 21. UgglA A, Stenlund S, Holmdahl OJM, *et al.* Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int J Parasitol*, 28:1467-1472, 1998.
 22. Sawada M, Park CH, Kondo H, *et al.* Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *J Vet Med Sci*, 60:853-854, 1998.
 23. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, *et al.* Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 28:1473-1478, 1998.
 24. Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, *et al.* Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol Cell Pro*, 10:289-297, 1996.
 25. Shibahara T, Kokuho T, Eto M, *et al.* Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Vet Pathol*, 36:321-327, 1999.
 26. Sawada M, Park C, Morita T, *et al.* Pathological findings of nude mice inoculated with bovine *Neospora*. *J Vet Med Sci*, 59:947-948, 1997.
 27. Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, *et al.* Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet Pathol*, 27:354-361, 1990.
 28. Lindsay DS, Lenz SD, Cole RA, *et al.* Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J Parasitol*, 81:313-315, 1995.
 29. Dubey JP, Dorrough KR, Jenkins MC, *et al.* Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int J Parasitol*, 28:1293-1304, 1998.