

Detección de anticuerpos de *Neospora* spp. en caballos, asociados a diferentes factores de riesgo en México

Kenia Jasher Padilla-Díaz ^a

Leticia Medina-Esparza ^{a*}

Carlos Cruz- Vázquez ^a

Irene Vitela-Mendoza ^a

Juan F. Gómez-Leyva ^b

Teódulo Quezada-Tristán ^c

^a Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, Km 18 Carretera Ags-SLP., Municipio de El Llano, Ags., 20330, Aguascalientes, México.

^b Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Agropecuarias, Aguascalientes, México.

^c Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

* Autor de correspondencia: imedinaesparza@yahoo.com.mx

Resumen:

Neospora spp. es un parásito protozoario causante de abortos y enfermedad del Sistema Nervioso Central (SNC) en diversas especies domésticas y silvestres. En equinos, se le ha involucrado como causa de aborto, mortalidad neonatal y enfermedades del SNC. La especie identificada en equinos es distinta a *Neospora caninum* y se denomina *Neospora hughesi*. El objetivo del presente, fue detectar la presencia de anticuerpos anti-*Neospora* spp., asociados a factores de riesgo en caballos de México. Se realizó una encuesta de cada cuadra y animales individuales de

cuatro regiones del país (Centro, Norte, Occidente y Sur) para identificación de los factores de riesgo. Se obtuvo un total de 684 muestras de sueros de caballos de las diferentes regiones, 52.3 % (358) machos y 47.7 % (326) hembras. Los sueros fueron conservados a -20 °C. El diagnóstico se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), los resultados de este fueron analizados para estimar la asociación entre la seropositividad y los factores de riesgo. La seroprevalencia a *Neospora spp.* fue de 2.34 % en la población estudiada; los casos positivos se encontraron principalmente en tres de las cuatro regiones incluidas, que presentaron una relación significativa a la presencia de anticuerpos anti-*Neospora spp.*; la convivencia de los caballos con otros animales obtuvo un valor de OR de 2.34 (IC 95%: 0.28 - 19.0; $P < 0.04$). Se concluye que, *Neospora spp.*, está presente en los caballos de México.

Palabras clave: *Neospora hughesi*, *Neospora spp.*, Equinos, Caballos, Factores de riesgo.

Recibido: 19/02/2019

Aceptado: 12/03/2020

Introducción

La neosporosis fue asociada por primera vez en caballos al reportarse la evidencia de *Neospora caninum* en un feto tardío y en la placenta⁽¹⁾; el segundo caso, fue en un potro de un mes de edad, que presentó ceguera congénita y desórdenes neurológicos⁽²⁾. Estudios moleculares, antigénicos y estructurales demuestran que la especie aislada en caballos con problemas neurológicos es diferente a la reportada, y la denominan *Neospora hughesi*⁽³⁾. Las especies *caninum* y *hughesi* son protozoarios intracelulares obligados del género *Neospora*, pertenece al Phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, orden Eucoccidiida, familia Sarcocystidae⁽⁴⁾. La *N. caninum* en caballos ha sido asociada a abortos y problemas reproductivos⁽⁵⁻⁸⁾, mientras que *N. hughesi* está relacionada con enfermedades neurológicas⁽⁹⁻¹¹⁾, también, asociada con *Sarcosystis neuronae*, causante de mieloencefalitis protozoaria equina (MPE), identificada como una enfermedad neurológica grave de los caballos, que produce pérdidas significativas en la producción equina, principalmente reportado en Estados Unidos⁽¹²⁾.

Los hospederos definitivos de *N. caninum* identificados son el perro doméstico⁽¹³⁾, coyote⁽¹⁴⁾, dingo australiano⁽¹⁵⁾ y lobo gris⁽¹⁶⁾, y como hospederos intermediarios varias especies silvestres y domésticas⁽¹⁷⁾, sin embargo, los hospederos definitivos de *N. hughesi*, no se han identificado y el caballo es considerado como único hospedero intermediario potencial⁽¹⁸⁾. La infección puede

ocurrir debido a la ingestión de ooquistes esporulados en alimento o agua contaminados; con respecto a la transmisión vertical actualmente es considerada solo como ruta alternativa^(19,20).

Las técnicas serológicas utilizadas para la identificación de anticuerpos de *Neospora* spp., son: técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmunoenzimático (ELISA), test de aglutinación de *Neospora* (TAN), Western blot (WB), manejan taquizoítos de *N. caninum* como antígeno, el uso de éste supone seropositividad para *Neospora* spp., debido a la reacción cruzada que presenta el parásito⁽²¹⁾, solo la biotecnología del ADN se utiliza para distinguir *N. hughesi* de *N. caninum*⁽²²⁾. El objetivo del estudio fue detectar la presencia de anticuerpos anti-*Neospora* spp., asociados a factores de riesgo en caballos de México.

Material y métodos

Lugar de estudio

Para este estudio se seleccionaron cuatro regiones de México según sus características geográficas y climáticas: Región Centro, Región Norte, Región Occidente, y Región Sur (Figura 1).

Figura 1: División geográfica de México por regiones de estudio



Diseño del trabajo

Se realizó un estudio epidemiológico de tipo transversal, durante el periodo comprendido del mes de octubre de 2016 a octubre de 2017. Se llevó a cabo en dos etapas; de campo y de laboratorio. Durante la etapa de campo se colectaron 5 ml de sangre completa en tubos vacutainer sin anticoagulante (BD Vacutainer®) por punción de la vena yugular de caballos aparentemente sanos, obteniendo un total de 684 muestras de las cuales correspondieron 75 a la Región Centro (10.96 %), 54 a la Región Norte (7.89 %), 298 a la Región Occidente (43.57 %) y 257 a la Región Sur (37.57 %).

A todos los animales que fueron muestreados se les realizó un examen físico para determinar su estado de salud, y se aplicó una encuesta a los propietarios de los caballos, la cual consistió en recabar información de las características generales de los animales (raza, edad, sexo y estado reproductivo) y sobre el manejo específico de la cuadra (uso de caballos, alimentación, alojamiento, fuentes de agua y contacto con otros animales). Las muestras de sangre obtenidas, se transportaron al laboratorio en refrigeración a 4.0 °C, donde fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 10 min para obtener el suero, el cual posteriormente fue separado con una pipeta de transferencia a tubos Eppendorf™ de 1.5 ml, los cuales se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Prueba serológica

La técnica de IFI, se realizó mediante un kit comercial para detectar anticuerpos IgG circulantes específicos de *Neospora* spp., utilizando laminillas antigenadas con taquizoitos de *N. caninum* cepa NC-1, (SLD-IFA-NC) y conjugado anti-equine IgG marcado con isotiacianato de fluoresceína (FITC-Conjugate VMRD). Las muestras de suero se diluyeron 1:25 en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se usó un control positivo y negativo como estándar, realizando la técnica de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Todos los sueros que presentaron fluorescencia en la dilución inicial se consideraron positivos y se diluyeron aún más hasta el punto final del título. La dilución más alta del suero que presenta fluorescencia se consideró como el título de punto final en esta técnica.

Análisis de los datos

Los datos generados a través de la encuesta (variables independientes) y los resultados positivos a la presencia de anticuerpos de *Neospora* spp. (variable dependiente) fueron analizados por el Software Estadístico STATA versión 10. Se obtuvo la distribución de la seroprevalencia con las variables independientes. La asociación entre la seroprevalencia de *N. caninum* en caballos y la presencia de otros animales, se realizó mediante un modelo de regresión logística (Ji cuadrada),

considerando $P < 0.05$. Finalmente se calcularon las razones de probabilidad (OR) entre los resultados positivos, los resultados negativos y la relación con el intervalo de confianza.

Resultados

Se detectó la presencia de anticuerpos anti-*Neospora* spp. en muestras de suero de caballos analizados mediante la técnica de IFI (Nc-1 *Neospora caninum*); las muestras de suero que presentaron títulos en una dilución de 1:50 fueron consideradas positivas. La seroprevalencia general obtenida fue de 2.34 % (16/684).

En base al total de animales seropositivos a *Neospora* spp, se analizó la variable estado reproductivo; donde el 50 % (8/16) de los animales presentaron anticuerpos anti-*Neospora* spp, en diferentes niveles de dilución, mayores al punto de corte (1:50), en el Cuadro 1, se observa que, en los machos enteros (4/16), la dilución máxima fue de 1:200, sin embargo, las hembras gestantes (3/16) alcanzaron diluciones de 1:200 y dos de ellas 1:400.

Cuadro 1. Porcentaje de niveles de titulación de anticuerpos de *Neospora* spp. según diluciones seriadas mediante la técnica de IFI

Animales	Títulos			
	1:50	1:100	1:200	1:400
Castrado	18.75 (3/16)	-	-	-
Entero	25.00 (4/16)	18.75 (3/16)	6.25 (1/16)	-
Potranca	6.25 (1/16)	-	-	-
Yegua	12.50 (2/16)	-	-	-
Gestante	18.75 (3/16)	18.75 (3/16)	18.75 (3/16)	12.50 (2/16)
Vacía	6.25 (1/16)	-	-	-
Recién parida	12.50 (2/16)	12.50 (2/16)	-	-
Total	100.0 (16/16)	50.00 (8/16)	25.00 (4/16)	12.50 (2/16)

Las variables de la encuesta incluidas en el estudio, se analizaron para identificar los posibles factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos anti-*Neospora* spp. Los resultados se presentan en el Cuadro 2, observándose que, el mayor número de casos positivos (62.50 %) fue en caballos de la región occidente, en la centro, de 6.25 %, sur 31.25 % y en la región norte no hubo casos positivos, esta variable no tuvo significancia estadística ($P < 0.05$). Del total de animales positivos a la presencia de anticuerpos anti- *Neospora* spp. el 43.75 % fueron machos y el 56.25 % hembras. Para la variable convivencia de los caballos con otros animales se observó un OR de 2.34 (IC 95%: 0.28 - 19.0; $P = 0.04$). Mientras que las variables uso de los caballos y alojamiento mostraron valores de $P < 0.20$, al ser analizadas con regresión logística la variable

alojamiento obtuvo un OR de 3.12. Las variables edad, raza, estado reproductivo y fuente de agua no presentaron significancia estadística ($P>0.05$).

Cuadro 2: Distribución de *Neospora* spp. en sueros positivos y negativos en caballos de México y los factores asociados

Variable	Muestras		<i>Neospora</i> spp.		P-value	OR (CI 95%)
	N	%	+	-		
Región:						
Centro	75	10.96	1 (6.25)	74	0.36	.79 (0.49-1.29)
Norte	54	7.89	0 (0.00)	54		
Occidente	298	43.57	10 (62.50)	288		
Sur	257	37.57	5 (31.25)	252		
Sexo:						
Macho	358	52.34	7 (43.75)	351	0.49	0.45 (0.03-6.18)
Hembra	326	47.66	9 (56.25)	317		
Edad:						
Joven (7-24 m)	68	9.94	1 (6.25)	67	0.21	1.09 (0.47-2.51)
Adulto (25-48 m)	375	54.82	10 (62.50)	365		
Viejo (>48 m)	241	35.23	5 (31.25)	236		
Raza:						
Criollo	262	38.30	6 (37.50)	256	0.68	1.09 (0.22-5.40)
Puro	422	61.70	10 (62.50)	412		
Estado reproductivo:						
Entero	293	42.84	4 (25.00)	289	0.13	0.69 (0.32-1.49)
Castrado	65	9.50	3 (18.75)	62		
Potranca	26	3.80	1 (6.25)	25		
Yegua	121	17.69	2 (6.25)	119		
Gestante	53	7.75	3 (18.75)	50		
Vacía	115	16.81	1 (6.25)	114		
Recién Parida	11	1.61	2 (12.50)	9		
Uso de los caballos:						
Competencia	329	48.10	6 (37.50)	323	0.10	0.25 (0.04-1.35)
No competencia	355	51.90	10(62.50)	345		
Alimentación:						
Forraje	325	47.51	9 (56.25)	316	0.06	1.14 (0.27-4.76)
Pastoreo	269	39.33	4 (25.00)	265		
Mixto	90	13.16	3 (18.75)	87		
Alojamiento:						
Caballeriza	340	49.71	8 (50.00)	332	0.20	3.12 (0.49-21)
Potrero	344	50.29	8 (50.00)	336		
Conviven otros					0.04	2.34 (0.28-19)

animales:	598	87.43	15 (93.75)	583		
Si	86	12.57	1 (6.25)	85		
No						
Fuentes de agua:						
Pozo abierto	341	49.85	8 (50.00)	333	0.78	0.86 (0.31-2.41)
Bordo	343	50.15	8 (50.00)	335		
Total	684	100.00	16 (100.00)	668	-	-

Discusión

La neosporosis en caballos ha sido reportada a nivel mundial con diferente seroprevalencia⁽²³⁻²⁶⁾. En el presente estudio se detectó el 2.34 % de anticuerpos anti-*Neospora* spp. en caballos de cuatro regiones de México. Otros estudios han reportado seroprevalencias similares al presente, en Brasil del 2.5 % y 4.1 % a la presencia de *Neospora* spp.^(6,18), Costa Rica el 3.5 %, Nineveh región de Iraq 3.7 % y en Durango, México reportaron una seroprevalencia del 3 % a la presencia de anticuerpos anti-*N. hughesi*⁽²⁷⁻²⁹⁾, sin embargo se han reportado seroprevalencias más altas a la presencia de anticuerpos anti- *Neospora caninum* en Estados Unidos 34 %, Irán 20 %, Brasil 48.27 % y Perú 12 %⁽²³⁻²⁶⁾. La importancia de detectar en caballos la presencia de anticuerpos anti- *Neospora* spp., contribuye con la aportación del estado epidemiológico que guarda esta enfermedad en México, y en esta especie que representa un sistema productivo importante en las explotaciones pecuarias. La seroprevalencia a *Neospora* spp. detectada en hembras y machos fue de 2.7 % y 2.0 % respectivamente. Estudios en Brasil reportaron un 4.3 % en hembras y 3.7 % en machos⁽⁶⁾; a diferencia de los resultados de Israel que fueron el 13,0 % en machos y 10.9 % en hembras⁽⁸⁾, coincide con lo reportado en Brasil, que a pesar de no ser estadísticamente significativo, se debe observar que tienen similitud de riesgo de infección tanto hembras como machos.

Los caballos que participaron en el presente estudio, fueron de diferentes regiones de México, observándose que las regiones occidente y sur presentaron un mayor porcentaje de caballos positivos a la presencia de anticuerpos anti-*Neospora* spp. en comparación de la región centro y norte. Estudios similares reportaron que en Brasil hubo variaciones 5.6 % y 2.6 % en las regiones costeras y de las montañas respectivamente⁽⁶⁾; en Jordania también se documenta la presencia del parásito en los caballos de acuerdo a su ubicación⁽³⁰⁾, esto podría sugerir la influencia de la presencia de *Neospora* spp. en caballos por su localización geográfica y el clima de cada región.

En este estudio se obtuvo un OR de 1.1 para las variables edad, raza y alimentación, no observándose diferencia estadística. Estos resultados coinciden con los reportes de Israel⁽⁸⁾, Brasil⁽²⁵⁾, Jordania⁽³⁰⁾ e Italia⁽³¹⁾, y se puede considerar que estas variables, aunque no sean

estadísticamente significativas, la importancia biológica como factor de riesgo es mayor con su incremento, aumenta la probabilidad de adquirir la infección de este parásito. Para la variable tipo de alojamiento el OR obtenido fue de 3.12 en este estudio, coincidiendo con lo reportado en Israel⁽⁸⁾, considerándose como un factor de riesgo para aumentar la probabilidad de infección a *Neospora* spp. La variable convivencia con otros animales asociada a la presencia de *Neospora* spp., el OR obtenido fue 2.34 ($P<0.05$), coincidiendo con diversos estudios realizados principalmente en Brasil^(5,6,25), que analizaron la misma variable con un OR 1.35 ($P<0.05$). Estos resultados indican, que la presencia de otros animales aumenta el riesgo de los caballos a adquirir el parásito *Neospora* spp.

Conclusiones e implicaciones

En este estudio se identificaron anticuerpos anti *Neospora* spp. en los caballos de las regiones estudiadas, lo que implica el riesgo de la presencia de Neosporosis en las explotaciones equinas; de los casos positivos ninguno mostro signos clínicos característicos de la enfermedad. La variable convivencia con otros animales es el factor de riesgo que presentó mayor relación con la seropositividad, sin embargo, es necesario realizar un análisis considerando las diferentes categorías de cada variable. Se requiere realizar estudios que permitan identificar al huésped definitivo para conocer mejor el mecanismo de transmisión de la enfermedad a los caballos, e identificar de manera precisa la especie de *Neospora* presente en caballos.

Agradecimientos

Se agradece a los propietarios de los animales incluidos en el estudio por las facilidades prestadas para el desarrollo del trabajo.

Literatura citada:

1. Dubey JP, Porterfield, ML. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. Int J Parasitol 1990;76:732-734.
2. Lindsay DS, Steinberg H, Dubielzig RR, Semrad SD, Konkle DM, Miller PE, *et al.* Central nervous system neosporosis in a foal. J Vet Diagn Invest 1996;8:507–510.
3. Marsh AE, Barr BC, Packham AE, Conrad PA. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). J Parasitol 1998;84(5):983–991.
4. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. Infect Genet Evol 2013;13:133–150.

5. Abreu RA, Weiss RR, Thomaz-Soccol V, Locatelli-Dittrich R, Laskoski LM, Bertol MA, *et al.* Association of antibodies against *Neospora caninum* in mares with reproductive problems and presence of seropositive dogs as a risk factor. *Vet Parasitol* 2014;202(3-4):128-131.
6. Moura AB, Silva MO, Farias JA, Vieira-Neto A, Souza AP, Sartor AA. *Neospora* spp. antibodies in horses from two geographical regions of the states of Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013;22(4): 597-601.
7. Veronesi F, Diaferia M, Mandara MT, Marenzoni ML, Cittadini F, Piorgili-Fioretti DP. *Neospora* spp. infection associated with equine abortion and/or stillbirth rate. *Vet Res Commun* 2008;32: 223-226.
8. Kligler EB, Shkap V, Baneth G, Mildenberg Z, Steinman A. Seroprevalence of *Neospora* spp. among asymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel. *Vet Parasitol* 2007;148:109-113.
9. Renier AC, Morrow JK, Graves AJ, Finno CJ, Howe DK, Owens SD, *et al.* Diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis using indirect fluorescent antibody testing and enzyme-linked immunosorbent assay titer ratios for *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi*. *J Equine Vet Sci* 2016;36:49–51.
10. Antonello AM, Pivoto FL, Camillo G, Braunig P, Sangioni LA, Pompermayer E, *et al.* The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses. *Vet Parasitol* 2012;187:367–370.
11. Finno CJ, Eaton JS, Alemán M, Hollingsworth SR. Equine protozoal myeloencephalitis due to *Neospora hughesi* and equine motor neuron disease in a mule. *Vet Ophthalmol* 2010;13(4):259-265.
12. Dubey JP, Calero-Bernal R, Rosenthal BM, Speer CA, Fayer R. *Sarcocystosis of animals and humans*. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press.; 2016.
13. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998;28(9):1473–1499.
14. Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2004;34:159-166.
15. King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2010;40:945–950.

16. Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, *et al.* Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 2011;181:382–387.
17. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals-the last five years. *Vet Parasitol* 2011;180:90–108.
18. Hoane JS, Gennari SM, Dubey JP, Ribeiro MG, Borges AS, Yai LE, *et al.* Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. *Vet Parasitol* 2006;136:155-159.
19. Dubey JP, Hemphill A, Calero-Bernal R, Schares G. Neosporosis en animales. Boca Raton, Florida: CRC Press.; 2017.
20. Pusterla N, Conrad PA, Packham AE, Mapes SM, Finno CJ, Gardner IA, *et al.* Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. *J Parasitol* 2011;97:281–285.
21. Gondim LF, Lindsay DS, McAllister MM. Canine and bovine *Neospora caninum* control sera examined for cross-reactivity using *Neospora caninum* and *Neospora hughesi* indirect fluorescent antibody tests. *J Parasitology* 2009;95(1):86-88.
22. Al-Qassab S, Reichel MP, Ivens A, Ellis JT. Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Mol Cell Probes* 2009;23:132-139.
23. James KE, Smith WA, Conrad PA, Packham AE, Guerrero L, Ng M, *et al.* Seroprevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* among healthy horses in the United States. *Proc Am Assoc Equine Pract.* 2015;61:524.
24. Tavalla M, Sabaghan M, Abdizadeh R, Khademvatan S, Rafiei A, Razavi-Piranshahi A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. infections in Arab horses, southwest of Iran. *J J Microbiol* 2015;8:e14939.
25. Cazarotto CJ, Balzan A, Grosskopf RK, Boito JP, Portella LP, Vogel FF, *et al.* Horses seropositive for *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora* spp.: Possible risk factors for infection in Brazil. *Microb Pathog* 2016;99:30–35.
26. Luza M, Serrano-Martínez E, Tantaleán M, Quispe M, Casas G. Primer reporte de *Neospora caninum*, en caballos de carrera de Lima, Perú. *Salud Tecnol Vet* 2013;1:40-45.

27. Dangoudoubiyam S, Oliveira JB, Viquez C, Gómez-García A, González O, Romero JJ. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in horses from Costa Rica. *J Parasitol* 2011;97:522–524.
28. Al-Obaidii WA, Al-Kennany ER. Investigation of *Neospora hughesi* antibodies by using ELISA in horses in Nineveh Province. *Assiut Veterinary Med J* 2014;60:167–170.
29. Yeargan MR, Alvarado-Esquivel C, Dubey JP, Howe K. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses from Mexico. *Parasite* 2013;20:29.
30. Talafha AQ, Abutarbush SM, Rutley DL. Seroprevalence and potential risk factors associated with *Neospora* spp. infection among asymptomatic horses in Jordan. *Korean J Parasitol* 2015;53:163-167.
31. Bártová E, Machacová T, Sedlák K, Budíková M, Mariani U, Veneziano V. Seroprevalence of antibodies of *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* in horses from southern Italy. *Folia Parasitol (Praha)* 2015;62:043.