

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDĚCKÁ FAKULTA
LABORATOŘ RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ



**PROTILÁTKY PROTI *NEOSPORA CANINUM* A
TOXOPLASMA GONDII U PSŮ V ITÁLII**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce:

Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D.

Konzultant práce:

RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.

Vypracovala:

Andrea Kováčová

OLOMOUC 2015

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Andrea Kováčová
Název práce	Protilátky proti <i>Neospora caninum</i> a <i>Toxoplasma gondii</i> u psů v Itálii
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVHE, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat
Konzultant práce	RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p><i>Neospora caninum</i> a <i>Toxoplasma gondii</i> jsou podobné kokcidie, které mohou způsobit fatální infekci u psů. Pro psy je významnějším parazitem <i>N. caninum</i>, nicméně je nutné zabývat se oběma parazity, jelikož kočky jako definitivní hostitelé <i>T. gondii</i> vylučují oocysty do vnějšího prostředí a psi se s oblibou válí v kočičích výkalech. Psi tak mohou fungovat jako mechanický vektor pro přenos infekce na lidi či další zvířata. Cílem práce bylo detekovat protilátky proti <i>N. caninum</i> a <i>T. gondii</i> u loveckých psů z Itálie a stanovit rizikové faktory této infekce. Vzorky krve byly odebrány 398 loveckým psům pocházejícím ze 76 obcí dvou provincií Salerno a Avellino v jižní Itálii. Protilátky proti <i>N. caninum</i> a <i>T. gondii</i> byly pomocí nepřímého imunofluorescenčního testu (IFAT, cut-off titr 1:50) zjištěny u 59 (14,8 %) a 94 (23,6 %) psů, respektive. Protilátky proti oběma parazitům mělo 25 (26,3 %) psů. Výsledky sérologického vyšetření byly statisticky vyhodnoceny v závislosti na pohlaví, věku a jiných rizikových faktorech pomocí chí-kvadrát testu ($P \leq 0,05$). Vyšší prevalence <i>N. caninum</i> protilátek byla zjištěna u fenek (17,5 %) ve srovnání se psy (12,9 %). Prevalence <i>N. caninum</i> protilátek byla v rozmezí 10,1 % - 19,6 % v různých věkových kategoriích, 6,7 % - 29,4 % u</p>

různých plemen, 9,1 % - 15,6 % u různých velikostí psů, 11,7 % - 20 % u psů v závislosti na velikosti smečky a druhu lovené zvěře (0 % - 25 %). Vyšší prevalence *T. gondii* byla zjištěna u psů (26,3 %) ve srovnání s fenkami (19,9 %) a u psů, kteří žijí ve městě (66,7 %) ve srovnání se psy žijícími na venkově (23 %). Prevalence *T. gondii* protilátek byla v rozmezí 15,9 % - 33,3 % u různých věkových kategorií, 13,3 % - 28,6 % u různých plemen a 18,2 % - 24,4 % u různé velikosti psů. Rozdíl v prevalenci *T. gondii* byl zjištěn ve skupinách psů v závislosti na velikosti smečky (15,2 % - 27,9 %) i na druhu lovené zvěře (0 % - 45 %). Kontakt s ostatními zvířaty neměl žádný vliv na prevalenci. V případě psů pozitivních na protilátky *N. caninum* a *T. gondii*, byly klinické příznaky zjištěny u 6 (10,2 %) a 10 (10,6 %) psů. Na základě modelu logistické regrese, nebyla zjištěna závislost pozitivních výsledků serologického vyšetření a testovaných rizikových faktorů (hodnoty byly statisticky nevýznamné). Tato studie se jako první v Evropě zaměřuje na seroprevalenci *T. gondii* u loveckých psů, v případě *N. caninum* byl použit větší počet vzorků s porovnáním s předchozími studii.

Klíčová slova	Neosporóza, toxoplazmóza, sérologické vyšetření, protilátky, prevalence, rizikové faktory
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Andrea Kováčová
Title of thesis	Antibodies to <i>Neospora caninum</i> and <i>Toxoplasma gondii</i> in dogs from Italy
Type of thesis	Bakalářská
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Assoc. prof. DVM Eva Bártová, Ph.D., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, FVHE, Department of Biology and Wildlife Diseases
Consultant	RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p><i>Neospora caninum</i> and <i>Toxoplasma gondii</i> are similar coccidia, which can cause fatal infection in dogs. <i>N. caninum</i> is more important parasite for dogs, however, it is necessary to deal with both parasites, since cats as definitive hosts of <i>T. gondii</i> sheds oocysts in the environment and the dogs like to roll down in cat feces. Dogs can act as a mechanical vector to transmit infection to humans or other animals. The aim of this study was to detect antibodies against <i>N. caninum</i> and <i>T. gondii</i> in hunting dogs from Italy and to identify risk factors for this infection. Blood samples were taken from 398 hunting dogs originating from the 76 municipalities of two provinces Salerno and Avellino in southern Italy. Antibodies against <i>N. caninum</i> and <i>T. gondii</i> were detected by indirect immunofluorescence test (IFAT, the cut-off titer of 1:50) in 59 (14.8%) and 94 (23.6%) dogs, respectively. Antibodies against both the parasites were detected in 25 (26.3%) dogs. The results of serological examinations were statistically analyzed according to sex, age and other risk factors using the chi-square test ($P \leq 0.05$). The higher prevalence of <i>N. caninum</i> antibodies was found in females (17.5%) compared to male (12.9%). The prevalence of</p>

N. caninum antibodies was between 10.1% - 19.6% in different age categories, 6.7% - 29.4% in different breeds, 9.1% - 15.6% for different sizes of dogs, 11.7% - 20% for dogs, depending on the size and type of the pack hunted animals (0% - 25%). Higher prevalence of *T. gondii* was detected in males (26.3%) compared to females (19.9%) and dogs who live in the city (66.7%) compared to dogs who live in rural areas (23%). The prevalence of *T. gondii* antibodies were in the range of 15.9% - 33.3% for different ages, 13.3% - 28.6% in different breeds and 18.2% - 24.4% in dogs of different size. Difference in prevalence of *T. gondii* was detected in groups of dogs depending on the size of pack (15.2% - 27.9%) and the type of hunted animals (0% - 45%). Contact with other animals had no effect on prevalence. Dogs who were positive for antibodies against *N. caninum* and *T. gondii* have clinical signs observed in 6 (10.2%) and 10 (10.6%) dogs. Based on the logistic regression model, no correlation was found between positive samples and risk factors (values were statistically insignificant). This study is the first in Europe that focus on seroprevalence of *T. gondii* in hunting dogs; in the case of *N. caninum*, greater number of samples were used in comparison with previous studies.

Keywords	Neosporosis, toxoplasmosis, serological examination, antibodies, prevalence, risk factors
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci zpracovala samostatně a citovala jsem všechny použité zdroje.

V Olomouci dne 24. 4. 2015

.....
podpis autora textu

Děkuji paní doc. MVDr. Evě Bártové, Ph.D. za cenné rady, ochotu a pomoc při vypracování bakalářské práce, Dr. Vincenzo Veneziano za odběr a poskytnutí vzorků, Mgr. Tereze Machačové za sérologické vyšetření vzorků, Mgr. Anežce Gazárkové za výpomoc se statistickou analýzou, rodině a přátelům za podporu.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Životní cyklus <i>Neospora caninum</i>	7
2.2. Neosporóza u psů.....	9
2.3. Diagnostika <i>N. caninum</i>	13
2.4. Léčba a prevence neosporózy	15
2.5. Životní cyklus <i>Toxoplasma gondii</i>	16
2.6. Toxoplazmóza u psů	19
2.7. Diagnostika <i>T. gondii</i>	20
2.8. Léčba a prevence toxoplazmózy.....	23
3. PRAKTICKÁ ČÁST	25
3.1 Materiál - vzorky krve loveckých psů	25
3.2 Metody	26
3.2.1 Nepřímý imunofluorescenční test (IFAT).....	26
3.2.3 Statistická analýza	28
3.2. VÝSLEDKY	29
3.3.1 Seroprevalence <i>N. caninum</i> a <i>T. gondii</i>	29
3.3.2 Statistické vyhodnocení.....	36
4. DISKUZE	38
5. ZÁVĚR.....	41
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42

Seznam zkratk:

ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
cELISA	kompetitivní ELISA
CNS	centrální nervová soustava
CsA	cyklosporin A
CSF	mozkomíšní mok
DAT	přímý aglutinační test
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (enzymová imunoanalýza)
FITC	fluorescein isothiokyanát
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody test (nepřímý imunofluorescenční test)
IFR	komerčně dostupný <i>N. caninum</i> a <i>T. gondii</i> antigen
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IH-ISCOM	detergentem-extrahovaný antigen tachyzoitů začleněný do komplexních částic stimulující imunitu
iscom-ELISA	imunostimulační komplex enzymového imunisorbentního testu
KFR	komplement fixační reakce
LAT	latex aglutinační test
MAT	mikroaglutinační test
NAT	nepřímý antiglobulinový test
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (náhodně amplifikované polymorfní DNA)
r-ELISA	rekombinantní ELISA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
SFR	Sabin Feldman Reaction (Sabin Feldmanova reakce)
ssrRNA	single stranded ribosomální RNA
WT-IH	extrakt tachyzoitů

1. ÚVOD

Kokcidie psů byly dříve zařazeny do rodu *Isospora*, nyní jsou řazeny do odlišných rodů: *Neospora* a *Toxoplasma* (Dubey 2009). *Neospora caninum* a *Toxoplasma gondii* jsou podobné kokcidie, které mohou způsobit fatální infekci u psů (Dubey et al. 1988); jedná se o intracelulární obligátní parazity (Levine 1973).

T. gondii je střevní kokcidie koček s různými druhy mezipřehoditelů (Dubey and Beattie 1988; Dubey and Lappin in: Greene CE 2006; Dubey 2009); jedná se o zoonózu. Na rozdíl od jiných parazitických kokcidií se může přenášet fekálně-orální cestou, transplacentárně, případně u lidí i transfuzí tekutin nebo transplantací orgánů (Dubey 2004).

N. caninum se pod světelným mikroskopem morfologicky podobá *T. gondii* (Dubey et al. 1988; Dubey and Lindsay 1996; Dubey et al. 2002) a proto do roku 1988 byl parazit *N. caninum* mylně označován jako *T. gondii* (Dubey et al. 1988). První popis infekce způsobené *N. caninum* byl zaznamenán u psů v Norsku v roce 1984 (Bjerkås et al. 1984). V roce 1988 byl popsán jako nový rod a druh *Neospora caninum* (Dubey et al. 1988). Neosporóza je závažné onemocnění skotu a psů po celém světě. Domácí pes (*Canis familiaris*), kojot (*Canis latrans*), pes dingo (*Canis lupus dingo*), vlk (*Canis lupus*) a liška (*Vulpes vulpes*) jsou definitivními hostiteli *N. caninum* (McAllister et al. 1998; Gondium et al. 2004; Dubey et al. 2007; Jessica et al. 2010; Dubey et al. 2011). Pro psy je významnějším parazitem *N. caninum*, nicméně je nutné zabývat se oběma parazity, jelikož kočky jako definitivní hostitelé *T. gondii* vylučují oocysty do vnějšího prostředí a psi se s oblibou válí v kočičím trusu. Psi tak mohou fungovat jako mechanický vektor pro přenos infekce na lidi či další zvířata. V případě *N. caninum* byl zaznamenán intrauterinní přenos infekce po sobě jdoucích vrzích (Dubey et al. 2009). Neosporóza na rozdíl od toxoplazmózy není zoonóza, nicméně u lidí byly detekovány protilátky proti *N. caninum* (Dubey et al. 2007).

V Itálii existuje několik serologických studií u psů s prevalencí protilátek proti *N. caninum* 9,1 % - 20,9 % (Cringoli et al. 2002; Capelli et al. 2004; Paradies et al. 2007). Většinou se ale jednalo o různorodé skupiny psů s malým počtem vyšetřených vzorků.

Cílem práce bylo detekovat protilátky proti *Neospora caninum* a *Toxoplasma gondii* u loveckých psů z jižní Itálie a stanovit rizikové faktory (pohlaví, věk, velikost psů a psí smečky atd.) této infekce. Výsledky budou statisticky zpracovány a porovnány s výsledky z jiných podobných studií.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Životní cyklus *Neospora caninum*

Neospora caninum má široké spektrum hostitelů. Životní cyklus je tvořen třemi infekčními stádii: tachyzoity, bradyzoity uvnitř tkáňových cyst a sporozoity uvnitř oocyst (Obr. 1).

Tachyzoiti (typičtí pro akutní fázi) a tkáňové cysty (typické pro chronickou fázi) jsou zjišťováni intracelulárně v krvi či tkáních mezihostitelů (Dubey et al. 2002). Tachyzoiti mají oválný, poloměsíčitý nebo kulatý tvar a měří 3 až 7 μm × 1 až 5 μm v závislosti na stádiu dělení (Dubey et al. 1988; Bjerkås and Presthus 1989; Speer and Dubey 1989; Dubey 1993). Během akutní infekce pronikají tachyzoiti aktivní invazí do hostitelských buněk (Hemphill et al. 1996), kde se obvykle nachází v cytoplasmě obklopeni parazitoforní vakuolou (Dubey et al. 1988; Speer and Dubey 1989). Tachyzoiti se dělí endodyogenií a nacházejí se v nervových buňkách, makrofázích, fibroblastech, vaskulárních endoteliálních buňkách, renálních tubulárních myocytech, epiteliálních buňkách a hepatocytech (Bjerk and Presthus 1989; Speer and Dubey 1989; Dubey 1993; Dubey et al. 1998).

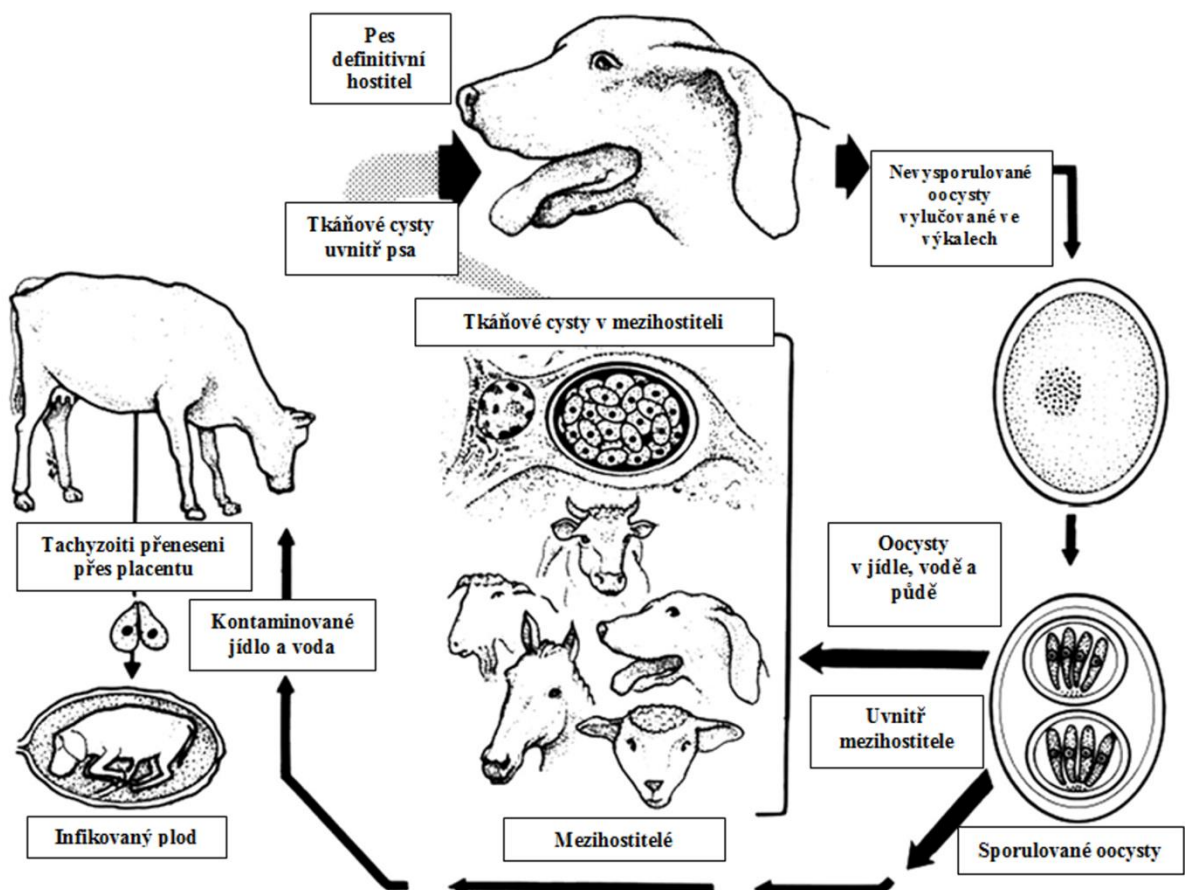
Tkáňové cysty jsou oválného tvaru, více než 107 μm dlouhé a byly zjištěny především v nervové tkáni (Dubey et al. 1988; Dubey et al. 1990), případně v očních svalech (Lindsay et al. 1996). Bradyzoiti v tkáňových cystách jsou odolní vůči roztoku pepsinu a HCl přítomných v žaludečních šťávách; může tak dojít k perorální infekci (Lindsay and Dubey 1990). Tkáňové cysty *N. caninum* mohou přežít 14 dnů při 4°C, ale po inkubaci při -20°C jeden den se stávají neinfekčními (Lindsay et al. 1992).

Oocysty *N. caninum* jsou v trusu definitivních hostitelů (McAllister et al. 1998; Lindsay et al. 1999; Gondim et al. 2004) vylučovány do vnějšího prostředí (Lindsay et al. 1999), kde sporulují za optimální teploty (20°C) a vlhkosti. Po sporulaci se oocysty stávají infekčními, obsahují dvě sporocysty, uvnitř kterých se nachází 4 sporozoity. Sporozoity mají rohlíčkovitý tvar a mohou přežít nepříznivé podmínky prostředí uvnitř oocyst po dobu několika měsíců i let. Po pozření oocyst, dochází ve střevě definitivního hostitele k uvolnění sporozoitů z oocyst a následně tvorbě schizontů nebo merontů. Během schizogonie nebo merogonie se sporozoitické jádro rozdělí. Každé jádro obklopené cytoplazmou, tvoří merozoity. Když infikovaná hostitelská buňka praskne, merozoiti jsou uvolňováni ze schizontu. Merozoiti první generace opakují nepohlavní cyklus a tvoří schizonty druhé

generace nebo se přemění v samčí (mikro) a samičí (makro) gamonty. Mikrogamonty se dělí do mnoha mikrogamet. Mikrogameta oplodní makrogametu a kolem zygoty se vytvoří stěna oocysty (Dubey et al. 2007).

Všechna tři vývojová stádia *N. caninum* se podílí na přenosu infekce. Šelmy se většinou nakazí pozřením kořisti, jejichž tkáň obsahuje tkáňové cysty *N. caninum*, zatímco hlavním zdrojem infekce pro býložravce je potrava a voda kontaminovaná vysporulovanými oocysty *N. caninum*. Transplacentární infekce může nastat, když se tachyzoiti přenášejí z infikované placenty na plod během březosti (Dubey et al. 2007). Transplacentární infekce byla experimentálně vyvolaná u psů (Dubey and Lindsay 1990; Cole et al. 1995), koček (Dubey and Lindsay 1989), ovcí (Dubey and Lindsay 1990; McAlister et al. 1996), skotu (Dubey et al. 1992; Barr et al. 1994) a myši (Cole et al. 1995; Lond and Baszler 1996). K transplacentární infekci může opakovaně dojít i u stejného zvířete (Bjerkts et al. 1984; Dubey et al. 1988; Barr et al. 1993).

Obr. 1: Životní cyklus *N. caninum* (Dubey 1999).



2.2. Neosporóza u psů

Seroprevalence klinicky zdravých psů je obvykle mnohem menší než 20 %, ale vyšší než prevalence klinického onemocnění, což naznačuje, že se jedná o subklinický průběh infekce (Lindsay and Dubey 2000). K přenosu infekce u psů může dojít perorálně, parentálně (experimentálně), ale rovněž transplacentárně cestou, což může být hlavní cesta přirozených infekcí. K transplacentárnímu přenosu infekce na plod může dojít u chronicky infikované březí feny během parazitémie. Infikovaná placenta může být zdrojem infekce i pro další vrhy. Experimentální studie naznačují, že *N. caninum* může způsobit předčasné odumírání plodu, mumifikaci a vstřebání plodu nebo narození slabých mláďat. Přestože je abort významným rysem tohoto onemocnění u skotu, neexistují žádné zprávy o abortech u psů (Dubey et al. 2007). Štěňata se mohou rodit s klinickými příznaky, nebo jsou zdravá a k reaktivaci infekce dojde až v pozdějším věku většinou ve spojitosti s imunosupresivním onemocněním, vakcinací živými viry nebo podáváním glukokortikoidů. Postnatální infekce bývají ovšem častější než infekce způsobené transplacentárním přenosem (Dubey et al. 2009).

Klinické příznaky u neosporózy jsou srovnatelné s klinickými příznaky u toxoplazmózy, nicméně v případě neosporózy převládají neurologické problémy a svalové slabosti až paralýzy. Mohou být postižené různé orgány játra, plíce, myokard, ale i další tkáně a orgány. Závažný průběh infekce (paralýza končetin) bývá zaznamenán především u mladých psů (< 6 měsíců). První příznaky mohou být zaznamenány již ve věku 3 - 9 týdnů. Pro neosporózu je typická postupná svalová atrofie a tuhost, obvykle vzestupná paralýza, mohou se vyvinout i kloubní deformace. Neosporóza může být letální; pokud psi přežijí, zůstávají ochrnutí s příslušnými komplikacemi. U starších psů je průběh infekce mírnější, mají příznaky multifokálního postižení CNS a polymyozitidu, myokarditidu, dermatitidu nebo zápal plic.

V Evropě se prevalence *N. caninum* u psů pohybuje mezi 0,5 % - 28,9 % v různých zemích (Dubey et al. 2007). V tabulce 1 a grafu (obr. 2) jsou přehledně shrnuty seroprevalence protilátek proti *N. caninum* u psů v jednotlivých zemích Evropy (Dubey et al. 2007). Prevalence *N. caninum* u psů žijících na venkově byla většinou vyšší než u psů žijících ve městech.

Tabulka 1: Seroprevalence protilátek proti *N. caninum* u psů v Evropě (Dubey et al. 2007).

Země	Kraj	Typ	Celkový počet psů	Positivní (%)	Test	Cut-off	Citace
Belgie	-	Z mléčné farmy	56	46,4	cELISA	VMRD	Lasri et al. 2004
Česká republika	-	-	80	1,3	cELISA	IH- ISCOM	Koudela et al. 1998
Dánsko	-	Domácí	98	15,3	IFAT	1:160	Rasmussen and Jensen 1996
Francie	-	Z mléčné farmy	22	22,7	IFAT	1:100	Pitel et al. 2001
Maďarsko	-	Venkovský	249	6,0	IFAT	1:80	Hornok et al. 2006
Německo	-	Klinika	200	13,0	IFAT	1:50	Klein and Müller 2001
Nizozemsko	-	Městský	344	5,5	cELISA	WT-IH	Wouda et al. 1999
Rakousko	-	Venkovský	433	5,3	IFAT	1:50	Wanha et al. 2005
Rumunsko	Cluj Napoca	Toulavý	56	12,5	IFAT	-	Suteu et al. 2005
Španělsko	Katalánsko	Domácí	139	12,2	IFAT	1:50	Ortuño et al. 2002
Švédsko	-	Domácí	398	0,5	cELISA	IH- ISCOM	Björkman et al. 1994
Švýcarsko	-	Domácí	1077	7,3	cELISA	WT-IH	Sager et al. 2006
	-	Městský	381	2,1	IFAT	1:50	Wanha et al. 2005
	-	Neznámý	956	3,3	IFAT	1:50	Wanha et al. 2005
	-	Klinika	84	18,4	cELISA	VMRD	Lasri et al. 2004
	-	Nemocný	71	22,2	cELISA	VMRD	Lasri et al. 2004
	Antverpy	Náhodný	100	11,0	IFAT	1:50	Barber et al. 1997
	Ghent	Klinika	100	11,0	IFAT	1:50	Barber et al. 1997
	Ghent	Náhodný	100	12,0	IFAT	1:50	Barber et al. 1997
	-	-	858	4,9	IFAT	1:50	Václavěk et al. 2007

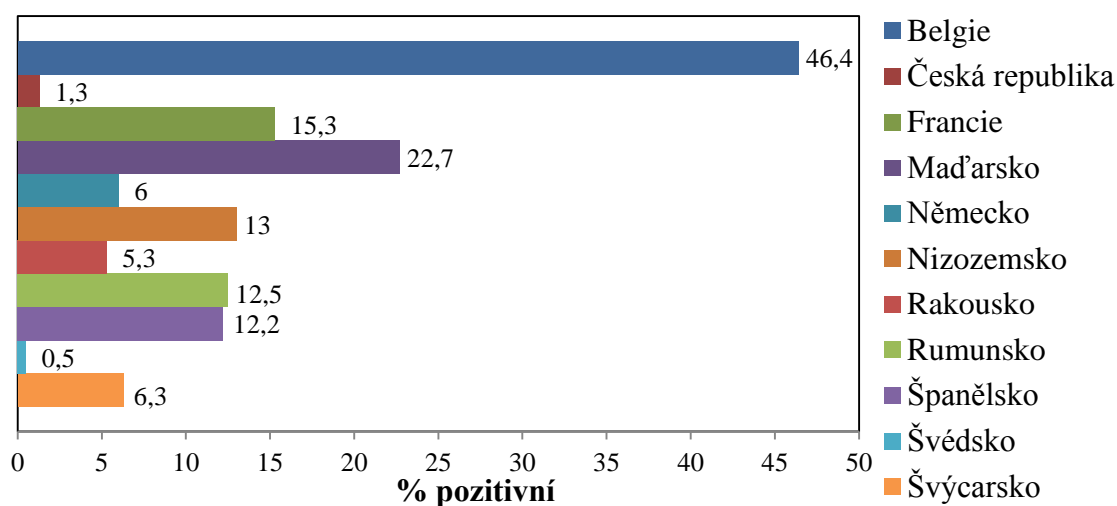
-	-	50	4,0	IFAT	1:50	Klein and Müller 2001
-	Městský	402	1,0	IFAT	1:80	Hornok et al. 2006
-	Farmářský	152	23,6	cELISA	WT-IH	Wouda et al. 1999
-	Z mléčné farmy	30	20,0	cELISA	WT-IH	Sager et al. 2006

Vysvětlivky:

IFAT – nepřímý imunofluorescenční test, cELISA - kompetitivní ELISA (enzymová imunoanalýza), VMRD-běžně dostupný antigen; IH-ISCOM – použit detergentem-extrahovaný antigen tachyzoitů začleněný do komplexních částic stimulující imunitu, WT-IH – použit celý extrakt tachyzoitů.

Pozitivní (%) – provedeno podmíněné formátování, čím intenzivnější červená barva, tím vyšší % pozitivních.

Obr. 2: Seroprevalence protilátek proti *N. caninum* u psů v evropských zemích

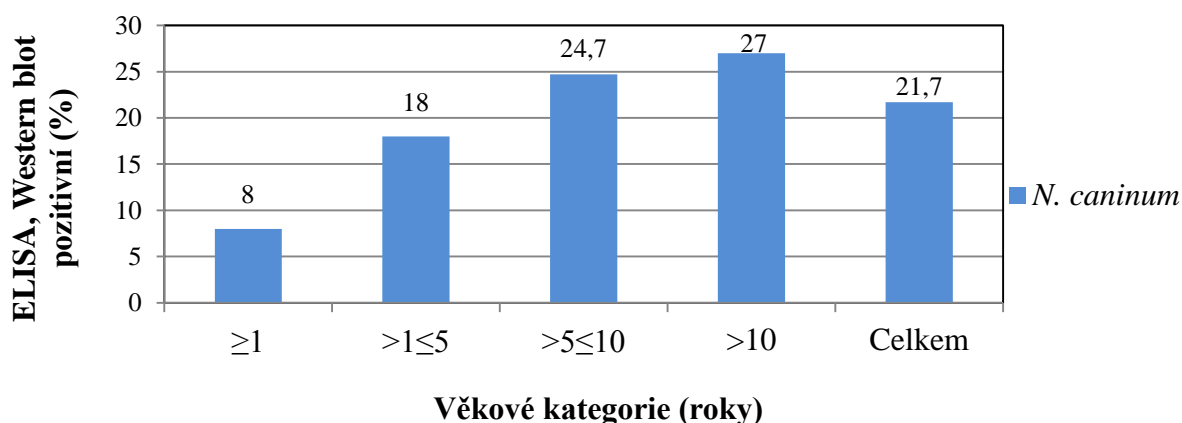


Goździk et al. (2011) vyšetřil sérologicky metodami ELISA a Western blot analýzy 257 psů v městské části centrálního Polska. Protilátky proti *N. caninum* byly detekovány v 56 sérech (21,7 %). Statisticky významný rozdíl byl zjištěn v prevalenci u fenek (28 %, 30/107) a u psů (17,3 %, 26/150). Prevalence protilátek v rámci věkových skupin se pohybovala mezi 8 % až 27 %, nicméně bez statisticky významného rozdílu (tabulka 2). ELISA a Western blot pozitivní výsledky v závislosti na věkových skupinách byly vyneseny do grafu (obr. 3) Z celkem 56 seropozitivních psů, mělo pouze 12 z nich klinické příznaky typické pro neosporózu, což naznačuje, že většina infekcí se vyskytuje v subklinické formě (Goździk et al. 2011).

Tabulka 2: Prevalence protilátek proti *N. caninum* u psů různých věkových skupin (Goździk et al. 2011).

Věk (roky)	Počet sér vyšetřených psů	Počet pozitivních (ELISA, Western blot)	Prevalence (%)
≥ 1	25	2	8,0
> 1 ≤ 5	77	14	18,0
> 5 ≤ 10	85	21	24,7
> 10	70	56	27,0
Celkem	257	56	21,7

Obr. 3: Graf závislosti ELISA a Western blot pozitivních výsledků na věkových kategoriích psů



Prevalence protilátek (21,7 %) u psů v Polsku je mnohem vyšší než prevalence u psů z evropských zemí, jako je např. Švédsko 0,5 % (Björkman et al. 1994b), Maďarsko 1 % (Hornok et al. 2006), Rakousko 2,1 % (Wanha et al. 2005), Česká republika 2,6 % (Václavek et al. 2007) nebo Španělsko 2,9 % (Collantes-Fernandez et al. 2008). Prevalence srovnatelné s výsledky v centrálním Polsku byly zjištěny u psů v severozápadní Itálii (20,2 %), (Ferroglia et al. 2007), v Katalánsku na severovýchodě Španělska (12,2 %), (Ortuno et al. 2002), v Dánsku (15,3 %), (Rasmussen and Jensen 1996), a v jihozápadním Polsku (15 %), (Płoneczka and Mazurkiewicz 2008).

2.3. Diagnostika *N. caninum*

Hematologie a biochemie

Hematologické a biochemické nálezy jsou variabilní, v závislosti na systémovém orgánovém postižení. Hladiny kreatinkinázy a aspartátaminotranferázy (AST) jsou při svalovém onemocnění zvýšeny. Sérové hodnoty alaninaminotranferázy (ALT) a alkalické fosfatázy se zvyšují u psů, kteří mají zánět jater. Abnormální hodnoty mozkomíšního moku (CSF) zahrnovaly mírné zvýšení koncentrace bílkovin (> 20 , avšak < 150 mg/dl) a jaderných buněk (> 10 , avšak < 100 buněk/dl). Klesá rozdíl leukocytů včetně lymfocytů, monocytů a makrofágů, neutrofilů a eozinofilů. Výsledky CSF mohou být u některých psů v hodnotách referenčních mezí. Elektromyografické hodnoty sestávají ze spontánní aktivity potenciálů síni, pozitivní ostré vlny a občasné opakovaného výboje. U psů s myositidou mohou být nalezeny evokované akční potenciály (Dubey et al. 2009).

Sérologické metody

Prokázané sérové protilátky IgG a IgM proti *N. caninum* mohou potvrdit diagnózu neosporózy. IgG protilátky (typické pro chronickou infekci) se objeví většinou 1 - 2 týdny po infekci. Existuje několik sérologických metod k detekci protilátek *N. caninum*: ELISA – enzymová imunoanalýza, cELISA – kompetitivní enzymová imunoanalýza, iscom-ELISA – imunostimulační komplex enzymové imunoanalýzy, r-ELISA – rekombinantní ELISA, IFAT – nepřímý imunofluorescenční test, MAT – mikroaglutinační test, NAT – nepřímý antiglobulinový test (Dubey et al. 1988; Björkman et al. 1994; Dubey et al. 2007). IFAT využívá reakci mezi protilátkami v séru s antigenem (tachyzoity *N. caninum*) a následný průkaz reakce v imunofluorescenčním mikroskopu. Titry ≥ 50 se považují za pozitivní, avšak hodnoty bývají obvykle vyšší. Vyšší titry byly zjištěny u klinicky postižených psů, nicméně neexistuje žádný vztah mezi velikostí titru a klinickými příznaky. Někdy bývají zjištěny falešně pozitivní výsledky u psů, kteří byli infikováni, ale zůstávají bez klinických příznaků. Přímý aglutinační test k detekci IgG protilátek je rovněž citlivý a specifický a lze jej využít k diagnostice u různých druhů hostitelů.

Imunohistochemie a mikroskopie

N. caninum může být detekována v CSF nebo tkáňových aspirátech a biopsiích. Když je *N. caninum* detekována, biopsie postiženého svalu může určit definitivní diagnózu. Tachyzoiti *N. caninum* jsou pod světelným mikroskopem podobní tachyzoitům *T. gondii*. Tkáňové cysty *N. caninum* mají silnější stěny než ty u *T. gondii*. Strukturní rozdíly mohou být

také detekovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Cysty *T. gondii* mají tenčí stěny a méně mikronemů a rhoptrií.

Flotační metody

Detekce oocyst *N. caninum* v psím trusu je obtížná. Tyto oocysty jsou malé a morfologicky se podobají oocystám *T. gondii*, *Hammondia hammondi* a *Hammondia heydorni* z nichž všechny mohou být přítomny v psích výkalech (McAllister et al. 1998; Dubey et al. 2002; Slapeta et al. 2002; Sreekumar et al. 2003; Schares et al. 2008; Monteiro et al. 2008). Rozlišení kokcidií těchto 4 druhů v psích výkalech je technicky obtížné (Dubey et al. 2009).

Metody molekulární biologie

Použití metod molekulární biologie, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR) slouží k přímé detekci *N. caninum* v tkáních zvířat a k odlišení od dalších podobných parazitů (Dubey et al. 2009). Molekulární charakterizace *N. caninum* se zaměřuje především na taxonomii a vývoj PCR diagnostických testů. Analýza malé podjednotky ribozomální RNA (ssrRNA) sekvence *N. caninum* a *T. gondii* prokazuje rozdíly ve čtyřech nukleotidech mezi těmito dvěma parazity (Marsh et al. 1995). Vzhledem k blízké homologní sekvenci mezi 16s rRNA geny *T. gondii* a *N. caninum*, bylo navrženo, že *N. caninum* by měla být umístěna do rodu *Toxoplasma* (Ellis et al. 1994; Holmdahl et al. 1994). Guo and Johnson (1995) zjistili pomocí RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) významné DNA polymorfismy mezi rody *Neospora*, *Toxoplasma* a *Sarcocystis* a dospěli k závěru, že *N. caninum* je odlišný druh. Brindley et al. (1993) zjistili, že homology tří dominantních *T. gondii* B1, P22 a P30 genů chybí u *N. caninum*. Informace získané na základě analýzy DNA *N. caninum* mají využití pro diagnózu neosporózy (Kaufmann et al. 1996). Nevýhodou PCR metody, která využívá 16S RNA geny, je možná křížová reaktivita s jinými organismy, protože se jedná o vysoce konzervativní eukaryotický proteinový gen. Riziko křížové reaktivity je možné minimalizovat výběrem vhodných primerů. Ačkoliv Lally et al. (1996) a Yamage et al. (1996) byli schopni detekovat *N. caninum* DNA v infikované mozkové tkáni a Ho et al. (1996) detekovali *N. caninum* v infikované plodové vodě, problém detekce *N. caninum* DNA v autolyzovaných tkáních nebyl dosud vyřešen.

PCR s využitím sekvence ITS-1 *N. caninum* (Holmdahl and Mattsson 1996; Payne and Ellis 1996) je vysoce specifická a citlivá. Holmdahl a Mattsson (1996) detekovali pomocí PCR *N. caninum* v mozku, játrech a plicích z experimentálně infikovaných zvířat. Tato PCR byla také úspěšně použita pro detekci *N. caninum* v tělních tekutinách a tkáních

experimentálně infikovaných ovcí (Holmdahl 1996). Payne a Ellis (1996) detekovali *N. caninum* ve tkáních fixovaných formalínem (Ellis 1996).

Biologický pokus, izolace

K izolaci a kultivaci *N. caninum* je možné využít buněčné kultury (CV-1 buňky, kmen NC-1, HCT-8 buňky) nebo laboratorní myši (Dubey et al. 1988; Dubey et al. 2002). Myši s oslabenou imunitou byly použity k izolaci *N. caninum* a pro výrobu tkáňových cyst (McGuire et al. 1997; Yamane et al. 1998; Dubey et al. 1998), avšak imunokompetentní laboratorní myši jsou vůči infekci rezistentní. Naproti tomu, pískomilové (*Meriones unguiculatus*) jsou více citliví k infekci *N. caninum* a to i bez předchozí imunosuprese. Cuddon et al. (1992) izoloval *N. caninum* ze psa s využitím pískomilů. Gondim et al. (1999) použili pískomily k namnožení *N. caninum* pro následnou peritoneální infekci psů. Dubey and Lindsay (2000) prokázali, že pískomilové jsou vysoce citliví k perorální infekci pomocí oocyst *N. caninum*.

V několika případech byla diagnóza neosporózy potvrzena izolací *N. caninum* z tkání postižených psů (Hay et al. 1990; Cuddon et al. 1992; Barber et al. 1995; Dubey et al. 1988). Izolát NC-1, původně získán z nervových tkání paralyzovaného psa (Dubey et al. 1988), je používán jako zdroj antigenu pro sérologickou diagnózu neosporózy. Kromě psích izolátů, bylo několik dalších izolátů *N. caninum* získáno z infikovaného skotu (Conrad et al. 1993; Stenlund et al. 1997; Yamane et al. 1997) a koní (Marsh et al. 1996).

2.4. Léčba a prevence neosporózy

Informace o účinné léčbě neosporózy jsou omezené (Dubey and Lappin in: Greene 2006; Jones and Dubey 2009). Neexistuje žádná vakcína (Dubey et al. 2009), nicméně k léčbě neosporózy se využívá klindamycin, sulfadiazin a pyrimethamin samostatně nebo v kombinaci (Dubey and Lappin 2006). Starší štěňata (> 16 týdnů) a dospělí psi reagují na léčbu lépe. U dospělých psů s akutní paralýzou motorického nervu je léčba účinná na začátku, v případě postupujícího ochrnutí není léčba již moc účinná.

U psů může být *N. caninum* opakovaně přenášena na potomstvo intrauterinním přenosem a to v několika po sobě jdoucích vrzích. Neexistuje žádná známá léčba, která by zabránila přenosu infekce na její mláďata. Tuto skutečnost je třeba vzít v úvahu při plánování chovu fenek, které mají protilátky proti *N. caninum* a s infekcí se již setkaly. Pro snížení

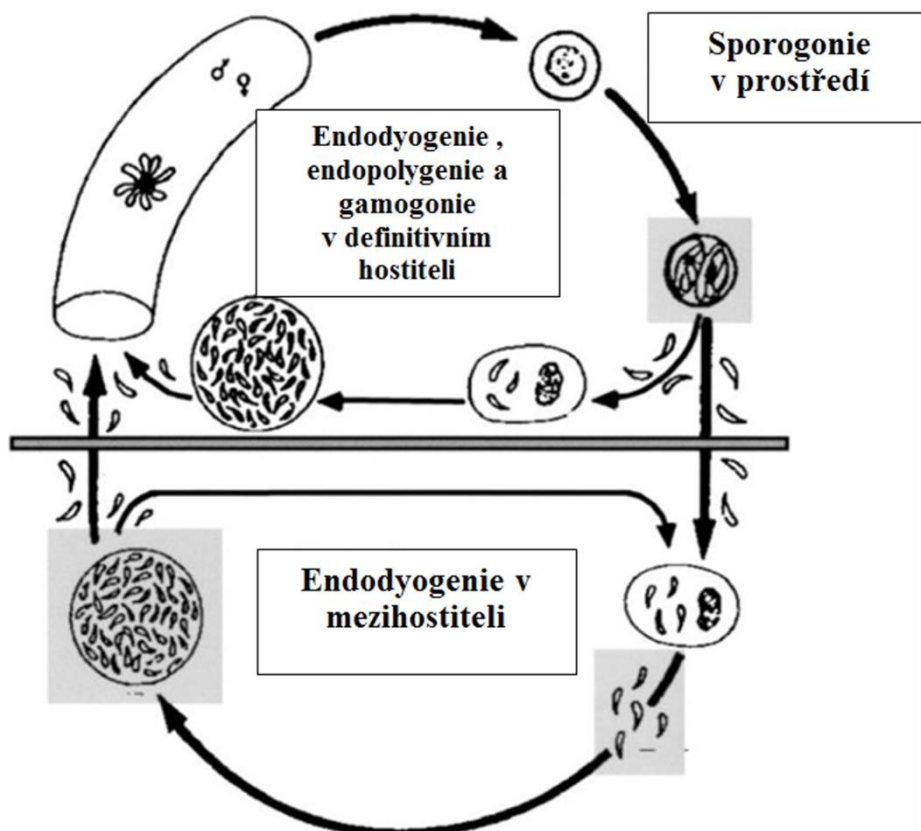
rizika onemocnění by měli být léčeni všichni psi v postiženém vrhu, jakmile je neosporóza v daném vrhu diagnostikována (Dubey et al. 2005; Dubey and Knickman 2005; Dubey et al. 2007).

Jako prevence je vhodné nekrmit psy tepelně neupraveným masem, zejména hovězím.

2.5. Životní cyklus *Toxoplasma gondii*

T. gondii je všudypřítomný parazit, který se vykytuje v mnoha oblastech světa. Je schopen infikovat velké spektrum hostitelů a hostitelských buněk (Levine 1961; Dubey and Beattie 1988; Dubey et al. 1998). Životní cyklus *T. gondii* je fakultativně heteroxenní (Obr. 4).

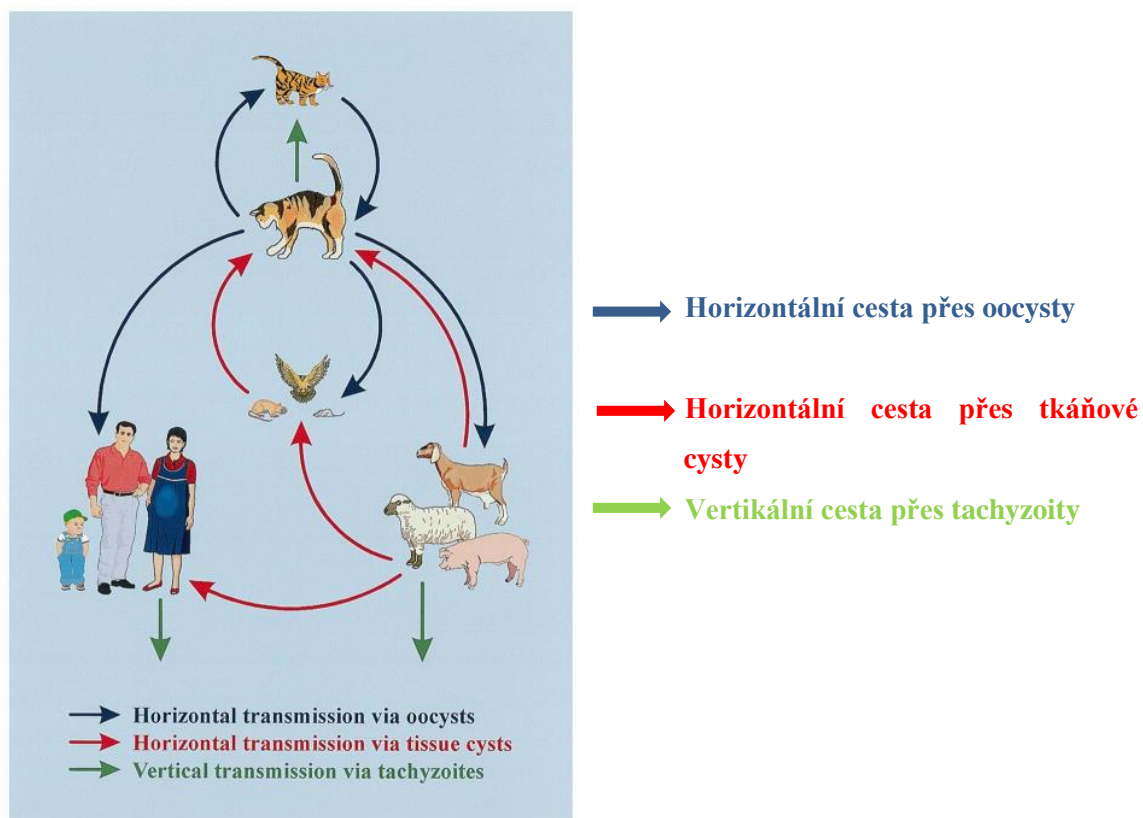
Obr. 4: Životní cyklus *T. gondii* (Rommel 1989).



Existují tři infekční stádia *T. gondii*, tj. tachyzoiti, bradyzoiti obsažené v tkáňových cystách a sporozoiti obsažené v oocystách. Všechny tři fáze jsou infekční pro mezihostitele a definitivního hostitele. Definitivním hostitelem *T. gondii* jsou zástupci čeledi kočkovitých šelem, například domácí kočky (Dubey and Beattie 1988; Boothroyd and Sibley 1993; Dubey in: Kreier 1993; Frenkel in: Ambroise Thomas and Petersen 2000). Mezihostitelem mohou být všechna teplokrevná zvířata včetně domácích, volně žijících a zoo zvířat a rovněž člověk (Dubey 2004). V mezihostiteli prochází *T. gondii* dvěma fázemi nepohlavního vývoje. V první fázi se tachyzoiti (nebo endozoiti) rychle množí opakovanou endodyogonií v různých typech hostitelských buněk. Tachyzoiti poslední generace zahájí druhou fázi vývoje, což vede k tvorbě tkáňových cyst. V tkáňových cystách se bradyzoiti (nebo cystozoiti) dělí pomalu endodyogonií (Dubey and Beattie 1988; Jackson and Hutchison 1989; Evans in: Ho-Yen and Joss 1992; Dubey in: Kreier 1993; Dubey et al. 1998). Tkáňové cysty jsou terminální fází životního cyklu v mezihostiteli a jsou okamžitě infekční. U některých druhů mezihostitelů mohou přetrvávat po celou dobu života hostitele. V definitivním hostiteli dojde k uvolnění bradyzoitů z tkáňových cyst a ty iniciují další nepohlavní fázi proliferace, která se skládá z počátečního množení endodyogonií a následnou opakovanou endopolygenií v epitelálních buňkách tenkého střeva. Terminální stádium tohoto nepohlavního množení zahajuje pohlavní fázi životního cyklu. Gametogonie a tvorba oocyst probíhá v epitelu tenkého střeva koček. Nevysporulované oocysty jsou uvolňovány ze střevního lumen a jsou trusem vylučovány do vnějšího prostředí. Ke sporulaci oocyst dochází ve vnějším prostředí, vznikají infekční oocysty, které obsahují dvě sporocysty, z nichž každá obsahuje čtyři sporozoity (Dubey and Beattie 1988; Jackson and Hutchison 1989; Evans in: Ho-Yen and Joss 1992; Dubey in: Kreier 1993; Dubey et al. 1998). Sporozoiti mohou přežít nepříznivé podmínky prostředí uvnitř oocyst po dobu několika měsíců až let (Dubey 2004).

K infekci parazitem *T. gondii* dochází různými způsoby (Obr. 5):

Obr. 5: Cesty přenosu infekce *T. gondii* (Tenter et al. 2000).



K infekci může dojít horizontálně požitím infekčních oocyst z prostředí nebo pozřením tkáňových cyst *T. gondii* obsažených v syrovém nebo nedostatečně tepelně upraveném mase nebo vnitřnostech mezihostitelů, dále vertikálně při transplacentálním přenosu tachyzoitů *T. gondii* (Dubey and Beattie 1988; Jackson and Hutchison 1989; Remington and Desmonts in: Remington and Klein 1990; Dubey 1991; Evans R in: Ho-Yen and Joss 1992; Dubey in: Kreier 1993; Dubey et al. 1998). *T. gondii* může být tedy přenášena od definitivních hostitelů k mezihostitelům, od mezihostitelů k definitivním hostitelům a stejně tak může být přenášena mezi konečnými hostiteli a mezi mezihostiteli (Obr. 5). V současné době není známo, která z těchto cest přenosu je epidemiologicky nejvýznamnější (Tenter et al. 2000).

2.6. Toxoplazmóza u psů

Typ a závažnost klinického onemocnění toxoplazmózy u psů závisí na mnoha faktorech, jako je věk, pohlaví, kmen *T. gondii* a způsob infekce. Postnatálně získaná toxoplazmóza je obecně méně závažná než prenatální infekce. Současně probíhající onemocnění nebo imunoprese může způsobit, že je hostitel vnímavější, protože *T. gondii* je oportunní patogen. Klinická toxoplazmóza u psů je často spojena s psinkou nebo s jinými infekcemi jako je ehrlichioza nebo terapie glukokortikoidy (Dubey and Lappin 2006). Prevalence toxoplazmózy u psů se snížila s rutinním používáním vakcín proti psince.

Klinické nálezy bývají lokalizovány do dýchacích cest, neuromuskulárních nebo gastrointestinálních systémů nebo mohou probíhat jako generalizované onemocnění (Dubey and Beattie 1988; Dubey et al. 1989; Ehrensperger et al. 1989; van Ham 1991; Rhyan and Dubey 1992; Dubey and Lappin in: Greene 2006; Dubey et al. 2006; Dubey 2009). Generalizovaná toxoplazmóza se objevuje většinou u psů mladších jednoho roku a je charakterizována horečkou, dušností, průjemem a zvracením. K úhynům psů může dojít již během jednoho týdne, protože při závažném onemocnění bývají postiženými orgány plíce a játra. Postižení srdce probíhá většinou subklinicky, ačkoli arytmie a srdeční selhání se může vyvinout v nejvýznamnější nálezy zvláště u některých starších psů. Neurologická forma toxoplazmózy může trvat několik týdnů bez postihnutí dalších systémů. Příznaky závisí, zda se léze nachází v mozku, mozečku nebo v míše. K hlavním příznakům patří záchvaty, poruchy hlavových nervů, třes, ataxie, paréza nebo paralýza. Psi s myozitidou mohou zpočátku vykazovat abnormální chůzi a svalovou slabost nebo ztuhlost. Paraparéza a tetraparéza mohou rychle pokročit k poškození motorických nervů a k ochrnutí. Existuje jen několik zpráv o očních lézích spojených s toxoplazmózou u psů. Dále byly zaznamenány uveitida, iridocyklitida, epiteliální hyperplazie, neuritida očního nervu a keratokonjunktivitida. Závažná keratokonjunktivitida byla nedávno hlášena u psů na prodloužené kortikosteroidové terapii (Swinger et al. 2009).

Protilátky proti *T. gondii* byly detekovány v sérech psů po celém světě s rozdílnou prevalencí v různých oblastech (Dubey 2010). Seroprevalence se zvyšuje s věkem psů, je vyšší u psů z venkovských oblastí, u psů chovaných výhradně venku a u psů, kteří konzumují ptáky, drobné savce, maso, vnitřnosti a jídla vařená v domácnostech (Lopes et al. 2011). V Evropě byla nejvyšší prevalence 75 % zjištěna pomocí metody SFR (Sabin Feldmanova reakce) v Turecku (Aktas et al. 1998), zatímco nejnižší 5 % prevalence byla zjištěna metodou

cELISA u psů ve Švédsku (Lunden et al. 2002). V České republice byly protilátky proti *T. gondii* zjištěny metodou IFAT u 26 % (107/403) psů s nejnižší prevalencí u psů, kteří pobývají v domácnosti a jsou krmeni komerční stravou (Bártová and Sedlák 2012). V dřívějších studiích realizovaných u psů v České republice byla zjištěna prevalence 4 % - 58 % pomocí metod SFR nebo KFR (komplement fixační reakce). V Rakousku byly protilátky proti *T. gondii* zjištěny metodou IFAT u 26 % (63/242) vyšetřených psů (Wanha et al. 2004). V této studii byla seroprevalence protilátek proti *T. gondii* vyšší ve srovnání s *N. caninum*.

2.7. Diagnostika *T. gondii*

K diagnostice toxoplazmózy lze využít klinické příznaky, sérologické metody (detekce protilátek v krevním séru), cytologické a radiologické vyšetření, koprologické vyšetření (vyšetření trusu) apod. (Lappin et al. 1989; Dubey and Carpenter 1993; Sardinias et al. 1994; Brownlee and Sellon 2001; Little et al. 2005; Dubey and Lappin in: Greene 2006; Park et al. 2007; Dubey 2009).

Hematologie a biochemie

Rutinní hematologické a biochemické parametry mohou být u psů s akutní toxoplazmózou neobvyklé. Nejčastěji jsou zjišťovány neregenerativní anémie, neutrofilní leukocytóza, lymfocytóza, monocytóza a eozinofilie.

Biochemické abnormality během akutní fáze onemocnění zahrnují hypoproteinemii a hypoalbuminémii. Hyperglobulinemie byla zjištěna u některých koček s chronickou toxoplazmózou. Výrazné zvýšení alaninaminotranferázy (ALT) a aspartátaminotranferázy (AST) v séru bylo zaznamenáno u zvířat s akutní poruchou funkce jater a svalové nekrózy. U psů s nekrózou jater dochází ke zvýšení aktivity sérové alkalické fosfatázy, což se méně často vyskytuje u koček. V případě svalové nekrózy je také zvýšená hladina kreatinkinázy. Sérové hladiny bilirubinu byly zvýšeny u zvířat s akutní nekrózou jater, zejména u koček s cholangiohepatitidou nebo jaterní lipoidózou. Kočky nebo psi, kteří mají zánět slinivky břišní, mohou vykazovat zvýšené hladiny sérové amylázy a lipázy. Kočky často vykazují proteinurii a bilirubinurii. Kočky s pankreatitidou mohou mít sníženou sérovou hladinu celkového vápníku s normální koncentrací sérového albuminu.

Cytologie

Tachyzoiti mohou být detekováni v akutní fázi infekce v různých tkáních a tělních tekutinách pomocí cytologického vyšetření. Vzácně se vyskytují v krvi a mozkomíšním moku. Při podezření na kočičí toxoplazmózu nervového systému, hladiny proteinů mozkomíšního moku byly v referenčním rozmezí do maximálně 149 mg/dl a jaderných buněk bylo maximálně 28 buněk/ml. Převažují zde lymfocyty, ale může být nalezena i směs buněk.

Koprologické vyšetření

Navzdory vysoké prevalenci sérových protilátek u koček po celém světě, je prevalence oocyst *T. gondii* ve výkalech velmi nízká. Obecně méně než 1 % koček vylučuje oocysty *T. gondii* za 1 až 2 týdny od infekce (Jones and Dubey 2009). Detekce oocyst v trusu koček je obtížná, protože kočky jsou obvykle bez klinických příznaků (výjimkou může být průjem). K opakovanému vylučování oocyst dochází i ve vyšším věku při snížení imunity vlivem virových infekcí.

Ke koprologickému vyšetření trusu se využívá centrifugace s Sheather cukerným roztokem: Pět až deset gramů trusu se smísí s vodou a přefiltruje se přes gázu. Dva díly cukerného roztoku (500g cukru, 300 ml vody a 6,5 g roztavených krystalů fenolu) se smíchají s jedním dílem fekální suspenze a odstředí se v centrifuze. Oocysty jsou lehké a nachází se v horní tekuté fázi, odkud se odebere 1 - 2 kapky na mikroskopické sklíčko a pozoruje se při zvětšení 100x. Oocysty *T. gondii* jsou okolo jedné čtvrtiny velikosti oocyst *Isospora felis* a jedné osminy velikosti vajíček *Toxocara cati* (kočičí škrkavka).

Sérologické vyšetření

První sérologický test, který byl vyvinut pro prokázání protilátek proti *T. gondii*, byl Sabin-Feldmanův test (SFR), (Sabin and Feldman 1948). Na dlouhou dobu to byl považován za zlatý standard pro sérologii *T. gondii*. Test mohl být použit u různých hostitelských druhů, a nevyžadoval druhově specifické sekundární protilátky.

Mezi další serologické testy patří IFAT, DAT – přímý aglutinační test, MAT, ELISA, iscom-ELISA, KFR (Komplement fixační reakce) a LAT (latex aglutinační test). Infekční studie u různých hostitelů ukázaly, že IFAT vykazuje velmi malou zkříženou reaktivitu s jinými parazitickými kokciemi (Trees et al. 1993; Dubey et al. 1996).

Test DAT u *T. gondii* poprvé popsali v roce 1959 Fulton and Turk (1959), a dále rozvinuli Desmonts and Remington (1980). Od té doby byl jedním z nejpoužívanějších sérologických testů u zvířat i lidí; je komerčně dostupný jako testovací kit (Toxoscreen;

bioMérieux). Modifikovaný test (MAT) detekuje pouze IgG protilátky, protože specifické i nespecifické IgM jsou zničeny merkaptoethanolem, který je součástí testu. Citlivost a specifčnost je srovnatelná s tou v IFAT (Packham et al. 1998).

Principy ELISA testů jsou široce užívány pro detekci protilátek proti různým infekčním agens, včetně *T. gondii* a *N. caninum* (Harlow and Lane 1988). Oproti IFAT, má ELISA výhodu, že odečítání výsledků je více objektivní pomocí ELISA readeru a test lze snadno automatizovat. Proto je tato technika vhodná pro screening velkého počtu vzorků, například při séroprevalenčních studiích.

Při iscom-ELISA nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita *N. caninum* s *T. gondii*, nebo s jinými úzce souvisejícími prvky. Citlivost a specifčnost byla vypočtena porovnáním s IFAT, jakožto referenční metody (Björkman and Ugglå 1999).

Sérologické průzkumy ukazují, že infekce *T. gondii* převládají po celém světě. Přibližně 30 % psů a koček ve Spojených státech mají protilátky proti *T. gondii*. Séroprevalence se zvyšuje s věkem kočky a psa (Dubey et al. 2009).

Diagnostika klinické toxoplazmózy u psů a koček je založena na kombinaci klinických příznaků a výsledků sérologického vyšetření. Pro akutní infekci jsou typické vysoké titry protilátek IgM, naopak nárůst titrů protilátek IgG svědčí pro chronickou infekci (Dubey et al. 2009). Protilátky třídy IgM bývají detekovány v séru nebo komorové vodě koček klinicky nemocných nebo infikovaných imunodeficientním virem, ale ne u zdravých koček.

Metody molekulární biologie

K diagnostice lze využít single PCR, nested PCR případně i multiplex PCR s využitím vhodných primerů a následným vyhodnocením v agarózovém gelu pomocí elektroforézy. V multiplex PCR se nejčastěji využívají tyto markery: c22-8, c29-2, L358, PK1, SAG2 a Apico (Dubey et al. 2007; Su et al. 2006). Alelové typy izolátů *T. gondii* se stanovují na základě RFLP vzorů šesti referenčních kmenů včetně RH88, PTG, CTG, COUGAR, MAS a TgCatBr5 (Su et al. 2006). Tyto referenční kmeny nám umožňují zachytit všechny známé alely pro každý marker a identifikovat potenciální jedinečné alely v *T. gondii* izolátech (Dubey et al. 2007).

Izoláty *T. gondii* byly klasifikovány do tří genetických typů (I, II a III) na základě využití metody RFLP (Howe and Sibley 1995). Byly genotypizovány izoláty *T. gondii* z lidí (Darde et al. 1992; Howe et al. 1997; Honoré et al. 2000; Fuentes et al. 2001) i zvířat.

Biologický pokus, izolace na tkáňových kulturách

Možnost, že genotyp parazita ovlivňuje závažnost onemocnění u lidí je podporována rozdíly ve virulenci pozorovaných ve zvířecích experimentálních modelech (laboratorní myši BALB). Kmeny *T. gondii* typu II a III vedou k chronické infekci a tvorbě tkáňových cyst u myši, zatímco typ I je extrémně virulentní kmen, který je pro myši letální. U tohoto typu *T. gondii* je zvýšené riziko transplacentárního přenosu na plod a větší závažnost infekce při vývoji plodu (Howe and Sibley 1995).

2.8. Léčba a prevence toxoplazmózy

Cíl léčby je veden ke snížení vylučování oocyst infikovaných koček. Kočkám je nutné podávat kombinaci léků, aby se zkrátila doba vylučování oocyst. Na základě studií in vitro, byla prokázána účinnost antibiotik (klindamycin, sulfas, azithromycin a ponazuril), která jsou zároveň relativně bezpečná pro použití u koček. Kombinace klindamycin-hydrochloridu a trimethopromsulfonamidu se používá pro léčbu klinické toxoplazmózy u koček i psů. Klindamycin byl úspěšně použit k léčbě různých klinických příznaků jako je horečka, myositida, uveitida a nemoci CNS (Greene et al. 1985; Lappin et al. 1989; Falzone et al. 2008). Mezi vedlejší účinky klindamycinu patří gastrointestinální podráždění, průjemy a případné změny normální anaerobní flóry gastrointestinálního traktu (Greene et al. 1993; Jacobs et al. 1993). Azithromycin byl rovněž úspěšně použit u koček, ale optimální protokol není známý (Lappin, nepublikovaná data, 2009). Pyrimethamin kombinovaný se sulfathiaziny nebo azithromycinem je sice účinný pro léčbu lidské toxoplazmózy, ale vede často k toxické odezvě u koček (Dubey and Lappin 2006). U ponazurilu bylo prokázáno, že inhibuje *T. gondii* in vitro a byl vhodný pro léčbu toxoplazmózy u testovaných hlodavců (Mitchell et al. 2004; Mitchell et al. 2006). Tento lék byl podáván psovi s toxoplazmózou, který měl zánět spojivek; nemoc se znovu objevila po léčbě klindamycinem (Swinger et al. 2009). Někteří psi a kočky s onemocněním CNS vyžadují podpůrnou léčbu, jako jsou antikonvulziva.

Klinické příznaky nezasahující oči nebo CNS obvykle odezní během prvních dvou až tří dnů díky podávání klindamycinu nebo trimethopromu-sulfonamidů; oční forma toxoplazmózy a toxoplazmóza CNS reagují na terapii pomaleji. Pokud horečka nebo svalová hypertenze neklesne po třech dnech léčby, je třeba zvážit jiné příčiny. Opakování klinických příznaků může být častější u koček léčených po dobu kratší než čtyři týdny. Neexistuje žádný důkaz o tom, že nějaký lék může úplně zničit *T. gondii* v živočišných tkáních, takže se klinické onemocnění může objevit u infikovaných psů a koček opakovaně. Podávání

imunopresivních dávek cyklosporinu A (CsA) nebo glukokortikoidů je spojené s aktivací toxoplazmózy u některých koček. Špatnou prognózu mají kočky a psi s rozšířenou toxoplazmózou a to zejména ti, s oslabeným imunitním systémem (Nordquist et al. 2008).

Prevence toxoplazmózy zahrnuje opatření, jejichž cílem je snížit výskyt kočičích infekcí a následné vylučování oocyst *T. gondii* do životního prostředí. Kočata žijící venku jsou obvykle infikována krátce po tom, co jsou odstavena a začnou lovit. Zdrojem infekce je lov a konzumace mezihostitelů (drobní hlodavci, ptáci apod.) nebo pasivních přenašečů, jako jsou švábi a žížaly. Kočky by měly být krmeny suchým nebo tepelně konzervovaným kočičím krmivem. Prevalence kočičí toxoplazmózy byla zvýšena v zemích, kde jsou domácí zvířata krmena surovými masnými produkty, proto by maso používané ke krmení mělo být vždycky důkladně tepelně upraveno. Například zmrazení nebo γ -záření může usmrtit tkáňové cysty *T. gondii* bez vlivu na kvalitu masa. Kočkám by měl být rovněž zabráněn vstup do budov, kde jsou chovaná zvířata určena k produkci potravin nebo do míst, kde jsou skladovaná krmiva. V současné době neexistuje žádná vakcína, která by zabránila vylučování oocyst nebo vzniku klinického onemocnění (Dubey et al. 2009).

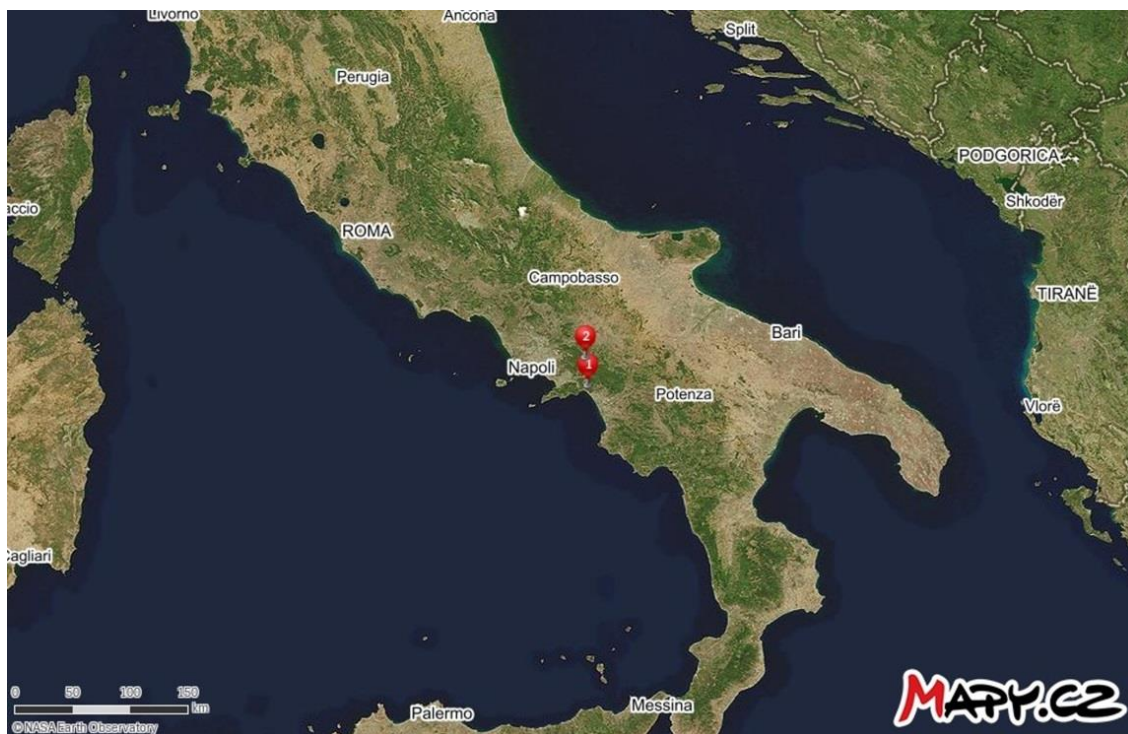
3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Materiál - vzorky krve loveckých psů

Během let 2013 - 2014 byly odebrány vzorky krve 398 loveckým psům pocházejících ze 76 obcí dvou provincií Salerno a Avellino v jižní Itálii (Obr. 6). Odběr vzorků zabezpečil MVDr. Vincenzo Veneziano, Department of Veterinary Medicine and Animal Production, University of Naples, Federico II, Naples, Itálie. Vzorky krve byly odebírány z krčních žil psů pomocí vakuové trubice bez antikoagulant. Krev byla centrifugována, sérum bylo zamrazeno na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Během odběru krve byly zjištěny údaje pro statistické zpracování výsledků, jako je: pohlaví, věk (od 5 měsíců do 14 let), plemeno (šest plemen zastoupeno min. 16 psy; ostatní plemena s menším počtem psů, byly seskupeny do kategorie ostatní), velikost psů v kohoutku (malé $\leq 39\text{ cm}$, střední $40 - 59\text{ cm}$ a velké $60 - 70\text{ cm}$), velikost psí smečky, místo, kde žijí (venkov a město), kontakt s ostatními domácími zvířaty a druh lovené zvěře. Tyto údaje byly získány prostřednictvím dotazníků s vlastníky psů (tabulka 3-11).

Obr. 6: Mapa dvou provincií v jižní Itálii – zvětšení 150 km (mapy.cz)



Vysvětlivky: Bod 1: Salerno, bod 2: Avellino

Obr. 7: Odběr vzorků krve od psů - Dr. Vincenzo Veneziano a jeho tým (Machačová).

3. 2 Metody

3. 2. 1 Nepřímý imunofluorescenční test (IFAT)

Přítomnost protilátek proti *N. caninum* a *T. gondii* byla detekována nepřímým imunofluorescenčním testem (IFAT). Jedná se o diagnostický test s přijatelnou citlivostí a specifíčností, který byl vyvinut pro detekci specifických protilátek proti *N. caninum* a *T. gondii*. Byl prvním sérologickým testem použitým k diagnostice neosporózy (Dubey et al. 1988) a v poslední době je ze všech sérologických technik nejvíce využíván k diagnostice infekce *N. caninum* (Conrad et al. 1993; Otter et al. 1997; Atkinson et al. 2000). IFAT je používán i jako referenční test pro jiné sérologické metody (Bjorkman and Uggla 1999). IFAT je založen na principu reakce protilátek a antigenu (tachyzoity fixované na mikroskopická sklíčka). Sklíčka se prohlíží v imunofluorescenčním mikroskopu. Výsledek IFAT se považuje za pozitivní, pokud je vidět fluorescence neporušené membrány tachyzoitů (Paré et al. 1995). V současnosti je komerčně dostupných několik IFAT souprav pro diagnostiku *N. caninum* (Björkman a Uggla 1999; Williams et al. 1999; Atkinson et al. 2000; Baszler et al. 2001; Reichel and Pfeiffer 2002).

Sérologické vyšetření bylo realizováno za použití komerčně dostupného *N. caninum* a *T. gondii* antigenu IFR (VMRD Pullman, USA), a anti-dog IgG konjugátu FITC (VMRD).

Séra byla ředěna fosfátovým pufovaným fyziologickým roztokem ve dvojkovém ředění začínající ředěním 1:50; titr 50 byl považován pro oba parazity za pozitivní.

Postup: Antigen *N. caninum* nebo *T. gondii* fixovaný na podložním sklíčku (obr. 7) byl překryt 15 μ l zkoumaného séra a inkubován ve vlhké komoře 30 minut při teplotě 37°C s následným promytím (2 x 10 min), sušením a přidáním 15 μ l specifického konjugátu. Potom se sklíčka inkubovaly 30 minut při 37°C ve vlhké komoře. Po promytí (2 x 10 min) a sušení, byla sklíčka překryta 80 % glycerolem (pH 7,4). Nátěry se přikryly krycím sklem a byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX 41; obr. 8) při zvětšení 1000 \times s olejovou imerzí. Kontinuální periferní fluorescence byla považována za specifickou (obr. 9). Byly použity pozitivní a negativní kontroly.

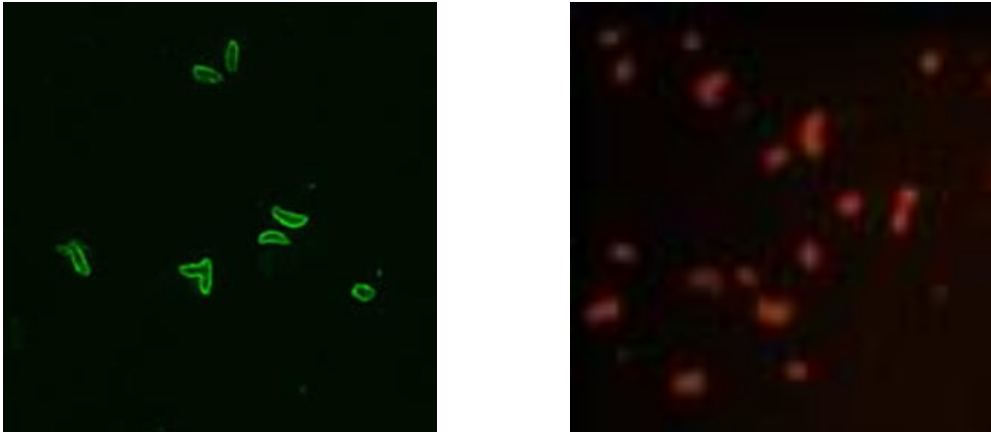
Obr. 7: IFAT substrátová podložní sklíčka *N. caninum* a *T. gondii* (Bártová).



Obr. 8: Fluorescenční mikroskop Olympus BX 41 (Labx.com).



Obr. 9: Pozitivní (vlevo - zelené) a negativní (vpravo - červené) výsledek IFAT v imunofluorescenčním mikroskopu (Bártová).



3. 2. 3 Statistická analýza

Výsledky sérologického vyšetření byly statisticky analyzovány, vzhledem k proměnné hodnotě pohlaví, věku, plemeni, velikosti psa, velikosti psí smečky, místě, kde žijí, kontaktu s jinými zvířaty a lovenou zvěří. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu JUMP 2011. JUMP je počítačový program, který se zaměřuje na explorační analýzu a vizualizaci dat.

Pomocí vícerozměrné analýzy bylo testováno, zda seroprevalence *T. gondii* a *N. caninum* závisí na pohlaví, věku a jiných rizikových faktorech. V chí-kvadrát testu byly rozdíly považovány za statisticky významné při $P \leq 0,05$. Psi ze skupiny s neznámými údaji nebyli zahrnuti do analýzy.

3.2. VÝSLEDKY

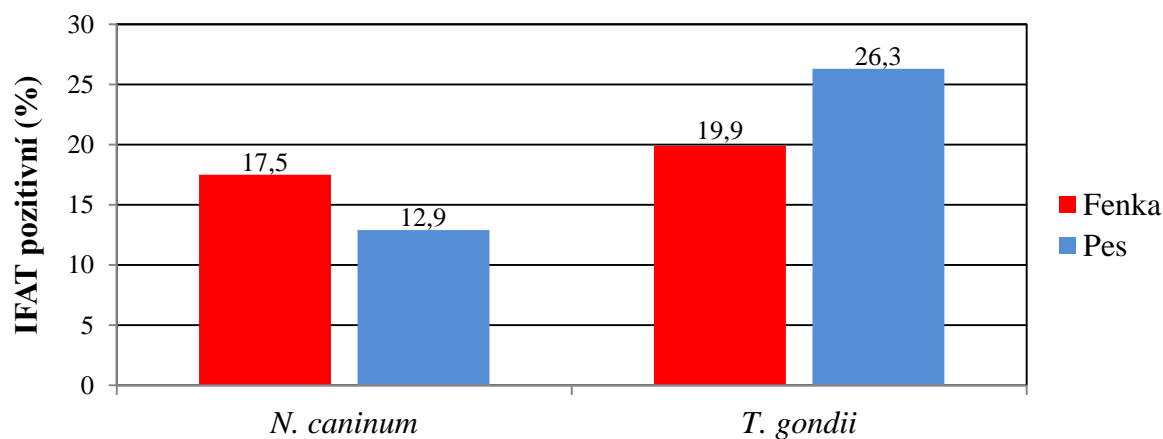
3.3.1 Seroprevalence *N. caninum* a *T. gondii*

Protilátky proti *N. caninum* a *T. gondii* byly zjištěny u 59 (14,8 %) a 94 (23,6 %) loveckých psů, respektive; 25 (26,3 %) psů mělo protilátky proti oběma parazitům. Výsledky seroprevalence v závislosti na různých charakteristikách jsou shrnuty v tabulkách 3 - 10. Pozitivní výsledky v IFAT v závislosti na rizikových faktorech jsou vyneseny do grafů (obr. 10 - 17).

Tabulka 3: Pohlaví psů a výsledky seroprevalence *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*.

Pohlaví	Testovaní psi	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
		IFAT pozitivní	IFAT pozitivní
Fenka	166	29 (17,5 %)	33 (19,9 %)
Pes	232	30 (12,9 %)	61 (26,3 %)

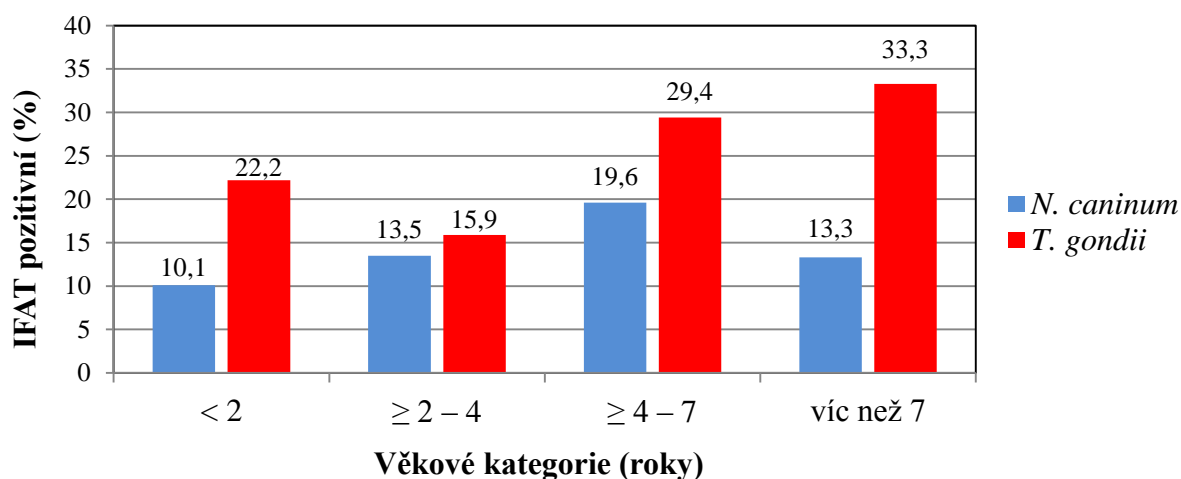
Obr. 10: Graf závislosti pozitivních výsledků v IFAT na pohlaví psů



Tabulka 4: Věkové kategorie a výsledky seroprevalence *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*.

Věkové kategorie (roky)	Testovaní psi	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
		IFAT pozitivní	IFAT pozitivní
< 2	99	10 (10,1 %)	22 (22,2 %)
≥ 2 – 4	126	17 (13,5 %)	20 (15,9 %)
≥ 4 – 7	143	28 (19,6%)	42 (29,4 %)
víc než 7	30	4 (13,3 %)	10 (33,3 %)

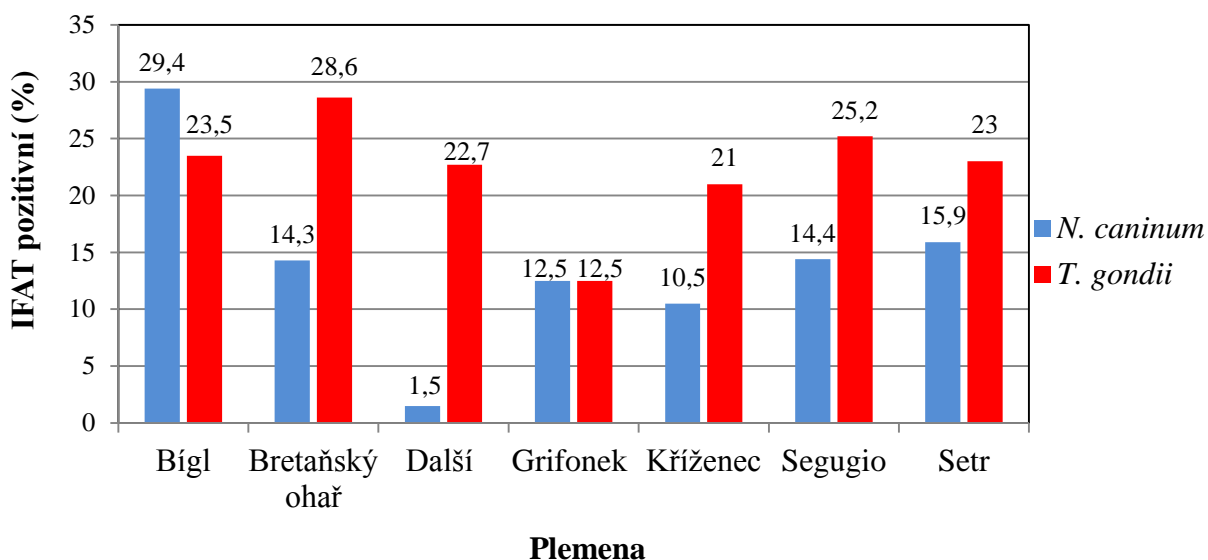
Obr. 11: Graf závislosti pozitivních výsledků v IFAT na věkových kategoriích



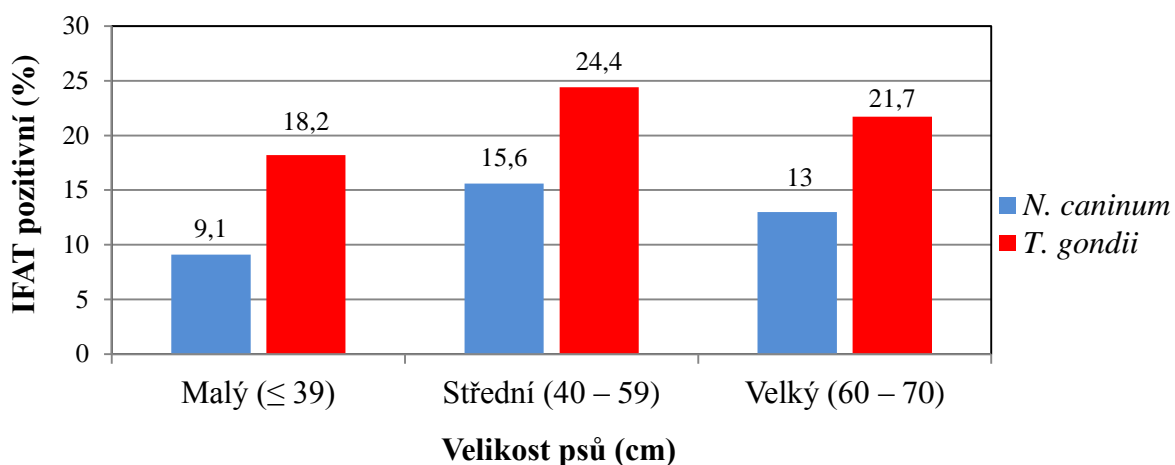
Tabulka 5: Plemena a výsledky seroprevalence *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*.

Plemeno	Testovaní psi	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
		IFAT pozitivní	IFAT pozitivní
Bígl	17	5 (29,4 %)	4 (23,5 %)
Bretaňský ohař	28	4 (14,3 %)	8 (28,6 %)
Grifonek	16	2 (12,5 %)	2 (12,5 %)
Kříženec	19	2 (10,5 %)	4 (21,0 %)
Segugio	139	20 (14,4 %)	35 (25,2 %)
Setr	113	18 (15,9 %)	26 (23,0 %)
Další*	66	1 (1,5%)	15 (22,7 %)

Další* - zahrnuje 19 plemen zastoupených menším počtem psů (Alpský jezevčíkovitý brakýř, Anglo-francouzský honič, Ariégois, border kolie, Briquet griffon, Briquet griffon vendéen, Drátosrstý ohař, Griffon Vendéen, italský ohař, italský spione, jezevčík hladkosrstý králíčí, kokršpaněl, Meticcio chrt, Meticcio segugio, ohař, Porcelaine, Segugio, Spione Livornese, špringeršpaněl).

Obr. 12: Graf závislosti pozitivních výsledků v IFAT na plemenech psů**Tabulka 6: Velikost psů a výsledky seroprevalence *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*.**

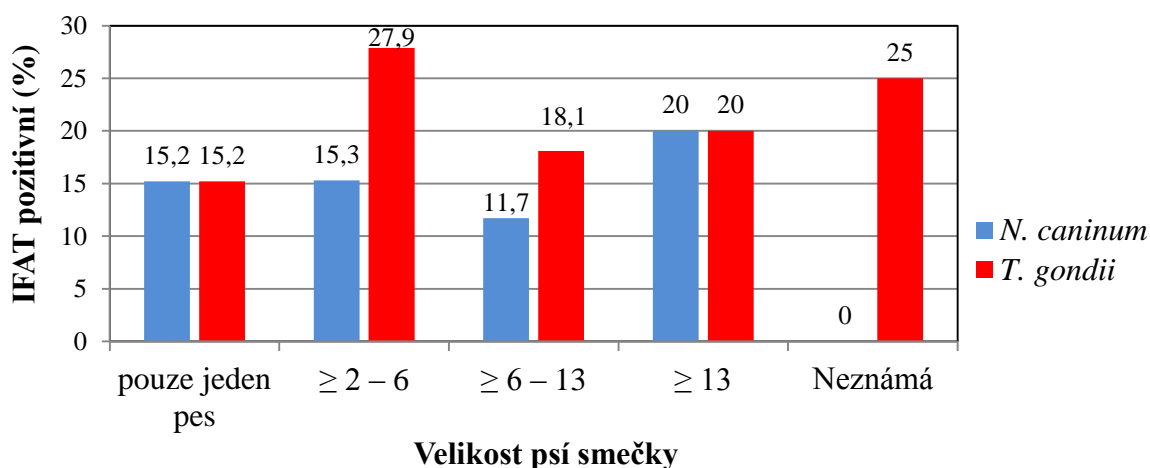
Velikost psa (cm)	Testovaní psi	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
		IFAT pozitivní	IFAT pozitivní
Malý (≤ 39)	11	1 (9,1 %)	2 (18,2 %)
Střední (40 – 59)	295	46 (15,6 %)	72 (24,4 %)
Velký (60 – 70)	92	12 (13,0 %)	20 (21,7 %)

Obr. 13: Graf závislosti pozitivních výsledků v IFAT na velikostech psů

Tabulka 7: Velikost psí smečky a výsledky seroprevalence *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*.

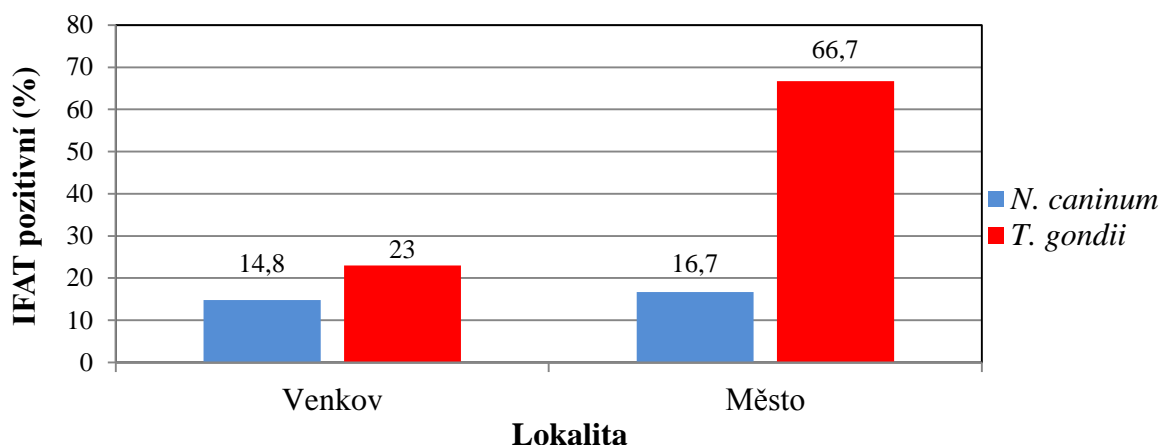
Velikost psí smečky	Testovaní psi	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
		IFAT pozitivní	IFAT pozitivní
pouze jeden pes	33	5 (15,2 %)	5 (15,2 %)
≥ 2 – 6	222	34 (15,3 %)	62 (27,9 %)
≥ 6 – 13	94	11 (11,7 %)	17 (18,1 %)
≥ 13	45	9 (20,0 %)	9 (20,0 %)
Neznámá	4	0 (0,0 %)	1 (25,0 %)

Obr. 14: Graf závislosti pozitivních výsledků v IFAT na velikosti psí smečky



Tabulka 8: Lokality, kde psi žijí a výsledky seroprevalence *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*.

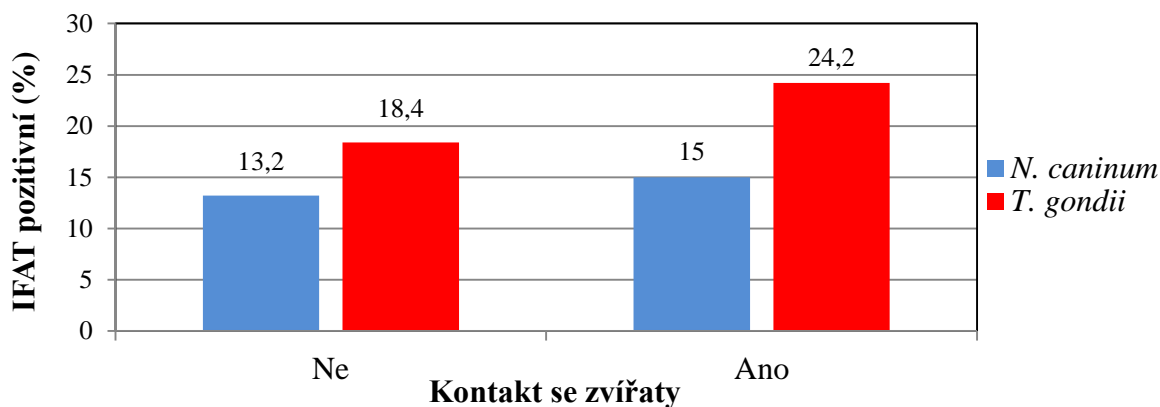
Lokalita	Testovaní psi	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
		IFAT pozitivní	IFAT pozitivní
Venkov	391	58 (14,8 %)	90 (23,0 %)
Město	6	1 (16,7 %)	4 (66,7 %)
Neznámá	1	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)

Obr. 15: Graf závislosti pozitivních výsledků v IFAT na lokalitě, kde psi žijí

V grafu nebyla uvedena lokalita Neznámá, jelikož hodnoty = 0%.

Tabulka 9: Kontakt s jinými domácími nebo hospodářskými zvířaty a výsledky seroprevalence *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*.

Kontakt s jinými domácími nebo hospodářskými zvířaty	Testovaní psi	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
		IFAT pozitivní	IFAT pozitivní
Ne	38	5 (13,2 %)	7 (18,4 %)
Ano	359	54 (15,0 %)	87 (24,2 %)
Neznámo	1	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)

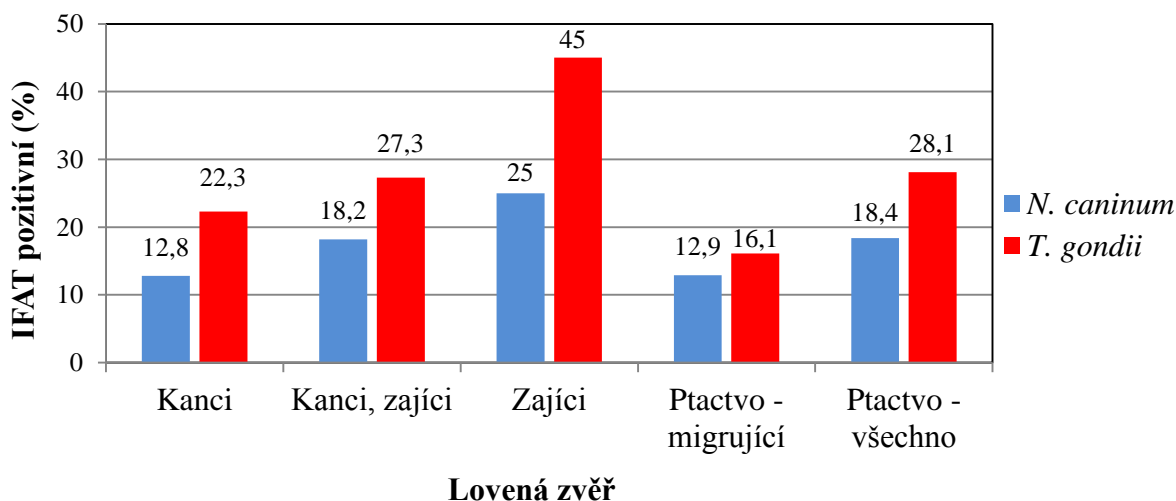
Obr. 16: Graf závislosti pozitivních výsledků v IFAT na kontaktu s jinými domácími nebo hospodářskými zvířaty

V grafu nebyla uvedena hodnota Neznámo, jelikož hodnoty = 0%.

Tabulka 10: Lovená zvěř a výsledky seroprevalence *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*.

Lovená zvířata	Testovaní psi	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
		IFAT pozitivní	IFAT pozitivní
Kanci	179	23 (12,8 %)	40 (22,3 %)
Kanci, zajíci	11	2 (18,2 %)	3 (27,3 %)
Kanci, lišky	6	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Kanci, zajíci, lišky	2	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Zajíci	20	5 (25,0 %)	9 (45,0 %)
Lišky	2	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Lovené ptactvo - migrující	62	8 (12,9%)	10 (16,1%)
Lovené ptactvo - nemigrující	1	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Lovené ptactvo - všechno	114	21 (18,4 %)	32 (28,1 %)
Neznámé	1	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)

Obr. 17: Graf závislosti pozitivních výsledků v IFAT na lovené zvěři



Vyšší prevalence *N. caninum* protilátek byla zjištěna u fenek (17,5 %) ve srovnání se psy (12,9 %). Prevalence *N. caninum* protilátek byla v rozmezí 10,1 % - 19,6 % v různých věkových kategoriích, 6,7 % - 29,4 % u různých plemen a 9,1 % - 15,6 % u různých velikostí psů. Rozdíl v prevalenci *N. caninum* byl nalezen ve skupinách psů v závislosti na velikosti smečky (11,7 % - 20 %), a druhu lovené zvěře (0 % - 25 %). Kontakt s ostatními domácími nebo hospodářskými zvířaty a výskyt psů ve venkovských či městských lokalitách neměl žádný vliv na prevalenci.

Naopak, vyšší prevalence *T. gondii* byla zjištěna u psů (26,3 %) ve srovnání s fenkami (19,9 %) a u psů, kteří žijí ve městě (66,7 %) ve srovnání se psy žijícími na venkově (23 %).

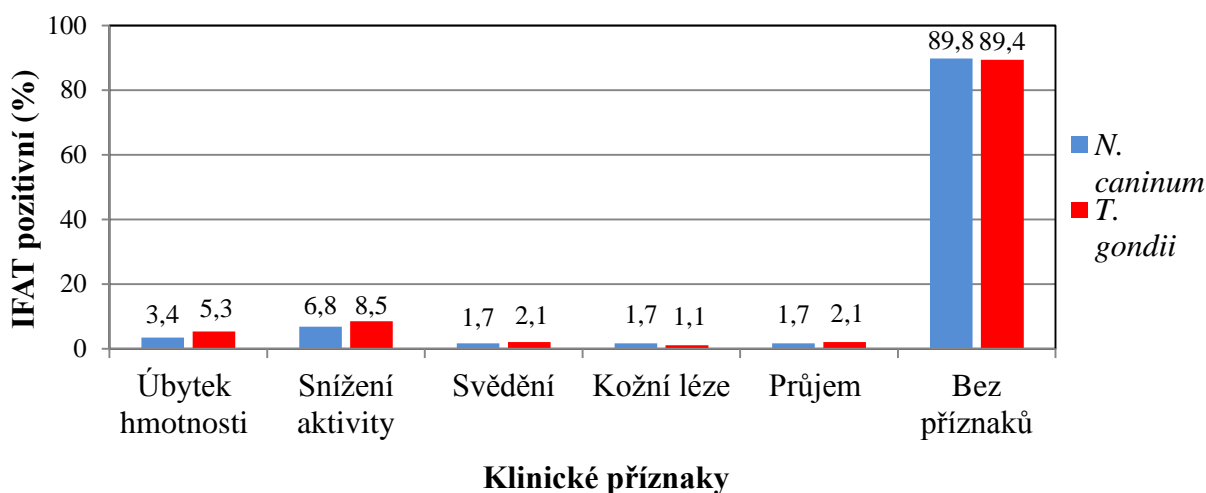
Prevalence *T. gondii* protilátek byla v rozmezí 15,9 % - 33,3 % u různých věkových kategorií, 13,3 % - 28,6 % u různých plemen a 18,2 % - 24,4 % u různé velikosti psů. Rozdíl v prevalenci *T. gondii* byl zjištěn ve skupinách psů v závislosti na velikosti smečky (15,2 % - 27,9 %) a i na druhu lovené zvěře (0 % - 45 %). Kontakt s ostatními domácími nebo hospodářskými zvířaty neměl žádný vliv na prevalenci.

Klinické příznaky byly zjištěny u 36 (9 %) psů. V případě psů pozitivních na protilátky *N. caninum* a *T. gondii*, byly klinické příznaky zjištěny u 6 (10,2 %) a 10 (10,6 %) psů. Mezi nejčastější klinické příznaky patřilo snížení aktivity (6,8 % pro *N. caninum* a 8,5 % pro *T. gondii*) a úbytek tělesné hmotnosti (5,1 % a 6,4 %, respektive). Další klinické příznaky (svědění, průjem a kožní léze) byly pozorovány pouze v několika málo případech (tabulka 11).

Tabulka 11: Klinické příznaky u psů pozitivních na protilátky *N. caninum* a *T. gondii* a souběžně probíhající infekce.

Souběžně probíhající infekce	<i>T. gondii</i> (n = 94)	<i>N. caninum</i> (n = 59)
Vlasovec	0 (0,0 %)	1 (1,7 %)
Anaplasma	8 (8,5 %)	4 (6,8 %)
Ehrlichia	12 (12,7 %)	3 (5,1 %)
Borelia	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Klinické příznaky		
Úbytek hmotnosti *	5 (5,3%)	2 (3,4%)
Snížení aktivity*	8 (8,5 %)	4 (6,8 %)
Svědění*	2 (2,1 %)	1 (1,7 %)
Kožní léze*	1 (1,1 %)	1 (1,7 %)
Průjem	2 (2,1 %)	1 (1,7 %)
Bez příznaků	84 (89,4 %)	53 (89,8 %)

* Souběžně probíhající infekce Anaplasma a Ehrlichia v jednom případě.

Obr. 18: Graf závislosti výsledků pozitivních v IFAT na klinických příznacích u psů

3.3.2 Statistické vyhodnocení

Výsledky sérologického vyšetření psů na protilátky proti *N. caninum* a *T. gondii* v závislosti na pohlaví, věku a jiných rizikových faktorech byly analyzovány pomocí chí-kvadrát testu ($P \leq 0,05$). Výpočty byly provedeny pomocí statistického programu JUMP 2011 (tabulka 12-13).

Tabulka 12: Výpočty statistické analýzy serologického vyšetření *N. caninum* vzhledem k rizikovým faktorům

Termín	Odhad	Standardní chyba	Chí-kvadrát	Pravděpodobnost > chí-kvadrát
Průsečík	5,5087	459,6090	0,0000	0,9904
Pohlaví	-0,1339	0,1665	0,6500	0,4214
Věk	-0,0865	0,0712	1,4800	0,2244
Plemeno - Bígl	-4,1298	459,6089	0,0000	0,9928
Plemeno - Bretaňský ohař	-3,1890	459,6089	0,0000	0,9945
Plemeno - Kříženec	13,3749	1838,4346	0,0000	0,9942
Plemeno - Segugio	-2,8789	459,6087	0,0000	0,9950
Velikost psí smečky	-0,1636	0,1480	1,2200	0,2690
Kontakt s jinými zvířaty	-0,1960	0,3311	0,3500	0,5540

Tabulka 13: Výsledky statistické analýzy serologického vyšetření *T. gondii* vzhledem k rizikovým faktorům

Termín	Odhad	Standardní chyba	Chí-kvadrát	Pravděpodobnost> chí-kvadrát
Průsečík	1,8242	0,5111	12,7400	0,0004*
Pohlaví	0,2027	0,1411	2,0600	0,1509
Věk	-0,0970	0,0596	2,6500	0,1035
Plemeno - Bígl	-0,0700	0,5128	0,0200	0,8914
Plemeno - Bretaňský ohař	-0,2559	0,4303	0,3500	0,5520
Plemeno - Kříženec	0,5104	0,6368	0,6400	0,4228
Plemeno - Segugio	-0,2015	0,2804	0,5200	0,4724
Velikost psí smečky	0,1581	0,1399	1,2800	0,2584
Kontakt s jinými zvířaty	0,2999	0,2921	1,0500	0,3047

*Oranžově zvýrazněná hodnota průsečíku v tabulce 13. značí bod, kdy regresní přímka protne osu Y.

Na základě modelu logistické regrese, nebyla zjištěna závislost pozitivních výsledků serologického vyšetření na přítomnost protilátek proti *N. caninum* a *T. gondii* a rizikových faktorů (hodnoty byly statisticky nevýznamné).

Při statistické analýze skupiny lovené zvěře vyšla velmi nízká závislost na tomto rizikovém faktoru, takže není ani uveden v tabulkách. V kategorii prostředí, ve kterém psi žijí, bylo pouze 5 psů z městské oblasti, takže tento rizikový faktor také nebylo možné statisticky vyhodnotit.

V kategoriích současně probíhajících nemocí a symptomů se nacházel velký nepoměr pozitivních a negativních výsledků, proto je nebylo možné statisticky vyhodnotit.

4. DISKUZE

Protilátky proti *N. caninum* a *T. gondii* byly detekovány u 14,8 % a 23,6 % loveckých psů. V Evropě existuje jen pár studií zaměřených na seroprevalenci *N. caninum* u loveckých psů. Ve Španělsku, Collantes-Fernández et al. (2008) detekovali protilátky *N. caninum* pomocí IFAT (cut-off 50) metody u 23 % ze 100 loveckých psů. Nižší seroprevalence 1,7 % byla zjištěna u 59 loveckých psů z Portugalska pomocí cELISA ($I \geq 30$ %), (Maia et al. 2014).

V Itálii byly v dřívějších letech detekovány protilátky proti *N. caninum* pomocí IFAT u 9 (9,1 %) z 99 loveckých psů z jižní Itálie (Cringoli et al. 2002) a pomocí ELISA u 14 (14,7 %) z 95 loveckých psů ze severovýchodní Itálie (Capelli et al. 2004). Lovečtí psi vykazovali vyšší séropozitivitu než psi s jiným využitím (Cringoli et al. 2002; Capelli et al. 2004). Vyšší riziko infekce *N. caninum* může být způsobeno tím, že lovečtí psi konzumují syrové maso lovených zvířat. Naproti tomu Maia et al. (2014) zjistili mnohem vyšší seroprevalenci u toulavých než u loveckých psů.

V naší studii bylo zjištěno více infikovaných fenek než psů bez statistické významnosti ($P > 0,05$). To souhlasí se studií zaměřenou na psy pohybujících se na zemědělských farmách v Nizozemsku (Wouda et al. 1999), kde byl celkový podíl seropozitivních fenek (14,1 %) výrazně vyšší než u seropozitivních psů (6,8 %); tento rozdíl byl ale statisticky významný ($P = 0,01$). Collantes-Fernández et al. (2008) také detekovali více pozitivních fenek (26,9 %) než psů (22,7 %) různého využití. Goździk et al. (2011) zjistili v Polsku statisticky významný rozdíl v prevalenci fenek (28 %, 30/107) a psů (17,3 %, 26/150). Cringoli et al. (2002) nezjistili žádnou významnou korelaci mezi seroprevalencí *N. caninum* a věkem, avšak oproti našim výsledkům, byla vyšší seropozitivita *N. caninum* u psů (6,8 %) než u fenek (5,8 %).

Nejvyšší prevalence byla zjištěna u psů věkové kategorie $\geq 4 - 7$ roků. V předchozí studii z Itálie (Capelli et al. 2004), byla také zjištěna nejvyšší prevalence ve stejné věkové kategorii u psů různého využití, kde byli zahrnuti i lovečtí psi. Wouda et al. (1999) zjistili, že se prevalence *N. caninum* protilátek významně ($P < 0,05$) zvyšuje s věkem v průběhu prvních 7 let života a zvyšování pokračuje (statisticky nevýznamně) i u osmiletých a starších psů. To naznačuje, že většina psů je nakažena ihned po narození. Naproti tomu, Cringoli et al. (2002) zjistili, že psi starší 7 let byli méně infikováni než psi mladší ($P = 0,055$).

Nejvyšší seroprevalence protilátek proti *N. caninum* byla nalezena u plemena bígl (29,4 %). U protilátek proti *T. gondii* mělo nejvyšší seroprevalenci plemeno bretaňský ohař (28,6 %), tyto hodnoty ale nebyly statisticky významné. Collantes-Fernández et al. (2008) zjistili

častější přítomnost protilátek proti *N. caninum* u kříženců než u čistokrevných plemen psů ($P < 0,01$). Avšak vyšší infekce u kříženců nebyla zjištěna, pokud se psi sloučili do jednotlivých skupin, protože většina zvířat ze skupiny zatoulaných psů byla kříženci různých plemen a proto tento výsledek může být zkreslen větší velikostí vzorku.

Nejvyšší prevalence *N. caninum* protilátek (15,6 %) byla zjištěna u loveckých psů střední velikosti, ale bez statistické významnosti. Vyšší prevalence u loveckých psů může být opět způsobena konzumací syrového masa lovených zvířat. Naopak, Wanhaa et al. (2005) zjistili v Rakousku nejvyšší seroprevalenci 3,96 % u velkých psů odlišného využití, avšak rozdíly v těchto kategoriích byly rovněž minimální a bez statistické významnosti.

Psi žijící ve větších smečkách (≥ 12 psů) byli více pozitivní než psi žijící v menších smečkách. V předchozí studii z Itálie, Capeli et al. (2004) popsali nejvyšší pozitivitu (20 %) u psů, kteří žijí ve smečce dvou a více psů různého využití (součástí jsou i lovečtí psi). Psi mohou vylučovat oocysty *N. caninum* pět a více dní po požití infikované živočišné tkáně (Dubey et al. 2007). Ve smečce, která obsahuje více psů, je tedy vyšší riziko kontaminace životního prostředí oocystami *N. caninum*, které by mohly být zdrojem nákazy pro ostatní psy ve smečce.

V naší studii byla vyšší seroprevalence zjištěna u psů, kteří žijí ve městě. Naproti tomu, Capelli et al. (2004) zjistili vyšší séropozitivitu (16,3 %) u psů (jiného využití) žijících ve venkovských oblastech v Itálii; nezjistili ale žádné významné rozdíly mezi městskými, příměstskými a venkovskými psy. V Maďarsku, Hornok et al. (2006) také zjistili vyšší seroprevalenci u psů z venkovských oblastí (15 z 249; 6 %) než u psů z městských oblastí (4 ze 402; 1 %) se statistickou významností ($P = 0,0004$). Wanhaa et al. (2005) zjistili statistickou významnost ($P = 0,017$) mezi seropozitivními psy z městských (8 z 381; 2,1 %) a venkovských (23 ze 433; 5,3 %) oblastí.

Vyšší seroprevalence byla zjištěna u psů, kteří byli v kontaktu s jinými druhy domácích a hospodářských zvířat. Collantes-Fernández et al. (2008) zjistili mnohem vyšší seroprevalenci u hospodářských psů (51/100; 51 %, $P < 0,001$) v porovnání s domácími psy (3/102; 2,9 %, $P < 0,0001$). Údaje potvrzují, že toulavý, lovečtí a psi z farem vykazují rizikovou psí populaci. Nejvyšší seropozitivita byla nalezena u psů z mlékárenských farem, což naznačuje epidemiologické spojení mezi psy a dobytkem.

Nejvyšší prevalence byla zjištěna u psů, kteří jsou využíváni k lovu divokých zajíců (25 %) a skupiny stěhovavých nebo nestěhovavých ptáků (18,4 %). Kořist by mohla být

významným zdrojem infekce *N. caninum* pro psy, avšak pro potvrzení této hypotézy nemáme k dispozici informace o seroprevalenci těchto divokých zvířat v Itálii.

V Evropě nejsou žádné informace o výskytu protilátek *T. gondii* u loveckých psů, avšak prevalence u psů různého využití je v rozmezí od 4 % - 75 % (Dubey 2010). U loveckých psů by kořist mohla být považována za nejdůležitější zdroj infekce *T. gondii*. Nejvyšší seroprevalence byla zaznamenána u psů lovců zajíce (45 %) a potom u těch, kteří loví ptáky, kance i zajíce. Protilátky proti *N. caninum* byly detekovány pomocí DAT u sér zajíců ze Slovenska (6,8 % při ředění 1:40 a 2,3 % při ředění 1:320) a Maďarska (8,6 % při ředění 1:40 a 1,1 % při ředění 1:320) importovaných do Itálie (Ferroglio and Trisciuglio 2003). Mancianti et al. (2013) detekovali protilátky proti *T. gondii* u 9 ze 103 (8,7 %) vodních ptáků ze střední Itálie pomocí aglutinačního testu. Ranucci et al. (2013) zjistili pomocí IFAT protilátky proti *T. gondii* u 56 ze 400 (14 %) divokých prasat ze střední Itálie.

Mezi nejčastější klinické příznaky u testovaných psů patřilo snížení aktivity (6,8 % a 8,5 %) a snížení tělesné hmotnosti (5,1 % a 6,4 %) u psů pozitivních na protilátky proti *N. caninum* a *T. gondii*, respektive. V případě psů pozitivních na *N. caninum* protilátky, byly klinické příznaky (ztráta hmotnosti, snížení aktivity, průjem, svědění nebo kožní léze) pozorovány u 5 (8,5 %) psů. Nicméně 42,4 % psů pozitivních na *N. caninum* protilátky byli také pozitivní na protilátky proti *T. gondii*. Stejně klinické příznaky, byly pozorovány u 10 (10,6 %) z 94 *T. gondii* pozitivních psů. Čtyři (40 %) z těchto psů byly současně pozitivní na protilátky *N. caninum*. Maia et al. (2014) zjistili rozdíl mezi seropositivitou u psů bez klinických příznaků kompatibilních s neosporózou (5,6 %) a u psů kteří mají poruchy pohybového aparátu nebo neurologické příznaky (21,4 %, $P = 0,05$), což je třeba brát v úvahu při diferenciální diagnostice neurologických onemocnění u psů.

Naše studie ukázala, že *N. caninum* a *T. gondii* seroprevalence u loveckých psů z jižní Itálie je nižší než v ostatních zemích Evropy. V případě *N. caninum* bylo do této studie zahrnuto větší množství sér loveckých psů ($n = 398$) oproti předchozím studiím ($n =$ do 100). Tato studie se jako první v Evropě zaměřuje na seroprevalenci *T. gondii* u loveckých psů.

5. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo detekovat protilátky proti *Neospora caninum* a *Toxoplasma gondii* u loveckých psů z jižní Itálie a stanovit rizikové faktory (pohlaví, věk, velikost psů a psí smečky atd.) této infekce. Dalším cílem bylo statisticky analyzovat výsledky sérologického vyšetření v závislosti na rizikových faktorech a porovnat je s výsledky z jiných podobných studií.

V teoretické části bakalářské práce je popsán životní cyklus obou parazitů, způsoby přenosu infekce, klinické příznaky, způsoby diagnostiky, možná léčba a prevence. Další část bakalářské práce se zaměřuje na seroprevalenci obou parazitů u psů a to především v Evropských zemích.

V praktické části bakalářské práce je popsán materiál a metodika. Během odběru krve psů byly zjištěny údaje pro statistické zpracování výsledků. Přítomnost protilátek proti *N. caninum* a *T. gondii* v sérech psů byla detekována nepřímým imunofluorescenčním testem (IFAT). Protilátky proti *N. caninum* a *T. gondii* byly zjištěny u 14,8 % a 23,6 % loveckých psů a 26,3 % psů mělo protilátky proti oběma parazitům. Na základě modelu logistické regrese pomocí chí-kvadrát testu pro $P \leq 0,05$ nebyla zjištěna žádná závislost pozitivních výsledků serologického vyšetření a testovaných rizikových faktorů (hodnoty byly statisticky nevýznamné).

Zjištěná seroprevalence *N. caninum* a *T. gondii* u loveckých psů z jižní Itálie patří mezi nejnižší v Evropě. Tato studie se jako první v Evropě zaměřuje na seroprevalenci *T. gondii* u loveckých psů, v případě *N. caninum* byl použit větší počet vzorků s porovnáním s předchozími studiemi.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Články v časopisech:

1. Atkinson R., Harper P. A., Reichel M. P. and Ellis J. T. (2000). Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitology Today* [online], vol. 16, issue 3, s. 110-114 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1016/s0169-4758(99)01604-x.
2. Barber J. S., Holmdahl O. J. M., Owen M. R., Guy F., Uggla A. and Trees A. J. (1995). Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology* [online], vol. 111, issue 5 [cit. 2015-03-19]. DOI: 10.1017/s0031182000077039.
3. Barr B. C., Conrad P. A., Breitmeyer R., Sverlow, K., Anderson M. L., Reynolds J., Chauvet, A. E., Dubey J. P. and Ardans A. A. (1993). Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: Four cases (1990-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 202, s. 113-117.
4. Barr B. C., Rowe J. D., Sverlow K. W., Bondurant R. H., Ardans A. A., Oliver M. N., Conrad P. A., Estill Ch. T. and Scully C. M. (1994). Experimental reproduction of Bovine Fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [online], vol. 6, issue 2, s. 567-574 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1002/9781118833971.ch62.
5. Baszler T. V., Adams S., Vander-Schalie J., Mathison B. A. and Kostovic M. (2001). Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Journal of Clinical Microbiology* [online], vol. 39, issue 11, s. 3851-3857 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1128/jcm.39.11.3851-3857.2001.
6. Bjerkås I., Mohn S. F. and Presthus J. (1984). Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research* [online], vol. 70, issue 2, s. 271-274 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/bf00942230.
7. Bjerkås I. and Presthus J. (1988). Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. *APMIS* [online], vol. 96, 1-6, s. 445-454 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1988.tb05328.x.

8. Bjerkås I. and Presthus J. (1989). The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *APMIS* [online], vol. 97, 1-6, s. 459-468 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1989.tb00816.x.
9. Bjerkås I. and Dubey J. P. (1991). Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Veterinaria Scandinavia*, vol. 32, s. 407-410.
10. Björkman C. and Ugglå A. (1999). Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology* [online], vol. 29, issue 10, s. 1497-1507 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1016/s0020-7519(99)00115-0.
11. Boothroyd J. C., Sibley L. D. (1993). Population biology of *Toxoplasma gondii*. *Research in Immunology* [online], vol. 144, issue 1, s. 14-16 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1007/springerreference_143294.
12. Brindley P. J., Gazzinelli R. T., Denkers E. Y., Davis S. W., Dubey J. P., Belfort R., Martins M. C., Silveira C., Jamra L., Waters A. P. and Sher A. (1993). Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 48, s. 447-456.
13. Brownlee L. and Sellon R. K. (2001). Diagnosis of naturally occurring toxoplasmosis by bronchoalveolar lavage in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* [online], vol. 37, issue 3, s. 251-255 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.5326/15473317-37-3-251.
14. Bryan L. A., Gajadhar A. A., Dubey J. P. and Haines D. M. (1994). Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora sp.* protozoan. *The Canadian Veterinary Journal*, vol. 35, s. 111-113.
15. Capelli G., Nardelli S., di Regalbono A. F., Scalac A. and Pietrobella M. (2004). Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. *Veterinary Parasitology*, vol. 123, s. 143-148.
16. Cole R. A., Lindsay D. S., B. L. Blagburn, Sorjonen D. C. and Dubey J. P. (1995). Vertical Transmission of *Neospora caninum* in dogs. *The Journal of Parasitology* [online], vol. 81, issue 2, s. 208-64 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/springerreference_142186.
17. Collantes-Fernández E., Gómez-Bautista M., Miró G., Álvarez-García G., Pereira-Bueno J., Frisuelos C. and Ortega-Mora L. M. (2008). Seroprevalence and risk factors

- associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Veterinary Parasitology*, vol. 152, s. 148-151.
18. Conrad P. A., Barr B. C., Sverlow K. W., Anderson M., Daft B., Kinde H., Dubey J. P., Munson L. and Ardans A. (1993). In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology*[online], vol. 106, issue 03 [cit. 2015-03-28]. DOI: 10.1017/s0031182000075065.
 19. Conrad P. A., Sverlow K., Anderson M., Rowe J., BonDurant R., Tuter G., Breitmeyer R., Palmer C., Thurmond M. and Ardans A. (1993). Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [online], vol. 5, issue 4, s. 572-578 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1177/104063879300500412.
 20. Cringoli G., Rinaldi L., Capuano F., Baldi L., Veneziano V. and Capelli G. (2002). Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, vol. 106, s. 307-313.
 21. Cuddon P., Lin D., Bowman D. D., Lindsay D. S., Miller T. K., Duncan I. D., de Lahunta A., Cummings J., Suter M., Cooper B., King J. M. and Dubey J. P. (1992). *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. *Veterinary Internal Medicine* [online], vol. 6, issue 6, s. 325-332 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.7717/peerj.674/fig-3.
 22. Ellis, J., Luto, K., Baverstock P. R., Brindley P. J., Nimmo, K. A. and Johnson A. M. (1994). The phylogeny of *Neospora caninum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 64, s. 303-311.
 23. Darde M. L., Bouteille B. and Pestre-Alexandre M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *The Journal of Parasitology*, vol. 78(5), s. 786-794.
 24. Desmonts G. and Remington J. S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 11, s. 562-568.
 25. Dubey J. P., Hattel A. L., Lindsay D. S. and Topper M. J. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 193 (10), s. 1259-1263.

26. Dubey J. P., Carpenter J. L., Speer C. A., Topper M. J. and Uggla A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 192, s. 1269-1285.
27. Dubey J. P., Lindsay D. S. and Speer C. A. (1988). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11(2), s. 267-299.
28. Dubey J. P. and Lindsay D. S. (1989). Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *The Journal of Parasitology* [online], vol. 75, issue 1 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/springerreference_142186.
29. Dubey J. P., Carpenter J. L., Topper M. J. and Uggla A. (1989). Fatal toxoplasmosis in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, vol. 25, s. 659-664.
30. Dubey J. P. and Lindsay D. S. (1989). Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *The Journal of Parasitology* [online], vol. 75, issue 5 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.2307/3283062.
31. Dubey J. P. and Lindsay D. S. (1990). Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *The Journal of Parasitology* [online], vol. 76, issue 3 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.2307/3282676.
32. Dubey J. P. and Lindsay D. S. (1990). *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [online], vol. 2, issue 3, s. 230-233 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/springerreference_142186.
33. Dubey J. P. and Lindsay D. S. (1990). Neosporosis in dogs. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 36, 1-2, s. 147-151 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1016/0304-4017(90)90103-i.
34. Dubey J. P. (1991). Toxoplasmosis: an overview. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, vol. 22, s. 88-92.
35. Dubey J. P., Janovitz E. B. and Skowronek A. J. (1992). Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 43, 1-2, s. 137-141 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1016/0304-4017(92)90056-f.
36. Dubey J. P. (1993). *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier J. P. (Editor). *Parasitic Protozoa*, vol. 6. Academic Press., NY, s. 1-158.
37. Dubey J. P. (1993) Protozoal abortion in cattle. *Journal of the American Medical Association*, vol. 203, s. 1250-1251.

38. Dubey J. P. and Carpenter J. L. (1993). Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats - 100 cases (1952–1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 203, s. 1556–1566.
39. Dubey J. P. and Lindsay D. S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 67, 1-2, s. 1-59 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1016/s0304-4017(96)01035-7.
40. Dubey J. P., Lindsay D. S., Adams D. S., Gay J. M., Baszler T. V., Blagburn B. L. and Thulliez P. (1996). Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 57, s. 329-336.
41. Dubey J. P., Dorough K. R., Jenkins M. C., Liddell S., Speer C. A., Kwok O. C. and Shen S. K. (1998). Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *International Journal for Parasitology* [online], vol. 28, issue 8, s. 1293-1304 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1016/s0020-7519(98)00099-x.
42. Dubey J. P. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 84, 3-4, s. 349-367 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1016/s0304-4017(99)00044-8.
43. Dubey J. P. and Lindsay D. S. (2000). Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitology Research* [online], vol. 86, issue 2, s. 165-168 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1007/s004360050027.
44. Dubey J. P., Barr B. C., Barta J. R., Bjerkås I., Björkman C., Blagburn B. L., Bowman D. D., Buxton D., Ellis J. T., Gottstein B., Hemphill A., Hill D. E., Howe D. K., Jenkins M. C., Kobayashi Y., Koudela B., MARSH A. E., Mattsson J. G., McAllister M. M., Modrý D., Omata Y., Sibley L. D., Speer C. A., Trees A. J., Uggla A., Upton S. J., Williams D. J. L. and Lindsay D. S. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology* [online], vol. 32, issue 8, s. 929-946 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/springerreference_142186.
45. Dubey J. P. (2004). Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 126, 1-2, s. 57-72 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.09.005
46. Dubey J. P., Graham D. H., de Young R. W., Dahl E., Eberhard M. L., Nace E. K., Won K., Bishop H., Punkosdy G., Sreekumar C., Vianna M. C. B., Shen S. K., Kwok O. C. H., Sumners J. A., Demarais S., Humphreys J. G. and Lehmann T. (2004). Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United

- States. Journal of Parasitology [online], vol. 90, issue 1, s. 67-71 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1645/ge-110r.
47. Dubey J. P., Sreekumar C., Knickman E., Miska K. B., Vianna M. C. B., Kwok O. C. H., Hill D. E., Jenkins M. C., Lindsay D. S. and Greene C. E. (2004). Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. International Journal for Parasitology [online], vol. 34, issue 10, s. 1157-1167 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1016/j.ijpara.2004.07.005.
 48. Dubey J. P., Knickman E. and Greene C. E. (2005). Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. Acta Parasitologica, vol. 50, s. 176-179.
 49. Dubey J. P. and Thulliez P. (2005). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. Journal of Parasitology [online], vol. 91, issue 5, s. 1217-1218 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1645/ge-576r.1.
 50. Dubey J. P., Chapman J. L., Rosenthal B. M., Mense M. and Schueler R. L. (2006). Clinical *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis canis*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* infections in dogs. Veterinary Parasitology [online], vol. 137, 1-2, s. 36-49 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.12.017.
 51. Dubey J. P. and Lappin M. R. (2006). Toxoplasmosis and neosporosis. In: Greene C. E., editor. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd edition. St Louis (MO): Saunders Elsevier, s. 754-775.
 52. Dubey J. P., Alvarado-Esquivel C., Liesenfeld O., Herrera-Flores R. G., Ramírez-Sánchez B. E., González-Herrera A., Martínez-García S. A., Bandini L. A. and Kwok O. C. H. (2007). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from durango city, Mexico. Journal of Parasitology, vol. 93 (5), s. 1033-1035. DOI: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1281R.1>.
 53. Dubey J. P., Cortés-Vecino J. A., Vargas-Duarte J. J., Sundar N., Velmurugan G. V., Bandini L. M., Polo L. J., Zambrano L., Mora L. E., Kwok O. C. H., Smith T. and Su C. (2007). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. Veterinary Parasitology, vol. 145, Issues 1-2, s. 45-50.
 54. Dubey J. P., Schares G. and Ortega-Mora L. M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clinical Microbiology Reviews [online], vol. 20, issue 2, s. 323-367 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/springerreference_142186.

55. Dubey J. P., Sundar N., Gennari S. M., Minervino A. H. H., da R. Farias N. A., Ruas J. L., dos Santos T. R. B., Cavalcante G. T., Kwok O. C. H and Su C. (2007). Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para' state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Veterinary Parasitology*, vol. 143, s. 182-188.
56. Dubey J. P., Vianna M. C. B., Kwok O. C. H., Hill D. E., Miska K. B., Tuo W., Velmurugan G. V., Conors M. and Jenkins M. C. (2007). Neosporosis in Beagle dogs: Clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 149, 3-4, s. 158-166 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.08.013.
57. Dubey J. P. (2009). The evolution of the knowledge of cat and dog coccidia. *Parasitology*, vol. 136, issue 12, DOI:10.1017/S003118200900585X.
58. Dubey J. P., Lappin M. R., Kwok O. CH., Mofya S., Chikweto A., Baffa A., Doherty D., Shakeri J., Macpherson C. N. L. and Sharma R. N. (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and concurrent *Bartonella spp.*, Feline immunodeficiency virus, and Feline leukemia virus infections in cats from Grenada, West Indies. *Journal of Parasitology* [online], vol. 95, issue 5, s. 1129-1133 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1645/ge-2114.1.
59. Dubey J. P., Lindsay D. S., Lappin M. R. and Shaw S. (2009). Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* [online], vol. 39, issue 6, s. 138-142 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1201/b15174-14.
60. Dubey J. P., Jenkins M. C., Rajendran C., Miska K., Ferreira L. R., Martins J., Kwok O. C. H. and Choudhary S. (2011). Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 181, 2-4, s. 382-387 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.018.
61. Ehrensperger F. and Pospischil A. (1989). Spontane Mischinfektionen mit Staupevirus und *Toxoplasmen* beim Hund [Canine concurrent infection with distemper virus and *Toxoplasma spec.*]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, vol. 96, s. 184-186 [in German].
62. Evans R. (1992). Life cycle and animal infection. In: Ho-Yen D. O. and Joss A. W. L., editors. *Human toxoplasmosis*. New York: Oxford University Press, s. 26-55.
63. Ezio F. and Anna T. (2003). Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Veterinary Parasitology* [online], vol. 115, issue 1, s. 75-78 [cit. 2015-03-27]. DOI: 10.1016/s0304-4017(03)00201-2.

64. Falzone C, Baroni M, de Lorenzi D. and Mandara M. T. (2008). *Toxoplasma gondii* brain granuloma in a cat: diagnosis using cytology from an intraoperative sample and sequential magnetic resonance imaging. *Journal of Small Animal Practice* [online], vol. 49, issue 2, s. 95-99 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1007/springerreference_143294.
65. Frenkel J. K. (2000). Biology of *Toxoplasma gondii*. In: Ambroise-Thomas P. and Petersen E., editors. *Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control*. Paris: Springer-Verlag, s. 9-25.
66. Fuentes I., Rubio J. M., Ramirez C. and Alvar J. (2001). Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, s. 1566-1570.
67. Fulton J. D. and Turk J. L. (1959). Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *The Lancet* [online], vol. 274, issue 7111, s. 1068-1069 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/s0140-6736(59)91535-1.
68. Greene C. E., Cook J. R. and Mahaffey E. A. (1985). Clindamycin for treatment of *Toxoplasma* polymyositis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 187, s. 631-634.
69. Greene C. E., Lappin M. R. and Marks A. (1993). Effect of clindamycin on clinical, hematologic, and biochemical parameters in healthy cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, vol. 28, s. 323-326.
70. Gondim L. F. P., Saeki H., Onaga H., Haritani M. and Yamane I. (1999). Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *New Zealand Veterinary Journal* [online], vol. 47, issue 1, s. 36-36 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1080/00480169.1999.36107.
71. Gondim L. F. P., McAllister M. M., Pitt W. C. and Zemlicka D. E. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* [online], vol. 34, issue 2, s. 159-161 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1016/j.ijpara.2004.01.001.
72. Goździk K., Wrzesień R., Wielgosz-Ostolska A., Bień J., Kozak-Ljunggren M. and Cabaj W. (2011). Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dogs from urban areas in Central Poland, vol. 108, s. 991-996.
73. Guo Z.-G. and Johnson A. M. (1995). Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitology Research* [online], vol. 81, issue 5, s. 365-370 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1007/bf00931495.

74. Hay W. H., Shell L. G., Lindsay D. S. and Dubey J. P. (1990). Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol 197, issue 1, s. 87-89.
75. Hemphill A., Gottstein B. and Kaufmann H. (1996). Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* [online], vol. 112, issue 02 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1017/s0031182000084754.
76. Ho M. S. Y., Bat'r B. C., Marsh A. E., Anderson M. L., Rowe J. D., Tarantai A. F., Hendrickx A. G., Sverlow K., Dubey J. P. and Conrad P. A. (1996). Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small subunit rRNA sequence probe hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 34, s. 1203-1208.
77. Holmdahl O. J. M., Mattsson J. G., Uggla A. and Johansson K. E. (1994). The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiology Letters* [online], vol. 119, 1-2, s. 187-192 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/0378-1097(94)90412-x.
78. Holmdahl O. J. M. and Mattsson J. G. (1996). Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer I. *Parasitology* [online], vol. 112, issue 02, s. 177-82 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1017/s0031182000084742.
79. Honoré S., Couvelard A., Garin Y. J. F., Bedel C., Hénin D., Dardé M. L. and Derouin F. (2000). Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients. *Pathologie Biologie*, vol. 48, s. 541-547.
80. Hornok S., Edelhofer R., Fok É., Berta K., Fejes P., Répási A. and Farkas R. (2006). Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. *Veterinary Parasitology*, vol. 137, s. 197-201.
81. Howe D. K. and Sibley L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 172, s. 1561-1566.
82. Howe D. K., Honore S., Derouin F. and Sibley L. D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, s. 1411-1414.
83. Jackson M. H. and Hutchison W. M. (1989). The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Advances in Parasitology*, vol. 28, s. 55-105. [PubMed: 2683617]

84. Jacobs G., Lappin M. R., Marks A. and Greene C. E. (1989). Effect of clindamycin on feline factor-VII activity. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 50, s. 393-395.
85. Jenkins M. C., Wouda W. and Dubey J. P. (1997). Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 4, s. 270-274.
86. Jones J. L., Dubey J. P. and Shimada Y.(2009). Waterborne toxoplasmosis - recent developments. *Experimental Parasitology* [online], vol. 124, issue 1, s. 10-25 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.5772/2845.
87. Kaufmann H., Yamage M., Roditi I., Dobbelaere D., Dubey J. P. and Holmdahl O. J. M. (1996). Trees A. and Gottstein B. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Molecular and Cellular Probes*, vol. 10, s. 289-297.
88. King J. S., Šlapeta J., Jenkins D. J., AL-Qassab S. E., Ellis J. T. and Windsor P. A. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* [online], vol. 40, issue 8, s. 945-950 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.01.008.
89. Lally N. C., Jenkins M. C. and Dubey J. P. (1996). Development of polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 75, s. 169-178.
90. Lappin M. R., Greene C. E., Winston S., Toll S. L. and Epstein M. E. (1989). Clinical feline toxoplasmosis. Serologic diagnosis and therapeutic management of 15 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 3, s. 139-143.
91. Levine N. D. (1961). *Sarcocystis*, *Toxoplasma* and related protozoa. Protozoan parasites of domestic animals and of man. Minneapolis: Burgess Publishing Company, vol. 12, p. 317-346.
92. Levine N. D. (1973). Protozoan parasites of domestic animals and of man. Minneapolis (MN): Minnesota: Burgess, s. 1-406.
93. Lindsay D. S., Blagburn B. L. and J. P. Dubey. (1992). Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *The Journal of Parasitology* [online], vol. 78, issue 1, s. 70-2 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.2307/3283689.
94. Lindsay D. S., Steinberg, H., Dubielzig R. R., Semrad S. D., Konkle D. M., Miller P. E. and Blagburn B. L. (1996) Central nervous system neosporosis in a foal. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [online], vol. 8, issue 4, s. 507-510 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1177/104063879600800424.

-
95. Lindsay D. S., Dubey J. P. and Duncan R. B. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 82, issue 4, s. 327-333 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/springerreference_142186.
 96. Lindsay D. S. and Dubey J. P. (2000). Canine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, vol. 14, s. 1-11.
 97. Little L., Shokek A., Dubey J. P. and Deheer H. L. (2005). *Toxoplasma gondii*-like organisms in skin aspirates from a cat with disseminated protozoal infection. *Veterinary Clinical Pathology* [online], vol. 34, issue 2, s. 156-160 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2005.tb00030.x.
 98. Lobato J., Silva D. A. O., Mineo T. W. P., Amaral J. D. H. F., Segundo G. R. S., Costa-Cruz J. M., Ferreira M. S., Borges A. S. and Mineo J. R. (2006). Detection of Immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: High seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clinical and Vaccine Immunology* [online], vol. 13, issue 1, s. 84-89 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1128/cvi.13.1.84-89.2006.
 99. Long M. T. and Baszler T. V. (1996). Fetal loss in Balb/c mice infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology* [online], vol. 82, issue 4 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.2307/3283785.
 100. Maia C., Cortes H., Brancal H., Lopes A. P., Pimenta P., Campino L. and Cardoso L. (2014). Prevalence and correlates of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in Portugal, vol. 21, s. 29. DOI: 10.1051/parasite/2014031.
 101. Malmasi A., Mosallanejad B., Mohebbi M., Fard M. S. and Taheri M. (2009). Prevention of shedding and re-shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts in experimentally infected cats treated with oral clindamycin: a preliminary study. *Zoonoses and Public Health* [online], vol. 56, issue 2, s. 102-104 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01174.x.
 102. Marsh A. E., Barr B. C., Sverlow K., Ho M., Dubey J. P. and Conrad P. A. (1995). Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar eocidial parasites. *The Journal of Parasitology* [online], vol. 81, issue 4 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.2307/3283848.
 103. Marsh A. E., Barr B. C., Madigan J., Lakritz J., Nordhausen R., Conrad P. A. (1996). Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 209 (11), s. 1907-1913.

-
104. McAllister M. M., Huffman E. M., Hietala S. K., Conrad P. A., Anderson M. L. and Salman M. D. (1996). Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to Neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [online], vol. 8, issue 3, s. 355-357 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1177/104063879600800313
 105. McAllister M. M., Dubey J. P., Lindsay D. S., Jolley W. R., Wills R. A. and McGuire A. M (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, vol. 28, s. 1473-1478. DOI:10.1016/S0020-7519(98)00138-6.
 106. McGuire A. M., McAllister M. M. and Jolley W. R. (1996). Separation and cryopreservation of *Neospora caninum* tissue cysts from murine brain. *The Journal of Parasitology* [online], vol. 83, issue 2, s. 319-21 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.2307/3284465.
 107. McGuire A. M., McAllister M. M., Jolley W. R. and Anderson-Sprecher R. C. (1997). A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *The Journal of Parasitology* [online], vol. 83, issue 4, s. 647-51 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.2307/3284241.
 108. Mitchell S. M., Zajac A. M., Davis W. L., Lindsay D. S. and Georgiev V. St. (2004). Efficacy of ponazuril in vitro and in preventing and treating *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Journal of Parasitology* [online], vol. 90, issue 3, s. 163-182 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1385/1-59259-296-1:163.
 109. Mitchell S. M., Zajac A. M., Kennedy T., Davis W., J. P. Dubey and Lindsay D. S. (2006). Prevention of recrudescent toxoplasmic encephalitis using ponazuril in an immunodeficient mouse model. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* [online], vol. 53, s1, S164-S165 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2006.00217.x.
 110. Monteiro R. M., Pena H. F. J., Gennari S. M., de Souza S. O., Richtzenhain L. J. and Soares R. M. (2008). Differential diagnosis of oocysts of Hammondia-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Parasitology Research* [online], vol. 103, issue 1, s. 72-72 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1201/b16181-72.
 111. Nordquist B. C., Aronson L. R., Pelloux H. and Ambroise-thomas P. (2008). Pyogranulomatous cystitis associated with *Toxoplasma gondii* infection in a cat after renal transplantation. *Journal of the American Veterinary Medical Association* [online], vol. 232, issue 7, s. 155-163 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1007/978-3-642-51014-4_14.

112. Otter A., Jeffrey M., Scholes S. F., Helmick B., Wilesmith J. W. and Trees A. J. (1997). Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Veterinary Record* [online], vol. 141, issue 19, s. 487-489 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1136/vr.141.19.487.
113. Packham A. E., Sverlow K. W., Conrad P. A., Loomis E. F., Rowe J. D., Anderson M. L., Marsh A. E., Cray C. and Barr B. C. (1998). A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 5, s. 467-473.
114. Paradies P., Capelli G., Testini G., Cantacessi C., Trees A. J. and Otranto D. (2007). Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. *Veterinary Parasitology*, vol. 145, s. 240-244.
115. Paré J., Hietala S. K. and Thurmond M. C. (1995). Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [online], vol. 7, issue 2, s. 273-275 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1177/104063879500700222.
116. Park C. H., Ikadai H., Yoshida E., Isomura H., Inukai H. and Oyamada T. (2007). Cutaneous toxoplasmosis in a female japanese cat. *Veterinary Pathology* [online], vol. 44, issue 5, s. 683-687 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1354/vp.44-5-683.
117. Payne S. and Ellis J. (1996). Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *International Journal for Parasitology* [online], vol. 26, issue 4, s. 347-351 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/0020-7519(96)00030-6.
118. Ranucci D., Veronesi F., Moretti A., Branciarri R., Miraglia D., Manfredi M. T. and Fioretti D. P. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) from Central Italy. *Parasite* [online], vol. 20, s. 48 [cit. 2015-03-27]. DOI: 10.1051/parasite/2013048.
119. Reichel M. P. and Pfeiffer D. U. (2002). An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 107, issue 3, s. 197-207 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1016/s0304-4017(02)00086-9.
120. Remington J. S. and Desmonts G. (1990). Toxoplasmosis. In: Remington J. S., Klein J. O., editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, s. 89-195.

121. Rhyan J. and Dubey J. P. (1992). Toxoplasmosis in an adult dog with hepatic necrosis and associated tissue cysts and tachyzoites. *Cancer Pract*, vol. 17, s. 6–10.
122. Sabin A. B. and Feldman H. A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*[online], vol. 108, issue 2815, s. 660-663 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1126/science.108.2815.660.
123. Sardinas J. C., Chastain C. B., Collins B. K. and Schmidt D. (1994). *Toxoplasma pneumonia* in a cat with incongruous serological test results. *Journal of Small Animal Practice* [online], vol. 35, issue 2, s. 104-107 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1994.tb02548.x.
124. Schares G., Vrhovec M. V., Pantchev N., Herrmann D. C. and Conraths F. J. (2008). Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. *Veterinary Parasitology* [online], vol. 152, 1-2, s. 34-45 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.12.004.
125. Slapeta J. R., Koudela B., Votypka J., Modrý D., Horejs R. and Lukes J. (2002). Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: Differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *The Veterinary Journal* [online], vol. 163, issue 2, s. 147-154 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1053/tvjl.2001.0599.
126. Speer C. A. and Dubey J. P. (1989). Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *The Journal of Protozoology* [online], vol. 36, issue 5, s. 458-463 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1989.tb01081.x.
127. Sreekumar C., Hill D. E., Fournet V. M., Rosenthal B. M., Lindsay D. S. and Dubey J. P. (2003). Detection of *Hammondia heydorni* - like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA–Polymerase Chain Reaction. *Journal of Parasitology*[online], vol. 89, issue 5, s. 1082-1085 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1645/ge-93r.
128. Stenlund S., Björkman C., Holmdahl O. J. M., Kindahl H. and Uggla A. (1997). Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitology Research* [online], vol. 83, issue 3, s. 214-219 [cit. 2015-03-28]. DOI: 10.1007/s004360050236.
129. Su C., Zhang X. and Dubey J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, vol. 36, s. 841–848.

130. Swinger R. L., Schmidt K. A. and Dubielzig R. R. (2009). Keratoconjunctivitis associated with *Toxoplasma gondii* in a dog. *Veterinary Ophthalmology* [online], vol. 12, issue 1, s. 56-60 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1007/springerreference_143294.
131. Tenter A. M., Heckeroth A. R. and Weiss L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* [online], vol. 30, 12-13, s. 1217-1258 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1016/s0020-7519(00)00124-7.
132. Tranas J., Heinzen R. A., Weiss L. M. and McAllister M. M. (1999). Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neospora caninum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 6, issue 5, s. 765-767.
133. Trees A. J., Guy F., Tennant B. J., Balfour A. H. and Dubey J. P. (1993). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Veterinary Record* [online], vol. 132, issue 6, s. 125-126 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1136/vr.132.6.125.
134. Van Ham L. (1991). Een geval van *Toxoplasma encefalitis* bij de hond [A case of *Toxoplasma encefalite* in the dog]. *Vlaams Diergeneesk Tijdsch*, vol. 60, s. 149-52 [in Dutch].
135. Wanhua K., Edelhofer R., Gabler-Eduardob C. and Prosla H. (2005). Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Veterinary Parasitology*, vol. 128, s. 189-193.
136. Williams D. J., Davison H. C., Helmick B., McGarry J., Guy F., Otter A. and Trees A. J. (1999). Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle. *Veterinary Record* [online], vol. 145, issue 20, s. 571-575 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1136/vr.145.20.571.
137. Woudaa W., Dijkstra Th., Kramerb A. M. H., van Maanenc C. and Brinkhof J. M. A. (1999). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, vol. 29, issue 10, s. 1677-1682.
138. Yamage M., Flechmer O. and Gottstein B. (1996). *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain cyst DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of Parasitology* [online], vol. 82, issue 2, s. 272-9 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.2307/3284160.
139. Yamane I., Kokuho T., Shimura K., Eto M., Shibahara T., Haritani M., Ouchi Y., Sverlow K. and Conrad P. A. (1997). In vitro isolation and characterisation of a bovine

Neospora species in Japan. Research in Veterinary Science [online], vol. 63, issue 1, s. 77-80 [cit. 2015-03-28]. DOI: 10.1016/s0034-5288(97)90162-4.

140. Yamane I., Shibahara T., Kokuho T., Shimura K., Hamaoka T., Haritani M., Conrad P. A., Park C. H., Sawada M. and Umemura T. (1998). An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation [online], vol. 10, issue 4, s. 364-368 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1177/104063879801000411.

Internetový zdroj:

1. Labx.com - auction, classifieds and new product. [Http://www.labx.com/item/olympus-bx41-brightfield-darkfield-dic-nomarski-reflected/LV32666922](http://www.labx.com/item/olympus-bx41-brightfield-darkfield-dic-nomarski-reflected/LV32666922).
2. Mapy.cz

Pasáž v knize:

1. Dubey J. P. and Beattie C. P. (1988). Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton (FL): CRC Press, s. 1-220.
2. Dubey J. P. (2009). Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; in press.
3. Harlow E. and Lane D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, xiii, 726 s. ISBN 0879693746.