



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ  
ДЕПАРТМАН ЗА  
ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ**

---



**СЕРОПРЕВАЛЕНЦА *Neospora caninum* КОД  
КРАВА СА РЕПРОДУКТИВНИМ  
ПОРЕМЕЋАЈИМА У ВОЈВОДИНИ**

**-докторска дисертација-**

**Ментор:**

**Проф. др Весна Лалошевић**

**Кандидат:**

**Мр сц. Милан Н. Савовић, дипл. вет.**

---

**Нови Сад, 2016.године**

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**

**др Весна Лалошевић, редовни професор, ментор**

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Ужа научна област: Ветеринарска микробиологија и заразне болести животиња

---

**др Сава Лазић, научни саветник**

Научни институт за ветеринарство “Нови Сад” - Нови Сад

Ужа научна област: Микробиологија и заразне болести

---

**др Душан Лалошевић, редовни професор**

Медицински факултет, Нови Сад

Ужа научна област: Хистологија и ембриологија

---

**др Станко Бобош, редовни професор**

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Ужа научна област: Болести животиња и хигијена анималних производа

---

**др Иван Станчић, ванредни професор**

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Ужа научна област: Репродукција и акушерство домаћих животиња

---

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

|  |   |
|--|---|
| Редни број:<br>РБР                         |   |
| Идентификациони број:<br>ИБР               |   |
| Тип документације:<br>ТД                   | Монографска документација   |
| Тип записа:<br>ТЗ                          | Текстуални штампани материјал   |
| Врста рада:<br>ВР                          | Докторска дисертација   |
| Име и презиме аутора:<br>АУ                | Милан Савовић   |
| Ментор:<br>МН                              | Проф. др Весна Лалошевић, редовни професор  |
| Наслов рада:<br>НР                         | Серопреваленца <i>Neospora caninum</i> код крава са репродуктивним поремећајима у Војводини |
| Језик публикације:<br>ЈП                   | српски (ћирилица)   |
| Језик извода:<br>ЈИ                        | српски / енглески   |
| Земља публикавања:<br>ЗП                   | Република Србија  |
| Уже географско подручје:<br>УГП            | Аутономна Покрајина Војводина   |
| Година:<br>ГО                              | 2016.   |
| Место и адреса:<br>МА                      | ауторски репринт  |
| Издавач:<br>ИЗ                             | Нови Сад, Трг Доситеја Обадовића 8  |
| Физички опис рада:<br>ФО                   | 8 поглавља / 110 страница / 14 слика / 10 табела / 3 схеме / 6 графикана / 271 референца    |
| Научна област:<br>НО                       | Ветеринарска медицина   |
| Научна дисциплина:<br>НД                   | Паразитологија  |
| Предметна одредница,<br>Кључне речи:<br>ПО | <i>Neospora caninum</i> , серопреваленца, репродуктивни поремећаји, краве                   |
| УДК  | UDC 636.082.4:636.09(043.3)   |

|   |   |
|---|---|
| Чува се:<br>ЧУ  | Библиотека Пољоприведног факултета, Трг Доситеја<br>Обадовића 8, Нови Сад |
| Важних напомена:<br>ВН  |   |
| <p>Извод:</p> <p>ИЗ</p> <p><i>Neospora caninum</i> је интрацелуларна паразитска кокцидија, која припада колу <i>Aricomplexa</i>, фамилији <i>Sarcocystidae</i>, а одговорна је за абортусе код крава широм света. Зоонотски карактер ове протозое за сада није доказан. Ипак, имунокомпромитованим особама препоручује се избегавање контакта са познатим изворима <i>N. caninum</i></p> <p>Један од проблема у говедарству, су велики економски губици због неоспорозе у стадима високо продуктивних плоткиња услед абортуса. Процент абортуса се креће од 0,4-10,6% мада ове вредности могу бити и знатно више ако су инфективни агенси присутни у стадима. Пошто болест пролази у већини случајева без клиничких симптома, абортуси у првој трећини гравидитета могу бити непримећени тако да је губитке врло често тешко и документовати.</p> <p>Плод код заражене јединке може бити ресорбован код раног гравидитета, аутолизован или мумифициран у каснијем стадијуму гравидитета или пак мртворођен. Међутим, забележени су и случајеви живо рођених телади са клиничким симптомима болести или рођени без клиничких симптома али позитивном серолошком реакцијом. Поред високе стопе абортуса на фармама код животиња оболелих од неоспорозе који представљају директну штету, економски губици се огледају и у смањеној концепцији. Нису занемарљиви ни индиректни трошкови везани за ветеринарске услуге у првом реду у успостављању дијагнозе која је тешка и скупа. Вишекратним вештачким осемењавањем се повећава индекс осемењавања, а због смањене концепције продужава се и сервис период, смањује производња млека. Заражена стада прати повећан број превремених тељења, као и рађање авиталне телади те смањени прираст јунади у тову . Годишње серолошко тестирање би могло бити од користи за стратегију контроле серопозитивности на <i>N. caninum</i>.</p> <p>Циљ овог истраживања био је да се утврди серопреваленца <i>Neospora caninum</i> код крава на територији Војводине. Истраживање је обухватило 376 млечних крава, старости преко 24 месеца, различитих раса, подељених у три групе:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• прву групу обухватале су краве са репродуктивним поремећајима,</li> <li>• другу групу чиниле су краве без репродуктивних поремећаја,</li> <li>• трећу групу краве чија је репродуктивна историја непозната.</li> </ul> <p>На основу добијених резултата може се закључити да је неоспооза код крава доказана на целој територији АП Војводине. Укупна преваленца износи 15,4%. Код крава са побачајима и другим репродуктивним поремећајима серопреваленца износи 12,8%, а код крава без репродуктивних поремећаја она износи 18,8%. У раду није доказана статистички значајна разлика у серопреваленци између крава са и без репродуктивних поремећаја.</p> <p>Серопреваленца на малим приватним газдинствима износи 20,2% и статистички је значајно већа у односу на велике комерцијалне фарме где износи 6,2%.</p> <p>Из добијених резултата може се закључити да је једини доказани фактор ризика за појаву неоспорозе код говеда у Војводини узгој на малим приватним газдинствима, што се може објаснити слабом применом зоохигијенских мера, односно слободним држањем и присуством паса на фарми.</p> |   |

|  |   |
|--|---|
| Датум прихватања теме<br>Од стране НН већа:<br>ДП                                      | 8.07.2011.  |
| Датум одбране:<br>ДО   |   |
| Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус)<br>КО | <p>Председник: _____<br/><b>Проф. др Станко Бобош, редовни професор</b><br/>Пољопривредни факултет, Нови Сад</p> <p>Ментор: _____<br/><b>Проф. др Весна Лалошевић, редовни професор,</b><br/>Пољопривредни факултет, Нови Сад.</p> <p>Члан: _____<br/><b>др Сава Лазич, научни саветник,</b><br/>Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“ - Нови Сад</p> <p>Члан: _____<br/><b>Проф. др Душан Лалошевић, редовни професор,</b><br/>Медицински факултет, Нови Сад.</p> <p>Члан: _____<br/><b>Проф. др Иван Станчић, ванредни професор,</b><br/>Пољопривредни факултет, Нови Сад</p> |

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE**
**KEY WORD DOCUMENTATION**

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Accession number:<br>ANO       |  |
| Indetification number:<br>INO  |  |
| Document type:<br>DT           | Monograph documentation  |
| Type of record:<br>TR          | Textual printed material   |
| Contents code:<br>CC           | Ph. D. Thesis  |
| Author:<br>AU                  | Mr. sc. Milan N Savović DVM  |
| Mentor:<br>MN                  | Prof.dr Vesna Lalošević, Full Professor  |
| Title:<br>TI                   | Seropevalenca <i>Neospora caninum</i> in cows with reproductive disorders in Vojvodina |
| Language of text:<br>LT        | Serbian (cyrilic)  |
| Languate of abstract:<br>LA    | Serbian / English  |
| Country of publication:<br>CP  | Republic of Serbia   |
| Locality of publication:<br>LP | Autonomous Province of Vojvodina   |
| Publication year:<br>PY        | 2016.  |
| Publisher:<br>PU               | Author reprint   |
| Publication place:<br>PP       | Novi Sad, Dositeja Obradovića 8  |
| Physical description:<br>PD    | 8 chapters, 110 pages, 14 pictures / 10 tables / 3 schemes / 6 graphs / 271 references |
| Scientific field:<br>SF        | Veterinary medicine  |
| Scientific discipline:<br>SD   | Parasitology   |
| Subject, Key Words<br>SKW      | <i>Neospora caninum</i> , seroprevalence, reproductive disorders, cattle               |
| UDC                            | 636.082.4:636.09(043.3)  |

|  |   |
|--|---|
| Holding data:<br>HD  | Library of The Faculty of Agriculture, Dositeja Obradovića 8,<br>Novi Sad |
| Note:<br>N   |   |
| <p>Abstract:<br/>AB</p> <p><i>Neospora caninum</i> is intracellular parasitic coccidia from the phylum <i>Apicomplexa</i>, family <i>Sarcocystidae</i>, responsible for abortion in cattle worldwide. Although zoonotic nature of this protozoa has not been proven, it is generally recommended that immunocompromised persons should avoid contact with the known sources of <i>N. caninum</i>.</p> <p>One of the problems that affect cattle breeding industry are great economic losses due to neosporosis-related abortions in herds of highly productive cows. The percentage of abortions ranges from 0.4% to 10.6%, although it may reach considerably higher values when the infectious agent is present in flocks. Since the disease is asymptomatic in the majority of cases, abortions in the first trimester of pregnancy may remain undetected so that the losses are often difficult to document.</p> <p>Depending on the gestational age of the calf, the outcome of infection may vary from the foetal resorption in early pregnancies, autolysis and mummification in the later course of the gestation, or the occurrence of stillbirths. However, cases of birth of both clinically diseased and asymptomatic, but seropositive newborns, from the infected mothers, have been recorded. In addition to the direct damage reflected in the high rate of abortions, affected farms also suffer significant economic losses due to decreased conception rates in infected cows. Also, indirect costs of veterinary services, especially those regarding expensive and toilsome diagnostic procedures, are not negligible. Finally, repeated artificial insemination increases insemination index and decreased conception rate results in prolonged service period and reduced milk production. Infected herd exhibits increased number of early calving as well as birth of non-vital calves and reduced growth in beef cattle. Serological testing, conducted on yearly basis, could contribute to the development of a control strategy of seropositivity of the cattle to <i>N. caninum</i>.</p> <p>Aim of this research was to determine seroprevalence of <i>N. caninum</i> in cows from the territory of Vojvodina. The study included 376 dairy cows over 24 months of age, of different breeds and divided into three groups, according to their medical history:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• The first group consisted of cows with reproductive disorders</li><li>• The second group consisted of cows without evident reproductive disorders</li><li>• The third group consisted of cows with unknown medical history</li></ul> <p>Based on these results it can be concluded that neosporosis in cows was demonstrated throughout the territory of the Vojvodina province, with overall prevalence of 15.4%. In cows with abortions and other reproductive disorders seroprevalence was 12.8% and in cows without reproductive disorders it was 18.8%. No statistically significant difference in seroprevalences between cows with and without reproductive disorders was observed.</p> <p>In small private holdings, seroprevalence reached 20.2% which was significantly higher compared to the 6.2% detected on large commercial farms.</p> <p>According to these results, the only proved risk factor for acquisition of neosporosis in cattle in Vojvodina is cattle being bred on private smallholdings, which could probably be explained by poor zoohygienic measures, free-range to semi-confined production systems and the presence of dogs, all of which are often associated with this type of farms.</p> |   |

|   |  |
|---|--|
| Accepted<br>On Scientific board on:<br>AS | July, 8 <sup>th</sup> , 2011.  |
| Defeded:<br>DE                            |  |
| Thesis Defense Board<br>DB                | <p>President: _____<br/><b>Prof. dr Stanko Boboš, full professor</b><br/>Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Mentor: _____<br/><b>Prof. dr Vesna Lalošević, full professor</b><br/>Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Member: _____<br/><b>Dr. sci. Sava Lazić, principal research fellow</b><br/>Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" - Novi Sad</p> <p>Member: _____<br/><b>Prof.dr Dušan Lalošević, full professor</b><br/>Medical Faculty, Novi Sad</p> <p>Member: _____<br/><b>Prof. dr Ivan Stančić, associate professor</b><br/>Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> |



## ЗАХВАЛНОСТ

На овај начин желео бих да изразим своју најискренију захвалност свима који су ми помогли да своју дисертацију доведем до краја.

Захвалност првенствено дугујем ментору проф. др Весни Лалошевић, на вођењу и саветима при изради овог рада, без чије помоћи, сигуран сам, ово дело не би угледало светлост дана. Најискреније се захваљујем проф. др Станку Бобошу који ми је помогао да обавим истраживања на циљним групама у Банату, а саветима упутио у правом смеру. Такође, захвалност дугујем др Сави Лазићу, научном саветнику и проф. др Душану Лалошевићу, који су ми помогли у анализи и обради материјала сакупљеног са терена. Најлепше се захваљујем проф. др Ивану Станчићу на сугестијама и уложеном времену око исправке рукописа.

Искрену захвалност дугујем мојим колегама и пријатељима, др вет. мед. Љиљани Куруци и др вет. мед. Станиславу Симићу, који су ми помагали у сређивању прикупљених резултата током истраживања

Коначно, посебну захвалност дугујем мојој породици и пријатељима на подршци.

Нови Сад, 17.04.2016.

мр сци. Милан Н. Савовић

## САДРЖАЈ

|  |    |
|--|----|
| 1. УВОД.....   | 1  |
| 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....   | 4  |
| 2.1. Опште карактеристике <i>Neospora caninum</i> .....                  | 5  |
| 2.1.1. Таксономски положај .....   | 5  |
| 2.1.2. Морфолошке карактеристике <i>Neospora caninum</i> .....           | 8  |
| 2.1.3. Циклус развој.....  | 16 |
| 2.1.4. Врсте домаћина за <i>Neospora caninum</i> .....                   | 19 |
| 2.2. Епидемиологија: Начин преношења и преваленца <i>N.caninum</i> ..... | 23 |
| 2.2.1. Хоризонтална трансмисија .....                                    | 23 |
| 2.2.2. Вертикална трансмисија .....                                      | 24 |
| 2.2.3. Серопреваленца <i>N. caninum</i> код говеда .....                 | 25 |
| 2.2.4. Серопреваленца <i>N. caninum</i> код паса.....                    | 27 |
| 2.3. Клиничка слика неоспорозе .....                                     | 27 |
| 2.3.1. Неоспороза код говеда.....  | 27 |
| 2.4. Имунолошки одговор домаћина .....                                   | 30 |
| 2.5. Дијагноза.....  | 31 |
| 2.6. Фактори ризика.....   | 33 |
| 2.7. Економски значај неоспорозе у говедарству.....                      | 34 |
| 2.8. Терапија .....  | 35 |
| 2.9. Превенција .....  | 36 |
| 2.10. Отпорност .....  | 36 |
| 3. ЦИЉЕВИ И РАДНА ХИПОТЕЗА.....  | 38 |
| 3.1. Циљеви истраживања.....   | 39 |
| 3.2. Радна хипотеза.....   | 39 |
| 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....  | 40 |
| 4.1. Испитивано подручје.....  | 41 |
| 4.2. Испитиване животиње.....  | 42 |
| 4.3. Испитивани материјал.....   | 43 |
| 4.3.1. Узорци крви .....   | 43 |
| 4.3.2. Узорци побачених фетуса .....                                     | 44 |

---

|   |    |
|---|----|
| 4.4. Серолошка испитивања.....  | 44 |
| 4.4.1. Извођење имуноензимског компетитивног <i>cELISA</i> теста.....   | 44 |
| 4.4.2. Извођење теста индиректне имуофлуоресценције.....  | 46 |
| 4.4.3. Доказивање антитела других узročника репродуктивних поремећаја.....  | 48 |
| 4.5. Епизотиолошки подаци.....  | 50 |
| 4.6. Испитивање побачених фетуса.....   | 51 |
| 4.7. Статистичка обрада података.....   | 51 |
| 5. РЕЗУЛТАТИ.....   | 52 |
| 5.1. Укупна преваленца анти - <i>N. caninum</i> антитела код крава.....   | 53 |
| 5.2. Репродуктивни поремећаји код крава.....  | 56 |
| 5.3. Преваленца анти - <i>N. caninum</i> антитела код крава са репродуктивним поремећајима.....                     | 57 |
| 5.3.1. Остали узročници побачаја и других репродуктивних поремећаја.....  | 58 |
| 5.4. Преваленца анти - <i>N. caninum</i> антитела код крава без репродуктивних поремећаја.....                      | 59 |
| 5.5. Преваленца анти - <i>N. caninum</i> антитела код крава без података о присуству репродуктивних поремећаја..... | 60 |
| 5.6. Епизотиолошки подаци.....  | 60 |
| 5.7. Географска дистрибуција.....   | 62 |
| 5.8. Присуство паса као фактора ризика за појаву инфекције.....   | 63 |
| 5.9. Испитивање побачених фетуса.....   | 65 |
| 5.9.1. Резултати патохистолошког прегледа.....  | 65 |
| 6. ДИСКУСИЈА.....   | 69 |
| 7. ЗАКЉУЧЦИ.....  | 84 |
| 8. ЛИТЕРАТУРА.....  | 86 |

## 1. УВОД

*Neospora caninum* је интрацелуларна паразитска протозоа широм света позната као најчешћи узрочник абортуса код високопродуктивних плоткиња који за последицу имају велике економске губитке. Истраживања показују да годишњи губици у млекарској индустрији у САД, износе око 550 милиона долара, док је на Новом Зеланду, због појаве масовних абортуса губитак у производњи говеђег меса више од милион долара (Reichel *u cap.*, 2013).

Ова протозоа је први пут идентификована 1984. године у Норвешкој код паса оболелих од енцефалитиса и миозитиса (Bjerkås *u cap.*, 1984). До сада је утврђено да се овај паразит са хетероксеним циклусом развоја, може наћи код канида: паса, којота, аустралијских динго паса и вукова као коначних домаћина, док су говеда најзначајнији прелазни домаћини (Woods *u cap.*, 1994; Dubey *u cap.*, 1996; McAllister *u cap.*, 1999; Gondim *u cap.*, 2004). Пас и вук се најчешће инфицирају овом протозоом ингестијом делова плаценте након телења (Dijkstra *u cap.*, 2001). Говеда се могу заразити инфективним ооцистама које избацују пси, (егзогеним путем) или што је много важније, трансплацентално (ендогеним путем) при чему настаје латентна инфекција. Код инфицираних млечних крава и товних говеда сем побачаја нема никаквих других клиничких знакова болести, а побачени фетуси немају видљивих промена.

Код инфицираних млечних крава и товних говеда осим побачаја нема никаквих других клиничких знакова болести, а побачени фетуси немају макроскопски видљивих промена. Бројне епидемиолошке студије урађене у Калифорнији, Аустралији, Новом Зеланду, Холандији, Енглеској, указују на велике економске губитке у сточарској производњи услед абортуса узрокованих овом протозоом. Сматра се, у наведеним земљама, да од укупног броја свих абортуса, *Neospora caninum* узима учешће од 20% до 43% (Dubey, 1999) а инфекција може да обухвати више од 20% јединки са једне фарме. *Neospora caninum* је описана као важан узрок абортуса и у региону Скандинавских земаља (Petersen *u cap.*, 1999).

Постоје оскудни подаци о распрострањености ове инфекције у Србији, где се истраживња спроводе у задњих неколико година.

Прелиминарна истраживања спроведена од 2008-2010. године, показала су да су серопозитвне животиње присутне у Војводини, а на малом узорку пашних говеда из Баната, серопозитивност је доказана код чак 48,1%, док је овај проценат код млечних крава из Срема износио 12% (Лалошевић и сар., 2010). Серопозитивност је доказана и код оваца на територији Србобрана (Бобош и сар., 2009) као и код паса са територије Војводине (Куруца и сар., 2012). Истраживање рађено у Панчеву показало је проценат серопозитивности од 4,6% (Гавриловић и сар., 2013).

Превенција говеђе неоспорозе се своди на мере спречавања контаминације сточне хране изметом заражених паса. Такође, плацента и угинули тј. абортирани фетуси не смеју доћи у ланац исхране паса. Кује које су раније показивале клиничке знаке неоспорозе као и оне чији су штенци раније били инфицирани овом протозоом, не смеју се држати за приплод (Dubey и Schares., 2011).

У неким земљама спроводи се вакцинација говеда против неоспорозе вакцином *Bovilis NeoGuard® - Intervet*. Вакцинација животиња се изводи у првој трећини гравидитета да би се обезбедила максимална заштита током друге трећине гравидитета, где је ризик од побачаја узрокован инфекцијом *N. caninum* највећи (Barajas и сар. 2004). Код паса не постоји ефикасна вакцина, због чега су превентива и рана дијагностика од кључног значаја.

Због тешке изолације *Neospora caninum*, посебно место у дијагностици су заузели серолошки тестови, међу којима се као „златни стандард“ истакао тест индиректне имунофлуоресценције (ИИФТ). Овај тест је коришћен и у нашим ранијим истраживањима за утврђивање серопреваленте код паса, оваца и говеда. У ту сврху су коришћени комерцијални антиген (VMRD, USA) и коњугат истог произвођача.

Све горе наведено говори да се на сузбијању и искорењивању неоспорозе мора још много радити како би се спречило њено појављивање и ширење и да би се смањили економски губици у сточарској производњи.

Први корак је утврђивање одговарајућих епизоотиолошких података из којих се може увидети значај инфекције као и фактори ризика који на то утичу.

## **2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ**

## 2.1. Опште карактеристике *Neospora caninum*

*Neospora caninum* је интрацелуларна паразитска кокцидија, која припада фамилији *Sarcocystidae*, колу *Apicomplexa* а одговорна је за абортусе код говеда широм света (*Dubey u cap.*, 2002, *Dubey.*, 2005).

Код паса изазива менингоенцефалитис, полимиозитис и полирадикулонеуритис који често завршавају леталном асцендентном парализом. Такође, код паса, *Neospora caninum* се сматра најчешћим узрочником инфективних инфламаторних миопатија, а документована је и кожна форма неоспорозе (*Boyd u cap.*, 2005).

Зоонотски карактер ове протозое за сада није доказан. Ипак, имунокомпромитованим особама (особе оболеле од *AIDS*-а и слично) препоручује се избегавање контакта са познатим изворима *N. caninum* (*Lyon.*, 2010, *Lindsay u cap.*, 1999б). Антитела на *N. caninum* код људи доказана су у свега неколико истраживања, код 7,2 % трудница у Египту, на пример, али за сада нема доказа који би потврдили њен зоонотски значај (*Ibrahim u cap.*, 2009)

*Neospora caninum* је облигатни интрацелуларни паразит морфолошки и антигенски врло сличан са *Toxoplasma gondii*, али се због специфичности за врсту дефинитивног и прелазног домаћина, од ње значајно разликује. Први опис *Neospora caninum* дао је 1984. године *Bjerkas*, у Норвешкој, који је објавио да једна протозоа, налик на токсоплазму, узрокује тежак енцефаломијелитис код паса, код којих нису доказана антитела на *Toxoplasma gondii*. Исти аутор је такође показао да је ултраструктура паразита значајно другачија од токсоплазме, а паразите је доказао у мозгу и мишићном ткиву обелелих паса (*Bjerkas u cap.*, 1984).

### 2.1.1. Таксономски положај

Највећи допринос познавању овог релативно новог паразита дао је *Dubey* који је доказао имунохистохемијским и серолошким методама нову врсту кокцидија у сачуваним парафинским резovima ткива од десет паса који су раније погрешно



дијагностиковани као инфекција са *T. gondii* и назвао је *Neospora caninum* (Dubey и сар. 1988). Иако од тада почињу интензивна истраживања, све до данас, упркос бројним новим лабораторијским методама, није употпуности разјашњено питање природног, дефинитивног домаћина као и сви детаљи животног циклуса ове кокцидије. Током новијих молекуларних истраживања, потврђено је присуство још једне врсте из рода *Neospora*, која је названа *Neospora hughesi*. Ова протозоа је доказана искључиво код коња, као узрочник енцефаломијелитиса (March и сар. 1999). Таксономски положај рода *Neospora* дат је у табели 1.

Табела 1. Таксономски положај *Neospora caninum* (према Dubey и сар., 1988а)

|                                       |                          |                              |                               |                          |
|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <i>Коло</i> <u><i>Apicomplexa</i></u> |                          |                              |                               |                          |
|                                       |                          |                              |                               |                          |
| <i>Класа</i>                          | <i>Aconoidasida</i>      |                              | <u><i>Conoidasida</i></u>     |                          |
|                                       |                          |                              |                               |                          |
| <i>Подкласа</i>                       |                          | <u><i>Coccidia</i></u>       |                               | <i>Gregarinia</i>        |
|                                       |                          |                              |                               |                          |
| <i>Ред</i>                            | <i>Agamococcidiorida</i> | <u><i>Eucoccidiorida</i></u> | <i>Ixorheorida</i>            | <i>Protococcidiorida</i> |
|                                       |                          |                              |                               |                          |
| <i>Подред</i>                         | <i>Adelorina</i>         |                              | <u><i>Eimeriorina</i></u>     |                          |
|                                       |                          |                              |                               |                          |
| <i>Фамилија</i>                       |                          | <u><i>Sarcocystidae</i></u>  |                               |                          |
|                                       |                          |                              |                               |                          |
| <i>Потфамилија</i>                    |                          | <i>Sarcocystinae</i>         | <u><i>Toxoplasmatinae</i></u> |                          |
|                                       |                          |                              |                               |                          |
|                                       |                          |                              | <i>Besonoitia</i>             |                          |
|                                       |                          |                              | <i>Hammondia</i>              |                          |
|                                       |                          |                              | <i>Hyaloklossia</i>           |                          |
| <i>Род</i>                            |                          |                              | <u><i>Neospora</i></u>        |                          |
|                                       |                          |                              | <i>Nephroisospora</i>         |                          |
|                                       |                          |                              | <i>Toxoplasma</i>             |                          |

Новоописана врста, *Neospora hughesi* је структурно врло слична са *Neospora caninum* али и са другом, од раније познатом кокцидијом, узрочником енцефаломијелитиса код коња, *Sarcocystis neurona* (Marsh *u cap.*, 1999).

Разлике између *N. caninum* и *N. hughesi* огледају се у варијабилности више од 6% секвенци аминокиселина површног антигена названог SAG1, антигенског протеина од 29-36 kDa, локализованог само на површини тахизоита, који служи за адсорпцију током пенетрације у ћелије домаћина. Такође, доказана је разлика у више од 9% аминокиселинских секвенци другог површинског антигена, означеног као SRS2, величине 35-43 kDa који се експримира на површини тахизоита и бразизоита (Dubey *u cap.*, 2002). Полиморфизам ових гена и њихови површински антигени омогућавају прецизну диференцијацију између ове две врсте у оквиру рода *Neospora*. (Marsh *u cap.*, 1998).

Иако је *Neospora caninum* морфолошки врло слична са добро познатом врстом *Toxoplasma gondii*, постоје три врло значајне карактеристике које их диферентују:

1. Клинички ентитет са парализама, нарочито предњих екстремитета не виђа се код токсоплазмозе,
2. Ткивне цисте ова два паразита значајно се разликују у случају инфекције паса. Код неоспорозе налазе се искључиво у нервном ткиву, дебљина зида је 1-4 $\mu$ m, док код токсоплазме могу да се нађу у многим органима, а зид је дебљине <0,5 $\mu$ m.
3. Код неоспорозе антитела на *Toxoplasma gondii* се не могу доказати и паразит не реагује на антитоксоплазма антитела у имунохистохемијским реакцијама.

Неоспороза клинички манифестна болест говеда и паса, за разлику од токсоплазмозе од које у првом реду обољева човек као и друге топлокрвне животиње, на пример: овце, пси, мачке, козе, свиње и коњи (Dubey *u cap.*, 2001).

Код приплодних говеда, *N. caninum* се може преносити у неколико генерација (Garcia-Vazquez., 2005., Schares *u cap.*, 1998) због чега ова говеда представљају резервоар инфекције за каниде (Wouda *u cap.*, 1999).

Зоонотски карактер ове протозое до сада није доказан, нити је човек регистрован као њен прелазни домаћин (*Mc Cann.*, 2008). Прва испитивања зоонотског карактера *N. caninum* спроведена су код инфицираних резус мајмуна (*Macaca mulata*), Потом су серолошка испитивања обављена на људима (радници на фармама, пољопривредници, даваоци крви, жене које су у историји болести имале податак о абортусу), али није доказано постојање зоонотског потенцијала овог узрочника. Ипак, имунокомпромитованим особама (особе оболеле од AIDS-а и слично) не препоручује се контакт са познатим изворима *N. caninum* (*Lyon*, 2010).

Месоједи се највероватније заразе уношењем меса које садржи бразидзоите, унутар ткивних циста, док се биљоједи инфицирају вероватно преко хране или воде за пиће контаминираних спорулисаним ооцистама (*хоризонтална трансмисија*). Могуће су и трансплацентарне инфекције када се тахизоити преносе са инфициране мајке на фетус у периоду гравидитета (*вертикална трансмисија*).

### **2.1.2. Морфолошке карактеристике *Neospora caninum***

Детаљи животног циклуса *N. caninum* до данас нису употпуности разјашњени, али је познато да је *Neospora caninum* хетероксени паразит, што значи да су јој неопходни и прелазни и сталног (дефинитивни) домаћин како би успешно заокружила свој циклус развоја.

Кокцидије из кола *Apicomplexa*, обухватају велики број врста, а карактерише их недостатак органела за кретање (цилија и флагела). Циклус размножавања карактерише смена бесполне, мултипле деобе (шизогонија) и сексуалне мултипликације (гаметогонија) која води у стварање ооциста и инфективних форми које се називају спорозоити. Хаплоидија траје током читавог размножавања осим у фази зигота, која је врло кратка (схема 1).

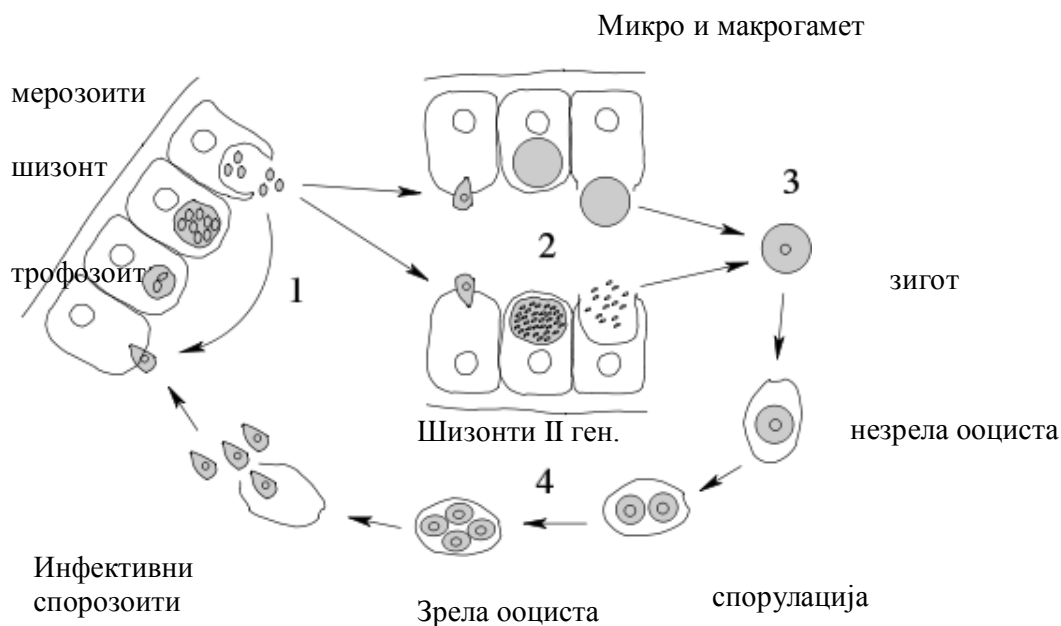


Схема 1. Општа схема размножавања кокцидија

Сва три развојна облика који се могу видети у циклусу развоја других ткивних кокцидија као што су *Toxoplasma gondii* и *Sarcocystis spp.*, на пример, и код *N. caninum* су инфективна, али сматра се да ооцисте представљају кључ епидемиологије неоспорозе (Dubey u Schares., 2010).

Инфективни стадијуми *N. caninum* су: тахизоит, ткивне цисте и ооцисте. Тахизоити и ткивне цисте представљају интрацелуларну фазу развоја узрочника у прелазним домаћинима док се ооцисте могу наћи само у фецесу сталног домаћина, односно паса и других канида (Dubey u cap., 2002).

Прелазни домаћин спорулисане ооцисте уноси у организам ингестијом контаминиране хране или воде, и у његовим цревима се из ооциста ослобађају спорозоити. Они инвадирају ентероците домаћина, умножавају се и формирају тахизоите. Тахизоити се одатле, путем крвотока и лимфних судова, дисеминују по организму инфицирајући нови пријемчиве ћелије, као што су: нервне ћелије, макрофаги, фибробласти, ендотел крвних судова, мишићне ћелије, хепатоцити, епител бубрежних тубула итд. (Al-Qassab u cap., 2010).

Код gravidних животиња, тахизоити пролазе плаценту и инфицирају фетус. Константни циклуси интрацелуларне пролиферације тахизоита, у комбинацији са имунопатолошким процесима, код домаћина могу довести до деструкције ткива и развоја болести. Међутим, у нормалном току инфекције, у имунокомпетентном домаћину, тахизоити се под утицајем јаког ћелијског имуног одговора трансформишу у брадизоите који затим, најчешће унутар мишићних и нервних ћелија, формирају тзв. ткивне цисте (*Vonlaufen*, 2004).

Сексуална фаза развоја описана је тек 1988. године када је *McAllister* доказао ооцисте у измету паса храњених ткивним цистама експериментално инфицираног миша (*McAllister u cap.* 1998).

Месоједи се највероватније инфицирају уношењем меса које садржи брадизоите унутар ткивних циста, и сматра се да се стални домаћин не може инфицирати инфективним ооцистама (*Bandini u cap.*, 2011) док се биљоједи заразе преко хране или воде за пиће контаминираних спорулисаним ооцистама (*хоризонтална трансмисија*). Далеко су важније, трансплацентарне инфекције, када се тахизоити преносе са инфицираних мајке на фетус у периоду gravidитета (*вертикална трансмисија*).

Према томе, инфективни стадијуми *N. caninum* су сва три стадијума развоја: тахизоит, брадизоит и ооциста. Тахизоити и ткивне цисте са брадизоитима представљају интрацелуларну фазу развоја узрочника у прелазним домаћинима која још увек има непознаница (*Dubey u cap.* 2002).

Детаљан опис морфологије развојних облика *N. caninum*, дат је од стране Дабија и сарадника још 1988. године, али је 2002. године урађена редескрипција од стране истих аутора, ради диференцијације од других, врло сличних ткивних кокцидија попут *Neospora hugesii*, *Hammondia heydorni*, *Isospora bigemina*. (*Dubey u cap.*, 2002).

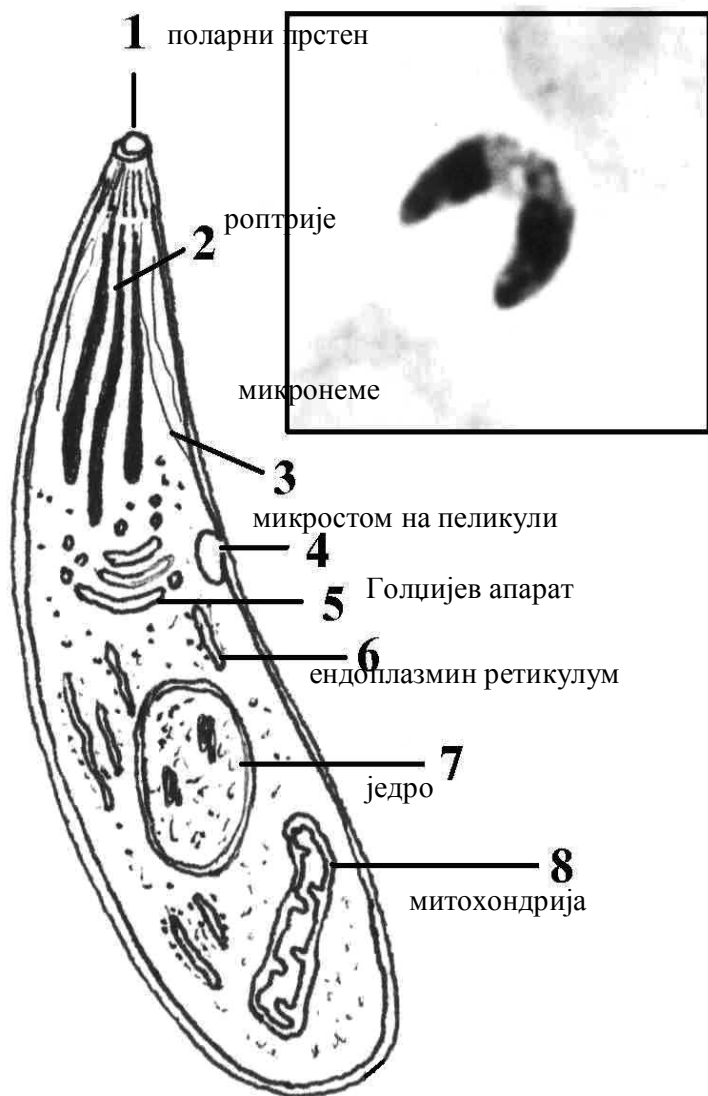


Схема 2. Схематски приказ структуре зоита, исечак: *Toxoplasma gondii*, микроскопски препарат, увељичање 1000x

### 2.1.2.1. Тахизоити

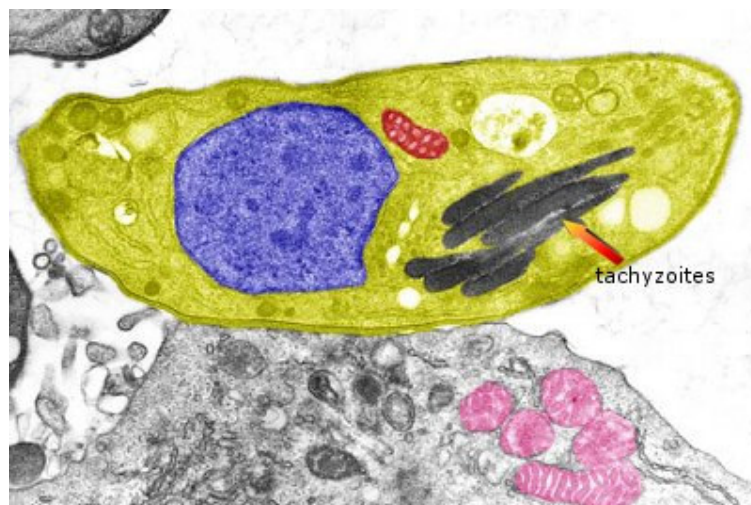
Термин тахизоит је исковао *Frenkel* од грчке речи тахија што значи брз (грк. тахе́ια - брз) током истраживања *Toxoplasma gondii*, да би описао стадијум брзог умножавања зоита у ткивима прелазних домаћина и у екстраинтестиналном циклусу развоја код јединог коначног домаћина, мачке. Термин "тахизоит" замењује претходно коришћен термин "трофозоит" (грк. троφή - храна). Размножавање ткивних кокцидија је врло специфично, што се види на примеру *Toxoplasma gondii*. Тахизоити се размножавају

асексуално унутар ћелије домаћина поновљеном ендодиогенијом, посебном врстом размножавања код које се стварају два потомка унутар родитеља паразита. Код ендодиогеније, Голџијев апарат се дели први, и настају два апарата на предњем крају нуклеуса. Предњи делови унутрашњих мембранских апарата и микротубуле ћелија потомака испод опне изгледају као две куполасте структуре на предњем делу. Паразитски нуклеус поприма облик потковице, а крајеви нуклеуса се померају ка купастим предњим деловима потомка који се развија. Унутрашњи мембрански апарат и микротубуле испод мембране настављају да се продужавају позади и окружују половину нуклеуса, који се у неком тренутку подели на два дела. Потомак наставља да расте док не дође до површине родитеља. Унутрашњи мембрански апарат родитеља нестаје, а његова спољна мембрана постаје плазмалема ћелије потомка. Тахизоити настављају да се деле ендодиогенијом. Ћелија домаћина пуца кад више не може да подржава раст тахизоита (*Nichols u cap.*, 1983).

Функција органела унутар тахизоита није потпуно позната, али је вероватно везана за пенетрацију у ћелије домаћина и стварање интрацелуларне средине погодне за раст и развој паразита (*Morrissette u cap.*, 1997).

Тахизоити улазе у ћелије домаћина активно пенетрирајући кроз плазмалему ћелије домаћина или путем фагоцитозе. Након уласка у ћелију домаћина, тахизоит добија јајаст облик и окружује га паразитофорна вакуола (ПВ), која је изгледа изведена и из паразита и из ћелије домаћина. Убрзо након пенетрације, развија се тубуловезикуларна мембранска мрежа (ТМН) унутар ПВ. Први опис ултраструктуре *Toxoplasma gondii* дат је од стране *Nichols*-а и његових сарадника (*Nichols u cap.*, 1983) а врло мали број радова описује ултраструктуру тахизоита *Neospora caninum* (*Dubey u cap.* 2002).

Тахизоити *N. caninum* су овоидни, полумесечастии или глобуларни, величина им је 3-7x1-5 $\mu$ m, што зависи од стадијума деобе. Неподељени тахизоит има величину око 7x2 $\mu$ m. Лоцирани су у паразитофорној вакуоли у цитоплазми ћелија домаћина, и сваки садржи 6-16 роптрија. Тахизоити садрже бројне органеле који се виђају у мерозоитима других кокцидија (*Dubey u cap.*, 2002).



Слика 1. Приказ тахизоита унутар ћелије домаћина (*Dubey u cap. 2002.*)

У овој фази тахизоити су инфективни за прелазног домаћина, убрзано се размножавају и шире у ткивима. Овај феномен назива се ендодиогенија, и води у формирање два зоита, односно 2 ћелије ћерке, унутар мајке ћелије (*Dubey u Lindsay.,1996*).

Тахизоити се могу наћи у многим ћелијама, укључујући неуроне, макрофаге, миоците, ендотелне ћелије, ћелије реналног тубуларног епитела (*Lindsay u cap., 1999*) а могу проћи и трансплцентарну баријеру и довести до инфекције плода у току трудноће.

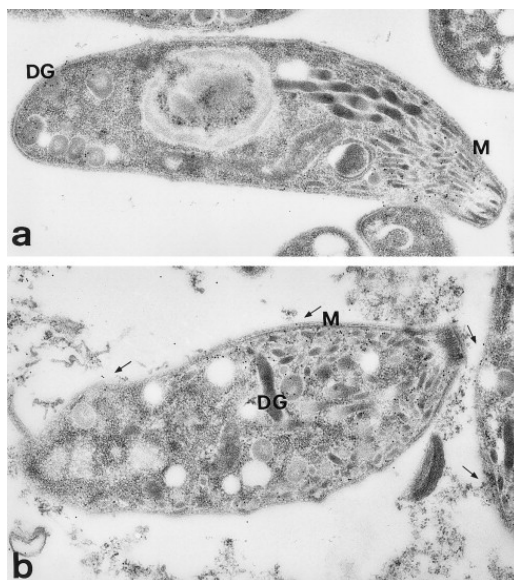
Паразити могу бити слободни у цитоплазми или се налазе унутар паразитофорне вакуоле, којих може бити више у једној ћелији (*Dubey u Lindsay.,1996.*). Ћелија може да садржи преко 300 тахизоита, а пенетрација у нове ћелије траје врло кратко (*Dubey u cap., 1996*).

Микроскопска структура тахизоита карактерише се присуством нуклеуса, нуклеолуса и апикалног комплекса, сачињеног од 2 поларна прстена, роптрија, око 150 микронема, микротубула, митохондрија, ендоплазматског ретикулума и Голџијевог апарата, што је дато у шематском приказу схеме. 2. (*Dubey u Lindsay., 1996*).

У процесу инвазије ћелија домаћина кључну улогу има апикални комплекс, а пенетрација траје око 15-20 секунди, након чека се формира паразитофорна вакуола у којој се паразит умножава. Велики значај у инвазији имају микронеме које садрже сет адхезивних протеина који се експримирају на површини тахизоита, а најважнији је SAG-1. У контакту између *N. caninum* и ћелије домаћина долази до интеракције специфичних домена адхезивних протеина микронема и лиганда експримираних на



површини циљних ћелија домаћина. Секреција садржаја микронема доводи до пораста интрацелуларне концентрације калцијумових јона, што доводи до секреције протеина кога луче роптрије, који је најзначајнији у стварању паразитофорне вакуоле. На крају се активира апикопласт, за којег се претпоставља да има значаја у метаболизму паразита (*Sonda u cap.*, 2000).



Слика 2. Тахизоити *N. caninum*, електронска микроскопија уз помоћ обележених антитета конјугованих златом, обележене микронеме (M) на апикалном крају (из: *Sonda u cap.*, 2000)

У оригиналном опису Дабија из 1988. године, тахизоити нису виђени у паразитофорној вакуоли у узорцима јетре и мишића два природно инфицирана пса (*Dubey u cap.*, 1988a). Међутим, паразитофорна вакуола око паразита описана је касније, након изолације паразита у ћелијској култури. Разлог зашто није раније виђена, може бити у чињеници да је зид паразитофорне вакуоле врло танак и није видљив у свим узорцима или је ова мембрана разорена у раној фази дегенерације ћелија домаћина (*Dubey u cap.*, 1988b).

Развојем целуларног имуног одговора (*Williams u cap.*, 2000; *Staska u cap.*, 2005) тахизоити прелазе у спороделеће облике-брадизоите, што је карактеристика хроничне фазе неоспозе.

### 2.1.2.2. Брадизоити и ткивне цисте

Термин „брадизоит” је такође дао Френкел да би описао организам који се споро умножава унутар ткивне цисте код *Toxoplasma gondii*.

Брадизоити су издужени, димензија 6-8x1-2 $\mu$ m (*Speer u Dubey*, 1989). Налазе се у паразитофорној вакуоли домаћина и формирају ткивне цисте.

Ткивне цисте *N. caninum* примарно се налазе у нервном ткиву (мозак, кичмена можина, периферни нерви), ретини и мишићном ткиву (*Peters u cap.*, 2001). Могу бити интактне, дегенерисане или руптуриране, без знакова инфламације у нервном ткиву (*Dubey u cap.*, 2004).

Величина ткивних циста је различита и може да износи и до 107 $\mu$ m. Садрже 20 – 100 брадизоита (*Speer u cap.*, 1999). Зид ткивне цисте је дебљине око 4 $\mu$ m, са таласастом контуром у хистолошким резевима ткива, без изражених протрузија. Цисте нису септиране а унутар њих налазе се брадизоити. Брадизоити су дужине 8x2 $\mu$ m, поседују субтерминално једро и све органеле као и друге кокцидије, укључујући роптрије, микронеме и грануле расуте у плазмалеми. У брадизоитима има 6–12 роптрија.

Иако се ткивне цисте могу развити у унутрашњим органима, укључујући плућа, јетру и бубреге, чешће су у нервном и мишићном ткиву, укључујући мозак, очи, мишиће срца и скелета (*Dubey u cap.*, 2004; *Peters u cap.*, 2001). Интактне ткивне цисте вероватно не изазивају оштећења и могу постојати током читавог живота домаћина без изазивања упалне реакције.

Интранеуралне ткивне цисте су описане код природно инфицираних говеда, оваца, коза, јелена и коња (*Dubey u cap.*, 2004). Ткивне цисте се развијају код екпериментално инфицираног миша, мачке и гербила, три месеца након инфекције (*Dubey u cap.*, 2004).

Интрамускуларне ткивне цисте имају зид дебљине до 1 $\mu$ m, садрже 14–50 брадизоита и морфолошки се тешко диференцирају од *Toxoplasma gondii* и *Sarcocystis spp.* Описане су код паса и мачака, могу да садрже 14 - 50 брадизоита, величине су 5,2x1,6 $\mu$ m.

Експериментална инфекција не даје мишићне цисте код мишева, гербила и мачака (*Dubey u cap.*, 2004).

Ткивне цисте претстављају латентну инфекцију код прелазног домаћина. Током гравидитета брадизоити се могу реактивирати и постати тахизоити, активне

инфективне форме, и довести до инфекције плода и последичних абортуса или других поремећаја (*Bartels и сар.*, 2006).

Након ингестије ткивних циста од стране сталног домаћина (пса) *Neospora* се ослобађа у цревима где започиње интраепителијални циклус развоја, прво асексуалну мултипликацију, потом сексуалну фазу развоја, након које могу настати ооците, које се неспорулсане избацују фецесом у спољашњу средину (*McAllister и сар.*, 1998).

### 2.1.2.3. Ооците

Ооците претстављају потенцијално инфективни стадијум паразита, који избацује стални домаћин. Код паса се оне елиминишу фецесом као неспорулсане, а у спољашњој средини за 24–72 сата спорулишу и постају инфективне за прелазног домаћина (*Lindsay и сар.*, 1998).

Спорулсане ооците *Neospora caninum* су сферичне, димензије 11,7x11,3µm (10,6-12,4x10,6-12,0) у пречнику. Зид ооците је безбојан, дебљине 0,6–0,8µm. Свака ооциста садржи две елипсоидне спороците, величине 8,4x6,1µm (7,4-9,4x5,6-6,4). Свака спороциста садржи 4 спорозоице и резидуално телашце. Спорозоите су дужине 6,5x2,0µm (5,8–7,0x 1,8–2,2) (*Dubey и сар.*, 2002).

Ентероепителијални циклус развоја код *N. caninum* још увек је неразјашњен. Ооците настају сексуалном мултипликацијом у цреву дефинитивног домаћина (пас, којот, динго) међутим до сада нису идентификовани асексуални облици – шизонти, нити сексуални облици - гамонти, који су добро познати код других кокцидија, тако да је овај део циклуса развоја и даље енигма (*Muller и Hemphill.*, 2012).

### 2.1.3. Циклус развоја

Иако су антитела пронађена код низа животињских врста, вијабилна *N. caninum* је до сад изолована само из пса и вука, који се сматрају њеним природним сталним домаћинима, док су којот и аустралијски динго експерименталним путем доказани као такви (*Dubey и сар.*, 2011).

Прелазни домаћини из којих је изолована вијабилна *N. caninum* су: домаће говедо, овца, биво, бизон и белорепи јелен (*Dubey и Schares.*, 2010).

Пси, односно друге каниде, могу послужити и као прелазни домаћини, мада се, најчешће појављују у улози сталног домаћина (Lyon, 2010).

Као што је већ раније речено, у преношењу неоспорозе укључене су све три развојне форме паразита: тахизоит, брадизоит (у ткивним цистама) и спорозоит (у ооцистама), али се сматра да ооцисте имају кључну улогу у епизоотиологији неоспорозе и одржавању паразита у природи (Dubey u Schares., 2006).

Циклус развоја *N. caninum* одвија се као и код других кокцидија, сменом бесполне и полне генерације у тзв. интраепителијалном циклусу унутар ентероцита, код сталног домаћина (пса) при чему настаје ооциста која се избацује фецесом у спољашњу средину.

Циклус развоја у прелазном домаћину, почиње од момента ингестије хране или/и воде контаминираних спорулисаним ооцистама које садрже 8 спорозоиота (схема 3). У цревима прелазног домаћина се из ооциста ослобађају спорозоити који користећи апикални комплекс продиру у ентероците. У њима се трансформишу у тахизоите (трофозоите) удвостручавајући своје димензије. Аналогно познавању развоја осталих ткивних кокцидија (*Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis spp.*) претпоставља се да у овом тренутку, почиње фаза бесполог размножавања - шизогонија, коју карактерише умножавање једра тахизоита, без поделе цитоплазме. Овај процес резултира преображавањем тахизоита у мултинуклеарни облик, који се зове шизонт. Након тога следи деоба ћелија са формирањем бројних мерозоиота.

Мерозоити су мали, округли облици пречника око 2 $\mu$ m, у чијој се цитоплазми налази једро или хроматинско зрнце. Мерозоити напуштају уништену цревну ћелију домаћина продирући у други суседни интактни ентероцит како би се поновио читав процес шизогоније. Број шизогоничних циклуса се не зна, јер њихов број највероватније зависи од снаге имуног одговора животиње. Наиме, већ после неколико шизогоничних циклуса у ентероцитима се почињу развијати и полни облици, тј. почиње друга фаза развоја - гамогонија. Код неких мерозоиота једра се не деле него се у средини формира растресито једро и настаје микрогаметоцит. У макрогаметоциту једно једро је компактно и смештено периферно. Из микрогаметоцита исклијају праменови цитоплазме налик на бичеве по којима су зрнца хроматина размештена попут чворића. То су зрели микрогамети који се одвајају и долазе до макрогамета насталих од макрогаметоцита. Један микрогамет оплоди макрогамет чиме се завршава

гамогонија. Нови развојни облик поприма издужен облик и назива се зигот. Зигот потом почиње да се завлачи у зид црева. Овде се увуче кроз епител и зачури између епителних ћелија и базалне мембране. Овај облик се назива ооциста која напушта ћелије мукозе, одлази у лумен црева и преко фецеса избацује у спољашњу средину. Такве ооцисте се називају неспорулисане или неинфективне ооцисте.

Спорулацијом ооциста у спољашњој средини за 1–3 дана настаје инфективна ооциста. Током спорулације ооцисте, хроматин се поново почиње делити, а с њим истовремено и цитоплазма. Настају појасеви цитоплазме с периферно распоређаним зрнцима хроматина. Постепено око хроматинских зрнаца одвајају се танке траке цитоплазме и формирају вретенасти облици спорозоити, те се тај део развојног циклуса назива спорогонија. Унутар две спороцисте, као што је раније већ наведено, налазе се по 4 спорозоита.

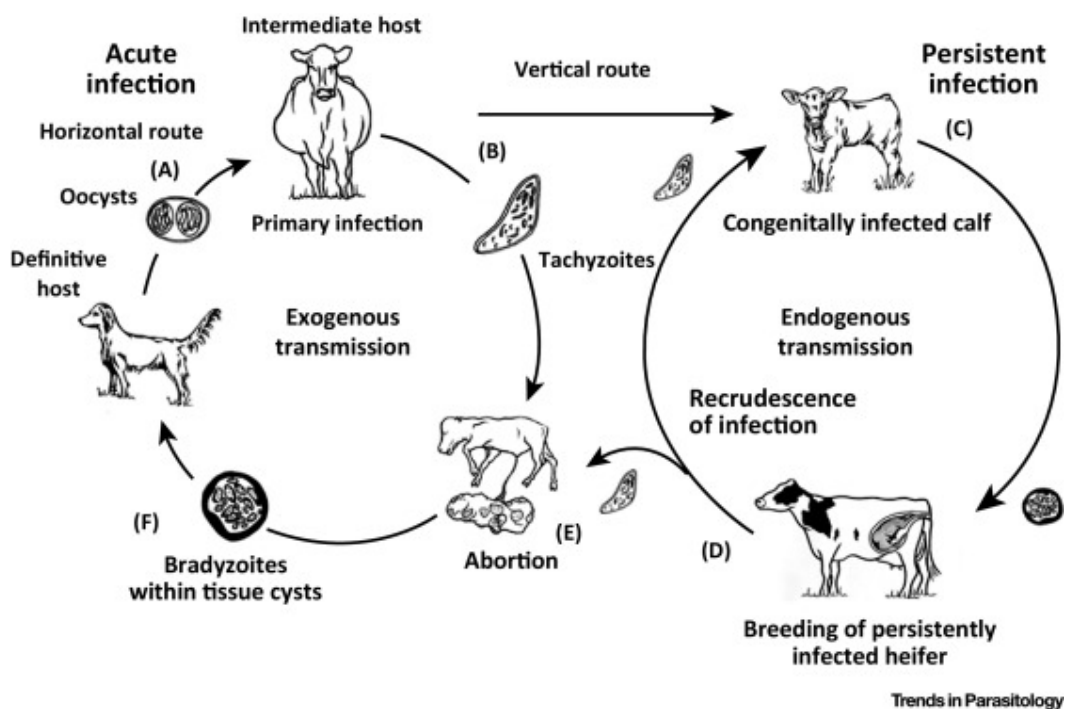


Схема 3. Циклус развоја *Neospora caninum*  
(Trends in Parasitology, February 2016, Vol.32, No.2)

#### 2.1.4. Врсте домаћина за *Neospora caninum*

У циљу разумевања епизоотиологије *N. caninum*, врло је важно идентификовати број и врсту домаћина који учествују у епизоотиолошком ланцу, као и географску распрострањеност домаћина ове паразитозе.

За разлику од *T. gondii*, вијабилну *N. caninum* је веома тешко изоловати. Вијабилна *N. caninum* је изолована код говеда, оваца, паса, белорепог јелена и воденог буфала (Dubey *u cap.*, 2004). Већина ових изолата је потицала од животиња са јасним клиничким симптомима или од интраутерино инфицираних животиња, осим изолата код буфала, оваца и јелена који су узети од старијих асимптоматских животиња.

Изолација вијабилне *N. caninum* је покушана на мноштву ћелијских култура и биолошким огледима на имуносупримираним мишевима, гербилина и псима (Dubey *u cap.*, 2006). Изолација у културама ћелија је нашла ограничену примену због тога што су испитивана ткива инфицирана и другим микроорганизмима с једне стране, а с друге стране не могу се сви изолати прилагодити за умножавање у култури ћелија (Vianna *u cap.*, 2005). Биолошки тестови на мишевима су скупи и неподесни, сматрају непогодним као модел за изучавање *N. caninum*.

Испитивање измета паса експериментално заражених инфицираним месом има предност у односу на претходне две методе, из једноставног разлога што се већа количина материјала може давати као храна псима него што би се икада могло тестирати у ћелијској култури или на глодарима.

Идентификација *N. caninum* у псећем измету треба да се заснива на добијању вијабилних тахизоита у ћелијској култури или глодарима којима се инокулишу ооцисте (Schaes., *u cap.*, 2005).

##### 2.1.4.1. Стални домаћини и пренос паразита путем ооциста

Код сталног домаћина завршава се комплетан циклус развоја, током којег кроз фазу сексуалног размножавања настају неспорулисани ооцисте, које се избацују у спољашњу средину, и у повољним условима температуре и влажности, спорулишу и постају инфективне.

Чак и пре доношења закључка о детаљима животног циклуса *Neospora caninum*, доказано је да држање паса на фармама представља ризик за појаву абортуса код крава (*Pare u cap.*, 1998).

Експерименталне студије су показале да су домаћи пас и аустралијски динго (*Canis domesticus*), битна карика у епизоотиологији инфекције са *N. caninum*, јер они заједно са којотима (*Canis latrans*) представљају за сада једине познате дефинитивне домаћине, који могу избацити ооците *N. caninum* у спољашњу средину (*Gondim 2004.*, *Lindsay u cap.*, 1999, 2001; *McAllister u cap.*, 1998., *Gondim u cap.*, 2004). Ипак, вијабилне ооците су доказане само у фецесу природно заражених паса (*Basso u cap.*, 2009a, 2009b.), мада постоје подаци да су и код сивог вука (*Canis lupus*) у природним условима пронађене вијабилне ооците *N. caninum* (*Dubey u Schares.*, 2011). У објављеној студији на лисицама у Немачкој, у измету нису пронађене вијабилне ооците *N. caninum* (*Constantin u cap.*, 2011).

Иако се сматра да су ооците кључне за епидемиологију неоспорозе јер су отпорне у спољашњој средини, са сигурношћу су доказане само код неколико паса упркос бројних испитивања широм света (*Uzeda u cap.*, 2007; *Neto u cap.*, 2011).

Број ооциста које излучују пси је обично врло мали. У новијим истраживањима чак није примећена ни једна или је нађено само неколико ооциста у псећем измету (*Dubey u Scharesb.*, 2011).

Пошто ооците *N. caninum* по структури личе на једну другу кокцидију, *Hammondia heydorni*, јако је важно да се ооците *N. caninum* идентификују на одговарајући начин (*Soares u cap.*, 2011). Из тих разлога су развијени додатни молекуларни инструменти за разликовање *N. caninum* и *H. heydorni* (*Barratta u cap.*, 2008).

Није потпуно разјашњено како се пси заразе *N. caninum* у природним условима. Вертикални пренос неоспорозе је прво примећен код паса. Сматра се да се *N. caninum* преноси са кује на штене током последњег стадијума гестације или постнатално преко млека. За разлику од говеда, вертикални пренос *N. caninum* код паса се сматра јако променљивим и није вероватно да може опстати у одсуству хоризонталне инфекције.

Фекално-орални пренос ооцистама *N. caninum* код паса није могућ већ искључиво инфекција настаје конзумацијом зараженог меса. У једном огледу храњена су 4 пса са 1000, 5000 и 10.000 ооциста *N. caninum* и ни један од 4 заражена пса није излучивао ооците у измету током посматраног периода од 30 дана. Сероконверзија је регистрована код 2 пса храњена са 10.000 ооциста док 2 пса храњена са 1000 односно

5000 ооциста, нису имала антитета на *N. caninum*. Ни паразитска ДНК ни паразитски стадијуми нису доказани у ткивима серопозитивних паса успаваних 6 месеци након храњења ооцистама. Ови закључци показују да пренос ооциста фекално-оралним путем највероватније није значајан начин преноса паразита за пса као сталног домаћина (*Bandini u cap.*, 2011).

Уношење зараженог ткива је највероватнији извор инфекције за месоједе. Теоретски, ткиво било које животиње које садржи ткивне цисте може бити извор заразе за псе.

Ткиво зараженог плена паса може представљати логичан извор заразе, али паразит способан да изазове инфекцију није изолован из потенцијалног плена за псе, на пример из птица, глодара или зечева.

Докази да птице могу бити природни домаћини за *N. caninum* за сада не постоје (*Gondim, 2006*) иако је висока серопозитивност доказана (*Darwich u cap.*, 2012).

Недавно је потврђена подложност ембрионисаних кокошијих јаја инфекцији тахизоитима *N. caninum* (*Mansourian u cap.*, 2009). Такође, успешно су тахизоитима заражени и голубови (*Columba livia*), а по неким ауторима они су природни резервоари *N. caninum* (*Mineo u cap.*, 2009).

Експериментално заражени пилићи старији од недељу дана, који су интраперитонеално инокулисани тахизоитима развили су пролазну инфекцију, али паразити или антитета нису доказани 60 дана након инокулације.

Код паса храњених инфицираним хориоалантоисним мембранама, долазило је до формирања ооциста у измету (*Furuta u cap.*, 2007).

Према неким ауторима у мозгу сврака, (*Pica pica*) и јастреба мишара (*Buteo buteo*) је доказана ДНК *N. caninum*, па се ове две врсте могу сматрати прелазним домаћинима за *N. caninum* (*Darwich u cap.*, 2012).

Пси храњени мускулатуром образа, срцем, јетром и мозгом природно заражених говеда или бивола су излучивали ооцисте (*Bandini u cap.*, 2011; *Cavalcante u cap.*, 2011).

Није познато да ли ткива која садрже само тахизоите, не и цисте (акутно заражене животиње) могу бити перорално заразна за месоједе. Пси који су храњени ткивом заражених новорођених телад нису излучивали ооцисте (*Cedillo u cap.*, 2008).



#### 2.1.4.2. Прелазни домаћини

До сада су као прелазни домаћини за *Neospora caninum* доказана говеда, козе, овце, свиње, коњи, јелени, лисице, глодари и живина.

Код ових врста присутна је асексуална фаза развоја, која подразумева постојање тахизоита и ткивних циста са брадизоитима.

Новије епидемиолошке студије, указују да црвена и сива лисица представљају фактор ризика за инфекцију пашних животиња, али још увек није доказано да ли се ооцисте могу избацити у спољашњу средину, тако да се ове каниде још увек сматрају само прелазним домаћинима (*Barling u cap.*, 2000).

#### 2.1.4.3. Вируленција *Neospora caninum*

До сада је са сигурношћу утврђено да *N. caninum* може изазвати озбиљне болести код говеда и паса, а понекад и код других животиња. Инапаратна инфекција код многих домаћина је уобичајена, али клинички манифестно обољење је ретко. Клинички манифестно обољење може бити повезано са вируленцијом соја, јер иако су различити изолати *N. caninum* од разних домаћина генетски слични, многи сојеви имају свој сопствени молекуларни састав, што је утврђено савременим молекуларним методама (*Regidor-Cerrillo u cap.*, 2006; *Al-Qassab u cap.*, 2009б, 2010; *Basso u cap.*, 2009б, 2010). Молекуларне карактеристике соја могу бити корисне за епидемиолошке студије. Егзогене епизоотије говеђе неоспорозе у Немачкој су биле повезане са заједничким извором заразе (*Basso u cap.*, 2010). У другом истраживању, у Шпанији, постојало је груписање изолата *N. caninum* према географском пореклу побачених говеђих фетуса (*Pedraza-Diaz u cap.*, 2009). Мало се зна о варијацијама сојева у односу на њихову вируленцију. У малобројним експерименталним студијама испитивања вируленције неки сојеви *N. caninum* су били више вирулентни за мишеве него за друге глодаре, и такође су показали разлике током *in vitro* култивације (*Garcia-Melo u cap.*, 2009, 2010; *Rojo-Montejo u cap.*, 2009а,б; *Regidor-Cerrillo u cap.*, 2010б, 2011). Још увек није познато да ли би забележена различита вируленција код мишева могла да се одражава и код других домаћина.

Експерименталне инфекције које су за последицу имале абортус или фетална оштећења добијане су уз помоћ различитих говеђих изолата, али се поставља питање

етичности оваквих истраживања код стеоних говеда и она ће бити забрањена (*Dubey u cap.*, 2007a). У истраживању рађеном у Шпанији, крвама 70-ог дана гестације, инокулисан је говеђи изолат који није оштетио фетус иако су инокулације вршене у раном стадијуму гравидитета (*Rojo-Montejo u cap.*, 2009a). Са друге стране, код говеда експериментално заражених у 110.-ом дану гестације говеђим сојем, смрт фетуса се десила само у једном случају (*Almeria u cap.*, 2010).

Студије које имају за циљ да испитају вируленцију *N. caninum* код говеда је тешко протумачити. Пошто експериментално заражени пси обично излучују само неколико ооциста, овај начин имитирања природне инфекције обично није погодан. С тога се користе тахизоити за експерименталну инфекцију говеда, иако су ооцисте највероватнији извор постнаталних зараза код говеда у природним условима,.

Студије које користе тахизоите добијене из ћелијске културе могу даље да се искомпликују јер изолати *N. caninum* који су дуго одржавани *in vitro* могу бити измењени што се тиче вируленције и других биолошких карактеристика. Експериментално изазивање абортуса може варирати у зависности од врсте, броја пасажа паразита или пута инокулације на пример. Од 19 јуница код којих је интракоњуктивално инокулирано  $10^8$  NC-1 врста тахизоита ни једна није донела на свет заражено теле (*de Yaniz u cap.*, 2007).

## 2.2. Епидемиологија: Начин преношења и преваленца *N.caninum*

Трансмисија *N.caninum* код крава одвија се на два начина: хоризонтално (постнатално) и вертикално (пренатално).

### 2.2.1. Хоризонтална трансмисија

Овај начин преношења инфекције виђа се након ингестије хране или воде контаминираним ооцистама *N. caninum* које избацује стални домаћин. Ингестија спорулисаних ооциста *N. caninum* из околине је једини природни начин инфекције животиња након рођења (*Mc Cann u cap.*, 2007).

Епидемиолошке студије су показале на могућност хоризонталне трансмисије након порођаја. У једној студији на фарми серонегативних музних крава у Холандији, које су праћене 6 месеци, јавила се сероконверзија код мајки, а доказана су антитела ниског

авидитета, што је доказ недавне инфекције. Доказ хоризонталне инфекције је и непостојање корелације серолошког статуса мајки и телад. Исти аутори наводе, да упркос доказане хоризонталне инфекције не морају се јавити абортуси и да сероконверзија на фарми може остати непримећена. Међутим, присуство серопозитивних паса на фарми високо корелира са присуством серопозитивних говеда (*Dijkstra u cap.*, 2002).

## 2.2.2. Вертикална трансмисија

Вертикални пренос подразумева пренос тахизоита трансплацентално са заражене мајке на фетус током гравидитета. Вертикална трансмисија представља предоминантни пут преношења инфекције, са ефикасношћу од 23,5 до чак 90% (*Pare u cap.*, 1996; *Sanderson u cap.*, 2000).

Разликују се две врсте вертикалне трансмисије код говеда:

1. егзогени трансплацентални пренос, кога карактерише ингестија спорулисаних ооциста путем хране или воде за пиће гравидних крава,
2. ендогени трансплацентални пренос, који се виђа код крава са хроничном латентном инфекцијом, ткивним цистама које су испуњене брадизоитима, а након реактивирања и трансформације брадизоита у тахизоите долази до трансплаценталног преноса (*Williams u cap.*, 2009).

Процент вертикалног преноса може варирати међу стадима. Код одабраних холандских млечних стада, проценат вертикалног преноса је процењен на 61,8% (*Bartels u cap.*, 2007) у једној, а другој студији 58% (*Dijkstra u cap.*, 2008). У Аргентини проценат вертикалног преноса у једном стаду млечних крава је био 37,1%, а краве са високим титром су имале више заражених телад од крава са ниским титром (*More u cap.*, 2009).

Висок проценат абортуса може довести до повећања стопе хоризонталног преноса инфекције због веће могућности приступа сталног домаћина заразном материјалу. С друге стране, ови резултати могу указивати да *N. caninum* није одговорна само за побачаје у другој половини гравидитета него и много раније (*Munoz-Zanzi u cap.* 2004; *Waldner*, 2005). Говеда која су била експериментално заражена седамдесетог дана

након осемењавања високим дозама тахизоита *N. caninum* су више подложна абортусима од плоткиња заражених истом дозом 140. или 210. дана гравидитета (Williams *u cap.*, 2000). Међутим, неке друге епидемиолошке студије не доказују ове тврдње (Romero, 2005.)

Као други могући видови преноса *N. caninum* не искључују се млеко и сперма. Венерални пренос је могућ, али мало вероватан, јер је у експерименталним условима потребан велики број тахизоита да би дошло до инфекције (Serrano-Martinez *u cap.*, 2007; Ferre *u cap.*, 2008). Краве природно парене са експериментално зараженим биковима нису показале сероконверзију (Osoro *u cap.*, 2009).

### 2.2.3. Серопреваленца *N. caninum* код говеда

Постоје знатне разлике у серолошкој преваленци *N. caninum* између различитих држава, као и у оквиру једне државе, међу регијама те товним и млечним говедима. (Bartels *u cap.*, 2005; De Meerschman *u cap.*, 2000; Koiwai *u cap.*, 2005; Moore *u cap.*, 2002; Quintanilla-Gozalo *u cap.*, 1999). Међутим, ове податке је тешко поредити због коришћења различитих серолошких техника, концепта проучавања и величине употребљеног узорка (Dubey *u cap.*, 2007a). У Шведској су добијени резултати стардандизованом серолошком техником (von Blumroder *u cap.* 2004). Из ових података јасно се види да је серопреваленца *N. caninum* најнижа у Шведској у поређењу са осталим европским земљама (Bartels *u cap.* 2005).

Резултати показују да постоје разлике у ризику појаве инфекције између различитих система узгоја, као и између различитих региона, унутар једне државе. Већина истраживања је урађена употребом појединачних говеђих серума.

У Србији, на територији Војводине, прва истраживања о серопреваленци *N. caninum* код говеда спроведена су 2010. године (Лалошевић *u cap.*, 2010.). Каснија истраживања других аутора потврдила су серопозитивност на говедима различитих намена (Видић *u cap.* 2011; Савовић *u cap.* 2012).

Серологија укупног млека је економичан начин процене преваленције неоспорозе у неком стаду (Wapenaar *u cap.*, 2007b; Frossling *u cap.*, 2008, Chares *u cap.*, 2009), и сматра се да је ELISA метод погодан за откривање антитела у стадима где је сеопреваленца већа од 15% (Enachescu *u cap.*, 2014).

Серолошко испитивање преколостралног серума је погодан начин да се утврди конгенитална инфекција. У одсуству активне инфекције, трансколострално добијена антитела пропадају временом у зависности од висине титра у колоструму. На откривање колостралних антитела код телади такође утиче осетљивост серолошког теста. У једној студији, пасивно добијена антитела на *N. caninum* су трајала пет недеља (Cardoso *u cap.*, 2008).

На узорку од 37.090 млечних крава и 20.206 товних говеда у Шпанији, серопреваленца се повећавала са годинама старости животиња. Серопреваленца код млечних крава је износила 10,4% у узрасту 12-24 месеци, 14,1% у узрасту 25-36 месеци и 24,6% у узрасту >36 месеци а слично повећање је примећено код товних говеда (12,9%, 15,3%, и 31,8%)(Eiras *u cap.*, 2011).

Постоје индиције да се серопреваленца *N. caninum* разликује према врсти говеда (Armengol *u cap.*, 2007; Duong *u cap.*, 2008; Munhoz *u cap.*, 2009). Ипак, неки од ових резултата су можда узроковани и разликама у производном систему који се користи за различите врсте, а не разликама у подложности инфекцији различитих врста говеда.

Потребно је даље истраживати да ли су побољшане врсте млечних крава подложније инфекцији *N. caninum* од зебу говеда или укрштених врста (Munhoz *u cap.*, 2009). Пакистански стручњаци на челу са Shabbur-ом анализирајући серопреваленцу *N. caninum* забележили су ниже вредности код европских врста млечних крава него код укрштених и других врста говеда (Dubey *u Schares.*, 2011б). Други аутори наводе да врста говеда може утицати на стопу абортуса и имунолошке реакције након инфекције са *N. caninum* (Armengol *u cap.*, 2007; Almeria *u cap.*, 2009б; Romero-Salas *u cap.*, 2010; Santolaria *u cap.*, 2011).

Мало података је доступно о повезаности генетских особина и присуства инфекције са *N. caninum*. У ретроспективној студији на холштајн говедима у Канади, нису пронађене никакве везе између серопозитивности на *N. caninum* и учесталости дистрибуције алела DRB3 или DQA гена. Ипак, независно од серолошког статуса, алели DRB3\*1001 и DRB3\*2703 су били повезани са отпорношћу и подложности побачајима (Schwab *u cap.*, 2009).

Један од недостатака серолошких истраживања су разноврсне лабораторијске технике које су се до сада користиле. До сада, ни интактна *N. caninum* нити паразитска ДНК нису доказане код асимптомаских одраслих крава (Dubey *u cap.*, 2007а; Warpenaar *u cap.*, 2007а; More *u cap.*, 2008а; Santos *u cap.*, 2010), мада је *N. caninum* била изолована

из мозга код асимптоматских природно заражених телади (*Fish u cap.*, 2007; *Gozdzik u Cabaj.*, 2007; *Regidor-Cerrillo u cap.*, 2008; *Rojo-Montejo u cap.*, 2009б).

#### 2.2.4. Серопреваленца *N. caninum* код паса

Већа серопреваленца је регистрована код руралних паса у поређењу са градским псима, што се доводи у везу са врстом и начином или боље речено квалитетом исхране. Пошто и нервно и екстранеурално ткиво могу бити извори заразе за псе, неадекватно уклањање инфицираних лешева на фармама или угинула дивљач могу бити извори инфекције (*Rosypal i Lindsay*, 2005).

Наша ранија истраживања указала су да је у Војводини серопреваленца код ловачких и кућних паса износила 17,2% (*Куруца u cap.*, 2013).

### 2.3. Клиничка слика неоспорозе

#### 2.3.1. Неоспороза код говеда

Код инфицираних млечних крава и товних говеда, јављају се углавном побачаји и нема других клиничких знакова болести, а побачени фетуси немају макроскопски видљивих промена.

*N. caninum* је један од главних узрока абортуса и код млечних крава као и код товних говеда (*Dubey*, 2003а; *Dubey u cap.*, 2007а). У различитим епидемиолошким студијама у Калифорнији, Аустралији, Новом Зеланду, Скандинавији, Холандији и Великој Британији, *N. caninum* је узрок од 20% до 43% свих побачаја код говеда а инфекција може да обухвати више од 20% животиња на фармама (*Pfeiffer u cap.*, 1997; *Dubey*, 1999; *Petersen u cap.*, 1999).

Клинички симптоми су забележени само код телади испод два месеца старости укључују неуролошке симптоме, немогућност подизања на ноге и малу тежину на рођењу. Задњи и/или предњи удови могу бити савијени или превише исправљени, а неуролошким испитивањем се могу открити атаксија, смањени пателарни рефлекси и губитак свесне проприоцепције. Може се видети егзофталмус или асиметричност очију, као и хидроцефалус (*Dubey u Schares*, 2011).

Краве било које старости могу абортирати од трећег месеца па до краја гравидитета, али се већина абортуса дешава између петог и шестог месеца гестације. Фетуси могу угинути у материци, бити ресорбовани, мумифицирани, аутолизирани, мртворођени, живорођени са клиничким симптомима, или рођени клинички здрави али латентно заражени. Недавно је *N. caninum* изолована из ткива 4 од 15 мумифицираних фетуса (*Ghanem u cap.*, 2009). Тестови ових фетуса на CLC35A3<sup>1</sup> ген који изазива сложене кичмене деформације код говеда су били негативни, што указује да је мумификација изазвана са *N. caninum* (*Ghanem u cap.*, 2009).

Абортуси изазвани *N. caninum* се дешавају током целе године. Код избијања епизоотија у неким стадима, чак 57% млечних крава је абортирало током само неколико недеља до неколико месеци. Налети абортуса се дефинишу као епизоотије ако више од 10% или 12,5% крава из ризичне групе абортира током шест до осам недеља. Мали проценат (<5%) крава може имати поновљене абортусе због неоспорозе (*Dubey u cap.*, 2007a; *Pabon u cap.*, 2007). Претходни абортус повезан са инфекцијом *N. caninum* се не сматра узроком стерилитета (*Santolaria u cap.*, 2009).

Из података везаних за стопу абортуса током различитог гестационог периода у зараженим стадима може се видети да је до абортуса дошло код 18% плоткиња током 60 дана гестације (*McAllister u cap.* 1996), код 10,5% плоткиња до 40 дана (*Dannatt u cap.* 1995), а код 5,3% плоткиња у току 3 недеље гравидитета (*Cox.*, 1998). У Великој Британији је у 1997. години пријављено 34% абортуса код плоткиња где је дијагностикован као инфективни узрочник *N. caninum* (*VIDA*, 1997).

Из изнетог се види да *Neospora caninum* представља веома важан биолошки агенс који изазива абортусе код говеда широм света (*Dubey u Lindsay.*, 1996; *Dubey.*, 2003a; *Dubey u cap.* 2007a; *Weston u cap.*, 2012).

### 2.3.1.1. Патогенеза абортуса

Неоспороза код говеда је углавном болест плаценте и фетуса, која започиње након паразитемије мајке, а која је последица примарне (егзогене) инфекције гравидне мајке или реактивације постојеће, (ендогене) инфекције током гравидитета (*Dubey u cap.*, 2007a).

Након паразитемије *N. caninum* се угради у септу карункуле мајке пре него што пређе у плаценталну ресицу фетуса. Да би дошло до абортуса, фетус, или плацента морају бити толико оштећени да нису више у функцији (*Gibney u cap.*, 2008). Примарно оштећење плаценте изазвано паразитима може угрозити преживљавање фетуса директно или може изазвати ослобађање простагландина мајке, који изазивају лутеолизу и абортус (*Chryssafidis u cap.*, 2014).

До оштећења фетуса може доћи због примарног оштећења ткива узрокованог умножавањем *N. caninum* код фетуса или због недостатка кисеоника/хранљивих материја, након оштећења плаценте. Такође, може доћи до имунолошког одбацивања фетуса од стране мајке, што је повезано са ослобађањем проинфламаторних цитокина мајке у плаценту или дерегулацијом хормона. Иако је јасно да су сви ови предложени механизми повезани, један или више њих могу бити од важности, и на све њих може утицати стадијум гестације (*Dubey u cap.*, 2006; *Innes.*, 2007; *Lopez-Gatius u cap.*, 2007; *Gibney u cap.*, 2008; *Almeria u cap.*, 2010).

Распрострањене лезије на виталним органима могу директно усмртити фетус (*Gibney u cap.*, 2008). Лучење регулаторних цитокина (попут IL-10) и инфламаторних (попут гамаинтерферона), и директна повреда фетуса умножавањем тахизоита, могу одредити да ли ће фетус преживети или не (*Innes.*, 2007; *Rosbottom u cap.*, 2007, 2008, 2011; *Almeria u cap.*, 2010).

Висок ниво пролактина код крава заражених неоспором може заштитити гестацију (*Garcia-Ispierto u cap.*, 2009). Неке студије су показале да прогестерон може имати позитиван утицај на трудноћу код крава тако што модификује имунолошке реакције посредоване Th1/Th2 лимфоцитима. Краве које нису абортирале, а биле су серопозитивне на *N. caninum* и на *C. burnetii* су показале виши ниво прогестерона у плазми од серонегативних животиња (*Garcia-Ispierto u cap.*, 2010). Међутим, додавање вештачког прогестерона кржавама током гравидитета несмањује број абортуса због неоспорозе, већ напротив, повећава ризик од абортуса код крава са високим титром анти-*N. caninum* антитета (*Bech-Sabat u cap.*, 2007).

Ризик од трансплаценталног преноса инфекције може бити повезан са стадијумом гестације. Учесталост преноса се повећава са старошћу гестације, вероватно због повећане пропустљивости плаценте у задњем триместру (*Dubey u cap.*, 2006, 2007а).



## 2.4. Имунолошки одговор домаћина

Пошто се *N. caninum* убраја у облигатне интрацелуларне паразите, сматра се да је јак целуларни (Th1) имуни одговор кључ ефикасне одбране домаћина од инфекције. Главни учесници протективног имунитета су: Т-лимфоцити, макрофаги, дендритичне ћелије, НК-ћелије, проинфламаторни цитокини попут  $\gamma$ -интерферона (IFN- $\gamma$ ), фактора туморске некрозе  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлеукина 12 (IL-12) (Boysen *u cap.*, 2006).

Прво се активирају макрофаги и дендритичне ћелије (Dion *u cap.*, 2011). Они синтетишу интерлеукин 12, који доводи до пролиферације и диференцијације Т-лимфоцита према Th1 и стимулишу Т-лимфоците и НК-ћелије на лучење IFN- $\gamma$  (La Perle *u cap.*, 2001; Dijkstra *u cap.*, 2002). Лучење IFN- $\gamma$  спречава интрацелуларно умножавање тахизоита и доводи до апоптозе заражених ћелија (Maley *u cap.*, 2006). Пролиферацију тахизоита спречава и TNF- $\alpha$  кога, под дејством IFN- $\gamma$ , излучују макрофаги (Innes *u cap.*, 2005).

Гравидитет, с друге стране, изазива природну модулацију имуног одговора у правцу потискивања Th1 и доминације Th2 имуног одговора (и његових цитокина IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ ), што, с једне стране, спречава одбацивање фетуса, као својеврсног алогеног импланта у организму мајке, али истовремено подстиче реактивацију брадизоита и последичну инфекцију плаценте и фетуса (Hemphill *u cap.*, 2006).

У нервном систему, заштитну улогу уместо IFN- $\gamma$  преузима TNF- $\alpha$  (Pinheiro *u cap.*, 2010.) и азотни оксид (NO), које синтетишу глија ћелије (Yamane *u cap.*, 2000).

Извесна улога у одбрани организма од *N. caninum* приписује се и антителима. Претпоставља се да она спречавају ширење екстрацелуларних развојних облика (тахизоити) по организму. Такође, антитела су се показала изузетно корисним у дијагностици и сероепидемиолошким анализама, а утврђивањем авидности употребом имуноензимског теста, могуће је разликовати акутну од хроничне инфекције. Сматра се да антитела синтетисана у почетној фази инфекције имају мању авидност у односу на антитела синтетисана у каснијем току инфекције (Vjörkman *u cap.*, 2005).

Имунопатологија неоспорозе још увек представља велику непознаницу, а колико се да сада зна, животиње не успевају да развију тзв. „стерилни имунитет“ на *N. caninum* (Reichel *u Ellis*, 2009).

## 2.5. Дијагноза

Дијагнозу абортуса услед неоспорозе није лако поставити. Серолошки преглед краве и фетуса, откривање карактеристичних лезија и самог узрочника (*N. caninum*) код фетуса помоћу имунохистохемијских и молекуларних тестова, могу помоћи у постављању дијагнозе (*Dubey u Schares, 2006*). Установљавање узрочно-последичне везе између абортуса и инфекције *N. caninum* је још сложеније јер су асимптоматске конгениталне инфекције уобичајене а проналажење паразита или паразитске ДНК не значи да је *N. caninum* узроковала абортус. У студијама заснованим на искључивању свих других узрока абортуса доказана је ова повезаност у око 20% случајева код крава и побачених фетуса из Калифорније и Холандије а дијагностичка проценат варира у зависности од методе која се користи (*Sadrebazzaz u cap., 2007*).

Диференцирање акутне од хроничне инфекције *N. caninum* код крава је епидемиолошки важно. У ту сврху користе се тестови авидности, а слабија авидност виђа се у акутној инфекцији (*Basso u cap., 2010*). Временски период за дијагнозу акутне инфекције је кратак, траје само неколико недеља. У скорије време, описани су ELISA тестови засновани на рекомбинантним протеинима NcGRA7 и NcCAG4 за откривање антитела током акутне инфекције (репликације тахизоита), и хроничне инфекције (брадизоита). Откривање антитела за оба рекомбинантна протеина може показати поново активiranу инфекцију. (*Aguado-Martinez u cap. 2008*).

Доступни су многи серолошки тестови за дијагностику инфекције говеда *N. caninum* (*Dubey u Schares, 2006; Wapenaar u cap., 2007a*). Висина титра антитела и број леукоцита може варирати током гравидитета, чак и код крава које нису абортирале (*Lopez-Gatius u cap., 2007a; Nogareda u cap., 2007; Serrano u cap., 2011*), а неке животиње могу постати серолошки негативне (*Nogareda u cap., 2007; Dijkstra u cap., 2008*). Поткласа антитела може варирати у зависности од клиничког статуса. IgG2 антитела су доминантна код скоро свих крава које су абортирале док су краве које нису абортирале показале или доминантну IgG1 или IgG2 поткласу (*Almeria u cap., 2009a*).

ELISA тест заснован на употреби протеина NcGRA7 је користан у откривању антитела код крава које су абортирале насупрот онима које су се телиле нормално (*Huang u cap., 2007*).

Новије серолошке методе за дијагнозу инфекције *N. caninum* засноване на рекомбинантним антигенима су у фази развоја (*Borsuk u cap., 2011*). Прелиминарне

студије су показале да би откривање супстанци везаних за гравидност могло помоћи у дијагнози абортуса због неоспорозе. У једном извештају, хронична инфекција *N. caninum* није утицала на појаву гликопротеина-1 везаног за гравидност (PAG-1) у плазми. Ипак, измерени PAG-1 код животиња које су абортирале би могао дати користан параметар за процену фето-плаценталног стања независно од инфекције са *N. caninum* (Lopez-Gatius *u cap.*, 2007a).

Имунофлуоресценција као једна од метода дијагностике неоспорозе која се и данас користи заснива се на употреби антитела означених бојом (FITC, флуоресцеин-изо-тио-цијанат) која има особину да флуоресцира под ултраљубичастим зрацима. У дијагностици неоспорозе, значај се придаје индиректној методи. У овом случају, антиген је познат и чине га тахизоити *N. caninum* стабилизовани на предметној плочици. Да би се тест сматрао позитивним на *N. caninum* – антитела, периферија тахизоита треба континуирано да флуоресцира. Флуоресценција само апикалних делова паразита може указивати на унакрсну реакцију са другим паразитима из кола *Apicomplexa*. (Björkman *u Uggla.*, 1999).

Тест индиректне флуоресценције представља референтни тест тј. „златни стандард“ са којим се упоређују, и у односу на који се калибрирају остали тестови (нпр. ELISA) за откривање антитела на *N. caninum*. Разлози за овако високо рангирање теста индиректне имунофлуоресценције су бројни. Један од разлога јесте изузетно мала склоност овог теста ка појави укрштених реакција са другим паразитским кокцидијама, због чега је тест високо специфичан. Ова карактеристика теста индиректне имунофлуоресценције последица је уобичајене праксе да се за његово извођење као антигени користе цели тахизоити, тако да се махом откривају антитела специфична за антигене који се налазе на површини самог паразита. У случају врста из кола *Apicomplexa*, каква је и неоспора, површински антигени се сматрају специфичнијим од интрацелуларних компоненти. Најбезбеднијим у погледу опасности од укрштених реакција током индиректне имунофлуоресценције, показало се гранично разређење од 1:50 (Björkman *u Uggla*, 1999, Silva *u cap.*, 2007), које се користи код испитивања серума паса. Код већине комерцијалних тестова за истраживање неоспорозе код говеда користи се гранично разређење 1:200 (Björkman *u Uggla*, 1999; Silva *u cap.*, 2007; Warenaar *u cap.*, 2007a).

Недостаци индиректне имунофлуоресценције огледају се у субјективности јер је за извођење неопходан тренинг и искуство (Björkman *u Uggla.*, 1999; Warenaar *u cap.*, 2007a). Из тог разлога отежавајући фактор представља и одсуство стандардизованих

граничних вредности титра. У случају овог теста вредности титра варирају од 1:16 до 1:100, зависно од лабораторије као и од низа других фактора, као што су карактеристике конјугата (обележених секундарних антитела) и техничке могућности микроскопа (*Silva u cap.*, 2007). Из тог разлога је компарација резултата овог серолошког теста између различитих лабораторија веома тешка.

Имуноблот тест се не користи у рутинској дијагностици, представља раздвајање протеинских фракција паразита електрофорезом, њихово преношење на нитроцелулозни папир и инкубацију са испитујућим серумом, након чега се додаје пероксидазом обележено анти-антитело, а позитивним се сматрају серуми који се вежу на бар два од више имунодоминантних антигена (*Schaes u cap.*, 1998).

За директно доказивање неоспорозе у случају побачених фетуса, ради се детекција паразитске ДНК у мозгу, као и патохистолошки преглед а у препаратима се може видети фокална некроза, ћелијска инфилтрација и паразити.

## 2.6. Фактори ризика

Познавање фактора који могу довести до ширења инфекције *N. caninum* је од великог је значаја за развој и имплементацију мера контроле и превенције. (*Dubey u cap.*, 2007a). Различити методи управљања фармама могу имати утицај (нпр. исхрана, метод коришћења пашњака, бројно стање животиња и начин држања) на појаву инфекције. Присуство паса на говедарским фармама повећава ризик за настанак неоспорозе говеда (*Dubey u cap.*, 2007a; *VanLeeuwen u cap.*, 2010). Пси, као стални домаћини, повећавају вероватноћу постнаталне инфекције путем контаминиране сточне хране или околине ооцистима. Исхрана фармских паса постељицом отељенх животиње или угинулим плодовима, могу повећати ризик серопозитивности на говедарској фарми (*VanLeeuwen u cap.*, 2010a).

Код хронично, конгенитално заражених говеда повећава се ризик од абортуса изазваног неоспором. Недавно, у два испитивана стада конгенитално заражених јуница и крава холштајнфризијске расе доказана је повезаност између серопозитивности, услова средине и периода гравидитета. са већим ризиком од абортуса. Код серопозитивних јуница и крава при условима релативне влажности ваздуха нижој од 60% у току друге трећине гравидитета се повећава ризик од абортуса (*Yániz u cap.*, 2010). Такође код вишетелки исти ефекат је имало и повећање падавина током друге трећине гравидитета (*Yániz u cap.* 2010). Ризик од абортуса је био већи код вишетелки

са високим титром антитела на *N. caninum* као и код крава које су инсеминирале спермом бика холштајнфризијске расе у односу на оне плоткиње које су осемењене спермом товних раса лимузин или Белгијско плаво говече (Yániz *u cap.*, 2010).

*N. caninum* се сматра примарним патогеним узрочником. Међутим, коинфекција са *BVD*, *IBR*, *T.gondii*, *Brucella spp.*, *Leptospira hardjo*, може погоршати неоспорозу код говеда. У Италији је као коинфекција изолован говеђи херпес вирус1 у 27% од 948 испитиваних животиња и он се сматра потенцијалним фактором ризика за неоспорозу говеда (Rinaldi *u cap.*, 2007). У истраживањима рађеним у Вијетнаму регистрована је снажна повезаност између бовине вирусне дијареје (*BVD*) и серопозитивности на *N. caninum* (Duong *u cap.*, 2008). Једно канадско истраживање указује да серопозитивност на оба узрочника има негативан ефекат на репродуктивне показатеље као нпр., успех код првог осемењавања и на интервал тељења. (VanLeeuwen *u cap.*, 2010б). Код коинфекција са *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* или вирусне леукозе говеда негативни ефекти нису примећени (VanLeeuwen *u cap.*, 2010б).

Анализа климатских ефекта (суша), рН вредности земљишта и агроеколошких параметара није показала утицај на појаву серопозитивности на *N. caninum*. (Scott *u cap.*, 2007).

Претходни побачаји представљају 5-6 пута већи фактор ризика од абортуса код конгенитално заражених плоткиња у односу на конгенитално заражене плоткиње које нису имале побачај (Thurmond *u cap.* 1997).

## 2.7. Економски значај неоспорозе у говедарству

Један од проблема у говедарству, су велики економски губици због неоспорозе на фармама и стадима високо продуктивних плоткиња услед абортуса у многим земљама. (Thurmond *u cap.* 1990).

Поред високе стопе абортуса економски губици се огледају и у смањеној концепцији (Anderson *u cap.* 1995). Нису занемарљиви ни индиректни трошкови везани за ветеринарске услуге у првом реду у успостављању дијагнозе која је тешка и скупа. Вишестратним вештачким осемењавањем се повећава индекс осемењавања, а због смањене концепције продужава се и сервис период, смањује производња млека. Заражена стада прати повећан број превремених тељења, рађање авиталне телад и смањени прираст јунади у тову (Thurmond 1996; 1997). Коначно, значајни трошкови

могу настати и због куповине серонегативних плоткиња и искључивања серопозитивних плоткиња из производње по смањеној тржишној вредности (*Dubey u cap.*, 2003).

Висину економских губитака у производњи, је тешко прецизно одредити, јер не постоје клинички манифестни знаци болести код одраслих говеда. За сада нема доказа да постоји разлика у тежини и брзини прираста код серопозитивних у односу на серонегативну јунад (*Noar u cap.*, 2007; *More. u cap.*, 2010). Ефекти инфекције узроковане *N. caninum* на производњу млека нису јасни, али у једној канадској студији првотелке које су биле серопозитивне имале су нижу производњу млека са сниженим процентом млечне масти и протеина у млеку у односу на серонегативне првотелке истог стада (*Tivari u cap.*, 2007).

Многи модели трошкова и користи од различитих мера за контролу неоспорозе као што су уклањање животиња са фаме које су имале абортус везан за *N. caninum* или не држање и узгој јединки које су имале неке везе са неоспорозом те нису дали очекиване резултате исплативости.

## 2.8. Терапија

Упркос чињеници да има велики економски значај у говедарству, врло мали број ефективних средстава би се могло користити у терапији неоспорозе код говеда (*Strohbusch u cap.*, 2009.). У експерименталним студијама *in vivo* и *in vitro* испитан је терапијски ефекат лосалоцида, моненсина, пиритрексима, пириметамина, клидтамицина, робенидина, триметоприма, артемисина, толтразурила и поназурила, али се ни један од ових лекова није показао ефективним за говеда. Начињени су покушаји да се промени ток инфекције ове кокцидије код крава употребом у профилактичке сврхе болуса моненсина са спороотпуштајућим дејством, али резултати су били слаби (*VanLeeuwen u cap.*, 2011.).

Најновија исраживања у огледу на мишевима, показала су да би киназа инхибитор (ВКИ-Bumped Kinaza Inhibitor) могла да се користи у профилактичке и терапеутске сврхе, код говеда и паса, јер доводи до уништавања тахизоита у мозгу (Ојо и сар., 2014).

## 2.9. Превенција

Вакцинацијом би требала да се спречи појава инфекције код неинфицираних говеда, смањи учесталост абортуса и спречи трансплацентални пренос *N. caninum*. За сада не постоји вакцина за неоспорозу у широкој употреби. Да би се тестирала ефикасност мртвих и рекомбинантних вакцина се користе модели на мишевима (*Aguado-Martinez u cap.*, 2009; *Rojo-Montejo u cap.*, 2011).

Доказано је да говеда развијају целуларни и хуморални имунитет након вакцинације мртвом вакцином (*Innes u cap.*, 2007; *Baszler u cap.*, 2008; *Moore u cap.*, 2011). Експериментално, угинућа фетуса се могу спречити код крава вакцинисаних живим тахизоитима код егзогено угрожених крава, али таква заштита није показана код ендогено заражених крава. Примећено је да краве које су вакцинисане NcSRS2 имуногенима развијају целуларни и хуморални имунитет (*Baszler u cap.*, 2008).

Најновија истраживања су показала да је вакцинација крава на средини гравидитета живим тахизоитима *N. caninum* безбедна и ефикасна, јер се значајно редукује број абортуса код природно инфицираних животиња (*Mazuz u cap.*, 2015).

## 2.10. Отпорност

Релативно се мало зна о отпорности ооциста *N. caninum* у спољашњим условима а због њихове сличности са *T. gondii*, претпоставља се да је и отпорност ових ооциста слична као код *T. gondii* (*Dubey*, 2004). Међутим, у измету паса и којота се могу наћи отпорне неспорулисане ооцисте које изван домаћина спорулишу у року од 24 часа (*Garcia Vazquez*, 2005; *Lindsay u cap.* 1999; *McAllister u cap.* 1998). Доказано је да висока температура преко 100 °C за 1 минут и 10% натијум хипохлоит за 1 сат употпуности инактивишу ооцисте (*Alves Neto u cap.* 2011).





### **3. ЦИЉЕВИ И РАДНА ХИПОТЕЗА**

### 3.1. Циљеви истраживања

Предмет истраживања је утврђивање значаја инфекције са *Neospora caninum* код крава са репродуктивним поремећајима, због чега су постављени следећи циљеви:

1. Утврдити присуство антитела на *Neospora caninum* код крава са репродуктивним поремећајима и без репродуктивних поремећаја;
2. Утврдити присуство антитела на *Neospora caninum* у општој популацији (код говеда);
3. Испитати могућу корелацију између утврђене серопреваленце и клиничких манифестација репродуктивних поремећаја;
4. Утврдити значај висине титра антитела на *Neospora caninum* у односу на манифестне репродуктивне поремећаје код крава;
5. На основу епидемиолошких истраживања утврдити да ли постоји повезаност између начина држања говеда, односно врсте фарме и учесталости појаве неоспорозе код крава са репродуктивним поремећајима;
6. Извршити процену значаја *Neospora caninum* инфекције у настанку репродуктивних поремећаја код крава.

### 3.2. Радна хипотеза

Наведени циљеви истраживања су дефинисани на основу следећих хипотеза:

1. Највећи значај инфекције са *Neospora caninum* огледа се у настанку различитих репродуктивних поремећаја домаћих животиња, нарочито млечних крава, што узрокује озбиљне економске губитке, како у производњи млека тако и телаци
2. Доказана серопреваленца на *Neospora caninum* може а не мора узроковати манифестне репродуктивне поремећаје код крава
3. Начин узгоја стоке (слободно држање и присуство паса на фарми) представљају фактор повећаног ризика за појаву неоспорозе, односно репродуктивних поремећаја код крава

## **4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

#### 4.1. Испитивано подручје

Аутономна Покрајина Војводина, представља северни део Републике Србије и простире се између  $45^{\circ}15'N$  и  $19^{\circ}50'E$ , на површини од  $21,506 \text{ km}^2$ . Традиционално се захваљујући великим рекама (Дунав, Тиса, Сава) дели на три географска региона, Бачку, Банат и Срем. Војводина има обележја умерено континенталне климе, са хладним зимама, сувим и топлим летом и релативно ниским падавинама.



Слика 3. Мапа АП Војводине, подела на три региона

## 4.2. Испитиване животиње

Истраживање је обухватило 376 млечних крава, старости преко 24 месеца, различитих раса, које су биле подељене у три групе:

- прву групу обухватале су краве са репродуктивним поремећајима,
- другу групу чиниле су краве без регистрованих репродуктивних поремећаја,
- у трећој групи су биле краве непознате репродуктивне историје.

Одабир крава које ће бити уврштене у узорак вршен је насумично, осим у случају крава са репродуктивним поремећајима од којих је крв узета приликом прегледа.

Величина узорка била је већа од минимално препоручених 220 крава.

Минимална величина узорка, погодна за утврђивање преваленце инфекције међу млечним кржавама, израчуната је помоћу софтвера (Win Episcore 2.0) на основу статистичког извештаја о популацији крава у Војводини у 2011. години (РЗС, Табела 2.) и очекиване преваленце утврђене ранијим истраживањем која је износила 17.3% (Савовић и сар., 2012).

Употребом већег узорка (376 крава) у дисертацији, грешка у процени преваленце смањена је са 5% на 3.82%.

Табела 2. Бројно стање стоке у Републици Србији на дан 01. 12. 2011. године, сегмент табеле из Саопштења Републичког завода за статистику

| Број стоке у Републици Србији<br>– Стање 1. 12. 2011. године – |               |                       |                |                            |                |                 |               |              |                 |
|--|---------------|-----------------------|----------------|----------------------------|----------------|-----------------|---------------|--------------|-----------------|
| Претходни резултати  |               |                       |                |                            |                |                 |               |              |                 |
|  | Говеда        |                       | Свиње          |                            | Овце           |                 | Козе          | Коњи         | Живина          |
|  | укупно        | краве и стеоње јунице | укупно         | крмаче и супрасне назимице | укупно         | овце за приплод |               |              |                 |
| <b>УКУПНО</b>  |               |                       |                |                            |                |                 |               |              |                 |
| <b>РЕПУБЛИКА СРБИЈА</b>  | <b>936570</b> | <b>541789</b>         | <b>3286900</b> | <b>485271</b>              | <b>1460295</b> | <b>1117889</b>  | <b>129720</b> | <b>11576</b> | <b>19103411</b> |
| <b>Србија – север</b>  |               |                       |                |                            |                |                 |               |              |                 |
| Београдски регион  | 50735         | 28039                 | 192165         | 33718                      | 52699          | 38553           | 6034          | 162          | 721687          |
| Регион Војводине   | 220201        | 97251                 | 1288796        | 131741                     | 233429         | 153269          | 40301         | 4835         | 9971379         |
| <b>Србија – југ</b>  |               |                       |                |                            |                |                 |               |              |                 |
| Регион Шумадије и Западне Србије                               | 450343        | 276476                | 1140878        | 189178                     | 875412         | 701899          | 48744         | 5263         | 5607764         |
| Регион Јужне и Источне Србије                                  | 215291        | 140023                | 665061         | 130634                     | 298755         | 224168          | 34641         | 1316         | 2802581         |
| Регион Косово и Метохија                                       | ...           | ...                   | ...            | ...                        | ...            | ...             | ...           | ...          | ...             |

### 4.3. Испитивани материјал

Материјал обухвата узорке крви и побачених фетуса, који су континуирано узорковани у четворогодишњем периоду, од 2009 - 2013. године за потребе овог истраживања.

#### 4.3.1. Узорци крви

Узорковање крви крава на приватним газдинствима и комерцијалним фармама, вршено је од стране ординирајућег ветеринара, ради потреба овог истраживања, пункцијом вратне вене (*v.jugularis*), односно репне вене (*v. coccigae*). Такође, крв је сакупљена на линији клања, на кланици „Неопланта“ у Новом Саду.

Осим узорака крви крава узета су и четири узорка крви присутних паса на приватним газдинствима на Ченеју и у Бегечу.

Узорци крви су након узимања достављани у Лабораторију за паразитологију Департмана за ветеринарску медицину. Након спонтане коагулације и центрифугирања 15 минута на 2000 обртаја у минуту из узорака се издвајао крвни серум. Узорци крвних серума су чувани на  $-20^{\circ}\text{C}$ , до серолошког испитивања.

#### **4.3.2. Узорци побачених фетуса**

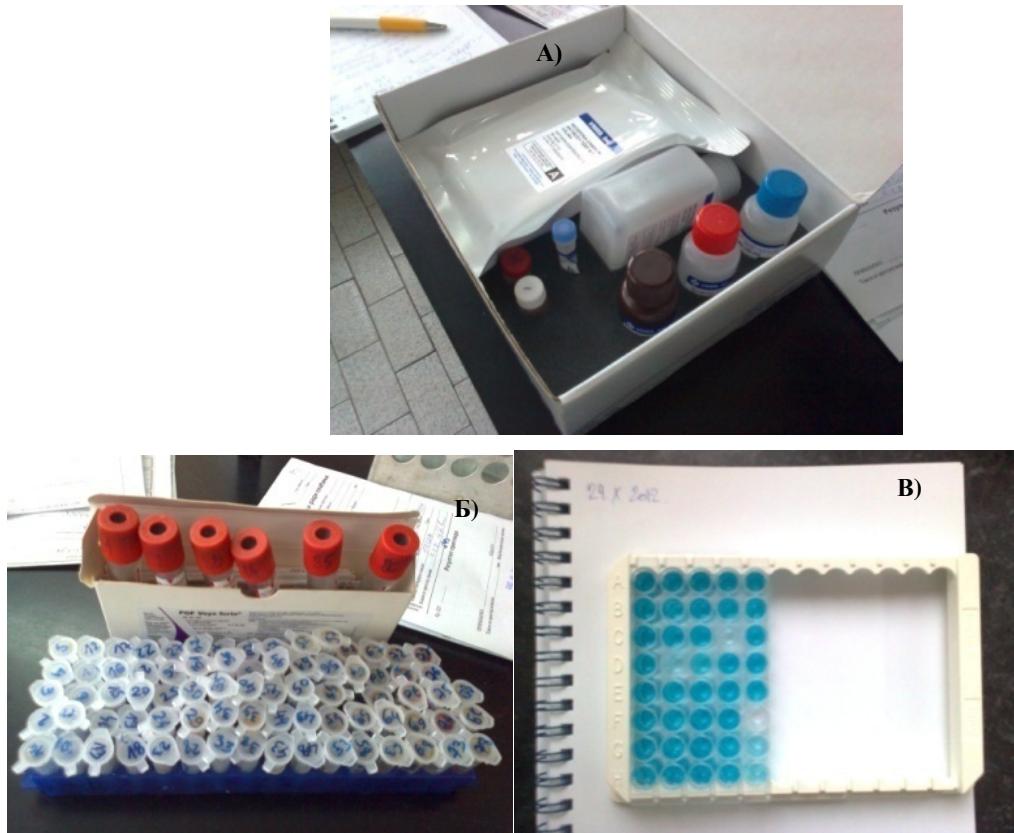
Током истраживања сакупљено је 7 побачених фетуса, који су достављени у Лабораторију за патохистологију неуроинфекција, у Националној референтној лабораторији за беснило, Пастеровог завода у Новом Саду, ради патоморфолошког патохистолошког испитивања.

#### **4.4. Серолошка испитивања**

Серолошка испитивања су вршена из узорака крвних серума ради доказивања специфичних антитела против *N. caninum*. За доказивање ових антитела коришћене су две методе: тест индиректне имунофлуоресценције (IFAT) и компетитивна имуноензимска метода (сELISA). Део ( $n = 100$ ) говеђих серума испитан је ELISA методом, док је остатак ( $n = 276$ ) испитано IFAT методом. Такође и сва четири псећа серума испитана су IFAT методом.

##### **4.4.1. Извођење имуноензимског компетитивног сELISA теста**

Укупно 100 серума, претежно пореклом од говеда са кланице, испитано је употребом комерцијалног сELISA кита (VMRD® Inc., Pullman, Washington, USA) на Одељењу за серолошку дијагностику бактеријских и паразитолошких обољења Института за јавно здравље Војводине (Слика 3. А) и Б)).



Слика 4. А) Садржај cELISA кита (VMRD® Inc., Pullman, Washington, USA); Б) серуми крава, узорковани на линији клања; В) Изглед cELISA стрипова, непосредно пре читавања у спектрофотометру – светла поља указују на присуство антитела у датим узорцима.

Компетитивни ELISA тестови засновани су на инхибицији специфичног везивања пероксидазом обележених моноклонских антитела против *N. caninum* за антиген тахизоита, од стране специфичних антитела из серума говеда. Због тога ће, у случају присуства специфичних антитела у серуму, изостати промена боје супстрата у бунарчићу у ком се тај серум налази (Слика 4. В)).

Тест је извођен у складу са процедуром препорученом од стране произвођача (VMRD, *on-line instructions for use*). Резултати су очитани на 450 nm таласне дужине, а за добијене OD (*optical density*) вредности израчунат је проценат инхибиције (I%), према следећој формули:



$\%I = 100 [1 - (OD \text{ испитаног серума/средња } OD \text{ вредност негативних контролних серума})]$

Серуми чији је  $I \geq 30\%$ , сматрани су позитивним.

Пријављена осетљивост и специфичност за овај тест је 97,6% и 98,6% (Baslezer и сар., 2001).

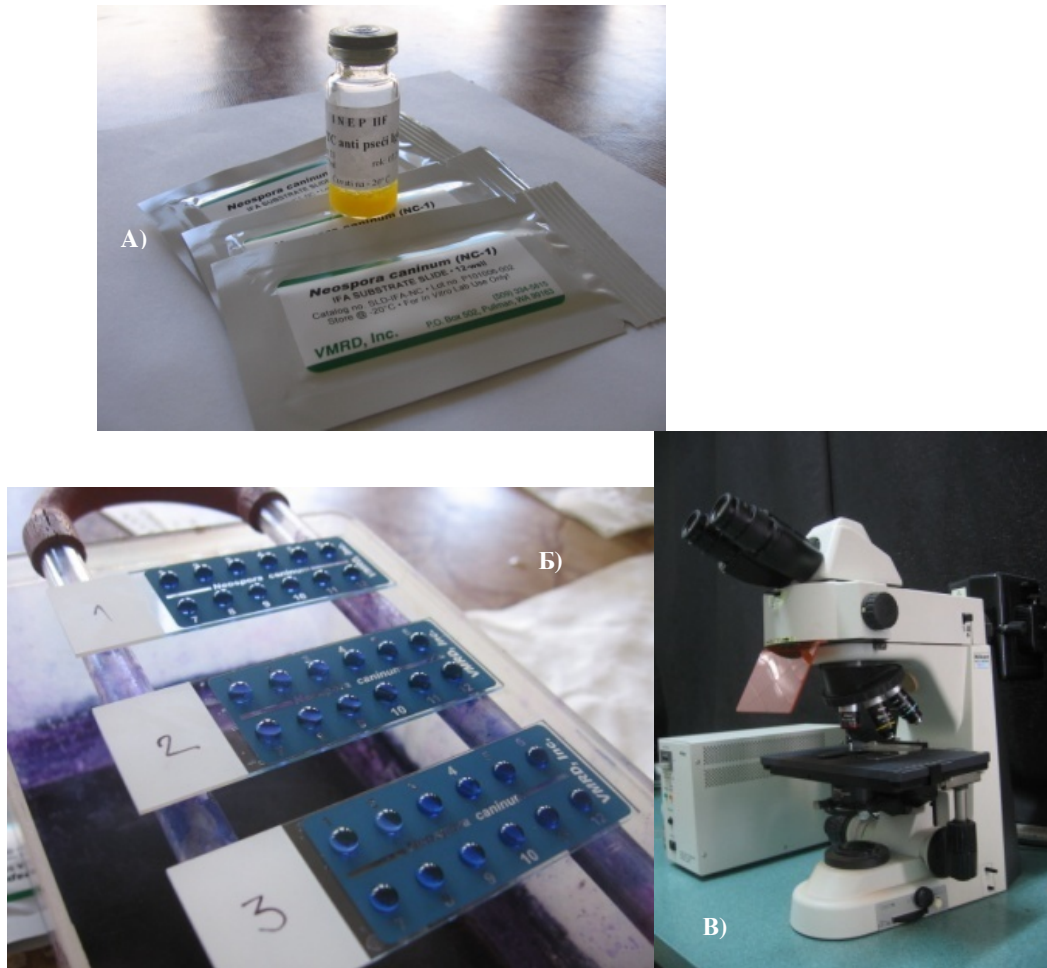
#### 4.4.2. Извођење теста индиректне имунофлуоресценције

Тестом индиректне имунофлуоресценције испитано је 276 серума крава и четири серума паса. За потребе скрининга, говеђи серуми су разређивани у фосфатном пуферу (PBS, *Euroimmun*, рН=7,2) у односу 1:200, за серуме крава, док је почетно разређење псећих серума износило 1:50.

Наведена разређења коришћена су на основу препоруке произвођача слајдова са антигеном (VMRD® Inc., Pullman, Washington, USA). Разређења серума су, затим, наносена на предметна стакла обложена тefлоном са бунарчићима, тачније на поља прекривена формалином фиксираним тахизоитима *N. caninum*, и инкубирани у влажној комори 45 минута на 37°C.

Након инкубације, плочице су испиране у фосфатном пуферу, 3 пута по 5 минута а након сушења на ваздуху наносен је одговарајући коњугат (FITC, флуоресцеином коњуговани анти говеђи/псећи IgG, истог произвођача) након предходне титрације са позитивном и негативном контролом (Слика 6).

У припремљени коњугат предходно се додаје Евансово плаво у разређењу 1:10000, ради спречавања неспецифичне флуоресценције.



Слика 5. А) Плочнице са антигеном (формалином фиксирани тахизоити *N. caninum*) и FITC - ом обележени анти-псећи IgG; Б) Нанети коњугат; В) Флуоресцентни микроскоп

Након поновљене инкубације, у трајању од 30 минута, слајдови су испирани у фосфатном пуферу, три пута по 5 минута, осушени на ваздуху и покривени луспицом уз предходно додавање пуферисаног глицерина рН 9, и посматрани под флуоресцентним микроскопом (Никон, Јапан), на увећању 100 и 400х.

На местима где се обележено анти-ИгГ антитело везало за антитело из серума, под микроскопом је била видљива интензивна зелена флуоресценција. Само комплетна периферна флуоресценција целих тахизоита сматрана је позитивним налазом.

Интензитет флуоресценције означен је са +, ++ или +++. Позитивни серуми који су очитани и означени са ++ или +++ титрирани су у даљим двоструким разређењима ради утврђивања висине титра.

Тест индиректне имунофлуоресценције извођен је у Лабораторији за паразитологију, Департмана за ветеринарску медицину, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду.

#### **4.4.3. Доказивање антитела других узročника репродуктивних поремећаја**

Серуми крава са историјом репродуктивних поремећаја, код којих су тестом индиректне имунофлуоресценције доказана антитела на *N.caninum*, послата су у Завод за лабораторијска испитивања Научног института за ветеринарство „Нови Сад“, где су испитана на присуство антитела за друге потенцијалне узročнике репродуктивних поремећаја код крава.

На Одељењу за имунолошко-серолошка испитивања, серуми су серолошки испитани на бруцелозу, лептоспирозу, Q-грозницу, хламидиозу и токсоплазмозу (Табела 3), према утврђеним акредитованим методама и стандардним оперативним поступцима (СОП).

Табела 3. Серолошки тестови коришћени за бактериолошку и паразитолошку анализу говеђих серума и њихове референтне вредности

| ред. бр. | Испитивана карактеристика   | Метод испитивања   | Прописана вредност                    |
|----------|---|--|---------------------------------------|
| 1.       | Присуство специфичних антитела за <i>Brucella</i>                 | Брза аглутинација ( <b>BAB</b> )<br>(Manual OIE, пог. 2.4.3, 2.7.2, 2.8.5) | позитивно /<br>сумњиво /<br>негативно |
| 2.       | Присуство специфичних антитела за <i>Leptospira</i>               | Микроскопска аглутинација<br>(Manual OIE, пог. 2.1.9)                      | позитивно $\geq$ 1:100                |
| 3.       | Присуство специфичних антитела за <i>Listeria monocytigenes</i> * | Аглутинација<br>(Приручник 154-174)  | позитивно $\geq$ 1:160                |
| 4.       | Присуство специфичних антитела за <i>Coxiella burnetii</i>        | ELISA<br>OIE пог. 2.1.12 и (СОП 3-02-220)                                  | позитивно /<br>сумњиво /<br>негативно |
| 5.       | Присуство специфичних антитела за <i>Toksoplazma gondii</i> *     | ELISA  | позитивно /<br>сумњиво /<br>негативно |
| 6.       | Присуство специфичних антитела за <i>Chlamydia psittaci</i>       | ELISA<br>(СОП 3-03-220)  | позитивно /<br>сумњиво /<br>негативно |

На Одељењу за вирусологију, серуми су додатно испитани и на антитела против вируса инфективног ринотрахеитиса и инфективног вулвовагинитиса говеда (IBR) и вируса вирусне дијареје говеда (BVDV) (Табела 4), акредитованим лабораторијским методама.

Табела 4. Серолошки тестови коришћени за вирусолошку претрагу *N. caninum*-позитивних говеђих серума

| Ред. бр. | Испитивана карактеристика       | Метод испитивања                             | Прописана вредност    |
|----------|---------------------------------|--|-----------------------|
| 1.       | Утврђивање антитела против IBR  | Серум неутрализација (О.И.Е., погл. 2.4.13.) | позитивно $\geq$ 1:2  |
| 2.       | Утврђивање антитела против BVDV | Серум неутрализација (О.И.Е., погл. 2.4.8.)  | Позитивно $\geq$ 1:16 |

#### 4.5. Епизоотиолошки подаци

Ради потреба овог истраживања, сачињен је анкетни упитник који је садржао податке о географским, зоохијенским и зоотехничким условима. У случају када је крв узоркована на комерцијалним фармама и приватним газдинствима, упитник је попуњаван на лицу места, док су се код узорковања на кланици попуњавали подаци који се могу наћи у здравственом уверењу говеда (раса, старост, пол, локалитет, врста фарме).

Упитник је садржао питање о величини стада, па је врста фарме са које потичу краве, дефинисана као приватно газдинство (мала фарма са појединачним узгојем 10-100 грла) и комерцијална фарма (са узгојем више од 100 грла).

У односу на расу, краве су подељене на три категорије: сименталска раса (СМ), холштајн-фризијска раса (ХФ) и мелези (МЛ).

Присуство и одсуство паса такође је забележено током сакупљања узорака крви и побачених фетуса.

Упитник је садржао и податке о присуству и врсти репродуктивних поремећаја код испитиваних крава. На основу тога краве су подељене на три категорије: краве са репродуктивним поремећајима, без репродуктивних поремећаја и без података о репродуктивним поремећајима (ово се односи на краве с кланице).

#### 4.6. Испитивање побачених фетуса

Узорци побачених фетуса су прегледани макроскопски а за патохистолошки преглед узети су узорци ткива мозга, величине 10 mm x 10 mm x 10 mm и фиксирани у 10% формалину. Након фиксације урађена је дехидратација стандардним хистолошким методама помоћу етил-алкохола растућих концентрација (70-100%). Потом су узорци калупљени у парафину и серијски сечени на микротомском ножу, на дебљину од 5 мм. Исечци су монтирани на предметна стакла и бојени хематоксилин-еозин методом.

#### 4.7. Статистичка обрада података

Утицај појединачних епизотиолошких фактора на серопреваленцу *N. caninum* на појединачном нивоу испитан је статистичким методама. Серопреваленца и одговарајући интервали поверења израчунати су помоћу софтвера *Quantitative Parasitology* 3.0. (Rozsa и сар., 2000). Евентуална повезаност географског порекла крава, типа фарме и историје репродуктивних поремећаја са присуством анти-*N. caninum* антитела испитана је помоћу  $\chi^2$ -теста, за степен значајности 95% ( $p \leq 0,05$ ). По потреби, коришћени су и алтернативни тестови (*Fisher's exact test* односно *Unconditional exact test*).

Степен вероватноће (*odds ratio*, OR) израчунат је помоћу Win Episcope 2.0. софтвера (Thrusfield и сар., 2001.). Позитивни OR ( $OR > 1$ ), са интервалом поверења (CI) од 95%, сматран је статистички значајним уколико се није поклапао са нултом вредношћу 1 и уколико је  $p \leq 0,05$  (Szumilas и сар., 2010). Интервал поверења и  $p$ -вредност за OR израчунати су помоћу *on-line* софтвера MedCalc 12.6 (*MedCalc*, 2013.).

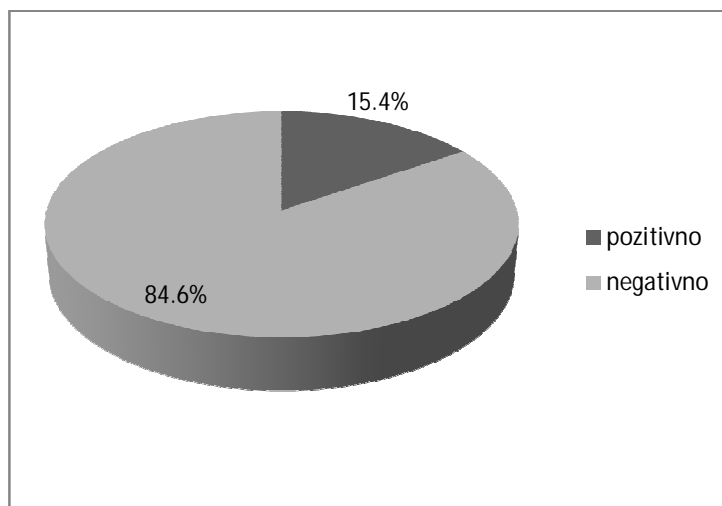
## **5. РЕЗУЛТАТИ**

### 5. 1. Укупна преваленца анти - *N. caninum* антитела код крава

Истраживање је трајало четири године и обухватило 376 млечних крава, старости преко 24 месеца, различитих раса, подељених у три групе:

- прву групу обухватале су 94 краве са репродуктивним поремећајима
- другу групу чинило је 188 крава без регистрованих репродуктивних поремећаја
- у трећој групи је било 85 крава чија је репродуктивна историја непозната.

Укупна стопа инфекције на појединачном нивоу износила је 15,4%, јер су антитела на *N.caninum* доказана у 58 од 376 серума испитаних млечних крава (15.4%, CI95%:12.1 – 19.5) (Графикон 1).

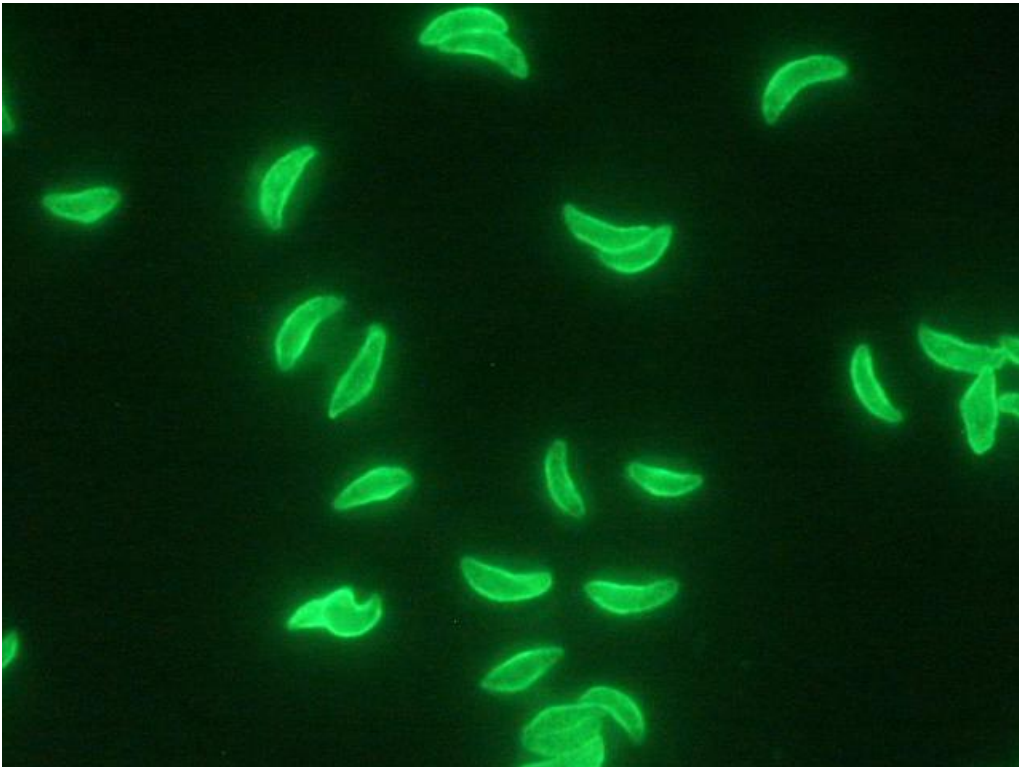


Графикон 1. Процент серопозитивних крава у односу на целокупан узорак (N=376)

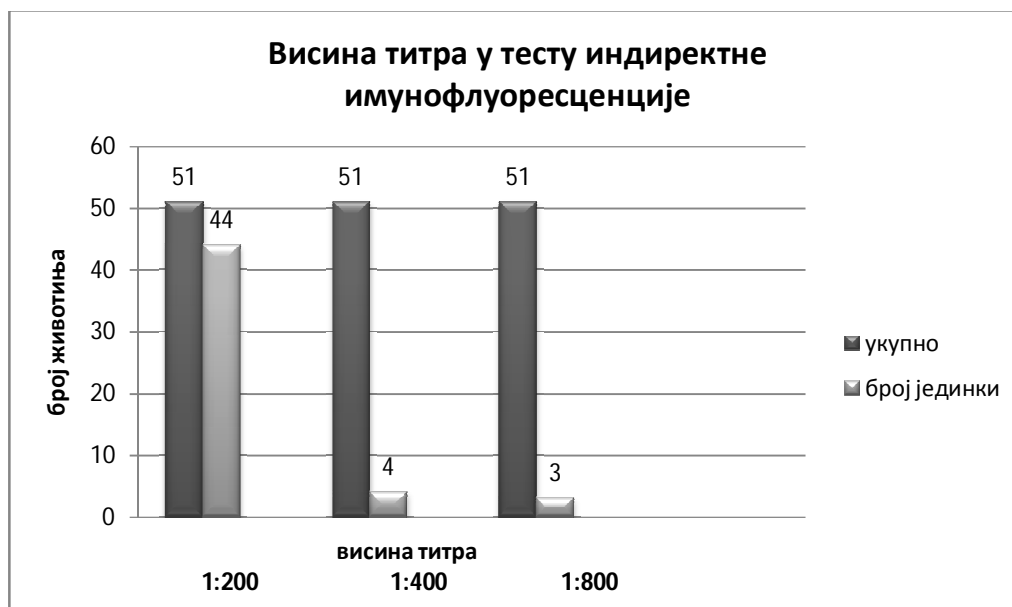


Тестом индиректне имунофлуоресценције (слика 6) прегледано је 276 серума, а позитивно је било 18, 8% (51/276).

Висина титра антитела кретала се од 1:200 до <1:800. Ниска вредност титра, једнака граничној вредности датај од стране произвођача теста 1:200, доказана је код 44 краве, средња вредност (1:400) код 4 краве а висок титар од 1:1600 показале су 3 животиње (графикон 2).



Слика 6. Флуоресценција тахизоита *N caninum*, индиректни имунофлуоресцентни тест, увећање 400x



Графикон 2. Висина титра серопозитивних крава (индиректни имунофлуоресцентни тест на *N. caninum* VMRD, USA)

Компетитивни имуноензимски тест урађен је са 100 серума, од тога 78 узорка потицало је од крава са кланице за које не постоје подаци о репродуктивним поремећајима. Антитела на Neospora caninum су доказана код седам (6,2%), јер су премаупутству произвођача показали су инхибицију < 30%.

Резултати урађених серолошких прегледа као и резултати статистичке анализе, дати су у табели 5.

Табела 5. Резултати ELISA и IFAT теста на присуство анти *N. caninum* антитела

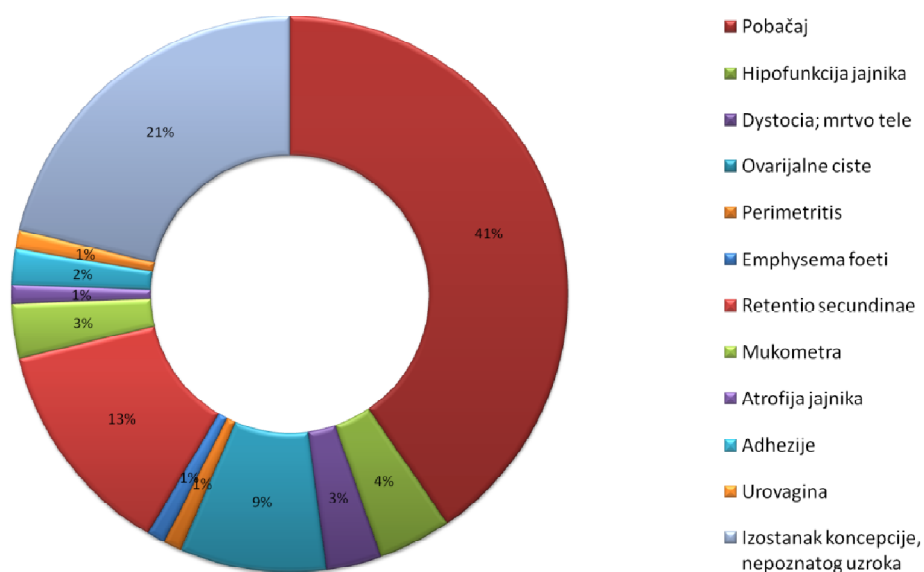
|                         | Прегледано |            |            | Позитивно |           |           |             | CI 95 (%)   | p-value             |
|-------------------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|---------------------|
|                         | ELISA      | IFA        | Σ          | ELISA     | IFAT      | Σ         | (%)         |             |                     |
| Географско порекло      |            |            |            |           |           |           |             |             |                     |
| Срем                    | 10         | 56         | <b>66</b>  | 0         | 9         | <b>9</b>  | <b>13.6</b> | 7.1 – 24.1  | 0.765               |
| Банат                   | 31         | 78         | <b>109</b> | 3         | 16        | <b>19</b> | <b>17.4</b> | 11.4 – 25.6 |                     |
| Бачка                   | 59         | 142        | <b>201</b> | 4         | 26        | <b>30</b> | <b>14.9</b> | 10.5 – 20.6 |                     |
| Тип фарме               |            |            |            |           |           |           |             |             |                     |
| Комерцијална            | 33         | 96         | <b>129</b> | 1         | 7         | <b>8</b>  | <b>6.2</b>  | 2.9 – 11.9  | 0.0002 <sup>a</sup> |
| Домаћинство             | 67         | 180        | <b>247</b> | 6         | 44        | <b>50</b> | <b>20.2</b> | 15.4 – 25.8 |                     |
| Репродуктивни поремећај |            |            |            |           |           |           |             |             |                     |
| да                      | 22         | 72         | <b>94</b>  | 0         | 12        | <b>12</b> | <b>12.8</b> | 7.3 – 21.2  | 0.155               |
| не                      | 0          | 197        | <b>197</b> | 0         | 37        | <b>37</b> | <b>18.8</b> | 13.9 – 24.8 |                     |
| Нема података           | 78         | 7          | <b>85</b>  | 7         | 2         | <b>9</b>  | <b>10.6</b> | 5.4 – 19.2  |                     |
| Укупно Σ                | <b>100</b> | <b>276</b> | <b>376</b> | <b>7</b>  | <b>51</b> | <b>58</b> | <b>15.4</b> | 12.1 – 19.5 |                     |

## 5.2. Репродуктивни поремећаји код крава

Од укупно 376 млечних крава које су ушле у истраживање, на основу клиничког прегледа или анамнестичких података од власника, репродуктивни поремећаји забележени су код 94 краве (25%).

Највећи број животиња (41%) имао је забележен бар један абортус. Мртворођеност је забележена код 3%, а код више од 20% испитаних животиња које су имале репродуктивни поремећај, регистрован је изостанак концепције непознатог узрока.

Графички приказ заступљености репродуктивних поремећаја код крава дат је у графикону 3.



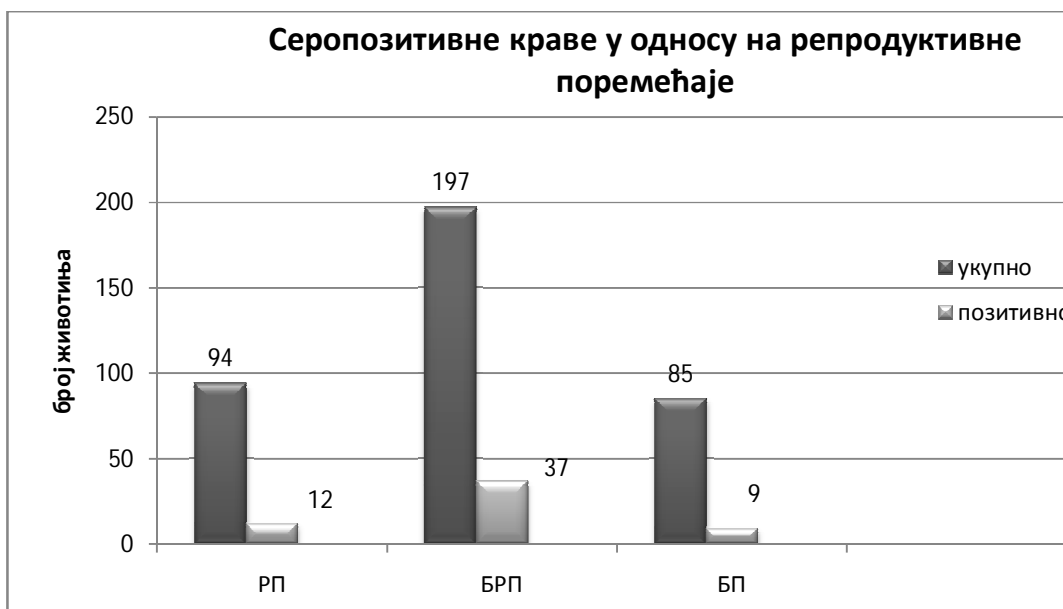
Графикон 3. Процентуални удео појединачних репродуктивних поремећаја

### 5.3. Преваленца анти - *N. caninum* антитела код крава са репродуктивним поремећајима

Историја различитих репродуктивних поремећаја евидентирана је у случају 94 краве, при чему је код њих 12 (12.8%) утврђено присуство антитела на *N. caninum*.

Абортус је регистрован код 38 крава, а присутна антитела на *N. caninum* су доказана код 6 животиња (15,8%). Од 56 крава које су имале друге репродуктивне поремећаје антитела су доказана код 6 (10,7%).

Употребом статистичке анализе није доказана статистичка значајност између серопозитивности на *N. caninum* и учесталости појаве и врсте репродуктивног побачаја код испитаних животиња. Резултати су приказани у графикону 4 и табели 6.



Графикон 4. Приказ броја серопозитивних крава у односу на репродуктивне поремећаје

РП-краве са забележеним репродуктивним поремећајима,

БРП-краве без репродуктивних поремећаја,

БП-краве без података о репродуктивним поремећајима.

Табела 6. Серопреваленца *N. caninum* код крава са побачајима и другим репродуктивним поремећајима

| Врста реп.поремећаја | Прегледано (n) | Позитивно |      |            |            |
|----------------------|----------------|-----------|------|------------|------------|
|                      |                | n         | %    | CI 95%     | p-вредност |
| Побачаји             | 38             | 6         | 15.8 | 7.1 – 31.3 | 0.537      |
| Други реп.пор.       | 56             | 6         | 10.7 | 4.8 – 22.1 |            |
| Укупно               | 94             | 12        | 12.8 | 7.3 – 21.2 |            |

Свих 12 серопозитивних крава, које су имале репродуктивне побачаје, прегледано је индиректним имунофлуоресцентним тестом, а висина титра специфичних антитела, кретала се од 1:200 до 1:1600.

Половина животиња (6) су биле краве сименталске расе, а половина (6) холштајн - фризијске расе. Све краве су биле старости преко две године, а имале су до момента узорковања крви од 1-8 тељења.

Код шест животиња забележен је један или више абортуса. У случају осталих шест крава, регистровани су други репродуктивни поремећаји (мртворођеност (2), изостанак концепције (1), мукометра (2), цисте (1)).

### 5.3.1. Остали узрочници побачаја и других репродуктивних поремећаја

Дванаест серума крава са репродуктивним поремећајима, позитивних на *N. caninum*, даље је тестирано на присуство антитела против других инфективних узрочника репродуктивних сметњи.

Један од *N. caninum* серопозитивних испитаних серума показао се позитивним само на токсоплазму, један само на хламидију, два на хламидију и BVDV, један на три инфективна агенса: Q грозницу, IBR и BVDB. Један испитани серум имао је антитела на хламидију, узрочника Q грознице, IBR и BVDV, а два на вирусне агенсе IBR и BVDB, док су три серума била позитивна само на *N. caninum* (Табела 7). Ни у једном од наведених серума нису пронађена антитела на бруцеле, лептоспиру и листерију.

Табела 7. Сума извештаја Ветеринарског института о резултатима испитивања дванаест *N. caninum* позитивних серума на антитела против *Brucella*, *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, вирус инфективног ринотрахеитиса и инфективног вулвовагинитиса (IBR) и вируса вирусне дијареје говеда (BVDV).

| ID животиње   | Brucella | Lepto. | Listeria | Toxo. | Chlam. | Coxiella | IBR                 | BVDV |
|---------------|----------|--------|----------|-------|--------|----------|---------------------|------|
| CS7141922172  | -        | -      | -        | -     | +      | -        | -                   | +    |
| CS7172042266  | -        | -      | -        | -     | -      | -        | Недовољно<br>серума |      |
| CS7152052384  | -        | -      | -        | -     | +      | -        | -                   | -    |
| CS7100264248  | -        | -      | -        | -     | +      | +        | +                   | +    |
| CS7110265822  | -        | -      | -        | -     | +      | -        | -                   | +    |
| 2603          | -        | -      | -        | -     | -      | +        | +                   | +    |
| 36089         | -        | -      | -        | -     | -      | -        | +                   | +    |
| 3435          | -        | -      | -        | -     | -      | -        | +                   | +    |
| CS71523590674 | -        | -      | -        | -     | -      | -        | -                   | -    |
| 2836          | -        | -      | -        | -     | -      | -        | -                   | -    |
| 3090          | -        | -      | -        | -     | -      | -        | -                   | -    |
| 0695          | -        | -      | -        | +     | -      | -        | -                   | -    |

#### 5.4. Преваленца анти - *N. caninum* антитела код крава без репродуктивних поремећаја

Сви серуми крава без регистрованих репродуктивних поремећаја су тестирани методом индиректне имунофлуоресценције. У 197 прегледаних узорака, антитела су доказана код 37 (18.8%), а висина титра била је ниска, износила је 1:200 и није захтевала даљу титрацију.

### **5.5. Преваленца анти - *N. caninum* антитела код крава без података о присуству репродуктивних поремећаја**

Међу кравама са кланице, чија је репродуктивна историја непозната, антитела су пронађена код девет (10.6%). Седам позитивних серума прегледано је ELISA методом, а два серума тестом индиректне имунофлуоресценције. Висина титра специфичних антитела била је ниска, износила је 1:200 у индиректном имунофлуоресцентном тесту и није захтевала даљу титрацију.

Нису доказане статистички значајне разлике ( $p \leq 0.05$ ) у серопозитивности између крава са репродуктивним проблемима, крава без репродуктивних поремећаја и крава непознате репродуктивне историје (табела 5).

### **5.6. Епизоотиолошки подаци**

Према величини стада, испитиване краве су подељене у две групе: краве пореклом из малих, приватних газдинстава и краве са великих, комерцијалних фарми. Из приватних газдинстава потиче 247 узорак, а са комерцијалних фарми 129.

На приватним газдинствима краве се држе комбинованим системом узгоја, у тзв. слободном систему узгоја у штали са повременим пуштањем на испашу. Краве са великим комерцијалних фарми, не пуштају се на испашу, већ се држе на вез у халама за узгој.

Серопозитивне животиње пронађене су у обе групе, с тим да је значајно већи проценат инфицираних крава пронађен у приватним газдинствима (20.2%) него на комерцијалним фармама (6.2%)(Табела 8).

Присуство паса (једног или више) регистровано је у свим малим приватним газдинствима, док се на великим фармама због строгих зоохигијенских мера, не региструју присутни пси.



Графикон 5. Серопозитивне краве о односу на величину стада

Добијени резултати сугеришу да су изгледи кржава држаних на малим газдинствима да буду инфициране са *N. caninum* значајно већи (OR = 3.83, 95% CI = 1.76 – 8.37,  $p = 0.0007$ ) у поређењу са кравима из фармског система држања.

Табела 8. Резултати серолошког испитивања кржава из различитих система држања

| Тип фарме       | Прегледано (n) | Позитивно |      |             |                           |
|-----------------|----------------|-----------|------|-------------|---------------------------|
|                 |                | n         | %    | CI 95%      | <i>p</i> -вредност        |
| Комерцијална    | 129            | 8         | 6.2  | 2.9 – 11.9  | <b>0.0002<sup>a</sup></b> |
| Домаћинство     | 247            | 50        | 20.2 | 15.4 – 25.8 |                           |
| Укупно $\Sigma$ | 376            | 58        | 15.4 | 12.1 – 19.5 |                           |

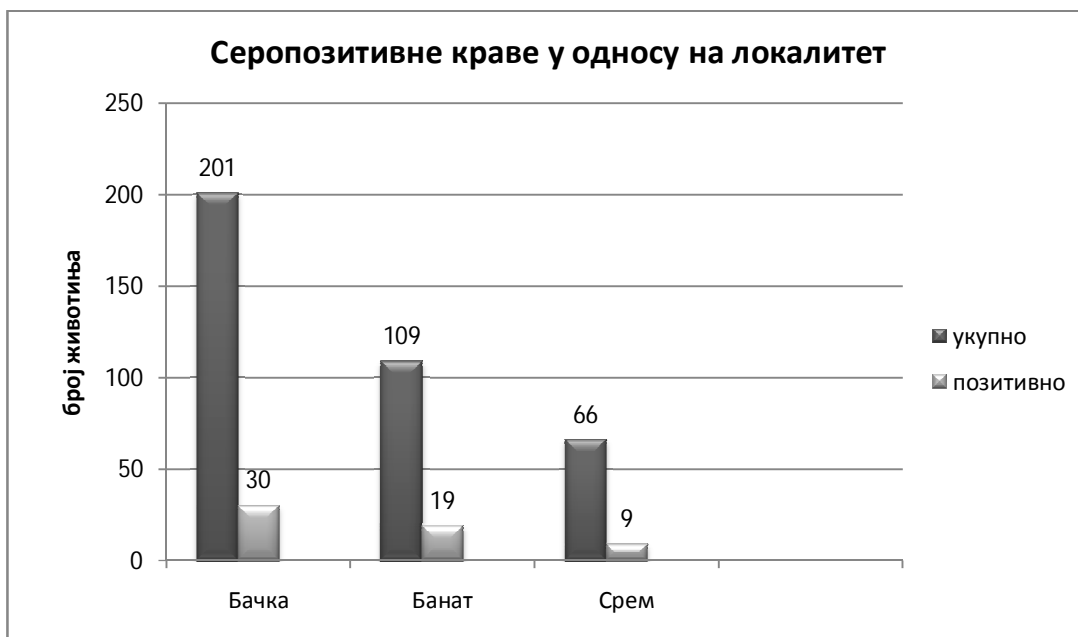
<sup>a</sup> = разлика између преваленце статистички је значајна ( $p \leq 0,05$ )

Иако је испитани узорак сувише мали за извођење статистички релевантних закључака, интересантно је напоменути да је од 19 кржава за које је потврђено да су извођене на пашу чак 8 кржава поседовало антитела на *N. caninum*.



## 5.7. Географска дистрибуција

Антитела против *N. caninum* пронађена су код крава из сва три региона Војводине (Срем, Банат и Бачка) (графикон 6).

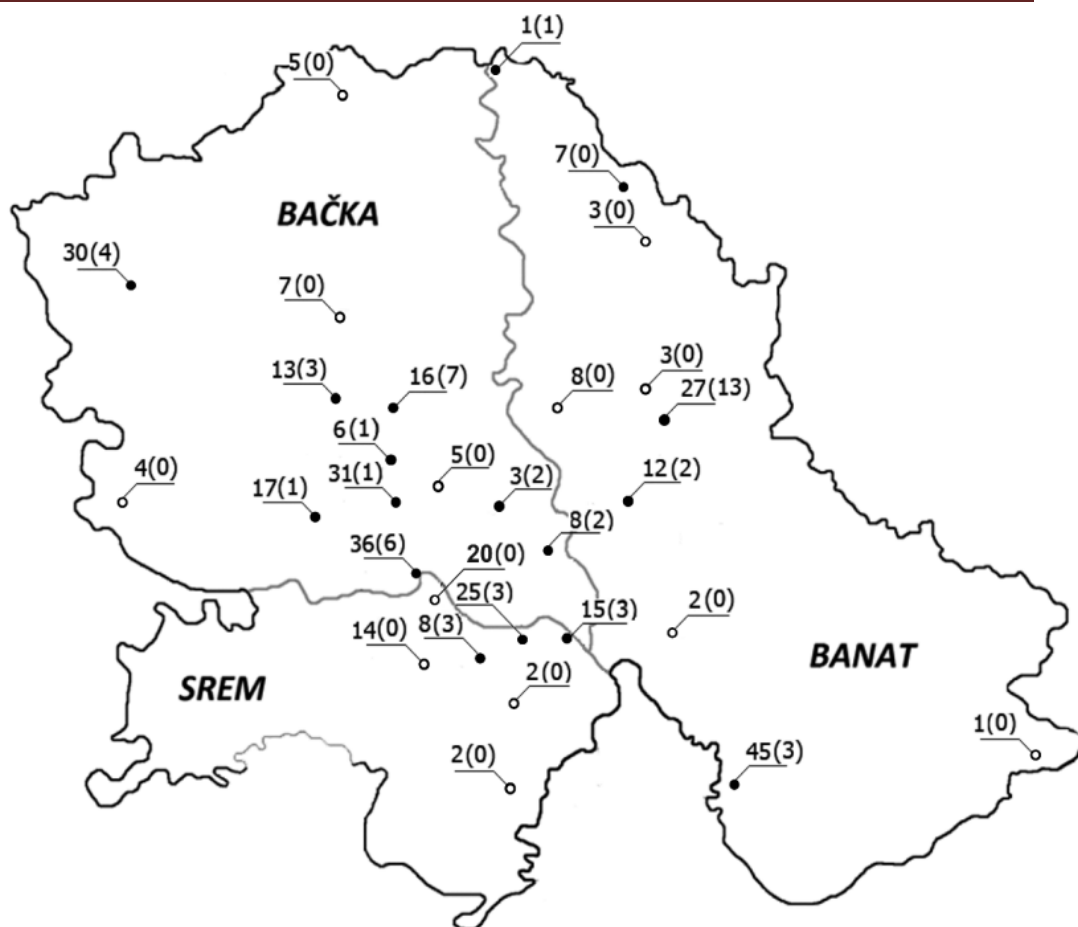


Графикон 6. Географска дистрибуција серопозитивних крава

Процентуално, највише серопозитивних крава откривено је у Банату, а најмање у Срему, али уочена разлика не може се сматрати статистички значајном, што потврђује и  $p$ - вредност која је далеко изнад 0.05 (Табела 5).

Табела 9. Географска дистрибуција серопозитивних крава по регионима Војводине

| АПВ             | Прегледано<br>(n) | позитивно |      |             |              |
|-----------------|-------------------|-----------|------|-------------|--------------|
|                 |                   | n         | %    | CI 95%      | $p$ -врдност |
| Срем            | 66                | 9         | 13.6 | 7.1 – 24.1  | 0.765        |
| Банат           | 109               | 19        | 17.4 | 11.4 – 25.6 |              |
| Бачка           | 201               | 30        | 14.9 | 10.5 – 20.6 |              |
| Укупно $\Sigma$ | 376               | 58        | 15.4 | 12.1 – 19.5 |              |



Слика 7. Приказ резултата према географским локацијама узорковања. Црним кружићима обележена су места узорковања у којима је пронађена једна или више серопозитивних крава (број у заграда), док празни кружићи представљају места у којима није пронађена ниједна серопозитивна крава.

### 5.8. Присуство паса као фактора ризика за појаву инфекције

Присуство паса на, или у околини, посуда на којима су држане испитиване краве пријављено је у случају свих приватних газдинстава. Са друге стране, иако ниједна од комерцијалних фарми званично не држи псе, поједини радници тврде да су у кругу фарме повремено ипак виђали псе, највероватније луталице.

У случају крава са кланице, податке о евентуалном контакту крава са псима није било могуће прикупити.

Због недовољне прецизности наведених информација, присуство паса на фарми није разматрано са аспекта фактора ризика за постојање инфекције код говеда, али високи степен инфекције код крава из приватних газдинстава, као и присуство анитела на *N. caninum* код једног пса са газдинства у коме је нађена серопозитивна крава, отвара врата даљим истраживањима у том правцу (Табела 10).

Серолошки статус четири прегледана пса из два приватна газдинства, само су илустрација о могућој повезаности серопозитивности и појаве абортуса код крава, јер серопозитивни пси могу бити стални резервоар хоризонталне трансмисије *N. caninum* са паса на говеда.

Табела 10. Присуство анитела на *N. caninum* паса са газдинства у коме је нађена серопозитивна крава

| Име пса | Антитела на <i>N. caninum</i> антитела код паса | ID газдинства | ID краве     | Антитела на <i>N. caninum</i> код крава | Место |
|---------|---|---------------|--------------|---|-------|
|         | Присуство/титар                                 |               |              | присуство/титар                         |       |
| Гариша  | не / -  | 802743002320  | CS7172042266 | да / 1:200                              | Бегеч |
| Меда    | не / -  |               | CS7131440292 | не / -                                  |       |
| Шврћа   | да / 1:50                                       |               |              |   |       |
| Рис     | не / -  | 802824001191  | RS7183123082 | не / -                                  | Ченеј |

## 5.9. Испитивање побачених фетуса

У оквиру истраживања добијени су узорци 6 побачених фетуса који су били употребљиви за патохистолошку претрагу мозга у којем су се очекивале патолошке промене и цисте паразита. Код 6 испитаних фетуса, макроскопским прегледом нису уочене видљиве патолошке промене (слика 8).

Један побачени фетус, био је мумифициран (слика 9) па није обухваћен патохистолошким прегледом.

### 5.9.1. Резултати патохистолошког прегледа

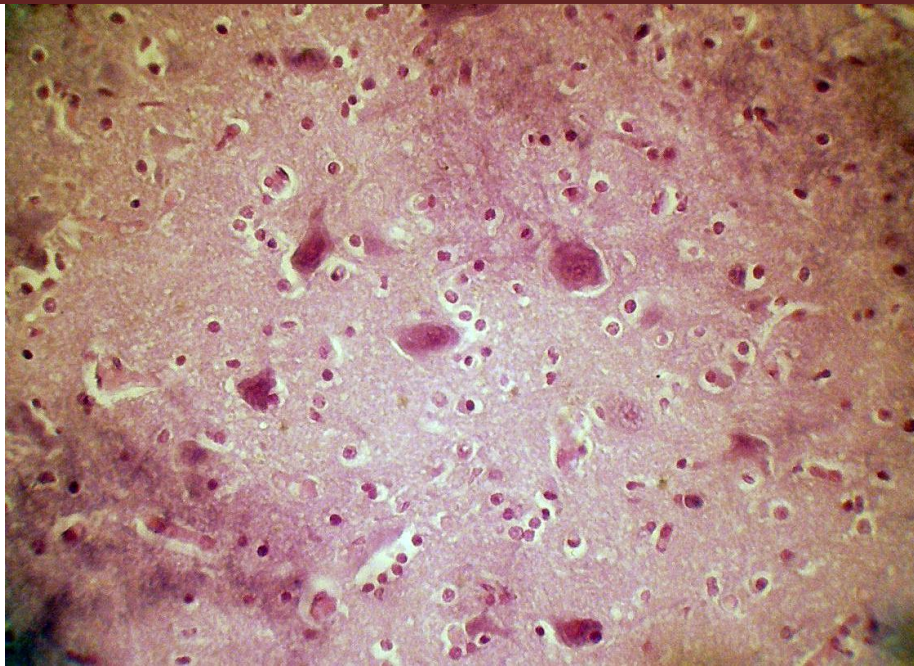
Прегледом исечака мозга побачених фетуса нису нађене ткивне цисте *Neospora caninum* или других агенаса који се могу идентификовати на хистолошком препарату. Код свих је нађена правилна архитектоника нервног ткива са јасно одвојеном сивом и белом масом као и са правилном слојевитости коре великог и малог мозга. У једном случају нису нађене патолошке промене нервног ткива (слика 9), у четири су нађени различити степени едема мозга (слике 10 и 11) који сведоче о агонији плода у краћем периоду пре угинућа. Код једног фетуса нађени су поред правилне архитектонике нервног ткива и акумулације неуроглијских ћелија које у првом реду одговарају слици неуроинфекције (слика 12).



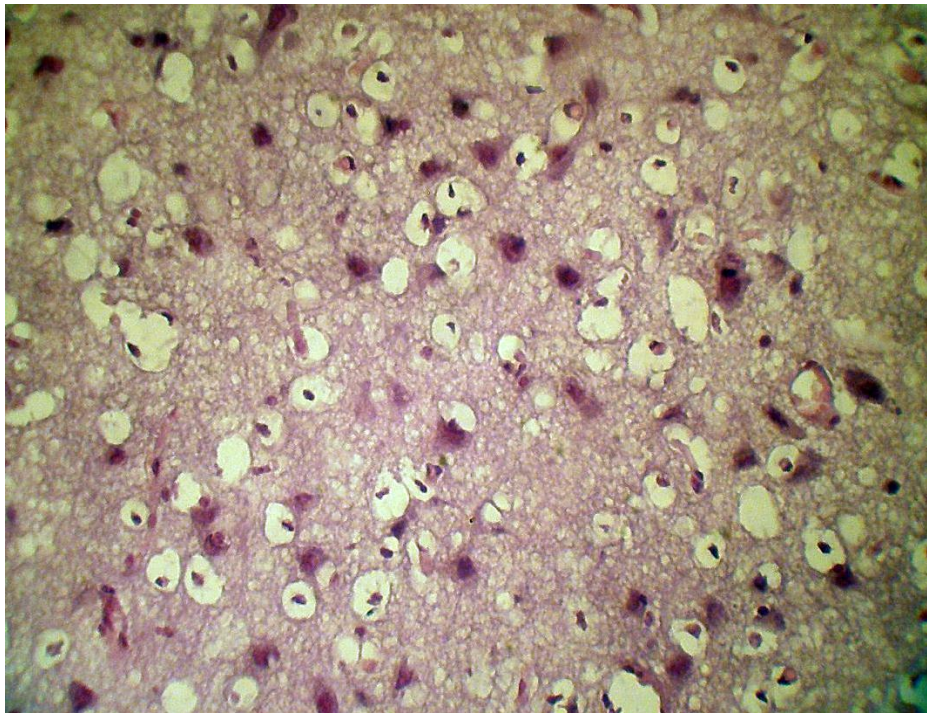
Слика 8. Побачени говеђи фетус узет за патохистолошку анализу



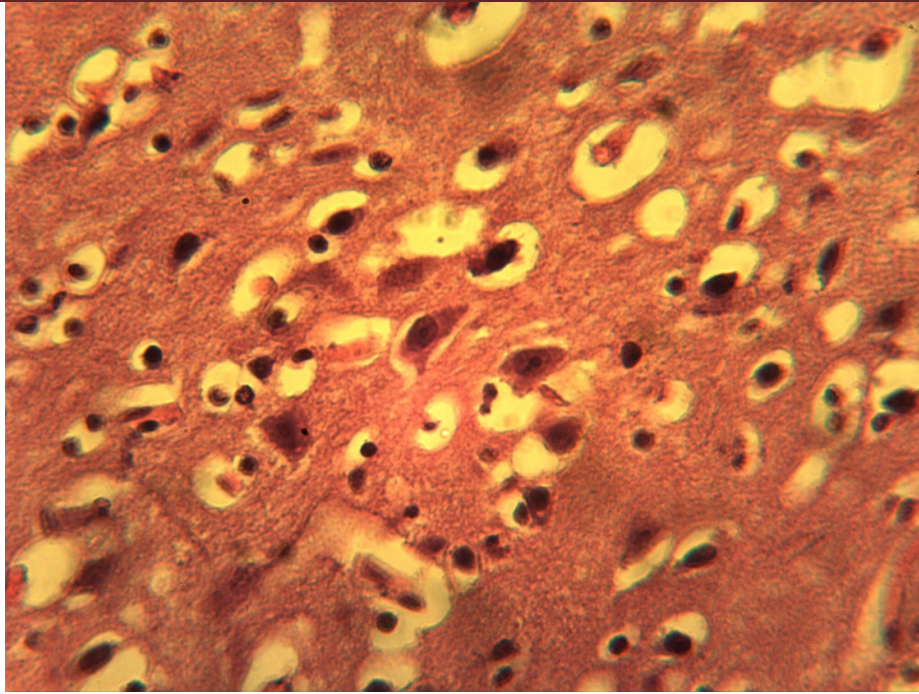
Слика 9 . Мумифицирани фетус краве серопозитивне на *N. caninum*



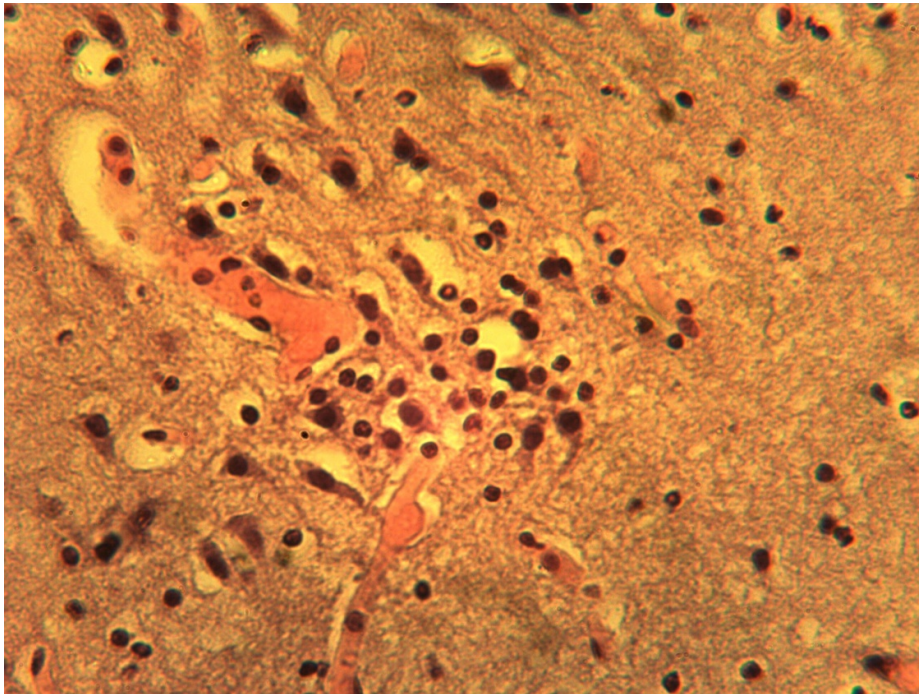
Слика.10. Мозак фетуса говеда бр. 5, добро развијени неурони, без патолошких промена



Слика 11. Мозак фетуса говеда бр. 4, регион кортекса, изражен едем нервног ткива



Слика 12. Мозак фетуса говеда бр. 6, едем нервног ткива средњег интензитета



Слика. 13. Мозак фетуса говеда бр. 6, акумулација неуроглије у кортексу

## **6. ДИСКУСИЈА**



Смањење репродуктивне ефикасности се манифестује пролонгираним периодом анеструса пост партум (*Thacher u cap.*, 2006), повећањем броја крава са тихим еструсом нерегуларног трајања, као последицом скраћене лутеалне фазе у првим постпарталним циклусима (*Darwach u cap.*, 1997), смањеним степеном успешне концепције после првог осемењавања (*Lucy.*, 2001), као и повећаним бројем крава са абнормалним развојем преимплантационих ембриона и различитим оболењима утеруса (*Fourchon u cap.*, 2000; *Boucard u Du Trembaly.*, 2003), што доводи до повећања ембрионалног и феталног морталитета (*Lucy.*, 2007). Ово има за коначан резултат знатно повећану појаву регуларних и нерегуларних повађања (неуспелих осемењавања), односно повећан број потребних инсеминација по успешној концепцији (*Sheldon u Dobson.*, 2003).

Ефикасност репродукције најбоље одсликава трајање међутелидбеног интервала. Многи аутори сматрају да међутелидбени интервал у трајању од 12-13 месеци, омогућава постизање максималне производње млека и телади (*Миљковић.*, 1976; *Stevenson u Britt.*, 1977; *Станчић.*, 1989; *Walker.*, 1997; *Wattiaux.*, 2006).

Међутелидбени интервал је одређен трајањем сервис периода (интервал тељење – успешна концепција) и трајањем гестације. Како је трајање гестације биолошка константа, то на трајање међутелидбеног интервала утичу фактори који одређују трајање сервис периода. Продужавање трајања сервис периода је последица продуженог интервала од тељења до успостављања првог еструса, као и продужавањем интервала од првог до фертилног осемењавања. На продужено трајање оба интервала утиче интеракција бројних фактора, инфективне и неинфективне етиологије (*Peters u Ball.*, 1987; *Станчић.*, 1989; *Gordon.*, 1997; *Станчић и Кошарчић.*, 2007).

Висока производња млека, директно је условљена степеном репродуктивне ефикасности крава, тј. њиховом плодношћу, која подразумева могућност доношења на свет живе и здраве телади. Истраживања последњих деценија указују на непрестани пад репродуктивне ефикасности крава у високо млечним запатима (*Dobson u cap.*, 2007) због разних разлога.

Ова истраживања су углавном базирана на дужини трајања интервала између два узастопна тељења тзв. међутелидбени интервал (*Станчић и Кошарчић, 2007*). Оптимално међутелидбени интервал траје од 12 до 13 месеци, јер је то период када се постиже максимална производња како млека тако и телаци по крави годишње. У условима практичне интензивне производње, трајање овог интервала се често пролонгира на 14 месеци и дуже.

Један од најзначајнијих економских ефеката у стадима високо продуктивних плоткиња у многим земљама, су високи економски губици услед абортуса, који се доводе у везу са неоспорозом (*Thurmond u cap., 1990*). Форар са сарадницима (*Forar u cap., 1995*) указује да се проценат абортуса код неоспорозе креће од 0,4-10,6%, мада ове вредности могу бити и знатно више ако су инфективни агенси присутни у стадима. У овај проценат не спадају они абортуси који се десе у првом и другом месецу гравидитета зато што они најчешће пролазе непримећени (*Kruuf., 1984*).

Етиолошка дијагноза абортуса није једноставна и сматра се да се етиолошки правилно дијагностикује око 20-30% случајева. За правилну и правовремену дијагнозу абортуса неопходно је на време узети узорак ткива за анализу и обезбедити што потпунију анамнезу, како за једну животињу тако и за цело стадо. Дијагноза се мора потврдити лабораторијским тестовима, а узорак мора да садржи што је могуће свежији фетус и делове плаценте. Пошто болест пролази у већини случајева без клиничких симптома, абортуси у првој трећини гравидитета могу бити непримећени тако да је губитке врло често тешко и документовати.

Абортус је прекид гравидитета при чему мртав или жив плод бива истиснут из материце. У оба случаја плод је незрео и није способан за живот од 42. дана до отприлике 260. дана гравидитета, тј. чим се прекине диамплацентарна функција. (*Küst u Schaetz., 1971*).

Под ембрионалним угинућем подразумева се смрт плода у првих 6 – 8 недеља гравидитета. Ембрионални морталитет клинички се испољава повађањем. Према неким истраживањима смртност ембриона се креће од 20 – 25% (*Aurich u cap., 1999*). Смрт ембриона може бити у првих 6 – 7 дана када се оплођена јајна ћелија налази у јајоводу или од 12 – 16-ог дана гравидитета као и на почетку имплантације око треће недеље гравидности. С обзиром на бројне етиолошке факторе који могу довести до угинућа, није могуће децидно утврдити разлог који је одговоран за повађање. У већини случајева ембрионална угинућа се дешавају у стадијуму зигота, тј. до 10-ог дана од

оплодње, док у стадијуму ембриона (8 недеља од оплодње) износе 5–8%. По завршеној плацентацији све до партуса, смртност фетуса се креће до 6% (Busch и Zerobun., 2009). Уколико се ембрионално угинуће појави од 10-ог до 12-ог дана од осемењавања, полни циклус протиче у регуларном интервалу од 21 дана и таква поновљена осемењавања називамо регуларним понављањима. Она могу бити разлог и других фактора као нпр. поремећаји у овулацији, поремећај у синтези хормона и сл. Уколико ембрионално угинуће наступи после 12-ог дана циклуса еструс ће се јавити касније у неправилном временском интервалу од 25-ог до 35-ог дана или  $\geq 48$  дана после осемењавања. То је тзв. нерегуларно поваћање, које указује на прекид гравидности у каснијој ембрионалној фази гестације и у највећем броју случајева је инфективне етиологије (Sreenan и Duskin., 1994; Станчић и Кошарчић., 2007.; Gani и сар., 2008). Ресорпција ембриона може да траје и дуже од два месеца без икаквих спољашњих знакова и појаве полног жара услед изостанка секреције простагландина  $F_{2\alpha}$  из ендометријума. (Aurich и сар., 1993).

У већини запата, абортус се уобичајено виђа код 1 до 2% крава, али ако ова појава премаши вредност од 3 до 5%, сматра се да постоје озбиљнији поремећаји репродукције (Bagley, 1999).

Према нашим ранијим истраживањима, изведеним на фармама за интензивну производњу млека, 6,9% крава отелило је мртву телад (Савовић, 2010). Такође утврђено је да код првотелки није било мртворођене телад, док је овај поремећај евидентиран код 10,5% вишетелки (Савовић, 2010). Узроци мртворођености код нас у овом ранијем истраживању нису испитивани, што нас је подстакло на даља истраживања етиологије абортуса и мртворођености, а према подацима из литературе један од водећих фактора ризика је инфекција са *N. caninum*.

Већ је напред рачено да је абортус један од најванијих клиничких знакова неоспорозе, који настаје због иреверзибилног оштећења плода или плаценте, што зависи од бројних међусобно повезаних фактора (Gubney и сар., 2008). Неповратно оштећење постелице, проузроковано је дејством паразита, које угрожава наставак гравидитета, изазивајући индиректно лутеолизу жутог тела. Оштећења у ткивима плода делимо на примарна и секундарна. Примарна оштећења су последица повећања бројности паразита, док се секундарна оштећења плода, доводе у везу са недостатком кисеоника и нутритивних материја услед оштећења постелице. Стадијум гравидности у првом реду утиче на који начин ће се испољити неки од наведених фактора (Dubey и сар., 2006, Innes., 2007; Lopez-Gatuus и сар., 2007; Gubney и сар. 2008; Almeria и сар.,

2010). Интересантно је да висок ниво пролактина у крвном серуму код иницираних гравидних плоткиња може испољити заштитни ефекат на одржавање гравидитета (*Garzia-Ispierto u cap.*, 2009). Такође је доказано, да позитиван, заштитни ефекат на очување гравидитета код коинфекције *N. caninum* и *Coxiella burnetii* има и повишен ниво прогестерона (*Garzia-Ispierto u cap.* 2010). Међутим, апликацијом суплементарног прогестерона дошло је до повећаног ризика за абортус код плоткиња са високим титром *N. caninum* специфичних антитела (*Bech-Sabat u cap.*, 2007). Степен инфестације плода *N. caninum* током гравидитета расте са степеном пермеабилности плаценте и највиши је у задњој трећини гравидитета (*Dubey u cap.* 2006; 2007а). Преживљавање плода зависи и од његове имунокомпетентности, тј. способности имуног система да контролише умножавање паразита и на тај начин спречи угинуће плода (*Gubney u cap.* 2008; *Iness u cap.* 2005). Имуни одговор на инфекцију *N. caninum* код говеда заснива се на целуларном имунитету и карактерише се великим количинама  $\gamma$  - интерферона које стварају мононуклеарне ћелије периферне крви и макрофаги слезине и лимфних чворова (*Marks u cap.* 1998; *Williams u cap.* 2000; *Andrianarivo u cap.* 2001; *Lunden u cap.*, 2002.). Под утицајем  $\gamma$ - интерферона долази до инхибиције раста паразита (*Innes u cap.* 1995) и до акивације макрофага и других мононуклеарних ћелија. Развија се тип 1 проинфламаторног одговора који се активира после примарне инфекције и доводи до контроле умножавања паразита, што води повољном исходу инфекције код одраслих негравидних јединки. До овог типа одговора може доћи и у ткиву постелице услед инфекције у току раног гравидитета, што ће имати за последицу угинуће плода (*Innes u cap.*, 2007). Уколико до примарне инфекције дође пре гравидитета, имунски одговор може да спречи трансплацентални пренос и абортус (*Innes u cap.*, 2001; *Willuams u cap.*, 2007). Основна клиничка манифестација инфекције гравидне краве је абортус који се јавља између треће недеље гравидитета и термина тељења (*Anderson u cap.*, 1991; *Barr u cap.*, 1991а; *Thornton u cap.*, 1991; *Otter u cap.*, 1995; *Wouda u cap.*, 1997). Абортус се најчешће јавља између петог и седмог месеца гравидитета (*Anderson u cap.*, 199; *Thornton u cap.* 1991; *Wouda u cap.*, 1997). Уколико се абортус догоди између трећег и осмог месеца гравидитета најчешће се избацује фетус који је подлегао аутолизи. Уколико пак, плод угине на самом почетку он бива ресорбован, што се манифестује као поваћање, тј. повишен индекс осемењавања (*Muñoz-Zanzi u cap.*, 2004; *Kamga-Waladjo u cap.*, 2010).

Резултати научних истраживања, као и практична искуства, како код нас, тако и у другим земљама, последњих деценија показују перманентан пад репродуктивне ефикасности крава у високомлечним запатима (Lucy, 2001; Bousque *u cap.*, 2004; Thacher *u cap.*, 2006; Dobson *u cap.*, 2007; Lucy, 2007).

Ово истраживање је показало да код крава са репродуктивним поремећајима стопа инфекције износи 12,8%. Од 12 серопозитивних животиња, половина су биле краве сименталске расе, а пола холштајн-фризијске расе. Ради се о кравима старости преко две године, које су имале од 1-8 телјења. У случају 6 серопозитивних крава забележена је појава једног или више абортуса, док се у случају осталих шест региструју други репродуктивни поремећаји (мртворођеност, изостанак концепције, мукометра, цисте). Статистички није доказана разлика између појаве серопозитивности и различитих репродуктивних поремећаја.

Иако се у литератури може срести велики број објављених радова на тему неоспорозе, први подаци из Србије срећу се тек онедавно. Подаци из света о серопреваленци се стално мењају, јер бројни епизоотиолошки фактори могу утицати на појаву и одржавање инфекције међу говедима. То се односи на климатске, зоохигијенске и зоотехничке услове као што су начин гајења стоке, величина стада, бројност паса, начин одабира грла за ремонт итд.

Пре анализе резултата добијених у овој студији, треба напоменути, да смо у истраживању користили два серолошка теста, што донекле може ограничавати поређење наших резултата са резултатима других аутора, иако су оба употребљена теста претходно валидирана и стандардизована од стране произвођача, и утврђен им је праг позитивности, на 1:200 за тест индиректне имунофлуоресценције, односно изнад 30% за компетитивни ELISA тест.

Серопреваленца *N. caninum* забележена широм света варира на фармама млечних крава од 3.0 до 65.0% (Dubey *u cap.*, 2007). Резултати овог истраживања показали су да је укупна серопреваленца на *N. caninum* код млечних крава у Војводини 15,4% (58/376) што је у сагласности са резултатима других аутора у Средњој Европи, нпр.у Пољској 15,6% (Cabaj *u cap.*, 2000). Према подацима из Словачке, (Reiterová *u cap.*, 2009) укупна серопреваленца износи 3,19%, а у Немачкој 4,1% (Conraths *u cap.*, 1996). У најновијим истраживањима рађеним на великом узорку који је обухватио 34 фарме млечних крава у Аргентини, стопа инфекције износи 20,3% млечних крава. (Fort *u cap.*, 2015.). У студији рађеној 2014. године у Израелу, нађено је 35,5% серопозитивних gravidних млечних крава, док је овај проценат серопозитивности код

крава са абортусом износио чак 54.5%, а ризик од појаве абортуса је три пута већи код серопозитивних у односу на серонегативне краве (*Mazuz u cap.*, 2014). Новије истраживање завршено 2014. године, које је обухватило 12 епизоотиолошких подручја у Србији, показало је да је стопа инфекције са *Neospora caninum* 7,2%, на нивоу јединке, а у појединим подручјима кретала се од 2,2 до 12% (*Клун И.*, 2014).

У овом истраживању у групи здравих млечних крава, серопозитивност је доказана код 18,8%, што је много више у односу на актуелне податке из Чешке, који говоре о ниској преваленци од свега 0,5% (*Bártová u cap.*, 2015) код здравих млечних крава док је код крава са абортусом овај проценат много већи и износи 3.19%, а ризик од појаве абортуса код серопозитивних крава је осам пута већи него код серонегативних (*Václavěk u cap.*, 2003).

Северни делови Аустралије представљају ендемска подручја неоспорозе, јер преваленца код говеда износи 31,8% (*Neverauskas u cap.*, 2015).

У Словачкој се серопозитивност среће код 1,9% здравих млечних крава (*Reiterová u cap.*, 2009), а у Естонији код 2,5%, (*Lassen u cap.*, 2012) што ове земље сврстава у оне са ниском преваленцом, попут Шведске, где је серопозитивност на нивоа стада износила 8.3% (95% CI 7.3-9.3%) (*Frösslung u cap.*, 2008).

Преваленца антитела на *N. caninum* базирана на резултатима појединачних узорка серума узетих од крава код којих је раније била доказано присуство антитела у узорцима збирног млека, у истраживању рађеном у Естонији, показала је вредност 37,0 ±9.6% (95% CI) (*Lassen u cap.*, 2012).

Једна од земаља са високим серопреваленцом је Румунија, где се у различитим регионима региструје чак до 56.8% заражених млечних крава (*Enachescu u cap.*, 2014). Истраживања рађена у источној Румунији показала су серопреваленцу од 40,3% код млечних крава, док је серопреваленца код телади износила 28,6% (*Mitrea u cap.*, 2012).

У земље са високом стопом инфекције на *Neospora caninum* спада Шпанија, где су специфична антитела код млечних крава забележена у 83,2% животиња, а код товних говеда 55,1% (*Quintanilla-Gozaló u cap.*, 1999). Компаративна анализа рађена истовремено у Немачкој, Холандији, Шпанији и Шведској показала је преваленцу неоспорозе на нивоу стада млечних крава од 16% у Шведској, 49% у Немачкој, 63% у Шпанији и 76% у Холандији. На фармама говеда серопреваленца је износила 41% у Немачкој, 46% у Шпанији и 61% у Холандији. Најнижа укупна преваленца забележена је код млечних крава у Шведској, а највиша у Шпанији (*Bartels u cap.*, 2006).

Из овог истраживања могло би се закључити да у односу на објављене податаке других аутора, северна покрајина Србије-Војводина, спада у европске регионе са средњом вредношћу укупне преваленце антитела на *Neospora caninum* али уз опаску, да су у набројаним студијама коришћени различити серолошки тестови, различите доминантне расе говеда, различити су начини држања као и да постоје значајне разлике у географским карактеристикама појединих држава или региона.

Резултати наших истраживања најсличнији су подацима из југоисточног Ирана, где преваленца (употребом комерцијалног ELISA теста износи 12,6% (*Gharekhanu u cap.*, 2014), Грчкој (*Sotiraki cap.*, 2008), Мексику, шпанској покрајини у Галицији (*Dubey u Schares*, 2011).

У овом истраживању, у групи крава са репродуктивним поремећајима, анти - *N. caninum* антитела су доказана код 12,8%, (12/94) а код крава без репродуктивних поремећаја код 18,8% (37/197). Иако постоји значајна разлика у стопи инфекције употребом  $\chi^2$  као и Фишеровог егзактног теста, није доказана статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ), што се може приписати величини испитиваних узорака.

Историја различитих репродуктивних поремећаја евидентирана је у случају 94 краве, при чему је код 12,8% (12/94) утврђено присуство антитела на *N. caninum*. Водећи репродуктивни поремећај био је абортус, код 41% животиња а регистрована је и мртворођеност (3%).

Према подацима Вестона и сарадника (*Weston u cap.*, 2012) у истраживању рађеном на Новом Зеланду, анти-*N. caninum* антитела срећу се код 26,5% крава са абортусом, а ризик од појаве побачаја је више од 4 пута већи него код крава које су биле серонегативне. Истраживања Сагера и сарадника, у Швајцарској, утврдила су да се антитела на *N. caninum* могу доказати код 44% крава са абортусом (*Sager u cap.*, 2001).

Њихови резултати слажу се са резултатима аутора из других земаља где се ризик од абортуса у случају серопозитивности крава креће од 2-19 пута у односу на серонегативне краве, а сматра се да је серопозитивност стабилна дужи временски период и удружена је са појавом понављаних абортуса.

Код побачених фетуса серопозитивних мајки, нису уочене макроскопске промене, док су микроскопске промене уочене углавном у подручју средњег мозга, ређе у кортексу и ретко у продуженој моздини и малом мозгу.

Серолошке методе, као што су IFAT и ELISA које се користе као индиректни дијагностички метод у случају појаве побачаја код крава могу показати флукуацију концентрације антитела током гравидитета, а у неким случајевима чак ниво антитела пада испод граничне вредности (Conrad *u cap.*, 1993).

Анализом 12 серопозитвних узорака, на остале могуће узрочнике побачаја код крава, доказано је у једном присуство антитела на токсоплазму, у једном случају доказана су антитела на хламидију, у два серума била су присутна антитела на хламидију и BVDV, а један серум био је позитиван на узрочника *Coxiella burnetti*, IBR и BVDB, а један на чак четири могућа узрочника побачаја: хламидију, *Coxiella burnetti*, IBR и BVDV. Два серума су била позитивна на IBR и BVDB, док су три серума била позитивна само на *N. caninum*. Ни у једном серуму позитивном на *N. caninum* нису доказана антитела на *Brucella abortus*, *Listeria monocitogenes*, *Leptospira spp.*

*N. caninum* може изазвати повећану подложност другим заразним агенсима. Бјоркман и сарадници (Bjorkman *u cap.*, 2000) су објавили да постоји статистички значајна веза између *N. caninum* и инфекције BVDV-ом. Слично томе, Mineo и сарадници су забележили да *N. caninum* коегзистира са BVDV-ом и говеђим херпеса вирусом 1, код крава музара у Бразилу (Bjorkman *u cap.*, 2000; Mineo *u cap.*, 2006; Konnai *u cap.*, 2008).

Истраживања других аутора показала су да се истовремено присуство више могућих узрочника абортуса среће код крава са побачајима. Шабир и сарадници, доказали су да се антитела на *N. caninum* и *B. abortus* могу детектовати код 43.8% односно 56.3% говеда, а да је преваленца антитела на оба узрочника виша код крава са абортусом (Shabbur *u cap.*, 2011). У истраживањима рађеним у Кини, преваленца антитела на *N. caninum*, *T. gondii*, *Chlamydia abortus* и BVD, знатно је виша код крава са абортусом (Sun *u cap.*, 2015).

Сероепидемиолошка студија рађена у Јужној Африци, показала је истовремено присуство више узрочника репродуктивних поремећаја код крава. Серопреваленца на BVD износила је 49.37%, на IBR 74.47%, на *Brucella abortus* 3.8% а на *Neospora caninum* 8.96% (Njiro, 2011). Велики број могућих узрочника као и могућност перзистенције коинфекције, отежава етиолошку дијагнозу абортуса и захтева молекуларна истраживања ради доказа паразита у ткивима побачених фетуса.

Иако је укупна серопреваленца на *N. caninum* у Шведској ниска, и износи 2% а серопреваленца на BVDV знатно виша и износи 32%, код крава са абортусом стопа



инфекције знатно виша, износи 7% и 42%, сматра се да истовремени налаз оба ова узрочника може имати конкурентни ефекат (*Björkman u cap.*, 2000) Наиме, половина серума позитивних на *N. caninum* имала је и антитела на BVDV. Систематским мерама ерадикације BVDV, које се спроводе од 1993. године, сматрају ови аутори, може се успешно контролисати и неоспороза, а ниска преваленца указује на искључиво вертикално преношење.

Међу кравама са кланице, чија репродуктивна историја није позната, антитела су регистрована код 10.6% (9/84), слично као у Италији, где је износила 11% (*Otranto u cap.*, 2003). Серопреваленца код говеда са кланице у Ирану је нижа и износи у региону Курдистана 7.80% (*Heidaru u cap.*, 2014), што аутори приписују аутохтоној раси резистентој на инфекцију. Новији подаци са Тајланда, показали су серопреваленцу код 5,9% товних говеда на кланицама (*Wuengcharoen u cap.*, 2012).

Што се тиче фактора ризика, у нашој студији значајна разлика је примећена између стопе инфекције говеда пореклом са комерцијалне у односу на мала, приватна газдинства. У односу на начин држања, односно, чињеницу да ли краве потичу са великих комерцијалних фарми или из домаћинства, серопозитивне животиње пронађене су у обе групе, с тим да је значајно већи проценат инфицираних крава пронађен на приватним газдинствима, 20.2% (50/247) него на комерцијалним фармама где је забележено 6.2% (8/129) крава. Разлог за овакав налаз лежи у чињеници да су биосигурносне мере на комерцијалним фармама супериорније у односу на мале, породичне фарме које имају веће шансе да имају псе присутне на фарми, који су потенцијални извор инфекције. С друге стране, краве из домаћинства, најчешће се држе у штали али се изводе на пашу, што је према неким ауторима (*Guimaraes u cap.*, 2012; *Rinaldi u cap.*, 2005) један од кључних фактора ризика повезаних са серопозитивношћу код говеда.

У студији на панчевачком епизотиолошком подручју (*Гавриловић у cap.*, 2012) серопозитивност је значајно већа код крава пореклом са великих комерцијалних фарми, што аутори објашњавају извођењем на испашу, али се ова разлика не види на појединачном нивоу, већ само на нивоу стада.

У нашем истраживању није размотрен ризик од присуства других животиња на фармама, као што су мали преживари, који не само да обољевају од неоспорозе већ представљају потенцијални резервоар инфекције. Наша ранија истраживања (*Бобош у cap.*, 2009) доказала су антитела на *Neospora caninum* код 6,0% оваца на једној малој фарми у Србобрану. У једном истраживању код мишева, који су редовни становници

фарми и домаћинстава у којима се држе животиње, доказана је паразитска ДНК-а у 21% (Barrat *u cap.*, 2008) што би могло имати епидемиолошки значај.

Присуство паса на или у околини поседа на којима су држане испитиване краве пријављено је у случају највећег броја малих газдинстава. Са друге стране, званично ни једна од комерцијалних фарми не држи псе, иако, поједини радници тврде да су у кругу фарме повремено ипак виђали псе, највероватније луталице.

Присуство других серопозитивних преживара повећава ризик инфекције паса на фарми, чиме се одржава хоризонтална инфекција код паса (Liu *u cap.*, 2015). Не мање важно, могуће присуство дивљих преживара који су доказани као прелазни домаћини за овог паразита (јелен, срна) могу допринети одржавању сивлатичног циклуса у околини фарме (Rosypal *u Lundsay.*, 2005).

Иако је према подацима из литературе, доминантни начин преношења инфекције са *Neospora caninum* код говеда вертикални, присуство паса на фармама говеда има велики епидемиолошки значај (Reichel *u cap.*, 2014; Dubey., 2007; VanLeeuwen *u cap.*, 2010). Фармски пси врло често се хране побаченим фетусима или њиховом плацентом, што повећава шансу појаве серопозитивности код говеда (VanLeeuwen *u cap.*, 2010).



Слика 14. Пси конзумирају постелицу

Као илустрацију, можемо размотрити серолошки налаз код три пса из домаћинства где су доказана серопозитивна говеда. У једном случају у серуму пса су доказана антитела на *Neospora caninum*, док су остала два пса серонегативна. Од два узорка крава са побачајима из истог домаћинства, у једном серуму доказана су антитела на *Neospora caninum* а у другом нису. Серопозитивна крава има анамнезу вишеструких побачаја, а њен један фетус који је прегледан, није имао патохистолошке промене у мозгу које одговарају неоспорози, нити је имао антитела на *Neospora caninum*. У овом домаћинству документовано је храњење паса постељицом након побачаја (слика 12).

Учестала дефекација паса у јасле, доводи се у везу са побачајима (*Hobson и сар.*, 2005), а дефекација у близини сточне хране, силаже и сена, повећава ризик од инфекције због могућности контаминације ооцистама *N. caninum* (*Dijkstra и сар.*, 2002).

У нашем ранијем истраживању неоспорозе код паса, серопозитивност је доказана код 17.2% (17/99, CI 95%: 10.8–26.2). Истраживање је обухватило углавном ловачке псе и мали број паса луталица и фармских паса, а највећи број серопозитивних припада ловачким псима који током лова могу контаминирати окружење и представљати ризик по говеда, нарочито ако се нађу у окружењима фарме говеда (*Куруца и сар.*, 2013).

Антитела против *N. caninum* пронађена су код крава из сва три региона Војводине (Срем, Банат и Бачка), а процентуално, највише серопозитивних крава откривено је у Банату, а најмање у Срему, али уочена разлика не може се сматрати статистички значајном.

Малобројна истраживања серопреваленце неоспорозе у Србији показала су различите резултате. Укупна преваленца антитела на *Neospora caninum* код млечних крава из овог истраживања (15,4%) била је већа од резултата Гавриловића и сарадника, као и од истраживања Клун и сарадника.

Слично овој студији, узорак Гавриловића и сарадника обухватао је узорак насумично одабраних крава као и крава са абортусом, узгајаних на оба начина, на великим комерцијалним фармама и у приватним газдинствима. Ипак, они су регистровали само 4,6% (23/500) серопозитивних крава, што се може делимично објаснити малим уделом крава са абортусом у укупном узорку и чињеницом да су били ограничени само малим географским подручјем, односно истраживање је обухватило само регион јужног Баната. Друго истраживање из Србије, које је спровела Клун,

обухватило је узорак од 78,3% говеда која нису имале сметње у репродуктивном здрављу. Ова студија је показала да су говеда држана у слободном систему била под три пута вишим ризиком од крава држаних у везном систему, што се може закључити и из наших резултата, јер се највећим делом говеда у приватним домаћинствима узгајају на овај начин.

Такође, у овим епидемиолошким истраживањима, коришћени су различити комерцијални тестови. Гавриловић и сарадници користили су ELISA IDEXX, а Клун ELISA тест другог произвођача (VMRD), док су у нашем истраживању коришћена два теста: IFAT и ELISA истог произвођача (VMRD) што је можда такође утицало на резултате.

У истраживањима која су радили Видић и сарадници, (*Видић и сар.*, 2011) као и у нашим ранијим истраживањима (*Савовић и сар.*, 2012) антитела на *N. caninum* нађена су код 3,7% (5/132) и 17,3% (9/52) високопродуктивних крава музара. Мала величина испитаних узорака у оба истраживања и чињеница да су се састојали искључиво од крава са репродуктивним поремећајима, чине да се ти подаци о преваленци тешко могу поредити са новодобијеним подацима из ове студије.

Резултати патоморфолошког и патохистолошког испитивања шест побачених фетуса, нису доказали присуство паразита у мозгу. Према литературним подацима, инфекција фетуса најчешће показује типичне хистолошке лезије у виду фокалних несупуративних некроза и инфламације. Међутим, пошто мозак фетуса најбрже аутолизира, па добија течну или полутечну конзистенцију, тешко се могу добити добри патохистолошки препарати (*Anderson u cap.*, 1991; *Nietfield u cap.*, 1992., *Dubey.*, 2003; *Corbelluni u cap.*, 2006)

На нашем узорку, микроскопско испитивање патохистолошких препарата узорака мозга побачених фетуса у којима су очекиване карактеристичне патолошке лезије и цисте паразита, најчешће се примећује едем мозга. Цисте *N. caninum* нису идентификоване на хистолошком препарату. Код свих узорака је нађена правилна архитектура нервног ткива са јасно одвојеном сивом и белом масом као и са правилном слојевитости коре великог и малог мозга. У једном случају нису нађене патолошке промене нервног ткива, а у четири је нађен различит степен едема мозга. Код једног фетуса нађени су поред правилне архитектонике нервног ткива и акумулације неуроглијских ћелија које у првом реду одговарају слици неуроинфекције. У истраживањима урађеним у Шпанији лезије запажене на мозгу говеђег фетуса инфицираног *N. caninum* дефинисане су као "карактеристичне", а описују се као

несупуративни мултифокални енцефалитис. У миокарду, је такође запажен несупуративни миокардитис, са групама лимфоцита и макрофага инфилтрираних дуж срчаних мишићних влакана. Поред карактеристичних промена на мозгу, запажена је у мањем степену некроза можданог паренхима. Код инфицираних фетуса, лезије се запажају углавном у подручју средњег мозга, ређе у кортексу и веома ретко у продуженој мождини и малом мозгу. Рутинском хистолошком методом ни ова група аутора, као ни ми, није детектовала паразита. Међутим, они су имунохистохемијском методом у лезијама на мозгу код 7 од 13 фетуса доказали присуство паразита (*Pereura-Vieno u cap.*, 2003). Пескадор са сарадницима потврђује могућност да се имунохистохемијским методама могу доказати тахизоити и ткивне цисте у мозгу, али у случају аутолизе мозга препоручује преглед срца и плућа (*Pescador u cap.*, 2005).

Међутим, иако се серологија користи као једино средство за обављање епидемиолошких истраживања абортуса повезаних са инфекцијом овим паразитом, и иако већина аутора сматра да постоји висока корелација између серопозитивности и високог ризика од абортуса као последице неоспорозе, овај рад је указао да је само серолошко испитивање ипак инсуфицијентно и да је неопходно доказати и присуство инфективног паразита у ткивима побаченог фетуса да би се са сигурношћу утврдио етиолошки агенс.

На крају, на основу сопствених вишегодишњих истраживања као и података из литературе, може се закључити, да инфекција паразитом *Neospora caninum*, представља још увек недовољно истражен узрочник побачаја и мртворођености на територији Војводине. Значај овог истраивања огледа се у чињеници да је средином марта 2016. године, Министарство пољопривреде Републике Србије, уврстило у Програм мера и обавезни преглед говеда на *Neospora caninum* (Министарство пољопривреде, 2016).

У литератури је дискутовано о многим контролним мерама како би се смањила могућност заражавања и ширења неоспорозе код говеда (*Dubeu u cap.*, 2007a). У првом реду се разматрало увођење вештачког осемењавања серопозитивних женки семеном приплодњака различитих раса, трансфер ембриона, уклањање серопозитивних јединки или читавог стада - замена јуница, хемотерапија и вакцинација. Студије из Шпаније су показале да је вероватноћа абортуса знатно нижа за јунице и краве које су се већ телиле осемењене семеном бикова товних раса у поређењу онима осемењеним семеном холштајн-фризијских бикова (*Almeria u cap.*, 2009b; *Yaniz u cap.*, 2010); овај утицај може се објаснити повољним утицајем укрштених трудноћа на функцију плаценте.

Ембрио трансфер са серопозитивних плоткиња на серонегативне реципијенте може спречити ендогени трасплацентарни пренос *N. caninum*. Ова метода се може користити за узимање незаражених телади од генетски високо продуктивних плоткиња које су заражене са *N. caninum*. Из тог разлога пре трансфера ембиона препоручује се тестирање реципијената на инфекцију *N. caninum* (Paz *u cap.*, 2007; de Oliveira *u cap.*, 2010).

Абортуси и конгениталне инфекције се могу десити уколико су краве примаоци серопозитивне (de Oliveira *u cap.*, 2010). Није познато у ком месецу гравидитета долази до заражавања фетуса *N. caninum* када да ембриони серопозитивних крава нису заражени овом кокцидијом (Moskwa *u cap.*, 2008).

Годишње серолошко тестирање би могло бити од користи за стратегију контроле *N. caninum*. Једна вишегодишња студија је показала да је серопозитивност била веома стабилна током посматраног периода, а серопозитивне краве су показале високу стопу поновљених абортуса (Pabon *u cap.*, 2007).

Стратегија „тест и уклањање” може укључити тестирање и уклањање серопозитивних женки или серопозитивних женки које су абортирале, тестирање и осемењавање потомака серопозитивних женки искључиво семеном бика и тестирање и одстрањивање потомака серопозитивних женки из запата.

У свету се примењују математички модели да би се проценили трошкови говеђе неоспорозе и да би се утврдиле користи и ефикасност различитих мера контроле (Hasler *u cap.*, 2008; Reichel *u Ellis*, 2009). Математичким приступом је утврђено да су губици на мањим говедарским фармама у Швајцарској од 81-1875 евра по фарми (Hasler *u cap.*, 2008).

Ризик од инфекције у овом истраживању се нарочито односи на приватна газдинства где се углавном примењује слободни начин држања, а да се притом зоохигијенске мере недовољно спроводе.

Будућа истраживања морају бити усмерена на молекуларна испитивања и карактеризацију *N. caninum* код побачених фетуса и серопозитивних крава.

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата може се закључити следеће:

- Инфекција паразитом *Neospora caninum* доказана је на целој територији Војводине, а укупна преваленце код крава износи 15,4%;
- Преваленца инфекције код крава са побачајима износи 12,8%;
- Преваленца инфекције код крава без репродуктивних поремећаја износи 18,8%;
- Није доказана статистички значајна разлика у серопреваленци код крава са репродуктивним поремећајима у односу на краве код којих нису забележени репродуктивни поремећаји;
- Доказана серопозитивност на *Neospora caninum* може а не мора узроковати манифестне репродуктивне поремећаје код крава;
- *Neospora caninum* може довести до појаве абортуса због чега се у рутински лабораторијски рад код утврђивања узрока абортуса мора увести серолошки преглед крава на *Neospora caninum*;
- Патохистолошка анализа мозга побачених фетуса није довољна, већ се за прецизну дијагностику конгениталне неоспорозе мора радити молекуларно истраживање мозга побачених фетуса;
- Фактор ризика за инфекцију крава представља гајење на малим приватним газдинствима што се објашњава слабом применом зоохигијенских мера (слободно држање и присуство паса на фарми)



## **8. ЛИТЕРАТУРА**

1. Aguado-Martinez A, Alvarez-García G, Fernandez-Garcia A, Risco-Castillo V, Marugan Hernandez V, Ortega-Mora LM. (2009): Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. *Vaccine*. 27, (52) 7331-7338
2. Aguado-Martínez A, Álvarez-García G, Fernández-García A, Risco-Castillo V, Arnaiz-Seco I, Rebordosa-Trigueros X, Navarro-Lozano V, Ortega-Mora LM (2008) *Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis*. *Vet Parasitol* 157, 182–195.
3. Almería S, Nogareda C, Santolaria P, Garcia-Ispuerto I, Yániz JL, López-Gatius F. (2009a): *Specific anti-Neospora caninum IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production*. *Vet Immunol Immunopathol* 130, 35–42
4. Almería S, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sàbat G, Serrano B, Santolaria P, Yániz JL. (2009b): *Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of Neospora caninum-infected dairy cows*. *Vet Parasitol* 163, 323–329
5. Almería SL, 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* 169:304-11
6. Al-Qassab S, Reichel MP, Ellis J. (2010): *On the biological and genetic diversity in Neospora caninum* *Diversity*, 2., 411–438
7. Al-Qassab S, Reichel MP, Ellis J. (2010): *A second generation multiplex PCR for typing strains of Neospora caninum using six DNA targets*. *Mol. Cell. Probes*. 24, 20–26
8. Al-Qassab S, Reichel MP, Su C, Jenkins D, Hall C, Windsor PA, Dubey JP, Ellis J. (2009b): *Isolation of Toxoplasma gondii from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization*. *Vet Parasitol* 164, 335–339
9. 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* Vol. 97, No. 1, pp. 135-139
10. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman 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

11. Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC. (1995): *Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California*. J Am Vet Med Assoc. 207:1206–1210
12. Andrianarivo AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW. (2001): *Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with Neospora caninum*. Parasitol Res. 87, 817–825
13. Анон.: Статистички годишњак Србије, 2011, Републички завод за статистику Србије, Београд
14. Marsh A, Barr B., Packham A, Conrad P. (1998): *Description of a New Neospora Species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae)*. J Parasitol, Vol. 84, No. 5, 983-991
15. Armengol R, Pabón M, Santolaria P, Cabezón O, Adelantado C, Yániz J, López-Gatius F, Almería S. (2007): *Low seroprevalence of Neospora caninum infection associated with the limousin breed in cow-calf herds in Andorra, Europe*. J Parasitol 93, 1029–1032
16. Bagley CV. (1999): *Abortion in cattle*. <http://ah/beef/36/Utah>
17. Bandini LA, Neto AFA, Pena HFJ, 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
18. Barajas-Rojas J, Mapes G, Yanez I, Morales E, Lastra G. (2004): *Field efficacy of a vaccine against Neospora caninum in Mexico*. Proceedings 23rd world Buiatrics Congress, p. 35.
19. Barling KS, McNeill JW, Thompson JA. (2000): *Association of serologic status for Neospora caninum with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves*. J Am Vet Med Assoc. 217:1356–1360
20. Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. (1991a): *Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions*. Vet Pathol 28:110-116
21. Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolde J, Chauvet AE, Dubey JP, Adams AA, 1993. *Congenital Neospora infection in calves born from that od previously aborted Neospora-infected fetuses: four cases (1990 - 1992)*. S Am Vet Med Assoc 202: 113 – 117
22. Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, Anderson ML. (1991b): *Neospora-like encephalomyelitis in a calf. Pathology, ultrastructure and imunoreactivity*. J Vet Diagn Invest 3:39–46
23. Barratta J, Al Qassaba 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*. Volume 22, Issue 4, Pages 228–233

24. Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Bjorkman C, Frossling J, Von Blumroder D, Conraths FJ, Schares G, Van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora LM. (2006): *Supranational comparison of Neospora caninum seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands Spain and Sweden*. Vet Parasitol 137, 17–27
25. Bartels CJ, Huinink I, Beiboer ML, van Schaik G, Wouda W, Dijkstra T. (2007): *Quantification of vertical and horizontal transmission of Neospora caninum infection in Dutch dairy herds*. Vet Parasitol, 148, 83–92
26. Bartels CJM, van Maanen C, van der Meulen AM, Dijkstra T, Wouda W. (2005): *Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Neospora caninum in bulk milk*. Vet Parasitol 131, 235–246
27. Bártová E, Sedlák K, Budíková M. (2015). *A study of Neospora caninum and Toxoplasma gondii antibody seroprevalence in healthy cattle in the Czech Republic*. AAEM, 22: 32–34
28. Basso W, Schares S, Barwald A, Herrmann DC, Conraths FJ, Pantchev N. (2009): *Molecular comparison of Neospora caninum oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers*. Vet Parasitol 160:43–50
29. Basso W, Schares S, Bärwald A, Herrmann DC, Conraths FJ, Pantchev N, Vrhovec MG, Schares G, (2009b): *Molecular comparison of Neospora caninum oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers*. Vet. Parasitol. 160, 43–50
30. Basso W, Schares S, Minke L, Bärwald A, Maksimov A, Peters M, Schulze C, Müller M, Conraths FJ, Schares G. (2010): *Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic Neospora caninum-associated bovine abortion*. Vet Parasitol 173, 24–31
31. Baszler TV, Shkap V, Mwangi W, Davies CJ, Mathison BA, Mazuz M, Resnikov D, Fish L, Leibovitch B, Staska LM, Savitsky I. (2008): *Bovine immune response to inoculation with Neospora caninum surface antigen SRS2 lipopeptides mimics immune response to infection with live parasites*. Clin. Vaccine Immunol 15, 659–667
32. 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
33. Bjerkås I, Mohn SF, Presthus. (198): *Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs*. Z Parasitenkd 70:271–274

34. Björkman C; Uggla A. (1999). *Serological diagnosis of Neospora caninum infection*. Int J Parasitol 29, 1497-1507
35. 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*. Veterinary Journal 159, 201–206
36. Bouchard E, Du Tremblay D. (2003): *Portrait Québécois de la reproduction*. Recueil des conférences du symposium des Bovines laitiers, saint-Hyacinthe, pp. 13-23
37. Bousquet D, Bouchard E, du Tremblay D. (2004): *Decreasing Fertility in Dairy Cows*. Myth or Reality, Proc. 23 WBC Congr., Quebec, Canada, pp. 1-7
38. Borsuk S, Andreotti R, Leite FP, da Silva Pinto L, Simionatto S, Hartleben CP, Goetze M, Oshiro LM, Matos MD, Berne, ME. (2011): *Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of Neospora caninum antibodies in cattle*. Vet Parasitol 177, 33–38
39. Boyd SP, Barr PA, Brooks HW, Orr JP. (2005): *Neosporosis in a young dog presenting with dermatitis and neuromuscular signs*. J Small Anim Pract. 46 (2):85-8
40. 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
41. Busch W, Zerobin K (2009): *Fruchtbarkeitskontrolle bei Grosse und Kleintieren*. Enke Verlag cattle. Vet Parasitol 17, 372–376
42. Cabaj W, Choromanski L, Rodgers S, Moskwa B, Malczewski A. (2000): *Neospora caninum infections in aborting dairy cows in Poland*. Acta Parasitol. 45:113–114
43. Cardoso JMS, Funada MR, Soares RM, Gennari SM. (2008): *Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para Neospora caninum em bezerros livres da infecção*. Braz J Vet Res Anim Sci 45, 379–384
44. Cavalcante GT, Monteiro R M, Soares R M, Nishi S M, Alves Neto A F, Esmerini 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
45. Cedillo CJR, Martínez MJJ, Santacruz AM, Banda RVM, Morales SE. (2008): *Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with Neospora caninum*. Vet Parasitol 154: 151-155
46. Chryssafidis AL1, Cantón G, Chianini F, Innes EA, Madureira EH, Gennari SM. 2014. *Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of Neospora caninum in*

- experimentally infected cows and buffaloes in early pregnancy*. Parasitol Res 113:1521-8
47. Conrad PA, Sverlow K, Anderson M. (1993): *Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental Neospora infections*. J Vet Diagn Invest 5:572–578
48. Conraths FJ, Bauer C, Becker W. (1996): *Nachweis von Antikörpern gegen Neospora caninum bei Kühen in hessischen Betrieben mit Abort- und Fruchtbarkeitsproblemen*. Dtsch tierärztl Wschr 103, 221–224
49. 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*. Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift 124(3-4):148-153
50. Corbellini LG1, Pescador CA, Frantz F, Wunder E, Steffen D, Smith DR, Driemeier D. (2006): *Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to Neospora caninum infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil*. Vet J. 172:114-20
51. Cox BT, Reichel MP, Griffiths LM. (1998): *Serology of a Neospora abortion outbreak on a dairy farm in New Zealand: a case study*. New Zealand. Vet J 46, 28–31
52. Dannatt L, Guy F, Trees AJ, 1995. *Abortion due to Neospora species in a dairy herd*. Veterinary Record 137, 566-567
53. Darwich L, Cabezon O, Echeverria I, Pabon M, Marco I, Molina-Lopez R. (2012): *Presence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum DNA in the brain of wild birds*. Vet. Parasitol. 183:377–381
54. De Meerschman F, Focant C, Boreux R, Leclipteux T, Losson B. (2000): *Cattle neosporosis in Belgium: a case-control study in dairy and beef cattle*. Int J Parasitol 30:887–890
55. De Yaniz MG, Moore DP, Odeón AC, Cano A, Cano DB, Leunda MR, Campero CM, (2007): *Humoral immune response in pregnant heifers inoculated with Neospora caninum tachyzoites by conjunctival route*. Vet Parasitol 148, 213–218
56. Dijkstra T, Barkema HW, Bjorkman C, Wouda W. (2002): *A high rate seroconversion for Neospora caninum in dairy herd without an obvious increased incidence of abortions*. Vet Parasitol 109, 203-211
57. Dijkstra T, Lam TJGM, Bartels CJM, 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

58. Dion S, Germon S, Guiton R, Ducournau C, Dimier-Poisson I. (2011): *Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite Neospora caninum*. Int J Parasitol 41:685-695
59. Dobson H, Smith R, Royal M, Knight Ch, Sheldon I. (2007): *The high-producing dairy cow and its reproductive performance*. Reprod Dom Anim 42(2):17-23
60. Dubey JP and Schares G. (2006): *Diagnosis of bovine neosporosis*. Vet Parasitol 140, 1-34
61. Dubey JP, (2003a): *Neosporosis in cattle*. J Parasitol 89 suppl., S42–S56
62. Dubey JP, Barr BC, Barta JR. (2002): *Redescription of Neospora caninum and its differentiation from related coccidia*. Int J Parasitol. 32:929–946
63. Dubey JP, Beattie CP. (1998): *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Boca Raton, Florida: CRS Press, pp. 1- 220
64. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. 1988. *Newly recognized fatal protozoan disease of dogs*. J Am Vet Med Assoc 192:1269–1285
65. 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
66. Dubey JP, Gendron- Fitzpatrick AP, Lenhard AL, Bowman D, (1988b): *Fatal toxoplasmosis and enteroepithelial stages of Toxoplasma gonadiei in a Pallas cat (Felis manul)*. J. Protozool. 35, 528-530
67. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ.(1988c). *Neonatal Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission*. J Am Vet Med Assoc 193:1259–1263
68. Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J. (2011): *Gray wolf (Canis lupus) is a natural definitive host for Neospora caninum*. Vet. Parasitol.;181:382–387
69. Dubey JP, Liddell S, Mattson D, Speert CA, Howe DK, Jenkins MC. (2001): *Characterization of the Oregon isolate of Neospora hughesi from a horse*. J Parasitol 87(2):345-53.)
70. Dubey JP, Lindsay DS, Hill D, Romand S, Thulliez P, Kwok OCH, Silva JCR, Oliveira-Camargo MC, Gennari SM. (2002): *Prevalence of antibodies to Neospora caninum and Sarcocystis neurona in sera of domestic cats from Brazil*. J Parasitol 88:1251–1252

71. Dubey JP, Lindsay DS. (1996). *A review of Neospora caninum and neosporosis*. Vet Parasitol. 67:1–59
72. Dubey JP, Lunney JK, Shen SK, Kwok OCH, Ashford DA, Thulliez P. 1996. *Infectivity of low numbers of Toxoplasma gonadii oocysts to pigs*. J Parasitol 82, 438-443
73. Dubey JP, Ott-Joslin J, Torgerson RW, Topper MJ, Sundberg JP, (1988d). *Toxoplasmosis in black-faced kangaroos (Macropus fuliginosus melanops)*. Vet Parasitol 30, 97-105
74. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM, (2007a): *Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 20, 323–367
75. Dubey JP, Schares G. (2011): *Neosporosis in animals – The last five years*. Vet Parasitol 180: 90-108
76. Dubey JP, Schares G. (2006): *Diagnosis of bovine neosporosis*. Vet Parasitol 140:1–34
77. Dubey JP. (2004). *Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis*. Vet Parasitol 126:57
78. Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska KB, Vianna MCB, Kwok OCH, Hill DE, Jenkins MC, Lindsay DS, Geene CE. (2004): *Biologic, morphologic, and molecular characterisation of Neospora caninum isolates from littermate dogs*, Int J Parasitol 34, 1157-1167
79. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. (2006): *Pathogenesis of Bovine Neosporosis*. Journal of Comparative Pathology 134, 267-289
80. Dubey JP. (1999): *Neosporosis in cattle: biology and economic impact*. J. Am Vet. Med Assoc 214; 1160-1163
81. Dubey JP. (2003). *Neosporosis in cattle*. J Parasitol.41: 1-16
82. Dubey JP. (2003a). *Review of Neospora caninum and neosporosis in animals*. Korean J Parasitol 41:1-16
83. Dubey JP. (2005). *Neosporosis in cattle*. Vet Clin North Am Food Anim Pract 21:473–83
84. Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Bjorkman 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, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJL,



Lindsay DS. (2002): *Redescription of Neospora caninum and its differentiation from related coccidia*. Int J Parasitol 32:929–946

85. Duong MC, Alenius S, Huong LTT, Björkman C, (2008) *Prevalence of Neospora caninum and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam*. Vet. J. 175, 390–394

86. Eiras C1, Arnaiz I, Alvarez-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 1;98:128-32

87. Enachescu VL, Ionita M, Mitrea IL. (2014): *Comparative study for the detection of antibodies to Neospora caninum in milk and sera in dairy cattle in southern Romania*. Acta Parasitol. 59:5-10

88. Ferre I, Serrano-Martinez E, Martinez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, Del-Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo C O, Ortega-Mora LM. (2008): *Effects of re-infection with Neospora caninum in bulls on parasite detection in semen and blood 18 and immunological responses*. Theriogenology 69, 905-911

89. Fish L, Mazuz M, Molad T, Savitsky I, Shkap V. (2007): *Isolation of Neospora caninum from dairy zero grazing cattle in Israel*. Vet Parasitol 149, 167–171

90. Forar AL, Gay JM, Hancock DD. (1995): *The frequency of endemic fetal loss in dairy cattle: a review*. Theriogenology 43, 989-1000

91. Fort M, Edelsten M, Maley S, Innes E. (2015): *Seroepidemiological study of Neospora caninum in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina*. Acta Parasitol. 60:275-2782

92. Fourchon C, Seegers H, Malher X. (2000): *Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis*. Theriogenology, 53(9)1-2

93. Frössling JL, Nødtvedt A, Lindberg A, Björkman C. (2008): *Spatial analysis of Neospora caninum distribution in dairy cattle from Sweden*. Geospat Health 3:39-45

94. 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

95. Gani OM, Amin MM, Alam SGM, Kaesh HEM, Karim RM, Samad AM, Islam R (2008): *Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infection in dair cows*. Bangl J Vet Med 6(1)79-86

96. 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
97. 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* 15;74(2):212-20
98. García-Melo DP, Regidor-Cerrillo J, Collantes-Fernández E, AguadoMartínez A, Del Pozo I, Minguijón E, Gómez-Bautista M, Aduriz G, Ortega-Mora LM. (2010): *Pathogenic characterization in mice of Neospora caninum isolates obtained from asymptomatic calves*. *Parasitology* 137, 1057–1068
99. García-Melo DP, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, CollantesFernández E, de Oliveira VSF, de Oliveira MAP, da Silva AC. (2009): *Isolation and biological characterisation of a new isolate of Neospora caninum from an asymptomatic calf in Brazil*. *Acta Parasitol*. 54, 180–185
100. García-Vázquez Z, Rocap.io-Cruz R, Ramos-Aragón A, Cruz-Vázquez C, Mapes G. (2005): *Neospora caninum seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico*. *Vet Parasitol* 134: 61-65
101. Ghanem ME, Suzuki T, Akita M, Nishibori M. (2009): *Neospora caninum and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification*. *Can Vet J* 50, 389–392
102. Gharekhani J, Haddadzadeh H, Bahonar A. (2014): *Prevalence of immunoglobulin G (IgG) antibody to Neospora caninum in dairy cattle of Hamedan province, west of Iran*. *Vet Res Forum* 5:149–152
103. Gibney EH, Kipar A, Rasbottom 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
104. Gondim LF. (2006). *Neospora caninum in wildlife*. *Trends Parasitol* 22:247–252
105. Gondim LF, Mc Allister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME. (2004): *Transmission of Neospora caninum between wild and domestic animals*. *J Parasitol*: 90; 6:1361-1365
106. Gondim LF, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Bjorkman C, Lock TF, Firkins LD, Gao L, Fischer WR. (2004): *Transplacental transmission and abortion in cows administered Neospora caninum oocysts*. *J. Parasitol*. 90:1394–1400

107. Gordon I. (1997): *Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes*. Cab International. Oxford. UK
108. Gozdzik K, Cabaj W. (2007): *Characterization of the first Polish isolate of Neospora caninum from cattle*. Acta Parasitol 52, 295–297
109. Häsler B, Stark 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
110. Hay WH, Shell LG, Lindsay DS, (1990): *Diagnosis and treatment of Neospora caninum infection in a dog*. J Am Vet Med Assoc 197(1): 87-8
111. Heidari H, Mohammadzadeh A, Gharekhani J. (2014): *Seroprevalence of Neospora caninum in slaughtered native cattle in Kurdistan province*. Iran Res Forum 5: 69–72
112. Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A. (2006): *Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with Neospora caninum*. Parasitology 133:261–278
113. Hoar BR, McQuarry AC, Hietala SK. (2007): *Prevalence of Neospora caninum and persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy-breed steers in a feedlot*. J Am Vet Med Assoc 230(7), 1038-43
114. Hobson JC, Duffield TF, Kelton D, Lissemore K, Hietala S K, Leslie KE, McEwen B, Peregrine AS. (2005): *Risk factors associated with Neospora caninum abortion in Ontario Holstein dairy herds*. Vet Parasitol 127, 177–188
115. Huang P, Liao M, Zhang H, Lee EG, Nishikawa Y, Xuan X. (2007): *Dense-granule protein NcGRA7, a new marker for the serodiagnosis of Neospora caninum infection in aborting cows*. Clin Vaccine Immunol 14, 1640–1643
116. 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(2):263-7
117. 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(1):95-100
118. Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I. (2005): *The host-parasite relationship in bovine neosporosis* Vet Immunol Immunopathol 108, 29–36
119. 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. 31:1523-34

120. Innes EA. (2007): *The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with Neospora caninum*. Parasitology 134:1903-1910
121. 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. 25:5495-503
122. Kamga-Waladjo AR, Gbati OB, Kone P, Lapo RA, Chatagnon G, Bakov SN., Pangui LJ., Diop PelH., Akakpo JA., Taunturier 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
123. Klun I. (2014): *Seroepizootiologija i molekularna gijagnostika infekcije parazitom Neospore caninum kod goveda*. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd
124. Knaus M, Rapti D, Kusi I, Shukullari E, Postoli R, Xhaxhiu D, Winter R, Visser M, Rehbein S. (2011): *Survey of Endo- and Ectoparasites of Cats from Tirana, Albania*. Buenos Aires, Argentina: 23rd International Conference of the World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology (WAAVP), 232-Abstract
125. Knowler C, Wheeler SJ. (1995): *Neospora caninum infection in three dogs*. J Small Anim Pract 36: 172-7
126. Koiwai M, Hamaoka T, Haritani M, Shimizu S, Kimura K. (2005): *Proportion of abortions due to neosporosis among dairy cattle in Japan*. J. Vet. Med. Sci. 67:1173–1175
127. Konnai, S, Mingala CN, Sato M, Abes NS, Venturina FA, Gutierrez CA, Sano T, Omata Y, Cruz LC, Onuma M, Ohashi K. (2008): *A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with abortion problems*. Acta Tropica. 105, 269–273
128. Kruif A. (1984): *Abortus bij het rund*. Tijdschr Diergeneesk, 112,1217-25
129. Küst D. Schaetz F. (1971): *Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
130. La Perle KM, Del Piero F, Carr RF, Harris C, Stromberg PC. (2001): *Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy*. J Vet Diagn Invest 13:252–255
131. Lassen B, Orro T, Aleksejev A, Raaperi K, Jarvis T, Viltrop A. (2012): *Neospora caninum in Estonian dairy herds in relation to herd size, reproduction parameters, bovine virus diarrhoea virus, and bovine herpes virus 1*. Vet Parasitol 190, 43–50

132. Lindsay DS, Butler JM, Rippey NS. (1996): *Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase/thymidylate synthase inhibitors against Neospora caninum tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine*. Am J Vet Res 57(1): 68-72
133. Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. (1999): *Confirmation that dogs are a definitive host for Neospora caninum*. Vet Parasitol 82, 327-333
134. Lindsay DS, Lenz SD, Dykstra CC, Blagburn BL, Dubey JP. (1998): *Vaccination of Mice with Neospora caninum: Response to Oral Challenge with Toxoplasma gondii Oocysts*. J Parasitol 84, 2, 311-315
135. Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP. (1999). *A structural study of the Neospora caninum oocyst*. Int J Parasitol 29, 1521-1523
136. Lindsay DS, Weston JL, Little SE. (2001): *Prevalence of antibodies to Neospora caninum and Toxoplasma gondii in gray foxes (Urocyon cinereoargenteus) from South Carolina*. Vet Parasitol 97, 159-164
137. Lindsay DS. (2001): *Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses*. Equine Veterinary Journal, 33: 116-118
138. Ljiljana Kuruca, Ljubica Spasojević Kosić, Simin S., Savović M., Lauš S., Lalošević V. 2013. *Neospora caninum antibodies in dairy cows and domestic dogs from Vojvodina, Serbia*. Parasite, 20, 40, doi:10.1051/parasite/2013036
139. Lopez-Gatius F, Pabón M, Almería S. (2004): *Neospora caninum infection does not affect early pregnancy in dairy cattle*. Theriogenology 62:606-613
140. Lopez-Gatius F, Garbayo JM, Santolaria P, Yaniz JL, Almería S, Ayad A, de Sousa NM, Beckers JF (2007a): *Plasma pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) concentrations during gestation in Neosporainfected dairy cows*. Theriogenology 67, 502-508
141. Lopez-Gatius F, Almería S, Donofrio G, Nogareda C, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yaniz JL, Pabón M, de Sousa NM, Beckers JF. (2007b): *Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with Neospora caninum*. Theriogenology 68, 1067-1073
142. 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. 15;68(7):1067-73

143. Lopez-Gatius F, Santolaria P, Almeria S, 2005. *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. J Vet Med 52: 1, 51-53
144. Lucy CM. (2001): *Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle*. Where Will it End J Dairy Sci 84:1277-1293
145. Lunden A, Stephen W, Judith E. A, David B. (2002): *Immunisation of mice against neosporosis*. International Journal for Parasitology 32 867–876
146. Lusy CM. (2007): *Fertility in high-producing dair cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement*. Soc Reprod Fert 64:237-254
147. Lyon C. (2010): *Update on the Diagnosis and Management of Neospora caninum Infections in Dogs*. Top Companion Anim Med 25: 170-175
148. Mack DG, Mc Leod R. (1984): *New micromethod to study the effect of antimicrobial agents on Toxoplasma gondii: comparison of sulfadoxine and sulfadiazine individually and in combination with pyrimethamine and study of clindamycin, metronidazole, and cyclosporin A*. Antimicrob Agents Chemother 26(1): 26-30
149. 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
150. Mansourian M, Khodakaram-Tafti A, Namavari M. (2009): *Histopathological and clinical investigations in Neospora caninum experimentally infected broiler chicken embryonated eggs*. Vet Parasitol 166, 185–190
151. Marks J, Lundén 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(7):303-9
152. Marsh AE, Howe DK, Wang G, Barr BC, Cannon N, Conrad PA (1999): *Differentiation of Neospora hughesi from Neospora caninum based on their immune dominant surface antigen, SAG1 and SRS2*. Int J Parasitol. 29(10):1575-82)
153. Marsh, AE, Barr BC, Packham AE, Conrad PA. 1998. *Description of a new Neospora species (Protozoa:Apicomplexa: Sarcocystidae)*. J Parasitol 84:983–991
154. Mayhew IG, Smith KC, Dubey JP. (1991): *Treatment of encephalomyelitis due to Neospora caninum in a litter of puppies*. J Small Anim Pract 32: 609-12

155. McAllister M, Dubey JP, Lindsay D. (1998): *Dogs are definitive hosts of Neospora caninum*. Int J Parasitol. 28:1473–1478
156. McAllister MM, McGuire AM, Jolley WR, Lindsay DS, Trees AJ, Stobart RH. (1996): *Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring*. Vet Parasitol 33:647–655
157. McCann CM, McAllister MM, Gondim LFP, Smith RF, Cripps PJ, Kipar A, Williams DJL, 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
158. McCann. (2008): *Lack of Serologic Evidence of Neospora caninum in Humans, England*, Emerg Infect Di. 14, 6 14(6):978-80.
159. Miljković V. (1976): *Patologija reprodukcije goveda*. 111-265, u: Reprodukcijska i veštačko osemenjavanje goveda. Minerva, Subotica
160. Mineo TW, Carrasco AO, Marciano JA, Werther K, Pinto AA, Machado RZ. (2009): *Pigeons (Columba livia) are a suitable experimental model for Neospora caninum infection in birds*. Vet Parasitol 159:149–153
161. Mineo TW, Näslund AK, Montassier HJ, Björkman C. (2006): *Distribution of antibodies against Neospora caninum, BVBD and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders*. Rev Bras Parasitol Vet 15, 188-192
162. Министарство пољопривреде Републике Србије, Правилник о отврђивању програма мера здравствене заштите животиња за 2016. Годину, Службени гласник 25., страна 11
163. Mitrea IL, Enachescu V, Radulescu R, Ionita M. (2012): *Seroprevalence of Neospora caninum infection on dairy cattle in farms from southern Romania*. J Parasitol 2012 98:69-72
164. Moore DP, Campero CM, Odeon AC. (2002): *Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of Neospora caninum in Argentina*. Vet Parasitol. 107:303–316
165. Moore DP, Echaide I, Verna AE, Leunda MR, Cano A, Pereyra S, Zamorano PI, Odeón AC, Campero CM. (2011): *Immune response to Neospora caninum native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves*. Vet Parasitol 175, 245–251
166. Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Venturini MC, Venturin L. (2009): *Frequency of horizontal and vertical transmission for Sarcocystis cruzi and Neospora caninum in dairy cattle*. Vet Parasitol 160, 51–54

167. Morrissette NS, Murray JM, Roos DS. (1997): *Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite Toxoplasma gondii*. J Cell Sci 110 (1),35-42
168. Moskwa B, Gozdzik K, Bien J, Cabaj W. (2008): *Studies on Neospora caninum DNA detection in the oocytes and embryos collected from infected cows*. Vet. Parasitol. 158, 370–375
169. Muller J, Hemphill A. (2012): *In vitro culture systems for study of apicomplexan parasites in farm animals*. <http://dx.doi.org/10.1016>
170. Munhoz-Zanzi CA, Thurmond MC, Hietala SK. (2004): *Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy heifers*. Theriogenology 61:1085–1099
171. Munhoz AD, Pereira MJS, Flausino W, Lopes CWG. (2009): *Neospora caninum seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de Janeiro*. Pesq Vet Bras 29, 29–32
172. Neverauskas CE, Nasir A, Reichel MP. (2015): *Prevalence and distribution of Neospora caninum in water buffalo (Bubalus bubalis) and cattle in the Northern Territory of Australia*. Parasitol Int 64:392-396
173. Nichols BA, Chiappino ML, O'Connor GR. (1983): *Section from the rhoptries of Toxoplasma gondii during host-cell invasion*. J Ultrastruct Res 83:85-98
174. Nietfeld JC, Dubey JP, Anderson ML, Libal MC, Yaeger MJ, Neiger RD. (1992): *Neospora-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle*. of Vet Diag Investig 4, 223-226
175. Njiro SM. (2011): *A study of some infectious causes of reproductive disorders in cattle owned by resource-poor farmers in Gauteng Province, South Africa*. J S Afr Vet Assoc 82(4):213-218
176. Nogareda C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, BechSabat G, Pabón M, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida J.A, Yániz J, Almeria S. (2007): *Dynamics of anti-Neospora caninum antibodies during gestation in chronically infected dairy cows*. Vet Parasitol 148, 193–199
177. Oliveira K CC, Faturi C, Garcia AR, Nahúm BS, Lourenço Júnior JB, Joele MRSP. (2010): *Supplemental feeding for buffaloes with agroindustry by-products on silvopastoral system in Brazilian eastern Amazon*. Revista Veterinaria, 21 (Supl. 1): 802-804
178. Osoro K, Ortega-Mora LM, Martínez A, Serrano-Martínez E, Ferre I. (2009): *Natural breeding with bulls experimentally infected with Neospora caninum failed to induce seroconversion in dams*. Theriogenology 71, 639–642
179. O'Toole D, Jeffrey M. (1978): *Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf*. Vet Rec 1231: 563 – 566



180. Otranto D, Llazari A, Testini G, Traversa D, Frangipane di Regalbono A, Tranto 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
181. 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
182. 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
183. Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. (1998): *Seroepidemiologic study of Neospora caninum in dairy herds*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 1595–1598
184. Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1996. *Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calft hood mortality*. Can J Vet Res. 60(2): 133–139
185. Parish SM, Maag-Miller L, Besser TE, Weidner JP, Mc Elwain T, Knowles DP, Leathers CW. (1987): *Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves*. J Am Vet Med Assoc 191: 1599 – 1600
186. Paz GF, RC Leite, MA Rocha. (2007): *Associação entre sorologia para Neospora caninum e taxa de prenhez em vacas receptoras de embriões*. Arq Bras Med Vet Zootec 59, 1323-1325
187. Pedraza-Díaz S, Marugán-Hernández V, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Rojo-Montejo S, Gómez-Bautista M, OrtegaMora LM. (2009): *Microsatellite markers for the molecular characterization of Neospora caninum: application to clinical samples*. Vet. Parasitol. 166, 38–46
188. Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaló A, Pérez-Pérez V, EspiFelgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora L.M. 2003. *Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with Neospora caninum in Spain* Vet Parasitol 111,143-152
189. Peters M, Lutkefels E, Heckeróth AR, Schares G. (2001): *Immunohistochemical and ultrastructural evidence for Neospora caninum tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle*, Int J Parasitol 31(10), 1144-1148
190. Peters RH, Ball HJR, (1987): *Reproduction in cattle*. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd.,UK

191. Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Björkman C, Uggla A. (1999): *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerging infection disease* 5; 278-280
192. Pfeiffer DU, Williamson NB, Thornton RN. (1997): *A simple spreadsheet simulation model of the economic effects of Neospora caninum abortions in dairy cattle in New Zealand*. *Epidémiologie et santé animale*, 31-32
193. Pinheiro A M, Costa S L, Freire S M, Ribeiro C S, Tardy M, El-Bachá R S. (2010): *Neospora caninum: early immune response of rat mixed glial cultures after tachyzoites infection*. *Exp. Parasitol.* 124, 442–447
194. Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Tabare's E, Innes EA, Gonzalez-Paniello R., Ortega-Mora LM. (1999): *Seroprevalence of Neospora caninum infection in dairy and beef cattle in Spain*. *Int. J. Parasitol.* 29:1201–1208
195. Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Del Pozo I, Jiménez-Ruiz E, Aduriz G, Ortega-Mora LM. (2010b): *Influence of Neospora caninum intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model*. *Vet Res* 41, 52
196. Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Pereira-Bueno J, Aduriz G, Navarro-Lozano V, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Pedraza-Díaz S, Ortega-Mora LM, (2008): *Isolation and genetic characterization of Neospora caninum from asymptomatic calves in Spain*. *Parasitology* 135, 1651–1659
197. Regidor-Cerrillo J, Gomez-Bautista M, Sodupe I, Aduriz G, Álvarez Garcia G, Del P, Ortega-Mora ILM. (2011): *In vitro invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of Neospora caninum*. *Vet Res* 42, 41-48
198. Regidor-Cerrillo J, Pedraza-Diaz S, Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM. (2006): *Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in Neospora caninum* *J. Parasitol* 92, 517–524
199. Reichel MP. (2014): *Control options for Neospora caninum – is there anything new or are we going backwards*. *Parasitology* 141: 1455-1470
200. Reichel MP, Ellis JT. (2009): *Neospora caninum – how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle*. *Int J Parasitol* 39, 1173–1187
201. Reiterova K, Spilovska S, Antolova D, Dubinsky P. (2009): *Neospora caninum, potential cause of abortions in dairy cows: the current serological follow-up in Slovakia*. *Vet Parasitol* 159, 1–6

202. Rinaldi L, Fusco G, Musella V, Veneziano V, Guarino A, Taddei R, Cringoli G. (2005): *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. *Vet Parasitol* 128:219-30
203. Rinaldi L, Pacelli F, Iovane G, Pagnini U, Veneziano V, Fusco G, Cringoli G. (2007): *Survey of Neospora caninum and bovine herpes virus 1 coinfection in cattle*. *Parasitol Res* 100: 359-364
204. Rojo-Montejo S, Collantes-Fernandez E, Blanco-Murcia J, RodriguezBertos A, Risco-Castillo V, Ortega-Mora LM. (2009a): *Experimental infection with a low virulence isolate of Neospora caninum at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy*. *Vet Res* 40, e49
205. Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, ÁlvarezGarcía G, Marugan-Hernández V, Pedraza-Díaz S, Blanco-Murcia J, Prenafeta A, Ortega-Mora LM. (2009b): *Isolation and characterization of a bovine isolate of Neospora caninum with low virulence*. *Vet Parasitol* 159, 7–16
206. Rojo-Montejo S, Collantes-Fernandez E, Regidor-Cerrillo J, Rodriguez-Bertos A, Prenafeta A, Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM. (2011): *Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against Neospora caninum infection in mice*. *Vet Parasitol* 175, 220–229
207. Romero JJ, Van Breda S, 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
208. Romero-Salas D, García-Vázquez Z, Montiel-Palacios F, Montiel-Pena T, Aguilar-Domínguez M, Medina-Esparza L, Cruz-Vázquez C. (2010): *Seroprevalence of Neospora caninum antibodies in cattle in Veracruz, Mexico*. *J. Anim Vet Adv* 9, 1445–1451
209. Rosbottom A, Gibney EH, Guy CS, Kipar A, Smith RF, Kaiser P, Trees AJ, Williams DJL. (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
210. Rosbottom A, Gibney H, Kaiser P, Hartley C, Smith RF, Robinson R, Kipar A, Williams DJL. (2011): *Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with Neospora caninum*. *PLoS ONE* 6, e15799–e15800
211. Rosbottom A, Guy CS, Gibney EH, Smith RF, Valarcher JF, Taylor G, Williams DJL. (2007): *Peripheral immune responses in pregnant cattle following Neospora caninum infection*. *Parasite Immunol* 29, 219–228
212. Rosypal A, Lindsay D. (2005): *The sylvatic cycle of Neospora caninum: where do we go from here*. *Trends Parasitol* 21:439-40

213. Sadrebazzaz A, Habibi G, Haddadzadeh H, Ashrafi J. (2007): *Evaluation of bovine abortion associated with Neospora caninum by different diagnostic techniques in Mashhad, Iran*. Parasitol Res 100:1257–1260
214. Sager H1, Fischer I, Furrer K, Strasser M, Waldvogel A, Boerlin P, Audigé L, Gottstein BA. (2001): *Swiss case-control study to assess Neospora caninum-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology*. Vet Parasitol 102:1-15
215. 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, 1-2, 15-24
216. Santolaria P, Almería S, Martínez-Bello D, Nogareda C, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Pabón M, Yániz JL, López-Gatius F. (2011): *Different humoral mechanisms against Neospora caninum infection in purebred and crossbreed beef/dairy cattle pregnancies*. Vet Parasitol 178, 70–76
217. Santolaria P, López-Gatius F, Yániz J, García Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sabat G, Serrano B, Almeria S. (2009): *Early postabortion recovery of Neospora-infected lactating dairy cows*. Theriogenology 72, 798–802
218. Santos SL, de Souza Costa K, Gondim LQ, da Silva MSA, Uzêda RS, Abe-Sandes K, Gondim LFP. (2010): *Investigation of Neospora caninum, Hammondia sp., and Toxoplasma gondii in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil*. Parasitol Res 106, 457–461
219. Savović M, Lalošević V, Simin S, Pavičić LJ, Boboš S. (2012): *Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cows with reproductive disorders in Vojvodina province, Serbia*. Lucrări Științifice Medicină Veterinară, 45, 161–166
220. Schares G, Pantchev N, Barutzki D, Heydorn AO, Bauer C, Conraths FJ. (2005): *Oocysts of Neospora caninum, Hammondia heydorni, Toxoplasma gonadii and Hammondia hammondi in feces collected from dogs in Germany*. Int J Parasitol 35, 14, 1525-1537
221. Schares G, Peters M, Wurm R, Ba'rwald A, Conraths FJ. (1998). *The efficiency of vertical transmission of Neospora caninum in dairy cattle analyzed by serological techniques*. Vet Parasitol 80:87–98
222. Sheldon IM, Dobson H. (2003). *Reproductive challenges facing the cattle industry at the beginning of the 21<sup>st</sup> century*. Reprod. Suppl., 61:1-13
223. Schwab AE, Geary TG, Baillargeon P, Schwab AJ, Fecteau G. (2009): *Association of BoLA DRB3 and DQA1 alleles with susceptibility to Neospora caninum and reproductive outcome in Quebec Holstein cattle*. Vet. Parasitol. 165, 136–140

224. Scott HM, Sorensen O, Wu JTY, Chow EYW, Manninen K. (2007): *Seroprevalence of and agroecological risk factors for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Neospora caninum infection among adult beef cattle in cow-calf herds in Alberta, Canada*. Can. Vet. J. 48, 397–406
225. Serrano-Martínez E, Ferre I, Martínez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, DelPozo I, Adúriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM. (2007): *Experimental neosporosis in bulls, parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses*. Theriogenology 67, 1175–1184
226. Serrano B, Almería S, García Ispuerto I, Yániz JL, Abdelfattah-Hassan A, López-Gatius F. (2011): *Peripheral white blood cell counts throughout pregnancy in non-aborting Neospora caninum-seronegative and seropositive high-producing dairy cows in a Holstein Friesian herd*. Res Vet Sci 90, 457–462
227. Shabbir MZ, Nazir M, Lateef M, Shabbir MAB, Ahmad A, Rabbani M, Yaqub T, Sohail MU, Ijaz M, Maqbool A. (2011): *Seroprevalence of Neospora caninum and Brucella abortus among dairy cattle herds with high abortion rates*. J. Parasitol. 97:740-2
228. Silva DA, Lobato J., Mineo TW, Mineo JR. (2007): *Evaluation of serological tests for the diagnosis of Neospora caninum infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with Toxoplasma gondii* Vet Parasitol., 143, 234–244
229. Soares RM, Lopes EG, Keid LB, Sercundes MK, Martins J, Richtzenhain LJ. (2011): *Identification of Hammondia heydorni oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the H. heydorni RAPD fragment AP10*. Vet. Parasitol. 175, 168–172
230. Sonda S, Fuchs N, Gottstein B, Hemphill A. (2000): *Molecular characterization of a novel microneme antigen in Neospora caninum*. Molecular & Biochemical Parasitology, 108, 39–51
231. Sotiraki S, Brozos C, Samartzi F, Schares G, Kioussis E, Conraths FJ. (2008): *Neospora caninum infection in Greek dairy cattle herds detected by two antibody assays in individual milk samples*. Vet Parasitol 152, 79–84
232. Speer CA, Dubey JA, McAllister MM, Blixt JA. (1999): *Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of Neospora caninum and Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 29(10), 1509-19
233. Speer CA, Dubey JP. (1989): *Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of Neospora caninum*. J Protozool 36: 458-463
234. Sreeanan J, Diskin M. (1994): *Factors affectin herd conception rate*. Irish Farmers Journal, 46 (18) 30-31

235. Stančić B, Košarčić D. (2007): *Reprodukcija goveda* (monografija ). Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
236. Stančić B. (1989): *O pitanju trajanja servis perioda kod krava visoke mlečnosti* Savremena poljop. 37(3-4)171-183
237. Staska LM, Davies CJ, Brown WC, McGuire TC, Suarez CE, Park JY, Mathison BA, Abbott JR, Baszler TV. (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
238. Stivenson SJ, Britt HJ. (1977): *Detection of Estrus by Three Methods*. J. Dairy Sci., 60:1994-98
239. Strohbusch M, Muller N, Hemphill A, Krebber R, Greif G, Gottstein B. (2009): *Toltrazuril treatment of congenitally acquired Neospora caninum infection in newborn mice*. Parasitol Res 104, 1335–1343
240. Sun WW, Meng QF, Cong WZ, Shan XF, Wang CF, Qian AD. (2015): *Herd-level prevalence and associated risk factors for Toxoplasma gondii, Neospora caninum, Chlamydia abortus and bovine viral diarrhoea virus in commercial dairy and beef cattle in eastern, northern and northeastern China*. Parasitol Res 114:4211-8
241. Thacher WW, Bilby RT, Bartolome AJ, Silvestre F, Staples RC, Santos PEJ. (2006): *Strategies for improving fertility in the modern dairy cow*. Theriogenology, 65:30-44
242. Thornton RN, Thompson EJ, Dubey JP. (1991): *Neospora abortion in New Zealand cattle*. N Z Vet J 39:129-133
243. Thurmond MC, Hietala SK. (1996): *Culling associated with Neospora caninum infection in dairy cows*. Am J Vet Res. ;57:1559–1562
244. Thurmond MC, Hietala SK. (1997): *Effect of Neospora caninum infection on milk production in first-lactation dairy cows*. J Am Vet Med Assoc 210:672–674
245. Thurmond MC, Picanso JP, Jameson CM. (1990): *Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows*. J Am Vet Med Assoc 15;197(10):1305–1312
246. Tiwari A, Van Leeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Haddad JP, Tremblay R, Scott HM, Whiting T. (2007): *Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhoea, paratuberculosis, and neosporosis*. Journal of Dairy Sci 90, 659–669

247. Uzeda RS, Pinheiro AM, Fernández SY, Ayres MCC, Gondim LFP, Almeida MAO. (2007): *Seroprevalence of Neospora caninum in dairy goats from Bahia, Brazil* Small Ruminant Res., 70 pp. 257–259
248. Vaclavek P, Koudela B, Modry D, Sedlak K. (2003): *Seroprevalence of Neospora caninum in aborting dairy cattle in the Czech Republic*. Vet Parasitol 115, 239–245
249. VanLeeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Scott HM. (2010): *Risk factors associated with Neospora caninum seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds*. Prev Vet Med 93, 129–138
250. VanLeeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Scott HM. (2010a): *Risk factors associated with Neospora caninum seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds*. Prev Vet Med 93, 129–138
251. VanLeeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Tiwari A, Keefe GP, Stryhn H, Tremblay R. (2010b): *Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairy cows*. Prev Vet Med 94, 54–64
252. VanLeeuwen JA, Greenwood S, Clark F, Acorn A, Markham F, Mccar-Ron J, O’Handley R. (2011): *Monensin use against Neospora caninum challenge in dairy cattle*. Vet Parasitol 17, 372–376
253. Vianna MC, Sreekumar BC, Miska KB, Hill DE, Dubey JP. (2005): *Isolation of Neospora caninum from naturally infected white-tailed deer (Odocoileus virginianus)*. Vet Parasitol 129, 253–257
254. Vidić B, Grgić Ž, Savić S, Bugarski D. (2011): *Neospora caninum causes abortions in cows, Scientific Symposium “Reproduction of domestic animals”*, Naučna KMD, Belgrade, Divčibare, Serbia
255. Vonblumroder D, Schares G, Norton R. (2004). *Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of Neospora caninum infection in bovines*. Vet Parasitol 120:11–22
256. Vonlaufen N, Guetg N, Naguleswaran A, Müller N, Björkman C, Schares G. (2004): *In vitro induction of Neospora caninum bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites*. Infect Immun 72:576–83
257. Waldner CL. (2005): *Serological status for N. caninum, bovine viral diarrhoea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds*. Anim Reprod Sci 90 (3-4):219-42.,

258. Walker C. (1997): *Dairy Reference Manual (Third edition)*. Cooperative Extension, Ithaca, NY 14853-5701. Chapter 7, pp. 188-197
259. Wapenaar W, Barkema HW, O’Handley RM, Bartels CJM. (2007b): *Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in bulk milk to estimate the prevalence of Neospora caninum on dairy farms in Prince Edward Island, Canada*. *Can Vet J* 48, 493–499
260. Wapenaar W, Barkema HW, VanLeeuwen JA, McClure JT, O’Handley RM, Kwok OCH, Thulliez P, Dubey JP, Jenkins MC. (2007a): *Comparison of serological methods for the diagnosis of Neospora caninum infection in cattle*. *Vet Parasitol* 143, 166–173
261. Wattiaux AM. (2006): *Reproduction and Genetic Selection – Technical Dairy Guide*. University of Wisconsin, Madison, USA, publication: TDG-Rg-07295-E
262. Weston JFL, Heuer C, Parkinson TJ, Williamson NB. (2012): *Causes of abortion on New Zealand dairy farms with a history of abortion associated with Neospora caninum*. *N Z Vet J*. 60:27-34
263. Wiengcharoen J, Nokkaew W, Prasithpon S, Prasomtong P, Sukthana Y. (2012): *Neospora caninum and Toxoplasma gondii antibodies in captive elephants (Elephas maximus indicus) in Kanchanaburi Province Thai*. *J Vet Med* 42, 235–240
264. Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, 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* 121:347-58
265. Williams DJ, Guy CS, Smith RFJ, Ellis C, Björkman MP, Reichel and Trees A J. (2007): *Immunization of Cattle with Live Tachyzoites of Neospora caninum. Confers Protection against Fetal Death* *Infect Immun* 75:1343-1348
266. Williams DJL, 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



267. Woods LW, Anderson ML, Swift PK, Sverlow KW. (1994): *Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (Odocoileus hemionus columbianus)*. J. Vet. Diagn. Invest. 6, 508–510
268. Wouda W, Bartels CJM, Moen AR. (1999): *Characteristics of Neospora caninum-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995–1997)*. Theriogenology 52:233–245
269. Wouda W, Moen A. R, Visser IJR, van Knapen F. (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 organisms in brain, heart, and liver*. J Vet Diagn Invest 9:180-185
270. Yániz JL, López-Gatius F, García-Ispierto I, Bech-Sàbàt 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
271. Yamane I, Kitani H, Kokuho T, Shibahara T, Haritani M, Hamaoka T. (2000): *The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of Neospora caninum in primary bovine brain cells*. J. Vet. Med. Sci. 62, 347–351

## Б И О Г Р А Ф И Ј А

Кандидат Милан Н. Савовић је рођен 27.11.1966. године у Новом Саду. Основну школу је завршио у Буковцу, а средњу пољопривредну школу смер ветеринарски техничар у Футогу. Дипломирао је на Ветеринарском факултету у Београду 1994. године. Школске 2004/2005. године уписао је последипломске студије на Пољопривредном факултету у Новом Саду, Департман за сточарство.

Приправнички стаж започиње 10.07.1994. године у ЈВС „Нови Сад“, амбуланта Петроварадин, где ради до септембра 2002. године. Потом одлази у „Пољопривредну школу са домом ученика Футог“ у Футогу, на радно место наставника ветеринарске групе предмета, до 2004. године. Од септембра 2004 до септембра 2008. године ради у ЈВС „Нови Сад“, амбуланта Футог на место шефа ветеринарске амбуланта. Потом се запошљава у ветеринарској амбуланти „Кошарчић“, где ради до 13.01.2010. године, када са двојицом колега оснива Ветеринарску станицу „МСВ Медицус“ д.о.о. у Буковцу. Као сарадник за репродукцију говеда има уговор са центром за ВО у Темерину у периоду 2013 – 2014, а од 2015 године као сарадник за репродукцију има уговор са говедарском фармом „Бугућност“ у Бачкој Паланци.

До сада је као аутор и коаутор објавио 3 рада у међународним часописима и више радова и саопштења у домаћим часописима.

Ожењен је и отац је три кћери. Служи се енглеским језиком, а у свом раду користи персонални рачунар.