

# *Neospora caninum* u żubrów – świadomość problemu

Władysław Cabaj, Katarzyna Goździk, Justyna Bień, Bożena Moskwa

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

---

## *Neospora caninum* in European bison – an awarness of the problem

**Abstract:** The prevalence of antibodies to *Neospora caninum* was examined in European bison (*Bison bonasus* L.) living mainly in Poland and abroad. At first, sera of 320 European bison collected from 1986 to 2003, different ages and sexes, were tested for *N. caninum* antibodies using ELISA test. Positive antibody responses were found in 23 bison (prevalence 7.3 %). Additionally, all positive sera were tested by Western blot to verify the ELISA results. The Western blot results confirmed the presence of antibodies to *Neospora* tachyzoites antigens in all ELISA positive sera. Thereafter, additional 200 sera collected in 2004–2008 were tested. High antibody responses were found in 26 bison (prevalence 13 %). Our results indicate strongly the presence of *N. caninum* in the European bison in Poland at least since 1988 to date and suggest that further researches are needed to evaluate the existence of a sylvatic cycle of *N. caninum*. Interestingly, among 30 bison living abroad in 10 tested sera antibodies against *N. caninum* were found. The effect of the infection on the health status and conservation of European bison is discussed.

**Key words:** European bison, *Neospora caninum*, reproduction, disturbances

---

## Wstęp

*Neospora caninum* jest pasożytniczym wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem należącym do typu *Apicomplexa*. Pasożyt ten został znaleziony po raz pierwszy w Norwegii, w postaci cyst w mózgu i rdzeniu kręgowym u psów z objawami paraliżu (Bjerkas i in. 1984). Kilka lat później w USA zidentyfikowano pasożyta i wprowadzono do systematyki nowy rodzaj *Neospora* i gatunek *N. caninum* (Dubey i in. 1988).

W warunkach naturalnych żywicielem ostatecznym pasożyta jest pies i kojot oraz prawdopodobnie inne psowate (McAllister i in. 1998; Lindsay i in. 1999; Gondim i in. 2004). Żywiciel ostateczny zaraża się, zjadając cysty tkankowe. W jelicie dochodzi do rozwoju płciowego pasożyta, w którego wyniku powstają oocysty (formy przetrwalnikowe pasożyta), które wraz z kałem żywiciela wydostają się do środowiska zewnętrznego, stanowiąc zagrożenie dla kolejnych żywicieli. Wewnątrz oocyst rozwijają się sporozoit, będące stadium inwazyjnym dla innych zwierząt. Żywicielami pośrednimi może być wiele gatunków zwierząt (Dubey 2003). W organizmie żywicieli pośrednich i ostatecznych

zachodzi proces rozmnażania bezpłciowego pasożyta (endodiogonia), w którego wyniku powstają tachyzoity i bradyzoity. Tachyzoity spotyka się w mózgu, rdzeniu kręgowym, rzadziej w płucach, wątrobie, mięśniach, sercu i łożysku. Bradyzoity znajdują się wewnątrz cyst tkankowych, które są odnajdywane przede wszystkim w komórkach układu nerwowego oraz w mięśniach (Dubey 2003).

Inwazje *N. caninum* z rozwinięciem objawów klinicznych zostały dobrze udokumentowane u bydła mlecznego i mięsnego oraz owiec, kóz, koni, jeleni i psów, natomiast przeciwciała przeciw pasożytowi wykrywano u krów, owiec, kóz, psów, koni, jeleni, danieli, wielbłądów, bawołów, wołu piżmowego, karibu, bizonów amerykańskich (Iowa, Alaska), lisów, kojotów, jenotów, psów dingo, szopów, oposów, lwów, gepardów, myszy, szczurów, gerbili, zajęcy, świń, ptaków, małp, nawet u nosorożca (Dubey 2003 i 2005). Do tej pory nie udało się zaobserwować objawów klinicznych u zwierząt wolno żyjących.

Cysty tkankowe *N. caninum* odnaleziono w mózgu martwego cielaka jelenia Elda (*Cervus eldi siamensis*) (Dubey i in. 1996), a także u martwych bliźniąt antylopy (*Tragelaphus imberberis*) w ogrodzie zoologicznym w Hanowerze w Niemczech (Peters i in. 2001). Neosporoza została zdiagnozowana u jelenia bagiennego (*Odocoileus hemionus columbianus*) odnalezionego martwego w lasach w Kalifornii w USA (Woods i in. 1994). Pierwotniaka *N. caninum* wyizolowano również od bawołu (*Bubalus bubalis*) (Rodrigues i in. 2004) i stwierdzono u kilku gatunków dzikich zwierząt afrykańskich, żyjących na terenach rezerwatów w Kenii: zebry (*Equus Burchelli*), antylopy (*Taurotragus oryx*), bawołu afrykańskiego (*Syncerus caffer*), gazeli Thompsona (*Gazella thompsoni*), impala (*Aepyceros melampus*), guźca (*Phacochoerus aethiopicus*), hieny (*Crocuta crocuta*), geparda (*Acinonyx jubatus*) i lwa (*Panthera leo*) (Ferroglio i in. 2003).

Przeciwciała przeciw pasożytowi stwierdzono u zwierząt mięsożernych: u wilków grzywiastych (*Chrysocyon brachyurus*) (Vitaliano i in. 2004), wilków (*Canis lupus*) na Alasce (Dubey i Thulliez 2005), wilków żyjących w ZOO w Czechach (Sedlak i Bartova 2005), u dwóch gatunków lisów (*Lycalopex gymnocercus* i *Cerdocycon thous*) zamieszkujących tereny Ameryki Południowej (Canon-Franco i in. 2004), u lisów srebrnych (*Urocyon cinereoargenteus*) (Lindsay i in. 2001), kojotów (*Canis latrans*) (Lindsay i in. 1996). Lis rudy (*Vulpes vulpes*) może być żywicielem pośrednim dla pasożyta (Almeria i in. 2002). U zajęcy brązowych (*Lepus europaeus*) (Ezio & Anna 2003), potencjalnych ofiar lisów, wykryto przeciwciała przeciwko *N. caninum*, co nasuwa przypuszczenie, że psowate takie jak lisy i wilki, zamieszkujące tereny Europy, również mogą być żywicielami ostatecznymi dla tego pierwotniaka. Z cytowanej literatury wynika jednoznacznie, że neosporoza u zwierząt ma zasięg światowy i może sprawiać duże problemy zdrowotne dla bardzo wielu gatunków zwierząt.

Wykrycie *N. caninum* u wolno żyjących przeżuwaczy oraz zwierząt mięsożernych potwierdza istnienie sylwatyicznego cyklu życiowego tego pasożyta.

Znaczenie zwierząt wolno żyjących w epidemiologii neosporozy nie zostało jak dotąd w pełni wyjaśnione.

Objawy kliniczne neosporozy występują jedynie u młodych zwierząt. Należą do nich między innymi: niedowład i progresywny paraliż kończyn, wiotczenie i atrofia mięśni, trudności w przełykaniu, nadpobudliwość, wodogłowie, jednoocność, zrastanie kości czaszki (Dubey i Lindsay 1996; Hemphill i Gottstein 2000; Dubey 2003). Skutkiem neosporozy u zwierząt dorosłych (u krów) są trudności w zacielaniu, nawracające poronienia, resorpcja lub mumifikacja płodu albo narodziny martwego potomka. Z danych literaturowych oraz wcześniejszych badań własnych wynika, że ponad 90% potomstwa urodzonego przez krowy zarażone *N. caninum* jest również zarażone, a młode zwierzęta szybko giną. Straty ekonomiczne to głównie utrata cieląt, ale również ponowne zacielanie, dłuższy okres laktacji, reperacja stada krów, które po poronieniu uległy zasuszeniu, gorsza jakość mięsa, gorsza jakość mleka oraz wzrost kosztów opieki weterynaryjnej nad stadem (Thurmond i Hietala 1997).

Badania, zapoczątkowane przez nasz zespół w 2000 r. wykazały, że *N. caninum* występuje również w Polsce. Po raz pierwszy wykryto przeciwciała przeciw pasożytowi we krwi krów, u których wcześniej notowano poronienia (Cabaj i in. 2000). Dodatkowo, pierwotniaka *N. caninum* wyizolowano z tkanek naturalnie zarażonego cielaka, a izolat NC-PolB1 jest utrzymywany w stałej hodowli komórkowej w Instytucie Parazytologii PAN (Goździk i Cabaj 2007).

Żubr (*Bison bonasus*) należy do rodziny krętorogich, jest to największy ssak Europy. Jest gatunkiem objętym całkowitą ochroną. Rok 2004, z okazji przypadającej 75. rocznicy rozpoczęcia akcji ratowania żubra, ogłoszono „Rokiem Żubra”. Akcja ta miała na celu zwrócenie uwagi na problem ochrony zagrożonych gatunków i promocji zachowań ekologicznych. W stadach żubr zamieszkiwał pierwotnie lasy mieszane Europy. Był cennym zwierzęciem łownym. Został silnie wytrzebiony i pod koniec XIX wieku zachował się już tylko w Puszczy Białowieskiej (podgatunek *Bison bonasus bonasus*, nizinny) i na Kaukazie (*Bison bonasus caucasicus*, górski lub kaukaski). Mimo ochrony zapoczątkowanej w Polsce już w średniowieczu, pogłowie żubra stale się zmniejszało, a działania w czasie I wojny światowej i kłusownictwo doprowadziły do całkowitego wytępienia. W 1919 roku padł ostatni okaz w Puszczy Białowieskiej. Od 1929 roku staraniem Międzynarodowego Towarzystwa Ochrony Żubrów podjęto akcję restytucji z okazów zachowanych w ogrodach zoologicznych i prywatnych zwierzyńcach. Obecnie w Polsce żubry żyją w rezerwach hodowlanych oraz na wolności (w Puszczy Białowieskiej, Bieszczadach, Puszczy Boreckiej, Puszczy Knyszyńskiej i woj. zachodniopomorskim). W Puszczy Białowieskiej w stadzie wolnym żyje około 450 osobników. Stado to odgrywa ważną rolę w restytucji i ochronie gatunku żubra, stąd też wynika troska o właściwy stan zdrowotny tej populacji zwierząt w tym miejscu bytowania.

Badania prowadzone przez nasz zespół wykazały po raz pierwszy na świecie obecność przeciwciał przeciw *N. caninum* u żubrów wolno żyjących w Polsce. Obecność przeciwciał stwierdzono u 7,3% badanych surowic (Cabaj i in. 2004). Przeciwciała stwierdzono u 16-letniej krowy żubra odstrzelonej 14.12.1988 r., tj. w roku, w którym gatunek *N. caninum* został opisany w USA przez Dubeya. Brak dostępu do surowic z wcześniejszego okresu uniemożliwił wykazanie obecności tego pierwotniaka w środowisku na długo przed jego opisaniem jako nowego gatunku. Dostęp do materiału biologicznego od żubrów selekcyjnie odstrzeliwanych lub immobilizowanych do różnych celów naukowych umożliwia monitorowanie tej groźnej pasożytozy u tego gatunku. Ośrodkiem mającym duży wpływ na kształtowanie się europejskiej populacji gatunku jest Białowieża, nie tylko ze względu na liczbę wysyłanych żubrów, ale przede wszystkim rolę w edukacji i propagowaniu treści związanych z restytucją żubra. Jest to konieczne, gdyż pasożyt może osłabiać potencjał rozrodczy, a przez to wywierać negatywny wpływ bezpośrednio na sam proces restytucji gatunku *Bison bonasus*. Przyjęcie przez kierownictwo resortu środowiska w sierpniu 2007 r. „Strategii ochrony żubra (*Bison bonasus*) w Polsce” wskazuje na fakt odpowiedzialności naszego kraju za dalsze losy żubra.

## **Materiał i metody**

### Hodowla pasożyta w komórkach nabłonkowych – Vero cells

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

### Test ELISA

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

Żubr jest zwierzęciem blisko spokrewnionym z bydłem domowym, dlatego można było wykorzystać testy stosowane do oznaczania poziomu przeciwciał u bydła. Badania przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu *Neospora caninum* Antibody Test Kit firmy IDEXX Laboratories, Inc. USA. W zestawach znajdują się płytki opłaszczane antygenem, kontrolne surowice pozytywne

i negatywne oraz standaryzowane rozcieńczalniki i bufony. W teście są wykrywane specyficzne przeciwciała klasy IgG. Wynik reakcji był odczytywany w czytniku EL\*800, Biotek, Instruments Inc. Wynik uznawano za pozytywny, jeśli wyliczony współczynnik S/P był większy lub równy 0,3 (dla bydła 0,5).

#### Metoda Western blot (WB)

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

#### Diagnostyka molekularna

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

## **Wyniki**

W roku 2004 dokonano analizy obecności przeciwciał przeciw *N. caninum* w 320 surowicach żubrów (ELISA i Western blot), odstrzelonych w latach 1984–2003. Po raz pierwszy na świecie stwierdzono wyniki dodatnie u 23 żubrów obu płci, tj. u 7,3% zbadanej populacji (Cabaj i in. 2005). Były to żubry żyjące głównie w Puszczy Białowieskiej (rezerwat i wolno żyjące), w Bieszczadach oraz w warszawskim i bydgoskim ZOO. Szczegółowe wyniki zostały przedstawione w tabeli 1. Zwierzęta z warszawskiego i bydgoskiego ZOO pochodziły z Białowieży, co można tłumaczyć zarażeniem tych zwierząt tym pasożytem. Możliwość zarażenia się żubrów w ZOO jest mało prawdopodobna, aczkolwiek nie można jej wykluczyć. Białowieża, jak i Bieszczady stanowią naturalne środowisko bytowania dla żubrów odpowiednio linii nizinnej i białowiesko-kaukaskiej. W dwóch różnych środowiskach bytowania zwierzęta są zarażone tym samym gatunkiem pasożyta. Występowanie wspólnego żywiciela ostatecznego dla tego pierwotniaka, jakim wydaje się być wilk, jest prawdopodobnie ogniwem w cyklu rozwojowym pasożyta łączącym te dwa środowiska i żywiciela pośredniego jakim jest żubr.

**Tabela 1.** Wyniki testu ELISA u żubrów eliminowanych w drodze odstrzału selekcyjnego bądź kładzionych w latach 1984–2003.

Lp.	Płeć/wiek	Data eliminacji lub immobilizacji	Miejsce pochodzenia	Wynik ELISA
1	K/16 lat	14.12.1988	Białowieża	0,50
2	K/5 lat	20.01.1993	Białowieża	0,31
3	K/15 lat	16.02.1993	Białowieża	0,53
4	K/<2 lata „Pokrewna”	20.09.1994	Białowieża	1,1
5	K/2 lata „Podleśna”	23.11.1994	Białowieża	0,4
6	K/2 lata „Pogorzałka”	16.11.1995	Bydgoszcz – ZOO	1,6
7	K/2 lata „Poszewka”	16.11.1995	Bydgoszcz – ZOO	1,7
8	K/4 lata	11.02.1997	Białowieża	0,50
9	B/12 lat	9.12.1999	Bieszczady	3,7
10	K/3 lata	16.12.1999	Białowieża	0,30
11	B/8 lat	12.01.2000	Białowieża	0,41
12	B/20 lat „Pozorny”	24.01.2000	Warszawa – ZOO	2,6
13	K/11 lat	9.02.2000	Białowieża	0,38
14	K/<1 rok	9.02.2000	Białowieża	0,43
15	B/?	24.03.2000	Białowieża	2,49
16	B/3 lata	29.02.2001	Białowieża	0,40
17	B/2 lata	2.03.2001	Białowieża	0,42
18	K/<1 rok	6.02.2002	Białowieża	0,54
19	B/2 lata	17.02.2002	Białowieża	0,7
20	K/3 lata	8.03.2002	Bieszczady	4,10
21	K/6 lat	9.03.2002	Bieszczady	0,76
22	K/<1 rok	4.02.2003	Białowieża	0,35
23	K/16 lat	11.03.2003	Białowieża	1,1

Objaśnienie: K – krowa, B – byk.

W kolejnych latach (2004–2008) prawie wszystkie dodatnie surowice pochodziły od żubrów selekcyjnie odstrzelonych bądź immobilizowanych w Białowieży (tab. 2) oraz od żubrów pochodzących z zagranicy (tab. 3). Były to osobniki w różnym wieku i obu płci.

Na łączną liczbę 200 przebadanych polskich żubrów, w 26 przypadkach wyniki testów immunoenzymatycznych wskazywały na kontakt z tym pierwotniakiem (wynik seropozytywny), co stanowi 13% przebadanej populacji żubrów.

W roku 2004 przebadano 28 surowic, spośród których 3 były pozytywne (10,7%); w 2005 r. 45 i 6 było dodatnich (13,3%), a w 2006 r. 42 i 8 było pozytywnych (19%). W kolejnym 2007 roku na 67 przebadanych surowic tylko u 4 osobników poziom przeciwciał przeciw *N. caninum* wskazywał na możliwe zarażenie tym pierwotniakiem (6%). W pierwszej połowie 2008 r. odstrzelono jedynie 18 żubrów (z 30 planowanych) a obserwowana seroprewalencja wynosi 27,8%. Jeszcze w tym roku są planowane dalsze badania i dlatego wynik tegoroczny nie jest ostateczny.

Badania koncentrowały się głównie w Białowieży, gdzie odstrzelono lub immobilizowano 16 żubrów zarażonych *N. caninum*. Tylko pojedyncze próby pochodziły z innych rejonów Polski, np. u dwóch krów żyjących w Puszczy Boreckiej i odstrzelonych w styczniu 2005 roku, u jednej stwierdzono bardzo wysoki poziom przeciwciał przeciw *N. caninum* (S/P = 1,98). Jeden byk (Pontek), na trzy zbadane przyżyciowo z woj. zachodniopomorskiego, miał wysoki poziom przeciwciał (S/P = 1,13). Przyżyciowo badane pojedyncze żubry z innych ośrodków (Niepołomice, Gołuchów, Pszczyna) były seronegatywne.

Spośród dodatnich surowic pozyskanych do 2003 r. prawie połowa (12 z 23) pochodziła od zwierząt poniżej 3. roku życia, z czego 9 to krowy, a 3 byki. W grupie wiekowej 4–10 lat na 4 dodatnie surowice 3 pochodziły od krów. Natomiast w grupie wiekowej ponad 10 lat, z 6 pozyskanych dodatnich surowic jedynie 2 pochodziły od krów. W latach 2004–2008, 11 pozytywnych surowic pochodziło od młodych osobników w wieku od 4 miesięcy do 3 lat, z czego 7 pochodziło od jałówek/krów, a 4 od byków w wieku 2,5–3 lata. Dziewięć zarażonych zwierząt było w wieku 4–10 lat i krowy stanowiły większość (6). Podobny rozkład występuje w grupie wiekowej ponad 10 lat. Najstarsza krowa z wysokim mianem przeciwciał miała 20 lat. Były też krowy 16- i 13-letnie. Analiza wieku i płci żubrów, od których uzyskano surowice dodatnie wobec *N. caninum*, wskazuje jednoznacznie, że w większości były to krowy poniżej 3. roku życia (16 z 49), co stanowi 32,7%. Ten wysoki odsetek młodych krów zarażonych *N. caninum* może skutkować problemami w rozrodzie.

Niezwykle cenne dla prowadzonych badań są zwierzęta seronegatywne, stanowią bowiem doskonałą grupę zwierząt kontrolnych do monitorowania środowiska na obecność *N. caninum*. Znając numery identyfikacyjne już zbadanych żubrów, przy kolejnej okazji immobilizacji bądź odstrzału selekcyjnego będzie można przeprowadzić powtórnie badania w kierunku obecności *N. caninum*.

**Tabela 2.** Wyniki testu ELISA u żubrów eliminowanych w drodze odstrzału selekcyjnego bądź kładzionych w latach 2004–2008.

Lp.	Płeć/wiek	Masa ciała w kg	Data eliminacji lub immobilizacji	Miejsce pochodzenia	Wynik ELISA
1	B/4 lata	–	4.03.2004	Białowieża	0,36
2	K/16 lat	380	11.03.2004	Białowieża	1,01
3	B/7 lat	610	22.12.2004	Białowieża	0,32
4	K/1,5 roku	160	11.01.2005	Białowieża	1,60
5	B/12 lat	670	11.01.2005	Białowieża	0,39
6	K/10 lat	450	25.01.2005	Białowieża	0,33
7	K/4 miesiące	57	8.02.2005	Białowieża	1,40
8	K/9 miesięcy	135	9.03.2005	Białowieża	0,74
9	K/5 lat	–	5.01.2005	Puszcza Borecka	1,98
10	B/3 lata	310	16.02.2006	Białowieża	1,54
11	K/< 1 rok	105	28.02.2006	Białowieża	0,26
12	B/2 lata	250	28.02.2006	Białowieża	0,5
13	K/3 lata	–	23.02.2006 (P)	Białowieża	2,27
14	K/<1 rok	–	13.06.2006 (P)	Białowieża	0,33
15	B/? Pontek	–	15.02.2006 (P)	Woj. zachodniopomorskie	1,13
16	K/8 lat	–	22.03.2006 (P)	Białowieża	0,46
17	K/< 1 rok	–	24.03.2006 (P)	Białowieża	0,29
18	B/3 lata	340	7.02.2007	Białowieża	0,29
19	B/? Pomak	–	27.02.2007 (P)	Białowieża	0,32
20	K/8 lat	–	14.06.2007 (P)	Białowieża	0,26
21	B/9 lat	–	15.11.2007 (P)	Białowieża	0,24
22	K/7 lat	310	26.02.2008	Białowieża	0,28
23	B/2,5 roku	310	26.02.2008	Białowieża	0,30
24	K/13 lat	400	4.03.2008	Białowieża	0,25
25	K/8 lat	360	4.03.2008	Białowieża	0,42
26	K/20 lat	360	4.03.2008	Białowieża	0,20

Objaśnienie: (P) – próba przyżyciowa (żubr żyje).

W 2007 roku zbadano 11 surowic od żubrów z ośrodka w Lelystad (Holandia). Jeden osobnik okazał się wysoce seropozytywny. Wcześniej badano surowice od żubrów z innych ośrodków za granicą i uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 3. Zwraca uwagę duża wartość współczynnika S/P, wskazująca na bardzo wysoki poziom przeciwciał przeciw *N. caninum*.



**Tabela 3.** Wyniki testu ELISA u żubrów sprowadzonych z zagranicy w ostatnich latach

Lp.	Płeć/wiek	Data immobilizacji	Miejsce pochodzenia	Wynik ELISA
1	K/4 lata Bjiva	14.06.2002	ZOO Blavaland, Dania	1,98
2	B/2,5 roku Archie	6.12.2004	Artis ZOO Amsterdam, Holandia (ur. 11.05.2002)	2,66
3	K/2,5 roku Pasqualina	6.12.2004	Parco Natura Viva, Bussolengo, Włochy (ur. 31.03.2002)	0,67
4	K/10 lat Ittina	6.12.2004	Parco Natura Viva, Bussolengo, Włochy (ur. 12.12.1992)	1,73
5	K/? Xara II	2006	Karlsruhe, Niemcy	2,26
6	M/? Xanto	2006	Karlsruhe, Niemcy	1,8
7	K/5 lat	19.12.2006	Madryt, Hiszpania	1,14
8	?/?	7.05.2007	Lelystad, Holandia	2,6
9	B/?	16.03.2007	PN Połoniny, Słowacja/Bieszczady-Polska	3,12
10	B/3 lata	27.07.2008	Karlsruhe/Berlin, Niemcy	1,56

Interesujący wydaje się fakt introdukcji żubra na Słowacji, gdzie areal zwierząt jest ograniczony tylko do północno-wschodnich obszarów kraju. W tym rejonie introdukowano 8 żubrów pochodzących z różnych ośrodków. U trzech osobników spośród 5 badanych stwierdzono wysoki poziom przeciwciał przeciw *N. caninum*. Były to: byk Archie z Artis ZOO Amsterdam, Holandia, ur. 11.05.2002 r.; krowa Ittina z Parco Natura Viva, Bussolengo, Włochy, ur. 12.12.1992 r. oraz krowa Pasqualina z tego samego ośrodka, ur. 31.03.2002 r. Pod koniec czerwca 2006 r. Pasqualina urodziła jedno młode. Matka, jak i jej potomek padły w niewyjaśnionych okolicznościach. Nie udało się pobrać prób biologicznych do badań w kierunku obecności pierwotniaka *N. caninum*. Niestety, z podobną sytuacją mieliśmy do czynienia w przypadku krowy o imieniu Bjiva sprowadzonej z Danii. Krowa jak i jej potomstwo zginęły. Obecnie w PN Połoniny przebywa 6–8 sztuk żubrów. Do tej grupy dołączył byk z Polski, u którego stwierdzono wysoki poziom przeciwciał przeciw *N. caninum*. U krowy, sprowadzonej do PN Połoniny z Zooparku Chomutów w Czechach, nie stwierdzono przeciwciał przeciw temu pasożytowi. Interesujący jest fakt, że w stadzie tym znajdują się dwa byki (Archie i byk z Polski) oraz krowa Ittina z bardzo wysokim poziomem przeciwciał, co sugeruje, że mogą one być zarażone *N. caninum*. Dalsze badanie potomstwa w tym stadzie może dać odpowiedź na pytanie, czy w sposób naturalny może dojść do zarażenia krów tam żyjących.

## Podsumowanie

Głównym symptomem neosporozy u zwierząt dorosłych są poronienia występujące w różnym okresie ciąży (najczęściej w 5–6 miesiącu). U zarażonych krów płody mogą obumierać *in utero*, ulegać resorpcji, mumifikacji, autolizie. Może dochodzić do narodzin martwego płodu, narodzin słabego lub chorego cielęcia albo też narodzin bez objawów neosporozy, za to z chorobą chroniczną. Skutkiem neosporozy u zwierząt dorosłych (krów) są również trudności w zacielaniu. Oznacza to, że neosporoza może wywierać również duży wpływ na proces rozrodczy u żubrów, co z kolei może prowadzić do zagrożenia restytucji tego gatunku. Można również przypuszczać, że neosporoza przenosi się drogą płciową, ponieważ w nasieniu dodatnich buhajów stwierdzono DNA pasożyta. Dodatkowo wykazano, że inseminacja nasieniem „doświadczalnie wzbogaconym” w tachyzoity *N. caninum* skutkuje narodzeniem cieląt zarażonych tym pasożytem (Serrano-Martinez i wsp. 2007). Realnym zagrożeniem dla restytucji żubrów jest także obecność żywicieli ostatecznych, wydalających wraz z kałem do środowiska oocyty, formy przetrwalnikowe.

Retrospektywna analiza danych opublikowanych przez Dackiewicz i Olech (2006) może wskazywać na wpływ pasożyta w procesie rozrodczym żubrów. Interesujący wydaje się fakt, że krowa Pustelnica urodzona w Białowieży, która dożyła wieku 25 lat w Ogrodzie Zoologicznym w Sztokholmie, urodziła 14 cieląt, a krowa Palmira, która również dożyła 25 lat w Sparkwell Zoo, urodziła tylko dwa cielęta. Co było przyczyną takiej różnicy? Pytanie zostanie bez odpowiedzi, a szkoda. Kolejna niewiadoma: co było przyczyną notowanego największego udziału martwo urodzonych cieląt w latach 1940–1949? Warto również zadać pytanie o przyczynę upadków cieląt przy porodzie lub w początkowym okresie życia cieląt do wieku 3 tygodni (prawie 30%) obserwowanych w latach 1980–1989. Czy tylko przypisywane urazy mechaniczne krów ciężarnych powodowane przez inne żubry były tego przyczyną? Zdaniem cytowanych autorów, na słaby rozwój płodu i upadki cieląt przy porodzie niewątpliwy wpływ miała silna inwazja pasożytnicza (motylca, nicienie) stwierdzona na początku tego okresu w rezerwatach.

Omawiane wcześniej objawy kliniczne neosporozy wskazują, że pierwotniak *N. caninum* może się również przyczynić do zaburzeń w rozrodzie żubrów.

## Podziękowanie

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

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

## Literatura

- Almeria S., Ferrer D., Pabon M., Castella J., Manas S. 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 107: 287–294.
- Bjerkas I., Mohn S.F., Presthus J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 70: 271–274.
- Björkman C., Hemphill A. 1998. Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunology*, 20: 73–80.
- Björkman C., Lunden A., Holmdahl J., Barber J., Trees A.J., Uggla A. 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, 16: 643–648.
- Cabaj W., Choromański L., Rodgers S., Moskwa B., Malczewski A. 2000. *Neospora caninum* in aborting dairy cows in Poland. *Acta Parasitologica*, 45: 113–114.
- Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Gill J. 2004. The evidence of antibodies to *Neospora caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Poland. *Proceedings of the Conferences European Bison Conservation, 30 september – 2 october 2004, Białowieża, Poland, 27–30.*
- Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Gill J. 2005. Antibodies to *Neospora caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Poland. *Veterinary Parasitology*, 128: 163–168.
- Canon-Franco W.A., Yai L.E., Souza S.L., Farias N.A., Ruas J., Rossi F.W., Gomes A.A., Dubey J.P., Gennari S.M. 2004. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 123: 275–277.
- Dackiewicz J., Olech W. 2006. Znaczenie Ośrodka Hodowli Żubrów w Białowieży dla restytucji gatunku *Bison bonasus*. [W:] *Perspektywy rozwoju populacji żubrów*, red. W. Olech, Wydawnictwo ARTISCO, Goczałkowice-Zdrój, 21–27.
- Dubey J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41: 1–16.
- Dubey J.P. 2005. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *Journal of Parasitology*, 91: 1217–1218.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. 1996. A review of *Nospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67: 1–59.
- Dubey J.P., Hattel A.L., Lindsay D.S., Topper M.J. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *JAVMA*, 193, No. 10.
- Dubey J.P., Thulliez P. 2005. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *Journal of Parasitology*, 91: 1217–1218.
- Ezio F., Anna T. 2003. Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Veterinary Parasitology*, 115: 75–78.
- Ferreglio E., Wambwa E., Castiello M., Trisciuoglio A., Prouteau A., Pradere E., Ndungu S., De Meneghi D. 2003. Antibodies to *Neospora caninum* in wild animals from Kenya, East Africa. *Veterinary Parasitology*, 118: 43–49.
- Gottstein B., Hentrich B., Wyss R., Thür B., Busato A., Stärk K.D.C., Müller N. 1998. Molecular and immunodiagnostic investigation on bovine neosporosis in Switzerland. *International Journal for Parasitology*, 28: 679–691.
- Goździk K., Cabaj W. 2007. Characterization of the first Polish isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Acta Parasitologica*, 52: 295–297.
- Hemphill A., Gottstein B. 2000. A European perspective on *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 30: 877–924.
- Lindsay D.S., Dubey J.P., Duncan R.B. 1999. Confirmation that dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 82: 327–333.

- Lindsay D.S., Weston J.L., Little S.E. 2001. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. *Veterinary Parasitology*, 97: 159–164.
- Lindsay D.S., Kelly E.J., McKown R.D., Stein F.J., Plozer J., Herman J., Blagburn B.L., Dubey J.P. 1996. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infection of coyotes with *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*, 82: 657–659.
- McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A., Mcguire A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 28: 1473–1478.
- Pčola Š., Adamec M., Pčola Š. jun. 2006. Reintrodukcja zubra (*Bison bonasus*) w Parku Narodowym Połoniny. [W:] *Perspektywy rozwoju populacji zubrów*. red. Wanda Olech, Wyd. ARTISCO, Goczałkowice-Zdrój 43–54.
- Rodrigues A.A.R., Gennari S.M., Aguiar D.M., Sreekumar C., Hill D.E., Miska K.B., Vianna M.C.B., Dubey J.P. 2004. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 124: 139–150.
- Romand S., Thulliez P., Dubey J.P. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research*, 84: 50–53.
- Thurmond M., Hietala S. 1997. Effect of congenitally infection acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 58: 1381–1385.
- Sedlak K., Bartova E. 2005. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*, 136: 223–231.
- Serrano E., Ferre I., Osoro K., Aduriz G., Mota R.A., Martinez A., del-Pozo I., Hidalgo C.O., Ortega-Mora L.M. 2007. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology*, 67: 729–737.
- Vitaliano S.N., Silva D.A., Mineo T.W., Ferreira R.A., Bevilacqua E., Mineo J.R. 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 122: 253–260.
- Yamaga M., Flechtner O., Gottstein B. 1996. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Parasitology*, 82: 272–279.