

# 강원도 사육 한우에서 *Neospora caninum*에 대한 항체양성률 조사

황의경\*

상지대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

(게재승인: 2003년 5월 2일)

## Seroprevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Korean Native Cattle Raised in Kangwon Province

Eui-kyung Hwang\*

Department of Animal Science, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University

(Accepted: May 2, 2003)

**Abstract:** This survey was carried out to investigate the seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native cattle (KNC) raised in Kangwon province in Korea. A total of 867 sera collected from KNC were tested for *N. caninum* antibodies using an indirect immunofluorescent antibody test (IFAT). One hundred and fifty five (17.9%) KNC were positive by IFAT. Seroprevalence of cows was 19.6% (44/224) and seroprevalence of boars was 17.3% (111/643). Among the seroprevalences of cattle according to the raised areas, five counties or cities, Hwacheon was 33.3% (1/3), Wonju was 30.8% (4/13), Chuncheon was 25.8% (24/93), Hongcheon 18.3% (22/120) and Wheongsung was 16.6%(104/628). It was proved that KNC raised in Kangwon provinces exposed extensively and seriously to *N. caninum*.

**Key words:** *Neospora caninum*, seroprevalence, Korean native cattle, IFAT

### 서 론

*Neospora caninum*은 분류학상 Apicomplexa아문, Coccidia아강, Sarcocystidae과에 속하는 원충(protozoan parasite)으로서, 개에서는 주로 신경증상을 유발하고 소에서는 주로 유산을 일으키는 것으로 알려져 있다 [6, 8, 12, 16, 18]. 지금은 *N. caninum*이 *Toxoplasma gondii*와 항원학적으로나 분자생물학적으로 서로 확연히 다르다는 것이 밝혀져 있지만 형태학적 구조는 매우 유사하여 이전에는 이 원충에 의한 감염증이 대부분 톡소플라스마병으로 잘못 진단되어 왔었다. 실제로 1988년 Dubey et al[13]이 미국의 Angell Memorial 동물병원에서 지난 40년간 톡소플라스마병 유사질병(toxoplasmosis-like illness)

으로 진단된 개 30예에 대한 조직절편과 혈청을 대상으로 재검사를 실시한 결과 10예에서 *T. gondii*가 아닌 새로운 원충의 감염임을 확인하고 이 원충을 *N. caninum*으로 명명하였고 이어 후구마비로 폐사한 개에서 원충에 의한 근육염과 신경염 소견을 관찰하고 세포배양법을 이용해 이 원충을 세계 최초로 분리하였다[14]. 1993년 Conrad et al [9]은 소에서 최초로 유산태아로부터 *N. caninum*을 분리하였다고 보고하였다.

우리 나라에서도 1996년 경기도 남양주시 소재 유우사육 목장에서 임신 6개월령에 유산된 태아가 *N. caninum*에 감염되었음을 김 등 [1]이 최초 보고한 이래, 1998년 김 등 [2]이 출생직후 기립불능을 나타낸 젖소 신생 송아지에서 *N. caninum*을 분리하였으며, 이 병이

이 논문은 2001년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것임

\* Corresponding author: Eui-kyung Hwang

Department of Animal Science, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea  
Tel: +82-33-730-0531, E-mail: ekhwang@mail.sangji.ac.kr

젖소에서 반복 유산을 일으킬 수도 있다는 것을 보고하였다 [3]. 혈청학적 역학조사에 있어서는 1998년 허 등 [4]은 간접형광항체법을 이용하여 전국 9개도에서 사육하는 유우에 대하여 검사한 바 유우의 35.6%가 *N. caninum*에 대한 항체를 보유하고 있다고 보고하여 이병이 이미 전국적으로 문제가 되어 있음을 밝힌 바 있으며 2001년 허 등 [5]이 충남지역에서 사육하는 유우와 한우에 대해 2002년 Kim *et al* [19]이 전국의 한우에 대해 검사한 성적을 발표한 바 있다.

저자는 국내 사육 유우에 비하여 한우에 대해서는 *N. caninum*에 대한 혈청학적 검사가 아직 심도있게 이루어지지 않았고 특히 강원도에서는 지형적 여건상 한우가 강원지역 축산을 대표하는 매우 중요한 축종임에도 불구하고 그 조사는 극히 제한적으로 밖에 수행되어 있지 않은 관계로 이 지역에서 사육된 한우에 대해 *N. caninum*에 대한 항체 보유 실태를 파악하여 앞으로 이에 대한 연구 및 방역대책수립 등에 기초자료로 삼고자 이 조사를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 검사 혈청

2002년 3월부터 9월까지 강원도 횡성, 홍천, 원주 소재 도축장에서 도축검사신청서에 근거하여 강원도내에서 사육 후 도축되는 한우 867두를 대상으로 도축시 혈액을 채취하였다. 이를 혈액이 응고된 후 혈청을 분리한 다음 검사 전까지 -20℃에 냉동보관하였다가 사용하였다.

### 검사용 항원 슬라이드

항원 슬라이드 제작을 위한 항원은 소에서 분리한 *N. caninum* 국내분리주인 KBA-1 [20]을 사용하였고 항원 슬라이드는 Yamane *et al* [28]과 허 등 [4]의 방법에 준하여 제작하였다. 이를 간략히 설명하면 KBA-1을 Vero 세포에서 증식시킨 다음 감염세포를 세포배양 플라스크로부터 수확하여 원심분리하였다. 수확한 세포 pellet을 23G 주사바늘을 통과시켜 세포를 파괴시켜 *N. caninum* tachyzoite를 노출시킨 후 이를 percoll 용액을 이용 농축시킨 다음에 1μl당 300~400개의 tachyzoite가 포함되도록 농도를 조절한 후 teflon 코팅된 12 well 슬라이드에 well당 10μl씩 가한 다음 2% paraformaldehyde 함유 PBS로 고정시켰다. 이 슬라이드를 -70℃에 보관하였다가 혈청검사에 사용하였다.

### 간접형광항체검사(IFAT)

IFAT는 Yamane *et al* [28]과 허 등 [4]의 방법에 준하여 실시하였다. 이를 간략히 기술하면 한우 혈청을 PBS (pH 7.4)로 200배 희석한 혈청을 *N. caninum* tachyzoite가 코팅된 12 well 슬라이드 위에 각 well당 10μl씩 분주하고 37℃ 습상에서 1시간 반응시킨 다음 5분간 수세하는데, 세척과 세척 사이에는 0.05% Triton X-100을 함유한 PBS로 씻어주었다. 그리고 슬라이드상의 습기를 헤어드라이어로 건조한 다음 2차 항체로는 100배 희석한 fluorescein-conjugated goat anti-bovine IgG(Cappel, Durham, USA)를 각 well당 10μl씩 분주하고 위와 같은 방법으로 반응시킨 후 세척하였다. 이어서 마운팅용 용액(mounting fluid)으로 봉입하고 형광현미경(Olympus Optical Co., Japan)으로 관찰하였다. 반응 판정 기준은 슬라이드에 부착된 tachyzoite의 표면 전체에서 형광을 발하는 것만을 양성으로 판단하였고, 표준양성혈청 및 표준음성혈청은 Dr. Yamane(일본 가축위생시험장)로부터 분양을 받은 소 혈청을 각각 매 검사 시에 사용하였다.

## 결 과

### 항체양성률

강원도 지역 사육 한우에서 *N. caninum*에 대한 혈청 항체양성률을 조사하기 위하여 총 867두(숫소 643두 및 암소 224두)의 혈청을 대상으로 검사를 실시하였다. 한우의 항체 양성률은 17.9%(155/868)였으며, 이를 성별로 분리하여 보면 숫소의 항체양성률은 17.3%(111/643), 암소의 항체양성률은 19.6%(44/224)로 나타나 암소가 숫소에 비해 항체양성률이 다소 높았다(Table 1).

**Table 1.** Seroprevalence of antibodies to *N. caninum* in Korean native cattle according to their sex raised in Kangwon province

Sex	No of heads	No of positive	%
Male	643	111	17.3
Female	225	44	19.6
Total	868	145	17.9

한우 나이별로 항체양성률을 비교하여 보면 수소의 경우 2년생은 17.3%였고 3년생은 17.6%였다. 암소의 경우는 2년생이 12.5%, 3년생은 20.7%, 4년생은 17.7%, 5년생은 32% 및 6년생은 25%였다(Table 2). 즉 성별에 관계없이 나이가 많아질수록 항체양성률 또한 다소 높아지는 경향을 나타내었다.

**Table 2.** Seroprevalence of antibodies to *N. caninum* in Korean native cattle according to their age

Sex		Age					Total
		2	3	4	5	6	
Male	No of heads	625	17	1	-	-	643
	No of positive	108	3	0	-	-	111
	%	17.3	17.6	0	-	-	17.3
Female	No of heads	8	29	159	25	4	225
	No of positive	1	6	28	8	1	44
	%	12.5	20.7	17.6	32.0	25.0	19.6

**지역별 항체양성률**

강원도내 한우 사육 지역별 항체양성률은 화천군이 33.3% (1/3)로 가장 높았고, 원주시가 30.8%(4/13)로 그 다음이었으며, 이어 춘천시 25.8%(24/93), 홍천군 18.3% (22/120), 횡성군 16.6% (104/628)였다(Table 3).

**Table 3.** Seroprevalence of antibodies to *N. caninum* in Korean native cattle according to their raised areas

Area	No of heads	No of positive	%
Wheongsung	628	104	16.6
Hongcheon	120	22	18.3
Chuncheon	93	24	25.8
Wonju	13	4	30.8
Hwacheon	3	1	33.3
Total	867	155	17.9

**고 찰**

Neosporosis의 혈청학적 진단방법으로는 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody test; IFAT)과 enzyme linked immunosorption assay(ELISA)가 주로 활용되고 있다 [6, 7, 12, 16, 27]. Pare *et al* [24]은 소의 혈청내 항체를 검출하기 위하여 *N. caninum* tachyzoite lysate 항원을 이용한 ELISA를 개발하였으며 ELISA 항원으로 개에서 분리된 원충주를 이용하던 또는 소에서 분리된 원충주를 이용하던 상관없이 같은 시험결과를 얻었다고 하였다. 그러나 Dubey *et al* [17]은 *N. caninum* tachyzoite lysate 항원으로 사용한 ELISA는 *Sarcocystis* sp를 인공 접종한 소의 혈청과 교차반응이 일어나기 때문에 소에서는 ELISA보다는 IFAT가 neosporosis의 혈청학적 진단에 더욱 유용함을 확인한 바 있다. 이번 조사에서는 국내에서 진단기술이 확립되어 널리 활용되고 있는 IFAT

를 이용하였다 [4, 5, 19].

어미 소 혈청에서 *N. caninum* 특이항체를 검사하는 것은 이 원충의 감염으로 인한 소의 유산 가능성을 추정하고, 본 질병을 혈청역학적으로 조사하는데 있어 유용한 방법이다 [9, 24]. 이 때 혈청의 희석배율은 진단상 중요한 의미를 가지며, *N. caninum*에 대한 항체 양성 판정 기준이 되는 소 혈청의 최적 희석배율은 연구자들에 따라 다소 차이가 있으나 태아의 혈청이나 체액(body fluid)의 경우에는 1: 80, 어미 소 혈청의 경우 1: 200에서 가장 특이성이 높은 것으로 알려져 있다 [7, 12]. 따라서 이번 조사에서도 한우의 혈청을 1: 200으로 희석하여 사용하였고, 결과의 판독에 있어서는 Yamane로부터 분양받은 양성 및 음성표준혈청을 매 검사 시마다 각각 대조 혈청으로 사용하였으며, Pare *et al* [24]과 허 등 [4]의 판정방법에 근거하여 slide glass에 코팅된 원충항원(tachyzoite) 표면 전체에서 형광이 발하는 것만을 양성으로 판단하였다. 즉 tachyzoite 표면의 일부 또는 침탄부에서만 형광을 발하는 경우에는 비특이적 반응으로 간주하고 음성으로 판정하였다.

지금까지 소에서 *N. caninum*에 대한 항체 보유 현황을 조사하여 보고한 바에 의하면 항체양성률은 젖소에 비하여 비육우는 보다 낮았는데 일 예로 미국에서는 지역은 다르지만 젖소의 항체양성률이 30.7%인데 비하여 비육우는 23.5%였고 [15, 26], 동일지역에서 동시에 실시한 조사에서도 벨기에의 경우 유우는 28.6%인데 비육우는 14.0%였고 [11], 스페인의 경우 유우는 36.8%인데 비육우는 17.9%였고 [23], 아르헨티나의 경우 유우는 27.6%인데 비육우는 9.7%였고 [22], 파라과이의 경우 유우는 36.0%였는데 비육우는 26.6%였다 [25]. 국내에서는 허 등 [4]이 1998년 유우에서 *N. caninum*에 대한 항체양성률을 전국적으로 조사한 바 전체적으로 35.6%의 유우가 항체양성이었으며 이를 다시 유사산이 급증하였던 목장과 그렇지 않은 목장의 항체양성률로 구별하여 보면 전자는 48.7%인데 비하여 후자는 20.7%로 심한 차이를 보여 이 병이 국내 소 유사산증의 원인임을 간접적으로 입증한 바 있다. 또한 2001년 허 등 [5]은 충남지역 4개 시·군에 사육 중인 유우와 한우에 대해 조사한 바 유우는 64.2%, 한우는 47.8%가 *N. caninum*에 대해 항체양성을 나타내었다고 보고하였으며, 2002년 Kim *et al* [19]은 국내 사육 한우에 대해 전국적으로 항체양성률을 조사한 바 4.1%가 *N. caninum*에 대해 항체양성을 나타내었다고 보고하였다. 이번 조사에서 강원도내 사육 한우의 항체양성률은 17.9%로 나타나 국내에서도 외국의 경우와 같이 비육우에 해당하는 한우가 유우에 비하여 항체양성률이 낮음을 알 수 있었다. 유

우에 비하여 비육우의 항체양성률이 낮은 이유는 일반적으로 단기간 사육된 후 출하되는 비육우에 비하여 유우는 비교적 오랜 기간 사육되는 점과 사육방식에 있어서도 비육우는 대부분 폐쇄된 공간에서 개 등 다른 동물과의 접촉이 거의 없는 상태로 사육되는데 비하여 유우는 보다 개방된 공간에서 개 등 다른 동물과의 직접적인 접촉이 보다 용이한 상태로 사육되기 때문인 것으로 생각된다. 이번 조사의 항체양성률 17.9%는 허인 등이 충남지역 사육 한우 항체양성률이 47.8%(11/23)라고 보고한 것에 비하여는 낮았지만 Kim et al [27]이 강원지역의 한우 항체양성률이 5.6%(2/36)라고 보고한 것에 비하여는 높았는데 이는 조사시기와 조사 대상지역간의 차이 및 조사대상 소의 나이 등에 따른 차이에 원인이 있겠지만 무엇보다도 조사대상두수의 매우 큰 차이에도 기인된 것으로 여겨졌다.

조사대상 한우의 성별 항체양성률은 수소에 비하여 암소가 높았는데 이는 수소의 나이는 2세가 전체의 97.2%로 대부분인 반면에 암소는 4세가 70.7%로 상당수여서 암소의 나이가 평균 2세가 더 많았던 것과 연관이 있는 것으로 생각되었다.

조사대상 한우의 사육 지역별 항체양성률은 화천이 33.3% (1/3)로 가장 높았고 횡성은 16.6%(104/628)로 가장 낮았는데 이는 지역별로 사육환경이 다른데 기인한 차이일 수도 있으나 검사두수의 차이에서 오는 것도 간과할 수 없으리라 여겨졌다.

이번 연구 결과 국내에서 조사된 다른 연구결과와 마찬가지로 강원도 지역에서 사육하는 한우에서도 상당수가 *N. caninum*에 노출되어 있음이 밝혀졌다. 이 질병에 대하여는 지금까지 유효한 예방약 또는 치료제가 개발되어 있지 않기 때문에 가능한 예방대책으로는 항체양성반응을 나타낸 소는 도태순위 결정시 우선적으로 고려되어야 하며 특히 유산의 원인이 이 원충의 감염에 의한 것으로 밝혀진 소는 즉시 격리시킨 후 신속히 도태시켜야 할 것이며, 또한 이 원충의 종숙주이면서 소에서 이 병을 전파하는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 개가 소와 접촉하는 것을 우선적으로 차단하여야 하고 이외 야생 설치류, 고양이 및 조류 등의 분변 또는 분비물로부터 사료나 음수원이 오염되지 않도록 하는 차단방역 및 유산된 태아 및 후산과 같은 분비물에 개나 다른 소가 접근하지 못하도록 하는 방안 등이 있다 [6, 10, 12, 21].

이 질병의 효과적인 방역을 위해서는 앞으로 개의 감염실태 파악과 개의 감염률과 소의 감염률간의 상관성 등에 대한 조사와 이 질병의 예방백신 및 치료제의 개발 등에 대한 연구가 시급한 실정인 것으로 여겨졌다.

## 결론

강원도내 사육 한우에 대하여 *N. caninum* 항체 보유 실태를 파악하기 위해 2002년 3월부터 9월까지 7개월간 횡성, 홍천, 원주 소재 도축장에서 도축되는 한우 867두의 혈액을 채혈하여 혈청을 분리한 후 IFAT 방법으로 혈청학적 역학조사를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총 867두(숫소 643두 및 암소 224두)의 혈청을 대상으로 검사를 실시하였다. 전체 한우의 항체 양성률은 17.9%(155/868)였으며, 이를 성별로 분리하여 보면 숫소의 항체양성률은 17.3% (111/643), 암소의 항체양성률은 19.6%(44/224)로 나타나 암소가 숫소에 비해 항체양성률이 다소 높았다.

2. 한우 나이별로 항체양성률을 비교하여 보면 수소의 경우 2년생은 17.3%였고, 3년생은 17.6%였다. 암소의 경우는 2년생이 12.5%, 3년생은 20.7%, 4년생은 17.7%, 5년생은 32% 및 6년생은 25%였다.

3. 강원도내 한우 사육 지역별 항체양성률은 화천군이 33.3% (1/3)로 가장 높았고, 원주시가 30.8%(4/13)로 그 다음이었으며, 이어 춘천시 25.8%(24/93), 홍천군 18.3%(22/120), 횡성군 16.6% (104/628)였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 강원도내 사육 한우의 *N. caninum*에 대한 항체양성률은 성별, 나이별, 사육지역별로 다소의 차이를 보이고 있으며, 국내 유우에서 조사한 결과에 비하여는 낮은 편이었으나, 이미 많은 한우가 *N. caninum*에 노출되어 있다는 사실이 입증됨으로써 앞으로 이에 대한 예방과 관리에 대한 연구가 시급한 것으로 여겨졌다.

## 참고문헌

1. 김대용, 황우석, 김재훈, 허권, 황의경, 이병천, 진영화, 이재진, 최상호. *Neospora*에 의한 소 유산 발생. 대한수의학회지. 1997, 37, 607~612.
2. 김재훈, 손현주, 황의경, 황우석, 허권, 진영화, 이병천, 이재진, 강영배, 山根逸郎, 김대용. 국내 소에서 *Neospora caninum*의 분리. 대한수의학회지. 1998, 38, 139~145.
3. 김재훈, 황의경, 손현주, 진영화, 윤순식, 김대용. *Neospora caninum*에 의한 젖소의 반복유산. 대한수의학회지. 1998, 38, 853~858.
4. 허권, 김재훈, 황우석, 황의경, 진영화, 이병천, 배지선, 강영배, 山根逸郎, 김대용. 간접형광항체법을 이용한 국내 젖소의 *Neospora caninum*에 대한 혈청학적 연구. 대한수의학회지. 1998, 38, 859~866.
5. 허인, 김영진, 김희, 허진희, 박일규, 강승원, 정우

- 석. 소에서 *Neospora caninum*에 대한 항체가 조사. 한국가축위생학회지. 2001, **24**, 9~14.
6. Anderson, M. L., Andrianarivo, A. G. and Conrad, P. A. Neosporosis in cattle. Anim. Reprod. Sci. 2000, **60-61**, 417~431.
  7. Barr, B. C., Anderson, M. L., Sverlow, K. W. and Conrad, P. A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. Vet. Rec. 1995, **137**, 611-613.
  8. Buxton, D., McAllister, M. M. and Dubey, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends Parasitol. 2002, **18**, 546~552.
  9. Conrad, P. A., Barr, B. C., Sverlow, K.W., Anderson, M., Daft, B. Kinde, H., Dubey, J. P., Munson, L. and Ardans, A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. J. Parasitology, 1993, **106**, 239~249.
  10. De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J. P., Jenkins, M. C. and Gasbarre, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. Int. J. Parasitol. 1999, **29**, 1647~1657.
  11. De Meerschman, F., Speybroeck, N., Berkvens, D., Rettigner, C., Focant, C., Leclipteux, T., Cassart, D. and Losson, B. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. Theriogenology. 2002, **58**, 933~945.
  12. Dubey, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet. Parasitol. 1999, **84**, 349~367.
  13. Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J. and Uggla, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1988, **192**, 1269~1285.
  14. Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D.A. and Topper, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1988, **192**, 1269~1285.
  15. Dyer, R. M., Jenkins, M. C., Kwok, O. C. H., Douglas, L. W. and Dubey, J. P. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. Vet. Parasitol. 2000, **90**, 171~181.
  16. Dubey, J. P. and Lindsay, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet. Parasitol. 1996, **67**, 1~59.
  17. Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Adams, D. S., Gay, J. M., Baszler, T. V., Blagburn, B. L. and Thulliez, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. Am. J. Vet. Res. 1996, **57**, 329~336.
  18. Hemphill, A. and Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 2000, **30**, 877~924.
  19. Kim, J. H., Lee, J. K., Hwang, E. K. and Kim, D. Y. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. J. Vet. Med. Sci. 2002, **64**, 941~943.
  20. Kim, J. H., Sohn, H. J., Hwang, W. S., Hwang, E. K., Jean, Y. H., Yamane, I. and Kim, D. Y. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. Vet. Parasitol. 2000, **90**, 147~154.
  21. McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolly, W. R., Wills, R. A. and McGuire, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 1998, **28**, 1473~1478.
  22. Moore, D.P., Campero, C. M., Odeon, A. C., Posso, M. A., Cano, D., Leunda, M. R., Basso, W., Venturini, M. C. and Spath, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. Vet. Parasitol. 2002, **107**, 303~316.
  23. Osawa, T., Wastling, J., Acosta, L., Ortellado, C., Ibarra, J. and Innes, E. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. Vet. Parasitol. 2002, **110**, 17~23.
  24. Pare, J., Hietala, S. K. and Thurmond, M. C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 1995, **7**, 273~275.
  25. Quintanilla-Gozal, A., Pereira-Bueno, J., Tabares, E., Innes, E. A., Gonzalez-Paniello, R. and Ortega-Mora, L. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. Int. J. Parasitol. 1999, **29**, 1201-1208.
  26. Sanderson, M. W., Gay, J. M. and Baszler, T. V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. Vet. Parasitol. 2000, **90**, 15~24.
  27. Williams, D. J., McGarry, J., Guy, F., Barber, J. and Trees, A. J. Novel ELISA for detection of

- Neospora*-specific antibodies in cattle. Vet. Rec. 1997, **140**, 328~331.
28. **Yamane I, Kokuho T, Shimura K, Haritani, M,** **Ouchi, Y., Sverlow, K. and Conrad, P. A.** In vitro isolation and characterisation of a bovine *Neospora species* in Japan. Res. Vet. Sci. 1997, **63**, 77~80.