

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ

Mrsc. vet. Ивана М. Клун

СЕРОЕПИЗООТИОЛОГИЈА И МОЛЕКУЛАРНА
ДИЈАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЈЕ ПАРАЗИТОМ
Neospora caninum КОД ГОВЕДА

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Београд, MMXIV

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ivana M. Klun, DVM, MSc

SEROEPIZOOTIOLOGY AND MOLECULAR
DIAGNOSIS OF *Neospora caninum* INFECTION
IN CATTLE IN SERBIA

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, MMXIV

Комисија за оцену и одбрану рада:

Др Софија Катић-Радивојевић, редовни професор Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (у пензији), **МЕНТОР**

Др Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, **МЕНТОР**

Др Војислав Павловић, редовни професор Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Датум одбране: _____

Докторска дисертација урађена је у ИНСТИТУТУ ЗА МЕДИЦИНСКА ИСТРАЖИВАЊА у Београду, у оквиру пројекта ИИИ 41019 "КОНТРОЛА ИНФЕКЦИЈА АПИКОМПЛЕКСНИМ ПАТОГЕНИМА: ОД НОВИХ МЕСТА ДЕЛОВАЊА ЛЕКА ДО ПРЕДИКЦИЈЕ", којим руководи научни саветник др Олгица Ђурковић-Ђаковић. Пројекат финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Србије.

Захваљујем се свима који су ми на било који начин помогли током израде ове дисертације, а посебно

- др Олгици Ђурковић-Ђаковић, научном саветнику Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду*
- сарадницима Центра изузетних вредности у паразитологији Института за медицинска истраживања УБ*
- професорима Факултета ветеринарске медицине УБ др Софији Катић-Радивојевић и др Војиславу Павловићу*
- дипл. вет. Милану Малетићу, асистенту Факултета ветеринарске медицине УБ*
- дипл. вет. спец. Синиши Брадоњићу, ветеринарском инспектору Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине*
- свим колегама из научних и специјалистичких ветеринарских института и ветеринарских станица*
- др Гереону Шаресу из Инст. за епидемиологију Савезног истражив. инст. за здравст. заштиту животиња Фридрих Лефлер, острво Римс, Немачка*

и најважније, мојој Ружи, илустратору, и мојим родитељима и породици

Кратак садржај

Инфекција паразитом *Neospora caninum* изучава се од 80-их година прошлог века, до када је због сличности агенса са *Toxoplasma gondii* била погрешно дијагностикована. Данас је неоспороза говеда широм света болест растућег значаја, која код репродуктивних категорија изазива побачаје, смртност телади и велике економске губитке ако се јави у епизоотској форми. Почетна истраживања преваленце инфекције *N. caninum* код говеда у Србији датирају од 2008. године, међутим нема података о губицима које неоспороза потенцијално проузрокује у говедарству Србије. У овом раду испитали смо серопреваленцу ове инфекције на репрезентативном узорку крава са целе територије Србије и анализирали епизоотиолошке факторе који могу имати улогу у појави и ширењу инфекције код говеда у нашој земљи, што би могло да резултира предлогом развоја мера превенције и последичног унапређења сточарске производње. Такође, извршили смо оптимизацију метода молекуларне дијагностике инфекције *N. caninum* и сагледали могућности примене молекуларних метода у дијагностици неоспорозе.

Серуми пореклом од укупно 1496 говеда испитани су компетитивним *ELISA* тестом на присуство *N. caninum* специфичних антитела. Показано је да серопреваленца износи 7,2%, са ниским до умереним (од 2,2 до 12%) степеном прокужености у свих дванаест епизоотиолошких подручја Србије. Инфекција је установљена на 10,7% испитаних фарми. Резултати *cELISA* теста за серопозитивне јединке, тј. вредности степена инхибиције кретале су се од 40,3 – 91,8%, средње вредности $71,9 \pm 17,1\%$, и медијане 79,9%, што значи да је практично половина серопозитивних крава имала специфична антитела у високом титру, тј. високе вредности степена инхибиције од преко 80%.

Испитивање епизоотиолошких фактора у смислу фактора ризика за инфекцију *N. caninum* урађено је применом логистичке регресионе анализе. Повезаност инфекције са потенцијално релевантним епизоотиолошким факторима (величина стада, доминантно заступљена раса, начин гајења, начин држања у штали, употреба силаже у исхрани, порекло грла за ремонт стада, присуство и број паса, појава побачаја у стаду, просечна годишња количина падавина, регион) прво је испитана униваријантном логистичком регресијом, и варијабле значајне на нивоу $P \leq 0,25$ укључене су у мултиваријантни регресиони модел. Утврђено је да је фактор ризика за инфекцију крава слободан начин држања ($OR=3,31$, 95% ИП=1,95-5,60, $P < 0,001$), док су фактори ризика за присуство инфекције на фармама говеда били и

слободан начин држања ($OR=18,49$, 95% ИП=5,40-63,36, $P<0,001$) и величина стада >100 грла ($OR=24,08$, 95% ИП=3,85-150,50, $P=0,001$). Осим свеобухватног увида у садашње стање прокужености говеда у Србији, резултати овог истраживања који се односе на факторе ризика за инфекцију *N. caninum* и на нивоу јединке и на нивоу фарме у нашој земљи указују на превентивне мере које се могу предузети у циљу побољшања здравља животиња и смањења економске штете, и тиме допринети унапређењу сточарства у Србији.

Резултати оптимизације молекуларно-дијагностичког метода *PCR*-а у реалном времену на узорцима крви и крвних елемената пореклом од 94 говеда, показали су изузетно високу осетљивост метода еквивалентну детекцији ДНК приближно једног тахизоита у 2,5 mL ДНК елуата. За детекцију ДНК *N. caninum* у узорцима моноклеарних (МН) ћелија периферне крви показана је нешто виша осетљивост метода у односу на узорке пуне крви – два пута већа при количини од 10 fg ДНК, и 25% већа за 100 fg ДНК. Праг осетљивости метода за спајковане узорке ДНК пореклом из МН ћелија износио је 1 fg ДНК, док је за узорке пореклом из коагулума био десет пута виши – 10 fg. С обзиром на изузетно високу осетљивост примењеног метода од 0,3 fg ДНК, може се препоручити увођење *PCR*-а у реалном времену као прецизног и брзог молекуларно-дијагностичког метода у протокол дијагностиковања неоспорозе на нивоу специјализованих лабораторија. Овим би се значајно допринело подизању нивоа здравствене заштите животиња а тиме и унапређењу сточарства у Србији.

Кључне речи: *Neospora caninum*, неоспороза, говеда, серопреваленца, фактори ризика, дијагностика, молекуларна детекција, *PCR* у реалном времену, паразитемија

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Паразитологија

УДК број: 619:616.993.192:636.2(043.3)

Summary

Neospora caninum is a relatively recently recognized protozoan parasite of animals. It has been studied only since 1988, until when it was misdiagnosed as *Toxoplasma gondii*, due to the morphological similarity of the agents. Today, neosporosis in cattle is known as a disease of growing importance worldwide, causing abortions and large economic losses if epidemic abortions occur. The first investigations of the prevalence of *N. caninum* infection in cattle in Serbia were not carried out before 2008, and no data exist on the potential damaging effects of neosporosis on cattle husbandry in Serbia. In this study we examined the seroprevalence of the infection in a representative sample of cows from the entire territory of Serbia as well as the epizootiological factors that may play a role in the emergence and spread of infection.

Sera originating from a total of 1496 cattle were tested by competitive ELISA assay for the presence of *N. caninum*-specific antibodies. It was shown that the seroprevalence was 7.2%, ranging from a low to a moderate (2.2 to 12%) prevalence accross all twelve epizootiological areas of Serbia. At least one seropositive animal was detected on 10.7% of farms. Results of the cELISA, i.e. the degree of inhibition in seropositive individuals, ranged from 40.3 to 91.8%, mean = $71.9 \pm 17.1\%$, median = 79.9%, which means that almost one half of the seropositive cows had specific antibodies in high titres, or high values of inhibition of more than 80%. Possible association of the infection with biologically plausible risk factors including herd size, breed, husbandry methods, feeding practices (use of silage), origin of replacement stock, presence and number of dogs, occurrence of abortions in the herd, average annual rainfall and region, was analyzed by univariate analysis, and variables significant at $P \leq 0.25$ were included in multivariate logistic regression models. The results showed that the single risk factor for infection in individual animals was keeping cows in loafing barns (OR=3.31, 95% CI=1.95-5.60, $P < 0.001$), while risk factors for the presence of infection on farms were the use of loafing barns (OR=18.49, 95% CI=5.40-63.36, $P < 0.001$), and herd size >100 animals (OR=24.08 95% CI=3.85-150.50, $P = 0.001$). In addition to a comprehensive insight into the current state of *N. caninum* infection in cattle in Serbia, the results of this research on infection risk factors both at the individual and farm level in our country suggest preventive measures that can be applied to improve animal health and reduce economic losses, thereby improving livestock production.

In addition, we performed the optimization of molecular diagnosis of *N. caninum* infection and analyzed the possibilities of application of molecular methods in the

diagnosis of neosporosis. Results of optimization of the real-time PCR in spiked samples of whole blood and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) that originated from 94 cattle, showed an extremely high sensitivity of the method in detecting DNA equivalent to approximately one tachyzoite DNA in 2.5 mL of the eluate. Somewhat greater sensitivity was shown for the detection of *N. caninum* DNA in PBMC samples compared to whole blood samples – two times higher for the amount of 10 fg DNA, and 25% higher for 100 fg DNA. The sensitivity threshold demonstrated for DNA spiked PBMC samples was 1 fg DNA, and for whole blood samples 10 fg DNA. Since a very high overall sensitivity of the method was demonstrated (0.3 fg DNA), the introduction of real-time PCR as an extremely precise and rapid molecular diagnostic method can be recommended as an improvement of the diagnostic approach to neosporosis in specialized laboratories, which could significantly raise the level of animal health protection and improve livestock production in Serbia.

Keywords: *Neospora caninum*, neosporosis, cattle, seroprevalence, risk factors, diagnosis, molecular detection, real-time PCR, parasitaemia

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific area: Parasitology

UDC number: 619:616.993.192:636.2(043.3)

САДРЖАЈ

I УВОД	1
II ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Животни циклус, облици и морфолошке карактеристике <i>N. caninum</i>	6
2.2. Пuteви инфекције	9
2.3. Инфекција <i>N. caninum</i> код говеда: патогенетске, имунолошке и клиничке карактеристике	14
2.4. Контрола и превенција неоспорозе говеда	20
2.5. Дијагностика неоспорозе	21
2.5.1. Директни методи	23
2.5.2. Индиректни методи (серолошки тестови)	26
III ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА	29
IV МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА	31
4.1. Испитивано подручје	32
4.2. Испитиване животиње	33
4.3. Испитивани материјал	34
4.3.1. Узорци крви/серума	34
4.3.2. Узорци крви (<i>EDTA</i> -к2)	34
4.4. Епизоотиолошки подаци	35
4.5. Серолошка испитивања	36
4.5.1. Компетитивни ELISA тест	36
4.6. Молекуларна дијагностика	37
4.6.1. Припрема узорака	37
4.6.1.1. Припрема узорака МН ћелија	37
4.6.1.2. Припрема узорака коагулума	38

4.6.2. Екстракција	38
4.6.3. <i>PCR</i> у реалном времену – <i>real-time PCR</i>	39
4.7. Статистичка обрада резултата	41
4.7.1. Преваленца <i>N. caninum</i> специфичних антитела	41
V РЕЗУЛТАТИ	42
5.1. Инфекција <i>N. caninum</i> код говеда у Србији	43
5.1.1. Преваленца и дистрибуција <i>N. caninum</i> специфичних антитела према степену инхибиције	43
5.1.2. Утицај епизоотиолошких фактора на инфекцију паразитом <i>N. caninum</i> – индивидуални ниво	46
5.1.3. Утицај епизоотиолошких фактора на инфекцију паразитом <i>N. caninum</i> – ниво фарме	53
5.2. Примена <i>qPCR</i> метода за детекцију ДНК <i>N. caninum</i>	60
5.2.1. Оптимизација <i>qPCR</i> метода за детекцију ДНК <i>N. caninum</i>	60
5.2.2. Детекција ДНК <i>N. caninum</i> у узорцима моноклеарних ћелија и коагулума и испитивање осетљивости метода	62
VI ДИСКУСИЈА	64
VII ЗАКЉУЧАК	80
VIII ЛИТЕРАТУРА	83
БИОГРАФИЈА И ПРИЛОЗИ	108

I УВОД

Неоспороза је глобално обољење говеда које се данас сматра једним од најважнијих узрока побачаја и рађања мртворођене телади, са значајним последицама по репродуктивни капацитет стада као и по економски аспект сточарства. Једно истраживање на Новом Зеланду показало је да трошкови у случају појаве масовних побачаја на нивоу целе земље, током петогодишњег периода могу износити чак и више од 200 милиона €. Како нема свеобухватних података о распрострањености ове инфекције у Србији (осим недавно објављених података о стању на епизоотиолошким подручјима Војводине) нема ни података о губицима које потенцијално проузрокује у говедарству Србије. Да би се попунила ова празнина, први корак за процену ризика од настанка оваквих губитака представља прикупљање валидних података о раширености неоспорозе код нас и утврђивање фактора ризика путем сероепизоотиолошке студије пресека. Наше (пилот) истраживање на узорку крава из целе Србије пре неколико година показало је да је ова инфекција присутна, и на ограниченом узорку утврђена је серопреваленца од 8,6%, док је истраживање у региону Панчева показало серопреваленцу од 4,6%. Стога, да би се осмислила стратегија за превенцију инфекције и последичног економског губитка, прво је потребно обезбедити валидне епизоотиолошке податке. Стога је предмет овог рада епизоотиолошка студија инфекције паразитом *N. capinum* код говеда у Србији. Анализом добијених података ће се утврдити да ли су и који од испитиваних (на које се може деловати) фактори ризика за настанак инфекције. Изведени закључци треба да поставе научну основу за предлог мера превенције неоспорозе крава.

Такође, не постоје довољно брзе, осетљиве и специфичне методе етиолошке дијагностике узрока побачаја код крава које су стандардизоване и валидиране а истовремено и исплативе. Стандардизација молекуларних метода је тешка, узимајући у обзир велики број техника које се користе, као и различите циљне гене/секвенце гена. У циљу унапређења дијагностике овог обољења у нашој земљи, потребно је оптимизовати метод (*qPCR*) молекуларне дијагностике који би могао да детектује ДНК паразита и из аутолизираног материјала, увести га у рутинску примену у специјализованим лабораторијама, и на тај начин омогућити валидну и ефикасну молекуларну дијагностику неоспорозе.

II ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Протозоа *Neospora caninum* (DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER и UGGLA, 1988) описана је осамдесетих година прошлог века као паразит паса и говеда. Инфекције су у међувремену забележене и код многих других врста природно и експериментално инфицираних животиња, укључујући птица; чак и за човека постоје посредни докази о долажењу у додир са *N. caninum*.

Врло је сродна врста паразиту *Toxoplasma gondii*, али је идентификована и именована читавих осам деценија после њеног открића (1908 – 1988), када је утврђено да припада посебном роду и представља нову врсту (Dubey и сар., 1988a). Откривена је први пут у Норвешкој, у виду ткивних циста и накупина појединачних неидентификованих паразита ("мерозоиота") у мозгу и скелетним мишићима паса оболелих од енцефаломијелитиса и миозитиса (Bjerkås и сар., 1984). Убрзо затим, установљена је и у Великој Британији, у случају конгениталног енцефаломијелитиса телета (O'Toole и Jeffrey, 1987), као и у САД, као узрочник мијелитиса код четири новорођена телета (Parish и сар., 1987), а детектована је и у ткивима три (од девет) абортираних фетуса говеда (Thilsted и Dubey, 1989). Још деценија је протекла до открића да је пас стални домаћин ове протозое (McAllister и сар., 1998).



Слика 1: Ткивна циста *N. caninum* у хомогенату мозга гербила (Pena и сар., 2007)



Слика 2: Спорулисана ооциста *N. caninum* (светл. микрос.)

Према таксономској класификацији, *N. caninum* спада у фамилију *Sarcocystidae* (Схема 1). Старост рода *Neospora* се на основу молекуларно-генетичких испитивања процењује на око 12 милиона година (Su и сар., 2003), а утврђено је и да *N. caninum* са паразитом *Hammondia heydorni* чини још блискију монофилетску групу него са *T. gondii* (Mugridge и сар., 1999; Su и сар., 2003).

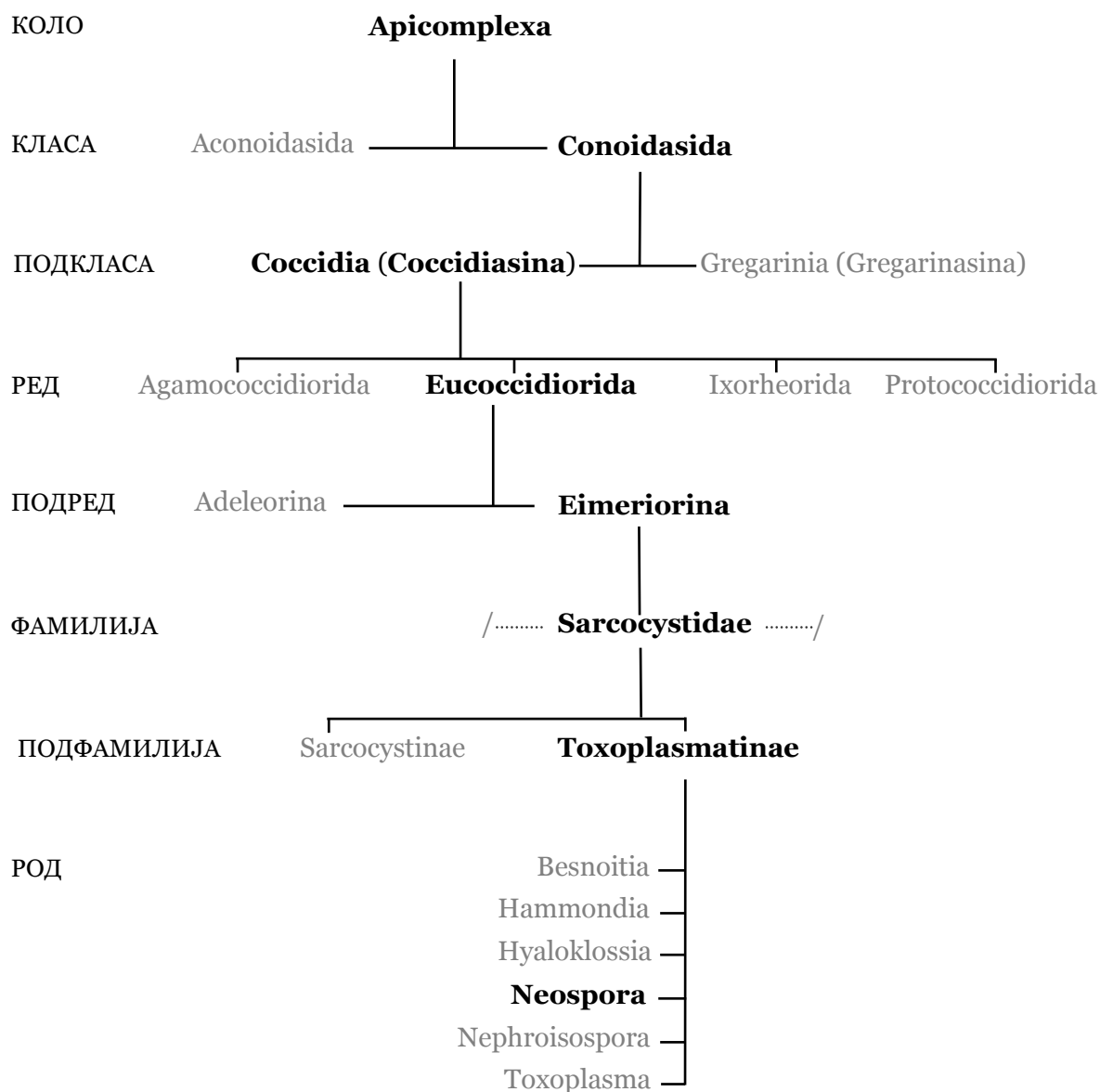


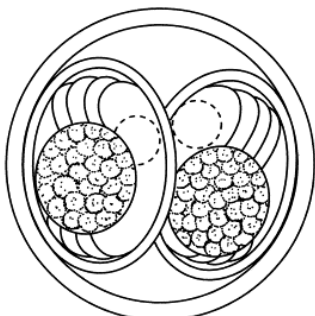
Схема 1. Таксономска класификација *Neospora* spp. (Leuckart, 1879; Léger и Duboscq, 1910; Léger, 1911; Poche, 1913; Biocca, 1956; Levine, 1970; Levine, 1988; Dubey и сар., 1988a)

2.1. Животни циклус, облици и морфолошке карактеристике *N. caninum*

Паразит *Neospora caninum* је облигатно интрацелуларна апикомплексна протозоа са хетероксеним животним циклусом којом се могу инфицирати и последично оболети преживари, коњи и животиње из фамилије *Canidae* (Dubey, 2003). До сада је потврђено да су четири припадника рода *Canis* – пси (McAllister и сар., 1998), којоти (Gondim и сар., 2004в), аустралијски динго пси (King и сар., 2010), и сиви вукови (Dubey и сар., 2011), стални домаћини за *N. caninum* у којима се одвија сексуална (ентероепителијална) фаза развоја. Ова фаза завршава се излучивањем ооциста у спољашњу средину, које након спорулације постају инфективне за прелазне и случајне домаћине, у којима се паразит умножава асексуално, у виду брзоделећих тахизоита и спороделећих брадизоита. Асексуално умножавање могуће је и у ткивима сталних домаћина.

Још увек није познато како се тачно одвија ентероепителијална фаза развоја, и до данас још нису откривени нити описани шизонти и гамонти у цревном епителу сталног домаћина (Dubey и сар., 2002). Пси ооцисте почињу да излучују почевши од петог дана (Lindsay и сар., 1999а) након инфекције. Излучивање најчешће траје краткотрајно, током неколико дана, а познати су и случајеви када је трајало само један дан (Lindsay и сар., 2001; Gondim и сар., 2002), што објашњава ретке успешне случајеве изолације ооциста копролошким прегледом фецеса паса инфицираних природним путем. Али, описан је и случај протрахираног или можда поновљеног излучивања ооциста – и након 4 месеца од првог узорковања (McGarry и сар., 2003). Значајно је истаћи да у једном тренутку врло мали број паса на некој територији излучује ооцисте – у опсежном истраживању у Немачкој ооцисте *N. caninum* су копролошким прегледом установљене само код седам од више од 24.000 паса (Schares и сар., 2005б). Број излучених ооциста варира од само неколико (Schares и сар., 2001а, 2001б), до неколико милиона (Lindsay и сар., 1999а), али је углавном релативно мали (McAllister и сар., 1998; Lindsay и сар., 1999а, 2001), и зависи од порекла ингестираног инфицираног материјала. Већи број ооциста излучивали су пси храњени ткивним цистама пореклом из говеда или бивола, него из експериментално инфицираних мишева (Gondim и сар., 2002; Rodrigues и сар., 2004). Такође, штенад је излучивала више ооциста од одраслих паса, а након примарне инфекције пси су током наредних 8 до 18 месеци били имуни на нове инфекције што је показано одсуством поновног излучивања ооциста (Gondim и сар., 2005).

Неспорулисане ооцисте су димензија 10-11 μm , сферичног до субсферичног облика, и садрже централни споронт (McAllister и сар., 1998). У лабораторијским условима (инкубација у 2% H_2SO_4 и аерација на шејкеру током неколико дана) све



Слика 3: Схематски приказ спорулисане ооцисте *N. caninum* (размерник = 10 μm) (Lindsay и сар., 1999б)

ооцисте су спорулисале у року од 1 до 3 дана; садржале су 2 спороцисте са по четири спорозоиота (McAllister и сар., 1998), мада има података и о аберантној спорулацији једног мањег броја ооциста, које су (као *Caryospora* spp.) садржале једну спороцисту са осам спорозоиота (Lindsay и сар., 1999а, 1999б). У детаљној морфолошкој студији (Lindsay и сар., 1999б) спорулисаних ооциста *N. caninum*, утврђене су димензије 11,7 $\times$ 11,3 μm , релативног односа дужине и ширине од 1,04. Ооцисте нису поседовале микропилу, резидуум, као ни поларне грануле, осим спорадичних рефрактилних гранула међу спороцистама. Спороцисте су биле елипсоидне, димензија 8,4 $\times$ 6,1 μm , и нису имале *Stieda* телашце.

Садржале су сферични до субсферични резидуум у виду накупине ситних гранула. Спорозоиоти су били дугуљастог облика, димензија 7-8 $\times$ 2-3 μm , без рефрактилних тела и са централно или благо постериорно постављеним једром (Слике 2 и 3).

Отпорност ооциста у спољашњој средини није детаљно проучавана, али се сматра да с обзиром на блиско сродство и велику морфолошку сличност са *T. gondii* и ооцисте *N. caninum* имају сличну отпорност и да могу остати вијабилне током више месеци (Dubey и сар., 2007а). Спорулисане ооцисте чуване на 4° C у 2% раствору H_2SO_4 остале су инфективне током 108 дана (Gondim и сар., 2002, 2004а). У другом експерименту, ооцисте чуване на исти начин више нису биле инфективне после 46 недеља (Uzeda и сар., 2007). Спорулисане ооцисте је за један минут уништавала температура од 100° C, као и 10% раствор Na-хипохлорита за један час (Alves Neto и сар., 2011).

Тахизоит, или брзоделећи облик *N. caninum* је лучног, овоидног или лоптастог облика, димензија 5-7 $\times$ 1-5 μm , благо зашиљеног предњег и заобљеног задњег краја. Димензије и облик зависе од стадијума деобе у којој се ћелија налази – тахизоит који се тренутно не дели је лучног облика, величине око 7 $\times$ 2 μm (Dubey и Lindsay, 1996; Speer и сар., 1999) Тахизоити су карактеристични за акутну фазу инфекције, када се крвотоком преносе кроз тело домаћина. На ултраструктурном нивоу, што је установљено електронском микроскопијом, садрже исте ћелијске органеле као и тахизоити *T. gondii*, мада различитог изгледа, броја и локализације

(*Speer* и сар., 1999), и као и *T. gondii*, у ћелије домаћина улазе активном пенетрацијом уз помоћ специјализованих органела – роптрија, микронема и густих гранула, већ након пет минута од првог контакта са ћелијском мембраном (*Hemphill* и сар., 1996).

Након продирања тахизоита у ћелију, формира се мембрана састављена од елемената и паразита, и ћелије домаћина. Унутар ове новонастале паразитофорне вакуоле (*Dubey* и сар., 1988б) тахизоити се несметано умножавају ендодиогенијом, и овакве накупине тахизоита означавају се као псеудоцисте. Брза деоба тахизоита евентуално доводи до лизе – пуцања ћелије домаћина, и инфицирања нових ћелија (*Hemphill*, 1999).

Са развојем имунитета домаћина, заснованог на целуларном имунском одговору (*Williams* и сар., 2000; *Andrianarivo* и сар., 2001; *Staska* и сар., 2003, 2005), тахизоити успоравају своју деобу и прелазе у спороделеће облике – брадизоите, који карактеришу хроничну фазу инфекције. Брадизоити су издуженог облика, димензија 6-8 x 1-2 μm (*Speer* и сар., 1999; *Dubey* и сар., 2002), и у поређењу са тахизоитима имају мање роптрија и више амилопектинских гранула.

Од паразитофорне вакуоле унутар ћелије постепено настаје ткивна циста, у којој брадизоити настављају да се врло споро умножавају. Ткивне цисте су округлог до овалног облика (Слика 1), величине и до 107 μm у пречнику, што зависи од броја брадизоита који садрже, а предилекционо место за настанак ткивних циста је нервно ткиво – мозак, кичмена мождина, нерви, и ретина (*Dubey* и сар., 1988а, 1990а), мада се могу наћи и у мишићном (*Peters* и сар., 2001а). Опна ткивне цисте је глатка и састоји се од примарног зида који формира мембрана паразитофорне вакуоле, и дебљег гранулисаног слоја са електронски густим везикулама (*Speer* и *Dubey*, 1989); поседује и разгранате тубуларне структуре (*Bjerkås* и *Dubey*, 1991). Дебљина опне може бити и до 4 μm , а најчешће су измерене вредности од 1 до 2 μm (*Dubey* и *Lindsay*, 1996); неки аутори сматрају да дебљина зависи од дужине трајања инфекције (*Jardine*, 1996). Ткивне цисте могу перзистирати у организму домаћина и више година, практично до краја живота домаћина – код мишева и до 13 месеци (*Lindsay* и сар., 1992) – и то без значајних клиничких симптома (*Hemphill*, 2007). Цисте се могу развити и у висцералним органима као што су срце, плућа, јетра или бубрези, што је честа појава код генерализоване инфекције нарочито осетљивих домаћина као што су торбари (*King* и сар., 2011). Што се отпорности на утицаје спољашње средине тиче, утврђено је да на 4° C ткивне цисте и брадизоити могу преживети и до две недеље (*Dubey* и сар., 2004; *Lindsay* и сар., 1992), док их замрзавање на -20° C уништава за један дан (*Lindsay* и сар., 1992).

У организму прелазних домаћина, код којих се, као што је већ речено, одвија само асексуални животни циклус, из ингестираних ооциста ослобађају се спорозоити, а из ингестираних ткивних циста брадизоити. Ови облици продире у епителне ћелије танког црева, трансформишу се у тахизоите који се прогресивно размножавају, и лимфотоком и крвотоком доспевају до предилекционих ткива, где се као што је већ описано формирају ткивне цисте. Уколико током живота домаћина дође до пада имунитета из било ког разлога, може доћи до ослобађања брадизоита из ткивних циста (ексцистација), који се на кратко опет претворе у тахизоите и почињу да инфицирају друге, нове ћелије. На овај начин долази до реактивације латентне инфекције. Ова појава забележена је и код сталних домаћина – паса, када се код гравидних женки тахизоити преко постељице пренесу на фетусе (*Barber и Trees, 1998; Heckerroth и Tenter, 2007*), или када до реактивације дође код јединки на имуносупресивној терапији, што може изазвати клиничко испољавање неоспорозе (*Fry и сар., 2009; Hoop-Hanks и сар., 2013*).

2.2. Пuteви инфекције

Као што је већ поменуто, сва три стадијума *N. caninum* (тахизоити, брадизоити и спорулисане ооцисте) инфективна су и представљају извор инфекције за одговарајуће домаћине. Постнатално, трансмисија инфекције може бити хоризонтална, путем ингестије ткива са ткивним цистама или тахизоитима, или уношењем хране или воде контаминираних спорулисаним ооцистама. Пренатално, инфекција се преноси вертикално током гравидитета, путем трансплацентне трансмисије тахизоита из крвотока мајке током паразитемије, када говоримо о конгениталној неоспорози. До конгениталне инфекције може доћи на два различита начина, и због процењивања епизоотиолошке ситуације их је врло значајно разлучити. Стога су ради прецизнијег дефинисања порекла инфекције фетуса недавно уведена и два термина – **ЕГЗОГЕНА** и **ЕНДОГЕНА** трансплацентна трансмисија (ТПТ) (*Trees и Williams, 2005*). Егзогена ТПТ настаје након (најчешће примарне) инфекције гравидне женке спорулисаним ооцистама. До ендogene ТПТ, која се сматра доминантним начином ТПТ, долази код перзистентно инфициране јединке (и саме најчешће конгенитално инфициране), услед реактивације инфекције током гравидитета (Схема 2). Трансплацентна трансмисија догађа се и код сталних домаћина – паса – када се код штенади јавља асцендентна парализа, атрофија мишића, неуролошки поремећаји, нодуларни дерматитис и отежано

дисање (Dubey и Lindsay, 1989; Wolf и сар., 1991; Cuddon и сар., 1992; Wouda и сар., 1993; Cole и сар., 1995; Flagstad и сар., 1995; Reichel и сар., 1998; Dubey и сар., 2007б).

Код крава, сматра се да је *N. caninum* један од микроорганизама са највишим степеном ефикасности трансплацентног преношења, с обзиром на то да је вероватноћа да инфициране јединке отеле конгенитално инфицирано теле чак 95% (Davison и сар., 1999а). Краве могу бити инфициране доживотно (Trees и сар., 1999), а до ТПТ може доћи у више консекутивних гравидитета (Fioretti и сар., 2003), или наизменично (Boulton и сар., 1995; Wouda и сар., 1998б; Guy и сар., 2001). Више студија показало је опадање степена конгениталне инфекције са порастом паритета крава, што можда указује на побољшање имунског одговора који смањује степен ТПТ у каснијим гестацијама (Romero и сар., 2002; Dijkstra и сар., 2003). На пример, Dijkstra са сарадницима (2003) је на 500 крава и њиховом потомству показао опадање степена ТПТ тј. рађања конгенитално инфициране телади: од 80% код јуница – примипара, преко 71% код другоротки, 67% код трећеротки, до 66% код крава са 4 и више тељења. И поред високе ефикасности ТПТ, теоријским математичким моделима доказано је да се инфекција *N. caninum* у стадима не може током дужег периода одржати без хоризонталног постнаталног преношења (French и сар., 1999).

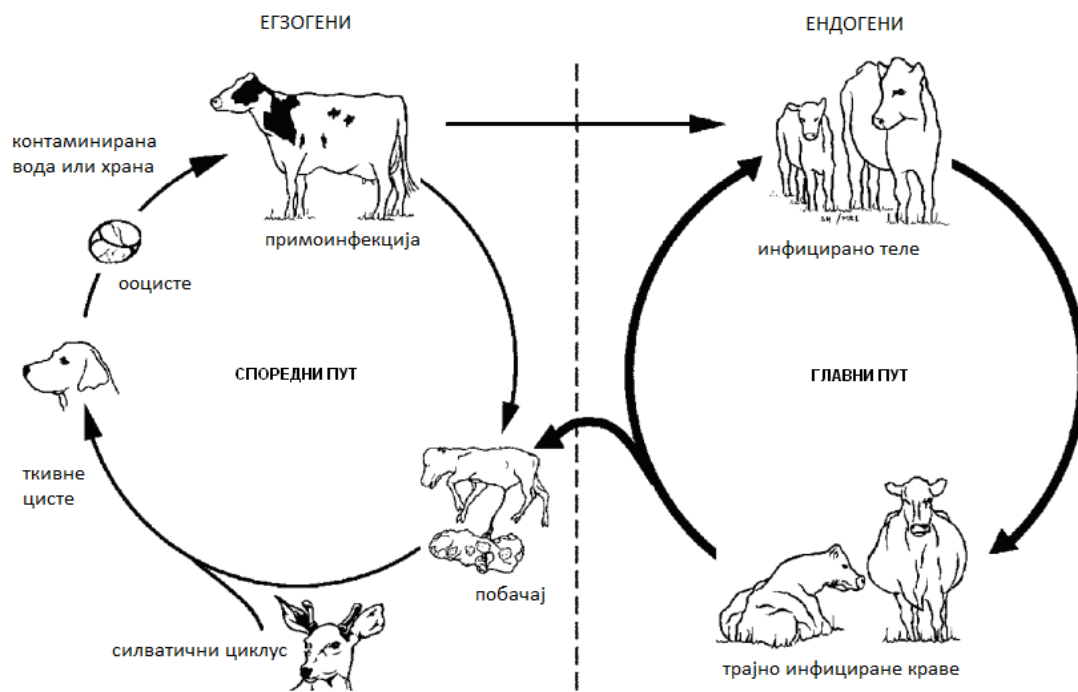


Схема 2. Пuteви преношења *N. caninum* код говеда (адаптирано из Dubey и сар., 2006; Wouda, 2007)

Ооцисте су кључне за ширење и одржавање инфекције у природи. Доказано је да су инфективне за говеда (*de Marez* и сар., 1999; *Trees* и сар., 2002, *Gondim* и сар., 2004а), овце и козе (*Schares* и сар., 2001б), и мишеве, гербиле и заморчиће (*McAllister* и сар., 1998; *Dubey* и *Lindsay*, 2000; *Schares* и сар., 2001б) а експериментално је последична ТПТ утврђена код говеда, паса, оваца, коза, мајмуна, мачака и мишева (*Dubey* и *Lindsay*, 1996). Са становишта зоохигијене, важно је истаћи да пси често дефецирају у близини заједничких јасала и спремишта сточне хране (*Dijkstra* и сар., 2002б), што представља могући извор заразе за цело стадо. Сматра се да је за хербиворе инфекција ооцистама једини начин постнаталне трансмисије (*Dubey* и сар., 2007а; *McCann* и сар., 2007), што значи да се инфекција у стаду не може пренети са краве на краву. Ово су практично и показали *Anderson* и сар. (1997), када су у блиској кохабитацији држали 25 серонегативних и 25 серопозитивних јуница. Праћене су серолошки, као и њихово потомство, и није било ниједног случаја сероконверзије или рађања инфициране телади у серонегативној групи, за разлику од серопозитивне где је бар седам телади имало доказе о конгениталној инфекцији.

Насупрот прелазним домаћинима, стални домаћини не могу се инфицирати ооцистама (*Bandini* и сар., 2011). Пси се могу инфицирати ингестијом постелице тек отелених крава (*Dijkstra* и сар., 2001б, 2002б), евентуално лешевима говеда (*Trees* и *Williams*, 2000), као и сировим месом (*Basso* и сар., 2001). Пси храњени месом и органима (масетер, срце, јетра, мозак) експериментално инфицираних говеда излучивали су ооцисте; интересантно је да упркос позитивном налазу ооциста, током четири недеље није дошло до сероконверзије ни код једног посматраног пса (*Cavalcante* и сар., 2011). Сами абортирани фетуси нису вероватни извор инфекције за сталне домаћине (*Bergeron* и сар., 2001а).

Код животиња инфицираних природним путем, вијабилне ооцисте установљене су једино у фецесу паса (*Basso* и сар., 2001; *Šlapeta* и сар., 2002; *McGarry* и сар., 2003; *Schares* и сар., 2005б; *Basso* и сар., 2009) и сивог вука (*Dubey* и сар., 2011). Питање постојања неког алтернативног начина преношења инфекције подвучено је налазом серопозитивних крава на фармама у чијој близини уопште нема паса (*Wouda* и сар., 1999б; *Constantin* и сар., 2011). Тако је на пример у Северној Америци доказано постојање сивлатичног циклуса преношења инфекције између којота и белорепих јелена. Као и код трихинелозе (*Teodorović* и сар., 2014), неодговорно остављање одране ловине у шуми помаже ширењу инфекције; новоинфицирани којоти излучују ооцисте, што опет доводи до повишеног ризика за домаћу стоку која користи пашњаке на тој територији (*Gondim* и сар., 2004б). У Европи, од доказаних сталних домаћина у могућем сивлатичном циклусу могли би

евентуално да учествују вукови; код других припадника рода *Canidae* који су у Европи присутни, било као аутохтоне било као интродуковане врсте, за сада је само потврђено индиректно присуство паразита – серолошки; или молекуларно присуство, као налаз ДНК *N. caninum* у органима. На пример, ДНК *N. caninum* детектована је у мозгу црвене лисице у више европских земаља (Almería и сар., 2002; Hůrková и Modrý, 2006; De Craeye и сар., 2011; Bartley и сар., 2013; Stuart и сар., 2013), али не и у Немачкој (Constantin и сар., 2011). Ооцисте *N. caninum* у фецесу лисица нису пронађене; у истом истраживању у Немачкој (Constantin и сар., 2011) у 2191 узорак фецеса лисица ооцисте, па чак ни ДНК *N. caninum* у 65 узорака фецеса позитивних на ооцисте неидентификованих кокцидија, уопште нису установљени. Ни експериментални покушаји инфекције лисица ткивима инфицираних оваца и коза нису били успешни – код шест јединки праћених током три месеца није дошло до излучивања ооциста *N. caninum* (Schares и сар., 2002б). Експерименти са шакалима и ракунским псима, врстама дивљих канида чији се ареал проширио (шакал), или које су интродуковане (ракунски пас) у Европу (и Србију) нису пак рађени, мада има серолошких доказа о изложености инфекцији код ове две врсте (Kim и сар., 2003; Steinman и сар., 2006). Према претпоставци Rosypal и Lindsay (2005), у већини земаља теоретски је могућ сивлатични циклус између канида и преживара, само су неопходна истраживања да потврде које су врсте укључене у тај циклус на конкретној територији.

Серолошки докази о изложености дивљих животиња овом паразиту су многобројни. *N. caninum* специфична антитета откривена су код вукова, дивљих мачака, рисова, куна, творова, јазаваца, лисица, бизона, јелена, срнића, муфлона, дивокоза, козорога, дивљих свиња, зечева, фералних мачака, гаврана (Gaffuri и сар., 2006; Almería и сар., 2007; Bártoová и сар., 2007; Sobrino и сар., 2008; Millán и сар., 2009а, 2009б; Goździk и сар., 2010; Panadero и сар., 2010; Malmsten и сар., 2011; García-Bocanegra и сар., 2012; Molina-López и сар., 2012), па чак и код морских сисара (Dubey и сар., 2003; Omata и сар., 2006; Fujii и сар., 2007; Miller и сар., 2010). ДНК *N. caninum* је установљена код свраке, јастреба мишара, визона, видри, срнића, лисица, мрког медведа (De Craeye и сар., 2011; Darwich и сар., 2012; Bartley и сар., 2013; Čobádiová и сар., 2013; Stuart и сар., 2013). Донедавно се мислило да се птице не могу инфицирати овом протозоом, међутим, утврђено је да на пример кокошке ипак могу бити прелазни домаћини и у експерименталним условима (Furuta и сар., 2007), као и у случају инфекције настале природним путем, када је из мозга кокошака изолована ДНК *N. caninum* (Costa и сар., 2008). Сматра се да птице имају улогу у епизоотиологији овог обољења, с обзиром на то да се у две студије присуство птица (живине) показало као фактор ризика за инфекцију *N. caninum* на

фармама где су забележени побачаји проузроковани неоспорозом (*Ould-Amrouche* и сар., 1999; *Bartels* и сар., 1999). Такође, птице могу послужити и као "сентинел" врсте за откривање присуства инфекције *N. caninum* на неком терену (*Molina-López* и сар., 2012).

Глодари на фармама могу имати улогу у ширењу неоспорозе, као прелазни домаћини – резервоари за инфекцију паса. У једној студији утврђена је висока преваленца ДНК *N. caninum* у 27% узорак ткива кућних мишева уловљених у близини фарми (*Barratt* и сар., 2008); ДНК *N. caninum* установљена је и у ткивима пољских мишева и пацова (*Ferroglio* и сар., 2007), као и обичних и белозубих ровчица, шумских и жетелачких мишева, и волухарица (*Meerburg* и сар., 2012). Такође, не треба заборавити да и мали преживари – овце и козе – поред тога што и сами могу оболети од неоспорозе (*Moreno* и сар., 2012; *González-Warleta* и сар., 2014), имају улогу резервоара инфекције. Поред оваца и коза, *N. caninum* специфична антитела детектована су и код других врста домаћих животиња – мачака, свиња, камила, јужноамеричких камелида, јакова, бали и гаур говечета и бивола (*Dubey* и сар., 2007a; *Dubey* и *Schares*, 2011).

Инфекција тахизоитима и брадизоитима пероралним путем била је успешна у експерименту са мишевима (*Lindsay* и *Dubey*, 1990), што је сасвим очекивано у случају брадизоита који су отпорни на дејство желудачне киселине и пепсина, али је интересно због тога што тахизоити третирани пепсином *in vitro* губе инфективност и способност репликације у ћелијској култури. Експериментално је инфекција пренета новорођеним теладима путем млека контаминираних тахизоитима *N. caninum* (*Davison* и сар., 2001), а ДНК *N. caninum* установљена је у млеку и колоструму инфицираних крава (*Moskwa* и сар., 2003, 2007), међутим за сада нема доказа о преношењу инфекције *N. caninum* путем млека код природно инфицираних животиња (*Davison* и сар., 2001; *Dijkstra* и сар., 2001b). Такође, нема доказа ни о полном преношењу под природним условима, иако је присуство ДНК паразита доказано у семену природно и експериментално инфицираних бикова (*Ortega-Mora* и сар., 2003; *Caetano-da-Silva* и сар., 2004; *Ferre* и сар., 2005, 2008).

Мада се неки аутори баве проучавањем зоонотског потенцијала ове инфекције, код човека за сада постоје само серолошки докази изложености паразиту, без икаквих клиничких показатеља обољења (*Tranias* и сар., 1999; *Ibrahim* и сар., 2009; *Robert-Gangneux* и *Klein*, 2009). Ипак, не може се у потпуности искључити етиолошка улога *N. caninum* као опортунистичког агенса у неуролошким поремећајима код ХИВ позитивних пацијената (*Barratt* и сар., 2010), с обзиром на знатно вишу преваленцу *N. caninum* специфичних антитела која је утврђена код ових пацијената у односу на здраву популацију (*Lobato* и сар., 2006).

2.3. Инфекција *N. caninum* код говеда: патогенетске, имунолошке и клиничке карактеристике

И поред знатно увећаног обима литературе у последњих 20-ак година, неоспороза и даље представља недовољно истражени проблем. Показало се да је то озбиљна болест растућег значаја код говеда и паса широм света (*Dubey* и сар., 2007а). У ветеринарској медицини, неоспороза представља најзначајнији проблем у говедарству (због изазивања побачаја и неонаталних утинућа), а донекле и у малој пракси, због спорадичних случајева неуролошког обољевања паса – нарочито штенаци. Међутим, пси као стални домаћини ове протозое имају много већи значај са епизоотиолошког аспекта.

Данас се неоспороза сматра једним од најважнијих узрока побачаја код крава широм света, нарочито код млечних раса (*Dubey* и сар., 2006). Подаци из више истраживања у САД (Калифорнији), Холандији и Новом Зеланду говоре да приближно 20% абортираних фетуса достављених ветеринарским дијагностичким лабораторијама има трагове инфекције *N. caninum* (*Anderson*, 2003).

Након примоињекције стеоне краве, или услед реактивације перзистентне (трајне) инфекције током гравидитета, долази до паразитемије, и преласка тахизоита на постељицу и плод (*Dubey* и сар., 2007а). Већ на самом почетку паразитемије, *N. caninum* се може наћи у септуму карункула, а након тога и у вилусу феталне плаценте. До побачаја долази услед настанка иреверзибилних оштећења било плода било постељице, на шта утиче више међусобно повезаних фактора (*Gibney* и сар., 2008). Примарно оштећење постељице дејством паразита може директно угрозити гравидитет, или пак проузроковати појачано лучење матерналних простагландина што доводи до побачаја услед лутеолизе. Примарна оштећења у ткивима плода су директно изазивана умножавањем паразита, а секундарна настају услед недостатка кисеоника и хранљивих материја услед оштећења постељице. Могуће је да дође и до имунски изазваног побачаја услед ослобађања велике количине матерналних проинфламаторних цитокина у постељници или због хормонског поремећаја. Један или више наведених фактора могу бити важнији у поједином тренутку, а на све њих, као и на меру у којој ће се испољити утиче стадијум гравидитета (*Dubey* и сар., 2006; *Innes*, 2007; *López-Gatius* и сар., 2007; *Gibney* и сар., 2008; *Almería* и сар., 2010). Тежа и обимнија оштећења виталних органа плода директно доводе до његовог утинућа (*Gibney* и сар., 2008). Сматра се да концентрација регулаторних (IL-10) и инфламаторних цитокина (γ-интерферон), и обим оштећења плода насталог умножавањем тахизоита, одређују да ли ће плод преживети или не (*Innes*, 2007; *Rosbottom* и сар., 2007, 2008; *Almería* и

сар., 2010; *Rosbottom* и сар., 2011). Заштитни ефекат у gravidитету може имати висок ниво пролактина у серуму инфицираних крава (*Garcia-Isperto* и сар., 2009). Истраживања су показала и заштитни ефекат прогестерона путем модулације Th1/Th2 имунског одговора, што је показано приликом *N. caninum* и *Coxiella burnetii* коинфекције, када су инфициране краве које нису побациле имале много више нивое прогестерона од оних које јесу (*Garcia-Isperto* и сар., 2010). Егзогени (суплементирани) прогестерон међутим, није имао овај ефекат, већ супротно, доводио је до повишеног ризика за побачај код крава са високим титровима *N. caninum* специфичних антитела (*Bech-Sabat* и сар., 2007). Ризик од преношења паразита на плод и последичног обољења је делимично зависан од стадијума gravidидета у тренутку настанка или реактивирања инфекције. Степен преношења током gravidитета расте са порастом пропустљивости постељице, и нарочито је висок у последњем триместру (*Dubey* и сар., 2006, 2007а). Међутим, ризик од побачаја повишен је и у случају инфекције у првом триместру, али услед ефеката имунског одговора на постељицу – у једној студији доказана је веза између повећане концентрације матерналних CD4+ Т ћелија и γ-интерферона и угинућа плода, при чему краве које нису побациле нису имале икаквог трага инфламаторне реакције у ткиву постељице (*Maley* и сар., 2006), а и најновија истраживања потврдила су улогу проинфламаторног одговора у изазивању оштећења постељице и последичног побачаја, нарочито ако до инфекције дође у првој трећини (70. дана) gravidитета (*Cantón* и сар., 2014а, 2014б; *Regidor-Cerrillo* и сар., 2014). Преживљавање плода зависи и од његове имунокомпетентности тј. зрелости имунског система (*Innes* и сар., 2005) који треба да контролише умножавање паразита и индукује прелазак тахизоита у брадизоите, и тиме спречи угинуће плода (*Gibney* и сар., 2008).

Имунски одговор на инфекцију *N. caninum* код говеда заснован је на ћелијском имунитету, и карактерише се огромним количинама γ-интерферона које стварају моноклеарне (МН) ћелије периферне крви, слезине и лимфних чворова. (*Marks* и сар., 1998; *Williams* и сар., 2000; *Andrianarivo* и сар., 2001; *Lunden* и сар., 2002). Највеће количине синтетишу CD4+ Т лимфоцити (*Marks* и сар., 1998; *Klevar* и сар., 2007) и НК ћелије (*Boysen* и сар., 2006; *Klevar* и сар., 2007), и то нарочито на почетку инфекције и у појединим ткивима као што су карункули плацентома (*Rosbottom* и сар., 2008). Утврђено је да у културама периферних МН ћелија долази до знатне пролиферације под утицајем антигена, и да је већа пропорција антитела IgG₂ изотипа (*Williams* и сар., 2000; *Andrianarivo* и сар., 2001). Под утицајем γ-интерферона долази до инхибиције раста паразита (*Innes* и сар., 1995) и до активације макрофага и других МН ћелија. Ово је такозвани Тип 1 проинфламаторног одговора који се активира одмах након примарне инфекције и

који доводи до контроле умножавања паразита и до трансформације тахизоита у брадизоите и стварања ткивних циста, што води повољном исходу инфекције код одраслих негравидних јединки. Међутим, као што је већ поменуто, до овог типа одговора може доћи и у ткиву постелице услед инфекције током раног гравидитета, што резултира угинућем плода (*Innes* и сар., 2007), с обзиром на то да је за регулацију потенцијално штетних ефеката проинфламаторног одговора и за одржавање гравидитета неопходна доминација Типа 2 имунског одговора (*Quinn* и сар., 2002; *Innes* и сар., 2005; *Williams* и *Trees*, 2006).

Постнатална инфекција код говеда доводи до развоја заштитног имунског одговора (*Williams* и *Trees*, 2006). Уколико до примоиности дође пре гравидитета, имунски одговор може да спречи ТПТ и побачај приликом експерименталне *challenge* инфекције током гестације (*Innes* и сар., 2001; *Williams* и сар., 2007). Ефикасност стеченог имунитета је доказана и у случају појаве побачаја у једном стаду товних говеда, када су краве са доказаном претходном инфекцијом биле под нижим ризиком од побачаја него краве које су се примоиностицирале у текућем гравидитету (*McAllister* и сар., 2000).

Знатно је компликованије објаснити имунски одговор код трајно (конгенитално) инфицираних крава, када до реактивације инфекције може доћи у практично сваком гравидитету са последичним рађањем конгенитално инфицираног телета, побачајем, и ретко, поновљеним побачајем. Ово указује на то да се код трајно инфициране јединке имунски одговор не може развити у довољној мери да спречи поновљену ендегену ТПТ, али је довољан да спречи егзогену ТПТ услед *challenge* инфекције. Код пет природно трајно инфицираних крава није било могуће изазвати егзогену ТПТ и побачај, али је зато код три од њих током другог и трећег триместра дошло до реактивације ендogene инфекције и касније до рађања конгенитално инфициране телади (*Williams* и сар., 2003). Очигледно постоји врло сложен однос између паразита и имунског одговора домаћина и исход ове интеракције зависи умногоме од начина и времена настанка првог контакта са паразитом (*Williams* и сар., 2009). Епизоотиолошки посматрано, последице пренаталне и постнаталне инфекције су веома различите. Једна студија показала је да код крава парентерално инфицираних тахизоитима *N. caninum* 10 недеља пре осемењавања није дошло до ендogene ТПТ и да су оне отелиле неинфицирану телад (*Williams* и сар., 2000). У другој студији, инфекција ооцистама током гравидитета довела је до егзогену ТПТ само у том гравидитету али не и до ендogene ТПТ у наредном (*McCann* и сар., 2007). Ово је показало да код ових експерименталних постнаталних инфекција није дошло до настанка трајне инфекције говеда.

Има врло мало података о току инфекције у наредним гравидитетима код крава које су током претходног инффициране ооцистама, али се показало да најчешће не долази до побачаја. У студији *Dijkstra* и сар. (2002a) у једном стаду где су постојали докази о инфекцији путем ооциста *N. caninum*, анализа серостатуса потомства зачетог након изложености стада ооцистама показала је да јесте дошло до ендogene ТПТ, али не код свих јединки; серолошко праћење истог стада у наредним годинама показало је да је до трајне инфекције дошло код 56% постнатално инффицираних крава (*Dijkstra* и сар., 2008). Такође, и у другим студијама потврђено је да су ефикасност ТПТ, као и могућност за настанак трајне инфекције код постнатално инффицираних крава генерално знатно ниже него код конгенитално инффицираних (*Paré* и сар., 1996, 1997; *Schares* и сар., 1998; *Wouda* и сар., 1998b; *Davison* и сар., 1999a; *Mainar-Jaime* и сар., 1999; *Bergeron* и сар., 2000; *Dyer* и сар., 2000; *Romero* и *Frankena*, 2003; *Dijkstra* и сар., 2006). Ове разлике нарочито су значајне у погледу примене мера превенције, и једна од могућих препорука одгајивачима била би да се из запата искључују конгенитално инффицирана грла, а за репродукцију задржавају постнатално инффицирана и њихово здраво потомство.

Основна клиничка манифестација обољења код говеда је побачај, и то од трећег месеца гравидитета до термина тељења (*Anderson* и сар., 1991; *Barr* и сар., 1991a; *Thornton* и сар., 1991; *Otter* и сар., 1995; *Wouda* и сар., 1997; *Hattel* и сар., 1998). Побачај је најчешћи од петог до седмог месеца гравидитета (*Anderson* и сар., 1991; *Thornton* и сар., 1991; *Wouda* и сар., 1997), а може доћи до реасорпције, мумификације, или аутолизе фетуса. Најчешће у случају утинућа плода између трећег и осмог месеца гравидитета долази до избацивања плода са умереним степеном аутолизе. Плодови који угину пре петог месеца могу се мумифицирати и задржати у материци и више месеци. Ако до утинућа плода дође на самом почетку гравидитета, плод се реасорбује, што се манифестује као повађање односно повећан индекс осемењавања (*Muñoz-Zanzi* и сар., 2004; *Kamga-Waladjo* и сар., 2010). Телад могу бити и мртворођена, превремено рођена, рођена у термину али са различитим поремећајима (од благо испољене атаксије до парализе све четири ноге) (*Dubey*, 2003). Задње и/или предње ноге могу бити у флексији или у хиперекстензији. Забележене су и егзофталмија или очна асиметрија, и понекад сколиоза, хидроцефалус, и сужење кичмене мождине (*O'Toole* и *Jeffrey*, 1987; *Parish* и сар., 1987; *Barr* и сар., 1991b, 1993; *Dubey* и *Lindsay*, 1996). Већина телади се међутим рађа клинички здрава али конгенитално инффицирана. На побаченом плоду видљиве патоанатомске промене су изузетно ретке – као на пример ситне беличасте или бледе тачкасте промене у скелетним мишићима или срцу. Микроскопски постоји налаз упале – ћелијског инфилтрата негнојне природе у мозгу, срцу и скелетним

мишићима, а такође и плућима, јетри и бубрезима (*Barr* и сар., 1990; *Wouda* и сар., 1997). На постелици такође могу бити видљиви трагови негнојне упале (*Otter* и сар., 1995; *Bergeron* и сар., 2001б), понекад са некрозом вилуса у првој трећини гравидитета (*Macaldowie* и сар., 2004), или калцификацијама током друге половине гравидитета (*Maley* и сар., 2003). Сами паразити могу се у овим ткивима идентификовати имунохистохемијски (*Wouda* и сар., 1997).

Побачаји се јављају епидемијски или чешће, ендемски (*Thurmond* и сар., 1997). Епидемијска појава побачаја, код већег броја стеоних крава у стаду у релативно кратком временском интервалу, обично је забележена након хоризонталне *N. caninum* инфекције и последичне егзогене ТПТ (*McAllister* и сар., 1996; *Thurmond* и сар., 1997; *Patitucci* и сар., 1999; *Waldner* и сар., 1999; *Dijkstra* и сар., 2001а). Показатељ епидемијске појаве побачаја је између осталог карактеристична крива појаве која се одликује наглим почетком и брзим растом броја побачаја, високом амплитудом и нагињањем у десно, што указује на постојање једног извора – жаришта инфекције. Такође, примећен је раст серопреваленте са старошћу јединки, као и одсуство корелације између серостатуса крава и њихових потомкиња. Једна студија је показала одсуство корелације у оба смера – серопозитивне јединке имале су или серонегативне мајке или серонегативно потомство. У случају серонегативних мајки и серопозитивних ћерки, доказана је хоризонтална инфекција ћерки, док је у случају серонегативног потомства до хоризонталне инфекције њихових мајки дошло тек након њиховог рођења (*Dijkstra* и сар., 2001а). Забележени су побачаји и код 57% ризичне популације крава у стаду током само неколико месеци (*Wouda* и сар., 1999а); а за границу дефинисања епидемијског јављања побачаја узима се појава од 10 до 12,5% побачаја у ризичној популацији у распону од 6 до 8 недеља (*Wouda* и сар., 1999а; *Schares* и сар., 2002а). Ризичном популацијом сматрају се краве које су на почетку епидемије стеоне бар 58 до 260 дана (*Schares* и сар., 2002а). Ендемска појава побачаја одликује се равномерношћу појаве током више месеци или година, обично на нивоу од преко 5% ризичне популације крава, и праћена је снажном корелацијом серостатуса мајки и ћерки, што је и показатељ да је вертикална односно ендегена ТПТ трансмисија доминантни начин преношења инфекције у датом стаду (*Schares* и сар., 2002а; *Thurmond* и сар., 1997). У случају ендемске појаве побачаја, ризичном популацијом сматрају се све краве стеоне током целокупног времена појаве побачаја у стаду (*Dubey* и сар., 2007а).

Код мање од 5% крава долази до поновљеног побачаја услед неоспорозе (*Anderson* и сар., 1995), као последице гравидитетом или другим факторима изазване имуносупресије. Микотоксикоза, као и инфекција вирусом бовине вирусне

дијареје (*BVDV*) могу изазвати реактивацију латентне инфекције. Утврђен је и 2-3^{1/2} пута виши ризик од побачаја код крава инфицираних *N. caninum* него код осталих јединки у стаду (*Paré* и сар., 1997; *Moen* и сар., 1998; *Davison* и сар., 1999б; *Stenlund* и сар., 1999); док је за конгенитално инфициране јунице он био и знатно виши (7^{1/2} пута) у првом гравидитету (*Thurmond* и *Hietala*, 1997а). Краве које побаци не показују друге знаке инфекције, и не долази до задржавања постелице, одлагања појаве еструса, или проблема са зачећем у наредном гравидитету, тако да се сматра да неоспорога говеда нема утицаја на плодност (*López-Gatius* и сар., 2005а; *Santolaria* и сар., 2009). Међутим, показан је пад млечности код серопозитивних крава (*Hernandez* и сар., 2001; *Romero* и сар., 2005; *González-Warleta* и сар., 2011), и то за чак више од 4% у првој лактацији (*Thurmond* и *Hietala*, 1997б); а ова појава нарочито је евидентна у стадима у којима су регистровани побачаји (*Hobson* и сар., 2002) или повећан број побачаја (*Duffield* и сар., 2001) било које етиологије. Такође, за серопозитивне краве постојао је два пута виши ризик да буду искључене из запата услед пада млечности, лоших репродуктивних параметара, или било ког разлога (*Thurmond* и *Hietala*, 1996; *Waldner* и сар., 1998; *Bartels* и сар., 2006б).

Као што је наведено, датирање настанка постнаталне инфекције у стаду могуће је поређењем серостатуса парова мајка-ћерка (*Dijkstra* и сар., 2001а), а такође и уз помоћ мерења авидитета специфичних IgG антитела (*Björkman* и сар., 1999), када недавну хоризонталну трансмисију потврђује велики број серопозитивних животиња са ниским авидитетом IgG антитела (*McAllister* и сар., 2000; *Dijkstra* и сар., 2002а). Уопште, ниво хуморалног имунског одговора детектован серолошким тестовима може пружити и многе друге податке осим о самој серопреваленси инфекције. На пример, утврђено је да је серопозитивност, како на нивоу јединке тако и на нивоу стада, добар индикатор за прогнозу исхода гравидитета. Већа је вероватноћа побачаја код серопозитивне него код серонегативне краве (*Anderson* и сар., 1995; *Moen* и сар., 1998; *Hietala* и *Thurmond*, 1999; *Davison* и сар., 1999б); *Paré* и сар. (1997) су користили резултате проспективне серолошке студије у стаду млечних крава ради предвиђања могућности побачаја, и утврдили су да конгенитална инфекција или побачај може настати и код крава које су биле инфициране и пре почетка гравидитета, и да имунски одговор тј. ниво специфичних антитела код сваке конкретне јединке утиче на то да ли ће доћи до инфекције плода; под вишим ризиком су биле краве са ниским нивоима антитела између 180-ог и 210-ог дана гравидитета од оних са високим. Две студије спроведене у Шпанији показале су да су серопозитивне краве под чак 12 до 19 пута вишим ризиком од побачаја него серонегативне (*López-Gatius* и сар., 2004а, 2004б), а трећа студија из исте земље утврдила је девет пута виши ризик, који се повишавао на 12 ако су била у питању

говеда са високим титровима специфичних антитела (*González-Warleta* и сар., 2011). Утврђено је и да интензиван узгој стоке има утицаја на повећање серопреваленте (*Sanderson* и сар., 2000; *Otranto* и сар., 2003), а да краве које се користе за производњу товног материјала имају нижи ризик од побачаја него млечне (*De Meerschman* и сар., 2000), због тога што инфекција *N. caninum* изазива значајно веће и озбиљније интрацеребралне лезије код фетуса млечних у односу на фетусе товних раса (*De Meerschman* и сар., 2002).

2.4. Контрола и превенција неоспорозе говеда

Тренутно нема терапијског приступа у лечењу неоспорозе одраслих крива применљивог у пракси. У студији *Kritzner* и сар. (2002) показана је ефикасност поназурила у дози 20 mg/kg телесне тежине током једног односно шест дана након експерименталне инфекције телади. *PCR* методом није утврђено присуство ДНК паразита у мозгу, срцу, јетри и бубрезима третираних животиња. Међутим, у практичној примени дуготрајна терапија би била скопчана и са значајним трошковима као и ограничењима услед присуства резидуа лека у млеку и поштовања периода каренце. Такође, постављено је и питање подложности ткивних циста хемиотерапијским средствима (*Reichel* и *Ellis*, 2002), па се предност даје превенцији применом ефикасне вакцине (*Innes* и сар., 2002). Једина комерцијална (инактивисана) вакцина недавно је повучена са тржишта због нејасних резултата примене и недовољне ефикасности (*Weston* и сар., 2012; *Monney* и *Hemphill*, 2014), а у почетним испитивањима живе вакцине пореклом од нисковирulentних сојева *N. caninum* показале су високу ефикасност код мишева (*Rojo-Montejo* и сар., 2012) и говеда (*Weber* и сар., 2013).

Од осталих мера које би могле да утичу на смањење присуства неоспорозе код крива разматрана је и примена ембриотрансфера (*Baillargeon* и сар., 2001; *Landmann* и сар., 2002), вештачко осемењавање серопозитивних крива семеном бикова товних раса (*López-Gatius* и сар., 2005б; *Almería* и сар., 2009; *Yániz* и сар., 2010), као и принудно клање праћено обнављањем стада серонегативним јуницама или искључивање ћерки серопозитивних крива из приплода (*Larson* и сар., 2004) али само у стадима где је утврђено да је доминантни начин преношења ендогена ТПТ (*Dubey* и сар., 2007а). Имајући у виду начине преношења неоспорозе, контрола се свакако мора спроводити двојачко – у циљу спречавања хоризонталне инфекције, и у циљу сузбијања вертикалне.

Препоручују се редовне годишње контроле серостатуса свих јединки у стаду (*Rabón* и сар., 2007), а у зависности од резултата тестирања могућа су следећа решења ради контроле неоспорозе: искључивање из запата серопозитивних крава или серопозитивних крава које су побациле услед неоспорозе, осемењавање ћерки серопозитивних крава само семеном бикова товних раса, или потпуно искључивање ћерки серопозитивних крава из приплода. Међутим, анализа оправданости спровођења мера превенције и контроле у односу на економску исплативост је у математичким моделима показала да је мали број решења могуће и практично применити (*Häsler* и сар., 2008; *Reichel* и *Ellis*, 2006). У Швајцарској су средње вредности процењених трошкова на годишњем нивоу износиле од 81 € за мале фарме (15 грла) са ниском серопреваленцом, до 1875 € за веће фарме (60 грла) са високом серопреваленцом од 50%, и утврђено је да искључивање крава које су бар једном побациле из запата или приплода није ни ефикасно у циљу контроле неоспорозе, нити исплативо. Једино је предложена стратегија "искључивање ћерки серопозитивних крава из приплода" била економски исплатива, и то у стадима са високом серопреваленцом. Такође, применљиво решење може бити и терапирање телади, али тек након научно доказане ефикасности терапије и валидације терапијског протокола (*Häsler* и сар., 2008).

2.5. Дијагностика неоспорозе

У лабораторијској дијагностици инфекције *N. caninum* код говеда, како на нивоу јединке тако и на нивоу стада, детекција специфичних IgG антитела у серуму или млеку индиректним (серолошким) дијагностичким методима сматра се основном и најприступачнијом опцијом (*Ortega-Mora* и сар., 2006). Добијени резултати пружају податке о серопреваленци, о начину преношења инфекције; омогућавају праћење серостатуса у корелацији са појавом побачаја, и чине незаменљив део сероепизоотиолошког праћења ради осмишљавања и примењивања мера превенције. Предност серолошких дијагностичких метода је то што пружају податке о живој животињи. У сврху дијагностиковања акутне инфекције односно паразитемије користе се и молекуларни дијагностички методи – детекција ДНК паразита у крви и ћелијама беле крвне лозе (*Maley* и сар., 2003; *Macaldowie* и сар., 2004; *Okeoma* и сар., 2004; *Ferre* и сар., 2005; *Okeoma* и сар., 2005; *Yao* и сар., 2009), серуму (*McInnes* и сар., 2006), као и у млеку (*Moskwa* и сар., 2003) и колоструму (*Moskwa* и сар., 2007).

За дијагностику неоспорозе код абортираних фетуса, најбоља опција је детекција ДНК паразита у мозгу, затим срцу и јетри, и хистолошки налаз карактеристичних лезија (и евентуално самих паразита) у овим органима, уз паралелно испитивање серостатуса мајке и плода. Хистолошке лезије у мозгу су скоро патогномоничне, а манифестују се као енцефаломијелитис са мултифокалном несупуративном инфилтрацијом, са или без централне некрозе, најчешће праћеном хиперплазијом васкуларног ендотела; а поред енцефаломијелитиса, могу се установити и миокардитис и перипортални хепатитис (*Barr* и сар., 1990, 1991б; *Dubey* и *Lindsay*, 1996; *Wouda* и сар., 1997). Како се у патохистолошким испитивањима најчешће користе конвенционална бојења препарата (хематоксилин-еозин) која су неспецифична, сами паразити који су и иначе малобројни у ткивима ће се врло тешко уочити – потребно је пажљиво прегледати веома велики број препарата, што није довољно брзо за рутинску дијагностику. Зато се користе имунохистохемијски методи, којима се специфично боје и обележавају препарати и тиме директно детектују развојни облици паразита или њихов дебрис у испитиваним ткивима. Ипак, патохистолошка анализа уочених лезија чини саставни део дијагностичког протокола за побачаје изазване неоспорозом, с тим да не треба заборавити да је могуће и потпуно одсуство патохистолошких лезија у побаченом плоду. За детекцију паразита се у високо специјализованим лабораторијама такође примењује и биолошки оглед на имуносупримираним или *knock-out* (КО) мишевима, или гербилима (*Meriones unguiculatus*) (*Dubey* и *Lindsay*, 2000). Због неопходности коришћења ових посебно пријемчивих домаћина биолошки оглед није погодан за рутинску дијагностику, а највише и због тога што мали број паразита који је и иначе присутан у ткивима брзо пропада током аутолизе узорка (*Dubey*, 1999). Наравно, за коначну етиолошку дијагнозу неоспорозе као дефинитивног узрока побачаја, неопходно је резултате добијене различитим дијагностичким методима анализирати у светлу података о епизоотиолошкој ситуацији као и историје болести. С обзиром на изузетно ефикасну ендемичну ТПТ, *N. caninum* може бити детектована и у фетусима који угину услед других разлога, тј. и у случајевима када инфекција протозоом *N. caninum* није примарни узрок побачаја (*Dubey* и *Schares*, 2006).

Према томе да ли служе за детекцију самог паразита и његове ДНК, или за детекцију маркера инфекције *N. caninum* (специфичних антитела), лабораторијски дијагностички методи могу се поделити на директне и индиректне.

2.5.1. Директни методи

За дијагностику неоспорозе на основу присуства тахизоита у телесним течностима током фазе паразитемије, или тахизоита или ткивних циста у постељици и ткивима побачених фетуса и мртворођене или жртвоване телади примењују се следећи методи:

- налаз паразита у конвенционално или специфично (имунохистохемијски) бојеним хистолошким препаратима;
- изолација паразита на култури ћелија или ткива након вештачке дигестије суспектног биолошког материјала [ради засејавања на културу, ткивне цисте се морају разложити да би се ослободили брадизоити, али да се не би уништили и често присутни тахизоити, време дигестије мора бити ограничено на један сат а финална концентрација трипсина у раствору на максимално 0,25% (*Sharma* и *Dubey*, 1981)];
- изолација паразита биолошким огледом на гербилина или имуносупримираним мишевима парентерално инокулисаних добијеним дигестом, или перорално недигестованим хомогенатом (најчешће нервног) ткива;
- изолација паразита биолошким огледом на псима храњеним суспектним материјалом (примењује се само у истраживачке сврхе); и
- детекција ДНК паразита путем *PCR* – реакције ланчане полимеризације засноване на откривању репетитивних секвенци гена или региона гена специфичних за *N. caninum* (*pNc5*, *ITS1 rDNA*, *18S rDNA*), при чему се разликује више врста *PCR*-а у зависности од технике извођења: класични, *nested*, *seminested*, квантитативно-компетитивни, квантитативни/*real-time*, *in situ*.

Значајан помак у дијагностици неоспорозе направљен је крајем прошлог века, када су почели да се развијају и примењују различити методи молекуларне дијагностике, који су омогућили брзу, поуздану и високо осетљиву детекцију ДНК паразита чак и у аутолизираном материјалу. До скоро директни дијагностички метод избора био је примена имунохистохемијских техника за феталне мозгове и друга ткива (плућа, јетра, срце) (*Lindsay* и *Dubey*, 1989). Међутим, ове технике, иако високо специфичне (упркос извештају и о ниском степену укрштене реактивности са *T. gondii* – *van Maanen* и сар., 2004) нису довољно осетљиве за примену на аутолизираном материјалу. Показало се да су *PCR* методи, поред високе специфичности, и довољно осетљиви за детекцију ДНК *N. caninum* у материјалу из

абортираних и аутолизираних фетуса (Gottstein и сар., 1998; Baszler и сар., 1999; Sager и сар., 2001; Pereira-Bueno и с ар., 2003; van Maanen и сар., 2004; Medina и сар., 2006). Предност PCR метода је и способност да се и из великог узорка као што је на пример фетус телета амплификују веома мале количине ДНК, а могу се применити и на велики број различитих супстрата (серум, крв, ћелијски елементи крви, млеко, семе бикова, ткива фетуса, плодове овојнице, амнионска и цереброспинална течност; као и фецес сталних домаћина).

Већина PCR метода данас је заснована на откривању или ITS1 ("internal transcribed spacer 1") региона рДНК (Holmdahl и Mattsson, 1996), или репетитивних секвенци гена *pNc5*, специфичног за *N. caninum* (Kaufmann и сар., 1996; Müller и сар., 1996; Yamage и сар., 1996; Müller и сар., 2001). На основу *pNc5* гена дизајнирано је више парова прајмера (означених са Np1 – Np8, и Np21), од којих се најпогоднијим показао пар Np6 и Np21 (Yamage и сар., 1996) који је класичним PCR-ом детектовао један тахизоит у 2 mg можданог ткива. Овај PCR метод коришћен је у више студија (McAllister и сар., 1998; McGuire и сар., 1999; Dreier и сар., 1999; McAllister и сар., 1999; Sawada и сар., 2000; Spencer и сар., 2000; Basso и сар., 2001; Gondim и сар., 2001; Hill и сар., 2001; Kobayashi и сар., 2001; Koyama и сар., 2001; Edelhofer и сар., 2003; Moskwa и сар., 2003; Schatzberg и сар., 2003; Sreekumar и сар., 2003; Gondim и сар., 2004в; Huang и сар., 2004а, 2004б; Rodrigues и сар., 2004; Sreekumar и сар., 2004; Lemberger и сар., 2005; Meseck и сар., 2005). Прајмери Np6 и Np21 коришћени су и за *in situ* детекцију ДНК *N. caninum* у хистолошким препаратима (Löschenberger и сар., 2004). Многи истраживачи модификовали су ове прајмере (Bergeron и сар., 2001б), или развијали сопствене (Collantes-Fernández и сар., 2002) и примењивали их у квантитативним / *real-time PCR* методима (Ortega-Mora и сар., 2003; Caetano-da-Silva и сар., 2004; Ferre и сар., 2005). Модификовани прајмери Np6+ и Np21+ коришћени су у класичном PCR-у где су ампликони детектовани хибридизационом *ELISA* техником (Müller и сар., 1996), а осетљивост метода износила је 1-10 тахизоита по милиграму ткива. Овако модификовани прајмери примењени су у већини студија које су користиле молекуларне методе детекције *N. caninum* (Schares и сар., 1997; Dubey и сар., 1998; Gottstein и сар., 1998; Reichel и сар., 1998; Eperon и сар., 1999; Gottstein и сар., 1999; Liddell и сар., 1999а, 1999б, 1999в; Peters и сар., 2000; Dijkstra и сар., 2001б; Gottstein и сар., 2001; Müller и сар., 2001; Peters и сар., 2001б; Sager и сар., 2001; Söndgen и сар., 2001; Almería и сар., 2002; Hässig и Gottstein, 2002; Henning и сар., 2002; Pitel и сар., 2002; Šlapeta и сар., 2002; Hässig и сар., 2003; McGarry и сар., 2003; Ammann и сар., 2004; Dubey и сар., 2004; Okeoma и сар., 2004; van Maanen и сар., 2004; Schares и сар., 2005б; Hůrková и Modrý, 2006).

PCR у реалном времену (*qPCR* – "*quantitative / real-time PCR*"). Овај метод заснован је на реакцији ланчане полимеризације, али се детекција и мерење амплификованог продукта не врше на крају реакције као код класичних (конвенционалних) метода *PCR*-а, већ се и амплификација, и детекција и/или квантификација врше симултано, у реалном времену – у току одигравања саме реакције. Ампликони се могу детектовати на два начина: неспецифичним флуоресцирајућим бојама које имају својство интеркалације са било којим двоструким ланцем ДНК; или ДНК пробама – нуклеотидним секвенцама специфичним за циљани микроорганизам, обележеним флуоресцентним бојама. Мерење флуоресцентног сигнала догађа се на крају сваког циклуса амплификације, и његова јачина је управо сразмерна количини ДНК која се полимеризује у узорку, што омогућава и њену квантификацију.

Сви методи *PCR*-а у реалном времену који се данас употребљавају за дијагностику *N. caninum* базирају се на детекцији репетитивних секвенци *pNc5* гена, а први који се заснивао на коришћењу неспецифичне флуоресцирајуће *SYBR Green I* боје су развили и стандардизовали *Collantes-Fernández* и сарадници (2002); применљивост овог метода потврђена је на узорцима мозга абортираних бовиних фетуса (детектовано је 2,9-26,6 тахизоита по милиграму ткива) као и експериментално инфицираних мишева. Овај метод може се користити и за квантификацију паразита у ткивима фетуса побачених у различитим периодима гравидитета (*Collantes-Fernández* и сар., 2006). Метод који се заснивао на коришћењу система специфичне двојне флуоресцирајуће хибридизационе пробе развили су *Müller* и сарадници (2002), за детекцију тахизоита *N. caninum* у култури ткива (*Vonlaufen* и сар., 2002), а користио се и за процену ефикасности вакцина и лекова (*Cannas* и сар., 2003а, 2003б; *Esposito* и сар., 2005).

Осим наведених проба, данас се за детекцију ампликона најчешће користе такозване *TaqMan*[®] хидролизујуће пробе које знатно повећавају специфичност квантитативног *PCR*. Пробе су на свом 5' крају обележене флуоресцирајућом бојом (флуорофором), а на 3' крају "пригушивачем" флуорофоре, који спречава емитовање флуоресцентног сигнала док год су два краја пробе у близини. Током *qPCR* реакције, у сваком циклусу амплификације *Taq* полимераза издужује прајмер и синтетиче нови ланац ДНК, и при томе од ланца егзонуклеазама одваја и разлаже пробу, са које се ослобађа флуорофора и удаљава од "пригушивача", и долази до појаве иреверзибилне флуоресценције коју *qPCR* апарат региструје у реалном времену.

2.5.2. Индиректни методи (серолошки тестови)

Ови методи заснивају се на могућности откривања и мерења продуката хуморалног имунског одговора – специфичних антитела различитих имуноглобулинских класа, првенствено IgG. Такође, свим наведеним тестовима уз одређене измене (употреба одговарајућег коњугата) могу се детектовати и IgM антитела, која се синтетишу већ у првим данима након инфекције, достижу максималне нивое за 2 недеље а затим веома брзо опадају и не могу се детектовати у серуму тестом аглутинације већ од четврте недеље (*De Marez* и сар., 1999). Њихово присуство указује на акутну инфекцију *N. caninum*. Антитела IgG класе синтетишу се касније – током друге недеље инфекције – и њихов ниво расте до највише 3-6 месеци након експерименталне инфекције (*Conrad* и сар., 1993; *Dubey* и сар., 1996; *Uggla* и сар., 1998; *De Marez* и сар., 1999; *Schares* и сар., 1999, 2000; *Williams* и сар., 2000; *Trees* и сар., 2002) када после фазе одржавања (тзв. "плато") почињу да опадају, задржавајући се (уз изузетке) на детектабилном нивоу током целог живота јединке. Поменути изузеци су најчешће последица појаве флукуације у нивоу антитела (*Conrad* и сар., 1993) која је честа током гравидитета (*Paré* и сар., 1997; *Dannatt*, 1997; *Stenlund* и сар., 1999; *Quintanilla-Gozalo* и сар., 2000; *Guy* и сар., 2001; *Fioretti* и сар., 2003), у време побачаја (*Wouda* и сар., 1998a; *Schares* и сар., 1999; *Guy* и сар., 2001) или након тељења (*Stenlund* и сар., 1999), када у случају пада нивоа антитела испод прага осетљивости појединих тестова долази до појаве лажно негативних резултата (*Dannatt*, 1997; *Wouda* и сар., 1998a; *Dijkstra* и сар., 2003). Интересантно је да се, као што је већ наведено, за датирање настанка инфекције код говеда користи такозвани тест авидитета, који се заснива на поређењу концентрације специфичних IgG антитела у серуму пре и после додавања урее. Принципи теста заснован је на способности урее да лакше разлаже везе антиген-антитело код недавно (до ≈ 2 месеца) настале инфекције, када IgG антитела имају слабији афинитет ("низак авидитет") за везивање са антигеном. Са преласком инфекције у хроничитет, ове везе јачају, тј. авидитет расте и постаје "висок", практично код свих јединки након 6 месеци од настанка инфекције. Данас се у ове сврхе најчешће користе *ELISA* индиректни тест авидитета (*Björkman* и сар., 1999) и имуноблот тест авидитета (*Aguado-Martínez* и сар., 2005).

Принцип свих серолошких тестова је да реакцију везивања антигена са антителима учине видљивом и/или мерљивом, при чему се код различитих тестова користе специфични коњугати, док се неки тестови заснивају на директној реакцији антиген-антитело без употребе коњугата. Поред серума, поједини тестови користе се за детекцију специфичних антитела у млеку (*Björkman* и сар., 1997; *Chanlun* и сар.,

2002; Schares и сар., 2003, 2004а; Bartels и сар., 2005; Hůrková и сар., 2005; Schares и сар., 2005а; Frössling и сар., 2006; Varcasia и сар., 2006).

Директни аглутинациони тест (NAT – “neospora agglutination test”) представља аглутинациони *in-house* тест по методи Romand и сар. (1998). Пошто није *species* специфичан јер се заснива на принципу директне реакције везивања антигена и антитела (без присуства коњугата), има предност да је применљив на све животињске врсте. Као антиген користе се цели интактни формализовани тахизоити *N. caninum*. Тест је репродуцибилан, једноставан и лак за извођење.

Тест индиректне флуоресценције (IFAT – “indirect fluorescent antibody test”) се заснива се на флуоресцирању комплекса антигена и *antispecies* IgG антитела обележених флуоресцентном бојом у присуству антитела у серуму. Ограничења овог теста су потреба за специјалним микроскопом и *species* специфичним коњугатом, као и појава неспецифичних реакција услед присуства реуматоидног фактора и антинуклеусних антитела. Још важније, извођење овог теста захтева добру обученост и велико искуство оператора, а читање и тумачење резултата је увек веома субјективно. Ово је тест који је први пут примењен у дијагностици неоспорозе (Dubey и сар., 1988б), а и касније се често употребљавао (Conrad и сар., 1993; Trees и сар., 1994; Paré и сар., 1995б; Dubey и сар., 1996; Otter и сар., 1997а, 1997б; Atkinson и сар., 2000).

Ензимски имунотест (ELISA – “enzyme-linked immunoadsorbent assay”) се заснива на промени боје супстрата у зависности од присуства антитела у серуму или млеку. Јачина обојености читава се на фотометру као одређена оптичка густина раствора, а резултати се рачунају према вредности теста означеној као “cut-off” или граничној вредности. Предност овог теста је што се резултати могу објективно очитати, као и то што се може изводити аутоматизовано на специјалним апаратима што омогућава испитивање великог броја узорака одједном. Постоје два облика *ELISA* теста (индиректни и компетитивни); као и више подтипова у зависности од врсте антигена који се користи – *crude antigen*, *fixed tachyzoite*, *iscom*, *recombinant protein*, *antigen capture* (Björkman и Uggla, 1999). Применљивост *ELISA* теста за дијагностику неоспорозе потврђена је у многобројним истраживањима (Paré и сар., 1995а; Baszler и сар., 1996; Lally и сар., 1996; Björkman и сар., 1997; Jenkins и сар., 1997; Williams и сар., 1997; Osawa и сар., 1998; Wouda и сар., 1998а; Williams и сар., 1999; Schares и сар., 2000; Baszler и сар., 2001; Ahn и сар., 2003; Álvarez-García и сар., 2003; Chahan и сар., 2003; Jenkins и сар., 2005).

Имуноблот (*IB* – “*immunoblot*” или *WB* – “*Western blot*”) је тест сложене методологије који се не примењује у рутинској дијагностици, а представља раздвајање протеинских фракција тахизоита *N. caninum* електрофорезом на полиакриламидном гелу, њихово преношење ("блотоваче") на нитроцелулозни папир/стрипове, и затим инкубацију ових антигенских стрипова са испитиваним серумом, а касније и са пероксидазом коњугованим *antispecies* имуноглобулином. Додавањем супстрата на стрипове, места везивања специфичних антитела за претходно нанете протеинске фракције антигена постају видљива. Приликом читања резултата теста, позитивним се сматрају они серуми код којих је до везивања антитела на стриповима дошло са бар два од пет дефинисаних имунодоминатних антигена ("*IDA*") *N. caninum*, релативне молекулске масе од 17-19, 29, 30, 33 или 37 kDa (*Björkman* и сар., 2007). Примена овог теста високе осетљивости и специфичности побољшава прецизност серолошке дијагностике и може употпунити резултате добијене стандардним тестовима (*Schares* и сар., 1998; *Söndgen* и сар., 2001).

III ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Адекватна стратегија за сагледавање статуса неоспорозе говеда у Србији, као и за евентуалну превенцију инфекције, обољења, и последичног економског губитка, мора бити заснована на валидним епизоотиолошким подацима. Стога је општи циљ овог рада обезбеђивање сероепизоотиолошких података о неоспорози говеда у Србији. Такође, ради што ефикасније дијагностике обољења, а у складу са најновијим стандардима који се примењују у савременим ветеринарским дијагностичким центрима у свету, један од циљева рада био је и увођење молекуларних метода у дијагностику неоспорозе. Конкретно, истраживања обухваћена овим радом имају за циљ:

- одређивање преваленце инфекције паразитом *Neospora caninum* код говеда у Србији;
- утврђивање епизоотиолошких фактора који утичу на настанак инфекције;
- сагледавање могућности примене мера превенције; и
- оптимизацију метода молекуларне дијагностике овог обољења и сагледавање могућности примене молекуларних метода у дијагностици неоспорозе.

У складу са циљевима истраживања формулисани су и одређени следећи задаци рада:

- 1) доказивање присуства IgG антитела специфичних за *N. caninum* у серумима говеда помоћу серолошког *screening* компетитивног имуноензимског теста (*cELISA*);
- 2) испитивање повезаности резултата серолошких испитивања са основним епизоотиолошким параметрима, како зоографским, тако и зоотехничким и зоохигијенским чиниоцима који могу бити од значаја за преношење инфекције; и
- 3) оптимизација метода *PCR*-а у реалном времену на узорцима крви и крвних елемената.

IV МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Ова Теза обухватила је испитивање преваленце инфекције *N. caninum* код говеда у Србији, утврђивање епизоотиолошких фактора од утицаја на инфекцију овим паразитом, као и увођење и оптимизацију молекуларног метода *PCR* у реалном времену (*real-time PCR*) у дијагностику овог обољења.

4.1. Испитивано подручје

Србија без Косова и Метохије простире се на 77512 квадратних километара површине. За потребе овог истраживања, територија Србије је на основу климатских и геолошких карактеристика подељена на четири региона: северни, западни, централно-источни, и Београд са околином (Слика 4). Северни регион – војвођанска плодна равница – има типично континенталну климу са хладном зимом и топлим летом, са равномерно распоређеном просечном количином падавина до 800 mm/годишње. У брдовито-планинском централно-источном и западном региону влада нешто блажа континентална клима. Западни регион нема великих речних сливова, а просечна годишња количина падавина износи 1200–2000 mm. Нешто мања количина падавина (до 800 mm/годишње) карактерише централно-источни регион, који захвата слив Велике Мораве са притокама. Београд са околином обухвата територију свих општина које административно припадају главном граду. Иако се налази на подручју где влада континентална клима, има специфичну микроклиму услед утицаја густе насељености и високе индустријализованости средине. На основу просечне годишње количине падавина, испитивано подручје класификовано је у две категорије – подручје ≤ 800 mm, и подручје ≥ 1200 mm падавина годишње.



Слика 4. Мапа поделе Србије на испитиване регионе: 1 – северни регион; 2 – западни регион; 3 – централно-источни регион; и 4 – Београд са околином.

4.2. Испитиване животиње

Укупни испитани узорак чинило је 1496 крава старости ≥ 24 месеца. Величина узорка валидног за статистичку обраду израчуната је на основу очекиване стопе инфекције, претпостављене из резултата пилот истраживања (Klun и сар., 2008). У овом истраживању на 350 крава из целе Србије утврђена је серопреваленца од 8,6%. Узорци су одабрани методом случајног узорка, стратификовани према 12 епизоотиолошких подручја (тј. подручја на којима епизоотиолошки надзор врше надлежни Ветеринарски специјалистички институти) у групе пропорционалне величине, и тако да већина општина у датом подручју буде заступљена. Величина узорка је израчуната по *Thrusfield-у* (2005). За ниво поверења од 95%, и за ниво од 5% апсолутне тачности, према очекиваној преваленци од 8,6%, колико је показало пилот истраживање (Klun et al., 2008), минималан узорак је $n=120$, а узимајући у обзир и број стратума (12×120), $n=1440$. На основу пописаног броја крава током 2008-2011. године (Статистички годишњаци Р Србије, РСЗ), планирана величина узорка износи приближно 0,25% укупне популације крава у Србији.

4.3. Испитивани материјал

Материјал обухвата узорке серума крава пореклом из свих 12 епизоотиолошких подручја (серуми узорковани ради испитивања по Програму мера здравствене заштите животиња, из банака серума надлежних Ветеринарских специјалистичких института), као и узорке крви (крв узоркована од стране ординирајућих ветеринара за потребе фарме ради израде метаболичког профила или провере општег здравственог стања крава, на неколико одабраних већих фарми).

4.3.1 Узорци крви/серума

Узорци су прикупљани у току два периода: април 2008. – април 2010., и јун 2012. – фебруар 2013. године. Од сваке од 1496 јединки узет је по један узорак крви (серума), а код 94 од њих по два (са и без додатка антикоагуланса). Узорци крви 160 говеда сакупљани су у приватним домаћинствима и на фармама. Узорци серума 1336 говеда добијени су током редовног годишњег узорковања ради испитивања на бруцелозу (из банке серума). Сви узорци су истог дана/одмах након узорковања транспортовани у ручном фрижидеру (+8°C) до лабораторије Центра за паразитске зоонозе Института за медицинска истраживања у Београду. Крв је центрифугована 20 минута на 2000 обртаја у минуту, а издвојени серуми су замрзавани, и чувани на -20°C до даљих испитивања.

4.3.1.1 Узорци крви са антикоагулансом (EDTA-K2)

Узорци пуне крви са антикоагулансом прикупљани су само у току периода јун 2012. – фебруар 2013. године. Од сваке од 94 јединке узет је по један узорак крви који је истог дана/одмах након узорковања транспортован у ручном фрижидеру (+8°C) до лабораторије Центра за паразитске зоонозе Института за медицинска истраживања у Београду. Узорци су одмах по допремању у лабораторију обрађивани методом *Ficoll* + натријум диатризоат градијента, ради издвајања моноклеарних ћелија.

4.4 Епизоотиолошки подаци

Узорковање крви било је праћено прикупљањем података о зоографским чиниоцима, као и зоотехничким и зоохигијенским условима. Када је крв узоркована од животиња на фармама и у приватним домаћинствима, подаци су уписивани у наменски сачињене упитнике на лицу места, а за серуме из банке серума, прво је утврђено порекло животиња а упитници накнадно попуњавани на фармама са којих су животиње потицале.

Осим зоографских података, упитник је садржавао и питања која се односе на зоотехничке и зоохигијенске услове, тј. величина стада, доминантно заступљена раса, начин гајења, начин држања у штали, употреба силаже у исхрани, порекло грла за ремонт стада, присуство и број паса, као и појава побачаја у стаду.

Величина стада дефинисана је као мала ($n \leq 10$) и велика (више од 100 говеда), што је одраз постојања малих сеоских домаћинстава као и великих фарми.

Према раси која је доминантно присутна у датом стаду, извршена је подела на четири категорије: сименталску расу и домаће говече у типу сименталца; холштајн-фризијску; бушу и друга мрко-сива говеда; и на 'мешано стадо' (у случајевима где се није могла утврдити доминантност, и односи се на стада где се подједнако гаје сименталска и холштајн-фризијска раса говеда).

Начин држања говеда у штали био је 'на вез', слободно држање (у мањим или већим боксовима/халама), и комбинација ова два система за различите производне категорије говеда.

Категорије за начин гајења говеда биле су држање само у штали, затим у штали са коришћењем отвореног земљаног односно бетонског испуста, и у штали уз редовну или повремену дневну испашу.

Говеда (фарме) су подељена на основу коришћења силаже у исхрани (не/да), као и на основу тога да ли се замена грла (ремонт стада) врши из спољних извора (не/да).

Према присуству и броју паса одређене су две категорије: два пса или мање; и више од два пса на фарми.

На основу појаве побачаја у стаду извршена је подела на три категорије. У првој нису забележени побачаји; у другој су побачаји пријављени у току текуће године; а у трећој су власници пријавили побачаје у стаду, али не у последњих пет година.

4.5. Серолошка испитивања

Доказивање *N. caninum* специфичних антитела је на свих 1496 узорак обављено комерцијалним компетитивним *ELISA* тестом (*cELISA*).

4.5.1. Компетитивни *ELISA* тест

Присуство IgG антитела специфичних за *N. caninum* у серуму крава доказивано је компетитивним *ELISA* тестом (*cELISA*), комерцијализованом и валидираном према резултатима *IFAT* теста пре двадесетак година, и то на материјалу из стада са забележеним побачајима. Насупрот овоме, већина наших узорака потицала је из стада где побачаји нису забележени. Како је у најновијим студијама показано да је праг позитивности који даје произвођач сувише низак (Álvarez-García и сар., 2013), на основу анализе хистограма дистрибуције и *scatter* графика добијених резултата за свих 1496 јединки, за нашу испитивану популацију праг позитивности је подигнут са 30 на 40% инхибиције, чиме је избегнуто добијање већег броја лажно позитивних резултата.

Комерцијални компетитивни имуносорбентни *cELISA* тест, намењен за доказивање *N. caninum* антитела у серуму говеда, извођен је према упутству произвођача (*VMRD Inc., Pullman, Wa, USA*). Ово је донедавно био једини компетитивни *ELISA* тест за детекцију *N. caninum*-специфичних IgG антитела на тржишту. У овом тесту долази до индиректне реакције антиген-антитело, која се видљивом чини уз помоћ хромогеног ензима. Тест се изводи на микротитарским стриповима (8x12) са бунарчићима са равним дном, пресвученим антигеном (протеин мембране *N. caninum* – *surface protein Ag GP65*). У тесту се користе и моноклонска антитела на GP65, обележена *HRP* пероксидазом. Уколико у испитиваном серуму постоје *N. caninum*-специфична IgG антитела, она ће се везати на антиген на стриповима, и спречити везивање коњугата са антигеном. Невезани коњугат уклања се испирањем, те пероксидаза није присутна да промени боју супстрата. Уколико специфичних антитела у серуму нема, коњугат се везује за антиген, и након додавања супстрата долази до промене боје – појачава се интензитет боје односно оптичка густина.

По 50 µL контролних и испитиваних серума (неразблажених) пипетирано је у бунарчиће микротитарских плоча превучених инактивисаним антигеном. Након инкубације од 60 минута на собној температури и испирања, додато је 50 µL пероксидазом обележеног моноклонског антитела на *N. caninum*. Након инкубације од 20 минута и испирања, додато је 50 µL раствора хромогена (ензимског супстрата),

а после 20 минута и 50 µL раствора за заустављање реакције промене боје. Тест је извођен у дупликату. Читање је вршено на фотометру (*Multiscan EX, Thermo Electron Corporation*) на таласној дужини од 620 nm. Проценат инхибиције узорака израчунат је према формули

$$100 - \frac{\text{ОГ}_{\text{узорка}} \times 100}{\text{ОГ}_{\text{негативне контроле (средња вредност)}}$$

Резултати су сматрани валидним ако је:

- а) $0,30 \leq \text{средња вредност ОГ негативних контрола} < 2,50$, и
- б) $\text{средња вредност позитивних контрола} \geq 40\%$ инхибиције.

4.6. Молекуларна дијагностика

Доказивање присуства ДНК протозое *Neospora caninum* у узорцима обављено је *real-time PCR* техником („*PCR* у реалном времену“).

4.6.1. Припрема узорака

За молекуларну дијагностику припремане су две врсте узорака:

- лимфоцити и друге мононуклеарне (МН) ћелије (из узорака крви са антикоагулансом)
- коагулуми (из узорака крви без антикоагуланса)

4.6.1.1. Припрема узорака МН ћелија

Лимфоцити и друге мононуклеарне (МН) ћелије из узорака пуне крви издвајане су методом *Ficoll* + натријум диатризоат градијента (*Carson* и сар., 1975; *Hering* и сар., 1990), а коришћен је *Histopaque*[®] специфичне густине од 1.077 g/mL, *Sigma-Aldrich, Inc.*

Укратко, у стерилне епрувете (̄ 10 mL) декантовано је по 3 mL *Histopaque*[®] раствора. Затим је по 3 mL пуне крви пажљиво сипано низ зид епрувете, да се формира додирна површина две течности. Епрувете су центрифугиране током 30 минута на 1600 обртаја/минут. Током центрифугирања, елементи крви се према својој специфичној тежини раслојавају по висини епрувете, и ствара се јасно видљива фаза бело-облачастог материјала која садржи мононуклеарне ћелије крви.

Пипетом се аспирира (од пар mm испод до изнад фазе), и пребаци у нову епрувету. Затим се током 2-3 центрифугирања испира добијени садржај, по 10 минута на 1200 обртаја/минут, садржај ($\approx 0,5$ mL) пребаци у микрокивету, центрифугира 15 секунди на 5000 обртаја/минут, вишак супернатанта одбаци и финална запремина од 200 μ L чува на -20°C до екстракције.

4.6.1.2. Припрема узорака коагулума

Ради поређења осетљивости *PCR* метода из различитог материјала, након издвајања серума из узорака пуне крви (без антикоагуланса), коагулум је стерилним инсулинским шприцом хомогенизован са резидуалним серумом, и 200 μ L овог материјала је издвајано за екстракцију.

4.6.2. Екстракција

Екстракција ДНК из материјала (МН ћелија, коагулисане крви), заснована на издвајању ДНК/РНК на силика-гел мембрани, рађена је на *GeneJet* киту (*Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.*), према упутству произвођача за екстракцију нуклеинских киселина из крви и крвних елемената, уз малу модификацију у последњем кораку (употреба воде уместо пуферованог испирача).

Укратко, испитиваном узорку прво је додавано 400 μ L раствора за лизу и 20 μ L протеиназе K, и затим добро промешано на вортексу. Лизирање је рађено на температури од 56°C , на мешалици са грејањем (термомиксер), током 10 до 20 минута, односно до потпуног лизирања узорка. Затим је лизираним узорку додавано 200 μ L 96% етил-алкохола, добро измешано 15 секунди на вортекс мешалици, и целокупан садржај пипетиран у колонице са силика-гел мембраном. Принцип метода је да се ДНК задржи на мембрани колонице, а остаци ћелија и други (не ДНК) садржај са мембране испере специјалним пуферима, и профилтриран садржај одбаци. Колонице су центрифуговане 1 минут на 6000 обртаја/минут, а филтрат одбачен. Прво испирање вршено је са 500 μ L пуферованог испирача I на 8000 обртаја/минут током једног минута, а затим са 500 μ L пуферованог испирача II на 13000 обртаја/минут током три минута. По потреби, вршено је и додатно центрифуговање на 13000 обртаја/минут током једног минута, ради избацавања мање количине пуфера заосталог на мембрани. Затим се приступало испирању садржаја ДНК са мембране, додавањем у колоницу 75 μ L воде ослобођене нуклеаза. Након инкубације од два минута на собној температури, колонице су центрифуговане на 8000 обртаја/минут током једног минута; овај корак испирања мембране понављан је још једном, ради издвајања што веће количине ДНК. На крају

описаног поступка екстракције, од сваког узорка добијано је 150 µL елуата ДНК, који је до постављања *PCR* реакције чуван на -20°C .

4.6.3. *PCR* у реалном времену – *real-time PCR*

Амплификација и детекција *N. caninum* Nc5 репетитивног елемента (*GenBank* приступни број X84238; Слика 5) *real-time PCR* техником према протоколу *Constantin* и сар. (2011), вршена је на *Mastercycler ep realplex⁴* апарату (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*), коришћењем универзалног *Taq*-полимераза мастер микса са урацил *N*-гликозилазом (*Maxima[®] Probe qPCR Master Mix (2X)*, *Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.*). Коришћени метод *PCR*-а у реалном времену (иначе првобитно развијен на *SYBR Green* платформи) (*Collantes-Fernandez* и сар., 2002) прилагођен је *TaqMan[®]* платформи (5' нуклеаза метод); поређењем са првонаведеним методом извршена је и његова провера и валидација (*Constantin* и сар., 2011).

```

1 acgggttgctg gggcaggatg gacgaagtgg caggagcagg atgacaacgg gttttggtga
61 ggcttcatgc gaggtctcgc gatgccgtcc tcacgcatga ggccggagaa tgagagcgat
121 ttccagggtgt ctcccttctg agtcgggttg tggttggttg tgaaggacag gggtgggtat
181 cgcgggtggag ctgggttgct gtgctcgtg ggacttcagg agcggcatcg gaggacatcg
241 ctccactgact ggaggcacgc tgaacaccgt atgtcgtaaa tcggagttgc ttctatgttg
301 cattcctctt gcgaagcatt gttggtggag cagcgagcg gtggttggtg gaggcggcag
361 cagcgaggga ggtgtggttg aggtatagga gagagaattt cgtggaaggg cggaaatggaa
421 ggaattgagt ggaggcaggg gggagggtgt gcgtccaatc ctgtaacgtg ttgctctgct
481 gacgtgtcgt tggtgggccc agcctgcggc agcaaggctc ctttttgttt gtgactatag
541 tgtgtgaacg ggtgaaccga gggagttggt agcggtgaga ggtgggatac gtgggtttgtg
601 gttagtcatt cgtcacgttg aaatcagcct gcgtcagggt gaggacagtg tgtcaatgat
661 acttatcgag agttcagtgt tctgtgttga ggcaacaccg gcggcactga tgacggggga
721 gattattcat agggagcaag cggacgaggg aaggggcaga agacgtaggt tgactggcga
781 gtgccccga ggagacgaga atgagtttgc ttgcatttg gaggcacaag aaagcatcca
841 ggtatgggag ccaataaagg gaaccgtggt atagactgga tgcccgtcga ggtaggtggt
901 caatgtcgac actgctggcg aacggagagc gcctgcgggg aggcgacacg tctccggtag
961 agtttttga atcgtgggcc gagtgtaacg aggtcgatgt gaacgggcag gcggaagagc
1021 ggcctggtag atgggtttgc agagcgttgt gcacttgcgt gtttaggtga cagatgtgag
1081 tttttttatc attgctgttg agacgtgtc cagcgttagc atacgccgca caaaaggaat
1141 atcatgaagg aatcggattc gtggtggcag tgatgaatgg gtaggagta gaggtgagtg
1201 acctg

```

Слика 5: Нуклеотидна секвенца *pNc5* региона *N. caninum* (*GenBank* приступни број X84238, верзија .1). Прајмери означени црвеним, проба плавим словима.

Циљани (*target*) *pNc5* репетитивни елемент умножаван је уз помоћ прајмера NeoF (GTG CTC GCT GGG ACT TCA G) и NeoR (CGA TTT ACG ACA TAC GGT GTT CA), и детектован *Taqman[®]* пробом NeoPr1: FAM - CAT CGG AGG ACA TCG CTC ACT GAC TG – BHQ1. Очекивана дужина секвенце продукта добијеног овим умножавањем је 83 бп (базних парова), што је проверено на *BLAST* интерактивном алату као и на агар дифузионом гелу. У смеси за *qPCR* реакцију иницијално је у финалној

запремини од 25 μL концентрација прајмера износила 900 nM, а пробе 200 nM; коришћено је 3 μL ДНК темплата. Циклус амплификације програмиран је на следећи начин: 10 минута на 95°C (ради активације ензима и евентуалног уништавања контаминаната), 45 циклуса од по 15 секунди на 95°C и 60 секунди на 60°C. Позитивним су сматрани сви резултати до 40 циклуса (*Ct-values*). Узорци ДНК поново су тестирани уз додатак 8 μg албумина говеђег серума (*BSA – Boehringer*) да би се предупредило евентуално дејство инхибитора реакције (*Comey* и сар., 1994; *Villena* и сар., 2004).

Првобитно предложене концентрације прајмера и пробе смањене су на 675 и 150 nM (Табела 1) након вишекратних провера и оптимизоване на 20 μL финалне запремине (17 μL основне смесе + 3 μL темплата), што је повећало осетљивост реакције за 3-4 циклуса. Сви узорци рађени су у дупликату. Свака реакција укључивала је позитивну контролу (ДНК *Nc*), негативне контроле (вода, и узорци пореклом од серонегативних јединки које су потицале са серонегативних фарми). Позитивна ДНК контрола добијена је љубазношћу др Гереона Шареса (*Gereon Schares*) из Института за епидемиологију немачког Савезног истраживачког института за здравствену заштиту животиња Фридрих Лефлер на острву Римс (*Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie, Greifswald - Insel Riems*).

Табела 1. Спецификација смесе (по узорку) за *qPCR* детекцију ДНК *N. caninum*

Основна смеша	Запремина (μL)	Фин. конц.
<i>Taq</i> -полимераза мастер микс	10	
Проба <i>NeoPr1</i> (10 pmol/ μL)	0,3	150 nM
Прајмер <i>NeoF</i> (45 pmol/ μL)	0,3	675 nM
Прајмер <i>NeoR</i> (45 pmol/ μL)	0,3	675 nM
MgCl ₂ (50 mM)	1	2,5 mM
Вода	5,1	
Укупно	17	

Провера очекиване дужине амплификоване секвенце вршена је електрофорезом свих *qPCR* продуката (укључујући и позитивну и негативне контроле) на 3% агар дифузионом гелу, на 90 V током 45 до 60 минута. Гел је прављен у 100 mL пуфера TAE 1X (*Tris-Acetate-EDTA*) са додатком 3 g агарозе и обојен са 3 μL етидијум бромидом (10mg/mL). Пре наношења узорака на гел, на

парафилму је по 10 μL *qPCR* продукта помешано са 2 μL "DNA loading dye" (*Fermentas*); а ради одређивања величине продукта на гел је наношено и 2 μL маркера "50bp ladder" (*Fermentas*). Гелови су очитавани, фотографисани и анализирани на УВ трансилуминатору са камером и софтвером (*Gel Documentation system/CCD, Biometra*).

4.7. Статистичка обрада резултата

4.7.1. Серопреваленца *N. caninum* специфичних антитела

Утицај свих појединачних испитиваних епизоотиолошких фактора као независно променљивих варијабли на серопреваленцу *N. caninum* (на индивидуалном нивоу) и на присуство инфекције *N. caninum* (на нивоу фарме) као зависно променљивих варијабли испитан је униваријантном логистичком регресијом, и фактори значајни на нивоу од $P \leq 0,25$ (*Mickey и Greenland, 1989*) са 95% ИП тестирани су на евентуалну колинеарност и затим укључени у моделе мултиваријантне логистичке регресије. Колинеарност је утврђивана на основу вредности Крамеровог *V*-коефицијента ("*Cramer's V*") као мере корелације између два по претпоставци независна фактора (0–0,33 слаба, 0,34–0,67 умерена и 0,67–1,00 јака корелација). Јака корелација између независних варијабли (фактора) може да омета тачно израчунавање регресионе једначине, па се у мултиваријантни модел укључује само варијабла са јачим статистичким ефектом, тј. већом Валд вредности (*Wald statistic*) добијеном у униваријантној логистичкој једначини, као и већом корелацијом у односу на зависну варијаблу.

Тачност финалних регресионих модела испитана је методом *Hosmer-Lemeshow*. За испитивани фактор "регион", за референтну категорију изабран је северни регион. За све друге испитиване факторе, за референтне категорије узимане су оне са највећим бројем посматраних случајева. Резултати мултиваријантних модела приказани су као кориговани односи вероватноћа – OR ("*odds ratio*") у границама 95% ИП. Границом статистичке значајности сматрана је вероватноћа од 5% ($P < 0,05$).

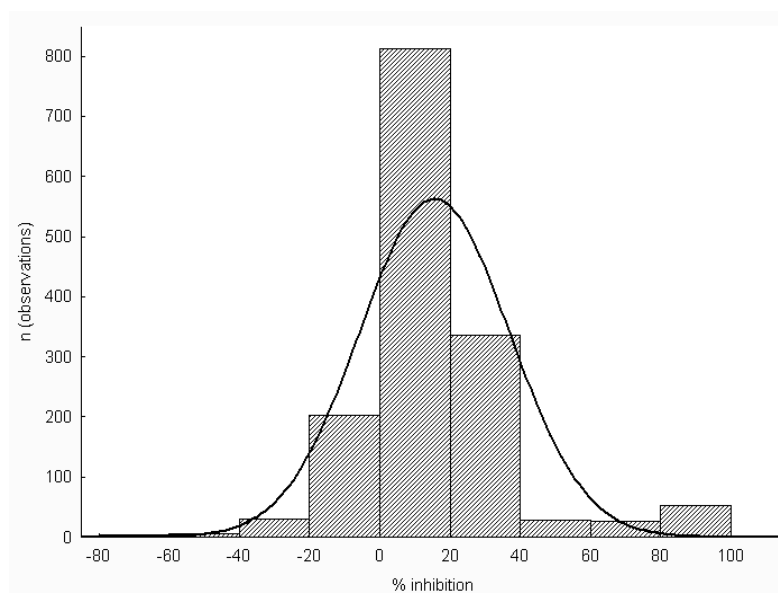
V РЕЗУЛТАТИ

Прво су приказани резултати испитивања преваленце инфекције и фактора ризика за инфекцију *N. caninum*, а затим и резултати оптимизације молекуларног дијагностичког метода.

5.1. Инфекција *N. caninum* код говеда у Србији

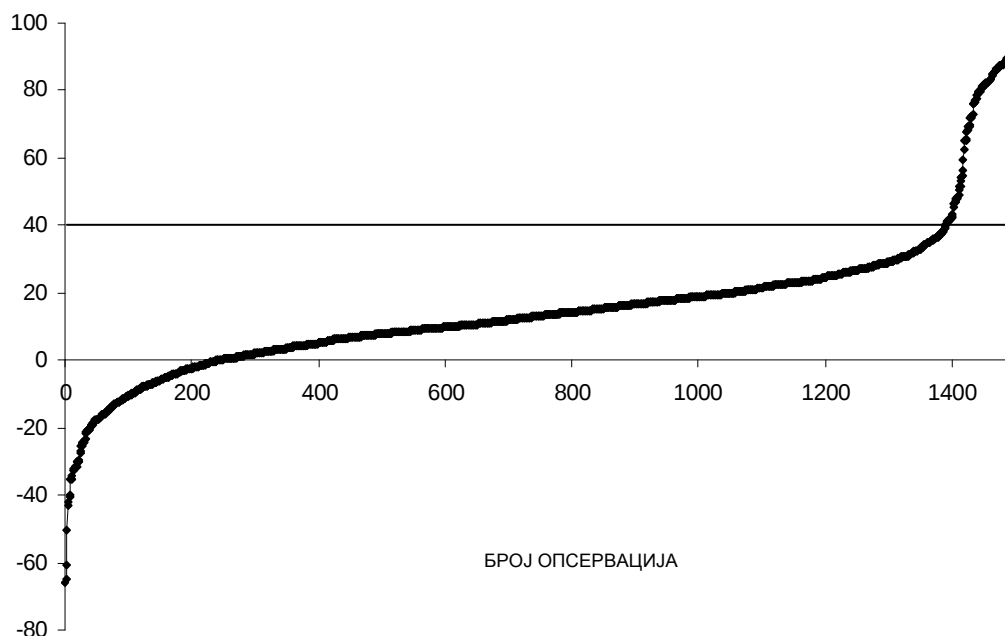
5.1.1. Преваленца и дистрибуција *N. caninum* специфичних антитела према степену инхибиције

Код говеда је утврђена стопа инфекције од 7,2% (108/1496), са вредностима степена инхибиције код серопозитивних јединки у распону од 40,3 – 91,8% ($\bar{x} = 71,9 \pm 17,1\%$), при чему је практично половина серопозитивних крава имала степен инхибиције од преко 80% ($Me = 79,9\%$). У целокупној серији испитаних јединки ($n=1496$) утврђена је бимодална расподела степена инхибиције (Графикон 1).



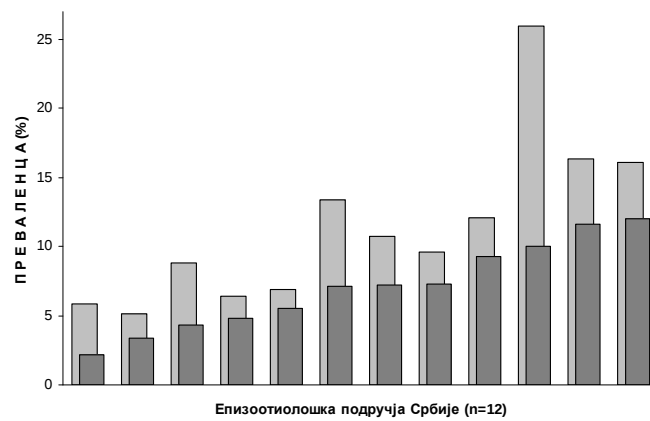
Графикон 1. Хистограм и крива нормализације резултата *cELISA* теста $n=1496$ серума према проценту инхибиције

На Графикону 1 уочава се благо наглашена бимодална дистрибуција резултата, а на Графику 2 уочава се јасан прелазак сигмоидне криве у стрм раст, тј. разграничење позитивних и негативних серума, и то при вредности степена инхибиције од 40%.



Графикон 2. Scatter график свих појединачних резултата *cELISA* теста (n=1496 серума) према проценту инхибиције (y-оса)

Присуство инфекције паразитом *N. caninum* утврђено је на 10,7% испитиваних фарми (86/800), у свих 12 епизоотиолошких подручја Србије. На наредном Графикону (3), приказан је степен прокужености инфекције паразитом *N. caninum* у различитим епизоотиолошким подручјима, који се кретао од 2,2 до 12% на нивоу јединке, односно 5,9 до 25,9% на нивоу фарми.



Графикон 3. Преваленца *N. caninum*-специфичних IgG антитела код крава (тамносиви) и проценат серопозитивних фарми (светлосиви стубићи) на 12 испитиваних подручја Србије

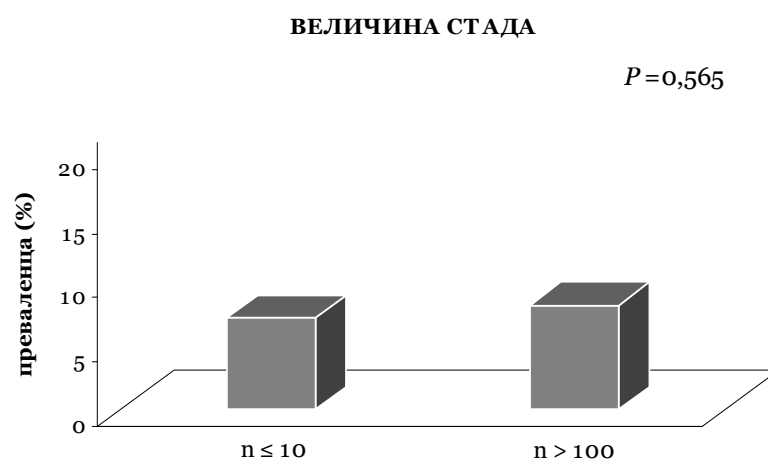
5.1.2. Утицај епизоотиолошких фактора на инфекцију паразитом *N. caninum* – индивидуални ниво

Карактеристике испитиване популације крава и резултати униваријантне логистичке регресије испитиваних епизоотиолошких фактора дати су у Табели 2.

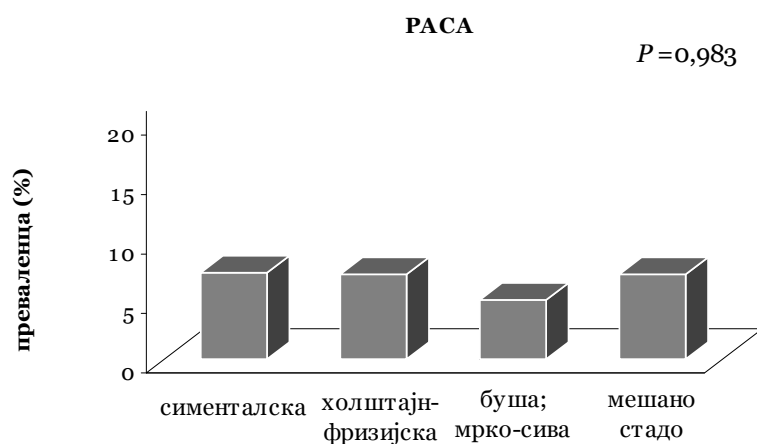
Табела 2. Налаз *N. caninum* специфичних антитела према испитиваним факторима популације крава (n=1496) и резултати униваријантне логистичке регресије (n – број животиња; ИП – интервал поверења; OR – odds ratio)

Фактор	n	Преваленца (%)	95% ИП	OR	95% ИП	P
Величина стада						
Мала (n≤10 говеда)	1275	7,1	6,3–7,8	1,00		0,565
Велика (n>100)	221	8,1	6,3–10,0	1,17	0,69–1,98	
Раса (претежно)						
Сименталска/ДГуТС	901	7,3	6,5–8,2	1,00		0,983
Холштајн-фризијска	449	7,1	5,9–8,3	0,97	0,63–1,50	
Буша (и мрка и сива г.)	20	5,0	0,1–9,9	0,67	0,09–5,05	
Мешано стадо	126	7,1	4,8–9,4	0,97	0,47–2,00	
Начин гајења						
Штала	853	6,4	5,6–7,3	1,00		0,301
Штала са испустом	224	9,4	7,4–11,3	1,50	0,89–2,54	
Штала и испаша	419	7,6	6,3–8,9	1,20	0,76–1,89	
Начин држања у штали						
Везни систем	1221	6,4	5,7–7,1	1,00		<0,001
Комбиновани систем	161	5,6	3,8–7,4	0,87	0,43–1,77	
Слободни систем	114	18,4	14,8–22,1	3,31	1,95–5,60	
Употреба силаже						
Не	1054	7,7	6,9–8,5	1,00		0,283
Да	442	6,1	5,0–7,2	0,78	0,50–1,23	
Замена грла споља						
Не	1095	7,5	6,7–8,3	1,00		0,506
Да	401	6,5	5,3–7,7	0,86	0,54–1,35	
Присуство и број паса						
≤2	1330	6,9	6,2–7,6	1,00		0,204
>2	166	9,6	7,3–11,9	1,43	0,82–2,51	
Побачаји у стаду						
Не	1171	6,8	6,1–7,6	1,00		0,537
Да, у текућој години	192	8,8	6,8–10,9	1,32	0,77–2,29	
Да, пре >5 година	133	8,3	5,9–10,7	1,23	0,364–2,37	
Количина падавина						
≤800 мм	1120	7,0	6,2–7,7	1,00		0,511
≥1200 мм	376	8,0	6,6–9,4	1,16	0,75–1,80	
Регион						
Северни	308	6,2	4,8–7,5	1,00		0,842
Западни	376	8,0	6,6–9,4	1,32	0,73–2,40	
Централно-источни	552	7,2	6,1–8,4	1,19	0,68–2,10	
Београд са околином	260	7,3	5,7–8,9	1,20	0,62–2,32	
УКУПНО	1496	7,2	6,6–7,9			

У даљем тексту, резултати униваријантне анализе графички су приказани по сваком испитиваном фактору појединачно.

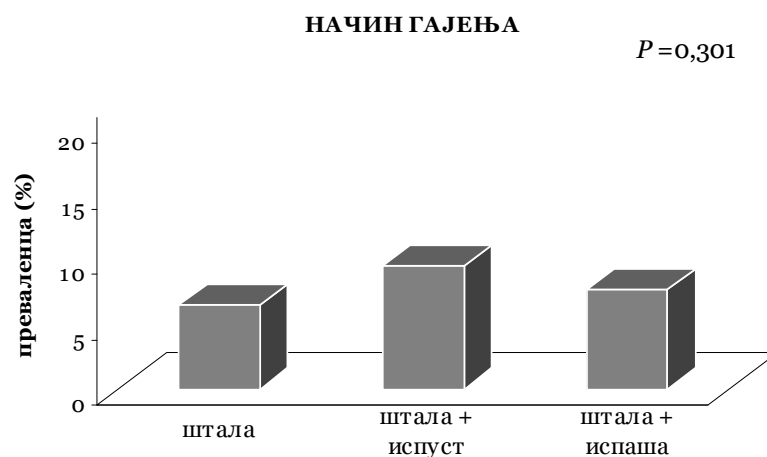


Графикон 4. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од величине стада



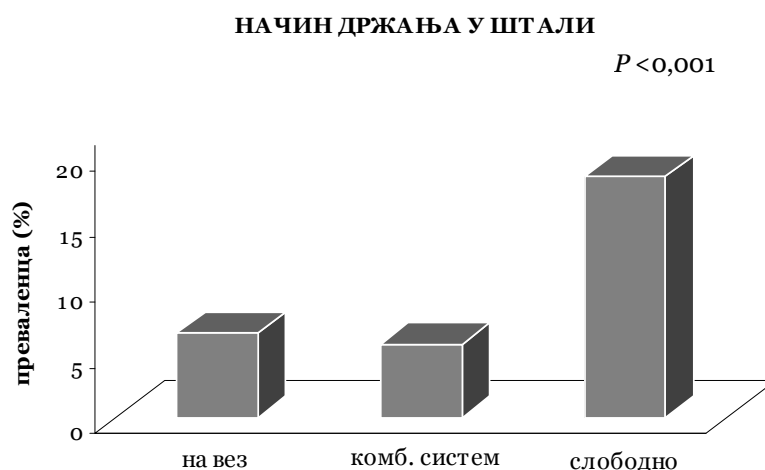
Графикон 5. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од расе говеда

Величина стада и раса говеда нису имали утицаја на преваленцу инфекције на индивидуалном нивоу (Графикони 4 и 5).



Графикон 6. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од начина гајења

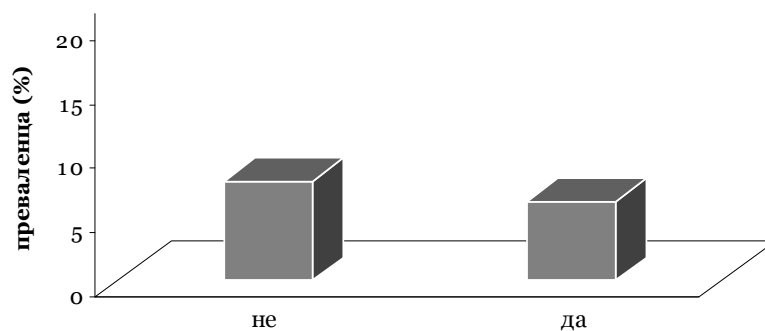
Начин гајења није имао утицаја на преваленцу инфекције индивидуалном нивоу (Графикон 6).



Графикон 7. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од начина држања у штали

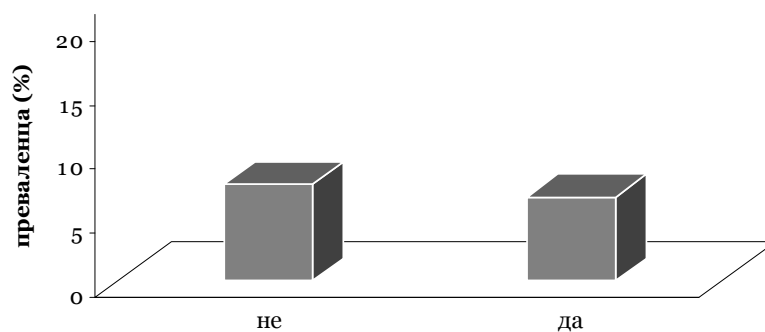
Показана је значајна разлика у преваленци инфекције на индивидуалном нивоу у зависности од начина држања говеда у штали (Графикон 7).

УПОТРЕБА СИЛАЖЕ

 $P=0,283$ 

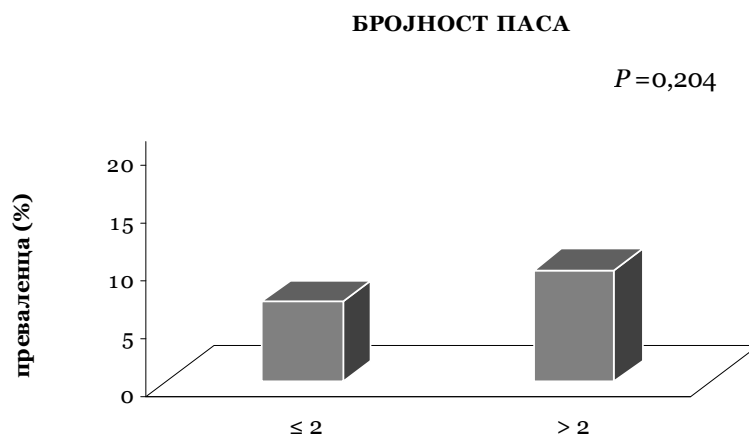
Графикон 8. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од употребе силаже у исхрани говеда

ЗАМЕНЕ СПОЉА

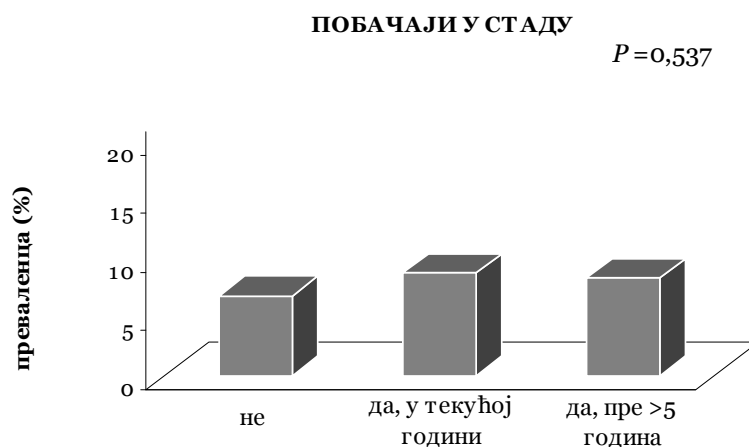
 $P=0,506$ 

Графикон 9. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од порекла грла за ремонт стада

Употреба силаже у исхрани и порекло грла за ремонт стада нису имали утицаја на преваленцу инфекције на индивидуалном нивоу (Графикони 8 и 9).

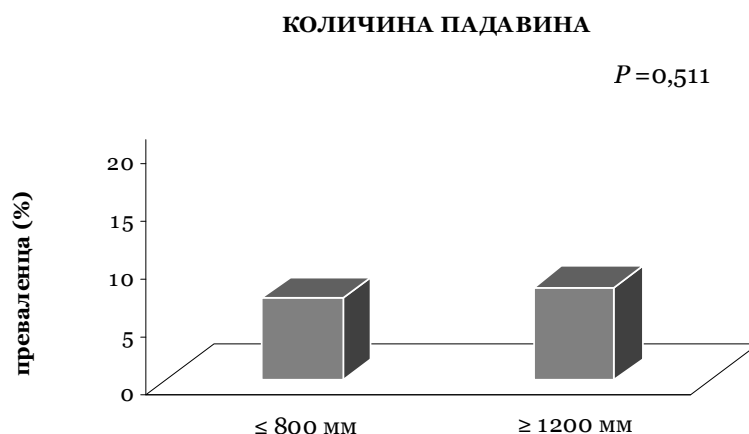


Графикон 10. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од присуства и бројности паса на фармама

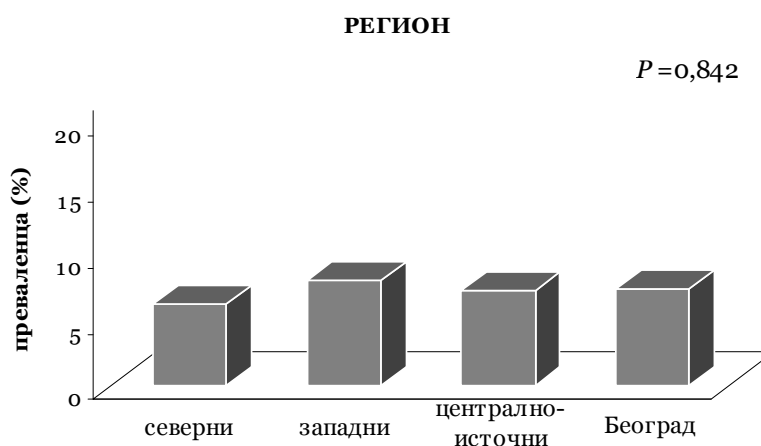


Графикон 11. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од појаве побачаја у стаду

Бројност паса имала је утицаја ($P \leq 0,25$) на преваленцу инфекције (Графикон 10); а насупрот овоме, појава побачаја у стаду као појединачни фактор није имала никаквог утицаја на преваленцу инфекције на индивидуалном нивоу (Графикон 11).



Графикон 12. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од просечне годишње количине падавина



Графикон 13. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од региона

Униваријантна анализа показала је да као појединачни фактори просечна годишња количина падавина (Графикон 12) и регион са кога су говеда потицала (Графикон 13) нису имали утицаја на преваленцу *N. caninum* инфекције на индивидуалном нивоу.

Из изложених резултата се види да су од свих испитиваних фактора у униваријантној анализи, са преваленцом инфекције *N. caninum* на индивидуалном нивоу били повезани начин држања у штали и бројност паса. Стога су ова два фактора укључена су у мултиваријантни модел логистичке регресије да би се утврдио њихов међусобни однос и евентуални независан утицај на преваленцу инфекције. Наиме, варијабле за које се у оваквом моделу покаже независан утицај представљају факторе ризика. Утврђено је да само начин држања у штали значајно и

независно утиче на преваленцу *N. caninum* инфекције (Табела 3). Говеда која су држана у шталама са слободним системом била су под преко три пута вишим ризиком да буду инфицирана од говеда која се држе у везном систему. Финални модел давао је веома висок степен тачности предвиђања (за 92,8% случајева/опсервација).

Табела 3. Фактор ризика за инфекцију паразитом *N. caninum* код говеда у Србији (мултиваријантна анализа)

Фактор	Кориговани OR	95% ИП	<i>P</i>
Начин држања у штали			
Везни систем	1,00		
Комбиновани систем	0,87	0,43–1,77	0,695
Слободни систем	3,31	1,95–5,60	<0,001

5.1.3. Утицај епизоотиолошких фактора на инфекцију паразитом *N. caninum* – ниво фарме

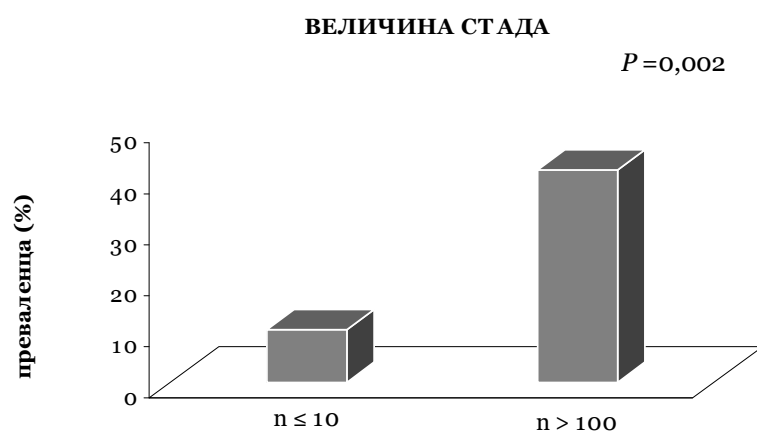
Испитано је и присуство инфекције на нивоу фарме, и карактеристике испитиваних 800 фарми и домаћинстава и резултати униваријантне логистичке регресије испитиваних епизоотиолошких фактора дати су у Табели 4.

Табела 4. Присуство инфекције *N. caninum* на испитиваним фармама (n=800) према испитиваним факторима и резултати униваријантне логистичке регресије (n – број фарми; ИП – интервал поверења; OR – odds ratio).

Фактор	n	Преваленца (%)*	95% ИП	OR	95% ИП	P
Величина стада						
Мала (n≤10 говеда)	788	10,3	9,2–11,4	1,00		0,002
Велика (n>100)	12	41,7	27,4–55,9	6,23	1,93–20,10	
Раса (претежно)						
Сименталска/ДГуТС	550	10,7	9,4–12,0	1,00		0,847
Холштајн-фризијска	149	12,1	9,4–14,7	1,14	0,65–2,01	
Буша (и мрка и сива г.)	17	5,9	0,2–11,6	0,52	0,07–4,00	
Мешано стадо	84	9,5	6,3–12,7	0,97	0,40–1,90	
Начин гајења						
Штала	531	9,2	8,0–10,5	1,00		0,003
Штала са испустом	25	32,0	22,7–41,3	4,63	1,90–11,27	
Штала и испаша	244	11,9	9,8–14,0	1,33	0,82–2,16	
Начин држања у штали						
Везни систем	745	9,4	8,3–10,5	1,00		< 0,001
Комбиновани систем	27	11,1	5,1–17,2	1,20	0,35–4,10	
Слободни систем	28	46,4	37,0–55,9	8,36	3,82–18,27	
Употреба силаже						
Не	665	10,8	9,6–12,0	1,00		0,876
Да	135	10,4	7,7–13,0	0,95	0,52–1,74	
Замена грла споља						
Не	658	11,4	10,2–12,36	1,00		0,206
Да	142	7,57	5,5–10,70	0,65	0,34–1,26	
Присуство и број паса						
≤2	764	10,9	9,7–12,0	1,00		0,633
>2	36	8,3	3,7–12,9	0,75	0,22–2,49	
Побачаји у стаду						
Не	716	9,9	8,8–11,0	1,00		0,068
Да, у текућој години	17	23,5	13,2–33,8	2,79	0,89–8,80	
Да, пре >5 година	67	16,4	11,9–20,9	1,78	0,89–3,56	
Количина падавина						
≤800 мм	593	9,9	8,7–11,2	1,00		0,217
≥1200 мм	207	13,0	10,7–15,4	1,36	0,83–2,21	
Регион						
Северни	150	11,3	8,7–13,9	1,00		0,589
Западни	207	13,0	10,7–15,4	1,17	0,61–2,24	
Централно-источни	370	9,5	7,9–11,0	0,82	0,44–1,51	
Београд са околином	73	9,6	6,1–13,0	0,83	0,33–2,10	
УКУПНО	800	10,7	9,7–11,8			

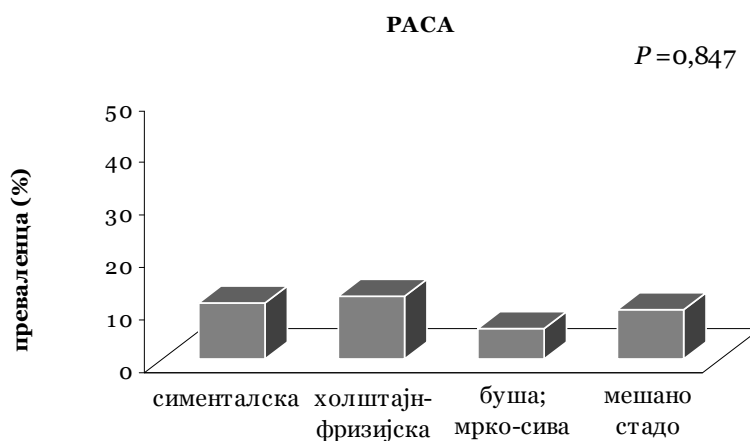
*Преваленца (%) се односи на проценат фарми где је установљено присуство бар једне серопозитивне јединке.

На следећим графиконима приказани су резултати униваријантне анализе по сваком испитиваном фактору.



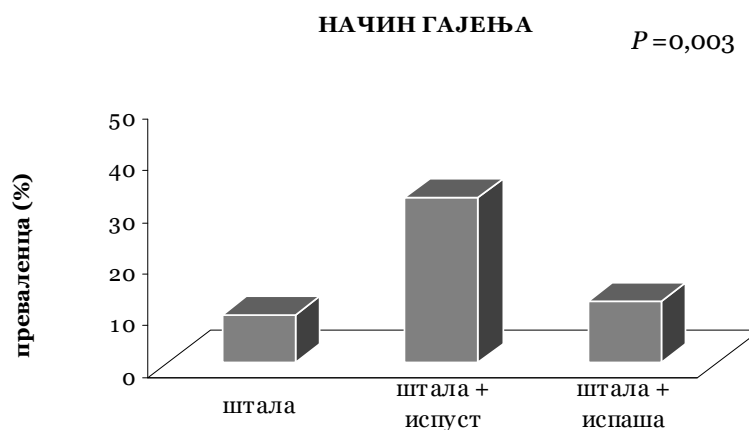
Графикон 14. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од величине стада

Величина стада значајно је утицала на присуство *N. caninum* инфекције на фармама говеда (Графикон 14).

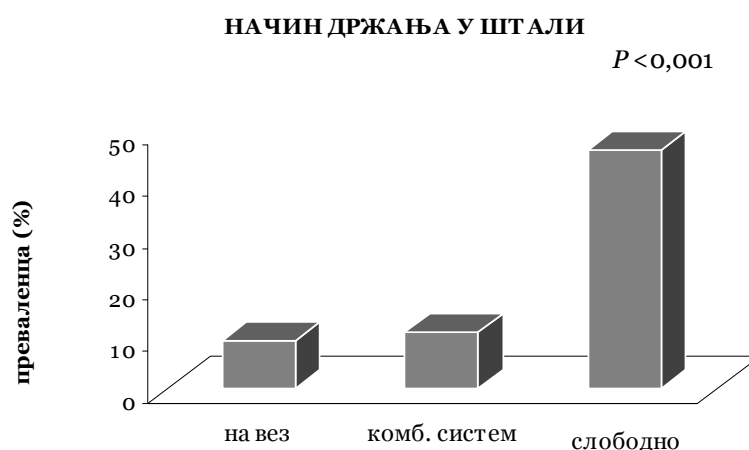


Графикон 15. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од расе говеда

Раса говеда није имала утицаја на присуство *N. caninum* инфекције на фармама говеда (Графикон 15).



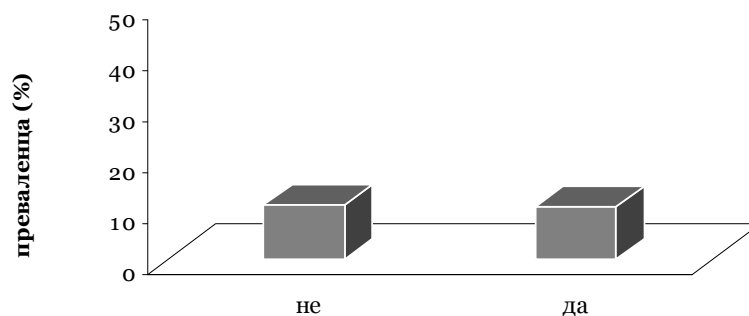
Графикон 16. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од начина гајења



Графикон 17. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од начина држања у штали

Показана је значајна разлика у присуству *N. caninum* инфекције на фармама говеда у зависности од начина гајења (Графикон 16), као и у зависности од начина држања говеда у штали (Графикон 17).

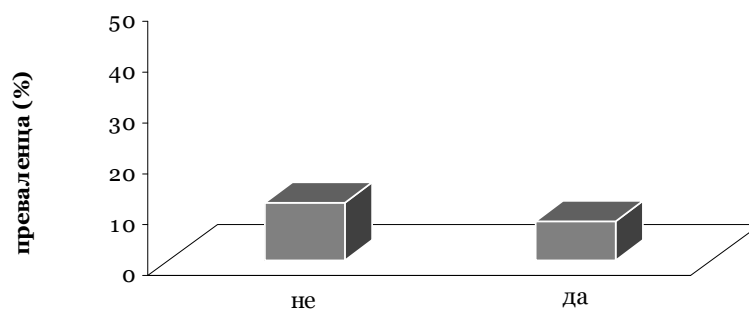
УПОТРЕБА СИЛАЖЕ

 $P=0,876$ 

Графикон 18. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од употребе силаже у исхрани говеда

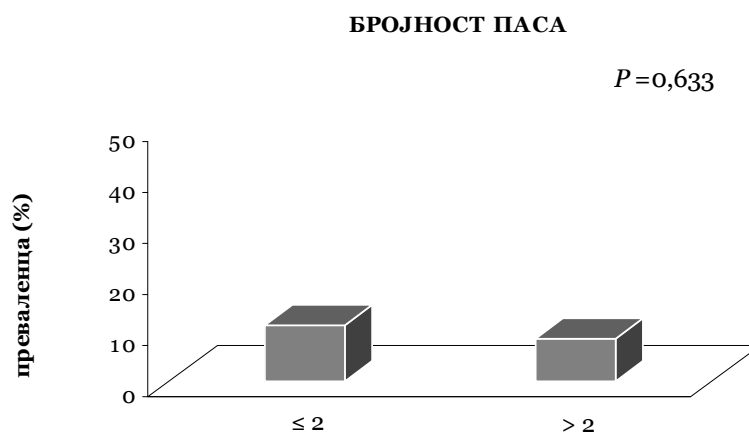
Употреба силаже у исхрани није имала утицаја на присуство *N. caninum* инфекције на фармама говеда (Графикон 18).

ЗАМЕНЕ СПОЉА

 $P=0,206$ 

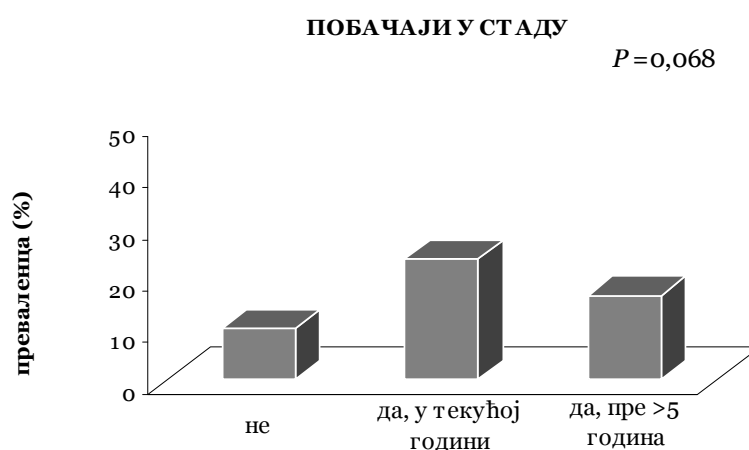
Графикон 19. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од порекла грла за ремонт стада

Порекло грла за ремонт стада је као појединачни фактор имало утицаја ($P \leq 0,25$) на присуство *N. caninum* инфекције на фармама говеда (Графикон 19).



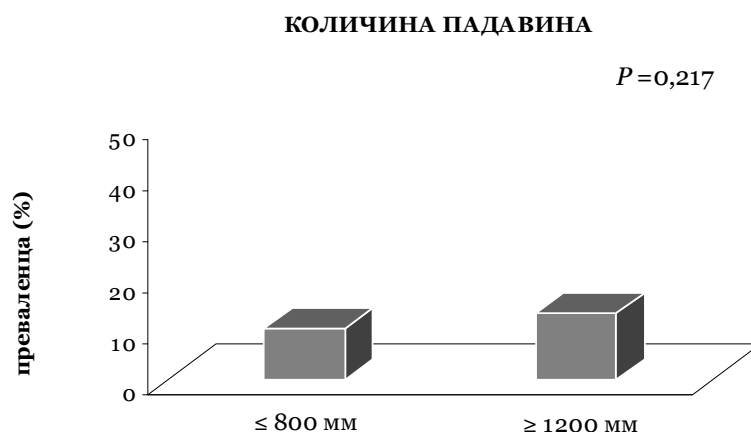
Графикон 20. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од присуства и бројности паса на фармама

Бројност паса није имала је утицаја на присуство *N. caninum* инфекције на фармама говеда (Графикон 20).



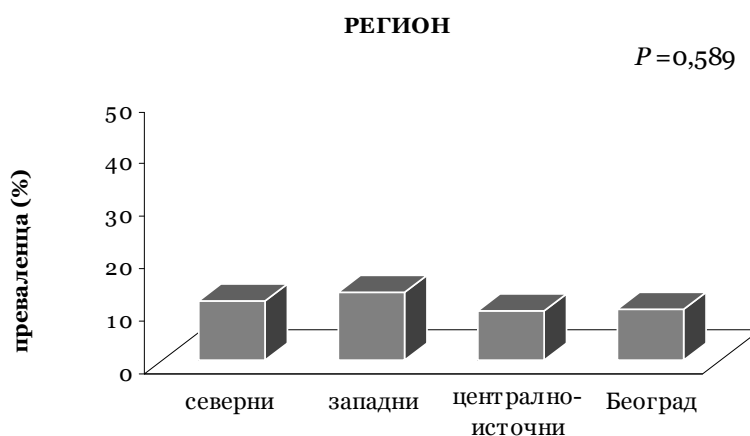
Графикон 21. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од појаве побачаја у стаду

Појава побачаја у стаду је као појединачни фактор имала утицаја ($P \leq 0,25$) на присуство *N. caninum* инфекције на фармама говеда (Графикон 21).



Графикон 22. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од просечне годишње количине падавина

Униваријантна анализа показала је да је просечна годишња количина падавина као појединачни фактор имала утицаја ($P \leq 0,25$) на присуство *N. caninum* инфекције на фармама говеда (Графикон 22).



Графикон 23. Налаз *N. caninum* специфичних антитела у зависности од региона

Регион где се фарма налазила није имао утицаја на присуство *N. caninum* инфекције на фармама говеда (Графикон 23).

Од свих испитаних фактора, униваријантна анализа је показала да су величина стада, начин гајења, начин држања у штали, замена грла (ремонт стада) из спољних извора, побачаји у стаду, и количина падавина били повезани са присуством инфекције *N. caninum* на фармама. Ови фактори укључени су у мултиваријантни модел логистичке регресије, и утврђено је да величина стада и

начин држања у штали значајно и независно утичу на присуство *N. caninum* инфекције на фармама (Табела 5). Ризик за присуство инфекције био је 24 пута виши за велике фарме, него за оне које су држале 10 и мање говеда. Такође, фарме на којима се говеда држе слободно у шталама биле су под преко 18 пута вишим ризиком од присуства инфекције него оне где се говеда држе везана. И овај финални модел давао је веома висок степен тачности предвиђања (за 89,9% случајева).

Табела 5. Фактори ризика за присуство инфекције паразитом *N. caninum* на фармама говеда у Србији (мултиваријантна анализа)

Фактор	Кориговани OR	95% ИП	P
Величина стада			
Мала ($n \leq 10$ говеда)	1,00		
Велика ($n > 100$)	24,08	3,85–150,50	0,001
Начин држања у штали			
Везни систем	1,00		
Комбиновани систем	0,73	0,16–3,26	0,682
Слободни систем	18,49	5,40–63,36	<0,001

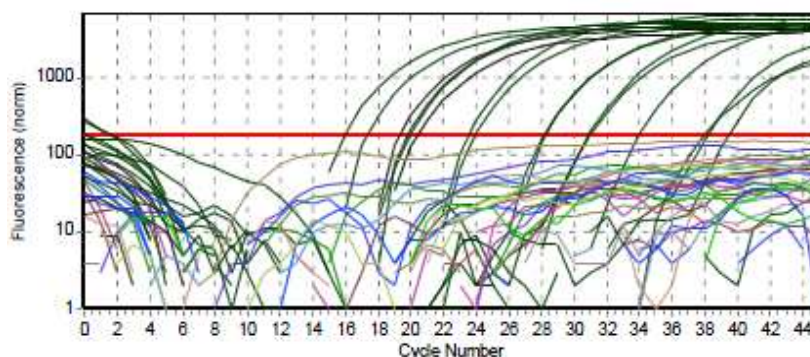
5.2. Примена *qPCR* метода за детекцију ДНК *N. caninum*

Други део овог рада обухватио је оптимизацију и испитивање осетљивости молекуларног дијагностичког метода за детекцију ДНК *N. caninum*.

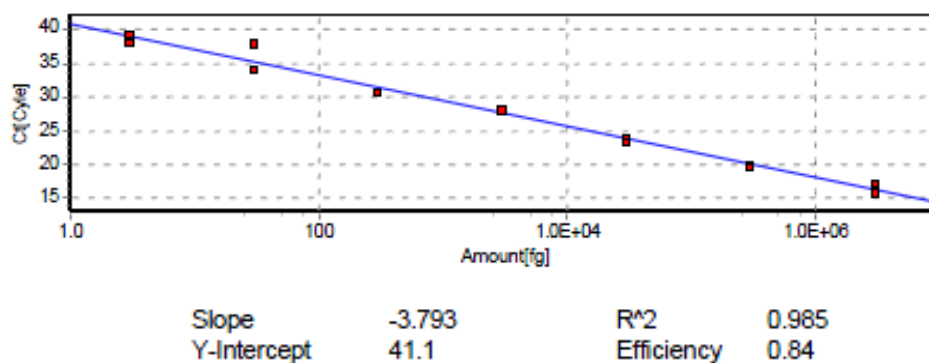
5.2.1. Оптимизација *qPCR* метода за детекцију ДНК *N. caninum*

Као што је наведено у Материјалу и методима, реакција је након вишекратних провера – мењања концентрација прајмера, пробе, MgCl_2 – оптимизована на 20 μL финалне запремине, са финалном концентрацијом прајмера и пробе од 675 односно 150 nM, и 2,5 mM MgCl_2 (Табела 1). Ово је довело до повећања осетљивости реакције у односу на оригинални протокол за 3-4 циклуса (*Ct*), то јест практично за 10 пута (с обзиром на то да током једног циклуса реакције под идеалним условима дође до удвостручавања циљане секвенце, до удесетостручавања долази након 3,3 циклуса).

Урађена је и стандардизација методе на серији од седам десетоструких разблажења ДНК *N. caninum* познате концентрације (од 3 fg до 3000 pg). Амплификационе криве и стандардна крива приказани су на Сликама 6 и 7.

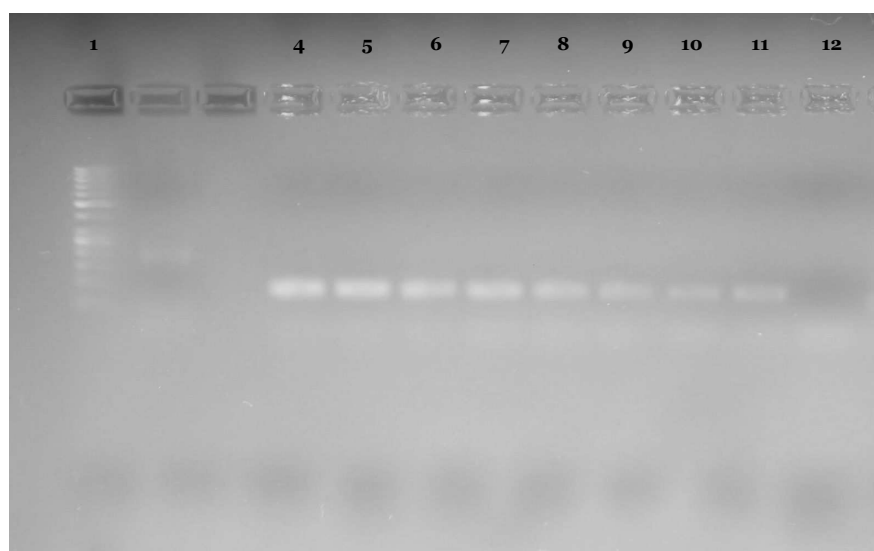


Слика 6. Приказ амплификационих криве циклуса *qPCR* са испитиваним стандардима



Слика 7. Приказ стандардизационе криве *qPCR* реакције, са стандардним низом десетоструких разблажења од 3 fg до 3000 pg ДНК *N. caninum*, са приказаним параметрима ефикасности и R^2 коефицијентом за дату реакцију

Као додатна провера, и ови продукти *qPCR* реакције испитани су на агар дифузионом гелу (Слика 8).



Слика 8. *qPCR* продукти на агар дифузионом гелу (3%): 1) 50bp ladder, 4-11) низ стандардних десетоструких разблажења (3000 pg – 3 fg) ДНК *N. caninum*, 12) негативна контрола (вода)

5.2.2. Детекција ДНК *N. caninum* у узорцима моноклеарних ћелија и коагулума и испитивање осетљивости метода

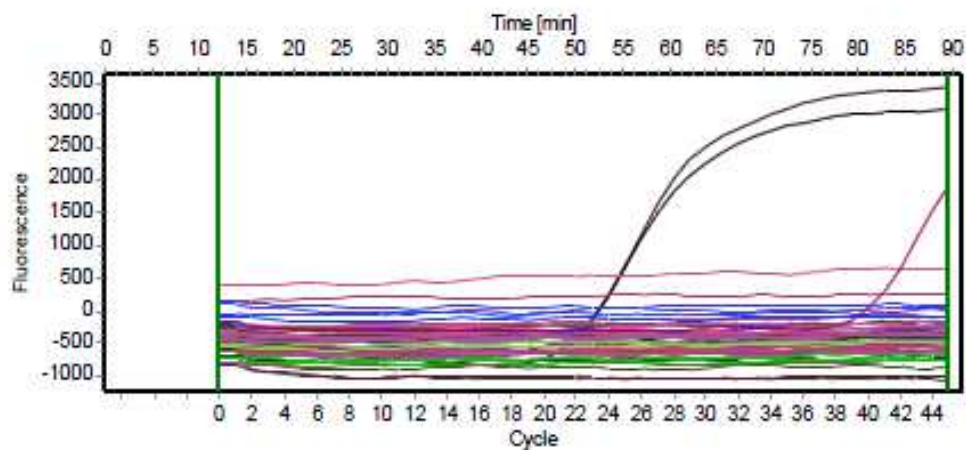
Испитано је укупно 94 узорка ДНК екстраховане из узорака моноклеарних ћелија и исто толико из коагулума. Ови узорци потицали су од 12 серопозитивних и 82 серонегативне краве. ДНК *N. caninum* није детектована ни у једном узорку. Узорци пореклом од серонегативних јединки искоришћени су затим за утврђивање осетљивости *qPCR* метода – детекцију ДНК *N. caninum* у различитом материјалу.

Једном броју негативних ДНК узорака додата је ("spiking") тачно одређена количина ДНК *N. caninum*, у серијском низу од четири десетострука разблажења тако да се у 3 μ L испитујућег темплата садржи 1, 10, 100 и 1000 fg ДНК *N. caninum*. Тестирање је извршено у пентапликату, упоредно са узорцима чисте ДНК. Резултати су приказани у Табели 6. Показана је нешто већа осетљивост метода за детекцију ДНК у узорцима МН ћелија у односу на узорке пуне крви – два пута већа при садржају ДНК од 10 fg, и 25% већа за 100 fg ДНК. Један фемтограм ДНК није се уопште могао детектовати у спајкованом узорку ДНК из коагулума, док је иста количина ДНК детектована у само једном од пет узорака пореклом из МН ћелија.

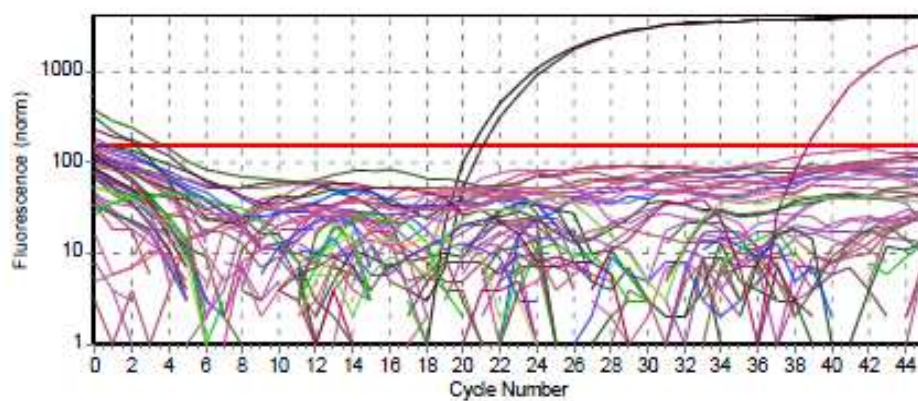
Табела 6: Успешност детекције ДНК *N. caninum* пореклом из различитог материјала (спајковани узорци)

Материјал	Садржај ДНК (fg)			
	1	10	100	1000
МН ћелије	1/5	4/5	5/5	5/5
Пуна крв – коагулум	0/5	2/5	4/5	5/5
Чист елуат ДНК	4/5	5/5	5/5	5/5

У новој реакцији, покушана је детекција 0,3 fg ДНК *N. caninum* у чистом ДНК елуату, и ДНК је амплификована у једном од дупликата (Слике 9 и 10), што представља изузетно велику осетљивост метода (≈ 1 тахизоит/2,5 mL чистог ДНК елуата, односно приближно еквиваленту ДНК 0,3 тахизоита/mL испитиваног материјала пре екстракције).



Слика 9. Приказ циклуса *qPCR* – флуоресценције у реалном времену



Слика 10. Приказ амплификационе криве циклуса *qPCR* – позитивне контроле, и један од дупликата узорка са садржајем од 0,3 fg ДНК *N. caninum*, позитивног у циклусу $C_t=38,69$, што је еквивалентно детекцији ДНК једног тахизоита у 2,5 mL ДНК елуата

VI ДИСКУСИЈА

Неоспороза говеда, изучавана и праћена тек четвртину века, и даље представља нерешив проблем у многим запатима. Објављен је значајан број радова о овом обољењу, али су детаљна истраживања рађена само у малом броју земаља; први подаци за Србију на пример почињу да се објављују тек пре нешто више од пет година. Важно је имати на уму да се стање инфекције говеда овим паразитом у свету у мањој или већој мери стално мења, делом у зависности од тога који начин трансмисије (хоризонтални или вертикални) доминира у запатима на датој територији. Такође, много епизоотиолошких фактора, како испитиваних тако и непотпуно испитаних, утиче на инфекцију *N. caninum*, укључујући зоографске чиниоце, зоотехничке и зоохигијенске услове (као што су начин гајења животиња, тип сточарске производње, хигијенски статус фарми, начин чувања сточне хране, присуство и бројност инфицираних канида и глодара и других прелазних домаћина, управљање производњом нарочито са аспекта репродукције и одабира грла за ремонт стада), услове спољашње средине у односу на могућност спорулације и одржавања ооциста у окружењу, као и географски положај земље. Променљивост неких од побројаних чинилаца доприноси и промени преваленце инфекције *N. caninum* код животиња са одређене територије током времена. Такође, локалне разлике у поменутим параметрима условљавају и локалне варијације у преваленци инфекције, тако да може бити и веома различита у разним подручјима једне земље. Битно је и преваленцу, а нарочито факторе ризика за инфекцију, одвојено анализирати код млечних и товних раса говеда, пошто се најчешће гаје под различитим условима.

Вредности преваленце веома зависе и од серолошког теста који се примењује, а нарочито од њихове валидације и стандардизације. Препорука *Björkman* и сарадника (2007) је да свака лабораторија треба да изврши валидацију серолошких тестова које примењује у испитиваној популацији говеда. Компетитивни *ELISA* тест (*cELISA VMRD*) који смо користили у овом истраживању претходно је валидиран на панелу стандардизованих серума испитаних тестом индиректне

имунофлуоресценције, као и на преко 4000 серума пореклом од крава непознатог серостатуса (Baszler и сар., 2001), на основу чије графички анализирани дистрибуције резултата је произвођач предложио праг позитивности од 30% инхибиције. Недавно је извршено поређење 10 комерцијалних *ELISA* тестова на стандардизованом панелу од 458 серума и извршена њихова анализа као и рестандардизација појединих тестова на основу *TG-ROC* рачунарске методе ("*two-graph receiver operating characteristic*"), при чему су аутори утврдили да се оптимална сензитивност и специфичност за испитивани панел серума код *VMRD cELISA* теста постижу при прагу позитивности степена инхибиције од 65% (Alvarez-García и сар., 2013), што је знатно више од оног што препоручује произвођач. На основу закључка аутора да се препоручене вредности за праг позитивности могу разликовати у зависности од испитиваног панела серума, као и на основу графичке анализе дистрибуције резултата овог теста примењеног на нашу популацију говеда, утврдили смо да до разграничења позитивних и негативних серума долази при вредности степена инхибиције од 40%. Коришћењем ове вредности за праг позитивности уместо препоручене од 30%, избегли смо добијање већег броја лажно позитивних резултата. Могуће да је на ову разлику утицало то што је на свим фармама са којих су потицале краве непознатог серостатуса (Baszler и сар., 2001) била забележена појава побачаја, а што није случај са популацијом коју смо ми испитивали и где на скоро 90% фарми нису били регистровани побачаји. Треба имати у виду и специфичност гајења стоке у Србији на малим породичним газдинствима, где се најчешће гаје 1-3 краве и где је појава побачаја знатно ређа него на великим фармама са више од 100 грла. Такође, у неким истраживањима примењена је и пролазна појава лажно позитивних резултата код јуница и крава у старости од 2-3 године, за које се због тога препоручује примена серолошких тестова са релативно вишим вредностима прага (Hietala и Thurmond, 1999; Frössling и сар., 2005). Према томе, пошто не постоји опште прихваћени "златни стандард", серолошки тестови који се данас користе у дијагностици неоспорозе валидирани су само у односу на панеле серума који су укључивали узорке пореклом од животиња са познатом и непознатом историјом појаве побачаја, као и једни у односу на друге. Међутим, треба имати у виду и да су, с обзиром на то да ниједан тест није валидиран у односу на резултате изолације вијабилних организама у домаћину, све вредности које се као праг позитивности користе у серолошким тестовима само претпостављене (Dubey и сар., 2007a).

Пре него што приступимо анализи наших резултата морамо да истакнемо да је због поменутих временских и територијалних варијација, незахвално поредити податке о серопреваленци из различитих студија. Такође, примена различитих

серолошких метода онемогућава директно поређење резултата, осим у ретким случајевима када је извршена међусобна валидација серолошких тестова и усклађивање њихових вредности прага према оптималним нивоима сензитивности/специфичности.

Овим првим систематским истраживањем инфекције паразитом *N. caninum* на статистички значајном узорку крава са целе територије наше земље које пружа прве валидне основне епизоотиолошке податке, утврђено је да серопреваленца инфекције *N. caninum* код говеда у Србији износи 7,2%. Подаци о преваленци ове инфекције код говеда постоје само за око тридесетак земаља. Иако по резултатима ових истраживања серопреваленца у општој популацији говеда широм света варира у распону од 0 до 97,2%, у Европи износи од 1,3 до не више од 39,4%, док су вредности серопреваленце нешто сличније у популацији крава које су побациле – у свету се крећу до 79, а у Европи до 63% (Dubey и сар., 2007a; Dubey и Schares, 2011). Први подаци о серопреваленци за Србију који потичу из пилот истраживања на 350 крава пореклом са целе територије земље показали су серопреваленцу од 8,6% (Klun и сар., 2008). Интересантно је да је у том истом узорку утврђена девет пута виша серопреваленца инфекције паразитом *T. gondii* – 75,1% (подаци пореклом из сероепизоотиолошке студије ове инфекције код копитара и папкара у Србији – Klun и сар., 2006), што можда индиректно показује да је неоспороза на испитиваној територији присутна много краће од токсоплазмозе, тј. да је недавно интродукована, или да хоризонтална трансмисија ове инфекције није тако ефикасна као у случају токсоплазмозе. У већини упоредних испитивања разних врста животиња настањених у истом подручју, преваленца инфекције *N. caninum* била је нижа од преваленце *T. gondii* (Lindsay и сар., 1996; Huong и сар., 1998; Figliuolo и сар., 2004a, 2004b; Wanha и сар., 2005; Hughes и сар., 2006; Romanelli и сар., 2007), али не у толиком степену као у Србији.

У Србији су испитивања неоспорозе недавно вршена и у Војводини али, осим у два случаја, на ограниченим узорцима, при чему је на узорку од 132 краве са историјом побачаја показана преваленца од 3,8% (Vidić и сар., 2011), и од 17,3% код 52 краве са различитим репродуктивним поремећајима (Savović и сар., 2012). Забележена је и преваленца од 12,9% на узорку од 31 пса (Pavičić и сар., 2011). Недавно истраживање потенцијалног удела *N. caninum* у етиологији побачаја код крава са целокупног панчевачког епизоотиолошког подручја на узорку од 500 животиња показало је серопреваленцу од 4,6% (Gavrilović и сар., 2013). Најновије истраживање, које је обухватило целу територију Војводине, показало је серопреваленцу од 15,4% на узорку од 356 крава, и 17,2% код 99 паса (Kurica и сар., 2013). Што се тиче вредности серопреваленце инфекције код паса добијених у

истраживањима у свету треба поменути да и оне веома варирају – од 0 до 96,8% (Barber и сар., 1997; Reichel, 1998; Ortuño и сар., 2002; Andreotti и сар., 2006; Collantes-Fernandez и сар., 2008; Dubey и сар., 2008; Ploneczka и Mazurkiewicz, 2008; Sharma и сар., 2008; King и сар., 2012), али још важније јесте да се и оне сматрају потцењеним, зато што је утврђено да и пси који су излучивали ооците *N. caninum* не поседују антитета која препознају антигенске детерминанте тахизоита (McAllister и сар., 1998; Lindsay и сар., 1999a), а антигенска компонента свих серолошких тестова који се данас користе пореклом је баш из тахизоита. Такође, код паса до сероконверзије не долази увек одмах по настанку инфекције, већ са закашњењем, а може доћи и до серонегативизације упркос појави излучивања ооциста (McAllister и сар., 1998; Cavalcante и сар., 2011). Што се тиче неоспорозе млечних раса говеда у суседним земљама, постоје подаци о преваленци инфекције од 5,8% у једном региону Хрватске (Beck и сар., 2010), 3,3% у Мађарској (Hornok и сар., 2006), као и о знатно вишој преваленци од 28-40% у појединим деловима Румуније (Gavrea и сар., 2011; Imre и сар., 2012; Mitrea и сар., 2012). У стадима говеда са репродуктивним проблемима, преваленца је била виша него у општој популацији – 10% у Мађарској (Hornok и сар., 1998), и 56% у Румунији (Gavrea и Cozma, 2010). Као пример поменутих територијалних варијација могу послужити наведени подаци о серопреваленци у Румунији (28-40%), као и у Италији – од 8,7% у јужним до 16% у северним деловима земље (Otranto и сар., 2003).

У нашем раду, практично половина серопозитивних јединки имала је високе вредности титрова то јест степена инхибиције специфичних антитета од преко 80%, што је још један прилог могућности да је у запатима говеда на територији Србије доминантни начин преношења инфекције вертикални. Истраживања код перзистентно инфицираних крава показала су да су интензитет серолошког одговора и дужина трајања специфичних антитета у високом титру повезани са ризиком преношења инфекције на плод (Stenlund и сар., 1999; Guy и сар., 2001), тако да је код крава са високим титровима *N. caninum* специфичних IgG антитета вишеструко виша фреквенција вертикалног преношења инфекције него код крава са ниским титровима (Moré и сар., 2009), као и да се побачаји чешће јављају код јединки са вишим титровима (McAllister и сар., 1996; Dubey и сар., 1997a; Waldner и сар., 1998; Schares и сар., 1999; Quintanilla-Gozalo и сар., 2000; Schares и сар., 2000). Ова повезаност између висине титра и рађања конгенитално инфицираног подмлатка забележена је и код паса (Barber и Trees, 1998). Такође, краве у случајевима ендемске појаве побачаја имале су више титрове него код епидемија побачаја (Schares и сар., 1999, 2000). Претпоставка да високи титрови установљени код половине серопозитивних јединки у нашем раду указују на вертикалну

трансмисију односно ендегену ТПТ као доминантну на фармама говеда у Србији захтева проверу у будућим истраживањима, путем упоређивања серостатуса парова мајка-ћерка као и серолошким испитивањима авидитета специфичних IgG антитела, нарочито у појединим запатима где је већ дошло до појаве побачаја. Подаци о нивоу специфичних IgG антитела код индивидуалних животиња, нарочито у стадима са високом серопревалентом, могу се користити у предикцији тока и исхода гравидитета ради откривања јединки које су под високим ризиком од побачаја (Quintanilla-Gozalo и сар., 2000).

Вредно је поменути студију у којој су директно поређене преваленце и анализирани фактори ризика за инфекцију говеда у неколико европских земаља (Bartels и сар., 2006а), што је омогућено међусобном валидацијом и стандардизацијом различитих серолошких тестова, као и применом сличног дизајна истраживачких студија. Најнижа преваленца за говеда млечних раса износила је 0,5% у Шведској, затим 1,6% у Немачкој, нешто виша (9,9%) била је у Холандији, а највиша, 16,2% у Шпанији. На нивоу стада, бар једно серопозитивно грло установљено је у 16% запата млечних говеда у Шведској, у 49% у Немачкој, 63% у Шпанији, и у 76% у Холандији, што говори да је инфекција у овим земљама (осим у Шведској) широко распрострањена. У нашем раду, слично наведеној студији, вредност серопреваленце на индивидуалном нивоу нижа је него преваленца инфекције у запатима – 7,2% према 10,7%. У Европи, ниже вредности преваленце инфекције на нивоу фарми (установљене тестирањем збирних узорак млека) забележене су једино у Норвешкој – 0,7% (Klevar и сар., 2010), и у Немачкој, у покрајини Шлезвиг-Холштајн, додуше са прагом осетљивости теста од >10% серопозитивних грла у стаду – 1% (Schares и сар., 2009). Иако је присуство инфекције утврђено на свих 12 епизоотиолошких подручја Србије, и то код 2,2 до 12% говеда, релативно ретка појава инфекције на фармама (10,7%) која говори да је тек свака десета фарма заражена, такође индиректно указује на могућност да је инфекција *N. caninum* не тако давно интродукована на територију Србије, као и да је доминантни начин преношења у запатима вертикални, по појединим генетским линијама, што је и једно од објашњења које су дали аутори студије за епизоотиолошку ситуацију и ниску преваленцу код говеда у Шведској. Такође, објашњење може зависити и од преваленце инфекције код паса, специфичности у начину гајења говеда, вирулентности сојева *N. caninum* који су присутни на одређеној територији, као и од климатских/временских услова (Björkman и сар., 2000; Frössling, 2004; Frössling и сар., 2005; Bartels и сар., 2006а). Разлике у преваленци инфекције у поменутој супранационалној студији указују да међу земљама постоје разлике у висини ризика од настанка инфекције на регионалном

нивоу, које зависе и од начина гајења говеда. Због тога се фактори ризика установљени различитим студијама не могу тумачити као универзални, већ само у оквиру одређених региона који имају упоредиве епизоотиолошке параметре (Dubey и сар., 2007а).

У нашем раду, испитивани епизоотиолошки фактори у популацији говеда укључивали су величину стада, доминантно заступљену расу, начин гајења, начин држања у штали, употребу силаже у исхрани, порекло грла за ремонт стада, присуство и број паса, појаву побачаја у стаду, просечну годишњу количину падавина и регион. Од ових, утврђено је да фактор ризика за говеда у Србији на индивидуалном нивоу представља само начин држања у штали, и то тако да су говеда која су држана у шталама са слободним системом била под преко три пута вишим ризиком да буду инфицирана од говеда држаних у везном систему. На нивоу фарме, изразито повишен ризик од присуства инфекције *N. caninum* у нашем истраживању утврђен је за велике фарме у односу на оне са 10 и мање говеда (24 пута), као и за фарме на којима се говеда држе слободно у шталама у односу на оне где се говеда држе на везу (18 пута). У поменутом испитивању на панчевачком епизоотиолошком подручју (Gavrilović и сар., 2013), без примене логистичке регресионе анализе, такође је утврђена виша присутност инфекције на великим фармама (50%) него на малим газдинствима (22,6%), док на индивидуалном нивоу нису утврђене разлике, као ни у нашем раду. Међутим, у једној студији у Италији (Otranto и сар., 2003) показан је повишен ризик од инфекције и за индивидуалне јединке упоредо са повећањем величине стада, нарочито уколико је на фарми био присутан и већи број паса. На нивоу стада, у Немачкој је величина стада такође утврђена као фактор ризика за инфекцију (Schares и сар., 2004б), могуће услед веће акумулације грла за ремонт стада из спољних извора у односу на мале фарме, и веће вероватноће уношења инфициране јединке у стадо и каснијег ширења инфекције на псе и опет на говеда. Такође, на већим фармама, нарочито услед мањка особља или његове недовољне мотивисаности, теже је уочити побачај и на време уклонити његове продукте и спречити да пси дођу у контакт са њима. Ово све говори да сама величина стада вероватно није директан фактор ризика, већ само маскира дејство других епизоотиолошких фактора који нису били идентификовани у овим истраживањима, укључујући и наше. У Галицији (Шпанија), присутност инфекције на фармама такође је расла са величином фарме (Eiras и сар., 2011). У погледу понуђеног објашњења, сличног оном понуђеном у немачкој студији за ремонт стада, треба поменути да је могућ и сасвим супротан сценарио у случају великих фарми које не врше или ретко врше ремонт стада из спољних извора – а то је да до повећања преваленце ипак дође уколико се у запату задржава већи број потомкиња

које су конгенитално инфициране, нарочито ако потичу из изузетно вредних генетских линија. Овај проблем могао би се превазићи применом ембриотрансфера (*Baillargeon* и сар., 2001; *Landmann* и сар., 2002; *Campero* и сар., 2003). У нашем истраживању, могуће је да је лоше управљање великим фармама током година економске кризе још од краја прошлог века наовамо довело до тога да се неоспороза појави и устали у нашој земљи, што се огледа и у вишем ризику за присуство инфекције на великим него на малим фармама, где је управљање производњом знатно лакше а вођено је и личним улагањем и заинтересованошћу малих произвођача.

Независно од величине фарме, као фактор ризика на нивоу фарме показао се слободан начин држања говеда у штали, а што је представљало и једини фактор ризика за инфекцију индивидуалних говеда. Парадоксално, слободан начин држања је имао протективни ефекат за инфекцију у једној студији у Француској, за шта аутори нису дали објашњење (*Ould-Amrouche* и сар., 1999). Повишен ризик за инфекцију који је показан у нашем раду може бити резултат ниског зоохигијенског нивоа на оваквим фармама где је и иначе теже спроводити зоохигијенске и зоотехничке мере, а нарочито у тренутној економској ситуацији услед већ поменутог недостатка довољно мотивисаног особља. Током овог истраживања уочен је веома лош зоохигијенски статус на већини фарми на којима су говеда држана слободно, што је углавном у супротности са ситуацијом описаном у другим земљама. Ипак, студија у Швајцарској (*Hässig* и *Gottstein*, 2002) показала је да је слободно држање повезано са ризиком од појаве побачаја код серопозитивних крава, али нису откривени конкретни разлози или поступци у начину гајења који би објаснили ову појаву. Међутим, добро дизајнирани и изведени простори за слободно држање стоке могу спречити приступ псима и последичну контаминацију ооцистама места за храњење, као и контакт паса са продукtima побачаја, што је показано у једној студији из Канаде (*Hobson* и сар., 2005), када је слободно држање говеда у таквим просторима довело до снижења ризика за појаву побачаја изазваних неоспорозом, вероватно прекидањем хоризонталног ланца трансмисије.

У нашем раду нисмо утврдили статистички значајну повезаност појаве побачаја на фармама и преваленце инфекције, иако је примећена нешто виша преваленца инфекције код јединки са фарми на којима су у ближој или даљој прошлости забележени побачаји, него код оних где се побачаји уопште нису јављали, што је било нарочито изражено на нивоу фарме (23,5 и 16,4%, према 9,9%). Треба нагласити да је највећи број говеда у нашем раду потицао са фарми где се побачаји уопште нису јављали (78,3% говеда односно 89,5% фарми), што је као што смо већ поменули одраз специфичности гајења стоке у Србији (нарочито

централној) на малим породичним газдинствима са по 1-3 краве и где је појава побачаја знатно ређа него на великим фармама са више од 100 грла.

Након открића да је пас стални домаћин *N. caninum* и да је ингестија спорулисаних ооциста основни начин хоризонталног ширења инфекције на прелазне домаћине, закључено је да је присуство и бројност паса на фармама или у близини сточне хране од изузетног епизоотиолошког значаја, и многе студије су потврдиле повишен ризик од инфекције или макар повезаност овог фактора са повишеном серопревалентом код говеда (Reichel и сар., 2014). У мањем броју студија, међутим (Rodriguez и сар., 2002; Kyaw и сар., 2004; Bañales и сар., 2006), као и у нашем раду, присуство и бројност паса на фарми нису представљали фактор ризика за инфекцију *N. caninum*. Могуће је да је свеприсутност паса на фармама, укључујући ту и луталице које се често неконтролисано крећу на фармама и имају приступ побаченом материјалу, спремиштима сточне хране, просторима за храњење и јаслама, као и на пашњацима, довела до тога да ризик од инфекције услед њиховог присуства буде подједнако распоређен на све испитиване фарме и говеда. Прва студија, спроведена у Немачкој (Schares и сар., 2003), која је показала да за ширење инфекције нису толико значајни пси пореклом са испитиваних фарми, већ густина насељености паса на неком подручју, што онда укључује и псе са суседних фарми, доказала је да сви пси на некој територији доприносе повећању контаминације ооцистама и излагању говеда инфекцији, што током низа година, уз висок степен ефикасности вертикалног преношења доводи до акумулације инфицираних јединки у стадима и вишој преваленци инфекције у стадима у регионима са густом насељености псима у односу на оне са ниском. Наш налаз одсуства статистички значајне повезаности присуства паса на фармама и преваленце инфекције, уз ниску до умерену прокуженост говеда као и релативно ниску преваленцу инфекције на нивоу фарми, такође иде у прилог претпоставци да је доминантни начин преношења инфекције *N. caninum* код говеда у Србији вертикалан.

С обзиром на факторе ризика утврђене у нашем раду, могуће је препоручити неке мере превенције које би директно или индиректно довеле до смањења прокужености говеда у Србији, као што су побољшање зоохигијенских и зоотехничких услова, нарочито на великим фармама, и фармама где се говеда држе у слободном систему. Такође, показало се да држање говеда у везном систему снижава ризик од инфекције.

Мада није утврђен као фактор ризика, пошто су говеда индиректно изложена опасности од контаминације простора и хране ооцистама, приступ псима мора бити ограничен и њихово кретање на фарми контролисано. Иако је математичким моделима показано да је за одржавање инфекције неопходно и хоризонтално

преношење (*French* и сар., 1999), чак и само са искључиво вертикалним начином преношења било би потребно веома дуго време да преваленца спадне на нулу, пошто се преко конгенитално инфицираних потомкиња инфекција одржава у запату генерацијама (*Frössling* и сар., 2005). Иако малобројне, инфициране јединке увек представљају ризик за ширење инфекције путем интеракције са сталним домаћинима и затварања циклуса трансмисије. С обзиром на то да у Србији инфекција протозоом *N. caninum* на нивоу фарми још није широко распрострањена, могу се препоручити и мере контроле предложене за скандинавске земље где је такође утврђена ниска преваленца на нивоу фарми а то су да се из запата са ниском серопревалентом где је установљен доминатни вертикални начин трансмисије одмах искључе инфициране краве, као и да се грла за ремонт стада тестирају пре увођења у запат (*Frössling* и сар., 2005); упоредо би се ревносном применом зоохигијенских мера спречавала евентуална појава хоризонталног преношења инфекције. Такође, препоручују се редовне годишње контроле серостатуса свих јединки у стаду (*Pabón* и сар., 2007). У циљу спречавања или смањивања појаве побачаја код већ инфицираних јединки, препоручује се осемењавање серопозитивних крава млечних раса семеном бикова товних раса (*López-Gatius* и сар., 2005б; *Almería* и сар., 2009; *Yániz* и сар., 2010); ова мера би донела и додатну корист за одгајиваче млечних говеда у Србији пошто се на тржиште за тов и клање тешко пласирају телад чисто млечних раса.

Најзад, у нашем раду посветили смо се оптимизацији и увођењу молекуларних метода у дијагностику неоспорозе, које до сада у Србији нису примењиване. Мора се поменути да је стандардизација молекуларних метода тешка, узимајући у обзир велики број техника и технологија које се користе, као и различите циљне гене/секвенце гена и следствено различитих протокола, прајмера и проба. Било је потребно оптимизовати метод молекуларне дијагностике који би могао да детектује ДНК паразита и из аутолизираног материјала, ради увођења у рутинску примену у специјализованим лабораторијама што би омогућило валидну и ефикасну молекуларну дијагностику неоспорозе. Као материјал у оптимизацији метода користили смо пуну крв и МН ћелије крви, а предност овог материјала је што је лако доступан и што се може добити од живих животиња. Такође, примена *real-time PCR* метода, поред тестирања већег броја животиња, омогућава и квантификацију ДНК у узорку.

У неколико студија приликом експерименталних инфекција коришћени су молекуларни дијагностички методи за утврђивање присуства ДНК *N. caninum* у крви односно паразитемије, када је ДНК детектована у фази једарних ћелија крви ("*buffy coat*") током првих неколико дана до две недеље након експерименталне

инфекције говеда (*Maley* и сар., 2003; *Macaldowie* и сар., 2004), или у пуној крви, рекурентно током 10 недеља после експерименталне инфекције резус мајмуна (*Ho* и сар., 1996), као и у пуној крви оваца, почев од прве па све до краја седме недеље када се експеримент и завршио (*O'Handley* и сар., 2002). Има веома мало података о трајању паразитемије код неоспорозе, док, с обзиром на много дужи период проучавања, нешто више података постоји за сродну протозоу *T. gondii* – чак осам месеци након експерименталне инфекције код мишева, кунџа и заморчића забележена је спонтана појава поновљене паразитемије (*Remington* и сар., 1961). Код говеда и бивола паразитемија је трајала 62 и 84 дана након инфекције (*Costa* и сар., 1977; *Scarpelli* и сар., 2009), а код коза 64 дана (*Vitor* и сар., 1999). У једном испитивању свиња са линије клања у београдским кланицама показано је присуство вијабилних паразита у пуној крви серопозитивних животиња у чак 73% постављена биолошка огледа (*Klun* и сар., 2011), што говори да је код свиња инфицираних паразитом *T. gondii* врло честа појава паразитемије, било током акутне токсоплазмозе као последице примарне инфекције, било услед реактивације инфекције, или пак реинфекције. Може се претпоставити да се слично може догодити и код инфекције *N. caninum* код говеда.

У студији *Benavides* и сарадника (2012), присуство паразитемије након експерименталне инфекције 11 стеоних крава товних раса потврђено је налазом ДНК *N. caninum* у белој крвној лози код свих инфицираних јединки почев од осмог до 14-ог дана након инфекције барем једанпут, а код велике већине животиња (9/11) током два или више дана. Коришћен је *nested PCR* метод, за откривање ITS1 *rDNA* региона *N. caninum*, а пре екстракције ДНК лизирани су и уклоњени еритроцити, а бела крвна лоза и евентуално присутни слободни тахизоити су центрифугирањем седиментирани и пелетирани. Сматра се да уклањање еритроцита (тј. хемоглобина) доприноси смањењу штетног утицаја инхибитора у *PCR* реакцији.

Интересантно је да смо у овом раду *real-time PCR* технику засновану на *TaqMan*[®] платформи први пут применили за детекцију ДНК *N. caninum* у крви и МН ћелијама периферне крви; до сада је ово урађено само за детекцију ДНК једне друге врсте протозое, *Leishmania infantum*, у крви паса и људи (*Mortarino* и сар., 2004; *Mohammadiha* и сар., 2013). У нашем раду, након оптимизације *qPCR* метода којом је осетљивост реакције у односу на оригинални протокол повећана за приближно 10 пута, извршена је његова стандардизација у низу стандардних разблажења ДНК *N. caninum*, као и додатна провера продуката *qPCR* реакције на агар дифузионом гелу где су показани продукти одговарајуће величине (83 бп) за сва испитивана разблажења. Методом је успешно детектована ДНК *N. caninum* и у не-серијском разблажењу, у веома малој количини од 0,3 fg, што је потврдило

изузетно велику осетљивост метода од приближно једног тахизоита у 2,5 mL чистог ДНК елуата, односно приближно еквиваленту ДНК 0,3 тахизоита по милилитру испитиваног материјала пре екстракције. У "спајкованим" узорцима, показана је нешто већа осетљивост метода за детекцију ДНК *N. caninum* у узорцима МН ћелија у односу на узорке пуне крви, што указује на могуће веће присуство једињења која на амплификацију делују инхибиторно у узорцима пуне крви у односу на МН ћелије. Присуство разних инхибиторних супстанци у биолошким узорцима није неуобичајено, и приликом детекције ДНК *N. caninum* класичним *PCR* методом већ је утврђена пет пута већа осетљивост при амплификацији из узорака тахизоита у медијуму за ћелијску културу него из узорака пуне крви или амнионске течности (Ho и сар., 1996). За методе *PCR*-а у реалном времену до сада је установљена осетљивост еквивалентна детекцији ДНК једног тахизоита *N. caninum* (Müller и сар., 2001, хибридизујућим пробама), и 0,1 тахизоита (10 fg ДНК) у 100 ng ткива мишијег мозга (Collantes-Fernández и сар., 2002, на SYBR® Green платформи), што је неколико пута мања осетљивост него она показана у нашем раду.

Испитивањем материјала пореклом од серопозитивних (природно инфицираних), и серонегативних крава ни у једном узорку крви или МН ћелија није утврђена ДНК паразита, што вероватно значи да у самом тренутку узорковања у циркулацији није било тахизоита *N. caninum*. Постоји и могућност да се помоћу *qPCR* метода коришћеног у нашем раду није могао детектовати веома мали број евентуално присутних тахизоита, али је ово објашњење мало вероватно с обзиром на показану високу осетљивост метода.

У више студија описана је амплификација ДНК паразита у телесним течностима говеда инфицираних природним путем, а први пут је детекција ДНК *N. caninum* у пуној крви и ћелијским елементима крви (леукоцитима и лимфоцитима) примењена у истраживању Okeoma и сар., 2004. У другој студији у којој је коришћен *nested PCR* метод за детекцију 18S-5.8S *rRNA ITS1* региона *N. caninum* у пуној крви и семену осам природно инфицираних серопозитивних бикова (Ferre и сар., 2005), једном недељно током 22 недеље, код пет јединки доказано је присуство ДНК *N. caninum* у крви бар у једном узорку. Код једног бика ДНК је установљена у 19. недељи, код два у по два наврата (током 11. и 19., и 15. и 20. недеље), код једног у четири (1., 8., 9. и 10.), а код једног у пет наврата (5., 7., 9., 11. и 16.). Могуће је да је до повремене детекције паразитемије дошло због присуства веома малог броја тахизоита у циркулацији, или краткотрајног или неуједначеног присуства у појединим периодима током дана узорковања.

У недостатку пуне крви или МН ћелија, амплификација ДНК *N. caninum* може се покушати и у узорцима серума. У једној студији у којој су у *nested PCR*-у

коришћени Nr6+ и Nr21+, и Nr9 и Nr10 прајмери за pNc5 репетитивну секвенцу, и утврђеног прага детекције од 1-10 fg, ДНК *N. caninum* детектована је у серуму 12 од 44 (27,3%) серопозитивне краве које су побациле, као и у четири серума пореклом од 107 (3,7%) серонегативних стеоних крава узоркованих у кланици. Тестирањем узорака плодова ДНК *N. caninum* је у поменутом 4 случаја утврђена код једног фетуса у амнионској/алантоисној течности, као и у још девет случајева (у мозгу, серуму, постељици, амнионској/алантоисној течности) када код мајке нису утврђена ни антители ни ДНК у серуму. Закључено је да нема видљиве корелације између налаза ДНК или *N. caninum* специфичних антитета у серуму крава, налаза ДНК у ткивима фетуса, и побачаја као последице неоспорозе (McInnes и сар., 2006), што потврђује да се само на основу серолошких резултата или налаза ДНК не може потврдити ни искључити улога *N. caninum* као проузроковача побачаја. Описаном студијом је први пут показано присуство ДНК *N. caninum* у серуму крава, а то што је оно установљено и код серонегативних јединки доказује да су трајне инфекције могуће и у одсуству детектабилног серолошког одговора.

Интересантно је да у нашој студији ни код серопозитивних ни код серонегативних јединки није детектована ДНК *N. caninum* у коагулуму и МН ћелијама, иако је осетљивост *qPCR* метода након оптимизације износила 0,3 fg ДНК. Могуће је и да нисмо испитали довољно велики узорак, али би на основу преваленце установљене у претходно описаној студији у нашем узорку могли да очекујемо налаз ДНК код три серопозитивне, као и три серонегативне краве. Мање вероватна претпоставка McInnes и сарадника (2006) је да се пошто код стеоних инфицираних крава услед инфламације и некрозе постељице долази до ексудације као и до преласка целих тахизоита и отпадних елемената паразита у циркулацију (Maley и сар., 2003; Macaldowie и сар., 2004), ДНК паразита пре може детектовати у серуму него у ћелијским елементима крви. Насупрот овоме, ДНК паразита утврђена је у лимфоцитима, леукоцитима и пуној крви али не и у серуму девет серопозитивних јуница инфицираних природним путем (Okeoma и сар., 2004), које су такође биле стеоне, или су недавно побациле услед неоспорозе; ови аутори присуство паразита само у белим крвним зрнцима а не и у серуму објашњавају могућом лизом слободних тахизоита у серуму услед дејства специфичних антитета. Такође, у другој студији (Okeoma и сар., 2005), *real-time PCR*-ом на SYBR® Green платформи вршена је квантификација ДНК *N. caninum* у пуној крви шест природно инфицираних јуница (стеоних барем пет месеци, и оних које су абортирале током петог или шестог месеца гравидитета). Јунице су током првих седам недеља узорковане сваке, а током наредних осам сваке две недеље, до тељења. У првом узорку крви, концентрација ДНК *N. caninum* је код свих јединки по групама била приближно једнака (0,08 ng по

микролитру бовине геномске ДНК код стеоних, и 0,1 ng/ μ L код абортираних). Код јуница које су побациле, након благог повећања концентрације ДНК током прве две недеље, дошло је до значајног опадања, и од седме недеље ДНК паразита се осим код једне животиње више није могла детектовати у крви. Код стеоних животиња међутим, ДНК се могла детектовати све време експеримента, и чак је уочи тељења дошло и до благог повећања концентрације (0,15 ng/ μ L). Након жртвовања, ДНК *N. caninum* детектована је и у мозгу свих испитиваних животиња, у нешто вишој концентрацији (0,275-0,6 ng/ μ L бовине геномске ДНК) него у пуној крви; ДНК је детектована и у мозговима телади. Пошто током гравидитета долази до физиолошке "down"- регулације имунског одговора Типа 1 (Quinn и сар., 2002), сматра се да се тахизоити ослобођени из ћелија након реактивације латентне инфекције врло често могу наћи у крви, што објашњава присуство ДНК *N. caninum* у крви стеоних јединки све време током трајања експеримента (Okeoma и сар., 2005). Код јединки које су побациле, одсуство ДНК паразита у крви после седам недеља можда се може објаснити обнављањем равнотеже Th1 и Th2 имунског одговора и успостављањем контроле умножавања паразита од стране Th1 проинфламаторних цитокина (γ -интерферон). Испитивања код људи утврдила су да до успостављања ове равнотеже долази након 3-12 месеци од порођаја (Ekerfelt и сар., 1997; Russell и сар., 1997; Watanase и сар., 1997; Matthiesen и сар., 1998; Shimaoka и сар., 2000). Сви узорци у којима је покушана детекција ДНК паразита у нашем раду потицали су од крава непосредно пред тељењем или у првој недељи пуерперијума, тј. оних које су још увек биле у периоду "down"- регулације имунског одговора, и код одређеног процента серопозитивних па и серонегативних јединки могао се очекивати позитиван *qPCR* резултат. Осим могућности да наш узорак није био довољно велики, на негативан резултат детекције ДНК могло је да утиче и евентуално присуство неиспитаних инхибитора амплификације, а које није било могуће инактивисати додавањем албумина говеђег серума (BSA) у смесу за *qPCR* реакцију.

ДНК паразита у циркулацији серонегативних јединки показана је у још неколико истраживања. У једној студији где је амплификација ДНК, као и код McInnes и сарадника (2006), рађена уз помоћ *nested PCR* метода за *pNc5* репетитивну секвенцу и парова прајмера *Np6+* и *Np21+*, и *Np9* и *Np10*, код 813 крава пореклом са осам фарми са регистрованим побачајима *ELISA* тестом утврђена је серопреваленца од 15,5% (126/813). Код седам крава (0,86%), од којих је чак пет било серонегативно, детектована је ДНК *N. caninum* у крвном коагулуму, што значи да је ДНК установљена код 0,73% (5/687) серонегативних јединки (Yao и сар., 2009), и да одсуство специфичних антитела не значи и одсуство инфекције *N. caninum*. Могућа објашњења аутора за ових пет случајева су да је крв узоркована непосредно по

инфицирању и да се још нису синтетисала IgG антитела, или да примењени серолошки тест није био довољно осетљив да детектује мале количине антитела, нарочито ако је праг позитивности теста подигнут ради повећања специфичности. Описани су и случајеви негативне сероконверзије (серонегативизације) код крава (Cox и сар., 1998; Dijkstra и сар., 2002a; López-Gatius и сар., 2004a; Pan и сар., 2004; Kyaw и сар., 2005; Dijkstra и сар., 2008), као и појава код појединих конгенитално инфицираних јединки да је контакт са паразитом пре настанка имунокомпетенције током феталног доба (Osburn и сар., 1982) можда довео до успостављања имунотолеранције на инфекцију *N. caninum* (Barber и Trees, 1998; Sager и сар., 2001).

У студији код 159 говеда расе зебу у Бразилу у којој је индиректним *ELISA* тестом утврђена серопреваленца од 15,1% (Marques и сар., 2011), за детекцију ДНК паразита у крви (*buffy coat*) 17 стеоних крава и ткивима њихових фетуса коришћен је класични метод *PCR*-а са *Np21* и *Np6* прајмерима. Од 12 серопозитивних јединки, ДНК *N. caninum* откривена је код једне (8,3%), док је код пет серонегативних крава установљена код чак четири (80%), што значи да је успешност изолације код серонегативних јединки била приближно 10 пута већа него код серопозитивних. У ткиву мозга и срца, ни код једног фетуса пореклом од пет крава позитивних у *PCR*-у није установљена ДНК паразита, али јесте код четири фетуса чије мајке нису имале паразитемију у тренутку узорковања.

У недавној студији Macedo и сарадника (2013) у бразилској клиници узорковано је 60 стеоних крава и њихових фетуса; код две краве (3,3%), од којих је једна била серонегативна, детектована је ДНК *N. caninum* у пуној крви, али ни у једном од њихових фетуса није откривена ДНК *N. caninum*. Насупрот овоме, код три фетуса пореклом од серонегативних крава код којих није утврђена ДНК паразита, у мозгу или срцу детектована је ДНК *N. caninum*. Амплификована је *pNc5* репетитивна секвенца класичним *PCR*-ом, а коришћени су прајмери *Np6* и *Np21*.

Све ове студије које показују одсуство корелације између серолошког статуса крава и изолације ДНК из крви, осим потврде да су трајне инфекције протозоом *N. caninum* могуће и у одсуству детектабилног серолошког одговора, указују и на потребу увођења молекуларне дијагностике неоспорозе ради откривања паразитемије упоредо са применом серолошког тестирања крава. У том смислу наши резултати додатно потврђују оправданост оптимизације *qPCR* метода и сагледавање могућности његове примене као једног од постављених циљева нашег рада, са крајњим ефектом увођења молекуларне дијагностике неоспорозе у стандардну процедуру ради утврђивања узрока појаве побачаја у запату као и приликом праћења епизоозиолошке ситуације овог обољења код говеда у Србији.

На крају, на основу резултата нашег истраживања, размотрених у контексту најновијих података из светске литературе, могли бисмо да у смислу превенције неоспорозе препоручимо опште подизање зоохигијенских стандарда и побољшање зоотехничких услова на фармама говеда у Србији. Ово се нарочито односи на велике фарме и фарме где се говеда држе у слободном систему, јер се везни систем показао као ниже ризичан. Ово истраживање је такође показало и да молекуларна дијагностика доприноси прецизној и брзој етиолошкој дијагнози, те се може препоручити да се уведе у рутинску дијагностику неоспорозе у специјализованим лабораторијама. Овим би се унапредила етиолошка дијагностика побачаја код крава, а тиме и ниво услуга које пружају стручне ветеринарске службе у Србији. Унапређењем зоотехничких и зоохигијенских услова, уз увођење савремених метода дијагностике, подићи ће се и ниво здравствене заштите животиња, како општи тако и у односу на специфичне инфекције као што је неоспороза.

VII ЗАКЉУЧАК

На основу резултата добијених опсежним истраживањем стања инфекције паразитом *Neospora caninum* код говеда у Србији може се закључити следеће:

- 1) Инфекција *N. caninum* је доказана код говеда на целој територији Србије, са степеном прокужености од 7,2%. Присутан је низак до умерен степен прокужености у различитим подручјима Србије (од 2,2 до 12%).
- 2) На 10,7% испитаних фарми установљено је присуство бар једне серопозитивне јединке, што представља релативно ниску стопу инфекције на нивоу фарме и говори да инфекција *N. caninum* није широко распрострањена на фармама говеда у Србији.
- 3) За серолошко испитивање говеда у Србији комерцијалним *sELISA* тестом (*VMRD*) подизање граничне вредности са 30% колико препоручује произвођач, на 40% показало се као одговарајуће. Наиме, резултати *sELISA* теста за серопозитивне јединке, тј. вредности степена инхибиције кретале су се од 40,3 до 91,8% (средња вредност $71,9 \pm 17,1\%$), са медијаном од 79,9%, што представља двоструко већу вредност од оне узете као праг позитивности (40%), и потврђује добру резолуцију теста са овако прилагођеним прагом позитивности.
- 4) Једини фактор ризика за инфекцију говеда у Србији на индивидуалном нивоу је слободан начин држања. На нивоу фарме, факторе ризика представљају величина стада >100 грла, као и слободан начин држања у односу на држање у везном систему. С обзиром на ове факторе ризика, за превенцију неоспорозе препоручује се побољшање зоохијенских и зоотехничких услова, нарочито на великим фармама, и фармама где се говеда држе у слободном систему.

- 5) Ниска до умерена прокуженост говеда, и релативно ниска стопа инфекције на фармама, уз високе вредности титра специфичних антитела код половине серопозитивних јединки, као и одсуство статистички значајне повезаности присуства паса на фармама и преваленце инфекције, иду у прилог претпоставци да је доминантни начин преношења инфекције *N. caninum* код говеда у Србији вертикалан.
- 6) Уведен је и оптимизован метод молекуларне дијагностике (*PCR* у реалном времену) за детекцију *N. caninum* изузетно високе осетљивости од 0,3 fg ДНК позитивне контроле (≈ 1 тахизоит / 2,5 mL чистог ДНК елуата, што је еквивалентно ДНК 0,3 тахизоита / mL испитиваног материјала пре екстракције). Показана је већа осетљивост метода у детекцији ДНК *N. caninum* у спајкованим узорцима МН ћелија него у узорцима пуне крви, па се стога у ове сврхе МН ћелије периферне крви и препоручују као материјал за екстракцију ДНК.
- 7) Испитивањем материјала пореклом и од серопозитивних и од серонегативних крава у овом истраживању ни у једном узорку крви или МН ћелија није утврђена ДНК паразита, што указује на то да у тренутку узорковања ни у једном случају у циркулацији није било тахизоита *N. caninum*.
- 8) Примењени молекуларно-дијагностички метод може да допринесе прецизној и брзој етиолошкој дијагностици и може се, у комбинацији са клиничким, патохистолошким и серолошким налазом, препоручити за дијагностику неоспорозе и етиолошку дијагностику побачаја код крава посебно у специјализованим лабораторијама, као и за процену и праћење епизоозиолошке ситуације овог обољења код говеда у Србији.

Изведени закључци потврђују потенцијално велики значај резултата ове Тезе и за ветеринаре на терену и за ветеринарске специјалистичке и научне институте у Србији, у смислу подизања нивоа здравствене заштите животиња и унапређења сточарства у нашој земљи.

VIII ЛИТЕРАТУРА

- Aguado-Martínez A, Alvarez-García G, Arnaiz-Seco I, Innes E, Ortega-Mora LM (2005): Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *J Vet Diagn Invest* 17: 442-450.
- Ahn HJ, Kim S, Kim DY, Nam HW (2003): ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *Korean J Parasitol* 41: 175-177.
- Almería S, Ferrer D, Pabón M, Castellà J, Mañas S (2002): Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 107: 287-294.
- Almería S, Vidal D, Ferrer D, Pabón M, Fernández-de-Mera MI, Ruiz-Fons F, Alzaga V, Marco I, Calvete C, Lavin S, Gortazar C, López-Gatius F, Dubey JP (2007): Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. *Vet Parasitol* 143: 21-28.
- 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.
- Almería S, Araujo R, Tuo W, López-Gatius F, Dubey JP, Gasbarre LC (2010): Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Vet Parasitol* 169: 304-311.
- Alvarez-García G, Collantes-Fernández E, Costas E, Rebordosa X, Ortega-Mora LM (2003): Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet Res* 34: 341-352.
- Alvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM (2013): Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet Parasitol* 198: 85-95.
- Alves Neto AF, Bandini LA, Nishi SM, Soares RM, Driemeier D, Antoniassi NAB, Schares G, Gennari SM (2011): Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. *J Parasitol* 97: 135-139.
- Ammann P, Waldvogel A, Breyer I, Esposito M, Müller N, Gottstein B (2004): The role of B- and T-cell immunity in toltrauril-treated C57BL/6 WT, mMT and nude mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasitol Res* 93: 178-187.
- Anderson M (2003): *Neospora* Infection in Dairy Cattle. Proceedings of the Minnesota Dairy Health Conference, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, May, стр. 18-24.
- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Homan RL, Conrad PA (1991): *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 198: 241-244.
- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, Read DH, Dubey JP, Conrad PA, Barr BC (1995): Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc* 207: 1206-1210.

- Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, Sverlow KW, Packham AE, Barr BC, Conrad PA (1997): Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 210: 1169-1172.
- Andreotti R, Oliveira JM, Silva EA, Oshiro LM, Matos Mde F (2006): Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet Parasitol* 135: 375-379.
- Andrianarivo AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA (2001): Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol Res* 87: 817-825.
- Анон.: Статистички годишњак Србије 2008, XLI изд., Републички завод за статистику Србије, Београд, 2008, стр. 219.
- Анон.: Статистички годишњак Србије 2009, XLII изд., Републички завод за статистику Србије, Београд, 2009, стр. 215.
- Анон.: Статистички годишњак Србије 2010, XLIII изд., Републички завод за статистику Србије, Београд, 2010, стр. 212.
- Анон.: Статистички годишњак Србије 2011, XLIV изд., Републички завод за статистику Србије, Београд, 2011, стр. 211.
- Atkinson RA, Cook RW, Reddacliff LA, Rothwell J, Broady KW, Harper P, Ellis JT (2000): Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Aust Vet J* 78: 262-266.
- 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.
- Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T (2006): A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Vet Parasitol* 139: 15-20.
- Bandini LA, Neto AF, Pena HF, Cavalcante GT, Schares G, Nishi SM, Gennari SM (2011): Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 176: 151-156.
- Barber JS, Gasser RB, Ellis J, Reichel MP, McMillan D, Trees AJ (1997): Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J Parasitol* 83: 1056-1058.
- Barber JS, Trees AJ (1998): Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int J Parasitol* 28: 57-64.
- Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, Daft BM, Kinde H, Conrad PA (1990): Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet Pathol* 27: 354-361.
- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA (1991a): *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol* 28: 110-116.
- Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, Anderson ML (1991b): *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diagn Invest* 3: 39-46.
- Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolds J, Chauvet AE, Dubey JP, Ardans AA (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.
- Barratt J, Al Qassab S, Reichel MP, Ellis JT (2008): The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. *Mol Cell Probes* 22: 228-233.
- Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D (2010): Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. *Clin Microbiol Rev* 23: 795-836.

- Bartels CJ, Wouda W, Schukken YH (1999): Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52: 247-257.
- Bartels CJ, van Maanen C, van der Meulen AM, Dijkstra T, Wouda W (2005): Evaluation of three enzyme-linked immuno-sorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet Parasitol* 131: 235-246.
- Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Björkman C, Frössling J, von Blumröder D, Conraths FJ, Schares G, van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora LM (2006a): Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol* 137: 17-27.
- Bartels CJ, van Schaik G, Veldhuisen JP, van den Borne BH, Wouda W, Dijkstra T (2006b): Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. *Prev Vet Med* 77: 186-198.
- Bartley PM, Wright SE, Zimmer IA, Roy S, Kitchener AC, Meredith A, Innes EA, Katzer F (2013): Detection of *Neospora caninum* in wild carnivores in Great Britain. *Vet Parasitol* 192: 279-283.
- Bartova E, Sedlak K, Pavlik I, Literak I (2007): Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in wild ruminants from the countryside or captivity in the Czech Republic. *J Parasitol* 93: 1216-1218.
- Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP (2001): First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol* 87: 612-618.
- Basso W, Herrmann DC, Conraths FJ, Pantchev N, Vrhovec MG, Schares G (2009): First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. *Vet Parasitol* 159: 162-166.
- Baszler TV, Knowles DP, Dubey JP, Gay JM, Mathison BA, McElwain TF (1996): Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 34: 1423-1428.
- Baszler TV, Gay LJC, Long MT, Mathison BA (1999): Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J Clin Microbiol* 37: 4059-4064.
- Baszler TV, Adams S, Vander-Schalie J, Mathison BA, Kostovic M (2001): Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J Clin Microbiol* 39: 3851-3857.
- Bech-Sabat G, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, Pabón M, Nogareda C, Yániz JL, Almería S (2007): Progesterone supplementation during mid-gestation increases the risk of abortion in *Neospora*-infected dairy cows with high antibody titres. *Vet Parasitol* 145: 164-167.
- Beck R, Marinculić A, Mihaljević Ž, Benić M, Martinković F (2010): Seroprevalence and potential risk factors of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Croatia. *Vet Arhiv* 80: 163-171.
- Benavides J, Katzer F, Maley SW, Bartley PM, Cantón G, Palarea-Albaladejo J, Purslow CA, Pang Y, Rocchi MS, Chianini F, Buxton D, Innes EA (2012): High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Vet Res* 43: 83.
- Bergeron N, Fecteau G, Paré J, Martineau R, Villeneuve A (2000): Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Can Vet J* 41: 464-467.
- Bergeron N, Fecteau G, Villeneuve A, Girard C, Paré J (2001a): Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 97: 145-152.
- Bergeron N, Girard C, Paré J, Fecteau G, Robinson J, Baillargeon P (2001b): Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J Vet Diagn Invest* 13: 173-175.

- Biocca E (1956): Alcune considerazioni sulla sistematica dei protozoi e sulla utilita di creare una nuova classe di protozoi. Rev Bras Malariol Doencas Trop 8: 91-102.
- Bjerkås I, Dubey JP (1991): Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. Acta Vet Scand 32: 407-410.
- Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J (1984): Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd 70: 271-274.
- Björkman C, Uggla A (1999): Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol 29: 1497-1507.
- Björkman C, Holmdahl OJ, Uggla A (1997): An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. Vet Parasitol 68: 251-260.
- Björkman C, Näslund K, Stenlund S, Maley SW, 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.
- Björkman C, Alenius S, Manuelsson U, Uggla A (2000): *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. Vet J 159: 201-206.
- Björkman C, Sager H, Schares G: Diagnostic Techniques – Serology. Y Ortega-Mora L, Gottstein B, Conraths F, Buxton D (упед.): Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 2007, стр. 63-74.
- Boulton JG, Gill PA, Cook RW, Fraser GC, Harper PA, Dubey JP (1995): Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. Aust Vet J 72: 119-120.
- Boysen P, Klevar S, Olsen I, Storset AK (2006). The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. Infect Immun 74: 953-960.
- Caetano-da-Silva A, Ferre I, Collantes-Fernández E, Navarro V, Aduriz G, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM (2004): Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. Theriogenology. Oct 1;62(7):1329-1336.
- Campero CM, Moore DP, Lagomarsino H, Odeón AC, Castro M, Visca H (2003): Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50: 458-460.
- Cannas A, Naguleswaran A, Müller N, Eperon S, Gottstein B, Hemphill A (2003a): Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. Parasitology 126: 303-312.
- Cannas A, Naguleswaran A, Müller N, Gottstein B, Hemphill A (2003b): Reduced cerebral infection of *Neospora caninum*-infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 and ribi adjuvant. J Parasitol 89: 44-50.
- Cantón G, Katzer F, Maley SW, Bartley P, Benavides-Silván J, Palarea-Albaladejo J, Burrells A, Pang Y, Rocchi M, Innes EA, Chianini F (2014a): Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. Vet Res 45: 11.
- Cantón GJ, Katzer F, Maley SW, Bartley PM, Benavides-Silván J, Palarea-Albaladejo J, Pang Y, Smith SH, Rocchi M, Buxton D, Innes EA, Chianini F (2014b): Cytokine expression in the placenta of pregnant cattle after inoculation with *Neospora caninum*. Vet Immunol Immunopathol 161: 77-89.
- Carson CA, Sells DM, Ristic M (1975): A method for separation of bovine blood leukocytes for in vitro studies. Am J Vet Res 36: 1091-1094.
- Cavalcante GT, Monteiro RM, Soares RM, Nishi SM, Alves Neto AF, Esmerini Pde O, Sercundes MK, Martins J, Gennari SM (2011): Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. Vet Parasitol 179: 220-223.

- Chahan B, Gaturaga I, Huang X, Liao M, Fukumoto S, Hirata H, Nishikawa Y, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Igarashi I, Mikami T, Xuan X (2003): Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1. *Vet Parasitol* 118: 177-185.
- Chanlun A, Näslund K, Aiumlamai S, Björkman C (2002): Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Vet Parasitol* 110: 35-44.
- Čobádiová A, Víchová B, Majláthová V, Reiterová K (2013): First molecular detection of *Neospora caninum* in European brown bear (*Ursus arctos*). *Vet Parasitol* 197: 346-349.
- Cole RA, Lindsay DS, Blagburn BL, Sorjonen DC, Dubey JP (1995): Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Parasitol* 81: 208-211.
- Collantes-Fernández E, Zaballos Á, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM (2002): Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40: 1194-1198.
- 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 foetuses. *Theriogenology* 65: 629-641.
- Collantes-Fernández E, Gómez-Bautista M, Miró G, Alvarez-García G, Pereira-Bueno J, Frisuelos C, Ortega-Mora LM (2008): Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet Parasitol* 152: 148-151.
- Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, Baechtel ES (1994): DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J Forensic Sciences*, JFSCA 39: 1254-1269.
- Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ardans A, Dubey JP, Duhamel G, Barr B (1993): Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest* 5: 572-578.
- Constantin EM, Schares G, Grossmann E, Sauter K, Romig T, Hartmann S (2011): [Studies on the role of the red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential definitive host of *Neospora caninum*]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124: 148-153.
- Costa AJ, Araujo FG, Costa JO, Lima JD, Nascimento E (1977): Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 63: 212-218.
- Costa KS, Santos SL, Uzêda RS, Pinheiro AM, Almeida MA, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LF (2008): Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 38: 157-159.
- Cox BT, Reichel MP, Griffiths LM (1998): Serology of a *Neospora* abortion outbreak on a dairy farm in New Zealand: a case study. *N Z Vet J* 46: 28-31.
- Cuddon P, Lin DS, Bowman DD, Lindsay DS, Miller TK, Duncan ID, deLahunta A, Cummings J, Suter M, Cooper B, King JM, Dubey JP (1992): *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. *J Vet Intern Med* 6: 325-332.
- Dannatt L (1997): *Neospora caninum* antibody levels in an endemically-infected dairy herd. *Cattle Pract* 5: 335-337.
- Darwich L, Cabezón O, Echeverría I, Pabón M, Marco I, Molina-López R, Alarcia-Alejos O, López-Gatius F, Lavín S, Almería S (2012): Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. *Vet Parasitol* 183: 377-381.
- Davison HC, Otter A, Trees AJ (1999a): Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol* 29: 1683-1689.

- Davison HC, Otter A, Trees AJ (1999b): Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int J Parasitol* 29: 1189-1194.
- Davison HC, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Williams DJ, Kelly DF, Trees AJ (2001): Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res Vet Sci* 70: 163-168.
- De Craeye S, Speybroeck N, Ajzenberg D, Dardé ML, Collinet F, Tavernier P, Van Gucht S, Dorny P, Dierick K (2011): *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae? *Vet Parasitol* 178: 64-69.
- De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L (1999): Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol* 29: 1647-1657.
- De Meerschman F, Focant C, Boreux R, Leclipteux T, Losson B, Czaplicki G (2000): Cattle neosporosis in Belgium: a case-control study in dairy and beef cattle. *Int J Parasitol* 30: 887-890.
- De Meerschman F, Speybroeck N, Berkvens D, Rettignera C, Focant C, Leclipteux T, Cassart D, Losson B (2002): Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef 20 cattle in Belgium. *Theriogenology* 58: 933-945.
- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Wouda W (2001a): Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int J Parasitol* 31: 209-215.
- Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW (2001b): 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* 31: 747-752.
- Dijkstra T, Barkema HW, Björkman C, Wouda W (2002a): A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Vet Parasitol* 109: 203-211.
- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Hesselink JW, Wouda W (2002b): Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet Parasitol* Apr 30;105(2):99-104.
- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W (2003): Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet Parasitol* 110: 161-169.
- Dijkstra T, Bartels C, Wouda W (2006): [New practice guidelines for abortion in cattle due to *Neospora caninum*?]. *Tijdschr Diergeneeskde* 131: 135.
- Dijkstra T, Lam TJ, Bartels CJ, Eysker M, Wouda W (2008): Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. *Vet Parasitol* 152: 220-225.
- Dreier KJ, Stewarter LW, Kerlin RL, Ritter DM, Brake DA (1999): Phenotypic characterisation of a *Neospora caninum* temperature-sensitive strain in normal and immunodeficient mice. *Int. J Parasitol* 29: 1627-1634.
- Dubey JP (1999): Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* 84: 349-367.
- Dubey JP (2003): Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 41: 1-16.
- Dubey JP, Lindsay DS (1989): Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am J Vet Res* 50: 1578-1579.
- Dubey JP, Lindsay DS (1996): A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 67: 1-59.
- Dubey JP, Lindsay DS (2000): Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol Res* 86: 165-168.

- Dubey JP, Schares G (2006): 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.
- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A (1988a): Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 192: 1269-1285.
- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ (1988b): Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 193: 1259-1263.
- Dubey JP, Miller S, Lindsay DS, Topper MJ (1990): *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *J Vet Diagn Invest* 2: 66-69.
- Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, Thulliez P (1996): Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am J Vet Res* 57: 329-336.
- Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister MM, Anderson-Sprecher R, Baszler TV, Kwok OC, Lally NC, Björkman C, 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.
- Dubey JP, Dorrough KR, Jenkins MC, Liddell S, Speer CA, Kwok OC, Shen SK (1998): Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int J Parasitol* 28: 1293-1304.
- Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modrý D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJ, Lindsay DS (2002): Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* 32: 929-946.
- Dubey JP, Zarnke R, Thomas NJ, Wong SK, Van Bonn W, Briggs M, Davis JW, Ewing R, Mense M, Kwok OC, Romand S, Thulliez P (2003): *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet. Parasitol* 116: 275-296.
- Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska KB, Vianna MC, Kwok OC, Hill DE, Jenkins MC, Lindsay DS, Greene CE (2004): Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int J Parasitol* 34: 1157-1167.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W (2006): Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Path* 134: 267-289.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM (2007a): Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 20: 323-367.
- Dubey JP, Vianna MC, Kwok OC, Hill DE, Miska KB, Tuo W, Velmurugan GV, Conors M, Jenkins MC (2007b): Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 149: 158-166.
- Dubey JP, Stone D, Kwok OC, Sharma RN (2008): *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in dogs from Grenada, West Indies. *J Parasitol* 94: 750-751.
- Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Choudhary S (2011): Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 181: 382-387.
- Duffield TF, Hobson J, Kelton DF, Peregrine AS, McEwen B, Hietala S, Lissemore KD, Leslie KE, Cramer G (2001): *Neospora caninum* and milk production — a theory based on a comparison of the effect in two populations of Ontario dairy herds. *Am Assoc Bovine Pract Proc* 34: 178.
- Dyer RM, Jenkins MC, Kwok OC, Douglas LW, Dubey JP (2000): Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Vet Parasitol* 90: 171-181.

- Edelhofer R, Loeschenberger K, Peschke R, Sager H, Nowotny N, Kolodziejek J, Tews A, Doneus G, Prosl H (2003): First PCR-confirmed report of a *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Austria. *Vet Rec* 152: 471-473.
- Eiras C, Arnaiz I, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, Sanjuán ML, Yus E, Diéguez FJ (2011): *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. *Prev Vet Med* 98: 128-132.
- Ekerfelt C, Matthiesen L, Berg G, Emerudh J (1997): Paternal leucocytes selectively increase secretion of IL-4 in peripheral blood during normal pregnancies: demonstrated by a novel 1-way MLC measuring cytokine secretion. *Am J Reprod Immunol* 38: 320-326.
- Eperon S, Brönnimann K, Hemphill A, Gottstein B (1999): Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (mMT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol* 21: 225-236.
- Esposito M, Stettler R, Moores SL, Pidathala C, Müller N, Stachulski A, Berry NG, Rossignol JF, Hemphill A (2005): In vitro efficacies of nitazoxanide and other thiazolides against *Neospora caninum* tachyzoites reveal antiparasitic activity independent of the nitro group. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3715-3723.
- Ferre I, Aduriz G, Del-Pozo I, Regidor-Cerrillo J, Atxaerandio R, Collantes-Fernández E, Hurtado A, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM (2005): Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology* 63: 1504-1518.
- Ferre I, Serrano-Martínez E, Martínez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, Del-Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM (2008): Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. *Theriogenology* 69: 905-911.
- Ferroglio E, Pasino M, Romano A, Grande D, Pregel P, Trisciuoglio A (2007): Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Vet Parasitol* 148: 346-349.
- Figliuolo LPC, Kasai N, Ragozo AMA, de Paula VSO, Dias RA, Souza SLP, Gennari SM (2004a): Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 123: 161-166.
- Figliuolo LPC, Rodrigues AAR, Viana RB, Aguiar DM, Kasai N, Gennari SM (2004b): Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. *Small Ruminant Res* 55: 29-32.
- Fioretti DP, 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.
- Flagstad A, Jensen HE, Bjerkås I, Rasmussen K (1995): *Neospora caninum* infection in a litter of Labrador retriever dogs in Denmark. *Acta Vet Scand* 3: 387-391.
- 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.
- Frössling J: Epidemiology of *Neospora caninum* infection in cattle. Evaluation of diagnostic tests and herd studies. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Veterinaria*, vol. 175. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2004 (докторска дисертација).
- Frössling J, Ugglå A, Björkman C (2005): Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. *Vet Parasitol* 128: 209-218.
- Frössling J, Lindberg A, Björkman C (2006): Evaluation of an iscom ELISA used for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Prev. Vet. Med.* 74: 120-129.
- Fry DR, McSporran KD, Ellis JT, Harvey C (2009): Protozoal hepatitis associated with immunosuppressive therapy in a dog. *J Vet Intern Med* 23 : 366-368.
- Fujii K, Kakumoto C, Kobayashi M, Saito S, Kariya T, Watanabe Y, Xuan X, Igarashi I, Suzuki M (2007): Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seals around Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 69: 393-398.

- Furuta PI, Mineo TW, Carrasco AO, Godoy GS, Pinto AA, Machado RZ (2007): *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology* 134: 1931-1939.
- Gaffuri A, Giacometti M, Tranquillo VM, Magnino S, Cordioli P, Lanfranchi P (2006): Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *J Wildl Dis* 42: 685-690.
- García-Bocanegra I, Cabezón O, Pabón M, Gómez-Guillamón F, Arenas A, Alcaide E, Salas-Vega R, Dubey JP, Almería S (2012): Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). *Vet J* 191: 257-260.
- García-Ispuerto I, López-Gatius F, Almería S, Yániz J, Santolaria P, Serrano B, Bech-Sàbat G, Nogareda C, Sulon J, de Sousa NM, Beckers JF (2009): Factors affecting plasma prolactin concentrations throughout gestation in high producing dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 36: 57-66.
- García-Ispuerto I, Nogareda C, Yániz JL, Almería S, Martínez-Bello D, de Sousa NM, Beckers JF, López-Gatius F (2010): *Neospora caninum* and *Coxiella burnetii* seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 74: 212-220.
- Gavrea RR, Cozma V (2010): Seroprevalence of *Neospora caninum* in cows with reproductive failure in Center and Northwest of Romania. *Sci Parasitol* 11: 67-70.
- Gavrea RR, Iovu A, Losson B, Cozma V (2011): Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle from north-west and centre of Romania. *Parasite* 18: 349-351.
- Gavrilović P, Živilj A, Todorović I, Jovanović M, Parunović J (2013): Investigation of importance of *Neospora caninum* in aetiology of abortion in dairy cows in Serbia. *Revue Méd Vét* 164: 100-104.
- Gibney EH, Kipar A, Rosbottom A, Guy CS, Smith RF, Hetzel U, Trees AJ, Williams DJ (2008): The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *Int J Parasitol* 38: 579-588.
- Gondim LF, Pinheiro AM, Santos PO, Jesus EE, Ribeiro MB, Fernandes HS, Almeida MA, Freire SM, Meyer R, McAllister MM (2001): Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet Parasitol* 101: 1-7.
- Gondim LF, Gao L, McAllister MM (2002): Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J Parasitol* 88: 1159-1163.
- Gondim LF, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Bjorkman C, Lock TF, Firkins LD, Gao L, Fischer WR (2004a): Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J Parasitol* 90: 1394-1400.
- Gondim LF, McAllister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME (2004b): Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J Parasitol* 90: 1361-1365.
- Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE (2004c): Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 34: 159-161.
- Gondim LF, McAllister MM, Gao L (2005): Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Vet Parasitol* 134: 33-39.
- González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Carro-Corral C, Mezo M (2011): Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. *Prev Vet Med* 101: 58-64.
- González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Regidor-Cerrillo J, Benavides J, Álvarez-García G, Fuertes M, Ortega-Mora LM, Mezo M (2014): *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Vet Res* 45: 88.

- Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thür B, Busato A, Stärk KDC, Müller N (1998): Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Intl J Parasitol* 28: 679-691.
- Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thür B, Bruckner L, Müller N, Kaufmann H, Waldvogel A (1999): Molekular- und immundiagnostische Untersuchungen zur bovinen Neosporose in der Schweiz. *Schweiz Arch Tierheilkd* 141: 59-68.
- Gottstein B, Eperon S, Dai WJ, Cannas A, Hemphill A, Greif G (2001): Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol Res* 87: 43-48.
- Goździk K, Jakubek EB, Björkman C, Bień J, Moskwa B, Cabaj W (2010): Seroprevalence of *Neospora caninum* in free living and farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Poland. *Pol J Vet Sci* 13: 117-120.
- Guy CS, Williams DJL, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Björkman C, Smith RF, Trees AJ (2001): *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec* 149: 443-449.
- Häsler B, Stärk K, Gottstein B, Reist M (2008): [Epidemiological and financial considerations for the control of *Neospora caninum* on Swiss dairy farms]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 150: 273-280.
- Hässig M, Gottstein B (2002): Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. *Vet Rec* 150: 538-542.
- Hässig M, Sager H, Reitt K, Ziegler D, Strabel D, Gottstein B (2003): *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. *Vet Parasitol* 117: 213-220.
- Hattel AL, Castro MD, Gummo JD, Weinstock D, Reed JA, Dubey JP (1998): Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet Parasitol* 74: 307-313.
- Heckerroth AR, Tenter AM (2007): Immunoanalysis of three litters born to a Doberman bitch infected with *Neospora caninum*. *Parasitol Res* 100: 837-846.
- Hemphill A (1999): The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv Parasitol* 43: 47-104.
- Hemphill A (2007): Generation of parasite cysts in cultured cells instead of living animals. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation* 24, Suppl: 29-31.
- Hemphill A, Gottstein B, Kaufmann H (1996): Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* 112: 183-197.
- Henning K, Schares G, Granzow H, Polster U, Hartmann M, Hotzel H, Sachse K, Peters M, Rauser M (2002): *Neospora caninum* and *Waddlia chondrophila* strain 2032/99 in a septic stillborn calf. *Vet Microbiol* 85: 285-292.
- Hering BJ, Muench KP, Schelz J, Amelang D, Heitfeld M, Bretzel RG, Bonath K, Federlin K (1990): The evaluation of neutral density separation utilizing Ficoll-sodium diatrizoate and Nycodenz and centrifugal elutriation in the purification of bovine and canine islet preparations. *Horm Metab Res Suppl* 25: 57-63.
- Hernandez J, Risco C, Donovan A (2001): Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 219: 632-635.
- Hietala SK, Thurmond MC (1999): Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serological responses in two dairies. *Int J Parasitol* 29: 1669-1676.
- Hill DE, Liddell S, Jenkins MC, Dubey JP (2001): Specific detection of *Neospora caninum* oocyst in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. *J Parasitol* 87: 395-398.
- Ho MS, BC Barr, AE Marsh, ML Anderson, JD Rowe, AF Tarantal, Hendrickx AG, Sverlow K, Dubey JP, Conrad PA (1996): Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridisation. *J Clin Microbiol* 34: 1203-1208.

- Hobson JC, Duffield TF, Kelton D, Lissemore K, Hietala SK, Leslie KE, McEwen B, Cramer G, Peregrine AS (2002): *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. J Am Vet Med Assoc 221: 1160-1164.
- Hobson JC, Duffield TF, Kelton D, Lissemore K, Hietala SK, Leslie KE, McEwen B, Peregrine AS (2005): Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. Vet Parasitol 127: 177-188.
- Holmdahl OJM, Mattsson JG (1996) Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. Parasitology 112: 177-182.
- Hoon-Hanks LL, Regan D, Dubey JP, Carol Porter M, Duncan CG (2013): Hepatic neosporosis in a dog treated for pemphigus foliaceus. J Vet Diagn Invest 25: 807-810.
- Hornok S, Nászlund K, Hajtós I, Tanyi J, Tekes L, Varga I, Uggla A, Björkman C (1998): Detection of antibodies to *Neospora caninum* in bovine postabortion blood samples from Hungary. Acta Vet Hung 46: 431-436.
- Hornok S, Edelhofer R, Hajtós I (2006): Seroprevalence of neosporosis in beef and dairy cattle breeds in Northeast Hungary. Acta Vet Hung 54: 485-491.
- Huang CC, Ting LJ, Shiau JR, Chen MC, Ooi HK (2004a): An abortion storm in cattle associated with neosporosis in Taiwan. J Vet Med Sci 66: 465-467.
- Huang CC, Yang CH, Watanabe Y, Liao YK, Ooi HK (2004b): Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). Vet Res 35: 283-290.
- Hughes JM, Williams RH, Morley EK, Cook DAN, Terry RS, Murphy RG, Smith JE, Hide G (2006): The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. Parasitology 132: 29-36.
- Huong LT, Ljungström BL, Uggla A, Björkman C (1998): Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. Vet Parasitol 75: 53-57.
- Hůrková L, Modrý D (2006): PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. Vet Parasitol 137: 150-154.
- Hůrková L, Halova D, Modrý D (2005): The prevalence of *Neospora caninum* antibodies in bulk milk of dairy herds in the Czech Republic: a case report. Vet Med (Czech) 50: 549-552.
- Ibrahim HM, Huang P, Salem TA, Talaat RM, Nasr MI, Xuan X, Nishikawa Y (2009): Short report: prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. Am J Trop Med Hyg 80: 263-267.
- Imre K, Morariu S, Ilie MS, Imre M, Ferrari N, Genchi C, Dărăbuș G (2012): Serological survey of *Neospora caninum* infection in cattle herds from Western Romania. J Parasitol 98: 683-685.
- Innes EA (2007): The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. Parasitology 134: 1903-1910.
- Innes EA, Panton WR, Marks J, Trees AJ, Holmdahl J, Buxton D (1995): Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. J Comp Pathol 113: 95-100.
- Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D (2001): Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. Int J Parasitol 31: 1523-1534.
- Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA (2002): Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends Parasitol 18: 497-504.
- Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D (2005): The host-parasite relationship in bovine neosporosis. Vet Immunol Immunopathol 108: 29-36.

- Innes EA, Bartley PM, Maley SW, Wright SE, Buxton D (2007): Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* 25: 5495-5503.
- Jardine JE (1996): The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet Parasitol* 62: 231-240.
- Jenkins MC, Wouda W, Dubey JP (1997): Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 270-274.
- Jenkins MC, Fetterer R, Schares G, Björkman C, Wapenaar W, McAllister M, Dubey JP (2005): HPLC purification of re-combinant NcGRA6 antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 131: 227-234.
- Kamga-Waladjo AR, Gbati OB, Kone P, Lapo RA, Chatagnon G, Bakou SN, Pangui LJ, Diop PelH, Akakpo JA, Tainturier D (2010): Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar – Senegal, West Africa. *Trop Anim Health Prod* 42: 953-959.
- Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, Dobbelaere D, Dubey JP, Holmdahl OJ, Trees A, Gottstein B (1996): Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol Cell Probes* 10: 289-297.
- Kim JH, Kang MS, Lee BC, Hwang WS, Lee CW, So BJ, Dubey JP, Kim DY (2003): Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs and raccoon dogs in Korea. *Korean J Parasitol* 41: 243-245.
- King JS, Šlapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA (2010): Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 40: 945-950.
- King JS, McAllan B, Spielman DS, Lindsay SA, Hůrková-Hofmannová L, Hartigan A, Al-Qassab SE, Ellis JT, Šlapeta J (2011): Extensive production of *Neospora caninum* tissue cysts in a carnivorous marsupial succumbing to experimental neosporosis. *Vet Res* 42: 75.
- King JS, Brown GK, Jenkins DJ, Ellis JT, Fleming PJ, Windsor PA, Šlapeta J (2012): Oocysts and high seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs living in remote Aboriginal communities and wild dogs in Australia. *Vet Parasitol* 187: 85-92.
- Klevar S, Kulberg S, Boysen P, Storset AK, Moldal T, Björkman C, Olsen I (2007): Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *Int J Parasitol* 37: 329-339.
- Klevar S, Norström M, Tharaldsen J, Clausen T, Björkman C (2010): The prevalence and spatial clustering of *Neospora caninum* in dairy herds in Norway. *Vet Parasitol* 170: 153-157.
- Klun I, Djurković-Djaković O, Katić-Radivojević S, Nikolić A (2006): Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol* 135: 121-131.
- Klun I, Nikolić A, Vujanić M, Ivoić V, Bobić B, Djurković-Djaković O (2008): Pilot study of *Neospora caninum* seroprevalence in cattle in Serbia. 10th European Multicollloquium of Parasitology, Paris, France, 24-28.08. Program & Abstract Book, crp. 192.
- Klun I, Vujanić M, Yera H, Nikolić A, Ivoić V, Bobić B, Bradonjić S, Dupouy-Camet J, Djurković-Djaković O (2011): *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Vet Res* 42: 17.
- Kobayashi Y, Yamada M, Omata Y, Koyama T, Saito A, Matsuda T, Okuyama K, Fujimoto S, Furuoka H, Matsui T (2001): Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J Parasitol* 87: 434-436.
- Koyama T, Kobayashi Y, Omata Y, Yamada M, Furuoka H, Maeda R, Matsui T, Saito A, Mikami T (2001): Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. *J Parasitol* 87: 1486-1488.

- Kritzner S, Sager H, Blum J, Krebber R, Greif G, Gottstein B (2002): An explorative study to assess the efficacy of toltrazuril-sulfone (ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 1: 4.
- Kuruca Lj, Spasojević-Kosić Lj, Simin S, Savović M, Lauš S, Lalošević V (2013): *Neospora caninum* antibodies in dairy cows and domestic dogs from Vojvodina, Serbia. *Parasite* 20: 40.
- Kyaw T, Virakul P, Muangyai M, Suwimonterabutr J (2004): *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle in central Thailand. *Vet Parasitol* 121: 255-263.
- Kyaw T, Suwimonterabutr J, Virakul P, Lohachit C, Kalpravidh W (2005): Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. *Vet Parasitol* 131: 145-150.
- Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP (1996): Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 275-279.
- Landmann JK, Jillella D, O'Donoghue PJ, McGowan MR (2002): Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust Vet J* 80: 502-503.
- Larson RL, Hardin DK, Pierce VL (2004): Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *J Am Vet Med Assoc* 224: 1597-1604.
- Léger L (1911): *Caryospora simplex*, coccidie monosporee et la classification des coccidies. *Arch Protistenk* 22: 71-86.
- Léger L, Duboscq O (1910): *Selenococcidium intermedium* Lég. et Dub. et la systématique des sporozoaires. *Arch Zool Exp Gen* 5: 187-238.
- Lemberger KY, Gondim LF, Pessier AP, McAllister MM, Kinsel MJ (2005): *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent canine distemper virus infection. *J Parasitol* 91: 960-961.
- Leuckart R (1879): *Die Parasiten des Menschen*. 2nd ed., GF Winter, Leipzig, 344 ctp.
- Levine ND (1970): Taxonomy of the Sporozoa. *J Parasitol* 56: 208-209.
- Levine ND: *The protozoan phylum Apicomplexa*. Volume I. CRC Press, Boca Raton, 1988, 203 ctp.
- Liddell S, Jenkins MC, Collica CM, Dubey JP (1999a): Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J Parasitol* 85: 1072-1075.
- Liddell S, Jenkins MC, Dubey JP (1999b): A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int. J Parasitol* 29: 1583-1587.
- Liddell S, Jenkins MC, Dubey JP (1999b): Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *J Parasitol* 85: 550-555.
- Lindsay DS, Dubey JP (1989): Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res* 50: 1981-1983.
- Lindsay DS, Dubey JP (1990): Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J Parasitol* 76: 410-413.
- Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP (1992): Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J Parasitol* 78: 70-72.
- Lindsay DS, Kelly EJ, McKown RD, Stein FJ, Plozer J, Herman J, Blagburn BL, Dubey JP (1996): Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J Parasitol* 82: 657-659.
- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB (1999a): Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 82: 327-333.

- Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP (1999b): A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol* 29: 1521-1523.
- Lindsay DS, Ritter DM, Brake D (2001): Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *J Parasitol* 87: 909-911.
- Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR (2006): Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin Vaccine Immunol* 13: 84-89.
- López-Gatius F, López-Béjar M, Murugavel K, Pabón M, Ferrer D, Almería S (2004a): *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in Northeast Spain. *J Vet Med B* 51: 348-352.
- López-Gatius F, Pabón M, Almería S (2004b): *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 62: 606-613.
- López-Gatius F, Santolaria P, Almería S (2005a): *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52: 51-53.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Almería S (2005b): 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.
- López-Gatius F, Almería S, Donofrio G, Nogareda C, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yániz JL, Pabón M, de Sousa NM, Beckers JF (2007): Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology* 68: 1067-1073.
- Löschnerberger K, Szölgyényi W, Peschke R, Prosl H (2004): Detection of the protozoan *Neospora caninum* using in situ polymerase chain reaction. *Biotech Histochem* 79: 101-105.
- Lunden A, Wright S, Allen JE, Buxton D (2002): Immunisation of mice against neosporosis. *Int J Parasitol* 32: 867-876.
- Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes EA (2004): Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J Comp Pathol* 131: 142-156.
- Macedo CA, Macedo MF, Cardim ST, Paiva MC, Taroda A, Barros LD, Cunha IA, Zulpo DL, Garcia JL (2013): *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered dairy cows (*Bos taurus*). *Rev Bras Parasitol Vet* 22: 13-17.
- Mainar-Jaime RC, Thurmond MC, Berzal-Herranz B, Hietala SK (1999): Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet Rec* 145: 72-75.
- Maley SW, Buxton D, Rae AG, Wright SE, Schock A, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Swales C, Hamilton CM, Sales J, Innes EA (2003): The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J Comp Pathol* 129: 186-195.
- Maley SW, Buxton D, Macaldowie CN, Anderson IE, Wright SE, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Hamilton CM, Storset AK, Innes EA (2006): Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J Comp Pathol* 135: 130-141.
- Malmsten J, Jakubek EB, Björkman C (2011): Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in moose (*Alces alces*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden. *Vet Parasitol* 177: 275-280.
- Marks J, Lunden A, Harkins D, Innes E (1998): Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol* 20: 303-309.

- Marques FA, Headley AS, Figueredo-Pereira V, Taroda A, Barros LD, Cunha IA, Munhoz K, Bugni FM, Zulpo DL, Igarashi M, Vidotto O, Guimarães JS Jr, Garcia JL (2011): *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitol Res* 108: 1015-1019.
- Matthiesen L, Ekerfelt C, Berg G, Ernerudh J (1998): Increased numbers of circulating interferon- γ and interleukin-4 secreting cells during normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 39: 362-367.
- McAllister MM, Huffman EM, Hietala SK, Conrad PA, Anderson ML, Salman MD (1996): Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J Vet Diagn Invest* 8: 355-357.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM (1998): Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28: 1473-1478.
- McAllister M, Wills RA, McGuire AM, Jolley WR, Tranas JD, Williams ES, Lindsay DS, Björkman C, Belden EL (1999): Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species. *Int J Parasitol* 29: 1531-1536.
- McAllister MM, Björkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG (2000): Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 217: 881-887.
- McCann CM, McAllister MM, Gondim LF, Smith RF, Cripps PJ, Kipar A, Williams DJ, Trees AJ (2007): *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. *Int J Parasitol* 37: 1631-1639.
- McGarry JW, Stockton CM, Williams DJ, Trees AJ (2003): Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J Parasitol* 89: 628-630.
- McGuire AM, McAllister M, Wills RA, Tranas JD (1999): Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol* 29: 1525-1529.
- McInnes LM, Ryan UM, O'Handley R, Sager H, Forshaw D, Palmer DG (2006): Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. *Vet Parasitol* 142: 207-213.
- Medina L, Cruz-Vazquez C, Quezada T, Morales E, Garcia-Vazquez Z (2006): Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol* 136: 187-191.
- Meerburg BG, De Craeye S, Dierick K, Kijlstra A (2012): *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. *Vet Parasitol* 184: 317-320.
- Meseck EK, Njaa BL, Haley NJ, Park EH, Barr SC (2005): Use of a multiplex polymerase chain reaction to rapidly differentiate *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* in an adult dog with necrotizing myocarditis and myocardial infarct. *J Vet Diagn Invest* 17: 565-568.
- Mickey RM, Greenland S (1989): The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am J Epidemiol* 129: 125-137.
- Millán J, Cabezón O, Pabón M, Dubey JP, Almería S (2009a): Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris catus*) in Majorca, Balearic Islands, Spain. *Vet Parasitol* 165: 323-326.
- Millán J, Candela MG, Palomares F, Cubero MJ, Rodríguez A, Barral M, de la Fuente J, Almería S, León-Vizcaíno L (2009b): Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet J* 182: 114-124.
- Miller MA, Conrad PA, Harris M, Hatfield B, Langlois G, Jessup DA, Magargal SL, Packham AE, Toy-Choutka S, Melli AC, Murray MA, Gulland FM, Grigg ME (2010): A protozoal-associated

- epizootic impacting marine wildlife: Mass-mortality of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) due to *Sarcocystis neurona* infection. *Vet Parasitol* 172: 183-194.
- Mitreă IL, Enăchescu V, Radulescu R, Ionita M (2012): Seroprevalence of *Neospora caninum* infection on dairy cattle in farms from southern Romania. *J Parasitol* 98: 69-72.
- Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EAM, Vanwerven T (1998): Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 49: 1301-1309.
- Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghighi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, Yeganeh F, Kazemi B, Taghipour N, Akhoundi B (2013): Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania infantum* infection in human and dog blood samples *Exp Parasitol* 133: 89-94.
- Molina-López R, Cabezón O, Pabón M, Darwich L, Obón E, Lopez-Gatius F, Dubey JP, Almería S. (2012): High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the Common raven (*Corvus corax*) in the Northeast of Spain. *Res Vet Sci* 93: 300-302.
- Monney T, Hemphill A (2014): Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? *Exp Parasitol* 140: 52-70.
- More G, D Bacigalupe, W Basso, M Rambeaud, F Beltrame, B Ramirez, MC Venturini, L Venturini (2009): Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle, *Vet Parasitol* 160: 51-54.
- Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM (2012): Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol* 187: 312-318.
- Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C (2004): [Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*]. *Parassitologia* 46: 163-167.
- Moskwa B, Cabaj W, Pastusiak K, Bien J (2003): The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. *Acta Parasitol* 48: 138-141.
- Moskwa B, Pastusiak K, Bien J, Cabaj W (2007): The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol Res* 100: 633-636.
- Mugridge NB, Morrison DA, Heckeroth AR, Johnson AM, Tenter AM (1999): Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 29: 1545-1556.
- Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B (1996): Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J Clin Microbiol* 34: 2850-2852.
- Müller N, Sager H, Hemphill A, Mehlhorn H, Heydorn AO, Gottstein B (2001): Comparative molecular investigation of Nc5-PCR amplicons from *Neospora caninum* NC-1 and *Hammondia heydorni*-Berlin-1996. *Parasitol Res* 87: 883-885.
- Müller N, Vonlaufen N, Gianinazzi C, Leib SL, Hemphill A (2002): Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. *J Clin Microbiol* 40: 252-255.
- Muñoz-Zanzi CA, Thurmond MC, Hietala SK (2004) Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology* 61: 1085-1099.
- O'Handley R, Liddell S, Parker C, Jenkins MC, Dubey JP (2002). Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. *J Parasitol* 88: 1120-1123.
- Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, Stowell KM, Gillespie L (2004): The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. *Vet Parasitol* 122: 307-315.

- Okeoma CM, Stowell KM, Williamson NB, Pomroy WE (2005): *Neospora caninum*: quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Exp Parasitol* 110: 48-55.
- Omata Y, Umeshita Y, Watarai M, Tachibana M, Sasaki M, Murata K, Yamada TK (2006): Investigation for presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* species infection in killer whales (*Orcinus orca*) mass-stranded on the coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 68: 523-526.
- Ortega-Mora LM, Ferre I, del-Pozo I, Caetano-da-Silva A, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Aduriz G (2003): Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet Parasitol* 117: 301-308.
- Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M (2006): Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives *Acta Parasitol* 51: 1-14.
- Ortuño A, Castellà J, Almería S (2002): Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Spain. *J Parasitol* 88: 1263-1266.
- Osawa T, Wastling J, Maley S, Buxton D, Innes EA (1998): A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Vet Parasitol* 79: 19-34.
- Osburn BI, MacLachlan NJ, Terrell TG (1982): Ontogeny of the immune-system *J Am Vet Med Assoc* 181: 1049-1052.
- O'Toole D, Jeffrey M (1987): Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet Rec* 121: 563-566.
- Otranto D, Llazari A, Testini G, Traversa D, Frangipane di Regalbono A, Badan M, Capelli G (2003): Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet Parasitol* 118: 7-18.
- 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* 136: 602-606.
- Otter A, Jeffrey M, Scholes SF, Helmick B, Wilesmith JW, Trees AJ (1997a): Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Vet Rec* 141: 487-489.
- Otter A, Wilson BW, Scholes SF, Jeffrey M, Helmick B, Trees AJ (1997b): Results of a survey to determine whether *Neospora* is a significant cause of ovine abortion in England and Wales. *Vet Rec* 140: 175-177.
- Ould-Amrouche A, Klein F, Osdoit C, Mohamed HO, Touratier A, Sanaa M, Mialot JP (1999): Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet Res* 30: 531-538.
- Pabón M, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Nogareda C, Almería S (2007): Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. *Vet Parasitol* 147: 40-46.
- Pan Y, Jansen GB, Duffield TF, Hietala S, Kelton D, Lin CY, Peregrine AS (2004): Genetic susceptibility to *Neospora caninum* infection in Holstein cattle in Ontario. *J Dairy Sci* 87: 3967-3975.
- Panadero R, Paineira A, López C, Vázquez L, Paz A, Díaz P, Dacal V, Cienfuegos S, Fernández G, Lago N, Díez-Baños P, Morondo P (2010): Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). *Res Vet Sci* 88: 111-115.
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC (1995a): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest* 7: 352-359.
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC (1995b): Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest* 7: 273-275.

- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK (1996): Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can J Vet Res* 60: 133-139.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK (1997): *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 83: 82-87.
- Parish SM, Maag-Miller L, Besser TE, Weidner JP, McElwain T, Knowles DP, Leathers CW (1987): Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J Am Vet Med Assoc* 191: 1599-1600.
- Patitucci AN, Charleston WA, Alley MR, O'Connor RJ, Pomroy WE (1999): Serological study of a dairy herd with a recent history of *Neospora* abortion. *N Z Vet J* 47: 28-30.
- Pavičić Lj, Lalošević V, Spasojević-Kosić Lj, Lauš S, Simin S (2011): Seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs. *Savremena poljoprivreda* 60: 453-457.
- Pena HF, Soares RM, Ragozo AM, Monteiro RM, Yai LE, Nishi SM, Gennari SM (2007): Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. *Vet Parasitol* 147: 61-66.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM (2003): Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet Parasitol* 111: 143-152.
- Peters M, Wagner F, Schares G (2000): Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitol Res* 86: 1-7.
- Peters M, Lütkefels E, Heckerroth AR, Schares G (2001a): Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol* 31: 1144-1148.
- Peters M, Wohlsein P, Knieriem A, Schares G (2001b): *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). *Vet. Parasitol* 97: 153-157.
- Pitel PH, Pronost S, Gargala G, Anrioud D, Toquet MP, Foucher N, Collobert-Laugier C, Fortier G, Ballet JJ (2002): Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. *Int. J Parasitol* 32: 481-485.
- Ploneczka K, Mazurkiewicz M (2008): Seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs in south-western Poland. *Vet Parasitol* 153: 168-171.
- Poche F (1913): Das System der Protozoa. *Arch Protistenk* 30: 125-321.
- Quinn HE, Ellis JT, Smith NC (2002): *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends in Parasitology* 18: 391-394.
- Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora LM (2000): Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int J Parasitol* 30: 900-906.
- Regidor-Cerrillo J, Arranz-Solís D, Benavides J, Gómez-Bautista M, Castro-Hermida JA, Mezo M, Pérez V, Ortega-Mora LM, González-Warleta M (2014): *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Vet Res* 45: 10.
- Reichel MP (1998): Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. *N Z Vet J* 46: 38.
- Reichel MP, Ellis JT (2002): Control options for *Neospora caninum* infections in cattle – current state of knowledge. *N Z Vet J* 50: 86-92.
- Reichel MP, Ellis JT (2006): If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet Parasitol* 142: 23-34.
- Reichel MP, Thornton RN, Morgan PL, Mills RJ, Schares G (1998): Neosporosis in a pup. *N Z Vet J* 46: 106-110.
- Reichel MP, McAllister MM, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT (2014): Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? *Parasitology* 141: 1455-1470.

- Remington JS, Melton ML, Jacobs L (1961): Induced and spontaneous recurrent parasitemia in chronic infections with avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 87: 578-581.
- Robert-Gangneux F, Klein F (2009): Serologic screening for *Neospora caninum*, France. *Emerg Infect Dis* 15: 987-989.
- Rodrigues AA, Gennari SM, Aguiar DM, Sreekumar C, Hill DE, Miska KB, Vianna MC, Dubey JP (2004): Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Vet Parasitol* 124: 139-150.
- Rodriguez I, Choromanski L, Rodgers SJ, Weinstock D (2002): Survey of *Neospora caninum* antibodies in dairy and beef cattle from five regions of the United States. *Vet Ther* 3: 396-401.
- Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, López-Pérez I, Risco-Castillo V, Prenafeta A, Ortega-Mora LM (2012): Evaluation of the protection conferred by a naturally attenuated *Neospora caninum* isolate against congenital and cerebral neosporosis in mice. *Vet Res* 43: 62.
- Romand S, Thulliez P, Dubey JP (1998): Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res* 84: 50-53.
- Romanelli PR, Freire RL, Vidotto O, Marana ERM, Ogawa L, de Paula VSO, Garcia JL, Navarro IT (2007): Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Res Vet Sci* 82: 202-207.
- Romero JJ, Perez E, Dolz G, Frankena K (2002): Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev Vet Med* 53: 263-273.
- Romero JJ, Frankena K (2003): The effect of the dam-calf relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rican dairy farms. *Vet Parasitol* 114: 159-171.
- Romero JJ, Breda SV, Vargas B, Dolz G, Frankena K (2005): Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology* 64: 1928-1939.
- Rosbottom A, Guy CS, Gibney EH, Smith RF, Valarcher JF, Taylor G, Williams DJ (2007): Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol* 29: 219-228.
- Rosbottom A, Gibney EH, Guy CS, Kipar A, Smith RF, Kaiser P, Trees AJ, Williams DJ (2008): Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infect Immun* 76: 2352-2361.
- Rosbottom A, Gibney H, Kaiser P, Hartley C, Smith RF, Robinson R, Kipar A, Williams DJ (2011): Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *PLoS One* 6: e15799.
- Rosypal AC, Lindsay DS (2005): The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol* 21: 439-440.
- Russell AS, Johnston C, Chew C, Maksymowych WP (1997): Evidence for reduced Th1 function in normal pregnancy: a hypothesis for the remission of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24: 1045-1050.
- Sager H, Fischer I, Furrer K, Strasser M, Waldvogel A, Boerlin P, Audige L, Gottstein B (2001): A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet Parasitol* 102: 1-15.
- Sanderson MW, Gay JM, Baszler TV (2000): *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet Parasitol* 90: 15-24.
- Santolaria P, López-Gatius F, Yániz J, García-Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sàbat G, Serrano B, Almeria S (2009): Early postabortion recovery of *Neospora*-infected lactating dairy cows. *Theriogenology* 72: 798-802.
- Savović M, Lalošević V, Simin, S, Pavičić L, Boboš S (2012): Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cows with reproductive disorders in Vojvodina Province, Serbia. *Lucr St Med Vet Timisoara* 4: 161-166.

- 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. *Vet Parasitol* 90: 247-252.
- Scarpelli L, Lopes W D Z, Migani M, Bresciani K D S, da Costa A J (2009): *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. *Pesq Vet Bras* 29: 59-64.
- Schares G, Peters M, Wurm R, Tackmann K, Henning K, Conraths F J (1997): *Neospora caninum* verursacht Aborte in einem Rinderbestand in Nordrhein-Westfalen. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 104: 208-212.
- Schares G, Peters M, Wurm R, Bärwald A, Conraths F J (1998): The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 80: 87-98.
- Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurm R, Dubey J P, de Graaf D C, Edelhofer R, Mertens C, Hess G, Conraths F J (1999): Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *J Parasitol* 85: 688-694.
- Schares G, Rauser M, Söndgen P, Rehberg P, Bärwald A, Dubey J P, Edelhofer R, Conraths F J (2000): Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 30: 1123-1130.
- Schares G, Heydorn A O, Cüppers A, Conraths F J, Mehlhorn H (2001a): Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitol Res* 87: 873-877.
- Schares G, Heydorn A O, Cüppers A, Conraths F J, Mehlhorn H (2001b): *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. *Parasitol Res* 87: 808-816.
- Schares G, Bärwald A, Staubach C, Söndgen P, Rauser M, Schröder R, Peters M, Wurm R, Selhorst T, Conraths F J (2002a): p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol* 106: 293-305.
- Schares G, Heydorn A O, Cüppers A, Mehlhorn H, Geue L, Peters M, Conraths F J (2002b): In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. *Parasitol Res* 88: 44-52.
- Schares G, Bärwald A, Staubach C, Ziller M, Klöss D, Wurm R, Rauser M, Labohm R, Dräger K, Fasen W, Hess R G, Conraths F J (2003): Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression. *Int J Parasitol* 33: 1631-1640.
- Schares G, Bärwald A, Staubach C, Wurm R, Rauser M, Conraths F J, Schroeder C (2004a): Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet Parasitol* 120: 55-63.
- Schares G, Bärwald A, Staubach C, Ziller M, Klöss D, Schröder R, Labohm R, Dräger K, Fasen W, Hess R G, Conraths F J (2004b): Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology* 129: 301-309.
- Schares G, Bärwald A, Conraths F J (2005a): Adaptation of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52: 45-48.
- Schares G, Pantchev N, Barutzki D, Heydorn A O, Bauer C, Conraths F J (2005b): Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int J Parasitol* 35: 1525-1537.
- Schares G, Wilking H, Bolln M, Conraths F J, Bauer C (2009): *Neospora caninum* in dairy herds in Schleswig-Holstein, Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 122: 47-50.
- Schatzberg S J, Haley N J, Barr S C, deLahunta A, Olby N, Munana K, Sharp N J (2003): Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the antemortem diagnosis of toxoplasmosis and neosporosis in the central nervous system of cats and dogs. *Am J Vet Res* 64: 1507-1513.

- Sharma SP, Dubey JP (1981): Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in pepsin and in trypsin solutions. *Am J Vet Res* 42: 128-130.
- Sharma S, Bal MS, Meenakshi, Kaur K, Sandhu KS, Dubey JP (2008): Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs in India. *J Parasitol* 94: 303-304.
- Shimaoka Y, Hidaka Y, Tada H, Nakamura T, Mitsuda N, Morimoto Y, Murata Y, Amino N (2000): Changes in cytokine production during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 44: 143-147.
- Šlapeta JR, Modrý D, Kyselová I, Horejs R, Lukes J, Koudela B (2002): Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet Parasitol* 109: 157-167.
- Sobrino R, Dubey JP, Pabón M, Linarez N, Kwok OC, Millán J, Arnal MC, Luco DF, López-Gatius F, Thulliez P, Gortázar C, Almería S (2008): *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 155: 190-197.
- Söndgen P, Peters M, Bärwald A, Wurm R, Holling F, Conraths FJ, Schares G (2001): Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet Parasitol* 102: 279-290.
- Speer CA, Dubey JP (1989): Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J Protozool* 36: 458-463.
- Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, Blixt JA (1999): Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 29: 1509-1519.
- Spencer JA, Witherow AK, Blagburn BL (2000): A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. *J Parasitol* 86: 1366-1368.
- Sreekumar C, Hill DE, Fournet VM, Rosenthal BM, Lindsay DS, Dubey JP (2003): Detection of *Hammondia heydorni*-like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *J Parasitol* 89: 1082-1085.
- Sreekumar C, Hill DE, Miska KB, Rosenthal BM, Vianna MC, Venturini L, Basso W, Gennari SM, Lindsay DS, Dubey JP (2004): *Hammondia heydorni*: evidence of genetic diversity among isolates from dogs. *Exp Parasitol* 107: 65-71.
- Staska LM, McGuire TC, Davies CJ, Lewin HA, Baszler TV (2003): *Neospora caninum* infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun* 71: 3272-3279.
- Staska LM, Davies CJ, Brown WC, McGuire TC, Suarez CE, et al. (2005): Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4+ cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected holstein cattle. *Infect Immun* 73: 1321-1329.
- Steinman A, Shpigel NY, Mazar S, King R, Baneth G, Savitsky I, Shkap V (2006): Low seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild canids in Israel. *Vet Parasitol* 137: 155-158.
- Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Björkman C (1999): Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 85: 227-234.
- Stuart P, Zintl A, De Waal T, Mulcahy G, Hawkins C, Lawton C (2013): Investigating the role of wild carnivores in the epidemiology of bovine neosporosis. *Parasitology* 140: 296-302.
- Su CL, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD (2003): Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299: 414-416.
- Teodorović V, Vasilev D, Cirović D, Marković M, Cosić N, Djurić S, Djurković-Djaković O (2014): The wolf (*Canis lupus*) as an indicator species for the sylvatic *Trichinella* cycle in the Central Balkans. *J Wildl Dis* 50: 911-915.

- Thilsted JP, Dubey JP (1989): Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1: 205-209.
- Thornton RN, Thompson EJ, Dubey JP (1991): *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *N Z Vet J* 39: 129-133.
- Thrusfield M: Veterinary Epidemiology. 3rd edition, Blackwell Science, Oxford, 2005, 610 ctp.
- Thurmond MC, Hietala SK (1996): Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am J Vet Res* 57: 1559-1562.
- Thurmond MC, Hietala SK (1997a): Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res* 58: 1381-1385.
- Thurmond MC, Hietala SK (1997b): Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 210: 672-674.
- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC (1997): Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Invest* 9: 44-49.
- Tran J, Heinzen RA, Weiss LM, McAllister MM. (1999): Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 765-767.
- Trees AJ, Williams DJ (2000): Neosporosis in the United Kingdom. *Int J Parasitol* 30: 891-893.
- Trees AJ, Williams DJ (2005): Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol* 21: 558-561.
- Trees AJ, Guy F, Low JC, Roberts L, Buxton D, Dubey JP (1994): Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet Rec* 134: 405-407.
- Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM (1999): Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 29: 1195-1200.
- Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams DJL (2002): *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet Parasitol* 109: 147-154.
- Uggla A, Stenlund S, Holmdahl OJ, Jakubek EB, Thebo P, Kindahl H, Björkman C (1998): Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J Parasitol* 28: 1467-1472.
- Uzeda RS, Costa Kde S, Santos SL, Pinheiro AM, De Almeida MA, McAllister MM, Gondim LF (2007): Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. *Korean J Parasitol* 45: 295-299.
- van Maanen C, Wouda W, Schares G, von Blumröder D, Conraths FJ, Norton R, Williams DJL, Esteban-Redondo I, Innes EA, Mattsson JG, Björkman C, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, Müller N, Sager H, Hemphill A (2004): An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol* 126: 351-364.
- Varcasia A, Capelli G, Ruiu A, Ladu M, Scala A, Björkman C (2006): Prevalence of *Neospora caninum* infection in Sardinian dairy farms (Italy) detected by iscom ELISA on tank bulk milk. *Parasitol Res* 98: 264-267.
- Vidić B, Grgić Ž, Savić S, Bugarski D (2011): *Neospora caninum* causes abortions in cows. Scientific Symposium Reproduction of Domestic Animals, Divčibare, Serbia, 13-16.10. Proceedings (Lazarević M, *ured.*), ctp. 133-134.
- Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Ingland JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM, Pisano E, Ortis N, Pinon JM (2004): Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 70: 4035-4039.
- Vitor RW, Ferreira AM, Fux B (1999): Antibody response in goats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol* 81: 259-263.
- Vonlaufen N, Müller N, Keller N, Naguleswaran A, Bohne W, McAllister MM, Björkman C, Müller E, Caldelari R, Hemphill A (2002): Exogenous nitric oxide triggers *Neospora caninum*

- tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. *Int J Parasitol* 32: 1253-1265.
- Waldner CL, Janzen ED, Ribble CS (1998): Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds *J Am Vet Med Assoc* 213: 685-690.
- Waldner CL, Janzen ED, Henderson J, Haines DM (1999): Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *J Am Vet Med Assoc* 215: 1448-1449, 1485-1490.
- Watanase M, Iwatani Y, Amino N (1997): Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 37: 368-377.
- Weber FH, Jackson JA, Sobecki B, Choromanski L, Olsen M, Meinert T, Frank R, Reichel MP, Ellis JT (2013): On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of *Neospora*-associated fetal loss in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 20: 99-105.
- Wanha K, Edelhofer R, Gabler-Eduardo C, Prosl H (2005): Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Vet Parasitol* 128: 189-193.
- Weston JF, Heuer C, Williamson NB (2012): Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev Vet Med* 103: 136-144.
- Williams DJL, Trees AJ (2006): Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. *Parasite Immunol* 28: 61-67.
- Williams DJ, McGarry J, Guy F, Barber J, Trees AJ (1997): Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet Rec* 140: 328-331.
- Williams DJ, Davison HC, Helmick B, McGarry J, Guy F, Otter A, Trees AJ (1999): Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle. *Vet Rec* 145: 571-575.
- Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, F. Guy, L. Tasker, R.F. Smith, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ (2000): *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121: 347-358.
- Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Guy F, McGarry JW, McKay JS, Trees AJ (2003): First demonstration of protective immunity in cattle with latent *Neospora caninum* infections. *Int J Parasitol* 33: 1059-1065.
- Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Ellis J, Björkman C, Reichel MP, Trees AJ (2007): Immunisation of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against foetal death. *Infect Immun* 75: 1343-1348.
- Williams DJ, Hartley CS, Björkman C, Trees AJ (2009): Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136: 1895-1900.
- Wolf M, Cachin M, Vandevelde M, Tipold A, Dubey JP (1991): [The clinical diagnosis of protozoal myositis syndrome (*Neospora caninum*) of puppies]. *Tierarztl Prax* 19: 302-306.
- Wouda W, de Jong JK, van Knapen F, Walvoort HC (1993): [*Neospora caninum* as a cause of lameness symptoms in young dogs]. *Tijdschr Diergeneesk* 118: 397-401.
- Wouda W, Moen AR, Visser IJ, Vanknapen K (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 organism in brain, heart and liver. *J Vet Diag Invest* 9: 180-185.
- Wouda W, Brinkhof J, van Maanen C, de Gee AL, Moen AR (1998a): Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: A comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5: 711-716.
- Wouda W, Moen AR, Schukken YH (1998b): Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49: 1311-1316.

- Wouda W, Bartels CJM, Moen AR (1999a): Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology* 52: 233-245.
- Wouda W, Dijkstra T, Kramer AM, van Maanen C, Brinkhof JM (1999b): Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol* 29: 1677-1682.
- Wouda W: Biology, Transmission and Clinical Signs. Y Ortega-Mora L, Gottstein B, Conraths F, Buxton D (упед.): Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 2007, сrp. 46-53.
- Yamaga M, Flechtner O, Gottstein B (1996): *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J Parasitol* 82: 272-279.
- Yániz JL, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Serrano B, Nogareda C, Sanchez-Nadal JA, Almeria S, Santolaria P (2010): Some factors affecting the abortion rate in dairy herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions are different in cows and heifers. *Reprod Domest Anim* 45: 699-705.
- Yao L, Yang N, Liu Q, Wang M, Zhang W, Qian WF, Hu YF, Ding J (2009): Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitology* 136: 1251-1256.

БИОГРАФИЈА И ПРИЛОЗИ

Ивана Клун је рођена 1967. године у Београду. Са просечном оценом 9,02 дипломирала је на Ветеринарском факултету у Београду 1996., када је и уписала магистарске студије на терет буџета Мин. просвете Р Србије (од 1996-98., а школске 1996/97. била је и добитник стипендије за постдипломце). Магистарску тезу “Сероепизоотиолошка студија инфекције копитара и папкара паразитом *Toxoplasma gondii* у Србији” одбранила је 23.09.2005. Школске 2007/08. уписала је специјалистичке студије из Паразитологије и паразитских болести на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду, и специјалистички рад “Изолација паразита *Toxoplasma gondii* из крви свиња на линији клања у београдским кланицама” одбранила 24.12.2010.

Радила је као волонтер на Катедри за Паразитске болести Ветеринарског факултета од 01.10.1997., а од 1998-2000. на истој Катедри/Предмету је била и запослена у својству приправника-талента обдареног за научно-истраживачки и образовни рад, према програму РЗТР. Стручни испит за раднике са високом школском спремом који раде у ветеринарским организацијама на пословима здравствене заштите животиња положила је 13.06.2000. Од 2003. године запослена је као истраживач (од 2006. као истраживач сарадник) у Групи за паразитологију Института за медицинска истраживања (ИМИ) Универзитета у Београду, данас Центру изузетних вредности у паразитологији. Осим текућег пројекта МПНТР (ИИИ 41019), од 2003. до данас била је учесник на пет међународних пројеката (1 ФП6, 3 билатерална – са Хрватском, са Мађарском и са Француском, и 1 COST), као и на три домаћа (2 МНТР и 1 МПШВ).

Октобар 2007. провела је у Француској на студијском боравку у *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)*, *Maisons-Alfort*, и у *Hopital Cochin, Université René Descartes, Paris*, на усавршавању из савремених метода паразитолошке дијагностике, укључујући молекуларне.

Од 1998. члан је Југословенског друштва паразитолога (од 2008. Друштво паразитолога Србије), а од 2012. је и секретар Друштва. Такође је од 2008. члан и *SouthEastern and Eastern European Parasitologists Association (SEEEP)*.

Научна активност мр Иване Клуна обухвата радове из области паразитологије, при чему се највећи број радова односи на истраживања различитих аспеката инфекције протозоом *Toxoplasma gondii*, а део је посвећен и другим паразитским инфекцијама животиња и људи. До сада је у сарадњи са другим ауторима објавила 97 библиографских јединица од којих је 35 објављено *in extenso*, као 3 поглавља у монографији међународног значаја, 10 радова (од којих два ревијална) у водећим часописима међунар. значаја (збирног импакт фактора 29,871), 9 у истакнутим часописима међунар. значаја, 5 у часописима међунар. значаја и 2 у водећем часопису националног значаја. Први је аутор три рада објављена у водећим међунар. часописима. Према *Scopus*-у, радови су цитирани 173 пута (134 без ауто- и хетероцитата). Од 2008., према категоризацији истраживача МПНТР, мр Ивана Клун има категорију А1. Добитник је и три награде за научни рад (све три групне награде за најбољи рад ИМИ) за 2010., 2011. и 2013. годину.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **ИВАНА КЛУН**

број уписа /

Изјављујем

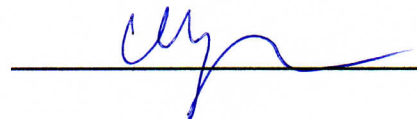
да је докторска дисертација под насловом

**СЕРОЕПИЗООТИОЛОГИЈА И МОЛЕКУЛАРНА ДИЈАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЈЕ
ПАРАЗИТОМ *Neospora caninum* КОД ГОВЕДА**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 5. XI. 2014



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора

ИВАНА М. КЛУН

Број уписа /

Студијски програм /

Наслов рада

**СЕРОЕПИЗООТИОЛОГИЈА И МОЛЕКУЛАРНА
ДИЈАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЈЕ ПАРАЗИТОМ *Neospora caninum* КОД ГОВЕДА**

Ментори

Др Софија Катић-Радивојевић, редовни професор Факултета
ветеринарске медицине Универзитета у Београду (у пензији)

Др Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник Института за
медицинска истраживања Универзитета у Београду

Потписана **ИВАНА КЛУН**

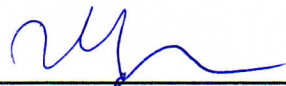
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 5. XI. 2014



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

СЕРОЕПИЗООТИОЛОГИЈА И МОЛЕКУЛАРНА ДИЈАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЈЕ ПАРАЗИТОМ *Neospora caninum* КОД ГОВЕДА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 5. XI. 2014

