

Vet. Arg. Vol. XVIII. N° 180: 752-775. Diciembre 2001

## Neosporosis bovina: una actualización

Moore, D.P.<sup>1</sup>, Odeón, A.C.<sup>2</sup>, Campero, C.M.<sup>2</sup>

### RESUMEN

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria abortigénica emergente causada por *Neospora caninum*. Ha sido descrita en regiones ganaderas de todo el mundo incluido nuestro país. Su ciclo es parcialmente conocido aunque recientemente se ha informado que el perro se comporta como hospedador definitivo. En las últimas dos décadas se han desarrollado técnicas inmunodiagnósticas, moleculares y de aislamiento para comprender su patogenia, signos clínicos y epidemiología. Sin embargo, existen numerosos interrogantes inherentes a la prevención y control. En este trabajo se pretende recopilar la información disponible en la actualidad para brindar elementos de juicio que amplíen los conocimientos en tal sentido.

### Bovine neosporosis: an update

### SUMMARY

Neosporosis in cattle is an abortifacient parasitary disease caused by *Neospora caninum*. It has been described in cattle regions of the world, including Argentina. The parasite cycle is partially known although recently it has been reported that the dog is a definitive host. In the last two decades immunodiagnosics, moleculars and isolations technics were developed to understand the disease's clinics signs, epidemiology and pathogenesis. However, there are a lot of questions about its prevention and control. In this work, we pretend to compile the available information at the present to extend the knowledge about these concepts.

<sup>1</sup> CONICET, Becario Formación de Posgrado. <sup>2</sup> Patología Veterinaria, INTA, Balcarce.  
Correspondencia: ccampero@ balcarce.inta.gov.ar

## 1. Definición

La neosporosis es una enfermedad parasitaria que afecta caninos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos y ciervos causada por el protozoo *Neospora caninum* (NC) (49). En la década del 80 fue identificada en perros como causante de encefalomielitis y miositis (21). En bovinos, el primer reporte de abortos asociados a NC fue en Nueva México a fines de la misma década (111). Recientemente se ha descrito otra especie denominada *Neospora hughesi* causante de meningoencefalitis en equinos (76).

## 2. Etiología

NC es un protozoo del phylum *Apicomplexa*, familia *Sarcocystidae* cuyo hospedador definitivo es el perro (79) aunque esta especie puede comportarse también como hospedador intermediario (21, 49). NC es morfológicamente similar a *Toxoplasma gondii* y está relacionado a otros protozoos formadores de quistes como *Hammondia* o *Besnoitia*, sin embargo fue descrito como una especie distinta en 1988 (42). Los estadios parasitarios reconocidos son: taquizoíto, quiste tisular y ooquiste. Mientras los taquizoítos y quistes tisulares se encuentran en hospedadores intermediarios, los ooquistes se eliminan en las heces del perro. Los taquizoítos tienen forma de media luna o globular, miden 3 a 7 µm de largo por 1 a 5

µm de ancho. Los quistes tisulares son redondos u ovales, miden hasta 107 µm, tienen una gruesa pared y contienen estadios parasitarios de lenta replicación denominados bradizoítos (49). Ambos, taquizoítos y quistes tisulares son intracelulares. Los taquizoítos han sido descritos en neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miositos, células renales y hepatocitos (22, 42, 48, 108). Los quistes tisulares, solamente han sido observados en el tejido nervioso (42, 46) sin embargo, se ha descrito el hallazgo de este estadio en el músculo ocular de un potrillo (68). Mediante microscopía electrónica de los taquizoítos se reconocen organelas capaces de favorecer la invasión e interacción con el huésped. Así mismo es posible reconocer en los taquizoítos micronemas, roptrias y gránulos densos, siendo su función, el reconocimiento de las células hospedadoras e interacción metabólica, respectivamente (49). Por último, los ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo son esféricos o subesféricos, miden 10 a 11 µm y contienen dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno (Mc Allister, *et al.*, 1998).

## 3. Antecedentes de la enfermedad en Argentina

Los primeros trabajos en el país referidos a esta enfermedad abortigénica permitieron identificar vacas con pérdidas reproductivas serorreactoras a *Neospora caninum*

(NC) (123). Posteriormente, se detectaron anticuerpos y lesiones histopatológicas compatibles con las causadas por NC en fetos bovinos abortados (29, 30), confirmando su presencia mediante inmunohistoquímica en tejidos fetales (IHQ), (31) y por inoculación en ratones (8). Recientes relevamientos seroepidemiológicos en las provincias de Santa Fe y Córdoba detectaron una prevalencia del 15 al 27,5% en 320 bovinos lecheros, siendo positivos los 8 rodeos en estudio (54). Otro trabajo de similares características, reveló una seroprevalencia del 16.1% en 416 vacas lecheras de 22 tambos sin datos previos referidos a NC ubicados en la cuenca Mar y Sierras (83). Este mismo estudio detectó animales seropositivos en 21/22 (95.4%) rodeos lecheros. En fetos provenientes de frigoríficos, se encontró que 20/82 (24%) y 1/22 (4,5%) especímenes de rodeos para leche y para carne respectivamente, tenían anticuerpos a NC (124).

Aunque nuestro país sufre importantes pérdidas por enfermedades que afectan la reproducción de los bovinos, sólo se conocen el 33% de las causas abortigénicas (32). Estudios tendientes a caracterizar esta enfermedad han revelado que NC es un agente frecuentemente identificado por IHQ en fetos bovinos abortados (33).

#### 4. Situación en el mundo

La enfermedad está ampliamente distribuida

informándose su presencia en Africa, América, Eurasia y Oceanía. Aunque la neosporosis fue descrita hace dos décadas atrás, los avances en el conocimiento han sido satisfactorios quedando por investigarse numerosos aspectos relacionados a la prevención y control (52, 53). También es motivo de investigación la frecuencia natural de la transmisión postnatal en el bovino o existencia de otras especies de hábitos carnívoros que pudiesen comportarse como hospedadores definitivos de la enfermedad (80).

#### 5. Signos Clínicos

En vacas adultas, NC ocasiona abortos entre el tercer mes hasta el final de la gestación, aunque más frecuentemente ocurre entre el quinto y sexto mes (2). Se desconoce si NC ocasiona pérdidas tempranas de preñez, sin embargo, se ha descrito que mientras vacas seronegativas a la enfermedad, reciben 1.7 dosis inseminantes para quedar preñadas, las vacas seropositivas necesitaron 2.2 dosis de semen (110). Así mismo, existen evidencias que vacas serorreactoras a NC son eliminadas anticipadamente por presentar un bajo desempeño reproductivo (114). Recientemente se describió que tras la presentación de abortos a NC en un rodeo de cría, el 22.2% de las vacas seropositivas y el 13.5% de sus hijas no se preñaron en el servicio natural siguiente (129). Estos hallazgos sugieren que vacas

seropositivas a NC podrían resultar subfértiles.

El aborto puede producirse en pocas vacas o involucrar hasta el 30% de los animales en un rodeo (53). Las vacas con anticuerpos a NC tienen mayor riesgo de abortar que aquellas seronegativas al parásito (115, 133, 135). El feto muerto en el útero puede ser reabsorbido, momificarse, o expulsarse con avanzado grado de autólisis. Más comúnmente acontece el nacimiento del ternero clínicamente normal pero crónicamente infectado. Aunque no es patognomónico, la momificación es un hallazgo frecuente habiéndose descrito en casos naturales (133) y experimentales (14). Los terneros infectados en el útero pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento (12, 49). El examen clínico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar o falta de sensibilidad propioceptiva (52), sin embargo son escasos los trabajos que describan esta presentación de la enfermedad en neonatos. Eventualmente pueden presentarse anormalidades congénitas como exoftalmia o asimetría ocular (31). Aunque estos signos van en perjuicio de la salud en los primeros días de vida del ternero, en un estudio, se cita mayor tasa de supervivencia hasta los 90 días de vida en terneros congénitamente infectados debido a la inmunidad cruzada con otros protozoos patógenos que actúan durante este período (95). En vaquillonas seropositivas a NC se ha observado menor producción

láctea (1kg/día) durante su primera lactancia (116).

## 6. Epidemiología y ciclo de vida

La enfermedad ha sido informada en Europa, África, Australia, Nueva Zelanda y América (52). En bovinos, la neosporosis afecta tanto razas para leche como para carne resultando expuestos el 100% de los rodeos (49, 51, 57, 60, 101, 104, 127). Sin embargo, son escasos los informes de abortos por NC en rodeos para carne (80, 128). La principal vía de contagio en bovinos es transplacentaria de madre a hijo (3, 47, 59, 95). Experimentalmente esta vía ha sido probada en ovinos (45), caprinos (67), ratones (34), caninos (43) felinos (44), porcinos (63) y primates (13). En los bovinos, un bajo porcentaje puede sufrir seroconversión debido probablemente a una exposición postnatal (59, 96). Uggle *et al.* (122) demostraron la infección de terneros adicionando taquizoítos a la leche, sin embargo no se ha comprobado la eliminación de estas formas parasitarias a través de la glándula mamaria bovina. En el postparto o tras el aborto, la placenta con presencia de taquizoítos (Shivaprassad *et al.*, 1989) podría servir como fuente de infección para otra vaca que la ingiera. Recientemente un ensayo experimental demostró que dos terneros y dos vacas libres de NC mantuvieron dicha condición luego de consumir placentas naturalmente infectadas (39).

El rol epidemiológico de los toros en la neosporosis bovina es desconocido. En nuestro país, existe información acerca de toros seropositivos congénitamente infectados (Campero *et al.*, datos no publicados), sin embargo, no se ha establecido la probabilidad de que un toro transmita la enfermedad horizontalmente a una vaca. La inoculación experimental por vía endovenosa de taquizoítos vivos de NC a tres toros ocasionó el desarrollo de títulos serológicos sin signos clínicos ni lesiones genitales a la palpación luego de dos meses de observación (Campero *et al.*, datos no publicados). En dicho trabajo, no se encontraron anticuerpos a NC en el plasma seminal aunque no se evaluó la presencia de NC en el semen.

Aunque los ooquistes presentes en las heces de perros infectados pueden ser infectivos a las 24 hs de ser eliminados (70), la infección oral en terneros sólo se ha descrito en forma experimental (40). Suponiendo que los ooquistes pueden contaminar el agua y comida de los hospedadores intermediarios (53, 97), es aún desconocida la frecuencia con que ocurre este hecho en la naturaleza.

Recientes trabajos han demostrado que la proporción de bovinos seropositivos aumenta cuando existen perros en los establecimientos (134). En caninos se ha encontrado un incremento de la seroprevalencia relacionada con la edad (16) siendo ineficiente la transmisión vertical en esta especie (10). Así mismo, la seroprevalencia

a NC es mayor en caninos pertenecientes a zonas rurales que aquella descrita para perros de áreas urbanas (9, 16, 105) probablemente debido a la estrecha relación epidemiológica existente entre esta especie y los bovinos (97, 134).

Un reciente trabajo experimental cuestiona la frecuencia con la cual los perros pueden adquirir la infección en la naturaleza (20). En dicho trabajo, nueve perros de 2 a 4 años de edad fueron alimentados con fetos bovinos naturalmente infectados con NC, sin embargo los cánidos no eliminaron ooquistes en la materia fecal resultando nula la evidencia clínica, serológica, o histopatológica a NC.

Evaluando la existencia de taquizoítos de NC en placentas de vacas seropositivas que parieron terneros clínicamente normales, se encontró por la técnica de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) que 2/16 especímenes resultaron positivos. Este hecho demostraría que la infección de perros a partir de placentas procedentes de vacas infectadas es muy baja (19). Aunque permanece aún sin conocerse el rol epidemiológico de cánidos salvajes u otros hospedadores, incluidas las aves, existen evidencias de exposición a NC natural y experimentalmente en estas especies (28, 69, 72, 81).

El comportamiento epizoótico o enzoótico que tiene la enfermedad podría reflejar la transmisión postnatal en bovinos de un rodeo libre (82, 112, 115, 135) o la persistencia de NC a través de

sucesivas generaciones en forma vertical, respectivamente (133). La manifestación epizootica de la enfermedad está asociada a la presentación de tormentas de abortos (78, 82). Sin embargo, se ha sugerido que la infección simultánea con el virus de la diarrea viral bovina (BVD) o la inmunosupresión por la ingestión prolongada de micotoxinas, podrían actuar como factores desencadenantes del aborto a NC en un rodeo enzooticamente infectado (3, 25, 89, 133).

En Argentina, el comportamiento epidemiológico de la enfermedad podría tener algunas diferencias en nuestros rodeos para carne y leche debido al diferente tipo de manejo existente. En otras regiones del mundo, recientemente se han descrito ciertos factores de riesgo asociados a la intensificación de los sistemas de producción (80, 104). Con las condiciones actuales de explotación de nuestro país, dichos factores podrían determinar un comportamiento disímil de la enfermedad en los rodeos locales existiendo mayor cantidad de animales seropositivos en rodeos para leche. Un reciente trabajo de Moore *et al.*, (87) reveló que 25/134 (18.6%) vacas vacías o abortadas pertenecientes a 26 rodeos para carne y 251/566 (44.3%) vacas para leche de 47 tambos con similares antecedentes reproductivos, resultaron seropositivas a NC.

Un estudio seroepidemiológico en 1001 terneros de 6 a 12 meses de edad pertenecientes a 120

establecimientos para carne ubicados en 7 partidos de Corrientes evidenció que la prevalencia a NC fue 16.8% y 86 (67.5%) de los rodeos resultaron expuestos (86). Otros trabajos, realizados sobre 55 rodeos para cría pertenecientes a 5 estados ubicados al noroeste de E.E.U.U. revelaron una seroprevalencia del 24% en los 2585 sueros analizados mediante una prueba ELISA de inhibición competitiva presentando todos los rodeos animales seropositivos (104). Waldner *et al.*, (127) describe en Canadá una seroprevalencia a NC que varió del 16 a 27% en 8 rodeos para carne. Quintanilla-Gozalo *et al.*, (101) en España, hallaron una seroprevalencia a NC del 18% en los 1712 sueros evaluados. Resultando positivos 119/ 216 (55.1%) rodeos para carne. El cuadro 1 resume el número de rodeos para carne expuestos a NC y la técnica serológica empleada según país y autor.

## 7. Pérdidas económicas

NC es reconocida como agente causal de importantes pérdidas económicas en la industria de la carne y leche (80, 120). En Inglaterra se considera que se producen 6000 abortos anuales debido a NC y asignándole un a pérdida de \$800 por cada aborto, se pierden aproximadamente 4.8 millones de dólares. En California, EEUU las pérdidas anuales serían de 35 millones de dólares y en Australia 85 millones de dólares en

<b>Cuadro 1: Prevalencia de <i>Neospora caninum</i> en rodeos para carne</b>				
<b>País/Región</b>	<b>Rodeos Pos/Total</b>	<b>% Rodeos Positivos</b>	<b>Categ.</b>	<b>Autor y técnica</b>
USA	55/55	100%	Vaca	Sanderson <i>et al.</i> 2000, ELISAc
España	119/216	55.1%	Vaca	Quintanilla <i>et al.</i> 1999, ELISA
Canadá	8/8	100%	Vacas	Waldner <i>et al.</i> 1998, ELISA
Argentina (Corrientes)	86/120	71.7%	Ternero	Moore <i>et al.</i> 2000c, IFI
Argentina (Bs As)	9/17	52.9%	Vaca	Moore <i>et al.</i> , IFI (no publicado)
Argentina (La Rioja)	2/31	16.1%	Vacas	Moore <i>et al.</i> , IFI (no publicado)

la industria lechera y 25 millones de dólares para la producción de carne (26). En rodeos para leche de nuestro país, Campero y Odeón han estimado las pérdidas en unos \$80 millones por año considerando el costo por abortos a NC, la reposición por eliminación de vientres seropositivos a NC, el intervalo parto-concepción y la menor producción láctea de la vaquillona en su primera lactancia (datos no publicados).

Los eventos que pueden originar tales pérdidas son:

- 1) Muerte fetal temprana con repetición de celo, incremento del intervalo parto concepción o infertilidad.
- 2) Aborto en el tercio medio de la gestación.
- 3) Muerte perinatal o neonatal.
- 4) Incremento en el descarte de vacas. Las vacas infectadas tienen más probabilidad de ser eliminadas por su bajo desempeño reproductivo (114).
- 5) Reducida producción de leche. Aunque el impacto del aborto

en la producción lechera es difícil de estudiar y cuantificar, el incremento del intervalo entre partos puede reducir el número de lactancias si se considera un período de años. Así mismo, las vacas infectadas a NC no abortadas han mostrado una reducción del 4% de su producción en su primera lactancia (116).

- 6) Reducido valor económico de la vaca para servicio. Las evidencias del mantenimiento de la infección a través de las generaciones hacen permanecer la infección en el rodeo reduciendo el valor de dichas hembras (3).

## 8. Patogenia

Aunque la patogenia de NC en el bovino es parcialmente conocida, se cree que posterior a la ingestión de ooquistes, los esporozoítos liberados en la luz intestinal son capaces de atravesar la barrera intestinal y acceder a los

tejidos vía el sistema linfático y sanguíneo. En las células huésped infectadas, se inicia el proceso de multiplicación mediante endodiogenia pudiendo el parásito ocasionar daño celular con necrosis e inflamación, o formar quistes tisulares capaces de persistir durante toda la vida del animal. Los bradizoítos alojados en los quistes tisulares del SNC de una hembra bovina gestante pueden reactivarse bajo ciertas influencias hormonales e inmunológicas originando parasitemia (106, 110).

Luego de esta difusión hematógena, los taquizoítos atraviesan la placenta ocasionando, de acuerdo a la edad de gestación, la muerte del feto o el nacimiento de un ternero congénitamente infectado (131). Aunque se ha estimado que transcurren 3 – 4 semanas entre la infección y el aborto (11, 47), la finalización de la gestación puede concluir con el nacimiento de un ternero que en caso de ser hembra, transmitirá la enfermedad a su descendencia o tendrá riesgo de abortar (115, 133).

## 9. Respuesta inmune

En hembras bovinas congénitamente infectadas decrece el riesgo de aborto en preñeces subsiguientes, sugiriendo cierto grado de protección fetal debido a presencia de una inmunorespuesta materna (115). La inmunidad mediada por células (IMC) desempeña un papel importante en infecciones a NC por ser este un organismo endocelular. Innes *et al.*,

(62) demostraron que el tratamiento de fibroblastos con interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) recombinante causa una significativa inhibición de la multiplicación intracelular de NC. Otro estudio comprobó un aumento del IFN $\gamma$  después de la infección experimental en bovinos (130). Así mismo, trabajos experimentales realizados con NC en ratones indicarían que las citoquinas tipo 1 pueden regular la carga parasitaria y el tipo de lesión (73). Marks *et al.*, (77) describen que antígenos de 30kDa obtenidos a partir de taquizoítos de NC separados mediante SDS PAGE estimularon la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD4 pertenecientes a 4 terneros infectados experimentalmente con NC.

Ante la estimulación con antígeno de NC lisado, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de bovinos infectados proliferaron y produjeron IFN  $\gamma$  (74). Sin embargo, las correlaciones entre la respuesta inmune con la resistencia a la infección, la prevención de la transmisión congénita y el aborto en el bovino, no han sido determinadas. La IMC que involucra a los linfocitos T ayudantes con la producción de IFN $\gamma$ , IL - 12 e IL - 2 está asociada a la resistencia a *T. gondii* (56), describiéndose así mismo, el hallazgo de una respuesta linfoproliferativa *in vitro* y producción de IFN  $\gamma$  en CMSP obtenidos de vaquillonas vacías inoculadas con taquizoítos de NC inactivados o vivos (5). Similarmente, tras la



infección oral de terneros con ooquistes de NC obtenidos a partir de la materia fecal de perros, se observó una significativa respuesta IMC (40).

Considerando que el feto bovino puede reaccionar inmunológicamente a los 120-160 días (118), recientes trabajos de investigación tienden a caracterizar la respuesta fetal en los casos de neosporosis. Estudios realizados por Andrianarivo *et al.*, (4) en fetos bovinos infectados experimentalmente con NC a los 159 y 169 días de gestación, evidenciaron el desarrollo de una respuesta humoral a NC detectados por IFI aunque la IMC determinada por pruebas de linfoproliferación y producción de IFN $\gamma$  fue variable entre los fetos. En dicho trabajo, ambas respuestas, humoral y celular, no fueron suficientes para impedir la infección fetal en ninguno de los animales, ni tampoco existió correlación entre la respuesta celular y la severidad de las lesiones fetales.

El tipo de respuesta inmune celular generada determina la producción de Igs. Una respuesta celular tipo 1 estimula la producción de IgG2 mientras que una respuesta celular tipo 2 regula, mediante la secreción de IL4, la producción de IgG1 (118). Andrianarivo *et al.*, (4) encontraron que la producción de citoquinas e IFN  $\gamma$  estuvo asociada a una respuesta celular tipo 1 en 4 de los 5 fetos en estudio. Sin embargo, una respuesta predominantemente tipo 2 fue indicada por la presencia de IgG1 específica a NC. Se sugiere

que un desbalance entre las respuestas celulares 1 y 2, a favor de la tipo 2, con producción de IL4, ocurrió en los fetos abortados, lo cual pudo haber afectado su capacidad de sobreponerse y resolver la infección (4).

## 10. Diagnóstico

### 10.1. Pruebas serológicas

La identificación de anticuerpos a NC en un animal es indicativa de exposición al protozoo (53). Diversas pruebas serológicas tales como: inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo de inmunoenzima (ELISA) y la microaglutinación (MA) han sido utilizadas para demostrar anticuerpos en el suero o en el fluido corporal de fetos.

#### 10.1.1. Inmunofluorescencia Indirecta

La IFI preserva la morfología del parásito y detecta antígenos de membrana no existiendo reacción cruzada con *Sarcocystis* spp. (50). Para diluciones séricas de 1:25 a 1:640, la sensibilidad y especificidad de la prueba varía de 82.4 a 97 % y 85.7 a 90 % respectivamente (7). Sin embargo, se ha sugerido utilizar una dilución de 1:200 para maximizar la sensibilidad (102). Un reciente trabajo realizado por Venturini *et al.* (124) describe la dificultad de encontrar sueros verdaderamente negativos mediante pruebas serológicas de IFI, MA y ELISA,

proponiéndose una dilución sérica de 1:25 para demostrar la exposición a NC. En Nueva Zelanda, se utilizó un título de 1:400 para asociar la infección por NC y el aborto (99). En Escocia se encontró que 21/280 (7,5%) de fetos abortados seropositivos provenían de madres con títulos menores a 1:512 por IFI (92). Estudios realizados en California determinaron un título serológico de 1:640 como indicativo de aborto por NC (94) mientras otros investigadores sugirieron un título de 1:1280 (119).

La interpretación de un resultado serológico es difícil por la variación que los niveles de anticuerpos poseen en hembras bovinas gestantes congénitamente infectadas tendiendo a incrementarse en el último trimestre de la gestación y decreciendo después del parto o aborto (37). En Inglaterra, otros investigadores aseguran que es dificultoso el diagnóstico de aborto por NC basado en un resultado serológico individual ya que encontraron altos títulos por IFI en 9/10 vacas abortadas pero también en 45/85 vacas que no tuvieron problemas reproductivos (36). Una vaca gestante seropositiva tiene mayor riesgo de abortar (82) aunque también altos títulos podrían indicar protección fetal (96) y que otros agentes estuviesen involucrados como causa de un eventual aborto.

El hallazgo de anticuerpos en el suero de un ternero sin mamar calostro, o en el líquido de cavidades de un feto abortado,

indica infección con NC (15). En este mismo estudio, se encontró que el 50% (37/74) de los fetos abortados confirmados o presuntivos de ser causados por NC, tenían un título de 1:80 por IFI y sólo un feto fue positivo de 64 abortados por otras causas (15). El 65% (31/48) de los fetos positivos por IHQ resultaron seropositivos por IFI cuando se utilizó una dilución de 1:25 siendo seronegativos los abortados por otras causas (132). Sin embargo, en otro estudio, un 7% (7/100) de los fetos sin lesiones compatibles con neosporosis, resultaron positivos a la prueba de IFI (92). La presencia de anticuerpos a NC en fluidos fetales no prueba que el aborto fue ocasionado por NC ya que muchos terneros clínicamente normales tienen anticuerpos congénitos (95).

#### *10.1.2. Enzimoimmunoensayo*

El ELISA ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la neosporosis. La facilidad para procesar un gran número de muestras, la obtención de una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con la IFI, sumado a la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, hacen confiable a esta prueba (96).

El título de corte o el valor de absorbancia asignado a una prueba es motivo de controversia ya que depende de factores tales como composición del antígeno, anticuerpos identificados y de los conjugados utilizados (51). Un determinado título o valor de corte

debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica (53).

La utilización de antígenos solubles obtenidos por destrucción del parásito al sonicar o congelar y descongelar, disminuye la especificidad de la prueba, resultando seropositivos a NC terneros experimentalmente inoculados con *Sarcocystis* spp. (50). También, se ha detectado reacción cruzada entre NC y *Toxoplasma gondii* (121). Empleando extractos de proteínas a partir de taquizoítos que fueron incluidos en complejos inmunoestimuladores, se incrementó la especificidad del ELISA, lográndose así, disminuir el número de proteínas intracelulares causantes de uniones inespecíficas o reacciones cruzadas (23). La especificidad de la prueba fue también incrementada por la utilización de un ELISA de competición que caracterizó anticuerpos monoclonales reaccionantes con antígenos inmunodominantes de 65kDa (17).

Otros autores han descrito esta prueba a partir de taquizoítos formolados que preservan los antígenos de membrana impidiéndose la exposición de antígenos internos responsables de la reacción cruzada con otros *Apicomplexa*. En este mismo trabajo, al compararse el ELISA con la IFI, se logró un 95% de correlación, 96% de especificidad y 95% de sensibilidad (130). En animales experimental y naturalmente infectados, la avidéz

de la IgG tiende a incrementarse con el curso de la infección, describiéndose un ELISA con inmunoestimuladores e incubación con urea que permite identificar animales crónica o recientemente infectados sobre la base de esta determinación (24). Se obtuvo una buena correlación para diversos ELISA efectuados sobre sueros negativos y positivos, sin embargo hubo diferencias a bajos niveles de anticuerpos (51). Mediante ELISA en leche, fue demostrada la presencia de anticuerpos anti-NC lográndose un 95% de correlación al compararla con las muestras de suero (23).

#### 10.1.3. Microaglutinación

La microaglutinación es una prueba serológica relevante en el diagnóstico de la neosporosis. No requiere conjugados de difícil adquisición y permite analizar sueros de varias especies simultáneamente. Tiene alta repetibilidad entre operarios, es barata, de fácil lectura, utiliza poco equipamiento y materiales (103). Aunque la técnica descrita por Romand destruye la Ig M por utilización del 2 – mercaptoetanol, la temprana aparición de la Ig G en la neosporosis bovina (50) permite la utilización de esta prueba en el diagnóstico serológico. Sobre 67 sueros con títulos menores a 1:25 por IFI, 56 fueron negativos y 11 resultaron positivos a la microaglutinación utilizando una dilución de 1:40 (124). Comparándose la técnica de

microaglutinación e IFI, la sensibilidad y la especificidad que se obtuvo fue 100% vs. 98% y 97% vs. 99% respectivamente (93).

## **10.2. Microscopía óptica**

La histopatología sobre tejidos bovinos fetales resulta una técnica diagnóstica relevante en las infecciones a NC (52). Aunque son citados en la literatura casos esporádicos de abortos en bovinos por protozoos con hallazgos histopatológicos de meningoencefalitis necrotizante multifocal (MENM), miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía, adrenalitis y placentitis no supurativas (41, 46, 55, 61, 64, 65, 88, 98, 91, 107) en la descripción de abortos bovinos asociados a NC, (111) el diagnóstico presuntivo de aborto por NC puede emitirse ante la presencia de este tipo de lesiones (4).

Sin embargo, existen reportes de fetos experimentalmente infectados con lesiones compatibles que no abortaron, (14) y nacieron sin signos de neosporosis (11, 27, 48, 97). Así mismo, opiniones emitidas por epidemiólogos tendieron a minimizar la importancia de las lesiones histopatológicas a nivel del SNC ocasionadas por NC en bovinos (117), aunque este criterio no es compartido por los patólogos (Anderson and Barr, comunicación personal).

En casos naturales de aborto a NC en bovinos, la ubicación de las lesiones histopatológicas fue caracterizada por Helman *et al.* (58)

describiéndose que la corteza cerebral y el cerebelo fetal resultaron las regiones más comúnmente afectadas. Sin embargo, realizado en nuestro país, un trabajo de similares características reveló que las lesiones histopatológicas más frecuentes ocasionadas por NC se presentaron en el área basal del SNC (bulbo, protuberancia y pedúnculos cerebrales (85). Este aspecto es relevante a los fines de adecuar el muestreo del encéfalo fetal para los análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos.

## **10.3. Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica (IHQ) realizada sobre tejidos fetales formolados con lesiones histopatológicas compatibles, permite la identificación de NC con alta especificidad, adquiriendo valor diagnóstico relevante (4, 31, 33, 53). Aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente (4). Esta baja sensibilidad es avalada por la descripción de un caso donde se necesitaron 19 cortes para que uno de ellos resultara positivo por IHQ (90).

Algunos investigadores han cuestionado el valor diagnóstico de la técnica IHQ describiéndose resultados positivos en fetos no abortados y terneros nacidos vivos (11, 27, 48, 97). Thurmond *et al.* (117) proponen que el valor

diagnóstico de la IHQ es mayor en rodeos con brotes de abortos por NC por disminuir la proporción de falsos positivos. La utilización de anticuerpos policlonales en la técnica de IHQ puede ocasionar reacción cruzada con *Toxoplasma gondii* (49). Sin embargo, al no estar comprobado que *T. gondii* es causa importante de abortos en bovinos, esta limitante no sería significativa para dichos especímenes. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra taquizoitos de NC, pero su utilización para IHQ aún no ha sido evaluada (53)

#### **10.4. Reacción en cadena de la polimerasa**

La técnica PCR ha permitido un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas por ser extremadamente sensible y específica. En el diagnóstico de la neosporosis bovina, su impacto ha sido notable permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos. En un estudio realizado sobre 83 fetos bovinos abortados, se encontró 24 (29%) cerebros positivos a NC por PCR. El examen histopatológico de estos casos positivos a NC por PCR reveló que 18 de los fetos presentaron lesiones compatibles con infección por protozoo. Sólo 6/24 (25%) casos positivos a NC-PCR tuvieron anticuerpos demostrados por IFI y ELISA. Este hallazgo sugiere que las pruebas serológicas a partir de fluidos fetales son de relativo valor y probablemente el resultado

serológico de la madre aporte más información referente a la posibilidad de infección en el feto (57). Otro estudio donde se correlacionaron diferentes pruebas diagnósticas, se encontró que en 6/8 fetos bovinos con lesiones histopatológicas compatibles a NC y negativos a la IHQ, se amplificó su ADN (18).

#### **10.5. Aislamiento**

El primer aislamiento de NC fue logrado a partir de material del SNC obtenido de un perro infectado (42). Posteriormente se reporta en California por primera vez un aislamiento a partir de un feto bovino abortado (35). Luego se lograron otros aislamientos en California (12), Suecia (109), Japón (136) y recientemente, en el Reino Unido e Italia (38, 75). Así mismo, se ha aislado NC del SNC perteneciente a una vaca adulta infectada naturalmente que abortó por dicho protozoo (106). El aislamiento en cultivos celulares a partir de fetos bovinos es dificultoso debido a la severa autólisis de las células del hospedador, el bajo número de parásitos presentes y a la alta probabilidad de contaminación (35). Se propone inicialmente, inocular tejido cerebral de feto bovino a ratones, con la finalidad de multiplicar y concentrar los taquizoitos aumentando las probabilidades de aislamiento (137). En nuestro país, trabajos tendientes a lograr el aislamiento de NC, demostraron una baja sensibilidad de esta técnica, lográndose seroconversión de ratones

inoculados con homogeneizados de SNC fetal (125). Recientes trabajos han permitido identificar quites de NC en el SNC de un merión inoculado a partir de tejido cerebral de un feto bovino infectado, constituyendo este hecho, el primer aislamiento de NC a partir de un bovino (126).

NC ha sido cultivada *in vitro* con monocitos bovinos, células endoteliales de arteria cardiopulmonar bovina, células de riñón bovino, fibroblastos humanos, células Vero (células renales de mono verde africano) y otras líneas celulares en donde sólo taquizoítos han sido observados. En esta etapa de su crecimiento *in vitro*, el parásito mantiene la infectividad para los animales. Se han mantenido taquizoítos activos en cultivos celulares durante 8 años sin perder infectividad para ratones. La criopreservación de taquizoítos en nitrógeno líquido es una alternativa válida sin pérdida de la infectividad para los cultivos celulares (49).

El protozoo puede mantenerse *in vivo* mediante inculación de *Meriones unguiculatus* los cuales son altamente susceptibles. Los taquizoítos pueden multiplicarse en las células peritoneales de los meriones y así ser transferidos mediante inóculos sucesivos (100).

## 11. Tratamiento y prevención

Existe información acerca de la sensibilidad "*in vitro*" de NC a ciertos antimicrobianos (66). Sin embargo, la administración de

monensina a razón de 40-120 mg/cabeza/día no resultó efectiva en bovinos naturalmente infectados con NC (116). Actualmente no existe tratamiento en los bovinos que los libere de la enfermedad (4).

La neosporosis neonatal canina caracterizada por paresias y parálisis del tren posterior, puede ser tratada con clindamycina oral en dosis de 12.5 a 18.5 mg/kg p.v. suministrada dos veces por día durante 2 a 4 semanas. También resulta eficaz la combinación de pyrimethamina y sulfonamidas en dosis de 0.25 a 0.5 y 30 mg/kg p.v., respectivamente cada 12 horas en forma oral durante 4 semanas (71).

La prevención de la enfermedad en los bovinos mediante el uso de vacunas inactivadas es motivo de investigación. Se han utilizado vacunas apartir de taquizoítos inactivados de NC en combinación con diferentes adyuvantes evaluándose la respuesta inmune lograda. Se vacunaron hembras vírgenes con 3 dosis de 5 ml por vía subcutánea con 1 mes de intervalo. En los animales vacunados observaron títulos serológicos muy inferiores respecto a los animales experimentalmente infectados con taquizoítos vivos de NC. Sin embargo, un adyuvante sintético (Polygen) ocasionó, en los animales vacunados, una adecuada respuesta IMC con producción de IFN $\gamma$ . Estos niveles de IFN $\gamma$  resultaron similares al observado en el grupo infectado experimentalmente y al encontrado en infecciones naturales (5).

Finalmente, al ser utilizada sobre animales gestantes y desafiados experimentalmente por inoculación endovenosa e intramuscular de taquizoítos vivos de NC, aquella preparación resultó inadecuada para prevenir la infección fetal (6).

Considerando el rol epidemiológico del perro como huesped definitivo de NC y a los fines de evitar la propagación de la enfermedad, se recomienda impedir el acceso de los perros a las fuentes de agua, pasturas, galpones y silos donde se almacene alimento para los bovinos (4, 84). Es importante también recolectar los fetos abortados y/o placentas y eliminarlos a los fines de evitar la fuente de infección para los caninos (113).

Dada la amplia distribución de esta enfermedad en los bovinos del país, se sugieren además diferentes medidas de manejo, a saber (84):

- 1) Reponer animales seronegativos a la enfermedad. Para esto debería sangrarse el animal recién nacido previo al calostrado. Si esto no fuese posible, la obtención de sangre podría realizarse a los 5-6 meses de edad cuando no haya interferencia de anticuerpos calostrales.
- 2) No dejar las hijas de vacas seropositivas para reposición dado su alto riesgo de ser congénitamente infectadas.
- 3) Es aconsejable realizar al menos 2 sangrados previos al primer servicio de vaquillonas debido al alto riesgo de aborto

que tiene esta categoría por su "pobre" memoria inmunológica.

- 4) Deberá sangrarse todo animal que entre al establecimiento a los fines de identificar animales seropositivos a NC.
- 5) Realizar el seguimiento del desempeño reproductivo del rodeo especialmente en establecimientos lecheros con elevada seroprevalencia a los fines de detectar perdidas de preñeces y/o fetos momificados mediante tactos rectales seriados.
- 6) En establecimientos donde se realice la transferencia embrionaria (TE) deberán utilizarse receptoras seronegativas a la enfermedad. Existen evidencias concretas del riesgo de aborto y transmisión congénita de NC al realizar dicha técnica en receptoras seropositivas (83, Campero *et al*, datos no publicados). La TE podría ser una técnica adecuada al permitir el empleo de embriones originados a partir de donantes con alto valor genético seropositivos a NC, evitándose el riesgo de difundir la enfermedad al ser transferidos dichos embriones a receptoras seronegativas (Campero *et al*, datos no publicados).
- 7) Colocar las vacas seropositivas y que posean al menos un aborto en una lista tentativa de refugio.
- 8) Identificar, aislar y realizar estudios serológicos de vacas abortadas.

- 9) Recuperar fetos y placentas abortados para enviarlos a centros de diagnóstico a los fines de establecer el agente abortigénico.

## 12. Conclusiones

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria abortigénica emergente y de amplia distribución en rodeos para carne y leche de nuestro país la cual debe ser considerada ante la presencia de pérdidas reproductivas. Pese a ello se considerará que otros agentes infecciosos, ya sean solos o asociados a NC, pueden ser responsables de dichas pérdidas.

Aunque la realización de pruebas serológicas resulta útil para identificar animales expuestos a NC, el diagnóstico definitivo de aborto bovino a NC deberá realizarse mediante la detección de dicho protozoo en tejidos fetales o placenta de la hembra abortada.

La caracterización de esta enfermedad como entidad causante de pérdidas económicas para la industria ganadera argentina avalan la existencia de trabajos investigación tendientes a esclarecer su importancia.

Mayores esfuerzos deberán realizarse a los fines de mejorar el control de la enfermedad evitando el ingreso de animales en pie sin el correspondiente análisis de seronegatividad a NC. Se espera en los próximos años el desarrollo de vacunas capaces de inducir inmunidad protectora a los fines de

controlar la enfermedad en los bovinos.

## Bibliografía

1. Agerholm, J.S., Willadsen, C.M., Nielsen, T.K., Giese, S.B., Holm, E., Jensen, E., Agger, J.F. (1997): Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *J of Veterinary Medicine A* 44: 551-558.
2. Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L., and Conrad, P.A. (1991): *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198: 241-244.
3. Anderson, M.L., Reynolds, J.P., Rowe, J.D., Packham, A.E., Barr, B.C. and Conrad, P.A. (1997). Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210: 1169-1172.
4. Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A. (2000): Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61: 417-431.
5. Andrianarivo, A.G.; Choromanski, L.; McDonough, S.P.; Packham, A.E.; Conrad, P.A. (1999): Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *International Journal for Parasitology* 29: 1613-1625.
6. Andrianarivo, A.G., Rowe, J.D., Barr, B.C., Anderson, M.L., Packham, A.E., Sverlow, K.W., Choromanski, L., Loui, C., Grace, A., Conrad, P.A. (2000): A POLYGENtm-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Inter. J. For Parasitol.* 30: 985-990.
7. Atkinson, R., Harper, P.A.W., Riechel M.P. and Ellis, J.T. (2000): Progress in the Serodiagnosis of *Neospora*



- caninum* Infections of Cattle. *Parasitology Today*. 16: 110-114.
8. Bacigalupe D, Venturini MC, Unzaga JM, Machuca M, Alvarez ML, Di Lorenzo C, Abdala A, Guglielmone A, Basso W, Venturini L. Infecciones transplacentarias por *Neospora caninum* en bovinos. (1998): *Memorias XVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*. 9 – 13 Nov. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. Pág. 143.
  9. Barber, J.S., Gasser, R.B., Ellis, J., McMillan, D. and Trees, A.J. (1997): Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *Journal of Parasitology* 83: 1056-1058.
  10. Barber, J.S. and Trees, A.J. (1998): Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Inter. J. for Parasitol.* 28: 57-64.
  11. Barr, B.C., Anderson, M.L., Dubey, J.P., Conrad, P.A. (1991): Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28: 110-116.
  12. Barr, B.C., Conrad, P.A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M.L., Reynolds, J., Chauvet, A.E., Dubey, J.P., Ardans, A.A. (1993): Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora* – infected fetuses: four cases (1990 – 1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202: 113 – 117.
  13. Barr, B.C., Conrad, P.C., Sverlow, K., Tarantal, A.F., and Hendrickx, A.G. (1994a): Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection the nonhuman primate. *Laboratory Investigations* 71: 236-242.
  14. Barr, B.C., Rowe, J.D., Sverlow, K.W., BonDurant, R.H., Ardans, A.A., Oliver, M.N., Conrad, P.C. (1994b): Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 207-215.
  15. Barr, B.C., Anderson, M.L., Sverlow, K., Conrad, P.C. (1995): Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Record* 137: 611-613.
  16. Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Moore, D.P., Rambeau, M., Unzaga, J.M., Campero, C.M., Bacigalupe, D., and Dubey, J.P. (en prensa): Prevalence of *Neospora caninum* in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *Journal of Parasitology*.
  17. Baszler, T.V., Knowles, D.P., Dubey, J.P., Gay, J.M., Mathison, B.A., McElwain, T.F. (1996): Serological Diagnosis of Bovine Neosporosis by *Neospora caninum* Monoclonal Antibody-Based Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 1423-1428.
  18. Baszler, T.V., Gay, L.J.C., Long, M.T., Mathison, B.A. (1999): Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 4059-4064.
  19. Bergeron, N., Girard, C., Paré, J., Fecteau, G., Robinson, J., Baillargeon, P. (2001a): Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 173-175.
  20. Bergeron, N., Fecteau, G., Villeneuve, A., Girard, C., Paré, J. (2001b): Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 97: 145-152.
  21. Bjerkas I, Mohn SF and Presthus J. (1984): Unidentified cysy-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd.* 70: 271 – 274.
  22. Bjerkas, I. and Presthus, J. (1989): The neurophatology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoan in dogs. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 97: 459 – 468.
  23. Björkman, C., Holmdahl, O.J.M., Uggla, A. (1997): An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk

- of cattle. *Veterinary Parasitology*. 68: 251-260.
24. Björkman, C., Näslund, K., Stenlund, S., Maley, S.W., Buxton, D., Uggla, A. (1999): An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 41-44.
  25. Björkman, C., Alenius, S., Emanuelsson, U., Uggla, A. (2000): *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *The Veterinary Journal* 159: 201-206.
  26. Brittain, R. (2000): A review of current reports on bovine neosporosis. *AETE Newsletter*. (11): 8 – 10.
  27. Bryan, L.A., Gajadhar, A.A., Dubey, J.P. and Haines, D.M. (1994). Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. Protozoan. *Canadian Veterinary Journal* 35: 111-113.
  28. Buxton, D., Maley, S.W., Pastoret, P.P., Brochier, B. Innes, E.A. (1997): Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet. Rec.* 141:308-309.
  29. Campero, CM; Anderson, ML; Conosciuto, G; Odriozola, H; Bretschneider, G; Poso, MA. (1997a): Neosporosis bovina: una nueva causa de aborto en Argentina. *Therios* 26:268-271.
  30. Campero, C.M., Odriozola, H., Venturini, M.C., Venturini, L., Lagomarsino, H., Conosciuto, G., Castro, T., Poso, M.A., Medina, D., Bacigalupe, D. (1997b): Presencia de seroreactores a *Neospora caninum* por la prueba de inmunofluorescencia indirecta en rodeos lecheros con abortos en Argentina. *XIII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba. 17-23 noviembre*.
  31. Campero, C.M., Anderson, M.L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., Poso, M.A. (1998): *Neospora caninum* associated abortion in dairy herd in Argentina. *Veterinary Record* 143: 228-229.
  32. Campero, C.M., Cipolla, A.L., Odeón, A.C., Odriozola, E., Moore, D.P., Ronchi, J. (2000a): Causales del aborto y mortalidad neonatal en bovinos de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *XXI Congreso Mundial de Buiatria, Punta del Este, Uruguay, 4- 8 diciembre*. Resúmenes pag.41.
  33. Campero, C.M., Moore, D.P., Anderson, M.A., Posso, M.A. (2000b): Diagnóstico de aborto bovino a *Neospora caninum* mediante inmunohistoquímica en rodeos de Argentina. *XXI Congreso Mundial de Buiatria, Punta del Este, Uruguay, 4- 8 de diciembre*. Resúmenes pág. 95.
  34. Cole, R.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P. (1995): Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J Parasitol.* 81: 730 – 732.
  35. Conrad, P.A., Barr, B.C., Sverlow, K.W., Anderson, M., Daft, M., Kinde, H., Dubey, J.P., Munson, L., Ardans, A. (1993): In vitro isolation and caracterización of a *Neospora* sp from aborted bovine fetuses. *Parasitol.* 106: 239 – 249.
  36. Dannatt L, Guy F and Trees A J. (1995): Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd. *Vet Rec.* 137: 566-567.
  37. Dannatt, L. (1997): *Neospora caninum* antibody levels in an endemically-infected dairy herd. *Cattle Practice* 5: 335-337.
  38. Davison, H.C, Guy, F., Trees, A.J., Ryce, C., Ellis, J.T., Otter, A., Jeffrey, M., Simpson, V.R., Holt, J.J. (1999): In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Research in Vet. Science.* 67: 103-105.
  39. Davison, H.C., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Williams, D.J., Kelly, D.F. Trees, A.J. (2001): Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res. Vet. Sci.* 70: 163-168.
  40. De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Gasbarre, L. (1999):

- Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology*. 29: 1647-1657.
41. Dubey, J.P., Bergeron, J.A. (1982): *Sarcocystis* as a cause of placentitis and abortion in cattle. *Vet. Pathol.* 19: 315 – 318.
  42. Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., and Uggla, A. (1988): Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192: 1269-1285.
  43. Dubey, J.P., Lindsay D.J. (1989a): Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1578 – 1579.
  44. Dubey, J.P., Lindsay, D.J. (1989b): Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J. Parasitol.* 75: 765 – 771.
  45. Dubey, J.P. and Lindsay, D.J. (1990a): *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 230 – 233.
  46. Dubey, J.P., Miller, S., Lindsay, D.S., Tooper, M.J. (1990b): *Neospora caninum* associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 66 – 69.
  47. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Anderson, M.L., Davis S.W., Shen S.K. (1992): Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *JAVMA*. 201: 709-713.
  48. Dubey JP. (1993): Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: *JP Kreier (Editor). Parasitic Protozoa.* 6. Academic Press, NY. 1-158.
  49. Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. (1996): A review of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 67: 1-59.
  50. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Adams, DS, Gay, JM, Baszler, TV, Blagburn, BL and Thulliez, P. (1996): Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research* 57: 329-336.
  51. Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Adams D.S., McAllister, M.M., Anderson, M.L., Sprecher, R., Baszler, T.V., Kwok, O.C., Lally, N.C., Björkman, C. and Uggla A. (1997): Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Parasitol.* 83: 1063 – 1069.
  52. Dubey, J.P., (1999a): Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214: 1160-1163.
  53. Dubey, J.P., (1999b): Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 1589: 1-19.
  54. Echaide, I.E., Valentini, B, Baszler, T.V. (1998): Detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos de la cuenca lechera de Santa Fe y Córdoba. Resultados preliminares. *XII Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, Mar del Plata, 26 y 27 de Noviembre de 1998, Resúmenes p. 71.*
  55. Fayer, R., Johanson, A.J., Lunde, M. (1976): Abortion and other signs of disease in cows experimentally infected with *Sarcocystis fusiformes* from dogs. *J. Infect. Dis.* 134: 624 – 628.
  56. Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi., et al., (1994): Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 150: 2533-2543.
  57. Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., Thür, B., Busato, A., Stärk K.D.C., and Müller N. (1998): Molecular and immunodiagnostic investigation on bovine neosporosis in Switzerland. *Intern. J. for Parasitol.* 28: 679-691.
  58. Helman, R.G., Stair, E.L., Lehenbauer, T.W., Rodgers, S. and Saliki, J.T. (1998): Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted

- fetuses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10: 292-295.
59. Hietala, S.K., Thurmond, M.C. (1999): Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *International Journal for Parasitology* 29: 1669-1676.
  60. Hoar, B.R., Ribble, C.S., Spitzer, C.C., Spitzer P.G., Janzen, E.D. (1996): Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora* sp. infection. *Can. Vet. J.* 37: 364-366.
  61. Hong, C.B., Giles, R.C., Newman, L.E., Fayer, R. (1982): Sarcocystosis in an aborted bovine fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 585-588.
  62. Innes, E.A., Panton, W.R.M., Marks, J., Trees, A.J., Holmdahl, J., Buxton, D. (1995): Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of H uracil. *J. Comp. Pathol.* 113: 95-100.
  63. Jensen, L., Jensen, T.K., Lind, P., Henriksen, S.A., Uggle, A., Bille-Hansen, V. (1998): Experimental porcine neosporosis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 106: 475 – 482.
  64. Jolley WR, Jensen R, Hancock HA, Swift BL. (1983): Encephalitic sarcocystosis in a newborn calf. *Am J Vet Res.* 44: 1908-1911.
  65. Kunde JM, Jones LP, Craig TM. (1980): Protozoal encephalitis in a bovine fetus. *Southwest Vet* 33: 231 – 232.
  66. Lindsay, D.S., Rippey, N.S., Cole, R.A., Parsons, L.C., Dubey, J.P., Tidwell, R.R. and Blagburn, B.L. (1994): Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. *Am. J. Vet. Res.* 55: 976-981.
  67. Lindsay, D.S., Rippey, N.S., Powe, T.A., Sartin, E.A., Dubey, J.P., Blagburn, B.L. (1995): Abortions, fetal death and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.* 56: 1176 - 1180.
  68. Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Byron, L.B. (1996a): Finding the cause of parasite-induced abortions in cattle. *Veterinary Medicine* 64-71.
  69. Lindsay, D.S., Kelly, E.J., McKown, R.D. et al. (1996b): Prevalence *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 82:657-659.
  70. Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Duncan, R.B. (1999a): Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology.* 82: 327-333.
  71. Lindsay, D.S., Dubey, J.P., McAllister, M.M. (1999b): *Neospora caninum* and potential for parasite transmission. *Compendium* 21: 317-321.
  72. Lindsay, D.S., Weston, J.L., Little, S.E. (2001): Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. *Vet. Parasitol.* 97: 159 – 164.
  73. Long, M.T., Baszler, T.V., Mathison, B.A. (1998): Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 84: 316-320.
  74. Lunden, A., Marks, J., Maley, S.W. Innes, E.A. (1998): Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 20:519-526.
  75. Magnino, S., Vigo, P.G., Fabbri, M., Colombo, M., Bandi, C., Genchi, C. (1999): Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. *Vet Rec.* 144: 456.
  76. Marsh, A.E., Barr, B.C. Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R., Conrad, P.A. (1996): Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 1907-1913.
  77. Marks, J., Lunden, A., Harkins, D. and Innes, E. (1998) Identification of

- Neospora* antigens recognized by CD4 + T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunology* 20: 303-309.
78. McAllister, M.M., Huffman, E.M., Hietala, S.K., Corand, P.A., Anderson, M.L. and Salman, M.D. (1996): Evidence suggesting a point of bovine abortion due to neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8: 355-357.
  79. McAllister, M.M., Dubey, J. P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A and McGuire, A.M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 28: 1473-1478.
  80. McAllister, M.M., Björman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G. (2000): Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *JAVMA*. 217: 881-887
  81. McGuire, A.M., McAllister, M., Wills, R.A., Tranas, J.D. (1999): Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. For Parasitol.* 29: 1525-1529.
  82. Moen, A.R., Wouda, W., Mul, M.F., Graat, E.A.M. and van Werven, T. (1998): Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreak: a retrospective study in four dairy herds. *Theriogenology* 49: 1301-1309.
  83. Moore, D.P., Odeón, A.C., Medina, D., Lagomarsino, H., Campero, C.M. (1999): Estudio seroepidemiológico de *Neospora caninum* en vacas lecheras de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *XXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría/Paysandú, Uruguay, 17 al 19 de junio*. Memorias pág 1-3.
  84. Moore, D.P., Odeón, A.C., Campero, C.M. (2000a): Sugerencias de saneamiento y manejo para limitar la neosporosis bovina. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires*. 16: 43 – 45.
  85. Moore, D.P., Poso, M.A., Odeón, A.C., Campero, C.M. (2000b): Caracterización histopatológica de lesiones causadas por *Neospora caninum* en el sistema nervioso central de fetos bovinos abortados. *Segunda Reunión Argentina de Patología Veterinaria 27 al 29 de septiembre*. Resúmenes pág.127.
  86. Moore, D.P., Odeón, A.C., Venturini, M.C., Späth, E., Leunda, M.R., Draghi, M.G., Cetrá, B., Campero, C.M. (2000c): Seroprevalencia a *Neospora caninum* en terneros de cría del sur de Corrientes. *III Congreso Argentino de Parasitología, Mar del Plata, 1 al 4 de noviembre*. Memorias pág. 441
  87. Moore, D.P., Medina, D., Odeón, A.C., Odriozola, H., Campero, C.M. (2000d): Infección por *Neospora caninum* en vacas para carne y leche con problemas reproductivos. *XIII Reunión Científica Técnica de la AAVLD, Merlo, San Luis 15, 16 y 17 de Noviembre*. Memorias. Pág. 47
  88. Munday, B.L., Black, H. (1976): Suspected *Sarcocystis* infections of the bovine placenta and fetus. *Z. Parasitenkd.* 51: 129-132.
  89. Murray, R.D. (1991): Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Archives of Virology* 3 (Suppl.) 217-224.
  90. Nietfeld, J.C., Dubey, J.P., Anderson, M.L., Libal, M.C., Yaeger, M.J., Neiger, R.D. (1992): *Neospora* like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 223-236.
  91. O'Toole, D., Jeffrey, M. (1987): Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet. Rec.* 121: 563 – 566.
  92. Otter A, Jeffrey M, Scholes SFE, Helmick B, Wilesmith JW and Trees AJ. (1997): Comparison of Histology with Maternal and Fetal Serology for the Diagnosis of Abortion Due to Bovine Neosporosis. *Vet. Rec.* 141(19): 487 – 489.
  93. Packham, AE, Sverlow, KW, Conrad, PA, Loomis, EF, Rowe, JD, Anderson, ML, Marsh, AE, Cray, C, Barr, BC. (1998): A Modified Agglutination Test

- for *Neospora caninum*: Development, Optimizacion, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 467 - 473.
94. Paré, J., Hietala, S. and Thurmond, M.C. (1995): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7: 352-359.
  95. Paré, J., Thurmond, M.C. and Hietala, S. (1996): Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calffood mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research* 60: 133 - 139.
  96. Paré, J., Thurmond, M.C. and Hietala, S. (1997): *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *Journal of Parasitology* 83: 82 - 87.
  97. Paré, J., Fecteau, G., Fortin, M., Marsolais, G. (1998): Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *JAVMA* 213: 1595 - 1598.
  98. Parish SM, Maag - Miller L, Besser TE, Weidner JP, McElwain T, Knowles DP, Learters CW. (1987): Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191: 1599 - 1600.
  99. Patitucci, A.N. (1994): *Neospora* and abortion in New Zealand dairy cattle. *Thesis of Master Philosophy in Veterinary Science, Massey University, New Zeland.*
  100. Pita Gondim, LF, Saeki, H, Onaga, H, Hiritani, M and Yamane, I. (1999): Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *New Zealand Veterinary Journal.* 47: 36.
  101. Quintanilla-Gozalo, A., Pereira-Bueno, J., Tabarés, E., Innes, E.A. González-Paniello, R., Ortega-Mora, L.M. (1999): Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *International Journal for Parasitology* 29: 1201-1208.
  102. Riechel, M.P. and Drake, J.M. (1996). The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. *New Zealand Veterinary Journal* 44: 151-154.
  103. Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J. P. (1998): Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res.* 84:50-53.
  104. Sanderson, M.W., Gay, J.M., Baszler, T.V. (2000): *Neospora caninum* seroprevalencia and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Veterinary Parasitology* 90: 15 - 24.
  105. Sawada, M., Park, C., Kondo, H., Morita, T., Shimada, A., Yamane, I. And Umemura, T. (1998): Serological Survey of Antibody to *Neospora caninum* in Japanese Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 853-854.
  106. Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T. (2000): Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Veterinary Parasitology.* 90: 247-252.
  107. Shivaprasad, H.L., Ely, R., Dubey, J.P. (1989): A *Neospora* - like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet. Parasitol.* 34: 145 - 148.
  108. Speer, C.A. and Dubey, J.P. (1989): Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J Protozool.* 36: 458-463.
  109. Stenlund, S., Björkman, C., Holmdahl, O.J.M., Kindahl, H., Ugglä, A. (1997): Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 83: 214-219.
  110. Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Ugglä, A., Björkman. (1999): Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology.* 85: 227-234.
  111. Thilsted, J.P. and Dubey, J.P. (1989): Neosporosis-like abortions in a herd of

- dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 205-209.
112. Thornton, R.N., Gajadhar, A., Evans, J. (1994): *Neospora* abortion epidemic in a dairy herd. *N.Z. Vet. J.* 42: 190-191.
  113. Thurmond, M.C.; Hietala, S. (1995). Strategies to control *Neospora* infection in Cattle. *The Bovine Practitioner* 29: 60-63.
  114. Thurmond, M.C. and Hietala, S. (1996). Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 57: 1559-1562.
  115. Thurmond, M.C., Hietala, S. and Blanchard P.C. (1997a). Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9: 44-49.
  116. Thurmond, M.C. and Hietala, S. (1997b). Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210: 672-674.
  117. Thurmond, MC, Hietala SK, Blanchard BC. (1999). Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. *J Vet Diagn Invest* 11: 90-94.
  118. Tizard, J. (1992): *Inmunología Veterinaria Quinta Edición*, p 234 – 237.
  119. Trees, A.J., Guy, F., Low, J.C., Roberts, D., Buxton, D. and Dubey, J.P. (1994): Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet Rec* 134: 405-407.
  120. Trees, A.J., Davison, H.C., Innes, E.A., Wastling, J.M. (1999): Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology.* 29: 1195-1200.
  121. Ugglä, A., Hilali, M., Lövgren, K. (1987): Serological responses in *Sarcocystis cruzi* infected calves challenged with *Toxoplasma gondii*. *Res. Vet. Sci.* 43: 127 – 129.
  122. Ugglä, A., Stenlund, S., Holmdahl, O.J.M., Jakubek, E.-B., Thebo, P., Kindahl, H., Björkman, C. (1998): Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *International Journal for Parasitology* 28: 1467-1472.
  123. Venturini, L., DiLorenzo, C., Venturini, C. y Romero, J. (1995): Anticuerpos anti *Neospora* sp en vacas que abortaron. *Vet Argentina* 12: 167-170.
  124. Venturini, M.C., Venturini, L., Bacigalupe, D., Machuca, M., Echaide, I., Basso, W., Unzaga, J.M., Di Lorenzo, C., Guglielmo, A., Jenkins, M.C., Dubey, J.P. (1999): *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *International Journal for Parasitology.* 29: 1705 – 1708.
  125. Venturini, M.C, Bacigalupe, D., Venturini, L., Rambeaud, M., Campero, C., Moore, D.P., Unzaga, J.M., Basso, W., Machuca, M. (2000): Detección de *Neospora caninum* en ratones inoculados con cerebros de fetos bovinos abortados. *XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, Uruguay, 4- 8 diciembre*. Resúmenes pág. 95.
  126. Venturini, M.C, Bacigalupe, D., Venturini, L., Basso, W., Moore, D.P., Unzaga, J.M., Machuca, M. M., Campero, C., (2001): Isolation of *Neospora* sp. from the brain of a dairy calf in Argentina. *Congress of Parasitology, Italia* (aceptado).
  127. Waldner, C.L., Janzen, E.D., Ribble, C.S. (1998): Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *JAVMA.* 213: 685-690.
  128. Waldner, C.L., Janzen, E.D., Henderson, J., Haines, D.M. (1999): Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *JAVMA.* 215: 1485-1490.
  129. Waldner, C.L., Henderson, J., Wu, J.T., Breker, K., Chow, E.Y. (2001): Reproductive performance of a cow-

- calf herd following a *Neospora caninum*-associated abortion epidemic. *Can. Vet. J.* 42: 355-360.
130. Williams D.J.L., McGarry J., Guy F., Barber J., Trees A.J. (1997): Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Veterinary Record*. 140: 328-331.
  131. Williams, D.J.L., Guy, G.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., MacEachen, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J. (2000): *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121: 347-358.
  132. Wouda, W., Moen, A.R., Visser IJR, Van Knapen, F (1997). Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 180-185
  133. Wouda, W., Moen, A.R. and Schukken, Y.H. (1998): Abortion risk in progeny of cows after a *N. caninum* epidemic. *Theriogenology* 49: 1311-16.
  134. Wouda, W., Dijkstra, Th., Kramer, A.M.H., Van Maanem, C., Brinkhof, J.M.A. (1999): Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Inter Journal for Parasitology*. 29: 1677-1682.
  135. Yaeger, M.J., Shawd-Wessels, S., Leslie-Steen, P. (1994): *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 506-508.
  136. Yamane, I., Kokuho, T., Shimura, K., et al. (1996): In vitro isolation of a bovine *Neospora* in Japan. *Vet. Rec.* 138: 652.
  137. Yamane, I., Shibahara, T., Kokuho, T., Shimura, K., Hamaoka, T., Haritani, M., Conrad, P.A., Park, C., Sawada, M., Umemura, T. (1998): An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 364-368.