

Neospora caninum: nowy czynnik spontanicznego roniczenia u krów w Polsce

BOŻENA MOSKWA, WŁADYSŁAW CABAJ

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

Moskwa B., Cabaj W.

Neospora caninum: a newly recognised agent causing spontaneous abortion in Polish cattle

Summary

Neospora caninum is an apicomplexan protozoan parasite first discovered in dogs with encephalomyelitis. Neosporosis is the principle cause of diagnosed abortion among dairy and beef cattle and occurs worldwide.

This paper describes some aspects of the biology, morphology, detection and protection against neosporosis. Additionally, because of lack of data about the prevalence of bovine neosporosis in Poland, preliminary results of the study carried out at W. Stefański Institute of Parasitology of the Polish Academy of Sciences are presented. The study was carried out in terms of: prevalence of neosporosis in cows and animals from natural areas, sero-evidence of IgG against parasites, vertical transmission in three generations of cattle (grandmother, mother, heifer/bullock) and vertical transmission using embryos derived from mothers tested as *Neospora*-seronegative which were transferred to *Neospora*-seropositive mothers. Results obtained in the biochemical study seem to indicate that the concentration of creatinine kinase, alkaline phosphatase magnesium and iron in the serum should be taken into account as potential biochemical parameters reflecting *N. caninum* infection.

Keywords: *Neospora caninum*, cattle, abortion

Dane o występowaniu *Neospora caninum* pochodzą z bardzo wielu regionów świata. Zainteresowanie tym pasożytem jest powodowane przede wszystkim roniczeniami występującymi u bydła (33). Najwięcej takich przypadków obserwuje się w rejonach, gdzie liczba ferm hodowlanych jest największa tzn. w USA, Kanadzie, Meksyku, Argentynie, Nowej Zelandii, Australii i większości krajów europejskich (14). Bazując na wynikach badań serologicznych, w niektórych stadach nawet 100% krów może być zarażonych tym pasożytem. Dane pochodzące z Kalifornii wskazują na znaczący wzrost odsetka poronień w skutek zarażenia *N. caninum* z 25% do 43% (1, 2). W Anglii z powodu neosporozy miało miejsce 20% aborcji u krów mlecznych (12), a w Holandii 25% (45).

Do strat ekonomicznych, oprócz kosztów bezpośrednich (utrata cieląt) należy zaliczyć również koszty pośrednie. Są to m.in. kosztowna opieka weterynaryjna nad stadem, ponowne zacielenie krów, wydłużenie okresu międzywycieleniami, wzrost kosztów brakowania stada, gorsza jakość mięsa i obniżona mleczność (40, 41). Stwierdzono jednoznacznie, że krowy i jałówki seropozytywne dają średnio w jednym udoju 1 litr mleka mniej niż seronegatywne. Straty ekonomiczne powodowane neosporozą np. w Kalifornii szacuje się na ok. 35 mln dolarów rocznie, w Australii natomiast na ok. 85 mln dolarów w fermach bydła mlecznego oraz 25 mln dolarów w fermach bydła mięsnego (1, 15).

Cykl życiowy

Neospora caninum jest wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem pasożytniczym należącym do typu *Apicomplexa* rodziny *Sarcocystidae* (22). Po raz pierwszy pasożyt ten został znaleziony w postaci cyst u psów w Nor-

wegii (4). Kilka lat później zidentyfikowano pasożyta i zaproponowano wprowadzenie do systematyki nowego rodzaju *Neospora* i w konsekwencji nowego gatunku *N. caninum* (16).

Pomimo rozwoju nowych technik głównie z zakresu biologii molekularnej nie wszyscy badacze uznają *N. caninum* jako odrębną jednostkę systematyczną. Na podstawie wyników badań fragmentu 16s rRNA, wykazano wysoką homologię wobec innych pasożytów powodujących roniczenia u krów, owiec czy koni (*Sarcocystis tenella*, *S. arieticanis*, *Toxoplasma gondii*, *N. hughesi*, *Hammondia heydorni*) (22). Jednakże pomimo bardzo dużego podobieństwa strukturalnego *N. caninum* różni się od w/w gatunków biologią cyklu rozwojowego, a także antygenami (27). Polygenetyczne relacje zostały opracowane w oparciu o analizę wybranych fragmentów DNA, ssr RNA czy DNA chloroplastowych nefotosyntetyzujących organelli (22). Dodatkowo wyniki badań molekularnych wskazują na dużą, genetyczną różnorodność w obrębie gatunku (NC-1, NC-Liverpool, BPA-1, NC-Swee B1, JPA-2, NC-Liv B1, KBA-1, KBA-2). Fakt ten może mieć ogromny wpływ na drogi transmisji, specyficzność wobec żywicieli oraz inwazyjność pasożyta (27).

Cykl życiowy pasożyta został opracowany głównie na podstawie badań eksperymentalnych. Uważa się, że w warunkach naturalnych żywicielem ostatecznym jest pies (17, 26). Z danych literaturowych wiadomo jednak, że oocysty mogą występować również sporadycznie w kale kotów, lisów, jenotów, kojotów. *Neospora caninum* posiada bardzo szeroki krąg żywicieli pośrednich. W warunkach naturalnych występuje m.in. u bydła, owiec, koni, kóz, jeleni, małp i skoczków pustynnych. Doświadczalnie udało się zarazić szczury, oposy, świnię oraz

myszy, które stanowią doskonały model służący do badań reakcji immunologicznych (szczególnie szczepy z defektem genetycznym tzw. knockout) (14, 17, 23).

Dotychczasowe badania nad występowaniem neosporozy u człowieka są nieliczne. Nie potwierdzono występowania przeciwciał przeciw pasożytowi (ELISA, IFAT, Western blott) u 76 kobiet mających kontakt z krowami roniącymi w wyniku neosporozy (35). Natomiast w badaniach surowic ludzkich wykazano obecność przeciwciał przeciw antygenom *N. caninum* o m.cz. 35 kDa (42).

W cyklu życiowym wyróżnia się 3 stadia rozwojowe; tachyzoity ($5-7 \times 1-2 \mu\text{m}$), bradyzoity ($6-8 \times 1-2 \mu\text{m}$) i oocysty (38). Dwa pierwsze powstają na drodze rozmnażania bezpłciowego tzw. endodyogonii (powstawanie dwóch identycznych osobników potomnych wewnątrz komórki). Trzecie stadium jest produktem procesu płciowego, który prawdopodobnie ma miejsce w jelicie żywiciela ostatecznego (15).

Tachyzoity aktywnie wnikające do komórek, określane są jako formy gwałtownie dzielące się. Proces penetracji do wnętrza komórki żywiciela trwa do 5 min. Tachyzoity mogą również dostawać się do wnętrza komórek na drodze fagocytozy np. przez makrofagi (23). Otoczone wakuolą „parasitophorus”, która powstaje już po 30 min. od chwili pierwszego kontaktu można je znaleźć w cytoplazmie wielu komórek takich jak: komórki nerwowe, makrofagi, fibroblasty, miocyty, komórki endotelialne, hepatocyty. Tachyzoity spotyka się w mózgu, rdzeniu kręgowym, sercu, płucach, wątrobie, mięśniach i łożysku (17, 19). Zarażona komórka żywiciela może zawierać do 100 tachyzoitów. Kiedy liczba ta przekroczy tzw. „masę krytyczną” następuje liza komórki żywicielskiej i zarażenie komórek sąsiednich.

Bradyzoity to stadia tkankowe, znajdowane głównie w cystach ($100 \mu\text{m}$) w centralnym układzie nerwowym (mózg, rdzeń kręgowy, włókna nerwowe, siatkówka). Ostatnio znaleziono je również w mięśniach szkieletowych psów oraz cieląt (29). Lokalizacja cyst w mięśniach jest szczególnie istotna z epidemiologicznego punktu widzenia. Bradyzoity są odporne na działanie mieszaniny HCl – pepsyna, stanowiąc w ten sposób formę inwazyjną dla żywicieli mięsożernych. Badania doświadczalne wykazały, że bradyzoity zachowują inwazyjność przez trzy tygodnie 14 dni w 9°C . Natomiast tracą inwazyjność po 1 dniu w temp. -20°C (19).

Grubościenne oocysty ($10-11 \mu\text{m}$) wydostają się do środowiska zewnętrznego wraz z kałem żywiciela ostatecznego. Po pewnym czasie, co stanowi cechę charakterystyczną dla każdego rodzaju *Apicomplexa* następuje sporulacja (maksymalnie 24 godz.). Kulista oocysta zwykle posiada pojedynczą otoczkę, ale zdarza się, że jest ona podwójna. Oocysta zawiera dwie elipsoidalne sporocysty zawierające po 4 wydłużone sporozoitów oraz tzw. „granule kompaktowe” pełniące prawdopodobnie funkcje odżywcze (19).

Objawy kliniczne

Do symptomów klinicznych charakteryzujących neosporozę u żywiciela pośredniego należą: niedowład koń-

czyn, progresywny paraliż kończyn, wiotczenie mięśni, atrofia mięśni (z włączeniem mięśnia sercowego), trudności w przełykaniu, nadpobudliwość. Jednakże objawy te występują tylko u zwierząt młodych (u krów do 2-3 miesiąca życia) (15, 19). Ronienia (z możliwością nawrotów) są jedynym objawem klinicznym neosporozy u zwierząt dorosłych (23). Pośmiertne badania sekcyjne natomiast wykazują następujące makroskopowe zmiany patologiczne: wybroczyny na powierzchni półkul mózgowych, ogniska martwicze w mięśniach, plamy i wybroczyny na powierzchni wątroby.

Drogi rozprzestrzeniania

Rozprzestrzenianie się *N. caninum* następuje dwiema drogami: tzw. pozioma oraz pionową. Rozprzestrzenianie poziome ma na celu „pozyskiwanie” przez pasożyta coraz szerszego kręgu żywicieli spośród wielu gatunków zwierząt. Rozprzestrzenianie pionowe odbywa się poprzez przekazywanie pasożyta z pokolenia na pokolenie, z matki na potomstwo. Rozprzestrzenianiu poziomemu sprzyja wzrost liczby oocyst wydalanych wraz z kałem żywiciela ostatecznego poprzez ich kumulację w pożywieniu i wodzie pitnej przeznaczonej dla bydła (36). Rozprzestrzenianie poziome jest również uwarunkowane obecnością w środowisku żywicieli, u których neosporozy występuje w formie cyst tkankowych. Stanowią one ogniwo wektorowe, potencjalne źródło zarażenia dla zwierząt mięsożernych (hodowlanych i wolno żyjących). Dane epizootologiczne oraz wyniki badań eksperymentalnych wskazują na istotną rolę łożyska w poziomym rozprzestrzenianiu neosporozy. Po wycieleniu łożysko często stanowi pokarm dla zwierząt mięsożernych na fermie oraz dla zwierząt mięsożernych wolno żyjących, jeśli do aborcji lub ocielenia doszło w warunkach niekontrolowanych (np. na pastwisku). Poprzez wylizywanie lub zjadanie łożyska zawierającego tachyzoity, następuje zarażenie kolejnego osobnika ze stada (29).

Jest dobrze udokumentowane, że zarażenie *N. caninum* jest przede wszystkim (81-95%) przenoszone pionowo (12, 33). Krowy zarażone *N. caninum* są w znacznie większym stopniu narażone na aborcję niż krowy nie zarażone. Mogą u nich występować kolejne poronienia, jak również problemy z zacieleniem (24, 25).

Uważa się, że jednym z czynników sprzyjających tej transmisji jest nieefektywność lub rozchwianie układu immunologicznego w czasie ciąży. Z danych literaturowych wynika, iż pionowe przenoszenie neosporozy przez łożysko obserwuje się również w warunkach doświadczalnych u psów (17), kotów (20), owiec (28), myszy (10) oraz u krów (3, 21). Dane epizootologiczne oraz wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że do czynników bezpośrednio wpływających na pionowe szerzenie się neosporozy należy zaliczyć sposób dokarmiania zwierząt, aczkolwiek wyniki badań doświadczalnych nie są jednoznaczne. Niektórzy badacze, wykorzystując PCR nie stwierdzili obecności pasożytów u psów dokarmianych siarą krów zawierającą tachyzoity *N. caninum*, a wynik ten tłumaczą destrukcyjnym wpływem przeciw-

ciał z siary na tachyzoity (13). Natomiast obecność przeciwciał przeciw *N. caninum* stwierdzono u cieląt dokarmianych siarą zawierającą tachyzoity (12). Ponieważ wynik ten nie został potwierdzony metodami biologii molekularnej, autorzy przypuszczają, że były to długo utrzymujące się przeciwciała matki. Wyniki badań prowadzonych na seronegatywnych cielętach dokarmianych mlekiem matki zawierającym tachyzoity wykazały nie tylko wzrost poziomu przeciwciał, ale również obecność pasożyta w mózgach cieląt (metoda PCR) (43).

Kolejnym czynnikiem wpływającym na pionowe rozprzestrzenianie się tej parazytozy jest rasa i wiek krowy (19). Wykazano również, że krowy zarażone przed zacieleniem, przy braku symptomów neosporozy będą rodziły zdrowe cielęta (44). Istnieją przypuszczenia, że w przypadku pierwszego zarażenia, u nie zacielenych krów rozwija się efektywna odpowiedź immunologiczna zabezpieczająca przed rozprzestrzenianiem się neosporozy na następne pokolenie (25, 27). W przypadku, gdy do zarażenia dojdzie we wczesnej fazie ciąży (do 10 tygodnia), wówczas następuje śmierć płodu poprzez resorpcję zarodka lub aborcja. Największy procent aborcji, która nie wykazuje sezonowości stwierdza się w 4-7 miesiącu ciąży (1, 30). Gdy zarażona krowa urodzi cielaka zarażonego pasożytem, objawy parazytozy mogą ujawnić się bardzo szybko i kończy się to zwykle śmiercią potomstwa. Możemy mieć również do czynienia z neosporozą bezobjawową, a zwierzę pozostaje potencjalnym przenosicielem pasożyta na następne pokolenia.

Diagnozowanie neosporozy

Przy braku jednoznacznych objawów neosporozy istotne jest prawidłowe jej diagnozowanie. Do powszechnie stosowanych metod należy zaliczyć: analizę objawów klinicznych, histopatologiczne badanie tkanek, mikroskop elektronowy, immunofluorescencja, test ELISA oraz metody biologii molekularnej (PCR). Niektóre z przedstawionych metod mogą być zastosowane jedynie w przypadku upadków zwierząt. Natomiast powszechnie stosowaną, przyżyciową metodą diagnozowania jest test ELISA, który służy do oznaczenia poziomu przeciwciał w surowicy, płynach: mózgowym, rdzeniowym czy wodach płodowych. Przeprowadzenie testu nie jest problemem, natomiast problemem może być prawidłowa interpretacja wyników ze względu na możliwość występowania reakcji krzyżowych na antygeny innych gatunków pierwotniaków. Dlatego nadrzędnym celem jest przygotowanie antygenów warunkujących wysoką specyficzność i czułość. Wykorzystuje się antygeny wbudowane w tzw. kompleks immunostymulujący (iscoms), rozpuszczalne w wodzie ekstrakty, białka powierzchniowe oraz antygeny rekombinowane (23). W przypadkach, gdy powyższe testy nie dają jednoznacznych wyników i budzą jakiegokolwiek wątpliwości stosuje się badania w kierunku zdiagnozowania pasożyta metodami biologii molekularnej (analiza DNA metodą PCR) (43). Zaletą tego testu stosowanego w wielu odmianach jest bardzo mała ilość materiału biologicznego potrzebna do analizy oraz jego niski próg czułości.

Zapobieganie neosporozie

Ze względu na szerokie rozprzestrzenienie oraz straty ekonomiczne powodowane neosporozą w wielu laboratoriach podejmowane są badania mające na celu wyprodukowanie skutecznej szczepionki. Pionierskie badania zostały podjęte przez firmę Bayer (obecnie Intervet), która jest autorem skutecznej szczepionki NeoGuard™. Wprowadzenie szczepionki na rynek było poprzedzone licznymi badaniami kontrolnymi na zwierzętach zdrowych, aby wykluczyć wszelkie efekty uboczne. Szczepionka została wprowadzona na rynek amerykański (szczególnie stany południowe) oraz Meksyk. Podawana jest podskórnie w kark, w dwóch dawkach podanych w 3-4 tygodniowych odstępach (1-sza po lewej, 2-ga po prawej stronie). W fazie pilotażowej, krowy były obserwowane przez lekarza weterynarii oraz właściciela stada w celu zarejestrowania wszelkich nietypowych zachowań. Prawidłowy rozwój ciąży sprawdza się w 60-tym oraz 90-tym dniu od podania drugiej dawki. Badania eksperymentalne, wykazały istotny wzrost poziomu przeciwciał przeciw szczepionce, którą stanowią inaktywowane tachyzoity izolowane z hodowli (9). Dane publikowane przez bazę danych Intervet podkreślają pełną skuteczność szczepionki przeciw zarażeniu *N. caninum* oraz brak jakiegokolwiek efektów ubocznych dla zwierząt.

Wyniki własne

Występowanie neosporozy w większości krajów europejskich spowodowało, że również nasz zespół zainteresował się możliwością występowania tej parazytozy w Polsce. Na przełomie lat 1999/2000 zbadaliśmy surowice 30 krów, u których wcześniej obserwowano roniecia. Zwierzęta pochodziły z Baranowa i Śmietek (rejon Wielkich Jezior Mazurskich), Leszna oraz Jastrzębca koło Warszawy. Test ELISA (IDEXX Laboratories, Inc.; *Neospora caninum* Antibody Test Kit) wykazał obecność specyficznych przeciwciał klasy IgG przeciw *N. caninum* u 23,3% zbadanych krów, u których notowano roniecia w przeszłości (5).

Nawiązanie współpracy z Instytutem Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu umożliwiło przebadanie stada ponad 200 krów rasy polska białoczarne w kierunku obecności przeciwciał przeciw *N. caninum* (7). Monitorowanie stada potwierdziło występowanie przeciwciał u 22% krów.

Wykorzystując test ELISA podjęto próbę prześledzenia zjawiska pionowego przekazywania zarażenia pierwotniakiem w badanym stadzie (8). Zbadano potomstwo pochodzące od 27 krów seropozytywnych wobec *N. caninum*, a obecność przeciwciał stwierdzono u 92,5% zwierząt. Dodatkowo, obserwowano trzy generacje krów (babka, matka, jałówka lub byczek), u których poziom przeciwciał utrzymywał się na stałym wysokim poziomie. Badano również potomstwo dwóch seropozytywnych matek, które urodziło się po uprzednim implantowaniu embrionów od seronegatywnych dawczyń. Wyniki testu ELISA wykazały w obu przypadkach wysoki poziom przeciwciał.

W czasie badań sekcyjnych pobrano mózgi cieląt, w surowicach których występowały przeciwciała (w tym cieląt urodzonych po implantowaniu zarodków) i przebadano je w kierunku obecności pasożyta. Wyniki gniazdowego PCR z zastosowaniem czterech primerów (2 zewnętrzne: NF1 i SR1 oraz 2 wewnętrzne: NS2 i NR1) potwierdziły obecność *N. caninum* w tkance mózgowej.

U dorosłych osobników jedynym symptomem neosporozy są ronienia. Przeprowadzone przez zespół badania sekcyjne płodów i starszych cieląt wykazały wybroczyny na powierzchni półkul mózgowych. Dane innych autorów mówią o ogniskach martwiczych w mięśniach, a także nieregularnych plamach i wybroczynach na powierzchni wątroby. Aktywność wydzielanych enzymów zależy od stopnia rozległości uszkodzeń tkankowych. Mając powyższe na uwadze, zbadano wzajemne zależności między wybranymi parametrami biochemicznymi w surowicy krwi w aspekcie potencjalnych wyznaczników klinicznych zarażenia bydła *N. caninum* w badaniach przyżyciowych (31). Na szczególną uwagę zasługuje analiza stężenia kinazy kreatyninowej, potasu i magnezu jako parametrów w sposób bezpośrednio odzwierciedlających zaburzenia funkcji układu nerwowego oraz zasadowej fosfatazy odzwierciedlającej zmiany w mięśniach oraz w łożysku.

Wyniki badań innych autorów wykazały obecność przeciwciał przeciw *N. caninum* u wielu wolno żyjących zwierząt. W latach 2000-2001 przeprowadzono badania surowic 33 żubrów pozyskanych w drodze odstrzału sanitarnego, pochodzących z dwóch regionów Polski: Białowieży i Bieszczad, gdzie zwierzęta żyją wolno (6). W surowicach 4 żubrów stwierdzono obecność specyficznych przeciwciał.

Uzyskane dotychczas wyniki wskazują wyraźnie na konieczność prowadzenia dalszych badań w kierunku monitorowania neosporozy w Polsce.

Piśmiennictwo

- Anderson M. L., Blanchard P. C., Barr B. C., Dubey J. P., Hoffman R. L., Conrad P. A.: Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 1991, 28, 110-116.
- Anderson M. L., Palmer C. W., Thurmond M. C.: Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995, 207, 1206-1210.
- Barr B. C., Conrad P. A., Sverlow K. W., Tarantal A. F., Hendricks A. G.: Experimental fetal and transplacental Neospora infection in non-human primate. *Lab. Invest.* 1994, 71, 236-242.
- Bjerkås L., Mohn S. F., Presthus J.: Unidentified cystforming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 1984, 70, 271-274.
- Cabaj W., Choromański L., Rodgers S., Moskwa B., Malczewski A.: Neospora caninum infections in dairy cows with abortion in Poland. *Acta Parasitol.* 2000, 45, 113-114.
- Cabaj W., Moskwa B., Choromański L., Pastusiak K., Lachowicz J.: Serological evidence of Neospora caninum in Bison bonasus L. in Poland. *Abst. 18th Internat. Conf. World Ass. Advancement of Veterinary Parasitology*, 26-30.08.2001a, Stresa, Italy, s. 19.
- Cabaj W., Moskwa B., Choromański L., Pastusiak K., Wojdan J.: Prevalence of Neospora caninum in dairy cattle in Poland. *Abst. 18th Internat. Conf. World Ass. Advancement of Veterinary Parasitology*, 26-30.08.2001a, Stresa, Italy, s. 18.
- Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Choromański L., Rodgers S.: Neospora caninum – vertical transmission in dairy cattle. *Wiadomości Parazytologiczne*, 2001c, 47, 9.
- Choromański L., Block W.: Humoral immune response and safety of experimental formulations of inactivated Neospora caninum. *Parasit. Res.* 2000, 86, 851-853.
- Cole R. A., Lindsay D. S., Blagburn B. L., Dubey J. P.: Vertical transmission of Neospora caninum in mice. *J. Parasitol.* 1995, 81, 730-732.
- Cudon P., Lin D. S., Bowmann D. D., Lindsay D. S., Miller T. K., Duncan I. D., deLaunta A., Cummings J., Suter M., Cooper B., King J. M., Dubey J. P.: Neospora caninum infection in English Springer Spaniel littermates: Diagnostic evaluation and organism isolation. *J. Vet. Intern. Med.* 1992, 6, 325-332.
- Davison H. C., French N. P., Trees A. J.: Herd-specific and age-specific seroprevalence of Neospora caninum in 14 British dairy herds. *Vet. Rec.* 1999, 144, 547-550.

- Dijkstra Th., Eysker M., Schares G., Conraths F. J., Wouda W., Barkema H. W.: Dogs shed Neospora caninum oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with Neospora caninum tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 2001, 31, 747-752.
- Dubey J. P.: A review of Neospora caninum and neosporosis. *Vet. Parasit.* 1996, 67, 1-59.
- Dubey J. P.: Recent advances in Neospora caninum and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 1999, 84, 349-367.
- Dubey J. P., Carpenter J. L., Speer C. A., Topper M. J., Uggla A.: Newly recognized fatal protozoan disease of dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988a, 192, 1269-1285.
- Dubey J. P., Hanel A. L., Lindsay D. S., Topper M. J.: Neonatal Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988b, 193, 1259-1263.
- Dubey J. P., Hamir A. N., Shen S. K., Thulliez P., Rupprecht C. E.: Experimental Toxoplasma gondii infection in raccoons (Procyon lotor). *J. Parasitol.* 1993, 79, 548-552.
- Dubey J. P., Lindsay D. S.: A review of Neospora caninum and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 1996, 67, 1-59.
- Dubey J. P., Lindsay D. S.: Fatal Neospora caninum infection in kittens. *J. Parasitol.* 1989, 75, 148-151.
- Dubey J. P., Lindsay D. S., Anderson M. L., Davis S. W., Shen S. K.: Induced transplacental transmission of Neospora caninum in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1992, 201, 709-713.
- Ellis J. T., Luton K., Baverstock P. R., Brindley P. J., Nimmo K. A., Johnson A. M.: The phylogeny of Neospora caninum. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1994, 64, 303-311.
- Hemphill A.: The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv. Parasitol.* 1999, 43, 47-104.
- Jones A. E., Wright S. E., Maley S., Rae A., Schock A., Kivár E., Bartley P., Hamilton C., Carey J. M., Buxton D.: Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 2001, 31, 1523-1534.
- McAllister M. M.: Do cows protect factus from Neospora caninum transmission? *Trends Parasitol.* 2001, 17, 6.
- McAllister M. M., Dubey J. P., Lindsay D. S., Jolley W. R., Wills R. A., McGuire A. M.: Dogs are definitive hosts of Neospora caninum. *Int. J. Parasitol.* 1998, 28, 1473-1478.
- McAllister M. M., Lathan S.: Neospora 2001. *Trends Parasitol.* 2002, 18, 4-5.
- McAllister M. M., McGuire A. M., Jolley W. R., Lindsay D. S., Trees A. J., Stobart R. H.: Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet. Pathol.* 1996, 33, 647-655.
- Modry D., Vaclavek P., Koudela B., Slapeta J.: Placentohagia – an alternative way for horizontal transmission of Neospora caninum in cattle? *Trends Parasitol.* 2001, 17, 573.
- Moen A. R., Wouda W., van Werven T.: Clinical and sero-epidemiological follow-up study in four dairy herds with an outbreak of Neospora abortion. *Proceedures of the Dutch Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, 1995, December 13, Lelystad.
- Moskwa B., Cabaj W., Wojdan J.: Estimation of some biochemical parameters in sera as potential clinical signs of Neospora caninum infection in dairy cattle. *Folia Univ. Agric. Stetin*, 2001, 224, Zootechnica 42, 121-126.
- Nietfeld J. C., Dubey J. P., Anderson M. L., Libal M. C., Yaeger M. J., Neiger R. D.: Neospora-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992, 4, 223-226.
- Pare J., Thurmond M. C., Hietala S. K.: Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calving mortality. *Can. J. Vet. Res.* 1996, 60, 133-139.
- Peters M., Lutketels E., Heckeroth A. R., Schares G.: Immunohistochemical and ultrastructural evidence for Neospora caninum tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 2001, 31, 1144-1148.
- Peterson E., Lebech M., Jensen L., Lind P., Rask M., Bagger P., Bjorkman C., Uggla A.: Neospora caninum infection and repeated abortion in humans. *Emerging Infectious Dis.* 1999, 5, 278-280.
- Schares G., Conraths F. J.: Placentophagia – an alternative way for horizontal transmission of Neospora caninum in cattle? *Trends Parasitol.* 2001, 17, 574.
- Schares G., Wenzel U., Muller T., Conraths F. J.: Serological evidence for naturally occurring transmission of Neospora caninum among foxes (Vulpes vulpes). *Int. J. Parasitol.* 2001, 31, 418-423.
- Speer C. A., Dubey J. P., McAllister M. M., Blvist J. A.: Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of Neospora caninum and Toxoplasma gondii. *Int. J. Parasitol.* 1999, 29, 1509-1519.
- Thorton R. N., Gajadhar A., Evans J.: Neospora abortion epidemic in a dairy herd. *N. Z. Vet. J.* 1994, 42, 190-191.
- Thurmond M., Hietala S.: Culling associated with Neospora caninum infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 1996, 57, 1559-1562.
- Thurmond M., Hietala S.: Effect of congenitally acquired Neospora caninum infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1997, 58, 1381-1385.
- Tranas J., Heinzen R. A., Weiss L. M., McAllister M. M.: Serological evidence of human infection with protozoan Neospora caninum. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunol.* 1999, 6, 765-767.
- Uggla A., Stenlund S., Holmdahl O. J. M., Jakubek E. B., Thebo P., Kindahl H., Bjorkman C.: Oral Neospora caninum inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 1998, 28, 1467-1472.
- Williams D. J. L., Guy C. S., McGarry J. W., Guy F., Tasker L., Smith R. F., MacEACHERN K., Cripps P. J., Kelly D. F., Trees A. J.: Neospora caninum-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 2000, 121, 347-358.
- Woods L. W., Anderson M. L., Swifi P. K., Sverlow K. W.: Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (Odocoileus hemionus columbianus). *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994, 6, 508-510.
- Wouda W., Bartels C. J. M., Moen A. R.: Characteristics of Neospora caninum-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 1999, 52, 233-245.