

EVCİL HAYVANLARDA NEOSPOROSİS**Neosporosis in Domestic Animals**

Şinasi UMUR*

M. Özkan ARSLAN**

ÖZET

Son yıllarda güncellenen Neospora türleri, Apicomplexa anacında yer alan protozoonlar olup, köpek ve sığırlarda ölümcül sinirsel bozukluk ve abortlara neden olmakta, nadiren koyun, keçi, at ve geyiklerde de görülmektedir.

Konuyla ilgili olarak Türkiye'de herhangi bir çalışma veya makaleye rastlanmamıştır. Bu nedenle bu makalede, Neospora türlerinin tarihçesi, sınıflandırılması, morfolojisi, yaşam çemberi, bulaşma yolları, yayılışı, klinik belirtileri, teşhisi, histopatolojisi, sağaltımı ve korunma yolları ile ilgili kısa bilgiler verilmiştir.

Anahtar Sözcükler : Neosporosis, Neospora caninum, atık, sığır, köpek.

SUMMARY

Neospora species recognised recently has been classified as Apicomplexa parasite. It can cause fatal neurological disorders and abort in dogs and cattle. The causative organisms were seen rarely in sheep, goats, horses and deer.

There is no study and article about this subject in Turkey. So, in this article, it has been given some informations about their histories, morphology, life-cycle, routes of contamination, distribution, clinical sings, diagnosis, histopathology, treatment and prevention methods.

Key Words : Neosporosis, Neospora caninum, abort, cattle, dog.

GİRİŞ

İlk kez 1984 yılında Norveç'te sinirsel bozukluk ve felç belirtileri gösteren yeni doğmuş köpeklerde morfolojik olarak T. gondii'ye benzer yapıda, ancak ondan farklı olan bir protozoona rastlanmış, fakat tanımlanamamıştır(1-5). Etken 1988 yılında Dubey ve arkadaşları tarafından A.B.D.'inde izole edilerek Neospora caninum olarak adlandırılmış (1), 1995 yılında da Avrupa'da izole edilmiştir(6).

Neospora caninum'a benzer yapıda bir protozoon ise sığırlarda ilk kez 1987'de görülmüş ve Neospora sp. olarak adlandırılmıştır(7-13). Daha sonra sığırlarda konjenital enfeksiyon ve atığa neden olduğu birçok ülkede saptanmıştır (14-21). Ender olmakla birlikte koyun, keçi, at (8,13,22-24) ve geyiklerde de (25) Neospora sp.'ye rastlanmıştır.

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 (6,9,10,26).

Sınıflandırma : Elektron mikroskopik ve PCR çalışmaları ile etkenin nukleotit dizileri, DNA sıklığı ve ribosomal RNA'ları incelenmiş ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır (3,6,10,12).

Anaç : Apicomplexa Levine, 1970
Sınıf : Sporozoa Leuckart, 1879
Sınıfaltı: Coccidia Leuckart, 1879
Takım : Eucoccidida Leger ve Duborg, 1910
Takımltı : Eimeriina Leger, 1911
Aile : Sarcocystidae Poche, 1913
Cins : Neospora
Tür : Neospora sp., N.caninum

Morfoloji: Etkenin şimdiye kadar sadece takizoit ve doku kistleri ile bunların içlerindeki bradizoitler tanımlanmış olup (1,2,4,6,9,27,28), diğer gelişme şekilleri, T. gondii'ninkine benzediği sanılmakla birlikte henüz belirlenememiştir (1,4, 13,27-29).

Takizoitler 4-7 x 1.5-5 µm çapında, tipik Apikompleksan şekilde olup, hücre içerisindedir parazitofor vakuolde bulunanlar kabaca muz şeklinde, hücre dışında serbest olanlar ise kısmen 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 (1,3,6,28,29). Bir veya 2 çekirdek taşırlar. Tek plasmolemma içeren pellicüle sahip olup iç tarafta çift katlı membran kompleksi vardır. Polar halka ve buradan çıkan 22 adet subpellicüler mikrotübül ve konoidin arkasında iki apikal

* Doç.Dr., KAÜ Vet. Fak. Parazitoloji Anabilim Dalı, Kars- Türkiye

** Yrd. Doç.Dr., KAÜ Vet. Fak. Parazitoloji Anabilim Dalı, Kars- Türkiye

halka bulunur. Parazitin ön yarımında 12 roptri, konoid hizasında ise 6-8 roptri vardır. Mikronem ön yarımında fazla sayıda, arka yarımında ise azdır. Stoplazmada 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 (1,3) veya varsa inaktiftir(28,29). Parazitofor vakuolde intravakuoler tubüller mevcuttur (3, 28,29).

Sadece merkezi sinir sisteminde bulunan doku kistleri, 1-4 µm kalınlıkta bir duvara sahip olup, septum benzeri yapılarla bölümlere ayrılmakta ve kist duvarında, lipid benzeri yapılar görülmekte, ayrıca vesiküler yapılar bulunmaktadır (4). Kistler içerisinde bulunan bradizoitler ise ince yapılı ve 3-4.3x0.9-1.1 µm çapında olup, sinir hücrelerinde paketler halinde bulunur ve PAS pozitif granüller fazladır. Takizoitlerde ise bu granüller daha azdır (1,28,29).

Önceleri ayrı tür sanılan, köpek orjinli *N. caninum* ile sığır orjinli *Neospora* sp. arasında morfolojik yapı açısından bir fark görülememiş (2,4,22), ancak henüz sinonim olarak da kabul edilememiştir (30).

Yaşam çemberi : Etkenin yaşam çemberi ve kuluçka süresi henüz bilinmiyor, ancak bu organizma ile *Toxoplasma* ve *Sarcocystis* türleri arasındaki benzerlik nedeniyle son konağın karnivor olduğu ve etkenlerin sindirim sisteminde eşeyssel gelişimini tamamladığı ve bunların dışkıyla ookist benzeri bir yapının dışarı atıldığı ve bunu alan sığırların arakonak görevi yaptığı ve bunlarda endodyogeni ile çoğaldığı sanılmaktadır. Buna karşın yapılan deneysel çalışmalarda kedi, köpek ve fare gibi hayvanlar denemiş, ancak kesin konağı belirlemek mümkün olmamıştır (1,6,11-15,28,31). Diğer taraftan tilkilerin de son konak olmadığı (13) ve hastalığın su veya gıda kaynaklı olabileceği de ileri sürülmektedir (1,14).

Bulaşma : Şimdilik sığırlarda bilinen tek bulaşma yolu plasental bulaşmadır (7,12, 13,18,19). Ancak, enfeksiyonun bir sürüde ilk kez ortaya çıkmasında, sürüye enfekte bir dişi katılması ya da olası son konak olan karnivor dışkısı yenmesinin sorumlu olduğu sanılmaktadır (18). Hayvanlarda yaş, ırk ve mevsimlere bağlı olarak bulaşmada bir

değişiklik bulunmadığı (18,20,29,32) ve etkenlerin sığırlarda tekrarlayan abortlara neden olabileceği sanılmakta (4,9, 13,14,33), ancak abortun tetaralama süresi veya kaç gebelik boyunca devam ettiği henüz bilinmemektedir (34).

Köpeklerde de bulaşma plasental yolla olmaktadır (2,31,35-37). Enfeksiyonun köpeklerde ömür boyu sürdüğü sanılmakta, ancak başka bulaşma yolları da olabileceği öne sürülmektedir (23,29,37).

Bulaşma farelerde genellikle plasental yolla, nadiren sütle olmakta (38), enfeksiyonun ender olarak görüldüğü at (22,24) ve geyiklerde (25), ise oral yolla olduğu sanılmaktadır.

Sığırlardaki Yayılışı: Neosporosis Avustralya, Yeni Zelanda, Almanya, İngiltere, İsveç, Japonya, İsrail, Güney Afrika, Kanada, Meksika, Hollanda ve Zimbabve dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde görülmektedir (7,10,15,18,19,35,39).

Ülkelere, araştırmacılara ve materyal alınan hayvanların artık yapıp yapmadıklarına göre değişimle birlikte, atık yapmış sığırların genel olarak 1/3'ünde neosporosis rastlanmakta (7-11,16,17,19), bu oran bazen %67'ye kadar çıkmaktadır (7). Bar ve ark. (22), atık 138 fötüsü makroskopik olarak fotal neosporosis şüpheli ve şüpheli olmayan şekilde ikiye ayırdıktan sonra, İFAT ile şüpheli 74 buzağının 37'sinde (%50), herhangi bir belirti göstermeyen 38 buzağının ise sadece 1'inde (%2.6) *Neospora* antikorunu saptamışlardır.

Kaliforniya'da abort yapmış sığırlarda enfeksiyonun % 19-42.5 arasında değiştiği (8, 9,18) ve 1985-1990 yılları arasında neosporosis bağılı 221 abort olayına rastlandığı kaydedilmiştir (32).

İrlanda'da, atık 335 sığır fötüsünden alınan beyinlerin 21'i histopatolojik kesitlerde irinsiz encephalitis gösterdiği halde, sadece 14'ünde immunohistokimyasal olarak etken saptanmıştır. Ayrıca 324'ü atık yapmış ve 165'i normal olmak üzere 489 sığırdaki yapılan serolojik incelemede abort yapanların 41'i (%12.6), sağlamların ise 5'i (%3) pozitif bulunmuştur (30).

İngiltere'de beslenme ve yetiştirme koşullarının çok iyi olduğu, döllenmenin suni tohumlamayla yapıldığı ve atığa neden olacak başka bir etkene rastlanmayan 34 fötüstan, 7'sinin beyninden histolojik kesit

alınmış ve bunların ikisinde immunohistokimyasal boyamayla *N.caninum*'a rastlanmıştır. Ayrıca incelenen 8 fôtusun anahtarının tamamında İFAT ile yapılan serolojik kontrolde yüksek titrede *N.caninum* antikorlu saptanmıştır (17). İngiltere'de yapılan diğer çalışmalarda (14-16,40) ise enfeksiyon oranı %4.2-21 olarak kaydedilmiştir.

Neosporosisin sığırlardaki yayılışı Güney Afrika'da %1.4 (12), İsrail'de %15 (34), Almanya'da %45.5 (33), Yeni Zelanda'da %30-50 (9), Kanada 'da %36-57.9 oranında saptanmıştır (19).

Köpeklerdeki yayılışı : İngiltere'de, klinik neosporosis görülmeyen ve rastgele seçilmiş 163 köpektan alınan serumlardan 27'si (%16.6), *N.caninum* yönünden pozitif bulunurken (5), bir başka çalışmada ise 104 köpeğin 6'sında (%5.8) *N.caninum* saptanmış ve bu köpeklerden sadece birinde klinik neosporosis gözlenmiştir (41).

Neosporosis Amerika'da sağlıklı köpeklerde % 13 olarak saptandığı halde (14), Kansas'ta herhangi bir nedenle hasta olan 229 köpeğin %2.2'sinde *N. caninum* antikorlarına rastlanmıştır (5). Enfeksiyonun yayılışı İsveç'te %0.5 (35, 42), Danimarka'da ise %15.3 (31) oranında bulunmuştur. Enfeksiyonun görülmesinde yaş, cinsiyet ve ırk gibi faktörlerin etkili olmadığı, ancak klinik belirtilerin bir yaşından küçüklerde daha belirgin olduğu belirtilmektedir (43).

Klinik Belirtiler: Etken köpeklerde tipik olarak, spastik karakterli ve aşağıdan yukarıya doğru yapılan kısmi felçle karakterize bozukluklara yol açmakta, zamanla felç 4 bacağı yayılmakta ve myocarditis sonucu ani ölümlere neden olmaktadır (2,5,28,29, 36,37,43). Nadiren ateş, iştahsızlık, kaslarda atrofi, baş titremesi (43) ile baş ve göğüs bölgesine lokalize olan nodüler pyogronulomatöz dermatitis görülmektedir (44).

Sığırlarda en yaygın klinik belirti abort olup, 2-9. aylar arasında rastlanmakla birlikte (8,21,22,45), genellikle gebeliğin 5-6. aylarında yoğunlaşmaktadır (7,8,13,34).

Neosporosisin yeni doğan buzağılarda encephalomyelitis, sinirsel bozukluklar ve felçlere neden olduğu ileri sürülmekte (14, 30,34), buna karşın sağlıklı buzağılarla, eklem bozuklukları ve doğmasal ataksi ile atık yapılmış buzağılarda da etkene rastlanmak-

tadır (13,21,45). Ayrıca enfekte buzağılarda zayıflık, halsizlik, ayağa kalkamama, arka ayaklarda felç, göz ve burunda seropurulent akıntı görülebilmektedir (39,45,46).

Enfeksiyonun ender olarak görüldüğü geyik (25) ve atlarda da (22,24) köpek ve sığırlardakine benzer klinik ve patolojik bozukluklara yol açmaktadır.

TEŞHİS: Teşhis için İFAT (6,9,10,14, 21,25,33), ELİSA ve indirekt ELİSA ile olumlu sonuçlar alınmakta (7,9,42,47), henüz pratiğe aktarılmamış olmakla birlikte, PCR iyi bir teşhis yöntemi olarak umut vermektedir (48).

Köpeklerden izole edilen etkenler Vero veya insan deri fibroblast hücre kültüründe, sığır serumsuz RPMI-1640 mediumda üretilir ve *N.caninum*'un 1. kuşak izolatu (NC-1) antijen olarak kullanılır (14,27).

İFAT köpeklerdeki seroprevalansı belirlemek amacıyla 1/50 sulandırmada başarıyla kullanılmaktadır. Ancak sığırlarda *N. caninum*'a karşı oluşmuş antikorların tam bağlanamaması ve çapraz reaksiyonlar nedeniyle testin sığırlarda tam güvenilir olmadığı ve bu nedenle sığır izolatlarının antijen olarak kullanılması gerektiği bildirilmektedir (14,15). Farklı oranlar ileri sürülmekle birlikte (15,22), araştırmacıların çoğu (3,7,10,18, 19), sığırlarda İFAT ile yapılan çalışmalarda pozitif sonuç için 1/640 sulandırmayı yeterli görmekte ve taban değer olarak bu sulandırmayı önermekte, ancak 1/10280 sulandırmaya kadar antikora rastlandığı belirtilmektedir (22).

Sığırlarda yapılan serolojik testlerde hata payının yüksek olması ve İFAT'ın gebeliğin 7. ayından sonra yanlış negatif sonuçlar verebilmesi nedeniyle (12), kesin teşhis için serolojik testlerin mutlaka histolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle desteklenmesi gerektiği bildirilmiş, ayrıca, aborttan kısa süre sonra antikor titresinin düştüğü, bu nedenle en geç 4 haftada serum alınıp incelenmesi gerektiği öne sürülmüştür (10,12,14,15,30).

ELİSA'da normal takizoit antijenleri, indirekt ELİSA'da ise immunostimulasyonla parçalanmış takizoit proteinleri kaplı antijen olarak kullanılmış ve İFAT standardıyla birincisi % 97.6, ikincisi % 95.6 olumlu sonuç vermiştir (47). İFAT'ın güvenilirliği % 76.5, ELİSA'nın ise % 92.19 dolayında saptanmıştır (7). Björman ve ark. (42),

İsveç'te 398 köpek serumunda ELİSA ile 2 N.caninum yakaladıkları halde, aynı serumlarda İFAT ile sadece 1 pozitif olgu yakaladıklarını, bu nedenle ELİSA'na daha duyarlı olduğunu öne sürmüşlerdir.

Son zamanlarda, immunohistokimyasal testlerde kullanılan ve N.caninum takizoitlerine karşı tavşanlarda üretilmiş poliklonal antikorlar yerine, immunoelektron mikroskop ve western blot yöntemiyle farelerde monoklonal antikorlar geliştirilmeye çalışılmaktadır (27). Yapılan çalışmada, N.caninum takizoitlerine karşı geliştirilen ve 6G7 olarak adlandırılan fare monoklonal antikorunun birçok antijeni tanıdığı, ancak bunun aynı ailede bulunan T. gondii antijenlerini de tanıdığı gözlenmiş, buna karşın bu hafif çapraz reaksiyonun İFAT ve ABC (Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleksi) de görülmediği bu nedenle teşhiste sorun oluşturmadığı belirtilmiştir. Ayrıca, formolde tespit ve parafin bloklama işlemlerinin T.gondii' de yıkımlanmaya neden olduğu, bu yüzden bu benzerliğin sorun oluşturmayacağı kaydedilmiştir (27).

PCR ile ilgili araştırma yapan Laly ve ark. (48), deneysel olarak enfekte edilen fare beyinlerinden saf olarak elde ettikleri ve 14-3-3 olarak kodlanan homolog proteini cDNA olarak klonlamışlardır. Bu protein birçok ökaryot organizmada bulunan yüksek dereceli bir aminoasit olup, PCR ile N.caninum'un genomik DNA'sından çoğaltılmıştır. Bu DNA parçası T.gondii ve Sarcocystis türlerinde bulunmadığından ayırıcı tanıda yararlıları ortadan kaldıracak gibi görünmektedir (48).

Dokularda bulunan Neospora takizoit ve bradizoitlerinde roptri, mikronem ve elektron koyu cisimcik sayısının fazla olması, yerleşme yerlerinin farklı olması ve PAP testinin negatif olmasına karşın, diğer kist oluşturan Toxoplasma, Sarcocystis gibi Apicomplexa anacında bulunan parazitlerinden morfolojik olarak ayırmak zordur (1, 5,14,28,49). Bu denemle farelere subkutan yolla takizoitler verilmiş ve enjeksiyondan 13-18 gün sonra PCR ile sfesifik N.caninum DNA fragmanları araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Özellikle Np21/Np6 primer DNA çiftinin epidemiyolojik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabileceği saptanmıştır (49).

Histopatoloji ve histopatolojik teşhis:

Atık buzağılarda özel bir belirtiyeye neden olmamakla birlikte, genellikle serebral kortekste ve medulla spinaliste gliosis, epikard, miyokard, plasenta ve renal kortekste mononükleer hücre infiltrasyonu, irinsiz multifokal ve granülatöz encephalitis, nekrotik encephalitis, myocarditis, myositis, hepatitis, placentitis görülür. Çoğunlukla otoliz ve mumyalaşma başlangıcı veya nadiren mumyalaşma görülür (7,9,12-14,16,21, 36). Ancak lezyonların genellikle 5-6 aylıkken atılmış fütuslarda görüldüğü, 7 aydan daha büyük buzağılarda ise oluşan immün yanıt nedeniyle azaldığı veya tipik olmadığı belirtilmektedir (14). Özellikle beyin, kalp ve böbrekteki nekrotik lezyonlarda çok sayıda takizoit bulunur ve bunlar immunohistokimyasal boyamalarla tespit edilebilir. Diğer tekniklerle bunları saptamak zordur (8,9, 11-14,16,34). Doku kistleri ise nekrotik olmayan alanlarda görülmekte, hatta yangı bulunmayan alanlarda da rastlanmaktadır (1,8,14,16). Köpek ve atlarda da benzer lezyonlara rastlanır (2,22, 24,26,29,36).

Lezyonlardan özellikle irinsiz encephalomyelitis, myocarditis ve plasentitisin hastalık için tipik olduğu ve ana karnındaki ölümün myocarditis sonucu olduğu ileri sürülmektedir (13,22).

Histopatolojik teşhis için aseptik koşullarda abomasum sıvısı alınır, bakteri, virus ve mantar yönünden incelenir ve bunlar elimine edilir. Diğer taraftan beyin, kalp, plasenta, medulla spinalis, böbrek, fütal zarlar, kara ve akciğer %10'luk tuzlu formol solusyonuna alınır. Parafin bloklara yerleştirilerek 5 µm kalınlığında kesitler yapıldıktan sonra Neospora için spesifik olan ABC ile boyanır (8,9,11-14,34). Ancak kesit alınan dokuların irinsiz ve otolize olmamış olması ve beynin öncelikle incelenmesi gerekir (11,14,21,22,34). Ayrıca kesitler Toxoplasma ve Sarcocystis yönünden kontrol edilmelidir. Diğer taraftan serum alınarak abort etkeni diğer mikroorganizmalar yönünden incelenmelidir (9,13,14,22,34). Gerekirse şüpheli beyin dokuları, immunsupressif farelere inokule edilerek beyinde kalın duvarlı kist dokuları aranır (2,13).

Sağaltım: Sağaltım için şu anda özel bir ilaç yoktur. Hücre kültürlerinde üretilen Neospora'lara karşı, insan ve hayvanlarda

protozoonların sağaltımında kullanılan, yaklaşık 50 farklı ilaç ile (7,50,51) gamma interferon (52) ve monoklonal antikörler (27) denenmiş ve bunların invitro ortamda değişik oranlarda etkili olmasına karşın, enfekte hayvanlarda fazla yararı olmamıştır (6, 7,29).

Buna karşın, enfeksiyonun erken teşhis edilebildiği olaylarda Clindamycin ile Sülfonamid/Trimethoprim kombinasyonlarının klinik belirtileri azalttığı, fakat oluşan lezyonların geri dönüşümsüz olması nedeniyle tam anlamıyla tedavi edilemediği belirtilmektedir (6,29,36,43). Bununla birlikte kutanöz neosporosisin sağaltımında Clindamycin hidroklorid başarıyla kullanılmıştır (44).

Korunma: Parazitin henüz biyolojisi, bulaşma yolları, klinik bulguları tam olarak bilinemediğinden şu anda belirgin bir korunma önlemi yoktur (15). Ayrıca, etkenlerin koruyucu düzeyde bağışıklığa neden olmadığı, bu nedenle aşılama çalışmalarının da başarısız olacağı ileri sürülmektedir (7,33, 35). Ancak genel bir kural olarak yem ve su kaynakları hayvanların dışkılarıyla kontamine olmaktan kurtarılmalı, atık yavru ve fütüsler dikkatlice imha edilmelidir (7,8,14). Eğer bir sürüde tetarlayan doğmasal enfeksiyonlar var ve sık sık atık oluşuyorsa akla neosporosis gelmeli (7) ve enfekte hayvanlar sürüden ayrılmalıdır (14).

KAYNAKLAR

1. Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J. and Uggla, A.: A newly recognised fatal protozoon disease of dogs. *JAVMA*, 192:1269-1285, 1988.
2. 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.
3. Ellis, J., Luton, K., Baverstock, P.R., Brindley, P.J., Nimmo, K.A., Johnson, A.M.: The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasit.*, 64:303-311, 1994. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 65, 954).
4. Jardine, J.E.: The ultrastructure of brodyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origine. *Vet. Parasitol.*, 62: 231-240, 1996. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1996, 66. 6294).
5. Trees, A. J., Guy, F., Tennant, B.J., Balfour, A.H. and Dubey, J.P.: Prevalences of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Vet. Rec.*, 132:125-126, 1993.
6. Barber, J.S., Holmdahl, O.J.M., Owen, M.R., Guy, F., Uggla, A. and Trees, A.J.: Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitol.*, 111:563-568, 1995. (Ref.: *Vet. Bull.* 1996, 66, 1642).
7. Hoar, B.R., Ribble, C.S., Spitzer, C.C., Spitzer, P.G. and Janzen, E.D.: Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora* sp. infection. *Can. vet. J.*, 37: 364-366, 1996.
8. Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L., Conrad, J.P.A.: Neosporalike protozoon infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *JAVMA*, 198: 241-244, 1991.
9. Anderson, M.L., Palmer, C.W., Thurmond, M.C., Picanso, J.P., Blanchard, P.C., Breitmeyer, R.E., Layton, A.W. McAllister, M., Daft, B., Kinde, H., Read, D.H., Dubey, J.P., Conrad, P.A. and Barr, B.C.: Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *JAVMA*, 207: 1206-1210, 1995.
10. Dannat, L., Guy, F. and Trees, A.J.: Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd. *Vet. Rec.*, 137: 566-567, 1995.
11. Jardine, J.E. and Wells, B.H.: Bovine neosporosis in Zimbabwe. *Vet. Rec.*, 137: 223, 1995.
12. Jardine, J.E. and Last, R.D.: The prevalence of neosporosis in aborted bovine fetuses submitted to the Allerton Regional Veterinary Laboratory. *Onderspoort J. Vet. Res.*, 62:207-209, 1995.
13. Obendorf, D.L., Murray, N., Weldhuis, G., Munday, B.L. and Dubey, J.P.: Abortion caused by neosporosis in cattle. *Aust. vet. J.*, 72: 117-120, 1995.
14. Otter, A., Jeffrey, M., Griffiths, I.B. and Dubey, J.P.: A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet. Rec.*, 136:602-606, 1995.
15. Trees, A.J., Guy, F., Low, J.C., Roberts, L., Buxton, D. and Dubey, J.P.: Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet. Rec.*, 134: 405-407, 1994.

16. Boulton, J.G., Gill, P.A., Cook, R.V., Fraser, G.C., Harper, P.A.V. and Dubey, J.P.: Bovine Neospora abortion north-eastern Wales. *Aust. vet. J.*, 72:119-120, 1995.
17. Duff, J.P. and Otter, A.: Neospora associated abortions in cattle. *Vet. Rec.*, 134: 145, 1994.
18. Pare, J., Thurmond, M.C. and Hietala, S.K.: Congenital Neospora infection in dairy cattle. *Vet. Rec.*, 136: 531-532, 1994.
19. Pare, J., Thurmond, M.C. and Hietala, S.K.: Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can. J. vet. Res.*, 60: 133-139, 1996. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1996, 66, 6903).
20. Collery, P.M.: Neospora abortion in cattle in Ireland. *Vet. Rec.*, 136: 595, 1995.
21. Yaeger, M.J., Shawd-Wessels, S. and Leslie-Steen, P.: Neospora abortion storm in a midwestern dairy. *J. vet. Diag. Invest.*, 6: 506-508, 1994. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 65, 6806).
22. Barr, B.C., Anderson, M.L., Sverlow, K.W. and Conrad, P.C.: Diagnosis of bovine fetal Neospora infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.*, 137: 611-613, 1995.
23. Gray, M.L., Harmon, B.G., Sales, L. and Dubey, J.P.: Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. *J. vet. Diag. Invest.*, 8: 130-133, 1996. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1996, 66, 5438).
24. Marsh, A.E., Barr, B.C., Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R., Conrad, P.A.: Neosporosis as a cause of equine protozoal encephalomyelitis. *JAVMA*, 209: 1907-1913, 1996.
25. Woods, L.W., Anderson, M.L., Swift, P.K. and Sverlow, K.W.: Systemic neosporosis in a California blacktailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) *J. vet. Diag. Invest.*, 6: 508-510, 1995. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 66, 6182).
26. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Adams, D.S., Gay, J.M., Baszler, T.V., Blagburn, B.L. and Thulliez, P.: Serological responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. J. vet. Res.*, 57: 329-336, 1996.
27. Cole, R.A., Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Torvivo-Kinnucan, M.A., Blagburn, B.L.: Characterisation of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Am. J. vet. Res.*, 55: 1717-1722, 1994.
28. Lindsay, D.S., Speer, C.A., Toivio-Kinnucan, M.A., Dubey, J.P., Blagburn, B.L.: Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 103-106, 1993.
29. Barber, J.S., Payne-Johnson, C.E. and Trees, A.J.: Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *J. small Anim. Pract.*, 37: 568-574, 1996.
30. McNamee, P.T., Trees, A.J., Guy, F., Moffet, D., Kilpatrick, D.: Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, 138: 419-420, 1996.
31. Rasmusen, K. and Jensen, A.L.: Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. *Vet. Parasitol.*, 62: 345-349, 1996. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1996, 66, 5434).
32. Thurmond, M.C., Anderson, M.L. and Blanchard, P.C.: Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *J. Parasitol.*, 81: 364-367, 1995. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 65, 7493).
33. Conraths, F.J., Bauer, C., Becker, W.: Detection of antibodies to *Neospora caninum* in cows from Hessian farms with abortions and fecundity. *Dt. tierarztl. Wschr.*, 103: 221-224, 1996.
34. Harmelin, A., Dubey, J.P., Perl, S., Nyska, A., Yakobson, B., Shpigel, N. and Orgad, U.: Neosporosis-another cause of bovine abortions in Israel. *Israel vet. J.*, 50: 55-56, 1995.
35. Björkman, C., Gustafsson, K., Holmdahl, J., Kindhal, H., Lunden, A., Magnusson, U., Stendlund, S. and Ugla, A.: *Neospora caninum*, a recent detect pathogen of cattle and dogs in Sweden. *Svensk Veterinartid.*, 46: 433-435, 1994 (Ref.: *Vet. Bull.*, 1996, 66, 919).
36. Knowler, C. and Wheeler, S.J.: *Neospora caninum* infection in three dogs. *J. small Anim. Pract.*, 36: 172-177, 1995.
37. Cole, R.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Sorjonen, D.C., Dubey, J.P.: Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.*, 81: 208-211, 1995. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 65, 7069).
38. Cole, R.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P.: Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J. Parasitol.*, 81: 730-732, 1995. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1996, 66, 5433).
39. Okuda, K., Hirata, Y., Fukutomi, T., Fuziwara, M., Shimada, A., Umemura, T.: *Neospora* induced hind limb paralysis in a 4-week-old Holstein calf. *J. Jap. vet. Med. Assoc.*, 48: 544-546, 1995. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 65, 8259).

40. Graham, D.A., Smyth, J.A., McLaren, I.E., Ellis, W.A.: Stillbirth/perinatal weak calf syndrome. *Vet. Rec.*, 139: 523-524, 1996.
41. Lathe, C.L.: *Neospora caninum* in British dogs. *Vet. Rec.*, 135: 532, 1993.
42. Björkman, C., Lunden, A., Uggla, A.: Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish dogs. *Acta vet. Scand.*, 35: 445-447, 1994. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1996, 66, 1588).
43. Barber, J.S. and Trees, A.J.: Clinical aspects of 27 cases of Neosporosis in dogs. *Vet. Rec.*, 139: 439-443, 1996.
44. Dubey, J.P., Metzger, F.L., Hattel, A.L., Lindsay, D.S. and Fritz, D.L.: Canine cutaneous neosporosis clinical improvement with Clindamycine. *Vet. Dermatol.*, 6: 37-43, 1995. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 65, 8258).
45. Gunning, R.F., Gumbrell, R.C., Jeffry, M.: *Neospora* infection and congenital ataxi in calves. *Vet. Rec.*, 134: 558, 1996.
46. Coltery, P.M.: *Neospora* encephlo-myelitis in a calf. *Vet. Rec.*, 135: 52, 1995.
47. Björkman, C., Lunden, A., Holmdahl, J., Baeber, J., Trees, A.J. and Uggla, A.: *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using iscom antigen. *Parasit. Immunol.*, 16: 643-648, 1994. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 65, 3081).
48. Laly, N.C., Jenkins, M.C., Dubey, J.P.: Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. *Mol. Biochem. Parasit.*, 75: 169-178, 1996. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1996, 66, 5435).
49. Yamage, M., Flechtner, O., Golstein, B.: *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain cyst DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.*, 82: 272-279, 1996. (Ref.: 1996, 66 6901).
50. Lindsay, D.S., Butler, J.M., Rippey, N.S. and Blagburn, B.L.: Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase / thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine. *Am. J. vet. Res.*, 57: 68-72, 1996.
51. Lindsay, D.S., Rippey, N.S., Cole, R.A., Parsons, L.C., Dubey, J.P., Tidwell, R.R., Blagburn, B.L.: Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agent against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. *Am. J. Vet. Res.*, 139:439-443, 1996.
52. Innes, E.W., Panton, W.R.M., Marks, J., Trees, A.J., Holmdahl, J. and Buxton, D.: Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *J. comp. Path.*, 113: 95-100, 1995. (Ref.: *Vet. Bull.*, 1995, 65, 7496).