

NEOSPOROSIS COMO CAUSA DE ABORTO EN EL GANADO BOVINO

ELIZABETH MORALES SALINAS

FRANCISCO J. TRIGO TAVERA

*Departamento de Patología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, DF*

I.	Introducción	2
II.	Historia	2
III.	Estructura y ciclo de vida	6
IV.	Patogénesis	8
V.	Cultivo	8
VI.	Diagnóstico	9
VII.	Prevención y control	12
VIII.	Tratamiento	12
IX.	Conclusiones	13
	Referencias	13

I. Introducción

Neospora caninum (*N. caninum*) es un protozooario perteneciente al phylum Apicomplexa y estructuralmente similar a *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), pero diferente a este ultraestructural y antigénicamente (3,7,8,12,17,18,24,27,36,40,50). Dicho parásito produce comúnmente una infección natural en perros y el ganado, se ha encontrado también en caballos, ovejas y cabras. En gatos, ratas, ratones y gerbiles la infección que causa se ha producido en forma experimental ocasionando cuadro clínico en estos animales (1,5,6,8,9,11,18,20,22,24,25,26,28,29,31,35,43,45, 47,50,51,54).

N. caninum causa enfermedad fatal en perros de todas las edades; sin embargo, se ha notificado con mayor frecuencia en perros jóvenes, en los cuales la enfermedad se caracteriza por parálisis severa y progresiva (11, 14, 22, 24, 33, 50, 55). En el ganado la infección por un protozooario parecido a la *Neospora* se asocia con parálisis neonatal, encefalomiélitis y aborto (3,5,7,9,21,23,25,29,30,32,55). La neosporosis en el ganado se caracteriza por aborto entre el tercero y noveno meses de gestación y ocurre con mayor frecuencia entre el quinto y sexto mes de gestación. Hasta la fecha se desconoce si la *Neospora caninum* aislada de perros infectados y la *Neospora* aislada de tejidos fetales de bovinos son o no parásitos similares; sin embargo, se ha visto que de no ser la misma especie, si son especies muy parecidas y relacionadas entre si, por lo que comparten determinantes antigénicos. Por esta razón ahora se prefiere referir como infección por especies de *Neospora* en caso del ganado bovino (3, 8, 18,54).

II. Historia

Una enfermedad parecida a la neosporosis fue reconocida en 6 perros Bóxer por Bjerkas *et al.*, en Noruega en 1984. Cinco de estos perros desarrollaron alteraciones neurológicas de 2 a 6 meses

después del nacimiento. En el estudio histopatológico se encontraron estructuras parasitarias parecidas a *T. gondii* en cerebro y músculos sin embargo, no se encontraron anticuerpos anti *T. gondii* en el suero de los perros (9, 11, 13, 17, 18, 21, 22, 55).

Dubey *et al.* en 1988 encontraron un parásito similar en 10 perros de Estados Unidos, distinguiéndolo de *T. gondii* y llamándolo *N. caninum*. En el mismo año Dubey, *et al.* aislaron a *N. caninum* de perros con infección natural y lo cultivaron en ratones y en cultivo de células, con ello indujeron experimentalmente neosporosis en perros (9, 11, 21, 22, 24, 26, 36, 55). Lindsay y Dubey en 1989 desarrollaron una prueba inmunohistoquímica para identificar antígenos de *N. caninum* en tejidos fijados en formalina amortiguada usando anticuerpos anti *N. caninum* provenientes de un conejo inoculado con el parásito, de esta manera hicieron posible realizar el diagnóstico de neosporosis en animales (16, 17, 21, 22, 36). Bjerkas y Dubey en 1992 compararon estructural y antigénicamente los parásitos encontrados en tejidos fijados en formalina de los perros de Noruega y Estados Unidos y llegaron a la conclusión de que la parasitosis originalmente descrita en perros de Noruega era *N. caninum* (10, 22). Sin embargo, ahora se sabe que la neosporosis no es una enfermedad nueva, ya que Dubey *et al.* en 1988 y en 1990, realizaron un estudio retrospectivo inmunohistoquímico de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina de los casos diagnosticados como infección por *T. gondii* en tejidos de perros, e identificaron a *N. caninum* en animales que habían muerto en Estados Unidos en 1957 y 1958. Esto indica que muchos casos que previamente se habían diagnosticado como infección por *T. gondii*, era en realidad infección por *N. caninum* debido a que ambos parásitos son muy semejantes morfológicamente a nivel histológico y no se sospechaba que eran parásitos diferentes (12, 21, 24, 33, 50).

En California, Estados Unidos, la infección por un protozoario en el ganado lechero reconocido recientemente, es ahora la causa de aborto que se identifica con mayor frecuencia. Desde 1985 en

el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario en California se había observado un nuevo patrón de lesiones histológicas en fetos provenientes de vacas lecheras. Las lesiones fetales consistían en encefalitis no supurativa focal y necrosis, miocarditis y miositis no supurativa e inflamación no supurativa en otros órganos. Estas lesiones eran similares a las encontradas por infección con *T. gondii* en el ganado ovino; sin embargo, no hubo evidencia serológica de infección por *T. gondii* en el ganado que había abortado (3, 5, 7, 9, 16, 18, 21, 43,53). En 1990 en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de California se realizó un estudio extenso en un periodo de 2 años de los casos de abortos remitidos. Las lesiones histológicas compatibles con infección por protozoarios en cerebro y corazón se observaron en 18 % de todos los fetos provenientes de California (3, 5, 6, 7,18). En otro estudio realizado en El Valle de San Joaquín en California, principalmente en ganado lechero se observó una alta incidencia de infección por protozoarios. En este estudio se examinaron un total de 391 fetos de los cuales 95 (24%) tenían lesiones características de infección por protozoarios. Se realizó un examen detallado de los cerebros de estos fetos y en más del 20% se identificaron protozoarios. El diagnóstico se confirmó a través de un estudio retrospectivo con el uso de la prueba de inmunoperoxidasa utilizando antisuero para *N. caninum*. Este antisuero se seleccionó después de que se determinó la primera asociación de aborto por un protozoario parecido a *N. caninum* en ganado lechero en Nuevo México en 1987 hecha por Thilsted y Dubey y notificada en 1989. Lo anterior sugiere que el parásito ha sido endémico desde 1985 (3, 4, 7, 22,53). En 1991 se realizó el primer aislamiento de *Neospora* obtenido de fetos abortados y desde entonces se ha mantenido en cultivos celulares (18,19). Ahora está claro que la infección por un protozoario parecido a *N. caninum* se asocia como una de las principales causas de aborto en ganado lechero identificadas en California. En comparación con otras causas de aborto infeccioso, el aborto por protozoarios es 3.5 veces más frecuente que la infección bacteriana más común (*Actinomyces*

pyogenes) y 5 veces más frecuente que la infección viral más común (RIB), véase el Cuadro 1 (3, 5,22).

CUADRO 1
COMPARACIÓN DE 468 CAUSAS DE ABORTO EN BOVINOS*

<i>Diagnóstico</i>	<i>Número</i>	<i>% Total</i>
Causa identificada	213	45.5
Infecciosas		
Protozoarios	90	19.2
Parecido a <i>Neospora</i>	89	19.0
<i>Sarcocystis</i> sp.	1	0.2
Bacterianas	76	16.2
Virales	26	5.6
Micóticas	5	1.1
Aborto epizootico bovino	8	1.7
No infecciosas	8	1.7
No determinada, compatible con posible infección	115	24.6
No determinada, sin detección de lesiones o infecciones	140	29.9

* Información basada en el examen de fetos abortados y tejidos de fetos de bovinos remitidos al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de California (Tulare) del 1 de enero de 1985 al 30 de junio de 1989.

La neosporosis bovina se ha reconocido como causa importante de aborto en varios países, tales como Gran Bretaña, Irlanda, Dinamarca, Nueva Zelanda, Bélgica, Holanda, Australia, Japón, Sudáfrica, Israel, Canadá, México; en Estados Unidos en 28 estados: Alabama, Arizona, California, Colorado, Georgia, Idaho, Illinois, Indiana, Iowa, Kansas, Maryland, Michigan, Minnesota, Missouri, Montana, Nebraska, Nuevo México, Nueva York, Dakota del Norte, Ohio, Oklahoma, Texas, Dakota del Sur, Utah, Virginia, Washington, Oeste de Virginia y Wisconsin (1, 5, 6, 8, 14, 18, 20, 25, 28, 31, 35, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 53, 54, 55).

III. Estructura y ciclo de vida

El ciclo de vida y la forma en que el protozoo induce al aborto en el ganado aun no se conoce sin embargo, recientemente se sabe que una vía natural de infección es a través de la placenta. Se piensa que el parásito puede tener un ciclo de vida similar al de *T. gondii*, transmitiéndose a un huésped susceptible a través de la ingestión de ooquistes presentes en las heces de algún huésped carnívoro definitivo. Los quistes con múltiples bradizoitos y taquizoitos en los tejidos son las únicas fases que se han reconocido (9, 16, 18, 21, 24, 33, 50,52).

Los taquizoitos son ovalados o en forma de media luna y miden de 3 a 7 por 1 a 5 micrómetros, dependiendo del estadio de división estos se dividen en 2 zooitos por endodiogenia. En animales infectados los taquizoitos se encuentran en macrófagos, polimorfonucleares, células neurales (axones, células de Schwann, neuronas, células endodiales, células de la retina y astrocitos), fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células epiteliales tubulares del riñón, hepatocitos y otras células del cuerpo. La célula infectada puede contener hasta 100 taquizoitos. Estos últimos se encuentran dentro del citoplasma de la célula huésped con o sin vacuola parasitófora (VP). Los taquizoitos de *N. caninum* tienen organelos semejantes a los de *T. gondii* sin embargo, existen algunas diferencias. Los taquizoitos de *N. caninum* tienen una membrana citoplásmica con tres capas, 22 microtúbulos, 2 anillos apicales, un conoide, un anillo polar de 1 a 3 mitocondrias, menos de 150 micronemas, 8 a 12 "rhoptries" (organelos apicales con forma de pera, se cree que están involucrados en la invasión de la célula del huésped por parte del parásito) anteriores al núcleo y de 4 a 6 "rhoptries" posteriores al núcleo, un complejo de Golgi, un retículo endoplásmico liso y un rugoso, un núcleo y un nucleolo. Los "rhoptries" contienen un material sólido electrodenso y son de 2 a 4 veces mas gruesos que el diámetro de los micronemas

(21,22,24,50,52). La discrepancia en el número de "rhoptries" encontrada como más de 30 por Bjerkas y Presthus (1989) y más de 18, por Speer y Dubey (1989), quizá se deba a la dificultad de distinguir "rhoptries" de los gránulos densos (10). Los microporos no se han visto en taquizoitos de animales, pero si se han encontrado en taquizoitos de cultivos celulares (10, 13,52).

Los quistes con bradizoitos en los tejidos, son con frecuencia de redondos a ovals, de más de 107 micrómetros de largo y se encuentran sólo en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal y retina). La pared del quiste es lisa y mide más de 4 micrómetros de espesor dependiendo del tiempo de infección. En muchos quistes tisulares la pared es de 1 a 2 micrómetros de espesor. La pared del quiste contiene estructuras parecidas a túbulos, no hay septos y no existe pared quística secundaria (12, 21,22, 40, 50,52).

Los bradizoitos son delgados (de 6 a 8 por 1 a 1.8 micrómetros) y contienen los mismos organelos que se encuentran en los taquizoitos con excepción de que existen menos "rhoptries" y estos son mas PAS-positivos. La pared de los quistes se tiñe en forma variable con PAS. Entre los bradizoitos existen estructuras tubulares vesiculares y pueden contener microporos (13, 22,40, 50,52).

Con la ayuda del microscopio óptico de transmisión se pudieron detectar las diferencias ultraestructurales entre los taquizoitos de *T. gondii* y los de *N. caninum*. Entre las principales diferencias se incluyen la estructura y el número de "rhoptries". Estos últimos son más numerosos en *N. caninum* que en *T. gondii*, su contenido es electrodenso en *N. caninum* y electrotransparente en *T. gondii*. La principal diferencia entre *N. caninum* y *T. gondii* en cuanto a los quistes es el espesor de la pared: en los quistes de *N. caninum*, ésta mide de 1 a 4 micrómetros y la de *T. gondii* mide menos de 0.5 micrómetros (8, 18, 21, 40,50).

IV. Patogénesis

La neosporosis en el ganado se asocia con parálisis neonatal, encefalomiелitis y aborto entre el tercero y noveno meses de gestación, ocurre con mayor frecuencia entre los meses quinto y sexto. No se encuentran lesiones macroscópicas características en fetos, placenta ni en neonatos y generalmente no existe retención placentaria. O'Toole y Jeffrey en 1987 notificaron en un becerro de 5 días de nacido, incapacidad para ponerse de pie, a la necropsia presentaba despigmentación bilateral especialmente de la sustancia gris del cerebro (3,22,46). La momificación de fetos ha sido un hallazgo clínico patológico importante; sin embargo, ha sido difícil determinar la causa de esta momificación ya que los tejidos se encuentran muy autolizados en el estudio histopatológico (22, 43,54). El parásito afecta principalmente al SNC, miocardio y músculo esquelético. Otros órganos afectados comúnmente son el hígado y el pulmón. Los órganos afectados con menor frecuencia son la piel, nódulos linfáticos, bazo, ojos y glándulas adrenales. En virtud de que *Neospora* constituye un patógeno intracelular, puede matar rápidamente las células del huésped como consecuencia de multiplicación activa de taquizoitos pues produce necrosis, inflamación no supurativa y granulomas en los tejidos afectados. Los quistes con bradizoitos tisulares con frecuencia no se rodean de reacción inflamatoria. La formación de granulomas alrededor de los quistes tisulares degenerados sugiere la ruptura de algún quiste y la subsecuente reacción inflamatoria por parte del huésped. El tiempo que permanecen los quistes en el SNC aún no se conoce (3, 6, 7, 8, 9, 18, 21, 22, 26,28).

V. Cultivo

N. caninum se cultivó inicialmente *in vitro* en monocitos de bovino (BM) y en células endoteliales de arteria cardiopulmonar de bovino (PCA) (Lindsay y Dubey, 1989). Desde entonces *N. caninum* se

ha mantenido en cultivos celulares de riñón de bovino, cerebro de feto de ratón y algunos otros cultivos celulares bien establecidos. Sólo los taquizoitos se han identificado en cultivos celulares. *N. caninum* no produce una infección consistente en ratones y ratas normales inmunocompetentes. La única manera de infectar experimentalmente a estos roedores con *N. caninum* es administrándoles 2 inyecciones con 2 a 4 mg de acetato de metilprednisolona durante 7 días antes de la inoculación con 10 o más taquizoitos. La neumonía y la encefalomiелitis son las lesiones predominantes en ratones mientras que las ratas desarrollan hepatitis en forma primaria. El número de quistes con bradizoitos en los tejidos de estos animales es variable e impredecible. Los quistes tisulares en los ratones son mucho más pequeños (10-25 micrómetros) que los encontrados en infecciones naturales (22, 26,37).

VI. Diagnóstico

La confirmación de casos clínicos compatibles con neosporosis en bovinos requiere de la asistencia de un laboratorio de diagnóstico veterinario en el cual se puedan realizar los siguientes estudios:

Patológico : Estudio *posmortem* de las placentas y de uno o más fetos abortados. Además de la posible autólisis y momificación, en general no existen hallazgos macroscópicos contundentes. Puede haber pequeños focos blanquecinos en el miocardio y músculos esqueléticos que corresponden a zonas de necrosis e inflamación. Las lesiones mas significativas se encuentran en SNC (médula espinal y sustancia gris principalmente) ocasionando encefalomiелitis no supurativa (infiltración linfocitaria perivascular), necrosis y gliosis focal; en miocardio, miocarditis multifocal no supurativa y en músculo esquelético, miositis multifocal no supurativa. En los cortes

histológicos es posible observar quistes o pseudoquistes con numerosos bradizoitos o taquizoitos intracelulares; sin embargo, estas lesiones y estructuras similares se pueden observar también en casos de infección por *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. y *Hammondia hammondi*, por lo que es necesario realizar pruebas de inmunoperoxidasa para demostrar antígenos específicos de *Neospora* (6,8,9,15,18,20,22,25,28,29,31,35,42,46,48,51).

Se puede realizar también estudio ultraestructural de tejidos de fetos con la ayuda de la microscopia electrónica para la identificación de organelos característicos del microorganismo; sin embargo, este estudio requiere fijadores especiales, materiales y equipo sofisticado, los cuales se encuentran en pocos laboratorios. Por otro lado, como método diagnóstico resulta ser definitivo (8, 12, 21, 50,52).

Inmunológico: Estudios previos han demostrado que existe alta antigenicidad cruzada entre *N. caninum* y otras especies de *Neospora* provenientes del ganado; por el contrario, no existe antigenicidad cruzada respecto de otros protozoarios como *T. gondii* y *H hammondi*, por lo que las pruebas serológicas suelen ser de gran utilidad para el diagnóstico de neosporosis en el ganado utilizando anticuerpos anti *N. caninum* (1, 2, 3, 5, 21, 26, 36,54).

La técnica de inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa) usando anticuerpos anti *N. caninum* o anti *Neospora* aislada de bovino, es un método contundente en los tejidos fetales incluidos en parafina con el fin de establecer un diagnóstico definitivo, ya que detecta antígenos específicos de *Neospora* y permite diferenciarla de otros protozoarios (1,2,5,7,8,9,16, 17,18,21,22,35,36,50).

Recientemente Cole, A. R. *et al.* han desarrollado la técnica de anticuerpos monoclonales para la detección de *N. caninum* en fetos abortados. Un anticuerpo murino monoclonal (MAB) 6G7 dirigido a los taquizoitos de *N. caninum* es capaz de reconocer 8 antígenos mayores y algunos antígenos menores, lo cual se puede

observar a través del análisis de Western Blot. La velocidad relativa de migración de los 8 antígenos mayores va de 31 a 97.4 kd. Adicionalmente MAB 6G7 reconoce antígenos de los taquizoitos de *T. gondii* con una velocidad relativa de migración de 107 kd. La técnica utilizada en los taquizoitos de *N. caninum* cultivados en fibroblastos de piel de humano indica que MAB 6G7 se une a los micronemas, gránulos densos, "rhoptries" de la porción basal y túbulos intravacuolares dentro de la vacuola parasitófora. El MAB 6G7 también se une a los micronemas y la porción basal de los "rhoptries" de los taquizoitos de *T. gondii* (16,17,18).

también se ha utilizado la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFA), la cual ha demostrado ser efectiva para detectar altos niveles de anticuerpos *anti-Neospora* en el suero de becerros infectados en forma congénita a través de la placenta. Además esta técnica puede ser útil para establecer el diagnóstico en fetos abortados desde los 5 meses de gestación en adelante con elevados niveles de anticuerpos. La técnica de IFA utilizada en vacas para serodiagnóstico no es confiable ya que puede dar resultados falsos negativos debido a que de 2 a 5 meses después del aborto, los niveles de anti cuerpos que eran elevados pueden disminuir a niveles muy parecidos a los de animales no infectados (8, 18, 21,54).

Recientemente se ha ofrecido el diagnóstico de neosporosis bovina a través de la detección de anticuerpos en suero de vacas sospechosas por el método de ELISA en el Sistema de Laboratorio de Diagnóstico Veterinario en California (CVDLS). Esta técnica tiene una sensibilidad del 88% y una especificidad del 97%. De igual manera dicha técnica se puede utilizar para determinar la seroprevalencia del hato a través del muestreo de sueros al azar de 30 vacas adultas con más de 30 días después del parto. La prevalencia se puede calcular con base en el total del número de vacas en producción. El CVDLS sugiere que se realice el muestreo 2 veces tanto de las vacas que no han abortado como de las vacas

que si lo han hecho y que la colección del suero provenga de un grupo de vacas que estén en el mismo periodo de gestación y que tengan una edad similar. El CVDLS realiza una evaluación epidemiológica basada en las muestras suministradas (información no publicada).

VII. Prevención y control

Hasta la fecha no se han podido establecer métodos de prevención y control satisfactorios de la neosporosis bovina debido a que se tiene insuficiente información de la biología del parásito sobre todo de su ciclo y forma de transmisión; sin embargo, se pueden tomar medidas de prevención y control generales como la eliminación total de todos los tejidos potencialmente infectados de placentas y fetos abortados del medio ambiente que pudieran ser una fuente de infección. Además, se debe eliminar hasta donde sea posible la contaminación fecal de alimentos y agua de otros animales en el medio, ya que se ha visto que la contaminación fecal con ooquistes de *Sarcocystis cruzi* eliminados de los canideos es muy común y pudiera suceder algo parecido en el caso de *Neospora*. por otro lado, al igual que en el caso de la toxoplasmosis, el desarrollo de una vacuna efectiva resulta ser extremadamente difícil (9,18).

VIII. Tratamiento

Los fármacos que se han utilizado para inhibir el desarrollo de *T. gondii* en cultivos celulares también son efectivos para inhibir el desarrollo de *N. caninum* cuando se usan en concentraciones similares. Específicamente, lasalocid sódico a 0.05 mg/ml, monensina sódica a 0.05 mg/ml, piritrexina a 0.01 mg/ml, pirimetamina a 0.05 mg/ml y trimetoprim a 5 mg/ml son efectivos para prevenir el desarrollo de taquizoitos intracelulares de *N. caninum* en cultivo de tejidos en monocitos de bovino, mientras

que el amprolium hidroclorado a 10 mg/ml, sulfadiazina a 200 mg/ml y sulfametoxalina a 200 mg/ml no han sido efectivos. Experimentalmente se ha visto que la sulfadiazina en el agua de bebida previene la neosporosis clínica en ratones infectados experimentalmente, aun así no es efectivo cuando ya existen manifestaciones clínicas (21,22,34,37,38,39,41,50).

IX. Conclusiones

En México existe escasa información sobre esta enfermedad, además no se han realizado estudios epidemiológicos en vacas ni en los fetos de bovinos abortados sospechosos de infección por *Neospora* debido a que el parásito no se conocía y no se dirigía el diagnóstico de aborto por *Neospora* a los diferentes laboratorios de diagnóstico veterinario en la República Mexicana. Es necesario realizar investigaciones en nuestro país para esclarecer aspectos que hasta la fecha se desconocen del parásito tales como el ciclo de vida, vías de transmisión y fuentes de infección hacia el ganado bovino, con el fin de establecer medidas de prevención y control satisfactorias, además de pruebas diagnósticas rápidas y conclusivas para la oportuna detección de la neosporosis bovina, por ejemplo: la inmunoperoxidasa y la prueba de ELISA, y finalmente establecer una terapéutica confiable para controlar la enfermedad.

Referencias

1. Abbitt, B., Craig, T. M., Jones, L. P., Huey R. L., Eugster, A. K.: Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infected with *Hammondia pardalis* . *JAVMA* 20: 444-448, 1993.
2. Anderson, M. L., Barr, C. B., Blanchard, C. P., Dubey, J. P. and Conrad, P. A.: Immunohistochemical diagnosis of protozoal abortion in cattle. *American Association of*

Veterinary Laboratory Diagnosticians: Abstracts 33rd. Annual Meeting, Denver, Colorado, October 7-9, 1990. 1993 ref. Madison, Wisconsin, USA; AAVLD.

3. Anderson, M. L., Barr, B. C., Conrad, P. A., Thurmond, M., Picanso, J. and Dubey, J. P.: Bovine Protozoal Abortions in California. *Bovine Practitioner* 2: 102-104, 1991.
4. Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C. and Hoffman, R. L.: A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 283-287, 1990.
5. Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C., Dubey, J. P., Hoffman, R. L. and Conrad, P. A.: *Neospora* like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *JAVMA* 198: 241-244, 1991.
6. Barr, B. C., Anderson, M. L. and Blanchard, P. C.: Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infection. *Vet. Pathol.* 27: 354-361, 1990.
7. Barr, B. C., Anderson, M. L., Dubey, J. P., Conrad, P. A.: *Nespora-like* protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28: 110-116, 1991.
8. Barr, B. C., Conrad, P.A., Dubey, J. P., Anderson, M. L.: *Neospora-like* encephalomyelitis in a calf: Pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 39-46, 1991.
9. Barr, B. C., Conrad, P. A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M. L., Reynolds, J., Chauvert, A.E.A., Dubey, J. P. and Ardans, A. A.: Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora* infected fetuses: Four cases (1990-1992). *JAVMA*, 202: 113117, 1993.
10. Bjerkas, I. and Dubey, J. P.: Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma-like* parasite of Norwegian dogs. *Acta. Vet. Scand.* 32: 407-410, 1991.

11. Bjerkas, I., Mohn, S. F. and Presthus, J.: Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitek.* 70: 271-274, 1984.
12. Bjerkas, I., and Presthus, J.: Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand.* 96: 445-454, 1988.
13. Bjerkas, I. and Presthus, J.: The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoan in dogs. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand.* 97: 459-468, 1989.
14. Blidfell, R., Davidson, J. and Dubey, J. P.: *Neospora* induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. *Can. Vet. J* 35: 122, 1994.
15. Bryan, L. A., Gajadhar, A.A., Dubey, J. P. and Haines, D.M.: Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora sp.* protozoan. *Can. Vet. J* 35: 111-113, 1994.
16. Cole, R. A., Lindsay, D. S., and Dubey, J. P.: Detection of *Neospora caninum* in tissue sections using murine monoclonal antibody. *J Vet. Diag. Inv.* 5: 579-584, 1993.
17. Cole, R. A., Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Toivio Kinnucan, M. A., Blagburn. B. L.: Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Am. J. Vet. Res.* 55: 1717-1723, 1994.
18. Conrad, P. A., Anderson, M. L. and Barr, B. C.: *Neosporosis*: A newly recognized cause of abortion in dairy cattle. 2nd. Western Large Herd Dairy Management Conference. Las Vegas, NY., April 6-8, 1995.
19. Conrad, P. A., Barr, B. C. and Sverlow K. W.: In vitro isolation and characterization of *Neospora sp.* from aborted bovine fetuses. *J. Parasitol.* 106: 239, 1993.

20. Dubey, J. P.: Congenital neosporosis in a calf. *Vet. Rec.* 125: 486, 1989.
21. Dubey, J. P.: *Neospora caninum*: A look at a new Toxoplasma-like parasite of dogs and other animals. *The Compendium Small Animal.* 12: 653-663, 1990.
22. Dubey, J. P.: A review of *Neospora caninum* and *Neospora* like infections in animals. *J. of Protozoology Res.* 2: 40-52, 1992.
23. Dubey, J. P.: Protozoal abortion in cattle: *JAVMA* 203: 1250-1251, 1993.
24. Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J. and Uggla, A.: Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *JAVMA.* 192: 1269-1285, 1988.
25. Dubey, J. P., Hartley, W. J., and Lindsay, D. S.: Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *JAVMA* 197: 1043-1044, 1990.
26. Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D. S. and Topper, M. J.: Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs. Isolation of the causative agent and experimental transmission. *JAVMA.* 193: 1259-1263, 1988.
27. Dubey, J. P., Higgins, R. J., Smith, J. H. and O'Toole, T. D.: *Neospora caninum* encephalomyelitis in a British dog. *Vet. Rec.* 126: 193-194, 1990.
28. Dubey, J. P., Janovitz, E.B. and Skowronek, A.J.: Clinical neosporosis in a 4 week old Hereford calf. *Vet. Parasitol.* 43: 137-141, 1992.
29. Dubey, J. P., Leathers, C. W. and Lindsay, D. S.: *Neospora caninum-like* protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. *J. Parasitol.* 75: 146-148, 1989.
30. Dubey, J. P. and Lindsay, D.S. : Neosporosis. *Parasitology Today* 9: 452-458, 1993.

31. Dubey, J. P., Miller, S., Lindsay, D. S. and Topper, M. J.: *Neospora caninum* associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *J. of Vet. Diag. Inves.* 2: 66-69, 1990.
32. Duff, J. P. and Otter, A.: *Neospora* associated abortions in cattle. *Vet. Rec.* 135: 415, 1994.
33. Greig, B., Rossow, D. K., Collins, E. J., and Dubey, J. P.: *Neospora caninum* pneumonia in an adult dog. *JAVMA*, 206: 1000-1002, 1995.
34. Hay, W. H., Shell, L. G., Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *JAVMA*. 197: 87-89, 1990.
35. Jardine, J. E. and Last R. D.: *Neospora caninum* in aborted twin calves. *J. of South Africa. Vet. Assoc.* 64: 101, 1993.
36. Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. Jour. Vet. Res.* 50: 1981-1983, 1989.
37. Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: In vitro development of *Nespora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *J. Parasitol.* 75: 163-165, 1989.
38. Lindsay, D. S., and Dubey, J. P.: Evaluation of anticoccidial drugs to inhibit development of *Neospora caninum* in cell cultures. *J. Parasitol.* 75: 990-992, 1989.
39. Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.* 76: 177-179, 1990.
40. Lindsay, D. S., Speer, C. A and Toivio-Kinnucan, M. A.: Use of infected culture cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Vet. Res.* 54: 103-106, 1993.
41. Mayhew, Y. G., Smith, K. C., Dubey, J. P., Gatwald, L. K. and McGlennon, N. J.: Treatment of encephalomyelitis due

- to *Neospora caninum* in a litter of puppies. *J. Small Anim. Pract.* 32: 609-612, 1991.
42. McIntosh, W. D. and Haines, M. D.: *Neospora* infection in an aborted fetus in British Columbia. *Can. Vet. J.* 35: 1141-115, 1994.
 43. Nietfeld, J. C., Dubey, J. P., and Anderson, M. L.: *Neospora-like* protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 223-226, 1992.
 44. Obendorf, D. and Mason R.: *Neospora caninum* infection detected in a bovine aborted foetus. *Aust. Sac. Vet. Path. Report.* 28: 36-37, 1990.
 45. Ogino, H., Watanabe, E. and Watanabe, S.: Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. *J. Comp. Path.* 107: 231-237, 1992.
 46. O'Toole, J. M., and Jeffrey, M.: Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet. Rec.* 121: 563-566, 1987.
 47. Otter, A., Griffiths, I. B. and Jeffrey, M.: Bovine *Neospora caninum* abortion in the U. K. (letter). *Vet. Rec.* 133: 375, 1993.
 48. Parish, S. M., Maag-miller, L., Basser, T. E., Weidner, J. P., McElwain, T., Knowles, D. P. and Leathers, C. W.: Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *JAVMA* 191: 1599-1600, 1987.
 49. Poncelet, L., Bjerkas, Y., Charlier, G, Coignoul, F., Losson, B. and Balligand.: Confirmation de la presence de *Neospora caninum* en Belgique. *Ann. Med. Vet.* 134: 501-503, 1990.
 50. Ruehlmann, D., Podell, M., Oglesbee, M and Dubey, J. P.: Canine Neosporosis: A case report and literature review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 31: 174-182, 1995.
 51. Shivaprasad, H.L., Ely, R. and Dubey, J. P.: A *Neospora* like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet. Parasitol.* 34: 145-148, 1989.

52. Speer, C. A. and Dubey, J. P.: Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J. Protozool.* 36: 458-463, 1989.
53. Thilsted, J. P. and Dubey, J. P.: Neosporosis-Like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diag. Invest. 1*: 205-209, 1989.
54. Thornton, R. N., Thompson, E. J. and Dubey, J. P.: *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *New Zealand Vet. J.* 39: 129-133, 1991.
55. Trees, A. J., Guy, F., Low, J. C., Roberts, L., Buxton, D. and Dubey, J.P.: Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet. Rec.* 134: 405-407, 1994.