

## ***Neospora caninum* u żubrów w Polsce – aktualny stan badań**

Władysław Cabaj, Justyna Bień, Katarzyna Goździk, Bożena Moskwa

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, Warszawa

---

### ***Neospora caninum* in European bison in Poland – the current research status**

**Abstract:** The prevalence of antibodies to *Neospora caninum* was examined in European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Białowieża, Poland. At first, sera of 62 European bison selected and shot from 2007 to March 2009, different ages and sexes, were tested for *N. caninum* antibodies using ELISA test. Positive antibody responses were found in 3 bison (prevalence 4.84 %). Additionally, all positive sera were tested by Western blot to verify the ELISA results. The Western blot results confirmed the presence of antibodies to *Neospora* tachyzoites antigens in all tested ELISA positive sera. Thereafter, 125 sera collected from immobilized bison in 2007–2009 were tested as well. High antibody responses were found in 10 bison (prevalence 8%). Our results strongly indicate the presence of *N. caninum* in the European bison in Poland. Further researches are needed to evaluate the existence of a sylvatic cycle of *N. caninum*.

**Key words:** European bison, *Neospora caninum*, ELISA, Western blot, Poland

---

### **Wstęp**

*Neospora caninum* jest pasożytniczym wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem u bydła hodowlanego, jak i wielu gatunków zwierząt wolno żyjących, lokalizującym się głównie w mózgu i rdzeniu kręgowym. Do roku 1988 pasożyt był mylnie diagnozowany jako *Toxoplasma gondii*. Od 1984 r., kiedy został stwierdzony jako przyczyna paraliżu tylnych kończyn psa, wprowadzono do systematyki nowy rodzaj i gatunek *Neospora caninum*. Neosporoza jest uważana za poważne schorzenie bydła i psów na świecie (Dubey i Lindsay 1996; Dubey 2003). Neosporoza jest uznawana za najważniejszą przyczynę aborcji u bydła. Odsetek ronień powodowanych *N. caninum* waha się w różnych krajach w zakresie od 20% do 43% (Dubey i wsp. 2007).

W warunkach naturalnych żywicielem ostatecznym pasożyta jest pies i kojot oraz należy przypuszczać, że i inne psowate (McAllister i wsp. 1998; Lindsay i wsp. 1996; Gondim i wsp. 2004). Żywiciel ostateczny zaraża się zjadając cysty tkankowe. W jelicie dochodzi do rozwoju płciowego pasożyta, w którego wyniku powstają oocysty (formy przetrwalnikowe pasożyta), które wraz z kałem żywiciela wydostają się do środowiska zewnętrznego stanowią zagrożenie dla kolejnych żywicieli. Wewnątrz oocyst rozwijają się sporozycy, które są stadium

inwazyjnym dla innych zwierząt. Żywicielami pośrednimi może być wiele gatunków zwierząt. W organizmie żywicieli pośrednich i ostatecznych zachodzi proces rozmnażania bezpłciowego pasożyta (endodiogonia), w którego wyniku powstają tachyzoity i bradyzoity. Tachyzoity spotyka się w mózgu, rdzeniu kręgowym, rzadziej w płucach, wątrobie, mięśniach, sercu i łożysku. Bradyzoity znajdują się wewnątrz cyst tkankowych, które odnajdywane są przede wszystkim w komórkach układu nerwowego oraz w mięśniach (Dubey 2003).

W Polsce, po raz pierwszy wykryto przeciwciała przeciw temu pierwotniakowi u krów, u których wcześniej notowano poronienia (Cabaj i wsp. 2000). Po latach prób udało się pierwotniaka *N. caninum* wyizolować z mózgu jednodniowego cielęcia pochodzącego od seropozytywnej matki. Polski izolat oznaczony został jako NC-PolB1 i jest utrzymywany w stałej hodowli komórkowej w Instytucie Parazytologii PAN (Goździk i Cabaj 2007). Podjęte w 2004 r. badania na żubrach wykazały, po raz pierwszy na świecie, obecność przeciwciał przeciw *N. caninum* u żubrów wolno żyjących w Polsce. Obecność przeciwciał stwierdzono u 7,3 % badanych surowic (Cabaj i wsp. 2005).

Dostęp do materiału biologicznego od żubrów selekcyjnie odstrzeliwanych lub immobilizowanych do różnych celów naukowych umożliwia monitorowanie tej groźnej pasożyty w populacjach żyjących na wolności, w ośrodkach hodowlanych lub pokazowych. Ośrodkiem mającym największy wpływ na kształtowanie się europejskiej populacji gatunku jest Białowieża, nie tylko ze względu na liczbę wysyłanych żubrów, ale przede wszystkim rolę w edukacji i propagowaniu treści związanych z restytucją żubra, stąd też wynika nasze zainteresowanie tym miejscem. Jest to konieczne, gdyż pasożyt może osłabiać potencjał rozrodczy, a przez to wywierać negatywny wpływ bezpośrednio na sam proces restytucji gatunku *Bison bonasus*.

Do tej pory nie udało się zaobserwować objawów klinicznych u zwierząt wolno żyjących.

Przeciwciała przeciw pasożytowi stwierdzono u zwierząt mięsożernych: u wilków grzywiastych (*Chrysocyon brachyurus*) (Vitaliano i wsp. 2004), wilków (*Canis lupus*) na Alasce (Dubey i Thulliez 2005), wilków żyjących w ZOO w Czechach (Sedlak i Bartova 2005), u lisów srebrzystych (*Urocyon cinereoargenteus*) (Lindsay i wsp. 2001), kojotów (*Canis latrans*) (Lindsay i wsp. 1996). Także lis rudy (*Vulpes vulpes*) może być żywicielem pośrednim dla pasożyta (Almeria i wsp. 2002). U zajęcy (*Lepus europaeus*) (Ezio i Anna 2003), potencjalnych ofiar lisów, wykryto przeciwciała przeciwko *N. caninum*, co nasuwa przypuszczenie, że psowate takie jak lisy i wilki zamieszkujące tereny Europy, również mogą być żywicielami ostatecznymi tego pierwotniaka. Wykrycie *N. caninum* u wolno żyjących przeżuwaczy oraz zwierząt mięsożernych potwierdza istnienie sylwaticznego cyklu życiowego tego pasożyta. Znaczenie zwierząt wolno żyjących w epidemiologii neosporozy nie zostało jak dotąd w pełni wyjaśnione.

## **Materiał i metody**

### **Hodowla pasożyta w komórkach nabłonkowych – Vero cells**

W Instytucie Parazytologii PAN prowadzona jest stała hodowla komórek *Vero* (komórki endotelialne pochodzące z nerki małpy *Cercopithecus aethiops*, typu monolayer). W warunkach laboratoryjnych komórki są utrzymywane w medium hodowlanym RPMI z dodatkiem 1% surowicy końskiej oraz antybiotyków; penicyliny i streptomycyny. W tych komórkach prowadzona jest stała hodowla dwóch izolatów *N. caninum* NC-1 oraz NC-PolB1. Hodowle komórkowe są utrzymywane w inkubatorze, w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> (przy 100 % wilgotności). Otrzymane tachyzoity po oczyszczeniu są wykorzystywane do sporządzenia antygenów (Western blot) oraz do badań molekularnych (wzorzec DNA).

### **Test ELISA**

Surowice uzyskane z krwi żubrów poddawanych zabiegom weterynaryjnym bądź selekcyjnie odstrzeliwanych stanowiły podstawowy materiał do badań. Pozyskiwano je w różnym czasie i z różnych miejsc, i do czasu użycia były przechowywane w temperaturze –20°C.

Żubr jest zwierzęciem blisko spokrewnionym z bydłem domowym, dlatego można było wykorzystać testy stosowane do oznaczania poziomu przeciwciał u bydła. Badania przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu *Neospora caninum* Antibody Test Kit firmy IDEXX Laboratories, Inc. USA. W zestawach znajdują się płytki opłaszczone antygenem, kontrolne surowice pozytywne i negatywne oraz standaryzowane rozcieńczalniki i bufory. W teście wykrywane są specyficzne przeciwciała klasy IgG. Wynik reakcji odczytywany był w czytniku EL\*800, Biotek, Instruments Inc. Wynik uznawano za pozytywny, jeśli wyliczony współczynnik S/P był większy lub równy 0,3 (dla bydła 0,5).

### **Metoda Western blot (WB)**

Metoda była stosowana dodatkowo dla potwierdzania wyników dodatnich w teście ELISA oraz w celu identyfikacji i analizy antygenów pasożyta. Tylko wyniki pozytywne otrzymane w dwóch testach (ELISA i Western blot) były podstawą do uznania tych prób za dodatnie/pozytywne. Antygen sporządzano z tachyzoitów *N. caninum* izolatu NC-1 bądź NcBPol-1 pochodzących z własnej hodowli komórkowej. Test WB był przeprowadzony zgodnie procedurami opisanymi przez Björkman i wsp. (1994) oraz Björkman i wsp. (1998). Po wywołaniu reakcji paski nitrocelulozy były fotografowane i poddawane analizie w zestawie do dokumentacji firmy KODAK.

### **Metoda 2DE**

W ramach wstępnych badań przeprowadzono optymalizację metody 2DE.

Uzyskane z hodowli *in vitro* tachyzoity *N. caninum* oczyszczano na Percoll'u,

następnie poddawano działaniu buforu lizującego, trzykrotnemu zamrażaniu i rozmrażaniu a następnie sonikowano (Eun-goo Lee i wsp., 2003, 2005) Tak przygotowane białka *N. caninum* umieszczano na paskach żelowych (ReadyStrep IPG Strips, pH 3–10, Bio-Rad) i poddawano rehydratacji z udziałem odpowiednich buforów. Następnie białka poddawano ogniskowaniu izoelektrycznemu, czyli rozdzielaniu pod względem ich punktu izoelektrycznego, w aparacie do poziomej elektroforezy (Protein IEF Cell, Bio-Rad). Kolejnym etapem było przeprowadzenie drugiego rozdzielania białek, znajdujących się na paskach żelowych, pod względem ich masy cząsteczkowej. Białka rozdzielano podczas elektroforezy pionowej w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE). Rozdzielone na żelu białka poddawano reakcji wysrebrzenia w celu ich wyznakowania. Alternatywnie po przeprowadzeniu 2DE stosowano metodę Western Blot w celu wyselekcjonowania immunoreaktywnych białek. Białka z żelu przenoszono na membranę nitrocelulozową, inkubowano z surowicą pochodzącą od seropozytywnego żubra a następnie drugorzędowym przeciwciałem wyznakowanym enzymatycznie (Anti-Bovine IgG, Sigma). Miejsca reakcji antygen–przeciwciało wykrywano po dodaniu 3',3'-Diaminobenzidine (Sigma).

Detekcja immunoreaktywnych białek *N. caninum* reagujących z surowicą pochodzącą od zarażonego uprzednio tym pierwotniakiem żubra jest dodatkowym dowodem na pozytywność prób.

### Diagnostyka molekularna

Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR jest czułą i bezpośrednią metodą pozwalającą na wykrycie DNA pasożyta, nawet, jeżeli jest go bardzo mało lub jest rozproszony w badanym materiale. Matrycą dla reakcji może być DNA wyizolowane z różnych komórek i tkanek (np. komórki krwi lub skrawki pobrane z narządów takich jak wątroba, śledziona, serce). DNA izolowano przy pomocy komercyjnego zestawu do izolacji DNA firmy MacheryNagel Germany. Wynikiem reakcji PCR z użyciem starterów Np21 i Np6 jest produkt o wielkości 328 pz (Yamaga i wsp. 1996).

### Wyniki

Wyniki badań serologicznych w kierunku obecności przeciwciał przeciw *N. caninum* w surowicach 62 żubrów selekcyjnie odstrzelonych w Puszczy Białowieskiej w latach 2007–2009 przedstawione zostały w Tabeli 1A, B, C.

W 2007 roku tylko jedna z 23 zgromadzonych surowic okazała się pozytywna w teście ELISA oraz Western blot. Pochodziła ona od żubra nr 813, dwuletniego byka z Puszczy Białowieskiej. Młody wiek zwierzęcia wskazuje na niedawne zarażenie, a sam poziom przeciwciał jest poniżej wartości progowej ( $S/P > 0,5$ ) od której wynik uważany jest za w pełni pozytywny. Western blot potwierdził jednak obecność przeciwciał wiążących się z wybranymi antygenami *N.*

**Tabela 1.** Wyniki testu ELISA u żubrów eliminowanych w drodze odstrzału selekcyjnego w latach 2007–2009

**A. Rok 2007**

Lp	Nr żubra	Płeć i wiek	Wynik ELISA	Data eliminacji
1	809	B; 1 rok	0,09	7.02.2007
2	810	K; 15 lat	0,05	7.02.2007
3	811	K; 12 lat	0,15	7.02.2007
4	812	B; 2 lata	0,16	7.02.2007
5	813	B; 2 lata	<b>0,29</b>	7.02.2007
6	814	K; 7–8 lat	0,02	14.02.2007
7	815	K; 27–28 lat	0,02	14.02.2007
8	816	B; 9 miesięcy	0,04	14.02.2007
9	817	K; 7 miesięcy	0	14.02.2007
10	818	K; 27 lat	0,1	14.02.2007
11	819	K; 7 miesięcy	0	26.02.2007
12	820	K; 6–7 miesięcy	0	1.03.2007
13	821	B; 1,5 roku	0	1.03.2007
14	822	K; 6 miesięcy	0	1.03.2007
15	823	K; 6 miesięcy	0	1.03.2007
16	824	K; 5 miesięcy	0	1.03.2007
17	825	K; 7 lat	0	5.03.2007
18	826	K; 16 lat	0,02	8.03.2007
19	827	B; 4 lata	0,09	8.03.2007
20	828	K; 4 lata	0	8.03.2007
21	829	K; 7 miesięcy	0	8.03.2007
22	830	K; 5 miesięcy	0	10.12.2007
23	831	K; 7 miesięcy	0	11.12.2007

*caninum*. Niestety pierwsze badanie PCR wykonane na innym materiale biologicznym niż krew (rdzeń kręgowy, wątroba, serce) dały wynik negatywny.

Z kolei w roku 2008, tylko dwie surowice (nr 836 i 842) na 22 zgromadzone wskazywały na możliwość zarażenia osobników *N. caninum*. Niskie miana przeciwciał mogą świadczyć o słabej inwazji lub rozwijającej się dopiero inwazji. Z kolei wiek i płeć zwierząt (7 i 8 lat, krowy) w przypadku inwazji tym pierwotniakiem wywarłby niewątpliwie negatywny wpływ w procesie rozrodu. Podjęte próby izolacji tachyzoitów *N. caninum* z tkanek seropozytywnych osobników nie dały pozytywnego wyniku.

**Tabela 1.** Wyniki testu ELISA u żubrów eliminowanych w drodze odstrzału selekcyjnego w latach 2007–2009**B. Rok 2008**

Lp	Nr żubra	Płeć i wiek	Wynik ELISA	Data eliminacji
1	832	K; 4 miesiące	0	5.02.2008
2	833	B; 3 lata	0	6.02.2008
3	834	B; 2,5 roku	0,15	6.02.2008
4	835	B; 5 lat	0	6.02.2008
5	836	K; 7 lat	0,28	26.02.2008
6	837	B; 2,5 roku	0,3	26.02.2008
7	838	B; 6 miesięcy	0,06	26.02.2008
8	839	2–3miesiące	0,03	26.02.2008
9	840	K; 17 lat	0,13	27.02.2008
10	Piód 840	K	0	27.02.2008
11	841	B; 2 lata	0,11	27.02.2008
12	842	K; 13 lat	0,25	4.03.2008
13	843	K; 8 lat	0,42	4.03.2008
14	844	K; 20 lat	0,2	4.03.2008
15	845	K; 15 lat	0,04	4.03.2008
16	846	K; 6 miesięcy	0	4.03.2008
17	847	B; 3 miesiące	0,06	4.03.2008
18	848	K; 3,5 roku	0,18	5.03.2008
19	bnr	B; 12 lat	0	12.09.08-Bieszczady
20	851	B; 2,5 roku	0	16.12.2008
21	852	B; 2 lata	0	16.12.2008
22	853	K; 26 lat	0	16.12.2008

Do końca marca 2009 r. przebadano 17 selekcyjnie odstrzelonych żubrów. Wszystkie były seronegatywne i zbierane próby biologiczne w celu izolacji pierwotniaka nie mogły być wykorzystane.

Oprócz selekcyjnie odstrzelanych rokrocznie żubrów, co roku pewna liczba żubrów poddawana jest immobilizacji podczas prac prowadzonych przez pracowników BPN i ZBS w Białowieży. W latach 2007–2009 udało się pozyskać krew od łącznie 125 osobników, żubrów w różnym wieku i obojga płci.

I tak w roku 2007 na 42 przebadane osobniki trzy były seropoztywne. Był to byk Pomak z OHŻ w Białowieży, ośmioletnia krowa (nr 1418) z wolnego stada oraz dziewięcioletni byk żyjący w Puszczy w oddziale 422.

**Tabela 1.** Wyniki testu ELISA u żubrów eliminowanych w drodze odstrzału selekcyjnego w latach 2007–2009**C. Rok 2009**

Lp	Nr żubra	Płeć i wiek	Wynik ELISA	Data eliminacji
1	854	B; 1,5 roku	0,2	20.01.2009
2	855	B; 5 lat	0,1	21.01.2009
3	856	K; 4 mies.	0	3.02.2009
4	857	K; 1,5 roku	0	4.02.2009
5	bnr	B; 4 mies.	0	26.01.2009
6	bnr	B; 2 lata	0	4.02.2009
7	bnr	B; 21 lat	0	5.02.2009
8	858	B; 3,5 roku	0	10.02.2009
9	859	10 mies.	0	10.02.2009
10	bnr	K; 10 lat	0	23.02.2009
11	860	B; 6 mies.	0	25.02.2009
12	861	K; 6 mies.	0	25.02.2009
13	862	K; 7 mies.	0,09	3.03.2009
14	863	K; 8 mies.	0,09	3.03.2009
15	864	K; 8 mies.	0,08	4.03.2009
16	865	B; 1,8 roku	0,11	4.03.2009
17	bnr	B; 5 mies.	0	16.03.2009 r. – padł

Objaśnienia: K – krowa, B – byk, bnr – bez numeru Nn – numer nieznan, – brak danych

W roku 2008 zbadano krew pobraną przyżyciowo od 58 żubrów i w tej liczbie 6 osobników było zarażonych. Były to żubr Poki, 27-letnia krowa z oddziału 422 w Puszczy, 10 letni byk i 3 osobniki o nieustalonym wieku i płci (brak szczegółowych danych).

Do końca marca 2009 roku przebadano 25 żubrów i jeden okazał się zarażony. Był to obrożowany byk o nr 103 R.

Łącznie na 125 osobników 10 miało poziom przeciwciał wskazujący na zarażenie tym pierwotniakiem (8 %), a z żubrami selekcyjnie odstrzelonymi w tym okresie (łącznie 187 osobników w tym 13 pozytywnych), seroprewalencja wynosi 7 %.

Wszystkie seropoztywne surowice dały wynik dodatni, kiedy badane były metodą Western Blot, jak również podczas pilotażowych badań z wykorzystaniem metody 2DE.

Dwukierunkowa elektroforeza (2DE), jest techniką znana już od ponad dwudziestu lat i po znacznych modyfikacjach w stosunku do metody 2DE

opisanej przez P.H. O'Farrell, 1975 jest jedna z najszybciej rozwijających się metod elektroforetycznych znajdujących coraz to większe zastosowanie jako jedna z podstawowych metod wykorzystywanych w proteomice. Jest to metoda wykorzystująca odmienne a zarazem ściśle zdefiniowane kryteria rozdziału białek jak punkt izoelektryczny (pI) i masa cząsteczkowa (MW).

Pierwszy etap to separacja białek techniką ogniskowania izoelektrycznego (IEF) na specjalnych nośnikach (standaryzowane paski żelowe zawierające immobilizowany gradient pH) w elektroforezie poziomej, gdzie cząsteczki białek są rozdzielane według ich punktu izoelektrycznego (pI). W drugim etapie, rozdzielone białka są przenoszone na elektroforezę pionową w żelu poliakrylamidowym (SDS PAGE), a cząsteczki podlegają rozdziałowi według ich masy (Görg i wsp. 2000).

Zastosowanie techniki 2DE pozwala na dokładny rozdział mieszaniny białek i uzyskanie szczegółowej, dwuwymiarowej mapy rozdziału białek zarówno pod względem ich punktu izoelektrycznego, jak i ich mas cząsteczkowych.

Detekcja białek *N. caninum* immunoreaktywnych reagujących z przeciwciałem w surowicy żubra zarażonego tym pierwotniakiem jest dodatkowym dowodem na pozytywność prób (Ryc. 1). Ta metoda jest obecnie wprowadzana i doskonalona w naszej pracowni.

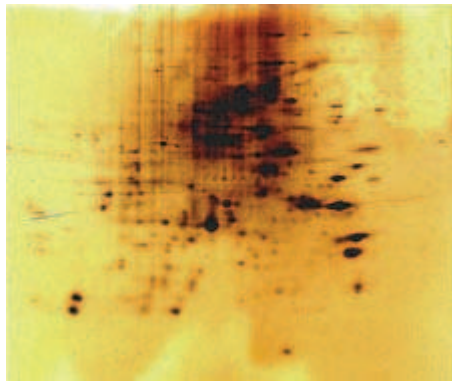
W drugiej połowie roku 2009 i pierwszej roku 2010 planowane badania będą koncentrowały się na potwierdzeniu obecności pierwotniaka w tkankach zarażonych żubrów przy użyciu metod biologii molekularnej i podjęta zostanie próba wyizolowania pierwotniaka *N. caninum*.

## Podsumowanie

Dotychczasowe wyniki badań wskazują jednoznacznie na obecność pierwotniaka *N. caninum* u żubrów żyjących w Białowieży. Odsetek osobników zarażonych zmienny jest w kolejnych latach badań. W latach 2004 do końca marca 2008 wynosił 13 % (Cabaj i wsp. 2008). Z kolei w latach 2007 do marca 2009 wynosił 7 %.

Nie tylko żubry pochodzące z Białowieży mogą być rezerwuarem dla tej pasożyty. Jak wykazały nasze wcześniejsze badania (Cabaj i wsp. 2008), wysoki poziom przeciwciał stwierdzano u żubrów pochodzących ze Słowacji, Holandii, Włoszech, Hiszpanii, Danii oraz Niemczech.

Poza Europą, Dubey i Thulliez (2005) w Ameryce Północnej wykryli przeciwciała u 5 bizonów na 249 przebadanych osobników. Nie jest to



Rycina 1. Dwuwymiarowa mapa rozkładu białek *N. caninum*



nadzwyczajnym zjawiskiem, skoro w tych krajach *N. caninum* występuje powszechnie u bydła hodowlanego. Zwierzęta wolno żyjące są naturalnym rezerwuarem dla tej pasożyty.

Badania będą kontynuowane i podjęta zostanie próba wyizolowania tego pierwotniaka, co samo w sobie jest dużym zadaniem i byłoby dużym osiągnięciem. Byłby to pierwszy w Polsce izolat pasożyta pochodzący od wolno żyjącego żywiciela.

## Podziękowanie

Szczególne podziękowanie składam Dyrekcji Białowieskiego Parku Narodowego, Pani profesor Małgorzacie Krasińskiej i Panu dr Rafałowi Kowalczykowi z Zakładu Badania Ssaków PAN w Białowieży oraz kierownikowi Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW w Warszawie Pani profesor Wandzie Olech-Piaseckiej za dotychczasową współpracę i pomoc w pozyskiwaniu materiału biologicznego do badań.

Praca zrealizowana częściowo w ramach projektu badawczego MNiSzW nr N303 062 32/2263.

## Piśmiennictwo

- Almeria S., Ferrer D., Pabon M., Castella J., Manas S. 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 107: 287–294.
- Björkman C., Lunden A., Holmdahl J., Barber J., Trees A.J., Uggla A. 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, 16: 643–648.
- Björkman C., Hemphill, A. 1998. Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunology*, 20: 73–80.
- Cabaj W., Choromański L., Rodgers S., Moskwa B., Malczewski A. 2000. *Neospora caninum* in aborting dairy cows in Poland. *Acta Parasitol.*, 45: 113–114.
- Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Gill J. 2005. Antibodies to *Neospora caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Poland. *Vet. Parasitol.*, 128: 163–168.
- Cabaj W., Goździk K., Bień J., Moskwa B. 2008. *Neospora caninum* u żubrów – świadomość problemu. *European Bison Conservation Newsletter*, 1: 53–64.
- Dubey J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41: 1–16.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 67: 1–59.
- Dubey J.P., Shares G., Ortega-Mora L. M. 2007. Epidemiology and control neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20: 323–367.
- Dubey J.P., Thulliez P. 2005. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *J. Parasitol.*, 91: 1217–1218.
- Eun-goo Lee, Jae Hoon Kim, Yong Seung Shin, Gee Wook Shin, Myung Deuk Shu, Dea Yong Kim, Yong Hwan Kim, Gon Sup Kim, Tae Sung Jung, 2003: Establishment of a two-dimensional electrophoresis map for *Neospora caninum* tachyzoites by proteomics. *Proteomics*, 3: 2339–2350.
- Eun-goo Lee, Jae-hoon Kim, Yong-seung Shin, Gee-wook Shin, Young-rim Kim, K.J. Palaksha, Dea-yong Kim, Itsuro Yamane, Yong-hwan Kim, Gon-sup Kim, Myung-deuk Suh, Tae-sung Jung, 2005: Application of proteomic for comparison of proteome of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Chromatography*, 815: 305–314.

- Ezio F., Anna T. 2003. Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). Vet. Parasitol., 115: 75–78.
- Gondim L.F.P., McAlister M.M., Pitt W.C., Zemliecka D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol., 34: 159–161.
- Goździk K., Cabaj W. 2007. Characterization of the first Polish isolate of *Neospora caninum* from cattle. Acta Parasitol., 52: 295–297.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. 2000. The current of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 21: 1037–1053.
- Lindsay D.S., Weston J.L., Little S.E. 2001. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. Vet. Parasitol., 97: 159–164.
- Lindsay D.S., Kelly E.J., McKown R.D., Stein F.J., Plozer J., Herman J., Blagburn B.L., Dubey J.P. 1996. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infection of coyotes with *Neospora caninum*. J. Parasitol., 82: 657–659.
- McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A., McGuire A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol., 28: 1473–1478.
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chemistry, 250: 4007–4021.
- Sedlak K., Bartova E. 2005. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. Vet. Parasitol., 136: 223–231.
- Vitaliano S.N., Silva D.A., Mineo T.W., Ferreira R.A., Bevilacqua E., Mineo J.R. 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. Vet. Parasitol., 122: 253–260.
- Yamage 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.