

ウシのネオスポラ症

西村 麻紀 西川 義文

帯広畜産大学原虫病研究センター

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線11番地

Tel:0155-49-5886 Fax:0155-49-5643

E-mail: nisikawa@obihiro.ac.jp

はじめに

ウシのネオスポラ症は、細胞内寄生性原虫 *Neospora caninum* の感染により流産、死産、まれに新生子牛に神経症状を引き起こす疾病である。ウシのネオスポラ症は世界各国で発生が報告されており、国内においても全国的に発生が確認され、ウシおよび水牛のネオスポラ症は家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定されている。ネオスポラ症の発生に季節性や地域性はなく、多くの場合散発的に発生するが時に集団発生が起こることもあり、異常産による子牛や乳の損失が養牛農家、特に酪農家に与える経済的影響は小さくない。本稿では、ウシの流産の主な原因の一つであるネオスポラ症の概要について述べるとともに、ウシのネオスポラ症の診断および防除対策等について取り上げる。

1. ネオスポラの感染サイクル

N.caninum はアピコンプレックス門に属する細胞内寄生性原虫で、トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) に近縁であり、生活環もトキソプラズマのそれとよく似ている。ネオスポラの生活環はタキゾイト、組織シスト、オーシストの3つのステージに大別され、オーシストはイヌ科動物のみから排出される。

伝播形式および宿主体内での原虫の生態については未だ不明な点が多いが、ネオスポラの生活環は次の様に考えられている。まず、イヌ科動物から糞便とともに排泄されたオーシストは外界で成熟し、内部にスポロゾイトを形成する。スポロゾイト形成

オーシストは感染性を有し、ウシを含めた中間宿主はこの成熟オーシストに汚染された水や餌を摂取することにより感染する。オーシストは中間宿主の体内でスポロゾイトを放出、増殖し、急速に増殖する虫体（タキゾイト）へと成長し、増殖と宿主細胞の破壊を繰り返す。中間宿主がこの急性期を耐過すると、分裂速度の遅い虫体（ブラディオゾイト）を多数含む組織シストを形成する。中間宿主から終宿主への伝播は、組織シストを含む組織を終宿主が経口摂取することによって起こると考えられている。

トキソプラズマがネコ科動物を終宿主とするのに対してネオスポラはイヌ科動物を終宿主とする。現在終宿主とされているのはイヌのみであるが、その他にコヨーテ [Gondim, et al.: 2004]、ディンゴ [King, et al.: 2011]、ハイイロオオカミ [Dubey, et al.: 2001] といった野生のイヌ科動物が固有宿主である可能性が示唆されている。中間宿主はウシ、ヒツジ、ヤギおよびシカで、終宿主であるイヌ自身も中間宿主となり得る。以前はウマも中間宿主として挙げられていたが、ウマで発見されたネオスポラの別種である *Neospora hughesi* が *N.caninum* と血清学的に交差反応を示し、これまでにウマから分離されたネオスポラは全て *Neospora hughesi* であったことから、現在では *N.caninum* がウマに感染するかどうかは不明である [Dubey, et al.: 2011]。その他、野ネズミ、野ウサギ、ニワトリを含む鳥類等様々な動物から *N.caninum* のDNAが検出されているが原虫が分離されたという報告はなく [Dubey, et al.: 2011]、これらの動物が自然宿主である確かな証拠

は示されていない。

ウシへの感染には水平感染および垂直感染の2つの経路がある。水平感染は、先に述べたとおりイヌから排出されたオーシストの経口摂取によるもので、その結果急性感染を引き起こすが、妊娠牛における異常産以外にウシが臨床症状を示すことはほとんどない [King, et al. : 2011]。垂直感染では胎盤を介してタキゾイトが母牛から胎子に感染するが、垂直感染には妊娠中にオーシストを経口摂取することにより初回感染した母牛から胎子へ感染する場合（外因性経胎盤感染）と、潜伏感染の状態にあった母牛の体内において妊娠中に原虫が再活性化し胎子に移行する場合（内因性経胎盤感染）の2つのタイプがある。牛群内における主要な感染経路は内因性経胎盤感染であるが、乳牛の牛群のような閉鎖的な育種集団で高い感染率を維持するためには水平感染が必須であることが数学的モデルによって示されている [French, et al. : 1999]。

2. ネオスポラ症の臨床症状および経過

ウシはネオスポラ感染時にほとんど臨床症状を示すことはなく、妊娠牛における流産がネオスポラ症の主な臨床症状である。流産の発生に季節性や地域性はないが、流産は妊娠5～6ヶ月、すなわち概ね妊娠中期に起こることが多い。しかし、流産は妊娠3カ月から妊娠末期までの間のいずれの時期でも起こりうる [King, et al. : 2011]。

ネオスポラに対する宿主の防御免疫は、他の細胞内寄生性原虫に対するものと同様にTh1タイプのサイトカインを介した細胞性免疫が主体であり、特にIFN- γ の産生が原虫の細胞内増殖の抑制に重要な役割を果たしている。しかし、妊娠中期では免疫抑制が起こり、この免疫機構の変化が原虫の再活性化を促し、胎盤、胎子への感染に繋がると考えられている。

ネオスポラ症における胎子の疾病の重症度は、ネオスポラの感染、寄生虫血症が起こった時点での妊娠ステージによって異なる [Innes. : 2007]。妊娠初期にネオスポラを実験的に感染させた場合、胎盤

に炎症や壊死性の病変が形成され、感染後早期に胎子が死亡し、一部の胎子は子宮内で吸収されるかミイラ化する [Dubey, et al. : 2006a]。自然発生例においても、胎子に認められる病変は妊娠後期に流産したものよりも妊娠初期および中期に流産したものでより重度となり、胎子の臓器における原虫数も妊娠ステージの進行に伴い減少する [Collantes-Fernández, et al. : 2006]。

一度ネオスポラに感染したウシは生涯にわたり感染状態にあり、感染時以降の妊娠において連続的あるいは間欠的に子に原虫を垂直感染させる [Dubey, et al. : 2006a]。感染母牛の胎子が死亡した場合、子宮内で死亡した後の吸収、ミイラ化、自己消化、死産等の転帰をたどるが、大部分は妊娠が維持され、臨床的には正常であるが先天性感染した子牛として産まれる。先天性感染の発生率は40～95%と報告によって様々である [Dubey, et al. : 2006a]。先天性感染牛は非感染牛と比較して初回妊娠時における流産が7.4倍起こりやすいことが報告されており [Thurmond, et al. : 1997]、先天性感染牛が次世代への感染源になるだけでなく、異常産による損失も持続することになる。

ウシのネオスポラ症における流産以外の臨床症状として、2カ月齢以下の子牛で神経症状、起立不能、出生時の発育不良が確認されている。発症子牛では、前肢、後肢または前後肢に屈曲や異常な伸展が認められ、神経学的検査を行うと膝蓋腱反射の低下やプロプリオセプションの消失が確認されることがある。また、その他の症状として眼球突出や左右非対称等の眼球の異常、まれに水頭症等の中樞神経系の先天性異常が認められることがある [Dubey, et al. : 2011]。

3. 検査方法および診断

ネオスポラ感染動物は通常無症状であり、流産を発症したウシからネオスポラやネオスポラの核酸が検出された場合においても、その流産がネオスポラに起因することを必ずしも意味しない。現在、ウシのネオスポラ症の確定診断は病理組織学的検査およ

び免疫組織学的検査により行われているが、図1に示した様に臨床検査、血清学的検査、分子生物学的検査、疫学調査等の検査結果がウシの流産の鑑別診断を進めていく上で重要な情報となる。また、ネオスポラ症の診断においてはネオスポラ以外の流産の原因を除外することも重要なポイントとなる。

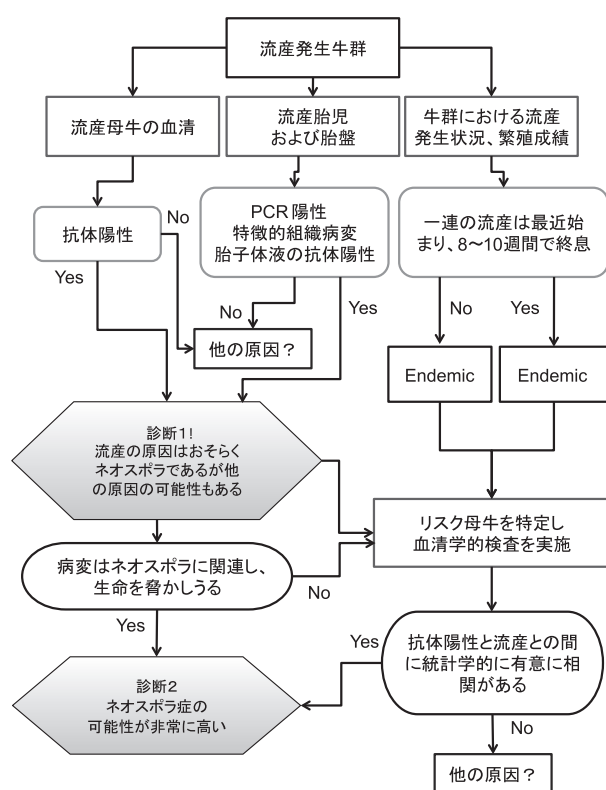


図1 ウシのネオスポラ症の診断チャートの例

ネオスポラ症の診断は病理組織学的検査を中心に複数の検査結果に基づいて行われる。流産の発生がendemicの場合は流産が発生していた期間に妊娠していた個体、epidemicの場合は流産の流行開始時に妊娠58~260日であった個体がリスク母牛となる。(Dubey, et al. : 2006b. Veterinary Parasitologyから引用改変)

病理組織学的検査および免疫組織学的検査では、流産胎児および胎盤が検査材料となる。流産胎児の肉眼的変化としては、まれではあるが心および骨格筋に白色病変が、脳に淡色から暗色の微細な壊死性病変が認められることがある。組織学的には変性や非化膿性の炎症が全身の諸臓器に認められることがあるが、組織病変がもっとも頻繁に認められるのは中枢神経系、肝および心で、非化膿性の炎症細胞浸潤および壊死が主体として認められる [Dubey, et al. : 2006b]。一方、腎に病変が形成されることは少ないとの報告もある [Collantes-Fernández, et

al. : 2006]。

中枢神経系では多発性の非化膿性脳脊髄炎の他、多発性巣状壊死や非化膿性髄膜炎が認められる。タキゾイトはまず小血管内および周囲に存在し、そこから脳炎を引き起こすと考えられている。炎症性細胞の浸潤の程度は胎子の胎齢に関係すると考えられており、胎齢の若い胎子では炎症反応が弱く、無制御的に増殖した原虫により神経網が広く破壊される。胎齢が進むと原虫に対する反応が起こり、原虫の増殖が抑制されるとともに、壊死巣の周囲にミクログリア、反応性アストロサイト、リンパ球等の炎症性細胞浸潤が見られるようになる [Dubey *et al.*, 2006a]。このような中心部に壊死巣を有し、その周囲に単核細胞浸潤巣を伴う病巣はネオスポラ症の流産胎子の中枢神経系に認められる比較的特徴的な病変と思われる (図2a)。

肝では門脈周囲を主体に単核細胞浸潤が認められ、また様々な程度の肝細胞の壊死を伴う。肝病変は一時的に流行性に発生した流産、言い換えると集団発生した、外因性胎盤感染によるネオスポラ流産においてより重度で、タキゾイトも高頻度に多数検出される [Wouda, et al. : 1997a; Buxton, et al. : 2002]。従って、ネオスポラ症が疑われる流産が集団的に発生した場合、病理組織学的および免疫組織学的検査において脳のほか、肝を積極的に検索することが原虫の検出に繋がるかもしれない。

胎盤では、分娩時に採取した胎盤において胎盤葉の絨毛にまれに巣状の炎症巣が肉眼的に認められることがある [Piergili Fioretti, et al. : 2003]。組織学的には脳、肝等と同様に非化膿性の炎症と壊死からなり、組織病変は胎盤葉にほぼ限局して形成されるが漿尿膜へも炎症が波及することがある [Otter, et al. : 1995]。

このような非化膿性炎症や壊死等のネオスポラ症に特徴的な組織病変の検索とともに、これらの病変に関連したネオスポラの検出が確定診断には必要である (図2b)。死亡胎子の組織内で完全な状態を保ったタキゾイトはまれにしか認められず、タキゾイトをヘマトキシリンエオジン染色の組織切片上で

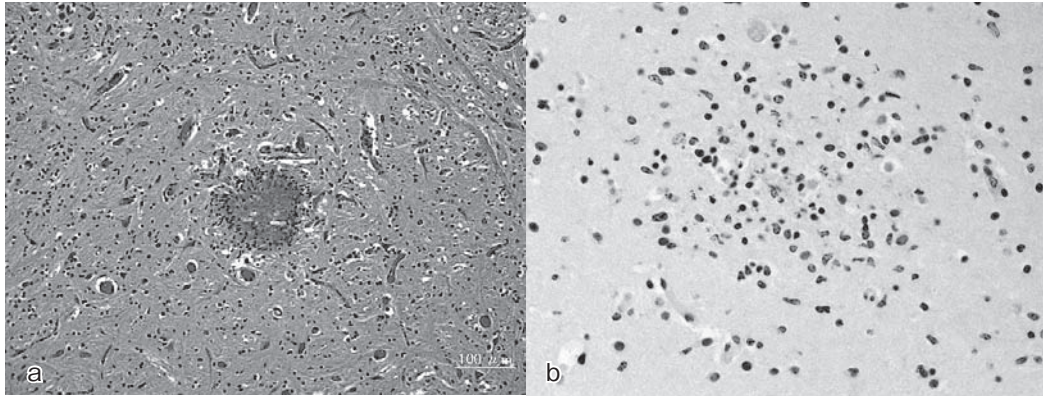


図2 ウシ流産胎子の脳の組織病変 (北海道十勝家畜保健衛生所原因)

a壊死巣の周囲に単核細胞の浸潤が認められるHE染色、b免疫組織化学染色により検出された*N.caninum*抗原

見つけることは困難であることから、原虫の検出には免疫組織化学的手法が用いられる。原虫が検出される可能性の高い部位は脳であるが、神経系以外の組織でしか検出されないこともあり、脳以外の組織も併せて検索することが必要である。しかし、新生子牛の場合には神経症状を発症した症例においてさえ、組織学的にネオスポラが検出されることは非常にまれであるといわれている [Dubey, et al. : 2011]。

抗体検査は間接蛍光抗体法、ELISA、直接凝集反応、免疫ブロット法等により可能であるが、結果の解釈にはいくつか考慮する点がある。ネオスポラ症による流産を発症した母牛や、流産を起こさなかった場合でも経胎盤的に子牛に伝播した母牛は流産を発症していない感染牛よりも高い抗体価を示すことが知られている [Dubey, et al. : 2006b]。先に挙げた検査方法の多くはネオスポラ症の診断を目的に開発されたものであり、流産発症牛の高い抗体を検出することは可能であるが、抗体価の低い非発症感染牛の摘発にはカットオフ値を下げるなど感度をより高くする必要がある。また、感染母牛のごく一部が流産を起こすことから、抗体陽性であっても流産を起こさない個体も多数存在する。従って、流産を起こした母牛の抗体検査の結果が陽性であったとしても、母牛のネオスポラ感染が疑われるだけで、流産にネオスポラが関与している証拠にはならず、流産の原因が他にある可能性がある。

母牛および流産胎子の血清の以外に、胎子の胸水、腹水、第四胃内容等も抗体検査の材料となるが、胎子の材料を用いた抗体検査の感度は高くない [Dubey, et al. : 2006b]。その原因として、感染時の胎齢が若い胎子では免疫能が十分発達していないこと、感染から胎子が死亡するまでの時間が短い等の理由により抗体が十分に産生されないことが考えられる [Wouda, et al. : 1997b]。従って、胎子の体液において抗体陰性であった場合でもネオスポラ症を否定することはできない。このように、ウシのネオスポラ感染に対する抗体検査結果の評価には様々な問題点があるが、我々は原虫の抗原によって抗体産生の誘導性が異なること、抗体検査の一つであるELISAにおいて急性および慢性のそれぞれの感染期での抗体検出に適した抗原があることを明らかにした [Hiasa, et al. : 2012]。今後、潜伏感染牛や胎子の抗体検出に適した抗原が発見されれば抗体検査の有用性が高まると考えられる。

その他の重要な補助的診断法としてPCR法が挙げられる。現在では原虫を定量的に検出できるリアルタイムPCRのプロトコールも確立されている。ネオスポラと同じアピコンプレックス門に属するトキソプラズマや*Sarcocystis* spp. がウシの流産に関与することはほとんどないが、免疫組織化学染色で使用される抗体の中にはこれらの原虫と交差反応を示すものもあるため、これらの原虫感染が疑われた場合の鑑別診断においてPCR検査は重要な役割を果た

す。ウシのネオスポラ症では流産胎子の組織がPCRの検査材料となるが、胎盤、羊水、慢性感染牛の血液、乳汁、精液等からも*N.caninum*のDNAの検出が可能であると報告されている [Dubey, et al. : 2006b]。胎子の組織を検査する場合、*N.caninum*のDNAは脳、心臓、肺、腎臓等から検出されるが、妊娠後期に流産を起こした場合には脳からしか検出されないこともあり [Collantes-Fernández, et al. : 2006]、胎子の脳が検査材料として最も適しているようである [Dubey, et al. : 2006b]。

4. 防除対策

現在のところネオスポラ症に有効な治療薬はなく、ネオスポラ症のコントロールは感染の機会の減少を目的とした飼養管理、衛生管理が主体となる。

ウシのネオスポラ症は、ある地域や牛群において一定の割合で発生する場合 (endemic) と突如集団的に発生する場合 (epidemic) があり、前者は潜伏感染牛の体内で原虫が再活性化する内因性経胎盤感染、後者は妊娠牛がオーシストの経口摂取による水平感染に起因する外因性経胎盤感染が関与していると考えられている [Dubey, et al. : 2006b]。牛群におけるネオスポラ症の発生が endemic であるか epidemic であるかによって防除対策のポイントが異なる。

ネオスポラ症が epidemic に発生した場合は、イヌから排出されたオーシストの経口摂取による水平感染をコントロールすることが重要である。終宿主であるイヌとウシとの接触を断つことが基本であり、具体的には牛舎や放牧場への野犬の侵入を防止する、イヌを放し飼いにしない、イヌの糞便を放置しない、オーシストによる汚染防止のために飼料にカバーをかける等の対策が挙げられる。また、イヌが流産胎子や胎盤を餌として摂取することがウシの抗ネオスポラ抗体の陽性率の上昇に繋がることから [Vanleeuwen, et al. : 2010]、イヌに流産胎子や胎盤を与えないこと、流産胎子や後産を放置しないことも重要である。ネオスポラ症による流産が一定の割合で発生している農場に感染していないイヌを新た

に導入すると、このイヌが水平感染の感染源となり牛群に感染を拡大する可能性も示唆されており [Dijkstra, et al. : 2002]、感染農場におけるイヌの導入には注意が必要である。

一方、一定の発生率でネオスポラ症による流産が起こっている牛群においては垂直感染の防除が重要であり、その対策は感染牛、抗体陽性牛の飼養管理が主体となる。集団発生後においても経胎盤感染を介して次世代に感染が拡大することから [Wouda, et al. : 1998]、流行的発生が終息した後も同様の対策が必要であると考えられる。抗体陽性牛は抗体陰性牛と比較して流産のリスクが2~3倍高く [Dubey, et al. : 2006b]、国内の症例を対象とした研究では抗体陽性牛の流産のリスクは6.1倍とさらに高い値が示されている [Koiwai, et al. : 2005]。対策としては、抗体検査による感染動物の摘発、淘汰や抗体陰性牛の積極的な導入が挙げられるが、抗体陽性牛の淘汰や非感染牛の導入は経済的に困難を伴い実際的でないことも多い。このような現状から抗体陽性牛を飼養し続けなければならない状況が多々あるが、抗体陽性牛および垂直感染した子牛を飼養する場合には主に繁殖管理に基づいた感染コントロールが検討されている。基本的には抗体陽性母牛および産子は繁殖候補から除外するべきであるが、抗体陽性牛の能力が高い等の理由でその子を得たい場合、抗体陽性牛から採取した胚を抗体陰性牛に移植する方法が提案されている [Baillargeon, et al., 2001]。また、抗体陽性牛が乳用種であった場合、肉用種の精液を授精すると流産のリスクが減少するとの報告もある [López-Gatius, et al. : 2005; Almería, et al. : 2009]。

その他の防除対策としてワクチンが挙げられるが、現在国内で使用できるワクチンはない。海外ではタキゾイトの死虫ワクチン等が使用されていたが、これらのワクチンは流産の発生を減少させるものの、流産の発生を完全に抑えることができないため [Romero, et al. : 2004; Reichel, et al. : 2008]、安全でより有効性の高い実用的なワクチンの開発が求められている。これまで生ワクチン、死虫ワクチ

ンのほか、原虫の膜成分、分泌蛋白、細胞小器官といった*N.caninum*特異的蛋白を抗原とした各種の成分ワクチン等について有効性が検討されている [Reichel, et al. : 2009]。

ワクチン接種牛と自然感染牛の区別が可能であること、他の個体に感染しないことはワクチンの一般的な必要条件であるが、ウシのネオスポラ症のワクチンに求められる効果は流産および胎盤感染を防ぐことである。これまでのいくつかの研究では外因性経胎盤感染および流産の予防は可能であることが示唆されているが、内因性経胎盤感染、すなわち潜伏感染牛における妊娠中の原虫の再活性化を阻止する免疫応答を誘導することは難しいと考えられている [Trees, et al. : 2005]。ネオスポラに対する防御免疫の主体はTh1タイプの免疫応答であり、IFN- γ と細胞傷害性T細胞の応答が重要な役割を果たすことが示されているが、感染牛の妊娠中の免疫応答や妊娠牛体内における原虫の動態等については未だに不明な点が多い。また、ワクチンにより感染母牛で強い免疫応答が誘導されたとしても、感染母牛のネオスポラに対する強い免疫応答が胎盤を傷害し、妊娠の継続に悪影響を及ぼす可能性も考えられる。今後、優れたワクチンが開発されれば、ワクチンはウシのネオスポラ症のコントロールにおいて非常に重要な防除手段となるが、ワクチン開発と並行して妊娠牛における免疫応答や原虫の再活性化の機序の解明等、ワクチン開発を含めたネオスポラ症のコントロールにおいて基盤となる基礎的な研究の進展が望まれる。

引用文献

- Almería S, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sàbat G, Serrano B, Santolaria P, Yániz JL. (2009) Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. *Vet. Parasitol.*, 163 : 323-329.
- Baillargeon P, Fecteau G, Paré J, Lamothe P, Sauvé R. (2001) Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 218 : 1803-1806.
- Buxton D, McAllister MM, Dubey JP. (2002) The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.*, 18 : 546-552.
- Collantes-Fernández E, Rodríguez-Bertos A, Arnáiz-Seco I, Moreno B, Aduriz G, Ortega-Mora LM. (2006) Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. *Theriogenology.*, 65 : 629-641.
- Dijkstra T, Barkema HW, Hesselink JW, Wouda W. (2002) Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet. Parasitol.*, 105 : 89-98.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W. (2006a) Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.*, 134 : 267-289.
- Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Choudhary S. (2001) Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 181 : 382-387.
- Dubey JP, Schares G. (2006b) Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 140 : 1-34.
- Dubey JP, Schares G. (2011) Neosporosis in animals—the last five years. *Vet. Parasitol.*, 180 : 90-108.
- French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ. (1999) Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle : transmission and options for control. *Int. J. Parasitol.*, 29 : 1691-1704.
- Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. (2004) Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 34 : 159-161.
- Hiasa J, Kohara J, Nishimura M, Xuan X, Tokimitsu H, Nishikawa Y. (2012) ELISAs based on rNcGRA7

- and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation. *Vet Parasitol.*, In press.
- Innes EA. (2007) The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology.*, 134(Pt 13) : 1903-1910.
- King JS, Jenkins DJ, Ellis JT, Fleming P, Windsor PA, Šlapeta J. (2011) Implications of wild dog ecology on the sylvatic and domestic life cycle of *Neospora caninum* in Australia. *Vet. J.*, 188 : 24-33.
- Koiwai M, Hamaoka T, Haritani M, Shimizu S, Kimura K, Yamane I. (2005) Proportion of abortions due to neosporosis among dairy cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 67 : 1173-1175.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Almería S. (2005) The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 52 : 88-92.
- Otter A, Jeffrey M, Griffiths IB, Dubey JP. (1995) A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet. Rec.*, 36 : 602-606.
- Pierrgili Fioretti D, Pasquali P, Diaferia M, Mangili V, Rosignoli L. (2003) *Neospora caninum* infection and congenital transmission : serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.*, 50 : 399-404.
- Reichel MP, Ellis JT. (2008) Re-evaluating the economics of neosporosis control. *Vet. Parasitol.*, 156 : 361-362.
- Reichel MP, Ellis JT. (2009) *Neospora caninum*-how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? *Int. J. Parasitol.*, 39 : 1173-1187.
- Romero JJ, Pérez E, Frankena K. (2004) Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.*, 123 : 149-159.
- Thurmond MC, Hietala SK. (1997) Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 58 : 1381-1385.
- Trees AJ, Williams DJ. (2005) Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.*, 21 : 558-561.
- Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Scott HM. (2010) Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Prev. Vet. Med.*, 93 : 129-38.
- Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. (1997b) Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J. Parasitol.*, 83 : 545-547.
- Wouda W, Moen AR, Visser IJ, van Knapen F. (1997a) 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.
- Wouda W, Moen AR, Schukken YH. (1998) Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology.*, 49 : 1311-1316.