

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOCAELİ SIĞIRLARINDAKİ *NEOSPORA*
***CANINUM*'UN PREVALANSI**

FATİH AKTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

GEBZE
2002

GYTE

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOCAELİ SIĞIRLARINDAKİ *NEOSPORA*
***CANINUM*'UN PREVALANSI**

FATİH AKTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. İ. YAVUZ SEZEN

GEBZE
2002
GYTE

KABUL VE ONAY SAYFASI

.....'ın tez çalışması G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri / Sosyal Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.....tarih ve sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye

(Tez Danışmanı) :(Ünvanı,Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye : (Ünvanı,Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye : (Ünvanı,Adı Soyadı) (Üniversite)

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri/Sosyal Bilimler Enstitüsü
Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı

İmza/ Mühür

ÖZET

Neospora caninum sığırlarda konjenital enfeksiyon ve abortlara neden olan bir parazittir. *Neospora caninum* yaygın olarak omurgalı soyunu enfekte edebilme özelliğine sahip bir protozoondur. Neosporosis hastalığına sebep olan bu organizma İlk defa 1988 yılında bir köpeğin merkezi sinir sisteminden izole edilmiştir. *Toxoplasma gondii*'ye olan benzerliği nedeniyle uzun yıllar yanlış olarak teşhis edilmiştir. Kocaeli ili ve çevresinde ilk kez yapılan bu çalışmada 97 adet inekten alınan kan örneklerinin serum analizleri yapılmıştır. Elde edilen örneklerin serumları ayrıldıktan sonra – 20 °C incelemeler için saklanmıştır. Serumlardaki seropozitiflik monoklonal antikorlarla hazırlanmış vMRD inc, competitive ELİSA (cELİSA) kiti kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan bu testlerin sonucunda Kocaeli bölgesinde 97 örnekten 5 tanesinin kanında seropozitiflik tespit edilmiştir. Seropozitifliği tanımlanan hayvanların parazit kimliği, yaşı, aborta sebebiyet vermesi ve çevresel faktörler gibi etmenler yönünden *Neospora caninum* ile bağlantısı analiz edilmiş Kocaelinde % 5.05 seroprevalans belirlenmiş olup pozitif örneklerin yaş dağılımlarının 3-5 arasında olduğu bulunmuştur.

SUMMARY

Neospora caninum causes congenital infections and abortions in cows in many countries. This study is about seroprevalences of *Neospora caninum* parasites and has been conducted for the first time in Kocaeli region. *Neospora caninum* is a protozoon which can infect a wide variety of cordota animals and causes neosporosis disease. For the first time in 1988 this organism isolated from a dog's nervous system. Because of its similarity to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* has been misdiagnosed for many years in the past. For this reason blood samples have been taken from cows in many areas in Kocaeli region. These samples were brought to the laboratories to split into its serum and kept at 20°C. Serums were obtained by means of seropositivity monoclonal anticors by using vMRD inc, cELISA kit. After examination of 96 samples, seropositivity found in 5 of them. Cows, which have seropositivity in their bloods, have been studied in relation with *Neospora caninum* in terms of age, environmental factors and causes to abortion.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı Yüksek lisans tezi olarak öneren ve çalışmalarımız esnasındaki ilgi yardımlarından dolayı tez danışmanım sayın Prof. Dr. İ.Yavuz Sezen'e teşekkürü borç bilirim. Deneylerimizde laboratuvar imkanları sağlayan Pendik Veteriner ve Kontrol Araştırma Merkezinde yapılmasında özellikle emekleri üzerimize geçen ve bize her konuda yardımcı olan Doç.Dr. Gülay Bıyıkoglu'na ve tez yazımındaki yardımlarından dolayı Arş.Gör. Abdurrahman Geymen'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
1.GİRİŞ	1
2. KONU İLE İLGİLİ YAYIN VE ÇALIŞMALAR	2
2.1.Sınıflandırma	2
2.2. Morfoloji	3
2.2.1. Taşizoit (Trofozoit, Endozoit) formu	3
2.2.2. Bradizoit (kistizoit) formu	5
2.2.3. Ookist formu	5
2.3. Biyoloji	9
2.4. Yayılışı	11
2.4.1.Sığırlardaki Yayılışı	11
2.4.2. Köpeklerdeki yayılışı	13
2.5. Klinik semptomlar	14
2.5.1. Sığırlarda görülen Klinik Semptomlar	14
2.5.2. Koyunlarda görülen klinik semptomlar	15
2.5.3.Köpeklerde Görülen Klinik Bulgular	15
2.6. Patoloji	16
2.7. Tanı	18
2.7.1.Histopatolojik tekniklerle teşhis	19
2.7.1.1 Işık mikroskobu ile teşhis:	19
2.7.1.2. Elektron Mikroskobunda Teşhis:	19
2.7.1.3. İmmuno-Patolojik Teşhis :	20
2.7.2.Serolojik Teşhis:	20
2.7.2.1. İFAT :	20

2.7.2.2. ELİSA :	20
2.7.2.3. Kùltür	21
2.8.Tedavi	21
2.9. Koruma ve kontrol	21
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1.Materyal	22
3.2.Metot	22
3.2.1. Kit İçindekiler	22
3.2.2.Gerekli Malzemeler	23
3.2.3.Saklama	23
3.2.4.Hazırlama	23
3.2.5.Testin Uygulanması	24
3.2.5.1.Örnekleri ve Kontrolleri Doldurma	24
3.2.5.2.Test Değerlendirme	24
3.2.6. Ekim alışmaları	25
4.BULGULAR	27
5.TARTIşMA ve SONUÇ	29
KAYNAKLAR	32
ÖZGEçMİş	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

PCR	Polynucleotit Chain Reaction
PAS	Periyodik Asid Schiff Boyası
i.v.	intra venöz (Damar içi)
i.m.	intra muscular (kas içi)
RF	Romatoit Faktör
ANA	Anti-Nüklear Antikor
mg	miligram
ml	mililitre
µl	mikrolitre
µm	mikrometre
kDa	kilodalton
O.D.	Optik Dansite
mAb	Monoklonal Antibody
ELİSA	Enzyme-linked immunosorbent assay
İFAT	İndirect fluorescent antibody test
PBS	Phosphate buffered saline
HRP	Horseradish peroxidase
cELİSA	Competetive enzyme-linked immunosorbent assay

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. <i>N.caninum</i> ve <i>T.gondii</i> Taşizoitlerinin Elektron Mikroskopik Görüntüleri	4
2.2. <i>N.caninum</i> ve <i>T.gondii</i> Bradizoitlerinin Elektron Mikroskopik Görüntüleri	6
2.3. <i>T.gondii</i> Bradizoiti Mikroporunun Elektron Mikroskopik Görüntüleri	7
2.4. <i>N.caninum</i> Doku Kistlerinin Elektron Mikroskopik Görüntüleri	7
2.5. <i>T.gondii</i> 'nin VEG Soyunun Doku Kistinin Elektron Mikroskopik Görüntüsü	8
2.6. <i>Neospora caninum</i> 'un Hayat Döngüsü	9
3.1. Ekim Çalışmalarının Yapıldığı Laboratuar ve Malzemeleri	26
3.2. Yeni Abort Olmuş Bir Fötüsün Muamele Edilmemiş Hali	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Ülkelere Göre Abort Vakaları	11
4.1. Alınan OD(Optik dansite)'ye Göre Hesaplanmış İnhibisyon Değerleri	27
4.2. Kocaeli İlindeki Yerleşim Yerlerine Göre Seropozitiflik	27
4.3. Pozitif Serumların Yaşa Göre Dağılımı ve İnhibisyon Değerleri	28
4.4. İnhibisyon Değerleri ile serum Sayısı Grafik Gösterimi	28

1.GİRİŞ

Bir tarım ülkesi olan Türkiye’de hayvancılık sektörü önemli bir yere sahiptir. Ancak günümüzde bu sektörün gelişmesini engelleyen bir çok faktör mevcuttur. Bu faktörler arasında son yıllarda ülkemize dışarıdan taşınmış bir çok hastalıklar da bulunmaktadır. Bunlar arasında atıkla seyreden hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır. Neosporosis atık belirtileriyle seyreden bir enfeksiyon olmakla beraber, ülkemizde bununla ilgili çok az sayıda araştırma bulunmakta ve bu nedenle hastalığın yayılışı ve oluşturduğu etki tam olarak bilinmemektedir.

Neosporosisin sığırlarda atığa neden olduğu 1987 yılında belirlenmiştir. Ancak parazitin A.B.D. de 1957 yılından beri saklanan doku örneklerinde de bulunduğu, tespit edilemediği için gözden kaçtığı saptanmıştır. Hastalık sığırlarda 3-9 aylarda yavru atımına neden olmaktadır. Meydana getirmiş olduğu enfeksiyonda yavru atımı tekrarlanabilir niteliktedir ve ciddi ekonomik problemlere yol açmaktadır. Son yıllarda bir çok ülkede bu parazit üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Ülkelere ve araştırmacılara göre değişmekle birlikte, atık yapmış sığırların genel olarak 1/3’ünde neosporosise rastlanmakta, bu oran bazen % 67’ye kadar çıkmaktadır.

Hastalığın bir çok şikayete yol açması, yakın ülkelerde hastalığın bulunması ve bazı atıkların sebebinin belirlenememesi ülkemizde de bu hastalığın ciddi boyutlarda olabileceği konusunda şüphe uyandırmaktadır.

Bu çalışmada, Kocaeli ili sığırlarında *Neospora caninum*’un seroprevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KONU İLE İLGİLİ YAYIN VE ÇALIŞMALAR

Dünyada ilk kez 1984 yılında Norveç'te sinirsel bozukluk ve felç belirtileri gösteren yeni doğmuş köpeklerde morfolojik olarak *Toxoplasma gondii*'ye benzer yapıda ancak farklı olan bir protozoona rastlanmıştır, fakat tanımlanamamıştır. 1988 yılında etken Dubey ve arkadaşları tarafından A.B.D.de izole edilerek *Neospora caninum* olarak adlandırılmış, 1995 yılında da Avrupa'da izole edilmiştir(7,13,16,18,36).

Amerika da çeşitli amaçlar için saklanan köpek dokularında yapılan retrospektif analizlere göre etkenin 1957 yılından beri var olduğu fakat teşhis edilemediği için gözden kaçtığı saptanmıştır (36,).

Türkiye'de neosporosis çok iyi bilinmemektedir. Türkiye'de konu ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır(3,9).

2.1.Sınıflandırma

Elektron mikroskopik ve PCR çalışmaları ile etkenin nükleotit dizileri DNA sıklığı ve ribozomal RNA'ları incelenmiş ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır(21,33,38).

Anaç	: Apicomplexa	Levine , 1970
Sınıf	: Sporozoa	Leuckart, 1879
Sınıfaltı	: Coccidia	Leuckart, 1879
Takım	: Eimeriina	Leger , 1911
Aile	: Sarcocystidae	Poche, 1913
Cins	: Neospora	
Tür	: Neospora sp.	<i>N. caninum</i>

2.2. Morfoloji

N. caninum 'un üç infektif evresi bulunmaktadır.

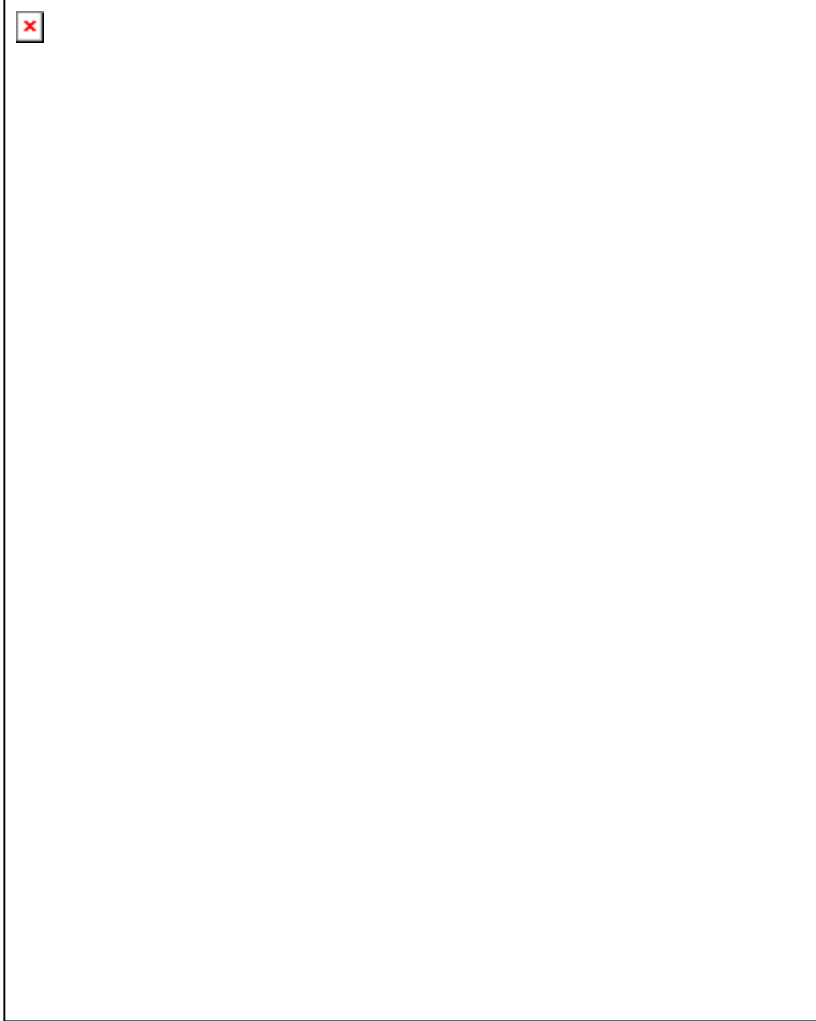
1. TAŞİZOİT (Trofozoit, Endozoit) formu
2. BRADİZOİT (Kistizoit) formu
3. OOKİST formu

2.2.1. Taşizoit (Trofozoit, Endozoit) formu

Taşizoit form özellikle beyin, omurilik plasenta, fetüs olmak üzere birçok organdan izole edilmiştir. Taşizoitlere özellikle makrofajlarda, polimorf çekirdekli lökositlerde, sinir hücrelerinde ve birçok değişik hücre tipinde rastlanmaktadır. Taşizoitler, Giemsa ve Wright boyasıyla boyandıktan sonra ovoid formda görülürler ve elektron mikroskopla yapıları incelendiğinde organel yönünden oldukça gelişmiş oldukları görülmüştür. Taşizoitlerin tamamen doku olan yapısında hücre çeperi, mikronem konoid, 8-12 anter ve 4-6 posterior roptri, nukleus nukleus zarı, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve mitokondri bulunur(13,14,15,16,17,18,38).

Taşizoitler 4-7 veya 1,5 –5 µm çapında tipik apikompleksan şeklinde olup, hücre içerisinde parazitofor vakuolde bulunanlar kabaca muz şeklinde olup, hücre içerisinde serbest olanlar ise yuvarlağa yakın şekildedir. Serbest olanlar ikili, üçlü veya daha fazla sayıdan oluşan gruplar halinde spinal sıvıdaki mononükleer hücreler, kan damarları çevresindeki sinir hücreleri ve diğer vücut hücrelerinde bulunurlar. Bir veya iki çekirdek taşırlar. Tek plazmolemma içeren peliküle sahip olan iç tarafta çift katlı membran kompleksi vardır. Polar halka ve buradan çıkan 22 adet subpelikular mikrotübül ve konoidin arkasında iki apikal halka bulunur. Parazitin ön yarımında 12 roptri, konoid hizasında ise 6-8 roptri vardır. Mikronem ön yarımda fazla sayıda arka yarımda ise azdır. Sitoplazmada 2-8 adet ovalimsi elektron koyu cisimcik yer alır. Çekirdek ve çekirdekçik parazitin arka yarımına yerleşmiştir. Ayrıca golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, ribozomlar ve 1-2 adet mitokondri bulunur. Mikropor yok veya varsa inaktiftir. Parazitofor vakuolde intravakuoler tübüller mevcuttur(36,32,13,14,15,21).

2.2.2. Bradizoit (kistizoit) formu



Şekil 2.1. *N.caninum* ve *T.gondii* taşızoitlerinin elektron mikroskopik görüntüleri

Şekil 1. M617 hücrelerinde yetiştirilen *N.caninum* NC-5 içindeki parazitofor vakuolündeki taşızoitlerde çeşitli organeller ve inkluzyon cisimcikleri gösterilmektedir. Mikronemlerden bazıları (Mn) pelikulaya düşey olarak uzanmış roptriler elektron yoğun olarak tek şekillidir. Onlardan biri (Rh) boyun kısmından arkaya doğru gelişmiştir. Yaklaşık olarak 10 yoğun granül (Dg) arkada yerleşmiş ve 3 tanesinde nükleusun önüne yerleşmiştir

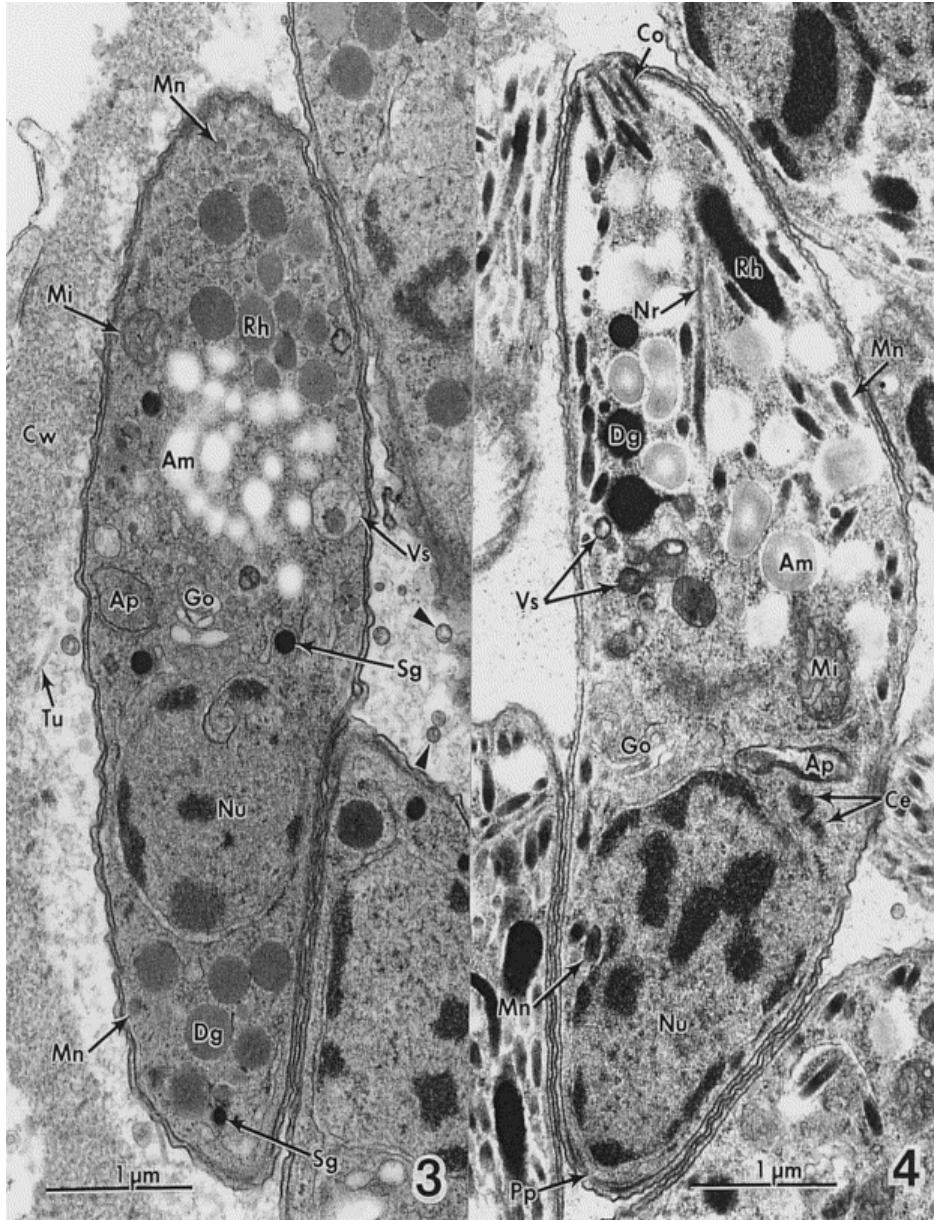
Şekil 2. Fare peritoneal makrofajındaki parazitofor vakuol (PV) içinde VEG *T.gondii* taşızoiti, labirent şekilli roptriler (Rh) ve içersinde bir plastid (Ap*) içeren endodiyogeni ile çoğalmanın erken aşamasında yeni bir (zoite), Golgi kompleksi (Go*), iç membran kompleksi (Im*)ve roptriler (Rh*) ana zoit içinde gelişmektedir. Bazı taşıyıcı hücre mitokondrileri (*) parazitofor vakuole yakın yerleşmişlerdir. Kısaltmalar; Am,amilopektin; Ar 1,2, uç halkalar 1 ve 2; Co, konoidGo, Golgi kompleksi; Hc taşıyıcı hücre sitoplazması, Im, pelikulanın iç zar kompleksi; Lb, yağ cisimciği; Mi, Mitokondri; Mn, mikronem; No, çekirdekçik; Nu, çekirdek; plazmolemma; Pr 1,2, kutup halkaları 1 ve 2; Sm, pelikula altı mikrotübüller; Tm, tubulovesküler membran ağı.(C.A. Speer)

N.caninum bradizoitlerinin ölçüleri ise 7.3 -1.5 µm dur. Bradizoitlerde, taşizoit formda bulunan organellere sahiptir. *Neospora caninum* bradizoitleri, diğer Coccidia sınıf altında bulunan protozoonların bradizoitlerinden, mikropor içermemesiyle ayrılır. Parazitin doku kistleri yuvarlak veya ovalimsi yapıda olup, periyodik acid schiff boyası (PAS), Wrigt Giemsa ve immunoperoksidase boyaları ile çok boyanırlar. Kistler 24.3 -19.2µm büyüklüğündedir. Mikropordan yoksun 50-200 civarında bradizoit içermektedir. *N.caninum* kistlerinin duvarlarıda 0.74 - 4 µm kalınlığındadır ve iki tabakadan oluşur. Bunlar ince primer yapıdaki kist duvarı birinci tabakayı, kalın granüler duvarı da ikinci tabak olan dış tabakayı oluşturur. (13,14,15,16,17,38)

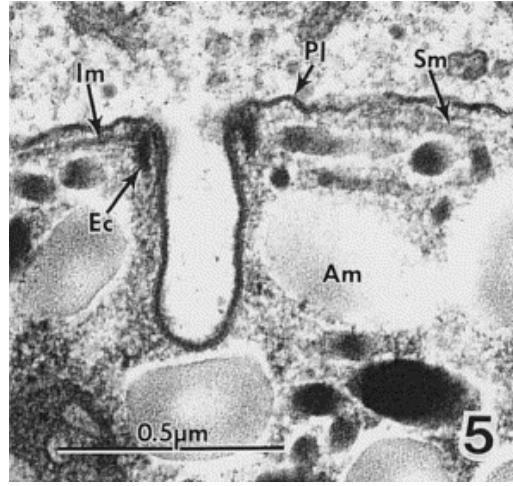
Sadece merkezi sinir sisteminde bulunan doku kistleri , 1.4 µm kalınlıkta bir duvara sahip olup, septum benzeri yapılarla bölümlere ayrılmakta ve kist duvarında lipid benzer yapılar görülmekte, ayrıca vesiküler yapılar bulunmaktadır. Kistler içerisinde bulunan bradizoitler ise ince yapılı ve 3-4.3 veya 0.9-1.1 µm çapında olup, sinir hücrelerinde paket halinde bulunur ve PAS pozitif granüller fazladır. Taşizoitlerde ise bu granüller daha azdır.(36,32,14,15,18)

2.2.3.Ookist formu

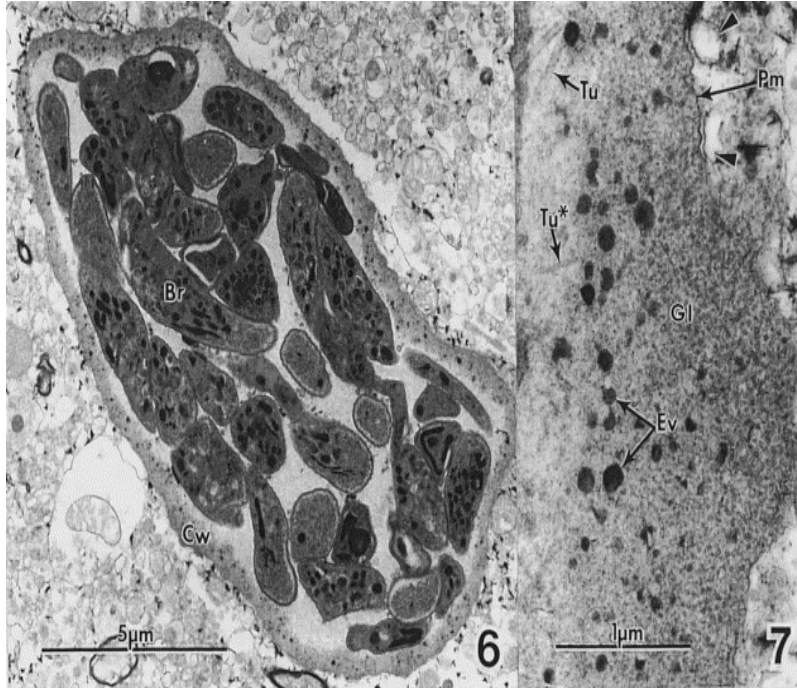
Bu form köpeklerin dışkıyla dışarı atılmaktadır. Önceleri ayrı tür sanılan, köpek orijinli *N.caninum* ile sığır orijinli *Neospora sp.* arasında morfolojik yapı açısından bir fark görülememiştir. Küre veya küre benzeri ookistler 11.7±0.43 ile 11.3±0.38 arasındadır. Uzunluk genişlik oranı (U/G) 1.04 tür. Ookist duvarı düz, renksiz ve 0.6-0.8 kalınlığındadır. Genellikle tek tabakalıymış görünmesine rağmen bazen birden fazla tabaka şeklinde de olabilir. Ookist duvarında mikropile rastlanmamaktadır. Ookist içersinde ookist rezidüleri bulunmamaktadır. Sporosistler arasında nadir olarak ince parlak granüller görülmesine rağmen polar granüller görülmemektedir (32,22,15,13,23,24).



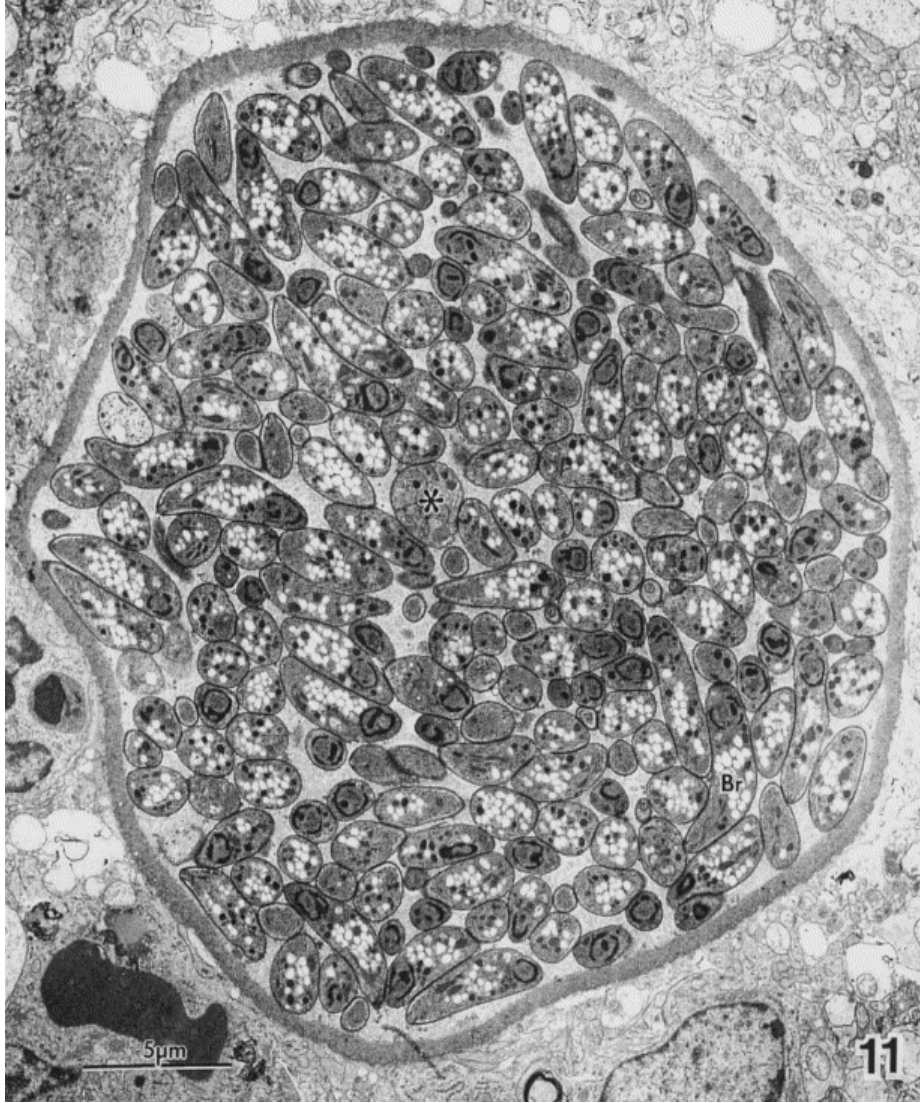
Şekil 2.2. *N. caninum* ve *T. gondii* bradizoitlerinin elektron mikroskopik görüntüsü. Şekil 3. *N. caninum* NC-Liverpool. Uç aşağıya doğru yerleşmiş çekirdek (Nu) ve mikronemler (Mn) bulunduran çekirdeğin arkasındaki sitoplazma, 6 yoğun granül(Dg), küçük yoğun granül(Sg), hücre duvarının(Cw) iç yüzeyinden çıkıntı oluşturmuş tübüller(Tu) ve veziküller(oklar) bradizoitlerin arasına saçılmıştır. Şekil 4. *T. gondii* VEG soyunun uç kısmında çekirdek bulunduran bradizoiti. Arkaya doğru boyun kısmından bir çıkıntı ile arkaya bağlanmış roptrilerden(Rh) biri (Dubey et al dan) Kısaltmalar: Am.



Şekil 2.3. *T.gondii* bradizoiti mikroporunun elektron mikroskopik görüntüsü. Am, Ami-lopektin, Ec, mikroporun elektron yoğun uzantısı, Im, iç membran kompleksi; Pl, Plazmalemma; Sm, Pelikula altı mikrotübül (C.A. Speer et al.)



Şekil 2.4. *N.caninum* doku kistlerinin elektron mikroskop görüntüleri. Şekil 6. NC-5 *N.caninum* doku kistinün düzensiz şekilli bir hücre duvarı(Cw) tarafından çevrelenmiş yaklaşık 30 bradizoit(Br) gösterilmektedir. Şekil 6 daki hücre duvarının bir parçasının yüksek büyütülmüş hali, granüler tabaka(Gl) içine iyice yerleşmiş elektron yoğun vezikülleri(Ev), hücre duvarının iç cephesinden çıkıntı oluşturan küçük(Tu*) ve geniş(Tu) tübüllerler (C.A. Speer et al.)

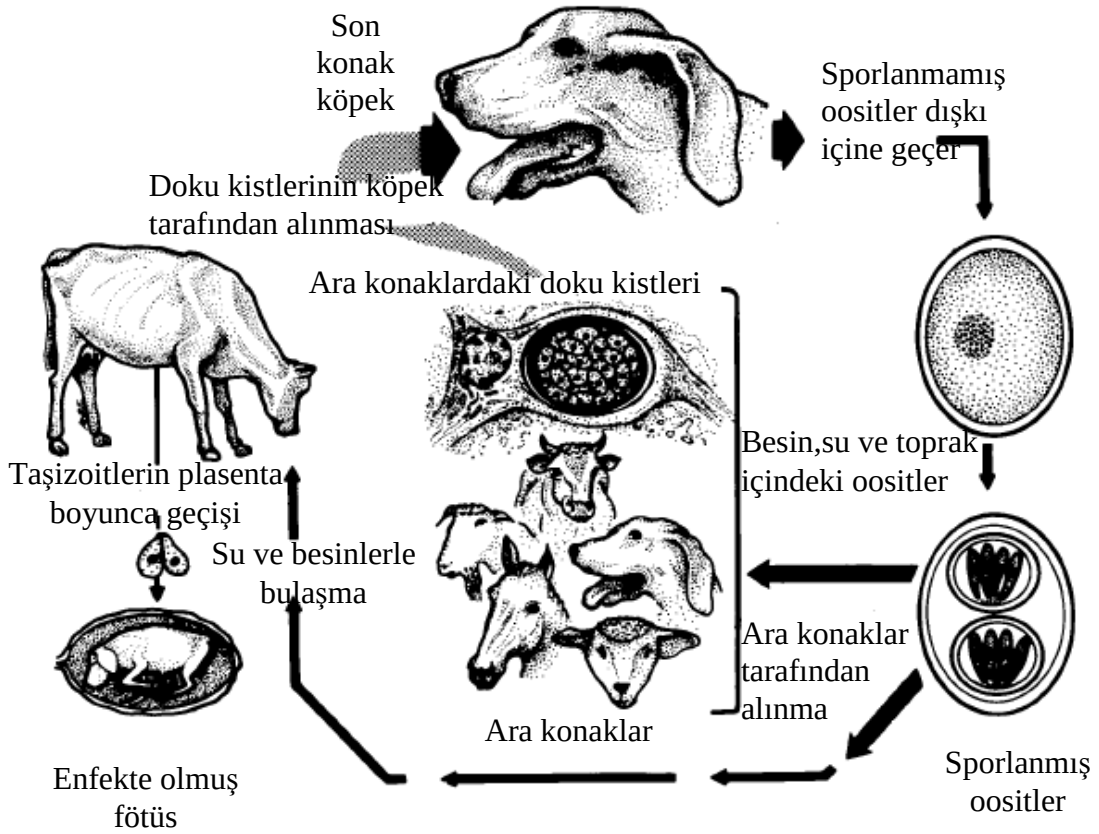


Şekil 2.5. *T.gondii* nin VEG soyunun doku kistinin elektron mikroskopik görüntüsünde oldukça kalın bir hücre duvarı, bölünmekte olan bir zoit ve birçok bradizoit görülmektedir.(C.A.Speer.)

2.3.BİYOLOJİ

Neospora caninum ; *T.gondii* ve *sarcocystis* türlerine benzemekte, son konağın karnivorlar olup enfeksiyonu oluşturan *N. caninum* etkenlerinin karnivorların sindirim sisteminde endodiyogeni ile çoğaldığı ve sularla ve dışkı ile ookistlere benzer kistlerin atılarak daha sonra yem ve sularla bu ookist benzeri yapıları alan sığırların ara konak görevi yaptığı belirtilmektedir.(34,31,6,15,35)

Köpeklerde hem oral yolla hem de plasental yolla olabilmektedir. Hastalığa yakalanmış köpeklerde enfeksiyonun ömür boyu sürdüğü kabul edilmektedir. (34,15)



Şekil 2.6.*Neospora caninum*'un hayat döngüsü(J.P.Dubey)

Şimdilik sığırlarda bilinen tek bulaşma yolu plasental bulaşmadır. Ancak enfeksiyonun bir sürüde ilk kez ortaya çıkmasında, sürüye enfekte bir dişi katılması yada olası son konak olan karnivor dışkıları ile kontamine otların yenmesi sorumlu olmaktadır. Hayvanlarda yaş ırk ve mevsimlere bağlı olarak bulaşmada bir değişiklik bulunmadığı ve etkenlerin sığırlarda tekrarlayan abortlara neden olabileceği sanılmakta ancak abortun tekrarlama süresi veya kaç gebelik boyunca devam ettiği bilinmemektedir.(33,22,6,15,20)

Dubey ve arkadaşları *N. caninum*'un plasentayı geçip yavruyu enfekte edip etmediğini görmek amacıyla yaptıkları çalışmalarda etkeni deri altı ve kas içi yollarla gebe köpeklerle vermişler. Bu çalışmada 8 yaşında dişi bir köpeğe hücre kültüründe üretilmiş ve daha sonra 1.500.000 adet *N.caninum* taşıyıcı i.m ve s.c. olarak doz ikiye bölünerek verilmiş. Bu köpeğin doğan yavrularının dokularından ve plasentadan *N.caninum* tekrar izole edilmiştir. Bu yavruların serumlarının İ.F.A.T. testi ile yapılan yoklamalarında *T.gondii* yönünden negatif oldukları tespit edilmiştir. Dubey ve arkadaşları gebe inekler üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca Trees ve arkadaşları da *N.caninum* antikorlarının analardan yavrulara geçebileceğini serolojik olarak göstermişlerdir(34,22,15,6,12).

N.caninum köpeklerde oral ve konjenital olarak 2 önemli yollarda bulaşabilir. Oral bulaşma bradizoit ve taşıyıcıların yenmesiyle olabildiği gibi ookistlerin alınması ile de oluşabilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış köpeklerin protozoon enfeksiyona daha kolay yakalandıkları gösterilmiştir(38,22,15,6,24).

2.4. Yayılışı

2.4.1.Sığırlardaki Yayılışı

Neosporiosis Avusturalya, Kanada, Danimarka, İrlanda, İsrail, Hollanda, Japonya, Meksika ve dünyanın birçok ülkesinde görülmektedir. Neosporiosisin sebep olduğu bireysel veya birkaç abort vakaları Çizelge2.1 de görülmektedir.

Bölge	Referans	Fetüs sayısı	Gebelik süresi	Notlar
Kanada British Columbia	Mcintcoch and Haines (1994)	1	8	Sığır eti
Prens Edward adası	Bridfell et al. (1994)	1	6	Sürülerde endemik abort vakası
Danimarka	Agerholm and Barr (1994)	2	5.7	Endemik abortlu sürülerdeki fetüsler
İsrail	Hormelin et all. (1995)	3	NR	Histolojik olarak incelenmiş 20 Fetüs
Japonya	Ogino et all. (1992)	5	5.9	7 aylık 4 fetüs ve bir yaşındaki buzağı eti
Güney afrika	Jardine and Lost (1993)	2	7	Hasta ikiz fetüs
İsveç	Holmdahl et al. (1995)	1	4.5	Sürülerdeki Endemik abort vakası
U.S.A İllinois	Scchivaprased et al.(1989)	1	5	Neospora plasentada görüldü.1982'de ki sığır abortu
Maryland	Dubey et al. (1990f)	1	8	Sığır baldırında kütle halinde miyokarditis

Çizelge 2.1 . Ükelere göre abort vakaları (J.P. Dubey)

Yeni Zelanda'da bir çiftlikte 158 sığırın % 33 ünde aborta rastlanmış ve daha sonra ilk 5 ay içinde *Neospora caninum* antikorları yönünden yapılan kontrollerde prevalans %50 olarak belirlenmiştir(15).

Kaliforniya’ da 1985-1990 yılları arasında 221 abort olayının neosporiosisle ilgili olduğu ve abort yapmış sığırlarda enfeksiyonun % 19-45 arasında değiştiği kaydedilmiştir(36).

İrlanda da atık 335 sığır fetusundan alınan beyinlerin 21’i histopatolojik kesitlerde irinsiz encephalitis gösterdiği halde sadece 14’ünde immünohistokimyasal olarak etken saptanmıştır. Ayrıca 324’ü atık yapmış ve 265’i normal olmak üzere 489 sığırdan yapılan serolojik incelemede abort yapanların 41’i (% 12.6), sağlamların ise 5’i (%3) pozitif bulunmuştur(36).

İngiltere de beslenme ve yetiştirme koşullarının çok iyi olduğu, döllemenin suni tohumlamayla yapıldığı ve atığa neden olacak başka bir etkene rastlanmayan 34 fetustan, 7’sinin beyninden histolojik kesit alınmış ve bunların ikisinde de immünohistokimyasal boyama ile *N.caninum* rastlanmıştır. Ayrıca incelenen 8 fetüsten analarının tamamında İFAT ile yapılan serolojik kontrolde yüksek titrede *N.caninum* antikoru saptanmıştır . İngilterede yapılan diğer çalışmalarda ise enfeksiyon oranı % 4.2-21 olarak kaydedilmiştir(36).

Costa Rica da 1987-1993 yılları arasında tropik yağmur ormanları ekosisteminde bulunan süt besiciliği yapılan 23 çiftlikte retrospektif bir çalışmada % 7-8 oranında abort vakası bulunmuştur (6741 sığırdan 515’inde abort tespit edilmiştir.) (30).

Seyreltik 1:800 İFAT kullanılarak yapılan bir seroepidemiolojik çalışmada Arjantin’de önceden abort vakasına rastlanmış süt besiciliği yapılan 6 farklı çiftlikte sığırlarda % 56.9 seroprevalans bulundu(8).

Ekim 1997 de İspanyanın Asturias bölgesinde 43 süt ineği çiftliklerindeki 889 sığır arasında *N.caninum* enfeksiyonunun seroprevalansı % 29.6 ve gerçek prevalans % 30.6 olarak bulundu (% 27.6- % 33.6) (25).

1998’de Kuzey Albartada 174 sürüden 1806 kan örneği toplanıp incelendiğinde bu örneklerin 162’si (% 9.0) *N.caninum* antikoru bakımından pozitif bulunmuştur. 1980 li yıllarda aynı bölgeden toplanan 260 örneğin kırkbeşi (%13.5) *N.caninum* olarak pozitif çıkmıştır (37).

İskoçya da sığırlarda yaygın olarak görülen ve ölü doğumlara sebep olan *N.caninum*'un yapılan çalışmada abort olmuş fetusların % 15.9'unda bu parazitin antikorları bulunmuştur (7).

2.4.2. Köpeklerdeki yayılımı :

N.caninum enfeksiyonunun köpeklerdeki yayılımı ile ilgili elde edilebilir bilgiler sınırlıdır. Kansas, USA;liverpool,UK; Kuzey Mymms, UK; ve Uppsala, İsveçte Veteriner kliniklerinde yayılımının % 0.25 ile 16.6 arasında olduğu saptanmıştır.İFAT kullanılarak Kansastaki 229 köpekten beşinde 1:400 (2 köpek) 1:200 (iki köpek) ve 1:100 (bir köpek) oranında antikora rastlanmıştır. Aynı köpeklerde *T.gondii* antikor yayılımı %25 ve *N.caninum* antikorları olan 5 köpekten 3'ünde *T.gondii* antikorları da bulunmuştur. Liverpoolda 163 köpek üzerinde yapılan araştırmada 1:50 oranında 50, 1:200 oranında 8, 1:800 oranında 9, 1:3200 oranında ise 4 tanesinde antikor bulunmuştur. Böylece 1:50 lik olanların %17 ve 1:200 olanların %13 pozitif oldukları saptanmıştır(15).

İngilterede klinik neosporosis görülmeyen ve rastgele seçilmiş 163 köpekten alınan serumlardan 27'si (%16.6) *N.caninum* yönünden pozitif bulunurken bir başka çalışmada ise 104 köpeğin 6'sında (%5.8) *N.caninum* saptanmış ve bu köpeklerden sadece birinde klinik neosporosis görülmüştür(15).

Neosporosis Amerika da sağlıklı köpeklerde %13 olarak saptandığı halde Kansas ta herhangi bir nedenle hasta olan 229 köpeğin %2.2 sinde *N.caninum* antikorlarına rastlanmıştır. Enfeksiyonun yayılımı İsveçte %0.5, Danimarka da ise %15.3 oranında bulunmuştur.Enfeksiyonun görülmesinde yaş,cinsiyet ve ırk gibi faktörlerin etkili olmadığı, ancak klinik belirtilerin bir yaşından küçüklerde daha belirgin olduğu belirtilmektedir(34).

Neosporosise diğerk hayvanlarda da rastlanmaktadır. Keçi , koyun, at, geyik, kedi, maymun, tilki, rakun, fare ve sıçanlarda değışik ÷lkeler üzerinde yapılan çalışmalarda *N.caninum* taşızoitlerine rastlanmıştır(15,31).

2.5. Klinik semptomlar

2.5.1. Sığırlarda gör÷len Klinik Semptomlar

N.caninum koyun,sığır ve keçilerde aborta neden olmaktadır. *N. caninum*'un ergin sığırlarda spesifik bir klinik semptomu belirlenmemiştir. Fakat tekrarlayan abortlar, zayıf ve kondüsyonu düşük buzağların doğması,buzağlarda nöromusküler bozukluklar doğumu takiben üç beş gün içersinde görülürse de bazen bu işaretlerin görülmesi iki haftaya kadar uzayabilir. Enfekte buzağlar düşük doğum ağırlığındadırlar ve ayağa kalkma güçlüğü çekerler. Bazen ön ekstremiteler arkaya doğru uzatılarak vücut bir düzlem içersinde tutulmaya çalışılır(Sehpa pozisyonu) . Fakat ekstremiteler eklemlerden elle bükülebilir.

Sinirlerin muayenesinde pateller reflekslerin azaldığı pelvik bölgenin ön kısmında reflekslerin kaybolduğı görülür(15,34).

Enfekte olmuş sığırlarda tek klinik belirti aborttur. Herhangi bir yaştaki sığır 3 ay ile gebelik sonuna kadar abort yapabilir. Bununla birlikte *Neospora* içeren abortların çoğı 5 ile 6 aylık fetüstür. Fetüsler uterusda ölebilir, otoliz olabilir, doğarken ölebilir, canlı ama hasta veya klinik olarak normal fakat enfekte olmuş olarak doğabilir. *Neospora* içeren abortlar bütün yıl boyunca sadece birkaç sığırdada veya yaklaşık sürünün % 30'unda bulunabilir. Anti-*N.caninum* antikör serumlu sığırlar (seropozitif), seronegatif sığırlardan abort yapma ihtimali faha fazladır. Doğum yapacak *N.caninum* enfekte olmuş sığırlarda nörolojik izler,kilo kaybı,büyüyememe veya hiçbir klinik belirti olmayabilir. Nörolojik çalışmalarda sıklıkla patellar reflekslerin azalması görülür. Sığırlarda ekzofitalmia veya gözlerin asimetrik olarak bulunması gör÷lebilir(15).

2.5.2. Koyunlarda görülen klinik semptomlar

Dubey ve Lindsay yaptıkları bir çalışmada 8 yaşındaki iki dişi koyunun birincisine 1.5 , 107 taşizoiti (i.v) ikincisine aynı miktar taşizoiti (i.m.) inokule etmişlerdir. Bir hafta sonra koyunlarda hafif bir iştah kaybı dışında hiçbir klinik belirti görülmemiştir. Fakat her iki koyunda ikiz kuzularını inokulasyondan sonra atmışlardır. Atık fetüslerin otopsilerinde *N. caninum* lezyonları gözlenmiştir. Anderson ve arkadaşları Kaliforniada koyunlarda 468 abort vakası incelemişlerdir. Araştırmacılar, olayların % 3.2 'sinin protozoon (Toksooplasma, Neospora vb.) tarafından meydana getirildiğini tespit etmişlerdir(15,38).

2.5.3. Köpeklerde Görülen Klinik Bulgular

Hastalıkla ilgili klinik bulguların en iyi gözlemlendiği hayvan köpeklerdir. Arka bacaklarda gerginlik, anormal yürüyüş, halsizlik gibi belirtilerle birlikte bazen hayvan arka ayakları üzerinde duramayıp ön ayaklarından destek alarak yürür. Bunun yanı sıra ayak refleksleri ve patellar refleksler normaldir. Ayrıca baş ve boyun hareketlerinde düzensizlik ve kaslarda da kuvvetsizlik vardır. Dubey ve arkadaşları bir köpekte özellikle masseter kasında olmak üzere kaslarda atrofi gözlenmiştir. Bir diğer köpekte ise dermatidis belirlenmiş özellikle anüsün ventralinden başlayan ülseratif ve fistüler bir deri lezyonu gelişmiştir(15,34).

Köpekler her yaşta *N.caninum*la infekte olabilirler. Fakat 5 haftalıktan daha büyük köpek yavrularında klinik belirtiler, daha da şiddetli olarak göze çarpar. Özellikle köpeklerde gittikçe artan paraliz, omurilik anormalileri, boyun ağrıları, disfaji ve sonunda ölüm görülür(15,38).

Neospora caninum enfeksiyonlu köpeklerde yapılan hematolojik muayenelerde leukositozis, lenfopeni ve neutrofillerde sola kayma tespit edilmiştir. Serobrospinal sıvının proteinden zengin olduğu ve pleositozisin geliştiği görülebilir. Serumda ise serum alanin transaminaz seviyesinin yükseldiği, albümin, globulin, alkalenfosfataz, bilirubin, üre ve kreatinin normal sınırlar içerisinde olduğu belirtilmiştir.

Klinik olarak paraliz gelişmiş köpeklerde vücut ısısının yüksek olduğu dikkati çeker ve klinik bulgular oluşan meningoensefalomyelitisin göstergesidir(15,34).

Deneyssel olarak oluşturulmuş *N.caninum* enfeksiyonları, köpeklerde uterusda yavru ölümüne ve hastalıklı yavruların doğumuna neden olur. Hasta olarak doğan yavruların birkaçı ölür, geriye kalanlar ise normal olarak hayatlarına devam ederler. Oral yolla bu protozoonla enfekte edilen kediler bu olayı takiben gebe kaldıklarında klinik olarak normal bir seyir izlerler. Fakat hastalıklı kedi yavruları doğururlar. Ayrıca yeni doğan kedi yavrularında felç görülebilir(15,38).

2.6. Patoloji

N.caninum'a genelde beyinde ve iskelet kaslarında rastlanır. Toxoplasmosis enfeksiyonlarda görülen patolojik lezyonlar neosporosis enfeksiyonları için de kabul görmektedir. *N. caninum* enfeksiyonlarına özgü patogeneze fütusta, neonatal dönemde birbirinin aynısıdır.

Dubey ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada yavru atmış keçinin plasentasında herhangi bir bulguya rastlamamışlar, abort edilmiş olan fütusta makroskopik olarak, cerebral sıvıların her iki ventrikülleri genişletmesi sonucu cerebellumun normalden küçülmesi ve bunun sonucunda hemisferlerin atrofiye olması sonucu oluşan hydrocephalus, subkutan ödemler ve peteşial cutaneous hemorajiler belirlemişlerdir.

Abort olmuş yavruda mikroskopik olarak deride mononükleor hücrelerin yaygın infiltrasyonu ve böbreklerde intersitisyel nefrit gibi ek lezyonlarda tanımlanmıştır(15,38).

Köpeklerde *N.caninum* enfeksiyonuna yakalanmış köpeklerde makroskopik lezyonlar pek görülmemekle birlikte arka ayaklardaki paraliz, ataksi ve ülseratif dermatitis gibi klinik bulgular neosporozisi düşündürmelidir. Karaciğer vücut ağırlığının %5-6 kadar büyümüş ve soluk sarı renktedir. Hepatositlerde nekroz vardır ve %25'inden fazlası yıkımlanmıştır.

Akciğer konjesyoneldir. Bazen diffüz bir pnömani tablosu görülür. Miyokard da hücre infültrasyonları ile birlikte, kalp kası hücrelerinin içerisinde taşızoitlere rastlanabilir. Şiddetli nonpurulent ve nekrotik bir meningo ensefalomiyelitis, ayrıca vaskulitisle birlikte beyin, beyincik ve medulla spinaliste kan damarlarının etrafında tek tek veya yığınlar halinde taşızoitlerin görülmesi hastalık için tipik histopatolojik bulgu olarak kabul edilebilir. Parazitin taşızoit formu ile bradizoit formunu birbirinden ayırmak için 4-6 mm kalınlığında kesilmiş kesitlerin PAS ile boyanması gerekir. Taşızoitler PAS ile boyanmazken bradizoitler boyanmaktadır(34).

Sığırlarda ve Koyunlarda, neosporosisle ilgili patolojik bulgular anadan ziyade atık fötüs neonatal zayıf doğmuş buzağılardır. Patolojik bulgular köpeklerdeki lezyonlara benzerlik göstermektedir.

Abort olmuş fötuslarda, mikrobik lezyonlar çoğunlukla beyin spinallerde ve kalpte görülür. Laboratuvara tanı için materyal gönderilirken ya fötusun tamamı ya da aborte fötusun beyni gönderilmektedir. Bunların yanı sıra akciğer ve böbreklerde de lezyonlara rastlanabilir. Kalp genişlemiş, karkas ödemlidir.

Histopatolojik olarak multifokal nekrotik nonpurulent ensefalitis ve myokorditis görülebilir. Bu bulgular sığır neosporosis için karakteristik olarak kabul edilebilir. Nonpurulent ensefalitis ortada nekrotik odak ve etrafında da neuroglia hücreleri ile mononükleer hücrelerden oluşur. Lezyonlu bölgelerde taşızoitlere de rastlamak mümkündür. Ancak taşızoitlerin identifikasyonu için immuno - histokimyasal metodlar kullanılmalıdır.

Abort olmuş fötusa ait plasenta kotiledonlarında *N.caninum* ile ilgili nekrozlar görülmüş yalnız nekrotik odaklarda protozoonit kistlere rastlanamamıştır(34).

2.7. Tanı

Neosporiosis'in klinik tanısında karşılaşılan birçok sorun nedeniyle, klinik belirtilere bakılarak tanıya gitmek hemen hemen olanaksızdır. *Neospora caninum* enfeksiyonlarında klinik belirtiler çok değişik olmakta, bu nedenle genellikle birçok hastalıkla karıştırılabilmektedir. Klinik tanıya yardımcı olabilecek karakteristik belirtilerin hemen görülmemesi nedeniyle birçok hastalığı birden düşündürebilecek genel belirtilerle birlikte neosporosisde düşünülmelidir. Ancak *Neospora caninum* enfeksiyonu akla geldiği veya düşünüldüğü zaman, abort merkezi sinir sistemi bozuklukları ve ensefalomiyelitis gibi klinik belirtiler yanında kesin tanıya yardımcı olabilecek laboratuvar tanı yöntemlerinin de uygulanması gerekir(37,38).

Neospora caninum'un enfeksiyonu için ölüm öncesi standartize bir tanı testi yoktur. Son yıllarda Dubey ve ark. doku kesitlerindeki *N.caninum* identifikasyonundaki Avidin-biotin-peroxidaz complex (ASPC) immunperoksidaz testini geliştirmişlerdir. Bu testle tavşanlarda üretilmiş *N.caninum* antikorları kullanılmaktadır. Böylece *N.caninum* taşıyıcılarını ve bradizoitlerini apicomplexa şubesindeki diğer kistlenen parazitler de kolayca ayırmak mümkün olmaktadır(38).

Neospora caninum gibi dokularda kistlenen *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Cystoisospora*, *Saococystis* ve *Frankelia* lar şu özellikleri ile *N.caninum*'dan ayrılabilir.

Sarcocystis'in şizont ve gametleri iyi sınırlanmış parazitik vakuol içinde bulunurlar.

Kist duvarı kalın yapıda olan *Besnoitia sp.* ise konakçı hücrenin nükleusunu içeri alır ve bu parazitin henüz köpeklerde bulunduğu rapor edilmemiştir.

Köpeklerin en yaygın kistlenen paraziti olan *Cystoisospora sp.* ise özellikle bağırsak hücrelerinde parazitik vakuol içerisinde yerleşir ve şizontları çevre dokularda bulunmaz.

Frankelia sp. küçük memelilerin paraziti ve kistleri sadece beyinde görülür. *Hammondia heydorni*'nin son konağı ise canidelerdir ve gelişmelerinde iki konak

kullanırlar. Fakat *H. heydorni*'nin şizont ve gametonları köpeklerin bağırsak epitellerinde gelişir ve konakçı hücrede parazitik vakuol içinde bulunur.

Neospora caninum'un ışık mikroskopik yapısı *T.gondii*'ye benzer. Ancak *N. caninum* konak hücrede parazitik vakuol olmaksızın ser best olarak lokalize olmuştur ve çok sayıda rhoptri taşır. *N.caninum* taşıyıcıları *T.gondii*'nin spesifik testi olan (P.A.S.) testine cevap vermez. *T.gondii* ise konakçı hücreden parazitik vakuolle ayrılır ve birkaç tane rhoptrisi vardır(34).

Laboratuvar tanı yöntemleri 3 grup altında incelenebilir.

2.7.1.Histopatolojik tekniklerle teşhis

2.7.1.1 Işık mikroskobu ile teşhis:

Bu teşhiste amaç, protozoon etkeninin direkt olarak ışık mikroskopunda görülmesi esasına dayanır. Bunun için beyin-omurilik sıvısı, kemik iliği ponksiyonu ve ateşli olgularda kan alınarak sürme preparatları yapılır. Preparatlarda trofozoiti görmek için Giemsa ve Wright, doku kistlerini görmek için periodic acid schiff (P.A.S.) ve Wright-Giemsa boyaları kullanılır. Eğer muayene materyali biyopsi ise doku kesitleri hematoksilin-eozin ile boyanır. Alınan materyal birkaç ml. hacminde sıvı ise bu sıvı santrifüj edilerek çökeltilen preparat hazırlanır ve aynı boyama yöntemleriyle boyanır.

2.7.1.2. Elektron Mikroskopunda Teşhis:

Elektron mikroskopik olarak yapılan incelemelerde *N.caninum* taşıyıcıları *T.gondii* taşıyıcılarına benzerler. Fakat *Neospora caninum* taşıyıcıları ve rhoptriye sahip olduğu halde toksoplasma taşıyıcılarında bu sayı bir eksiktir. Ayrıca rhoptri de *N.caninum*da trofozoitlerin arka nihayetine ulaşırken *T. gondii* de bunlar çekirdek önünde lokalize olmuşlardır.

*N.caninum*da mikronemler plazmolem'e dik olarak yerleşirken *T.gondii* de ise mikronem düzenli olarak bir yerleşim göstermiştir. Toksoplazma genleri parazitofor içine yerleşik halde *N.caninum* konak hücre sitoplazmasına denk olarak yerleşmektedir.

Toksoplazma kistleri ince duvar olup beyin iskelet kalp kasını tercih ettikleri halde *Neospora caninum* kistleri *Toksoplazma gondii* kistlerine göre 0.5 µm daha kalındır ve merkezi sinir sistemini toksoplazmaya oranla daha çok tercih eder.

2.7.1.3. İmmuno-Patolojik Teşhis :

Jardine 3 köpekten elde ettiği beyin dokusu parçalarında avidin-biotin immünohistokimyasal tekniğini kullanarak bradizoit ve doku kistlerinin varlığını ortaya koymuştur. Yazar bu tekniğin ayırıcı teşhiste oldukça spesifik olduğunu belirtmektedir.

2.7.2.Serolojik Teşhis:

Neospora caninum'a özgü antikorları görmek için kullanılan serolojik testler tanı için önemli asıl testlerdir. Bu testlerden özellikle İFAT ve ELİSA neosporozis teşhisinde fazlaca kullanılır.(5)

Serolojik testlerde doku kültüründen hazırlanan *N.caninum* trofozoitleri antijen olarak görev yaparlar(19). Lindsay ve ark. Fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada *N.caninum* ile *T. gondii* arasında antijenik olarak farklılık bulunduğunu ve bu iki protozoon arasında çapraz reaksiyonun meydana gelmediği saptanmıştır.

2.7.2.1. İFAT :

Canlı hayvanlarda neosporozis teşhisi İFAT ile İgM'e karşı hazırlanan floresans işaretli antiserumla çalışır. İFAT anti-nükleer antikor (ANA) ve Romatoit Faktör (RF) içeren serumlarla da yalancı negatif sonuçlar verir.(5,26)

2.7.2.2. ELİSA :

İFAT testine göre daha hassas ve spesifik bir testtir. RF ve ANA'nın neden olduğu yalancı pozitiflik bu testte görülmez.(5,6,26,31)

2.7.2.3. Kültür

Neosporiozis tanısında kültürle tanının fazla bir pratik değeri yoktur. Beyin omurilik sıvısından elde edilen materyalin veya *N.caninum* kistlerinin in vitro eksistasyonu ile elde edilen in vivo olarak deney hayvanlarından sağlanan taşıyıcıların doku kültürlerinde üretilmesiyle hem teşhis yapılabilir ve hem de elde edilecek taşıyıcıların sitolojik, sitokimyasal ve antijenik çalışmalar için olanak sağlar.

2.8.Tedavi

Bu güne kadar *Neospora caninum*'a karşı spesifik bir ilaç belirlenememiştir. Bu protozoer infeksiyonun sağaltımında toxoplasmosis infeksiyonlarında tavsiye edilen preparatlar kullanılabilir. Bu kullanılan ilaçlar sadece taşizoitlere etkilidir.

Lindsay ve Dubey *Neospora* infeksiyonlarının sağaltımı konusunda in vitro olarak yaptıkları bir çalışmada; 0,005 mg/ml lasalocid sodium, 0,05 mg/ml monensin sodyum, 0,01 mg/ml prithrexim, 0,05 mg/ml pyrimethamine ve 5,0 mg/ml trimethoprim'in sığırların monosit hücre kültüründen köken alan hücre içi *N.caninum* taşizoitlerinin gelişmesini önlemede etkili olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada 10,0 mg/ml amprolium hydrocloid, 200 mg/ml sulfametaksazole ile tedavi edilen kültürler, kontrollerle karşılaştırıldığında da kayda değer bir farkı görülmemiştir.

Lindsay ve Dubey yaptıkları başka bir çalışmada da deneysel olarak oluşturdukları neosporiosis infeksiyonlarında sulfadiazine ve amprolium'un etkilerini immunosupressif fareler kullanılarak incelemişlerdir. Sonuçta taşizoit inokulasyonundan 7 gün sonra verilen bu iki ilacında neosporiosis sağaltımında etkili olmadığını belirtmişlerdir(38).

2.9. Koruma ve kontrol

Neospora caninum'un dikey geçişini engellemek ve korunmak için aşı çalışmaları yapılmış, aşılanmayanlara göre aşılananlar parazite karşı korunabilmiştir.(30)

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Aralık 2001’de Kocaeli’ye ait üç merkezin herbirinden değişik sayılarda toplam 98 inek seçilerek kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri derhal laboratuvara getirilip 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiş ve serumları ayrılmıştır. Serumlar iki örnek olarak mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış – 20 C de farklı iki derin dondurucuda saklanmıştır. Kan örneklerinin toplama sırasında ineklere ait yaş ırk kaydedilmiştir. İneklerin abort yapıp yapmadığı belirlenmiştir.

3.2. Metot

Bu çalışmada vMRDinc cELİSA testi kullanılmıştır. cELİSA *Neospora caninum*’un sığırlarda ve keçilerdeki serumunda antikor tespitinde kullanılır. Örnek serumdaki *N.caninum* inhibe eden antikorlara bağlanan (HRP) ile kaplıdır. HRP *N.caninum* özel monoklonal antikorlarla birleşen *N.caninum* antijenleriyle kaplanmış plastik yüzeylerdir. HRP işaretli monoklonal antikorlarla birleşerek bağlanması, enzim substrat ilavesi ve renk verici ürün ile tespit edilir. Belirgin renk HRP kaplı monoklonal antikorlarla az bağlanması veya hiç bağlanmamasını ve böylece *N.caninum* antikorlarının örnek serumda olup olmadığını anlamamızı sağlar. Zayıf renk bulunması monoklonal antikorlarının inhibisyona bağlı olarak, örnek serumdaki *N.caninum* antikorlarının varlığını belirleyen sıvı fazla antikorlarının bağlandığını gösterir.

3.2.1. Kit İçindekiler

1. Antijen kaplı kuyucuklar (2×96 yüzey) A
2. Pozitif kontrol B , 3,6 ml
3. Negatif kontrol C , 3,6 ml
4. 100 × Antikor – peroksidaz bağlayıcısı D , 300 ml sulandırılmalı
5. Sulandırılmış buffer bağlayıcısı E , 30 ml
6. Substrat solüsyon F , 30 ml
7. Stop solüsyon G , 30 ml
8. 10 X Yıkama solüsyon konsantresi H , 120ml sulandırılmalı
9. Kit rehberi

3.2.2.Gerekli Malzemeler

1. 5-1000 ml ayarlı pipet
2. Micropipet, 50 ml
3. Test tüpleri
4. ELİSA mikropipet okuyucusu veya spektrofotometre 620 nm tek dalga boyu kapasiteli
5. Deiyonize veya distile su
6. Kağıt havlu
7. Alüminyum folyo
8. Dereceli silindir
9. 96 antijen kaplı olmayan transfer plate
10. Pipetler 1 ml, 5 ml, 10 ml
11. Ayarlı saat
12. Makas
13. Kurşun, tükenmez kalem

3.2.3.Saklama

Bütün malzemeler 2-7 °C (35-45 °F) saklanır. Dondurulmaz.

3.2.4.Hazırlama

1. Test yapılacağı zaman serum örnekleri ve kullanılacak malzemeler bir oda da oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilir.
 2. Yapılacak işlemleri fotokopiye yazılır.
 3. Seyreltici buffer ile **(E)** 100 x Antibody-peroksidaz bağlayıcı **(D)**'nin bir kısmı 1 x A-P-C (D) olacak şekilde sulandırılır.
- Serum örnekleri direkt *N.Caninum* antijen kaplı kuyucuk üzerine küçük numaradan büyük numaraya doğru aktarılır.
 - A1 boş bırakılır.
 - 65 µl pozitif kontrol (B) ve negatif kontrol (C) eklenir. Bu aşamada serumlar sulandırılmaz.
 - En az üç negatif kontrol 2 pozitif kontrol eklenir.

3.2.5.Testin Uygulanması

3.2.5.1.Örnekleri ve Kontrolleri Doldurma

1. A1'i boş bırakılır. Ayarlı pipet ile 50 µl serum örnekleri *N.caninum* antijen kaplı yüzeylere aktarılır. Aktarma esnasında bir kuyucuktan diğerine bulaşma olmaması için dikkat edilir. (21-25°C) 1 saat oda sıcaklığında bekletilir.
2. YIKAMA : 1 saat inkubasyondan sonra, kuyucukları boşaltılır. Temiz bir kağıt havlu üzerine 4 kez sert bir şekilde vurarak serum ve kontrolleri tamamen uzaklaşması sağlanır. Hemen her bir kuyucuğa 1 x yıkama solüsyonu otomatik plate yıkayıcı kullanarak doldurulur. Bu işlem 2'den fazla gerçekleştirilir (ortalama 3 kez). Son yıkamadan sonra plate'i dört kez sert bir şekilde kağıt havlu üzerine vurarak yıkama solüsyonu artıklarını uzaklaştırılır.
3. KONJUGATE EKLEME : Sulandırılmış 50 µl 1 x A-P-C her bir kuyucuya nirda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.
4. YIKAMA : Plate içerikleri 20 dakika sonra boşaltılır. (2. Aşamadakilerin aynısı)
5. SUBSTRAT SOLÜSYON EKLEME : substrat solüsyondan 50 µl her bir kuyucuya eklenir. Alüminyum folyo ile sarılır 20 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Kesinlikle kuyucuklar boşaltılmaz.
6. STOP SOLÜSYONU EKLEME : Stop solüsyondan 50 µl eklenir. Kesinlikle kuyucuklar boşaltılmaz.
7. OKUMA VE TEST SONUÇLARINI SAKLAMA : Stop solüsyondan sonra, plate okuyucuya okutulur.

3.2.5.2. Plate okuyucuya Okutma

1. O.D.'yi 620nm'ye ayarlanır.
2. A1 okuyucuda boş bırakılır.
3. Makine çalıştırılır.

3.2.5.3. Test Değerlendirme

O.D.'nin negatif olması için $\geq 0,300$ ve $< 2,500$ olmalı.

Hesaplama : $100 - [(\text{Örnek O.D.} \times 100) / (\text{Negatif kontrol O.D.})] = \% \text{ inhibitasyon}$ $< \%30$, sonuç negatiftir.

3.2.6. Ekim Çalışmaları

Neospora caninum izolasyon çalışmalarında yeni abort olmuş fötustan alınan ve 72 saat boyunca 2°C’de bekletilen beyin parçaları, fosfat buffered saline de pH 7,4’de bırakılmıştır. 37 °C’de %25 tripsinli PBS içinde 30 dakika bekletilmiş ve 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek parçalanmış ve homojenize hale getirilmiştir. Pellet %30’luk izotonik Percoll çözeltisinde belli bir süre bekletilmiş ve pellet PBS ile iki kez yıkanmış 4ml glutamine ve %2 fetol sığır serum içeren RPMI 1640’da 24 saat tek tabakalı vero hücrelerine ekilerek, 37 °C %5 CO₂ / %95 hava ortamında inkübe edilmiştir. Medium haftada iki kez değiştirilir. Kültürler her hafta kontrol edilmiştir.

Parazitler belirlendikten sonra Vero hücrelerindeki ekim RPMI 1640 medium kullanılarak devam ettirilmiştir. İlk 7 hafta boyunca, yeni vero hücreleri eklenmemiştir. Vero hücreleri artan oranda 7-11. haftalar arasında eklenir. 11 haftadan sonra parazitler her 7-10 günde pasaj edilmiştir.



Şekil 3.1. Ekim çalışmalarının yapıldığı laboratuvar ve malzemeleri



Şekil3. 2. Yeni abort olmuş bir fötüsün muamele edilmemiş hali

4.BULGULAR

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	-0,57	0,56	24,72	28,09	7,8	3,93	7,86	8,42	3,93	6,74	1,12
1,68	-2,24	1,68	7,30	0,56	6,74	5,61	-2,80	8,98	6,74	6,74	7,30
1,68	7,3	4,49	6,18	7,3	3,93	2,24	7,8	1,12	3,37	5,61	-
0	-5,62	-1,69	-2,25	7,3	5,61	-1,13	11,23	-4,49	5,61	2,24	7,86
-2,25	2,24	7,3	3,93	4,49	-1,13	7,3	6,74	7,86	2,24	6,74	6,74
4,49	-1,13	-5,62	-8,99	7,86	1,12	2,24	6,18	2,80	2,80	1,68	0,56
2,24	-2,25	25,84	13,48	3,37	3,93	4,49	31,46	22,47	2,24	16,85	2,24
-5,06	-7,31	0	19,66	11,79	-1,69	-0,57	30,89	1,12	3,37	3,37	31,46
2,8	-2,25	-4,5	28,65	30,33	-1,69	8,98					

Çizelge 4.1. Alınan OD(Optik dansite)'ye göre hesaplanmış inhibisyon değerleri

Şehir	KOCAELİ			TOPLAM KOCAELİ
Yerleşim Yeri	Balçık	Denizli Köyü	Tavşanlı	
Serum	39	31	27	97
Pozitif	% 0	% 0	% 5	% 5.05

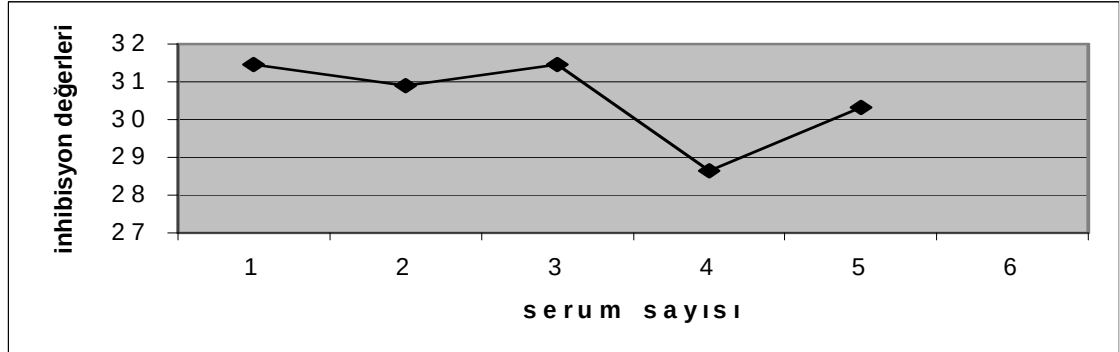
Çizelge 4.2. Kocaeli ilindeki yerleşim yerlerine göre seropozitiflik

Yapılan çalışmada Kocaeli ilinde Balçık'ta 39 serumdan, Denizli köyünden de 31 serumdan hiç pozitif çıkmamıştır. Tavşanlıda 27 serumun 5 tanesi pozitif sonuç vermiştir. Kocaeli ndeki toplam 97 serumdan 5 tanesi pozitif olduğundan % 5.05 lik bir oran elde edilmiştir.

Yaş	≤1	1	2	3	4	5
(+) Serum Sayısı	–	–	–	1	2	2
İnhibisyon değerleri	–	–	–	30,33	28,65-31,46	30.89-31,46

Çizelge 4.3. Pozitif serumların yaşa göre dağılımı ve inhibisyon değerleri

Pozitif serumların yaş dağılımlarına baktığımızda 2 yaş ve altında pozitiflik yok iken 3 yaşındaki sığırlarda 1, 4 yaşındaki sığırlarda 2, 5 yaşındaki sığırlarda 2 pozitif bulunmuştur.



Çizelge 4.4. İnhibisyon değerleri ile serum sayısı grafik gösterimi

N.caninum paraziti için pozitif bulunan yerleşim yerlerinde ahırdaki ineklerin yanına köpekler serbest olarak girebilmekte,ve inekler belirli zamanlarda su içmek için ahır dışına da çıkarılmaktadır. Bu çalışma sonucunda bölgedeki atık durumunun sporadik olduğu, kapasitesi büyük işletme sayısının da az olduğu ve hayvan sahiplerinin atıkları önemsemediği ve ilgili kurumlara haber vermediği belirlenmiştir.

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Neosporozis protozoon parazit olan *N.caninum*'un sebep olduğu bir hastalıktır. *N. Caninum* taşıyıcılarının aktif olarak çoğalmasıyla hücrenin ölümüne sebep olur. Bu parazit birkaç gün içerisinde görülebilecek lezyonları oluşturabilecek yetenektedir. Neosporosis ilk kez 1988 yılında köpeklerde görülmüş ve *Neospora caninum* olarak isimlendirilmiştir. Sığırlarda, atlarda ve keçilerde *N.caninum*'a bağlı abortlara rastlanmaktadır.

Neosporiosis Dünya'dan birçok ülkesinde görülmektedir. Costa Rica'da 1987-1993 yılları arasında süt sığırcılığı yapılan 23 çiftlik 6741 sığırdan 515'inde Neosporanın sebep olduğu abort vakası tespit edilmiştir (28).

Arjantin'de 1800 seyreltik İ.F.A.T. kullanılarak yapılan seroepidemiolojik bir çalışmada 6 farklı çiftlikte besi sığırlarında %56,9 oranında *Neospora caninum*'a bağlı aborta rastlanmıştır.(7)

Kuzey Alberto'da 1998'de 174 sürüde 1800 kan örneği incelenmiş ve bu örneklerin 162'sinde %9,0 oranında *N.caninum* antikorların rastlanmıştır. 1980'li yıllarda aynı bölgede toplanan 260 örneğin 45'i yani %13,5'i *N.Caninum* antikorları olan pozitif bulunmuştur.

İskoçya'da sığırlarda yaygın olarak görülen abort vakalarında fötusların %15,9' unda bu parazitin antikorları bulunmuştur. (6)

İspanya'nın Austrias bölgesinde 1997 Ekiminde 43 çiftlikte gerçek prevalans %30,6 olarak bulunmuştur.

Yine diğer bir çalışmada 43 sürüden 889 sığırdan yapılan çalışmada *N. Caninum*'un sebep olduğu abortların %38,7 oranında olduğu tespit edilmiştir. (Mainen-Jasime) 1999.

Yeni Zelanda'da *N.caninum* prevalansı %50 olarak belirlenmiştir. California'da %19-45, İrlanda'da %12,6, İngiltere'de %4,2-21 oranında prevalans kaydedilmiştir.

1996'da Kuzey İspanya'da abort olmuş besi sığırlarının fötuslarında yapılan çalışmalarda *N. caninum*'un sebep olduğu abort vakalarının %32-57 arasında olduğu bulunmuştur.

Türkiye’de Neosporanın yayılışı ile ilgili sadece Bıykoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma vardır. Bu çalışmada İç Anadolu bölgesi sığırlarında *N.caninum*’un varlığı araştırılmış 3290 sığır serumu IDEXX-ELİSA *Neospora caninum* antibody test kiti ile çalışılmış, sonucunda Ankara’da %10, Çankırı’da %6,93, Eskişehir’de %5,46, Kayseri’de %10,8, Kırıkkale’de %32,72, Kırşehirde %19,55, Nevşehir’de %5,10, Yozgat’ta %20,32 oranında seropozitiflik saptanmıştır.

Bu çalışmada Kocaeli’nde 97 sığır serumu cELİSA *N.caninum* antibody test kiti kullanılmış ve %5,05 oranında seroprevalans saptanmıştır. Bu bulguları Bıykoğlu’nun, Çankırı, Eskişehir ve Nevşehir’deki bulgularına yakın değerdedir. Bölgedeki atık durumuna bakıldığında, küçük aile işletmeciliği yaygın olduğundan vakaların sporodik seyir gösterdiği belirlenmiştir.

Dubey’in çalışmalarında *N.caninum*’a bağlı abort vakalarının yaş ilişkisi araştırılmıştır. Neosporaya bağlı abortlar genellikle 8 yaşına kadar görülmektedir. Sığırlardaki abortlar en yaygın olarak 4 yaşlarında görülmüştür. Yine başka bir çalışmada 3.5, 4.5, 5.5 yaşlarında abortların daha yaygın olduğu tespit edilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada abort vakalarının genellikle 3, 4, 5 yaşlarında yoğun olarak görüldüğü tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki bulguların Dubey’in bulgularıyla benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Çeşitli sığır populasyonlarından antijen örnekleri alınıp performansı optimize edilerek elde edilen cELİSA tabanlı monoklonal antikorlar, sığır abortlarına sebep olan *N.caninum* antikorlu serumları belirlemek için kullanılır. cELİSA’nın parazite özel mAb (mAb5B6-25) antijeni ve direk mAb (mAb4A4-2) competitor ile birleşebilmesi, her iki mAb’lerle bağlanabilen antijenleri bulunduran farklı epitoplara bulundurması, immunodominant 65-kDa taşıyıcı yüzey antijenleri içermesi farklılıklarındandır.

cELİSA, basit, hızlı ve sığırlarda bir single cut off değeri kullanılarak *N.caninum* enfeksiyon durumunu kesin olarak belirleyen metot sunmaktadır.

cELİSA çeşitli antijenlerdeki epitoplara bulunduran test serumlarında antikorlarla birleşebilen ve mAb içermektedir, mAb, fare immunoglobulinleriyle direkt bağlanabilen ikincil antikordur. Eğer mAb’de olduğu gibi, aynı epitopa direk bağlanabilen antikorlar içeren test serumu olursa absorbansı karışık mAb içeren

kuyucuklarında daha az olacaktır. Kuyucuklardaki test serumunda sadece mAb bulunur.

cELİSA'nın bir avantajı da bir tek epitopa antikorların seviyesin tahmin edilmesini sağlar ve conventional ELİSA sisteminden daha spesifiktir. Competetive ELİSA sığırlardaki *N.caninum* antikorlarının, *N.caninum* antijenlerine (65kDa) direk bir mAb olarak bağlandığını gösterir.

N.caninum etkenlerinin abort üzerinden izolasyonu bunun ekim çalışmaları hassas ve zorlu bir tekniktir. Bölgedeki atık durumunu tespit etmek için bizim çalıştığımız üç fötüs bu çalışma için istenen sonucu vermesi açısından yetersizdir. Bu konu ile ilgili çalışan araştırmacılarda gördüğümüz etken izolasyonu için en az 50 abort yapmış sığır ile çalışılması ve abortların yoğun olduğu bölgelerden seçilmesi dikkat çekmektedir.(15)

KAYNAKLAR

1. Andrianarivo, A.G., Choromanski, L., McDonough, S.P., Packham, A.E., Conrad, P.A., Immunogenicity of killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants, International Journal for Parasitology, 29, 1613-1625, 1999
2. Barling, K.S., McNeill, J.W., Thompson, J.A., Paschal, J.C., McCollun, T., Craig, T.M., Adams, L.G., Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves, JAVMA, Vol 217.No:9, 1356-1360, 2000
3. Barling, K.S., Sherman, M., Peterson, M.J., Thompson, J.A., McNeill, J.W., Craig, T.M., Adams, L.G., Spatial association among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalance to *Neospora caninum* in a population of beef calves, JAVMA, Vol 217, No: 9, 1365, 2000
4. Bıyıkoglu, G., Aksoy, E., Bozkır, M., Küçükayan, U., Ertürk, A., İç Anadolu bölgesi sığırlarında *Neospora caninum*'un varlığının araştırılması, Parazitoloji kongresi, 24-28 Eylül 2001
5. Björkman, C., M.Holmdahl, O.J., Uggla, A., An indirect enzyme-linked immunoassay (Elisa) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle, Veterinary Parasitology, 68, 251-260, 1997
6. Björkman, C., Uggla, A., Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection, International Journal of Parasitology, 29, 1497-1507, 1997
7. Buxton, D., Caldow, G.L., Moley, S.W., Marks, J., Innes, E.A., Neosporosis and Bovine abortion in Scotland, Veterinary Record, 141, 649-651, 1997
8. Campero, C.M., Anderson, M.L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., Poso, M.A., *Neospora caninum* associated abortion in a dairy herd in Argentina, Veterinary Record, 143, 228-229, 1998
9. Conrad, P.A., Barr, B.C., Sverlow, K.W., Anderson, M., Daft, B., Kinde, H., Dubey, J. P., Munson, L., Ardans, A., In vitro isolation and characterisation of a *Neospora* sp. From aborted bovine foetuses, Parasitology (106), 239-249, 1993
10. Coşkun, S.Z., Aydın, L., Bayer, C., Seroprevalance of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey, Veterinary Record, 146, 649, 2000

11. Davison, H.C., Otter, A., Trees, A.J., Abortion due to *Neospora caninum* in British cattle, *International Journal of Parasitology*, 29, 1189-1194, 1999
12. Dijkstra, Th., Barkema, H.W., Eysker, M., Wouda, W., Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds, *International Journal of Parasitology* 31, 209-215, 2001
13. Dubey, J.P., Neosporosis-The first decade of Research, *International Journal of Parasitology*, 29, 1485-1488, 1999
14. Dubey, J.P., Neosporosis in cattle biology and economic impact, *JAVMA*, Vol.214, No:8, 1160-1163, 1999
15. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., A review of *Neospora caninum* and neosporosis, *Veterinary Parasitology*, 67, 1-59, 1996
16. Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J. and Uggla, A.: A newly recognized fatal protozoan disease of dogs, *JAVMA*, 192, 1269-1285, 1988
17. Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S. and Topper, M.J.: Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental infection. *JAVMA*, 193, 1259-1263, 1988
18. Ellis, J., Luton, K., Baverstock, P.R., Brindlay, P.J., Nimmo, K.A., Johnson, A.M., The phylogeny of *Neospora caninum*, *Mol. Biochem. Parasit.*, 64, 303-311, 1994
19. Gonzales, L., Buxton, D., Atxaeronio, R., Aduriz, G., Maley, S., Marco, J.L., Cuervo, L.A., Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Northern Spain, *Veterinary Record* 144, 145-150, 1999
20. Hietala, S.K., Thurman, M.C., Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies, *International Journal of Parasitology*, 29, 1669-1676, 1999
21. Jardine, J.E., The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin, *Vet. Parasitol.*, 62, 231-240, 1996
22. Liddel, S., Jenkins, M.C., Collica, C.M., and Dubey, J.P., Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in Balb/c mice by vaccination, *J. Parasitol.*, 85(6), 1072-1075, 1999
23. Lindsay, S.D., Upton, S.J., Dubey, J.P., A structural study of the *Neospora caninum* oocyst, *International Journal of Parasitology*, 29, 1521-1523, 1999

24. Lindsay, S.D., Dubey, J.P., Duncan, R.B., Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*, *Veterinary Parasitology*, 82, 327-333, 1999
25. Mainer-Jaime, R.C., Thurmond, M.C., Berzal, H.B., Hietala, S.K., Seroprevalance of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in nothern Spain, *Veterinary Record*, 145, 72-75, 1999
26. Maley, W, S., Buxton, D., Thomson, K.M., Schriefer, C.E.S., Innes, E.A., Serological analysis of calves exoerimentelly infected with *Neospora caninum*: a 1- year study, *Veterinary Parasitology*, 96, 1-9, 2001
27. McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*, *International Journal of Parasitology*, 28, 1473-1478, 1998
28. McAllister, M.M., R.Jolley, W., Wills, R.A., Lindsay, D.S., McGuire, A.M., Tranas, J.D., Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*, *Am J vet Res*, 59, 441-444, 1998
29. McAllister, M.m., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., et al., Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*, *International Journal of Parasitology*, 28, 1473-1478, 1998
30. Perez, E., Gonzales, O., Dolz, G., Moraks, J.A., Bair, B., Conrad, P.A., First report of Bovine neosporosis in Dairy cattle in Costa Rica, *Veterinary Record*, 142, 520-521, 1998
31. Schares, G., Rauser, M., Zimmer, K., Peters, M., Wurm, R., Dubey, J.P., C. de Graaf, D., Edelhofer, R., Mertens, C., Hess, G., and J. Conraths, F., Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions, *J. Parasitol*, 85 (4), 688-694, 1999
32. Speer, C.A., Dubey, J.P., McAllister, M. M., Blixt, J.A., Comparative ultra structure of tachyzoites, bradizoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, *International Journal of Parasitology*, 29, 1509-1519, 1999
33. Trees, A.J., Guy, F., Tennant, B.J., Balfour, A.H. and Dubey, J.P.: Prevalances of antibodies to *Neospora caninum* in a population or urban dogs in England, *Vet. Rec.*, 132, 125-126, 1993
34. Tuzcu, M., Çiftçi, M.K., Neosporosis, *Veterinarium* (2000), 11, 1.2: 49-53, 2000

35. Uggla, A., Stenlund,S., Holmdahl,O.J., Jakuben,E.B.,Thebo,P., Kindahl, H., Björkman,C.,Oral *Neospora caninum* inoculationof Neonatal calves,International Journal of Parasitology, 28, 1467-1472, 1998
36. Umur, Ş., Arslan, M.Ö., Evcil Hayvanlarda Neosporosis Kafkas Üniv.Vet.Fak.Derg. Cilt: 3, Sayı:1, 115-121 1996
37. Waldner, C.L., Janzen, D.E., Henderson, J., Haines, D.M., Outbreak of abortion association with *Neospora caninum* infection in a beef herd, JAVMA, Vol 215, No:10, 1485-1490, 1990,
38. Yılmaz, F., Neosporosis, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 21(4): 446-452,1997

ÖZGEÇMİŞ

Haziran 1976'da İzmitte doğdu. İlk ve orta öğrenimini İzmitte tamamladı.1994 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünü kazandı ve eğitime başladı. 1998'de Biyoloji Öğretmenliğinden mezun olup halen Biyoloji Öğretmenliği yapmaktadır. Aynı zamanda Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü biyoloji Yüksek Lisans programı sınavını kazanarak Parazitoloji alanında yüksek lisansa başladı. Yüksek lisansta Moleküler Biyoloji, Sitogenetik, İmmünoloji, Mikrobiyoloji alanlarında ders aldı. Orta derecede İngilizce bilmektedir.