**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARAZİTOLOJİ (VETERİNER)**

**DOKTORA PROGRAMI**

**İZMİR YÖRESİNDEKİ İTHAL SIĞIRLARDA *NEOSPORA CANINUM* ENFEKSİYONUNUN SEROPREVALANSI**

**HALİL LİMONCU**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-21022 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN–2022**

**KABUL VE ONAY**

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde Halil LİMONCU tarafından hazırlanan “İzmir Yöresindeki İthal Sığırlarda *Neospora caninum* Enfeksiyonunun Seroprevalansı” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18.05.2022

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Üye (T.D.) | : Doç.Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | ………… |
| Üye | : Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | ………… |
| Üye | : Prof. Dr. Şükrü KIRKAN | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | ………… |
| Üye | : Prof. Dr. Veli Yılgör ÇIRAK | Bursa Uludağ Üniversitesi | ………… |
| Üye | : Dr. Öğr. Üyesi Onur KÖSE | Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi | ………… |

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün …………………… tarih ve …………………… sayılı oturumunda alınan ………… nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

**TEŞEKKÜR**

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ’e çok teşekkür ederim. Ayrıca bana tezim ile ilgili her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ, Prof. Dr. Serkan BAKIRCI, Dr. Öğr. Üyesi Selin HACILARLIOĞLU, Arş. Gör. Dr. Metin PEKAĞIRBAŞ’a teşekkür ederim. Ayrıca tezimin laboratuvar kısmında varlığını her zaman hissettiğim Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Veteriner Hekim Hakan KANLIOĞLU’na ve *Neospora caninum* SRS2 gliserol konstraktlarını tedarik eden Dr. Frank Katzer’e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin saha çalışmalarındaki programlamada ve örnek toplamada desteklerini her zaman hissettiğim Veteriner Hekim İrfan ÖZÜDOĞRU, Veteriner Hekim Deniz KULAÇ, Veteriner Hekim Süleyman AZMAN, Veteriner Hekim Aslan BAYRAK, Veteriner Hekim Turgut KARAKUZU ve Veteriner Hekim Murat USTA’ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için başta eşim Uzm. Dr. Hatice LİMONCU’ya, doktora sürecimde neşe kaynağım olan oğlum Mehmet Ali LİMONCU ve kızım Zehra LİMONCU’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

.

**İÇİNDEKİLER**

KABUL VE ONAY i

TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi

ŞEKİLLER DİZİNİ viii

TABLOLAR DİZİNİ ix

RESİM DİZİNİ x

ÖZET xi

ABSTRACT xii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 2

2.1. *Neospora caninum*’un Taksonomisi 3

2.1.1. *Neospora caninum*’un Morfolojisi 4

2.1.2. *Neospora caninum*’un Yaşam Döngüsü 6

2.2. Sığırlarda Neosporosis 8

2.2.1. Sığırlarda Bulaşma 9

2.2.2. Sığırlarda Abort ve Prevalansı 12

2.3. Klinik Bulgular 14

2.4. Epidemiyoloji 15

2.5. *Neospora caninum*’un Patogenezi 16

2.6. Neosporosis’in Teşhisi 17

2.6.1. Histopatolojik Teşhis 18

2.6.2. Kimyasal ve Histokimyasal Boyama Yöntemleri ile *N. caninum*’un Tespiti 19

2.6.3. Serolojik Testler 20

2.6.3.1. İndirekt Florasan Antikor Testi (IFAT) 23

2.6.3.2. Enzim İşaretli İmmunosorbent Assay (ELISA) 24

2.6.4. Moleküler Yöntemler ile Teşhis 28

2.7. Canlı *N. caninum* İzolasyonu 29

2.8. Neosporosis’in Kontrolü 34

3. GEREÇ VE YÖNTEM 38

3.1. Çalışma Bölgeleri ve Kullanılacak Serum Örneklerinin Toplanması 38

3.2. *Neospora caninum* SRS2 İndirekt ELISA Testinde Kullanılacak Rekombinant Proteinin Ekspresyonu 39

3.3. *Neospora caninum* SRS2 İndirekt ELISA Testinde Kullanılacak Rekombinant Proteinin Miktarlarının Belirlenmesi 41

3.4. İndirekt Enzim İşaretli İmmunosorbent (ELISA) Testi 42

3.5. İstatistiksel İnceleme 45

3.6. SRS2 İndirekt ELISA Testinde Kullanılan Reaktiflerin Dilüsyonları ve Kesim (cut-off) Noktasının Belirlenmesi 46

3.6.1. ELISA Testinin Standardizasyonu 46

4. BULGULAR 49

4.1. *Neospora caninum* SRS2 İndirekt ELISA Testinde Kullanılmak Amacıyla Üretilen Rekombinant Protein 49

4.2. Saha Serum Örneklerinin SRS2 ve Ticari ELISA Testi Sonuçları 52

5. TARTIŞMA 60

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 73

KAYNAKLAR 75

EKLER 125

Ek 1. Süt sığırlarında *N. caninum* antikorlarının serolojik prevalansı. 125

Ek 2. Serolojik çalışmalarda *N. caninum*’a karşı spesifik antikorların tespitinin geliştirilmesi. 128

Ek 3. SRS2 İndirekt ELISA ve ticari ELİSA yöntemi ile seropozitif ve şüpheli saptanan örneklere ait bilgiler. 130

BİLİMSEL ETİK BEYANI 132

ÖZ GEÇMİŞ 133

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

%: Yüzde

µm: Mikrometre

BSA: Bovine Serum Albümin

BVD: Bovine Viral Disease

c-ELISA: Kompetatif Enzyme Linked Immunosorbent Assay

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA: Etilen Diamin Tetra-Asedik Asit

ELISA: Enzim İşaretli İmmunosorbant Testi

FBS: Fötal Sığır Serumu

g: Gram

GuHCl: Guanidinium chloride

His-tag: Histidin ile işaretli

HP: Histopatolojik

HRP: Horse Radish Peroksidaz

IBR: Infectious Bovine Rhinotracheitis

IFAT: Indirekt Fluoresan Antikor Testi

IFN: İnterferon

IgG: İmmunglobulin G

IHC: İmmunohistokimya

İF: İmmünfloresan

KDa: KiloDalton

MAbs: Monoklonal Antikorlar

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

NAT: Neospora Aglütinasyon Testi

NcSAG1: Neospora caninum surface antigen 1

NcSRS2: Neospora caninum SAG1-related sequence 2

ºC: Derece Celsius

OD: Optik Dansite

pAbs: Poliklonal Antikorlar

PBS: Tuzlu Fosfat Solusyonu

PP: Yüzde Pozitif

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RIA: Radyoimmünotest

Rpm: Dakikadaki Devir Sayısı

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez

WS: Working Solution

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

**Şekil 1.** *Neospora caninum*’un yaşam döngüsü 7

**Şekil 2.** *Neospora caninum*’un bulaşma yolları 10

**Şekil 3.** *Neospora* SRS2 indirekt ELISA’da kullanılan pozitif ve negatif serumların frekans dağılımları. 48

**Şekil 4.** *Neospora* ELISA’da kullanılan SRS2 rekombinant proteinine ait TG–ROC analiz sonuçları. 48

**Şekil 5.** Ölçümü yapılan elüsyonlardaki protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standard protein dilüsyon dağılımlarını gösteren grafik. 50

**Şekil 6.** SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA sonuçlarının yüzde dağılım grafiği 54

**TABLOLAR DİZİNİ**

**Tablo 1.** *Neospora caninum*’un sınıflandırılması. 3

**Tablo 2.** *Neospora caninum* tanı testleri geliştirilmesi için yaygın olarak kullanılan antijenler. 23

**Tablo 3.** *Neospora caninum*’un izolasyon çalışmaları. 30

**Tablo 4.** Sığırdan elde edilen Neospora *caninum* izolatları. 33

**Tablo 5.** Çalışmada kullanılan ithal sığırların lokalizasyon ve sayıları. 38

**Tablo 6.** Standardize edilmiş SRS2 indirekt ELISA’da kullanılan optimal antijen ve serum dilüsyonları 47

**Tablo 7.** ELISA’da kullanılan *Neospora* SRS2 rekombinant proteinine ait ELISA ölçümleri. 51

**Tablo 8.** Örnek alınan çiftlik, toplanan örneklerin çiftlikteki hayvan sayılarını temsil yüzdeleri ve ELISA sonuçları. 53

**Tablo 9.** Irklara göre saha serum örneklerinin SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA testi sonuçları. 55

**Tablo 10.** Hayvan dönemlerine göre saha serum örneklerinin SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA testi pozitiflik oranları. 56

**Tablo 11.** Menşeilerine göre saha serum örneklerinin SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA testi pozitiflik oranları. 56

**Tablo 12.** SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA kiti ile edlde edilen sonuçların karşılatırılması 59

**RESİM DİZİNİ**

**Resim 1.** *Neospora caninum’un* enfeksiyöz basamaklarının hematoksilen ve eozin ile boyanmış histolojik kesitinin mikroskobik görünümleri.. 5

**Resim 2.** *Neospora caninum*’un enfeksiyöz basamaklarının Giemsa boyama ile mikroskobik görünümleri 5

**Resim 3.** SRS2 rekombinant proteinin elüsyonlarının Commasie Blue G-250 ile boyalı SDS-PAGE jel elektroforezi görüntüsü. 50

**Resim 4.** Pürifiye rekombinant SRS2 protein elüsyonlarının immunojenitelerinin belirlenmesi amacıyla deneysel enfekte hayvanlardan elde edilmiş pozitif serum örneği kullanılarak yapılan western blot sonucu. 51

**ÖZET**

**İZMİR YÖRESİNDEKİ İTHAL SIĞIRLARDA *NEOSPORA CANINUM* ENFEKSİYONUNUN SEROPREVALANSI**

**LİMONCU H. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji (Veteriner), Doktora Tezi, Aydın, 2022.**

**Amaç:** Bu araştırma farklı ülkelerden gelen sığırlarda Neosporosis enfeksiyonunun yaygınlığı serolojik yöntemle incelemek amacı ile yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırma, Mart 2017- Şubat 2020 tarihleri arası, İzmir ilinin dört ilçesinde ve Aydın iline ait bir ilçede bulunan sığır ithalatı yapan farklı çiftliklerden toplam 613 adet sığır ile gerçekleştirilmiştir. SRS2 indirekt ELISA yöntemi ve ticari ELISA yöntemi ile kan serumu incelenmiş ve verilerin analizinde tanımlayıcı istatistik olarak ki-kare ve kappa testleri kullanılmıştır.

**Bulgular:** Araştırmaya dâhil olan sığırlar SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile incelendiğinde; 613 örnekte 52 pozitiflik (%8,5) bulunurken, ticari ELISA yöntemi ile incelendiğinde 25 örnekte (%4,1) saptanmıştır. Sığırlarda ırk, menşei, hayvan durumu (inek, düve) açısından istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenememiştir.

**Sonuç:** Bu çalışma ile İzmir yöresine ithal edilen sığırlarda *Neospora caninum* seroprevalansının yapılan çalışmalar ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, hastalığın kontrolü için kesin tanı konulan hayvanların sürüden çıkartılması ve ithal damızlık hayvan girişlerinde menşei işletmelerden ‘’NEOSPORA ARİ’’ belgesinin zorunlu tutulması ya da ithalatı yapılan hayvanlardan istenilen test listesinin içerisine *N. caninum* etkeninin eklemesi uygun olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** İthal sığır, İzmir, Aydın, *Neospora caninum*, ELISA.

**ABSTRACT**

**SEROPREVALENCE OF *NEOSPORA CANINUM* INFECTION IN IMPORTED CATTLE IN IZMIR REGION**

**LİMONCU H. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Parasitology (Veterinary Medicine), PhD Thesis, Aydın, 2022.**

**Objective:** This study was carried out to investigate the frequency of Neosporosis in cattle imported from different countries by serological method.

**Materials and Methods:** The research was carried out with (between March 2017 and February 2020) a total of 613 cattle from diffrent farms importing cattle in four districts of İzmir and one district of Aydin province. Blood serums were analyzed by SRS2 Indirect ELISA method and commercial ELISA method. Descriptive statistics ''chi-square'' and ''kappa'' tests were used in the analysis of the data.

**Results:** When the cattle included in the study were examined by SRS2 indirect ELISA method, causative seroprevalence was found in 52 samples (8.5%) in 613 samples, when examined by commercial ELISA method, seroprevalence was found as 4.1% in 25 samples. No statistically significant difference was determined in terms of breed, origin, animal status (cow, heifer) of imported cattle.

**Conclusion:** In this study, it was determined that the seroprevalence of *N. caninum* in cattle imported to İzmir region was similar to the studies carried out. In line with the results obtained, it would be appropriate to remove the definitively diagnosed animals from the herd for the control of the disease and to require the "NEOSPORA FREE" certificate from the originating enterprises at the entrance of imported breeding animals or to include the *N. caninum* agent in the test list requested from the imported animals.

**Keywords:** Imported cattle, Izmir, Aydın, *Neospora caninum*, ELISA

**1. GİRİŞ**

Neosporosis, *Neospora caninum* isimli protozoonun neden olduğu, başta köpek ve sığırlar olmak üzere birçok hayvan türünde klinik bulgulara yol açan bir hastalıktır (Dubey ve diğerleri, 2007). Yavru atma ile sonuçlanan olgulardan izole edilmesinden sonra sığırlarda önemli bir abort etkeni olarak literatüre geçmiştir. Abortlar, sığır işletmelerinde sürü sağlığı ve sürünün devamlılığı açısından, yetiştiriciler için ise ciddi ekonomik kayıplara neden olması bununla birlikte dünya çapında oluşan kayıpların ekonomik boyutunun oldukça yüksek olmasından dolayı önemlidir (Trees ve diğerleri, 1999).

Neospora kaynaklı doğal enfeksiyonlarda meydana gelen kayıplar düşük süt üretimi, zayıf buzağı doğumları, abort ile pedigriden gelen değerli genetik yapının yüksek oranda bozulması kaynaklıdır (Dubey ve diğerleri, 2007). Hastalığın kontrolü için en önemli yol, kesin tanı konulan hayvanların sürüden çıkartılmasıdır (Reichel ve diğerleri 2013). Ancak, enfekte sığırlarda abort haricinde klinik bulgu görülmemesi hastalığın direkt yöntemler kullanılarak tanısını zorlaştırmaktadır (Barber ve diğerleri, 1995). Genel olarak sığırlarda *N. caninum* enfeksiyonunun teşhisi için enfeksiyona yakalanan hayvanlardaki *N. caninum*'a özgü oluşanantikor düzeylerinin serolojik yöntemler kullanılarak tespit edildiği yöntemler tercih edilmektedir (Dubey ve Schares, 2006). Genellikle kontrol programlarında, Neosporosis’in tespitine yönelik serolojik testler kullanılmakta ve bu gibi kontrol programlarında doğrulanmış/kabul görmüş ticari ELISA kitleri ile çalışılması gerekliliğine dikkat çekilmektedir (Aguado-Martínez ve diğerleri, 2006).

Türkiye’de hastalığın yaygınlığı ile ilgili çalışmalar yapılmış, ancak konu ile ilgili damızlık sığır yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı İzmir ili ve yöresindeki çiftliklerde hastalığın yaygınlığı ve oluşturduğu ve/veya oluşturabileceği ekonomik kayıplar ile ilgili yeterli literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu çalışmada damızlık sığır yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı İzmir ili ve yöresindeki ithal sığır barındıran damızlık işletmelerinde neosporosisin yaygınlığının saptanması; hayvanların yaşı, ırkı ve menşei olduğu ülke ile seropozitiflik oranı arasında ilişki olup olmadığının gösterilmesi ve neosporosisin yerel (çiftlik) ve/veya ülke bazında kontrolü için alınabilecek önlemlere dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

**2. GENEL BİLGİLER**

Neosporosis dünya çapında köpek ve sığırların ciddi bir hastalığı olup, ilk defa 1984 yılında Bjerkas ve arkadaşları tarafından Norveç’te köpeklerde tespit edilen *Neospora caninum* (*N. caninum*), *Toxoplasma gondii*’ye olan yapısal benzerliğinden dolayı önceleri *T. gondii* olarak tanımlanmıştır (Dubey, 1999a; Dubey, 1999b). Ancak, Dubey ve diğerleri (2003) toxoplasmosis olarak teşhis edilen vakaların retrospektif bakısında bazı etkenlerin immunolojik yapısının *T. gondii*’den farklı olduğunu tespit etmişler ve 1988 yılında bu etkeni *N. caninum* olarak isimlendirmişlerdir (Dubey, 1999a; Dubey, 1999b; Dubey ve diğerleri, 2003).

Neosporosis*, N. caninum* tarafından farklı hayvan türlerinde klinik bulgulara yol açan, üç enfeksiyöz formu olan bulaşıcı, protozoal bir hastalıktır (Dubey ve diğerleri, 2007). Neosporosis çoğunlukla sığır ve köpeklerde nadiren de koyun, keçi, geyik ve atlarda klinik enfeksiyonlara sebep olabilmektedir (Dubey ve diğerleri, 2007). Meksika’da 1987 yılında *N. caninum* etkeninin bir abort salgını sırasında sütçü sığırlarda tespit edilmesinden sonra özellikle son 15 yılda tüm dünyada abort vakalarının birçoğunun nedeni olduğu anlaşılmıştır (Thilsted ve diğerleri, 1989). *N. caninum* dünya çapında köpeklerde ve sığırlarda abortların ve kongenital bozuklukların başlıca sebebi olduğu ve *Neospora* enfeksiyonlarının epidemik abortların yanında, endemik abortlarla da ilişkili olduğu düşünülmektedir (Dubey ve diğerleri, 2007). Sığırlarda transplasental enfeksiyon parazit için önemli bir bulaşma kaynağı olmakla beraber, asıl bulaşma son konak olan köpek dışkıları ile atılan ookistlerin oral yolla alınması ile şekillenmektedir (McAllister ve diğerleri,1998).

Neosporosis kaynaklı ekonomik kayıpları kantitatif olarak ölçmek oldukça zordur, bununla birlikte oluşan kayıpların oldukça önemli olduğu düşülmektedir. Örneğin; Avusturalya’da süt endüstirisi *Neospora* enfeksiyonuna yaklaşık yılda 85 milyon Avusturalya doları (AUD) kayba neden olduğu tespit edilmiştir (Trees ve diğerleri, 1999). Bunun yanında Türkiye’de süt sığırcılığı üzerine yapılan bir çalışmada düşük süt üretimi, buzağılama aralığının uzaması, tohumlama sayısının artması, veterinerlik ve tanı masrafları gibi harcama kalemleri dikkate alındığında Neosporosisin Türkiye için yıllık maliyeti yaklaşık 40.5 milyon Amerikan doları (USD) olduğu bildirilmektedir (Demir ve diğerleri, 2020). *Neospora* kaynaklı doğal enfeksiyonlarda meydana gelen kayıplar oluşan abort, düşük süt üretimi, zayıf buzağı doğumları, pedigriden gelen değerli genetik yapının yüksek oranda bozulması kaynaklıdır. Neosporosis’in etkilerinde kongenital enfekte buzağı klinik semptom göstermeyip sürü içerisinde enfeksiyon kaynağı olarak kalabilmekte ve etken bazı hayvanlarda tekrarlayan enfeksiyonlara da neden olabileceği belirtilmektedir (Dubey ve diğerleri, 2007). Bunun yanında, enfekte doğan düvelerin ilerleyen dönemlerde gebe kaldıklarında atık yapma ihtimalinin etken ile karşılaşmamış hayvanlara göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Dubey ve diğerleri, 2007). Hastalığın kontrolu için en önemli yol, kesin tanı konulan hayvanların sürüden çıkartılmasıdır. Neosporosis’in tanısında atık fetüs ve plasentanın histolojik incelemeleri ve enfekte hayvanların serumlarında *Neospora*’ya özgü antikorların indirekt fluoresan antikor testi (IFAT) ve/veya enzyme linked immunosorbent assay (Enzim işaretli immunosorbant testi: ELISA) gibi yöntemler kullanılarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Latham, 2003).

**2.1. *Neospora caninum*’un Taksonomisi**

*Neospora caninum*’un yaşam döngüsü ve inkübasyon süresi tam olarak bilinmemekle birlikte, bu organizma ile *Toxoplasma* ve *Sarcocystis* türleri arasındaki benzerlikten dolayı son konağın karnivor olduğu ve etkenlerin sindirim sisteminde gelişip, dışkıyla atıldığı ve sporlanmış ookistleri alan sığırların arakonak görevi yaptığı düşünülmektedir (Dubey ve diğerleri, 1988; Barber ve diğerleri, 1995). *Neospora caninum*’un taksonomik yeri **Tablo 1**’de verilmiştir. Buna göre *N. caninum* Eimeriorina dizi altında *Sarcocystis* ve *Toxoplasma* soyundaki protozoonlar ile aynı ailede yer almaktadır.

**Tablo 1.** *Neospora caninum*’un sınıflandırılması (Systema Naturae, 2010’dan uyarlanmıştır).

|  |  |
| --- | --- |
| Üst Alem | Eukaryota |
| Alem | Chromalveolata |
| Kök | Myzozoa |
| Kök Altı | Apicomplexa |
| Sınıf | Conoidasida |
| Sınıf Altı | Coccidiasina |
| Dizi | Eucoccidiorida |
| Dizi Altı | Eimeriorina |
| Aile | Sarcocystidae |
| Aile Altı | Toxoplasmatinae |
| Soy | Neospora |
| Tür | ***Neospora caninum*** |

**2.1.1. *Neospora caninum*’un Morfolojisi**

*Neospora caninum, Toxoplasma gondii* gibi geniş bir konakçı aralığına sahip bir parazittir. Yaşam döngüsü takizoitler, doku kistleri içerisindeki bradizoitler ve ookistler içerisinde bulunan sporozoitler olmak üzere üç enfeksiyöz basamak ile karakterizedir (**Resim 1**). Ara konakçılarda (ruminantlar ve bazen de atlar) bulunan takizoitler ve bradizoitler hücre içi olarak gelişirler (Dubey ve diğerleri, 2007). *Neospora caninum* ookistlerinin sporülasyonu son konağın dışında (doğada) gerçekleşir. *Neospora caninum* ookistleri morfolojik açıdan kedi dışkısındaki *T. gondii* ve *Hammondia hammondi* ookistleri ve köpek dışkısındaki *H. heydorni* ookistleri ile benzerlik göstermektedir (Dubey, 2003).

Etkenin takizoitlerinin boyutları 3-7 x 1-5 μm arasında, oval, yarım ay ya da küresel şekillidirler (Dubey, 2003). Takizoitler; konaklarının beyin, omurilik, kalp, iskelet kası, karaciğer, akciğer, dalak ve lenf düğümleri gibi organ ve dokuları ile makrofajlar, fibroblastlar, böbrek tubulus epitelyum hücreleri gibi çeşitli hücrelerini enfekte edebilen ve parazitin hızlı çoğalan formlarıdır (Barr ve diğerleri, 1990; Dubey ve diğerleri, 2007). Doku kistleri ise genellikle yuvarlak veya oval şekilli, büyüklüğü 107 μm’ye kadar ulaşabilen, retina dahil merkezi sinir sisteminde bulunabilen formlarıdır (Dubey, 1999). Kist içinde hilal şeklinde dizilmiş bradizoitler ise parazitin yavaş çoğalan formu olup, 7-8x2 μm büyüklüğündedir (Dubey, 2003). *Neospora caninum* ookistleri, son konak olan köpekler (*Canis familiaris)*, çakallar (*Canis latrans)* ve gri kurtlar (*Canis lupus)* tarafından dışkı ile atıldıktan sonra konak dışında 24 saat içinde sporüle olmaktadırlar. Oval şekilli ve 11.7x11.3 (10.6-12.4x10.6-12.0) μm büyüklüğünde olan her bir ookist içerisinde iki adet sporokist ve her sporokist içerisinde dört adet sporozoit ihtiva etmektedir (McAllister ve diğerleri, 1998; Dubey, 1999; Lindsay ve diğerleri, 1999; Dubey, 2003; Dubey ve Schares, 2011).



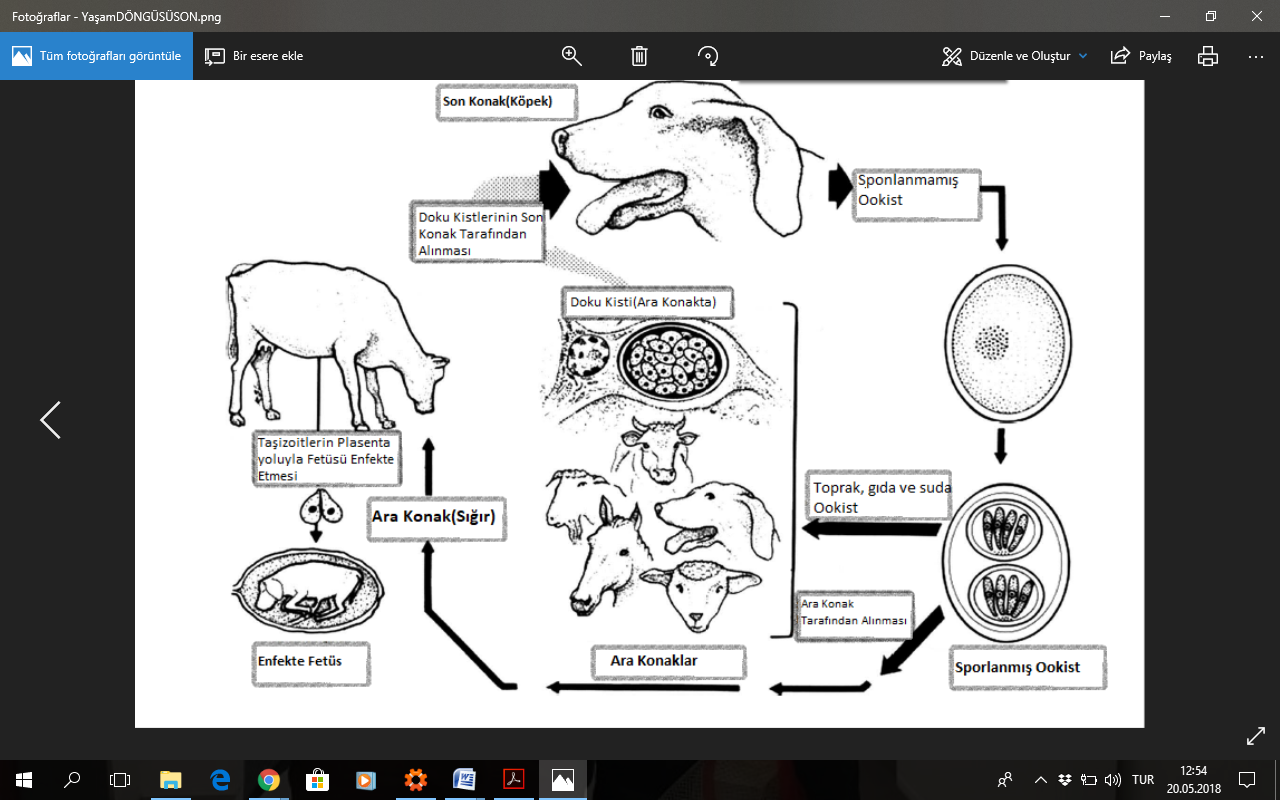
**Resim 1.** Konjenital olarak enfekte bir buzağının omurilik nöron hücresi içerisindeki doku kistinin hematoksilen ve eozin ile boyanmış histolojik kesiti. Doku kistinin kalın kist duvarı (karşılıklı ok uçları) bradizoitleri (içi boş üçgen) sarmakta **(B)**. Köpek dışkısında sporlanmamış ookist **(C)**. Sporokist içeren sporlanmış ookist **(D).** (Dubey ve diğerleri, 2007; Lindsay ve diğerleri, 1999).



**Resim 2.** *Neospora caninum*’un enfeksiyöz basamaklarının mikroskobik görünümleri. **(A)** Enfekte bir farenin karaciğer örneğinden Giemsa boyama ile yapılan yayma preparatında görülen takizoitlerin aşamaları (**a**) ince bir takizoit, (**b**) bölünme öncesi bir takizoit (**c**) bölünmüş takizoit (x400) (Raafat, 2016).

**2.1.2. *Neospora caninum*’un Yaşam Döngüsü**

*Neospora caninum*, apikompleksa anacında bulunan diğer protozoonlara benzerlik göstermektedir (Dubey, 1999). Parazitin bilinen son konağı evcil köpekler (*Canis familiaris)*, çakallar (*Canis latrans)* ve gri kurtlardır (*Canis lupus)* (Dubey, 2003; Gondiim ve diğerleri, 2004). Başta sığır, koyun, keçi, geyik, at olmak üzere manda, deve, çakal, tilki, kedi, fare, domuz, sıçan, gerbil, maymun ve köpeklerin ara konak olabildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Dubey, 1999). Parazitin naklinde *N. caninum*’un yaşam döngüsündeki üç enfeksiyöz basamağı oluşturan takizoit, bradizoit ve ookistler önemli rol oynamaktadır (**Resim 2**). Bulaşma horizontal ve vertikal olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir (**Şekil 2**). Horizontal bulaşma *N. caninum*’un takizoitlerini ya da bradizoitlerini içeren enfekte dokuların son konak tarafından yenilmesi ya da sporlanmış ookistlerin yiyecek ve içme suları ile ara konak tarafından oral yolla alınması sonucu gerçekleşmektedir (**Şekil 1**). Vertikal bulaşmada ise etkenler gebelik döneminde enfekte anneden transplasental yolla taşınmaktadır (Dubey, 2003.) Transplasental yolla bulaşma takizoitlerin anneden fetüse geçmesiyle meydana gelirken, horizontal bulaşma (post-natal aktarım) ookistlerin oral yolla alınması ile oluşmaktadır (Dubey ve diğerleri, 2007).



**Şekil 1.** *Neospora caninum*’un yaşam döngüsü (Dubey ve diğerleri, 2007’den modifiye edilmiştir).

*Neospora caninum*’un konakçı spektrumu oldukça geniştir. Köpekler neosporosis enfeksiyonunun bulaşmasında en önemli rolü oynamakta ve hastalığın köpeklerde tespit edilmesine yönelik çalışmaların arttırılması gerektiği düşünülmektedir (Dubey ve diğerleri, 2007). Deneysel olarak *N. caninum*’un doku kistleri ile enfekte edilen köpeklerin dışkılarında 11,7x11,3 μm (10,6-12,4x10,6-12,0 μm) büyüklüğünde sporlanmamış ookistlerin varlığı gösterilmiştir (Lindsay ve diğerleri, 1999). Son konakların dışkılarıyla atılan sporlanmamış ookistler dış ortamda yaklaşık 24 saat içerisinde sporlanarak ara konaklar için enfektif hale gelmektedir (Ufuk ve diğerleri, 2019). Ookistlerin enfekte köpeklerin dışkıları ile çıkarılma sıklığı ve doğada canlı kalma süresi tam olarak bilinmemektedir (Dubey, 1999; Dubey, 2003; Lindsay ve diğerleri, 1999). *Neospora caninum* ookistlerinin tabiatta hayatta kalması ile ilgili yapılmış çalışma bulunmamakta, ancak *T. gondii* ile belirgin benzerlikleri olduğundan bu sürenin *T. gondii* ookistlerinin yaşam süresi ile benzer olduğu varsayılmaktadır (Dubey, 2004). *Neospora caninum*‘un, birkaç gün içerisinde takizoitlerin aktif çoğalması ile hücre ölümlerine neden olduğu gösterilmiştir (Dubey ve Lindsay, 1993). Ayrıca *N. caninum’*un kranial-spinal sinirlerin ve hücrelerin iletkenliğini etkileyerek, bunun yanında nöronları parçalayarak nöromusküler bozukluklara neden olduğu bilinmektedir (Mayhew ve diğerleri, 1991; Dubey ve Lindsay, 1993).

*Neospora caninum*’a bağlı konjenital enfeksiyonlarda abort, ölü doğum, klinik ve/veya subklinik enfekte buzağı doğumları gebelik süresine göre farklı dönemlerde görülmektedir (Innes ve diğerleri, 2007). Gebeliğin ilk üç aylık ve ikinci üç aylık dönemlerinde fötusun immün sisteminin gelişmemiş ya da yetersiz gelişmesine bağlı olarak; fötusun erken embriyonik ölümü gebeliğin ilk üç aylık döneminde, abort ve ölü doğumlar ise sıklıkla ikinci üç aylık dönemde gözlenmektedir (Dubey and Schares, 2006). Üçüncü üç aylık dönemde ise fötusun immün sistemi artık gelişmiş olduğundan enfeksiyöz ajanlar ile baş edebilmekte ve subklinik olarak enfekte canlı doğumlar meydana gelmektedir (Barr ve diğerleri, 1990; Atkinson ve diğerleri, 2000; Dubey ve Schares, 2006; Dubey ve diğerleri, 2007; Innes ve diğerleri, 2007; Kul, 2012).

**2.2. Sığırlarda Neosporosis**

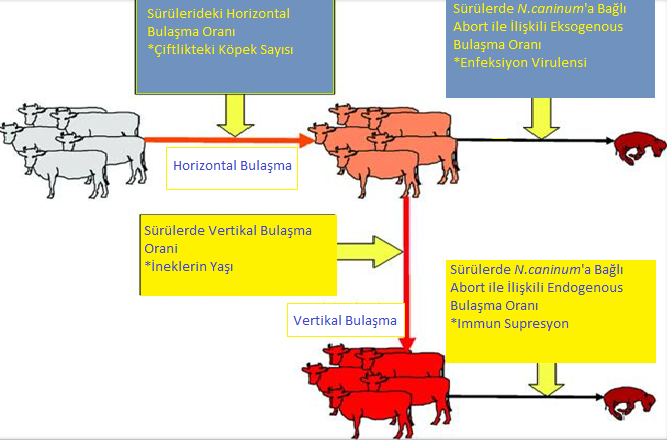
Sığırlarda gebeliğin 42. gününden doğuma kadar olan sürede uterusta yavrunun ölmesi ve ölen yavrunun uterustan dışarı atılması ‘abort’ olarak tanımlanmaktadır. Sürülerde %2 oranındaki abortlar normal olarak kabul edilebilmekle birlikte daha yüksek oranlardaki abort vakaları ciddi ekonomik kayıp olarak değerlendirilmektedir (Bagley, 1999). Abort nedenleri enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan nedenler olarak sınıflandırılmaktadır. Enfeksiyöz olmayan nedenler genetik faktörler, hormonal bozukluklar, yetiştiriciye bağlı faktörler (bakım-besleme gibi), çevresel faktörler (ısı stresi gibi), iatrojenik faktörler ve toksinler olarak sınıflandırılırken, enfeksiyöz etkenler ise bakteriler, mantarlar, protozoonlar ve viruslar olarak sınıflandırılabilmektedir (Givens ve Marley, 2008). Enfeksiyöz etkenler uterusa kan / plasenta yoluyla, tohumlama / çiftleşme esnasında enfekte semen veya enfekte boğalardan geçebilir. Enfeksiyöz hastalıklardan biri olan neosporosis son yıllarda birçok ülkede sütçü sığırların en önemli abort nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir (Dubey, 1999a; Dubey, 1999b; Dubey, 2003; Reichel, 2000; Toolan, 2003).

Thilsted ve Dubey (1989), New Mexico’da sürekli abortların yaşandığı bir sürüdeki sığır fetüsünden alınan beyin dokusunda *N. caninum* benzeri organizma olduğunu rapor etmişlerdir. Başlangıçta, birkaç küçük *T. gondii* benzeri doku kisti tespit edilmesi ve herhangi bir başka abort etkenine rastlanmamasında dolayı geçici tanı konulabilmiştir. İncelemelerde abort yapan sığırlarda *T. gondii* antikoruna rastlanmamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda, abort yapan sığırlarda *N. caninum* spesifik antikorların varlığının belirlenmesi ile abortların etiyolojik olarak neosporosis kaynaklı olduğu ortaya konulmuş (Lindsay and Dubey, 1989c), kist içerisindeki parazitin konağın immun sistemine göre *N. caninum* antikoru ile tekrardan aktive olduğu görülmüştür (Barr ve diğerleri, 1990). Kaliforniya’da sığırlarda aborta neden olan *T. gondii* benzeri bir protozoa olduğu gözlemlenmiş ve anti-*N. caninum* serumu kullanılarak Kaliforniya’daki sütçü işletmelerindeki sığır abortunun ana sebebinin *N. caninum* olduğu tespit edilmiştir (Lindsay ve Dubey, 1989c).

**2.2.1. Sığırlarda Bulaşma**

*Neospora caninum* enfeksiyonu postnatal ve transplasental yollarla bulaşabilir. Postnatal bulaşma, takizoitli dokuların veya kistli dokuların oral yolla alınması ve sporlanmış ookistlerle kontamine yiyecek ve suların yine sindirim için alınmasıyla oluşur. Transplasental (vertikal bulaşma, kongenital bulaşma) bulaşma ise etkenlerin gebelik sırasında enfekte anneden plasenta yoluyla fetüse geçmesidir (Dubey ve diğerleri, 2007).

Son zamanlarda eksojen transplasental bulaşma ve endojen transplasental bulaşma terimleri ile fetüsün enfeksiyon orijinini belirlemede etkin olduğu ileri sürülmüştür (Trees ve diğerleri, 2005). Eksojen transplasental bulaşma, annede gebelikten önce enfeksiyon varlığının olmaması, gebelik esnasında ilk defa enfeksiyonu geçirmesi ve plasental yolla fetüse taşıması iken, endojen transplasental bulaşma ise anne gebelikten önce enfeksiyonu geçirmiş ve gebelik sırasında enfeksiyonun tekrar aktive olması nedeniyle fetüse transplasental yolla enfeksiyonun nakli şeklinde tanımlanabilir. Deneysel olarak oral yolla taşizoit ve bradizoit verilen farelerden elde edilen taşizoitler pepsin asidi ile enfektivitelerini kaybederken, bradizoitler pepsine karşı dirençli davranıp, canlılığını sürdürmüşlerdir (Lindsay ve diğerleri, 1999). Başka bir çalışmada doku kistleri ile bradizoitlerin +4ºC’de iki haftadan fazla canlılığını sürdürebildikleri, ancak dondurulma neticesinde kolaylıkla öldükleri belirtilmiştir (Lindsay ve diğerleri, 1992; Dubey ve diğerleri, 2004).



**Şekil 2.** *Neospora caninum*’un bulaşma yolları (Dubey ve diğerleri, 2007’den modifiye edilmiştir).

*Neospora caninum*, sığırlardaki bilinen bütün parazitlerin arasında transplasental yolla bulaştığı iyi bilinen etkenlerden bir tanesidir. Hastalığın olduğu bazı sürülerde buzağılar enfektif doğarlar, ancak aseptomatiktirler. Björkman ve diğerleri (1996), İşveç’teki sütçü bir sürüde *N. caninum* seropozitif tüm hayvanların 16 yıl önce sürü kurulurken alınan iki adet ineğin soyundan geldiğini belirlemişlerdir. Tohumlama kayıtları doğal aşımın bir faktör olmadığı fikrini vermiştir. Benzer sonuçlar Almanya (Schares ve diğerleri, 1998), Kanada (Bergeron ve diğerleri, 2000), Avustralya (Hall ve diğerleri, 2005) ve İsveç’teki (Frössling ve diğerleri, 2005) çalışmalarda da elde edilmiştir. *Neospora caninum*’un transplasental bulaşmasına güçlü bir kanıt ineklerin ve onların yavrularının seroprevalansının karşılaştırılmasıdır. Sığır ve diğer ruminantlar, plasenta enfeksiyonuna maruz kalsa bile, anneden fetüse herhangi bir antikor transferi olmamaktadır. Bu nedenle pre-kolostral serumda spesifik antikorun varlığı uterusta fetüs tarafından antikor sentezinin olduğunu göstermektedir (Dubey ve diğerleri, 1987). Buna rağmen, fetüste antikor varlığının olmaması enfeksiyon yokluğunun bir göstergesi değildir, çünkü fetüs gebeliğin son döneminde enfekte olmuş olabilir ya da antikor sentezi için yeterli zaman kalmamış olabilir. Nadir de olsa seronegatif bir anneden seropozitif bir buzağı doğabilmektedir. Anne daha önce enfeksiyona yakalanmış ve hastalığı geçirmiş ve daha sonraki dönemlerde antikor seviyesi oldukça düşmüş ve gebelik periyodu süresince immun sistemi baskılandığı için hastalık reaktive olup plasenta yoluyla yavruya geçmiş olabilir (Conrad ve diğerleri, 1993; Sager ve diğerleri, 2001; Lopez-Gatius ve diğerleri, 2004; Frössling ve diğerleri, 2005).

Endojen plasental bulaşma üzerine yapılan bir çalışmada (Anderson ve diğerleri, 1997); kronik persiste enfeksiyonlu hayvanların sürüde izlenerek endojen bulaşma yoluyla soyların araştırılması hedeflenmiş, 25 seronegatif ve 25 seropozitif düve beraber barındırılmış ve bunların yavruları *N. caninum* enfeksiyonu yönünden incelenmiştir. Seronegatif düveler seronegatif olarak kalırlarken bunların yavruları da *N. caninum* ile enfekte olmamış, seropozitif düvelerin yavruları ise klinik olarak normal ancak kongenital enfekte halde dünyaya gelmişlerdir. Bu kongenital enfekte yavrulardan yedi tanesine nekropsi yapılmış ve bütün örneklerde histolojik olarak *N. caninum* varlığı tespit edilmiştir (Anderson ve diğerleri, 1997). Çalışmaya göre muhtemelen ineklerin yaşamları boyunca enfekte kaldıkları ve ardışık (Fioretti ve diğerleri, 2003) veya aralıklı olarak (Boulton ve diğerleri, 1995; Guy ve diğerleri, 2001; Wouda ve diğerleri, 1998) yavrularına paraziti nakledebildikleri düşünülmüştür. Sütçü sürülerdeki *N. caninum* enfeksiyonlarının matematik metotları, horizontal bulaşmanın düşük düzeylerinin bile sürü içerisinde enfeksiyonun korunmasında çok önemli olduğunu göstermiştir. Çünkü endojen transplasental enfeksiyon ile oluşan bulaşma %100’ün altıdadır ve bu yüzden endojen transplasental bulaşmka kaynaklı enfektif sürülerde enfeksiyon prevalansında sürekli bir düşüşe neden olmaktadır (French ve diğerleri, 1999).

Post-natal (horizontal) bulaşmada ise sığırlar doğumlarıından sonra çevrelerinde bulunan sporlanmış *N. caninum* ookistlerini oral yolla alarak enfeksiyona yakalanırlar (Marez ve diğerleri, 1999; Gondiim ve diğerleri, 2004; Trees ve diğerleri, 2002). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sığırdan sığıra bulaşma gözlenmemiştir.

**2.2.2. Sığırlarda Abort ve Prevalansı**

Neosporosise bağlı abortlar yılın her mevsimi şekillenebilir (Anderson ve diğerleri, 1991; Thurmond ve diğerleri, 1995b; Moen and Wouda, 1995). Kaliforniya’da birçok vakanın yaz aylarında ve sonbahar döneminden ziyade kışın görüldüğü (Anderson ve diğerleri, 1991; Thurmond ve diğerleri, 1995b); Hollanda’da *N. caninum* etkenine bağlı abortların yıllık dağılım oranı yaz döneminin sonları ile erken sonbahar mevsiminde arttığı görülmüştür (Moen ve Wouda, 1995). Thurmond ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada altı yıllık bir süre içerisinde, Kasım ve Şubat ayları arasında neosporosis kaynaklı abort riskinin arttığını gözlemlemişlerdir (Thurmond ve diğerleri, 1995).

Sütçü ve etçi sığırların her ikisinin birden etkileniyor olmasına karşın sütçü sığırlarda enfeksiyonun varlığı ile ilgili daha fazla bildirim mevcuttur. Kaliforniya’dan gelen abort bildirimlerinin birçoğu kapalı tip süt işletmelerinden (Barr ve diğerleri, 1991a; Anderson ve diğerleri, 1991; Anderson ve diğerleri, 1995) iken, Hollanda’dan gelen abort bildirimleri ise daha çok açık tip (ekstansif yetiştirme) süt işletmelerindendir (Wouda ve diğerleri, 1995). Avusturalya’da yapılan bir çalışmada 126 sürüden 729 abort vakalı sığır araştırılmış ve hastalıktan etkilenen sürülerin %59’unu sütçü sığırlar oluştururken, etçi sığırlarda bu oran %41 olarak bulunmuştur (Boulton ve diğerleri, 1995). Neosporosisin neden olduğu abortlarda sığırlarda bildirilen yaş sekiz yaşın üzerindedir. Yine de bu etkende yaş ile ilişkili bir duyarlılık olup olmadığı bilinmemektedir. Yeni Zelanda’da 1993 yılının sonbaharında abort oranı %33 olan bir sürüde, abort yapan sığırların çoğunun dört yaşın üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Thornton ve diğerleri, 1994).

Fetal ölümlerde, ilk üç aylık periyotta herhangi bir abort vakası bildirilmemesine rağmen genellikle fetal ölümler gebeliğin tüm dönemlerinde gerçekleşebilmektedir. Bir ila iki aylık fetüs uterusta ölebilir, rezorbe olabilir ve inek tekrardan kızgınlık gösterebilir. Kaliforniya’da yürütülen bir çalışmada *N. caninum*’un, gebeliğin 5,5 aylık döneminde aborta neden olduğu görülmüştür (Anderson ve diğerleri, 1991). *Neospora caninum*’a bağlı 113 doğrulanmış abort olan bir çalışmada; üç fetüs üçer aylıkken, 27 fetüs dört aylıkken, 33 fetüs beş aylıkken, 22 fetüs altı aylıkken, 16 fetüs yedi aylıkken, sekiz fetüs sekiz aylıkken ve dört yavrunun da dokuz aylıkken aborte olduğu bildirilmiştir (Anderson ve diğerleri, 1995). Hollanda’da yapılan bir araştırmada tohumlama ve abort arasındaki sürenin 110 ile 259 gün olduğu görülmüştür ve daha çok 170. günlerde yığılmaların olduğu gözlemlenmiştir (Moen ve Wouda, 1995).

İneklerde neosporosise bağlı abortlar genellikle sporadik veya gruplar halinde şekillenebilir. Abortların salgın şeklinde yayıldığına dair birçok yayın vardır (Thornton ve diğerleri, 1994; Yaeger ve diğerleri, 1994; Anderson ve diğerleri, 1994; Moen ve diğerleri, 1995a; McAllister ve diğerleri, 1996a). Bir salgında birkaç ay içinde gebe ineklerin %33’ünde abort şekillenmiştir (Thornton ve diğerleri, 1994). Görülen birçok salgında tanı sadece birkaç fetüsten alınan numuneler ile histolojik çalışma yapılarak konulmaya çalışılmıştır. Bu yüzden meydana gelen tüm salgınların neosporosis nedenli olup olmadığı belirsizdir. Nadir de olsa bazı sürülerdeki tüm abort yapan fetüsler abort nedenlerinin ortaya konması için araştırılmıştır. Kaliforniya’da kapalı sistem yetiştirilen toplam 19708 ineği içeren 26 sürüde yapılan bir çalışmada, bir yıldan fazla süre zarfında meydana gelen 266 abort vakasının 113 (%42,5)’ünde *N. caninum* etkeni tespit edilmiştir. Sürülerde %42,5’lik oran ile doğrulanan neosporosise ek olarak diğer nedenler hariç tutulduğunda %6,4 oranında neosporosis şüpheli vakalar tespit edilmiştir. İneklerin %18’inde altı haftalık bir dönemde abort şekillenmiş olup, 17 fetüsün tamamında *N. caninum* etkeni identifiye edilmiştir Bakteriyel ve mikotik kaynaklı abortların oranı %14 ve teşhis edilemeyen abortların oranı ise %37,2 olarak bulunmuştur (Anderson ve diğerleri,1995). Hollanda’da ekstansif işletme yapan dört adet sütçü Holstein sürüde büyük salgınların yaşandığı rapor edilmiştir (Moen ve diğerleri, 1995a). Bu sürülerdeki 227 inek ve 99 doğum yapmamış sığır, abort riski altındadır. Abort salgınlarının yaklaşık üç hafta sürdüğü gözlenmiş ve bunu mumifiye olmuş fetüslerin birkaç ay boyunca atılmasının izlediği bildirilmiştir. Abort oranı ineklerde (227 inekte; %33) doğum yapmamış sığırlara göre (99 sığırda; %14) çok daha yüksektir. Tanı için laboratuvara gönderilen 51 fetüstan 50’sinde neosporosis lezyonları gözlenmiş ve 40 örnekte immunohistopatolojik olarak *N. caninum* tespit edilmiştir (Moen ve diğerleri, 1995a).

Neosporosis dünyada birçok ülkeden rapor edilmiştir. Atık yapan sığırlarda *N. caninum* yaygınlığının c-ELISA ile araştırıldığı çalışmalarda: Bulgaristan’da %10 (Dubey ve diğerleri, 2007); Çekya’da %0,5 - 3,9 (Bártová ve diğerleri, 2015; Dubey ve diğerleri, 2007); Polonya’da %15,6 (Dubey ve diğerleri, 2007); Slovakya’da %22,2 (Dubey ve diğerleri, 2007); Sırbistan’da %7,2 - 15,4 (Klun ve diğerleri, 2019, Kuruca ve diğerleri, 2013) ; Romanya’da %27,7 (Imre ve diğerleri, 2012); Sudan’da %10,7 (İbrahim ve diğerleri, 2012); Brezilya’da %42,1; Meksika’da %42 - 59; ABD’de %79; Portekiz’de %49; İspanya’da %35,4; İsveç’te %63; Birleşik Krallık’da %60; Yeni Zellanda’da %50- 53 (Dubey ve diğerleri, 2007) ve Pakistan’da %43 (Nazir ve diğerleri, 2013) oranları bulunmuştur ( Erol ve diğerleri, 2019).

**2.3. Klinik Bulgular**

*Neospora caninum*’unhem sütçü hem de etçi ineklerde meydana getirdiği tek klinik belirti aborttur (Dubey, 1999a; Reichel, 2000). Enfeksiyonlarla ilişkili sığır abortları ve neonatal ölümler birçok ülkeden bildirilmiş olup; ABD, Yeni Zelanda, Hollanda ve Almanya’da sütçü sığırlardaki abortların %12-42’sinden *N. caninum*’un sorumlu olduğu gösterilmiştir (Dubey, 2003; Reichel, 2000). *Neospora caninum*’a bağlı abortlar sığırlarda gebeliğin üçüncü ayından itibaren bildirilmesine rağmen, daha çok gebeliğin beşinci ve altıncı aylarında görülmektedir. *Neospora caninum*’la enfekte fetuslar uterusta ölebilir, mumifikasyona uğrayabilir, otoliz olabilir ya da ölü veya erken doğabilirler (Anderson ve diğerleri, 2000; Dubey, 2003; Dubey ve Schares, 2006; Dumanlı ve Aktaş, 2010; Özcel ve diğerleri, 2013). Erken doğan yavrular klinik belirti gösterebilir ya da hiçbir belirti göstermeksizin kronik taşıyıcı olabilirler (Reichel, 2000; Davison ve diğerleri, 1999).

Erken doğan buzağılarda zayıflık, büyümede yavaşlama, ön veya arka bacaklarda ya da her ikisinde bükülme veya gerilmeler, normalin altında doğum ağırlığı, ekzoftalmi veya gözlerde asimetri gibi klinik bulgular yanında hidrosefalus ve medulla spinaliste daralma gibi doğum anomalileri de görülebilmekte; nörolojik muayenelerde ataksi, bilinç kaybı, patellar reflekste azalma, yürürken ve dururken dengeyi sağlayamama saptanabilmektedir (Dubey, 2003; Dubey ve diğerleri, 2006; Moore, 2005; Dumanlı ve Aktaş, 2010; Özcel ve diğerleri, 2013). Abort olan fetüslerdeki lezyonlar sadece histolojik muayenede görülebilirken, *N. caninum* vakaların %85’inden fazlasında merkezi sinir sisteminde lokalize olmakta, bunun yanında kalp, iskelet kası, karaciğer ve böbrekler ise daha az oranlarda etkilenmektedir (Reichel, 2000; Toolan, 2003). Abort görülme riski *N. caninum* antikoru taşıyan sığırlarda, seronegatif sığırlardan daha fazladır (Dubey, 2003). Ancak seropozitif sığırların doğurduğu konjenital olarak enfekte buzağıların yaklaşık %95’inin klinik olarak normal olduğu görülmüştür. Annenin yaşı, laktasyon süresi ve abort görülmesi gibi değişkenlerin konjenital enfeksiyon oranını genelde etkilemediği bildirilmiştir (Dubey, 1999a; Dubey, 2003; Quintanilla ve diğerleri, 1999).

**2.4. Epidemiyoloji**

Sığırlardaki *N. caninum* seroprevalansı ülke, bölge ve kullanılan serolojik test tipine göre değişiklikler göstermektedir. Brezilya, İrlanda, İspanya, Almanya, Polonya ve ABD gibi dünyanın birçok ülkesinde *N. caninum* enfeksiyonları görülmektedir (Gondiim ve diğerleri, 1999; McNamee ve diğerleri, 1996; Quintanilla ve diğerleri, 1999; Wladyslaw ve diğerleri, 2000). Neosporosis teşhisinde erişkin sığırlarda nadiren klinik olarak belirti görüldüğünden genellikle serolojik testler kullanılmaktadır (Öncel ve Bıyıkoğlu, 2003). Serolojik çalışmalar dünya üzerinde birçok ülkede süt ve et için yetiştirilen sığırlarda neosporosisin yaygın olduğunu göstermiştir (Fioretti, 2003; Trees ve diğerleri, 1999).

Dünya’da sığırlarda *N. caninum*’un yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılan serolojik çalışmalarda etkenin Kuzey Amerika’da %5,2 - 79, Güney Amerika’da %3,9 - 97,2, Avrupa’da %0,7 - 65, Asya’da %5,5 - 70, Afrika’da %8,96 - 20,4 ve Avustralya’da %7,6 - 53 (Asmare ve diğerleri, 2013; Bártová, 2015; Dubey ve diğerleri., 2011; Dubey ve diğerleri, 2007, İbrahim ve diğerleri, 2012; Kamga-Waladjo ve diğerleri, 2010; Klun ve diğerleri, 2019; Kuruca ve diğerleri, 2013; Dumanlı ve diğerleri, 2013; Njiro ve diğerleri, 2011) oranlarında altı kıtada da görüldüğü bildirilmiştir (Erol ve diğerleri, 2019). Meksika'nın Orta ve Doğu bölgelerinde *N. caninum* sığır serum antikorlarının prevalansı ortalama %24 olarak bulunmuştur (Zárate-Martínez ve diğerleri, 2021).

Türkiye’de sığırlarda *N. caninum*’un yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılan serolojik çalışmalarda ticari ELISA testi kullanılmıştır ve sonuçlar *N. caninum*’un yaygınlığının, Sakarya’da %9,2 (Öncel ve diğerleri,2003); Kırıkkale’de, İzmir’de ve Tokat’ta %10,77 (Yildiz ve diğerleri, 2009); Ankara’da %10,15, Çankırı’da %6,93, Nevşehir’de %5,10, Eskişehir’de %5,43, Yozgat’ta %20,32 (Vural ve diğerleri,2006); Kayseri’de %7 - 10,82 (İça ve diğerleri, 2006; Vural ve diğerleri, 2006); Kırşehir’de %18,1 - 19,55 (Vural ve diğerleri, 2006; Yıldız ve diğerleri, 2017); Kırıkkale’de %32,72 - 66,66 (Vural ve diğerleri, 2006; Öcal ve diğerleri, 2014); Burdur’da %21,97, Aksaray’da %34,9 (Vural ve diğerleri, 2006; Öcal ve diğerleri, 2014); Kars’ta %2 - 7,2 (Akca ve diğerleri, 2005; Mor ve diğerleri, 2012); Van’da %4,88 (Alan ve diğerleri, 2011); Şanlıurfa’da %7,5 (Pişkin ve diğerleri, 2009); Adana’da %10,7 (Eşki ve diğerleri, 2018); Elazığ’da %8,19-15 (Aktaş ve diğerleri, 2005; Simsek ve diğerleri, 2008); Malatya’da %4, Muş’ta %4,86 ve Bingöl’de %4,69 (Aktaş ve diğerleri, 2005; Erol ve diğerleri, 2019); Burdur %7,7 - 6,6 - 4,2 (Köse ve diğerleri, 2021) olduğunu göstermiştir. Seroprevelans çalışmalarının yanı sıra literatürde Türkiye’den köpek ve buzağıdan bildirilen klinik neosporosis vakaları da bulunmaktadır (Batmaz ve diğerleri, 2004; Kul ve diğerleri, 2009).

Türkiye son zamanlarda canlı hayvan ithalatına önem vererek dünyanın birçok ülkesinden sütçü ve etçi hayvan ithal etmektedir. Ülkeye giren hayvan sayısının artması hastalıkların görülme olasılığını da doğru orantılı arttıracağını düşündürmektedir. Türkiye’ye 2018 yılında damızlık hayvan ithalatının en fazla yapıldığı ülkeler Almanya, Avusturya, Çekya, Litvanya, Slovakya, Urugary ve Macaristan olurken, etçi hayvan ithalatı için Romanya, Brazilya, Macaristan, Urugary, Avusturalya, Çekya, Slovakya ve İtalya gibi ülkeler öön plana çıkmaktadır (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, İzmir İl Müdürlüğü 2021 yılı verileri).

*Neospora caninum*’un sütçü sığırlara ait dünya çapındaki ve Türkiye’deki serolojik prevalans sırası ile **Ek-1**’de verilmiştir.

**2.5. *Neospora caninum*’un Patogenezi**

*Neospora caninum*’un takizoitleri ve bradizoitleri genellikle iskelet kasları ve beyinde yerleşmektedir ve *N. caninum* enfeksiyonlarının patogenezisindeki fötal ve neonatal dönemler benzerlik göstermektedir (Dubey ve diğerleri, 1996). Neosporosis enfeksiyonu geçiren köpeklerde makroskobik lezyonlar fazla görülmezken, arka ayaklarda paraliz, ataksi ve ülseratif dermatitis gibi klinik bulgular göze çarpmakta ve bu bulguların görülmesi akla bu enfeksiyonu getirmektedir. *Neospora caninum* ile enfekte köpeklerin postmortem muayenesinde makroskobik olarak karaciğerin büyüdüğü ve soluk sarı renkte olduğu görülürken mikroskobik muayenede hepatositlerde nekroz odakları ve %25’inden fazlasının nekroza uğradığı belirlenmiştir (Dubey ve diğerleri, 1996). Karaciğer lezyonlarının yanında akciğer, miyokard, beyin, beyincik ve medulla spinaliste kan damarlarının etrafında tek tek veya yığınlar halinde takizoitlerin görülmesi hastalık için patognomonik histopatolojik bulgu olarak tanımlanmıştır. Bradizoitler periyodik asit shift (PAS) ile boyanırken takizoitlerin boyanmaması parazitin bradizoit formu ile takizoit formunu ayırmak için kullanılabilmektedir (Dubey ve diğerleri, 1996). Koyun ve sığırlarda neosporosisle ilgili patolojik bulgular köpeklerdeki lezyonlara benzerlik göstermekte ve genelde atık fötus ve zayıf doğmuş buzağılarda görülmektedir. Aborte fetüslerde lezyonlara genellikle beyin ve medulla spinalis ile kalpte, nadiren de akciğer ve böbreklerde rastlanabilmektedir. Histopatolojik olarak myokarditis ve multifokal nekrotik nonpurulent ensefalitis bulguları rapor edilmiş ve bu bulgular sığır neosporosisi için karakteristik olarak kabul edilmiştir (Gonzales ve diğerleri, 1999).

Gebelik sırasında meydana gelen hormonal değişiklikler, beslenme, stres, mikotoksin veya tekrarlayan hastalıklarla immunitenin zayıflaması sonucu, daha önce enfekte olmuş bir ineğin beyninde bulunan kistler aktifleşebilmekte ve bunun sonucunda kist içindeki bradizoitler hızlı bir şekilde bölünerek kan dolaşımına ve transplasental olarak fötusa geçerek aborta ya da konjenital enfekte buzağı doğumuna yol açmaktadır (Toolan, 2003; Anderson ve diğerleri, 2000).

Hücre içi bir parazit olan *N. caninum* enfeksiyonları gamma-interferon üretimi ile sonuçlanan yardımcı T-hücre yanıtı ile kontrol altında tutulabilmekteyken, gebelik ilerlerken meydana gelen hormonal değişiklikler Tip 2 yardımcı T-hücre yanıtını doğurmakta ve bunun sounucunda *N. caninum* enfeksiyonları kontrol altında tutulamamaktadır. Bu nedenle Quinn ve diğerleri (2002) abortun immun tepkilerden kaynaklanabileceğini iddia etmişlerdir. Bazı seropozitif sığırların hiç abort yapmaması, gebe olmadan önce *N. caninum* ile tabii olarak enfekte olmaları ve abort ile fötusun konjenital enfeksiyonuna karşı humoral bir bağışıklık geliştirmeleri ile açıklanmaktadır (Innes ve diğerleri, 2001).

**2.6. Neosporosis’in Teşhisi**

Neosporosis’de sadece klinik belirtilere bakarak tanıya gitmek, klinik bulguların değişkenlik göstermesi nedeniyle birçok hastalıkla karışabildiğinden hemen hemen olanaksızdır (Barber ve diğerleri, 1995). *Neospora caninum* enfeksiyonunun tanısında ışık mikroskobu, patolojik-immunopatolojik inceleme, elektron mikroskobu, serolojik ve moleküler testler kullanılabilmektedir (Barber ve diğerleri, 1995; Lally ve diğerleri, 1996).

Serolojik testlerde serumda *N. caninum* spesifik antikorların varlığının tespiti sadece parazite maruz kalındığını göstermekte ve aktif bir neosporosis enfeksiyonunun oluştuğu anlamına gelmemekle birlikte, yeni doğan yavrunun prekolostral serumundan ve aborte fetüsten alınan peritoneal, perikardiyal ve serebrospinal sıvılardan elde edilen serolojik sonuçlar, transplasental neosporosis enfeksiyonuna işaret etmektedir (Williams ve diğerleri, 1997; Osawa ve diğerleri, 1998; Dubey ve diğerleri, 2003; Dubey ve Schares, 2006). ELISA ve IFAT testleri neosporosisin teşhisinde kullanılabilecek serolojik testlerdir. ELISA testi tutarlı, objektif ve hızlı sonuç veren bir testtir (Crowther, 1998). IFAT ile karşılaştırıldığında çoğu zaman yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterir. ELISA test kitleri sığırlarda *Neospora*’ya özgü antikorları belirlemek için ticari olarak kullanılmaktadır **(**Williams ve diğerleri, 1997). Kronik olarak enfekte olan hayvanlarda serolojik tetkikler yeterli olmayacağından teşhiste aborte olmuş fetüsun incelemesi de kesin tanı için gerekmektedir. Neosporosisin patognomik gözle görülebilen lezyonları bulunmamakla birlikte aborte fetüste en karakteristik bulgu fokal ensefalomiyelittir (Dubey ve diğerleri, 1999; Dumanlı ve Aktaş, 2010; Kul, 2012).

**2.6.1. Histopatolojik Teşhis**

Fetüs ve ölü doğan buzağılarda**,** neosporosis enfeksiyonunda daha sık etkilenme olması nedeni ile fetal merkezi sinir sistemi (MSS), kalp ve karaciğer dokularında dejeneratif inflamatuar lezyonlar gözlenebilir (Anderson ve diğerleri, 1991; Barr ve diğerleri, 1990, 1991a; Boger and Hattel, 2003; Dubey ve diğerleri, 1998a, 1990b; Dubey ve diğerleri, 2006; Hattel ve diğerleri, 1998; Helman ve diğerleri, 1998; Nietfeld ve diğerleri, 1992; Wouda ve diğerleri, 1997b). Collantes ve diğerleri (2005) epidemik ve endemik abortlarda, gebeliğin farklı zamanlarındaki lezyon ve parazit yükünü araştırdıkları çalışmanın sonucunda; fetüsün kalp, beyin, karaciğer, akciğer, böbrek dokularında epidemik abortlarda, endemik abortlara göre daha yüksek oranda parazit ve lezyon yükü olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca gebeliğin ilk ve ikinci trimesterindeki fetüste lezyon ve parazit yükünün son trimestere göre daha yüksek olduğunu da bildirmişlerdir (Collantes ve diğerleri 2005). Plasental lezyonlar tipik olarak kotiledonlarda sınırlı fokal nekroz ve süpüratif olmayan inflamasyon alanlarıdır (Barr ve diğerleri, 1990, 1991a; Bergeron ve diğerleri, 2001; Otter ve diğerleri, 1995; Shivaprasad ve diğerleri, 1989).

Yenidoğan buzağıların,konjenital enfeksiyon sonrasında çok az bir kısmı klinik bulgu gösterdiğinden, histolojik olarak neosporosis tanısı koymak oldukça zordur. Bir çalışmada nörolojik klinik bulgularla doğan, serolojik olarak prekolostral *N. caninum* spesifik antikoru taşıyan altı buzağıdan sadece birinde histolojik bulgular gözlemlenebilmiştir (De Meerschman ve diğerleri, 2005).

**2.6.2. Kimyasal ve Histokimyasal Boyama Yöntemleri ile** ***N. caninum*’un Tespiti**

Boyama yöntemleri arasında yer alan hematoksilen eozin boyama yöntemi ile *N. caninum*’unteşhisi yapılabilmekte olsa da çok sayıda *N. caninum* etkeni bulunan iyi korunmuş bir fetüsten alınan örnekte bile hematoksilen eozin boyama ile takizoitlerin gösterilmesi oldukça güçtür. Konakta parazite karşı gelişen immun yanıt parazitin diğer gelişim formlarının yanı sıra takizoitleri de etkileyerek bunların görülmesini zorlaştırmaktadır (Dubey and Lindsay, 1996; Dubey ve diğerleri, 2006).

Aborte sığır fetal beyin dokusunda saptanan apikompleksan grupta yer alan parazitler, *N. caninum*, *T. gondii* ve *Sarcocystis cruzi*’dir. *Sarcocystis cruzi* şizontları endotel hücrelerde bulunmakta ve çok çekirdekli merozit içermeyen olgunlaşmamış evreye sahipken, *T. gondii* ve *N. caninum*’un olgunlaşmamış evresi yoktur. *T. gondii* morfolojik olarak *N. caninum*’a oldukça benzemektedir. *Toxoplasma gondii* DNA’sı aborte sığır fetüsünden izole edilebilmesine rağmen, bugüne kadar sığırlarda *T. gondii*’nin neden olduğu abort vakası bildirilmemiştir (Ellis, 1998; Gottstein ve diğerleri, 1998; Canada ve diğerleri, 2002b).

İmmünohistokimyasal boyama, *N. caninum* lezyonlarının gösterilmesinde geleneksel hematoksilen eozin boyamaya göre daha güvenilirdir ve lezyonların görüldüğü tüm dokularda neosporosis tanısının konmasını sağlayabilmektedir **(**Boger and Hattel, 2003). *Neospora caninum*’a spesifik poliklonal ve/veya monoklonal antikorlar immünohistokimyasal boyamada kullanılabilir ve her iki tip antikora da ticari olarak ulaşılabilinmektedir (Cole ve diğerleri, 1994; Lindsay and Dubey, 1989a). Apikompleksan parazitlerle ilişkili *N. caninum* antikorlarının çapraz reaksiyonları sorun teşkil etmemektedir. Çünkü *T. gondii* ve *Sarcocystis* spp.alt tipleri genellikle sığırda abortla ilişkili değildir (Anderson ve diğerleri, 1991; Canada ve diğerleri,2002b). Ancak bazı laboratuvarlarda, sık olmasa da immünohistokimyasal protokoller karşılaştırıldığında *T. gondii* ile enfekte hayvanlarda yanlış pozitiflik sonucu *N. caninum* tanısı konulmuştur (Van Maanen ve diğerleri, 2004).

**2.6.3. Serolojik Testler**

*Neospora caninum* enfeksiyonu, konakta immunodominant antijenlere karşı oluşan antikorların belirlenmesine imkân veren humoral yanıtı uyarmaktadır (Hiasa ve diğerleri, 2012a). Konakta enfeksiyonun akut veya kronik döneminde sırasıyla taşizoit veya bradizoitlerde bulunan antijenlere karşı antikor oluşumu gerçekleşir (Dubey ve diğerleri, 2013). Serolojik testlerin, sürü bazında akut enfeksiyon safhasındaki hayvanlar hakkında bilgi edinmek için ve antemortem muayene açısından önemli avantajları vardır (Dubey ve diğerleri, 2006). Buzağı ve sığırlarda enfeksiyondan birkaç gün sonra spesifik IgM ve IgG antikorlarında artış oluşur. Spesifik IgM enfeksiyonun 2. haftasından sonra en yüksek seviyeye ulaşır ve enfeksiyonun 4. haftasında neosporosis agglütinasyon testi ile belirlenen limitlerin altına düşmeye başlar (De Marez ve diğerleri, 1999). Buna karşın, IgG seviyesi deneysel enfeksiyonlarda ilk haftalarda artış göstermeye başlayıp, 3-6 ay kadar yüksek seviyelerde bulunabilir (Conrad ve diğerleri, 1993b; De Marez ve diğerleri, 1999; Dubey ve diğerleri, 1996; Schares ve diğerleri, 1999c, 2000; Trees ve diğerleri, 2002; Uggla ve diğerleri, 1998; Williams ve diğerleri, 2000). Taşizoit veya ookist kaynaklı birincil enfeksiyon sonrası başlangıçta yükselen IgG1’i çok az ve gecikmeli olarak IgG2 takip eder (Andrianarivo ve diğerleri, 2001; De Marez ve diğerleri, 1999; Williams ve diğerleri, 2000). Deneysel olarak ookist ile enfekte edilmiş buzağılarda IgA düzeyinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (De Marez ve diğerleri, 1999). *Neospora caninum*’un birincil enfeksiyonundan sonra spesifik antikorların aviditesinde (antikorlar ve antijenler arasında oluşan kompleksin ortalama stabilite ölçüsü) zamanla bir artış şekillenir (Björkman ve diğerleri, 1999; 2005) ve bu artış bize enfeksiyon hakkında geniş veri alınmasını sağlar. Düşük avitide IgG yanıtlarını (ortalama iki haftalık enfeksiyonun göstergesi) ve yüksek avitide IgG yanıtlarını (kronik enfeksiyonun göstergesi) ayırt etmek için birçok avitide testi geliştirilmiştir (Dubey ve diğerleri, 2006). Altı aylıktan büyük doğal yolla enfekte olan danada genellikle yüksek avidite IgG yanıtı gözlenmiştir (Björkman ve diğerleri, 1999; 2003). Serolojik testler gibi indirekt tanısal teknikler hayvanlar ölmeden önce kullanılabilir olmaları, hastalığın farklı evrelerini (akut-kronik) gösterebilmeleri, hastalığı izleme ve kontrol altına almaya yardımcı olabilmeleri nedeniyle önemli avantajlara sahiptir (Hiasa ve diğerleri, 2012a; Takashima ve diğerleri, 2013). *Neospora caninum*’a karşı hayvanlar tarafından üretilen spesifik antikorları test edebilmek için birçok ticari serolojik kit mevcuttur. En önemlilerinden biri aynı testte birçok örneği değerlendirebilmeyi sağlayan indirekt ELISA yöntemidir (Sinnott ve diğerleri, 2017). Bunun yanında referans teknik olarak kabul gören IFAT testi de yer almaktadır (Dubey ve diğerleri, 1988). Sürülere *N. caninum* ile aşılama uygulaması yapıldıktan sonra serolojik taramaların yorumlanması oldukça güç olabilmektedir. Kullanılan aşılar, ölü hücre kültürü kaynaklı taşizoit tabanlı adjuvantlardan oluşur ve örneğin A.B.D (Estill, 2004), Kosta Rika (Romero ve diğerleri, 2004) ve Yeni Zelanda (Heuer ve ark, 2003) gibi ülkelerde bu tip aşılar kullanılmaktadır (Dubey ve diğerleri, 2006). Bunun yanında Moore ve diğerleri (2005) tarafından, ticari olmayan ve canlı taşizoitlerin kullanıldığı deneysel aşı çalışmaları yapılmıştır. Canlı taşizoitlerin kullanılması ile aşılanan hayvanlarda, doğal yolla *N. caninum* ile enfekte olmuş sığırlara benzer antikor yanıtları gelişmiştir (Andrianarivo ve diğerleri, 2001; Choromanski and Block, 2000; Moore ve diğerleri, 2005). Bu hayvanların doğal enfeksiyona mı maruz kaldığı yoksa aşıdan dolayı mı antikor titresinin verdiğinin tespiti için, ayırt edici serolojik testler ile birlikte marker aşıların geliştirilmesi yönünde olmuştur (Conraths and Ortega, 2005).

Serolojik çalışmaların birçoğu sığırlarda *N. caninum* enfeksiyonunda spesifik antikorları belirlemeye yöneliktir. Bu çalışmaların tamamı hayvandan alınan numunede taşizoit antijeni aramaya dayanmaktadır. Bazı serolojik testlerde IFAT veya *Neospora* agglütinasyon testi (NAT) kullanılabilir. Her iki yöntemde de taşizoitlerin dış zar antijenlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorların tür spesifikliği ile gösterildiği gibi, neosporaya özgü birçok antijen sağlayan taşizoit yüzeyinde antikorları tespit etmeye yöneliktir (Baszler ve diğerleri, 1996; Bjorkman and Hemphill, 1998; Howe ve diğerleri, 1998; Schares ve diğerleri, 1999b). Diğer bir önemli nokta da *in vitro* koşullarda *N. caninum*'u üretmek için yararlanılan hücre kültürü ortamında kullanılan fetal sığır serumunun (FBS) *N. caninum*'a karşı antikorlar içermesidir ki bu durum ilgili FBS içeren örnekler kullanılarak hazırlanan antijenler ile yapılan testlerde yanlış pozitif sonuç verebilmektedir (Dubey ve diğerleri, 2006).

*Neospora caninum* enfeksiyonunun tanısında, immunoblotlarda indirgenmiş veya indirgenmemiş antijenlerin kullanılmasının tanımlanmasına yönelik ilk çalışmalar Barta ve Dubey (1992) ile Bjerkas ve diğerleri (1994) tarafından yapılmıştır. Aralarında 19, 29, 30, 33 ve 37 kDa antijenlerinin de bulunduğu farklı immunodominat *N. caninum*-spesifik antijenleri identifiye edilmiş ve indirgenmemiş antijenlere karşı güçlü reaksiyonlar gözlendiği bildirilmiştir. Konformasyonel epitoplar ağırlıklı olarak *N. caninum*-spesifik antikor yanıtında rol oynamasından kaynakladığı düşünülmüştür. İndirgenmemiş antijen kullanan araştırmacılar, indirgenmiş antijen kullananlara göre *N. caninum*, *T. gondii* ve *Sarcocystis* spp. ile enfekte hayvanların serumları arasında çapraz reaksiyonların daha az olduğunu gözlemlemişlerdir (Baszler ve diğerleri, 1996; Harkins ve diğerleri, 1998).

Bazı ELISA, *N. caninum* spesifik antikorları sığır serumunda belirlemeye yöneliktir. ELISA çalışmalarında total ya da fikse edilmiş *N. caninum* taşizoitleri, suda ya da deterjanda çözdürülebilir toplam taşizoit ekstratları, tek doğal ya da rekombinant taşizoit antijenleri kullanılmaktadır (Dubey ve diğerleri, 2006). Bu çalışmaların çoğu karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Zintl ve diğerleri, 2006). Monoklonal ve poliklonal antikorlara dayanarak, *N. caninum*-spesifik epitoplara karşı antikorları tespit eden yarışmalı ELISA (c-ELISA) geliştirilmiştir (Dubey ve diğerleri, 2006). *Neospora caninum* spesifik antikorlarını belirlemeye yönelik ticari ELISA kitlerinin birçoğu taşizoit lizat antijenini temel alır (Dubey ve diğerleri, 2006). Ayrıca, *N. caninum* taşizoitlerinin fikse edilmesine dayalı ticari ELISA kitleri de mevcuttur (Williams ve diğerleri, 1999). İmmunostimulan kompleksler, taşizoit antijeni veya arındırılıp-saflaştırılmış *N. caninum* yüzey antijeni (NcSRS2) ile birleştirilmiştir (Von Blumroder ve diğerleri, 2004). Çoğu aşı potansiyeli olan (Jiménez-Ruiz ve diğerleri, 2012; Weston ve diğerleri, 2012a, b; Uchida ve diğerleri, 2013; Lv ve diğerleri, 2015) veya teşhis amaçlı (Hu ve diğerleri, 2011; Hiasa ve diğerleri, 2012b; Yin ve diğerleri, 2012; He ve diğerleri, 2013; Ybañez ve diğerleri, 2013; Ghalmi ve diğerleri, 2014; Hamidinejat ve diğerleri, 2015) çok sayıda farkıl antijenler tanımlanmıştır. Bu antijen çalışmaları genellikle son on yılı kapsamakta olup, **Tablo 2** de verilmiştir (Sinnott ve diğerleri, 2017). İlerleyen yıllarda rekombinant antijenlerin önemi daha da artacaktır. Çünkü serolojik testler için rekombinant antijenler yüksek miktarda ve daha iyi standartlarda üretilebilmektedir. Liao ve diğerleri (2005), antijen olarak *N. caninum* taşizoitlerinin (NcSRS1) rekombinant yüzey antijenlerini ticari olmayan hızlı immunokromatografik test kullanarak rapor etmişlerdir.

**Tablo 2.** *Neospora caninum* tanı testleri geliştirilmesi için yaygın olarak kullanılan antijenler.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Antijen** | ***N. caninum* Lokalizasyonu** | **Taşizoit (T)**  **Bradizoit (B)** | **Kaynaklar** |
| NcSRS2 | Hücre Yüzeyi | T ve B | Sinnott ve diğerleri, 2014; Dong ve diğerleri, 2014; Fernandes Pinheiro ve diğerleri, 2013; Uzêda ve diğerleri, 2013; Dong ve diğerleri, 2012; Borsuk ve diğerleri, 2011; Fernandes Pinheiro ve diğerleri, 2015. |
| NcSAG1 | Hücre Yüzeyi ve Granül | T | Takashima ve diğerleri, 2013; Dong ve diğerleri, 2013; Dong ve diğerleri, 2012; Hiasa ve diğerleri 2012a; Moraveji ve diğerleri; 2012; Wilkowsky ve diğerleri, 2011 |
| NcSAG4 | Hücre Yüzeyi | B | Hu ve diğerleri, 2011 |
| Ncp40 | Hücre Yüzeyi | a | He ve diğerleri, 2013 |
| NcPF | Sitoskeleton | a | Hiasa ve diğerleri,2012b |
| NcGRA2 | Granül | T ve B | Dong ve diğerleri, 2012 |
| NcGRA6 | Granül | a | Ghalmi ve diğerleri, 2014 |
| NcGRA7 | Granül | T ve B | Takashima ve diğerleri, 2013; Uzêda ve diğerleri, 2013; Hiasa ve diğerleri, 2012a; Hamidinejat ve diğerleri, 2015; Kefayat ve diğerleri, 2012 |
| NcSUB1 | Serin proteaz | T | Ybañez ve diğerleri, 2013 |
| NcMIC10 | Mikronem | T | Yin ve diğerleri; 2012 |
| NcMIC6 | Mikronem | T | Li ve diğerleri, 2015 |

a\* Etkende yeri tanımlanamamış

**2.6.3.1.** **İndirekt Florasan Antikor Testi (IFAT)**

İndirekt immunofloresan antikor testi (IFAT), tamamlanmış ilk serolojik testtir (Dubey ve diğerleri, 1988) ve neosporosis tanısında referans teknik olarak kullanılmaktadır (Piagentini ve diğerleri, 2012). Taşizoit ile enfekte hücreleri tespit etmek maliyeti yüksek bir yöntemdir (Sinnott ve diğerleri, 2014). Ayrıca testi uygulayan uzmanın tecrübesi ile doğrudan ilişki olduğu için subjektif bir testtir ve diğer protozoanlar ile antikor reaksiyonu oluşabileceğinden miks enfeksiyonların varlığında spesifitesi azalabilmektedir (Risco-Castillo ve diğerleri, 2011; He ve diğerleri, 2013; Ybañez ve diğerleri,2013). Sadece belli bir sayıda örnek ile çalışılabilmesi ve tanı için kullanılan sulandırma değerlerinin farklılığı da test için dezavantaj oluşturmaktadır (Langoni ve diğerleri, 2011; Cardoso ve diğerleri, 2012; Minervino ve diğerleri, 2012). Sayılan dezavantajlara rağmen IFAT, neosporosis tanısında kullanılan standart bir testtir ve birçok çalışmada hastalığın prevalansının belirlenmesinde kullanılmıştır (Sinnott ve diğerleri, 2017). IFAT tekniğinde kullanılacak taşizoitin sağlam bir şekilde varlığı gerekmektedir ve *T. gondii* gibi diğer apikomleksa ailesindeki parazitlerle çapraz reaksiyon verebilmektadir (Dong ve diğerleri, 2012). IFAT testinde kullanılacak olan cut-off değerleri üzerine birçok tartışma olmuştur. Bu testlerin uygun cut-off değerlerinin belirlenmesi spesifik durumlar ortaya çıkmıştır. Çünkü IFAT test titreleri floresan mikroskobunun kaliteli malzemesine bağlı olduğu için, farklı laboratuvarlar arasında belli bir standart oluşturmak imkânsızdır. Sonuç olarak bir laboratuvar için uygun olan cut-off titresi bir başka laboratuvar için uygun olmayabilir. Laboratuvarlar kendi cut-off değerini belirlemeli ve literatürdeki cut-off değerlerine güvenmemelidir (Dubey ve diğerleri, 2006).

**2.6.3.2. Enzim İşaretli İmmunosorbent (ELISA)**

Antijen-antikor reaksiyonlarını belirleyebilmek için enzim reaksiyonlarının planlandığı tüm tekniklere genel olarak enzim immunotest (enzyme immunoassay, EIA) denir. Enzimle işaretli immuno reaktiflere dayalı bu testler, tanı laboratuvarlarında oldukça önemli bir yere sahiptir. Radyoimmünotestler (RIA), EIA'den daha önce kullanılmaya başlanmış, ancak işaretleme için iyot-125 gibi kısa ömürlü izotopların kullanılması, toplum sağlığı ve çevreye zararlı radyoaktif madde kullanımı, RIA'in endokrinoloji laboratuvarlarında kullanımı ile sınırlı kalmasına neden olmuştur. Mikrobiyoloji alanında immünfloresan (IF) teknikleri RIA'dan daha yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak IF tekniklerinin uygulanmasında iyi eğitilmiş eleman gereksinimi ve sonuçların yorumlanmasının subjektif olması bu tekniklerin de yaygın kullanımını engellemektedir. ELISA sistemleri 1960'larda radioimmunoassay yöntemlerine alternatif aranırken bulunmuştur. EIA'de kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması ve otomatize edilebilmesi diğer iki tekniğe olan üstünlükleridir. Daha önemlisi laboratuvarlara çok fazla sayıda örnekle çalışma olanağı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır (Çırak, 1999).

Hastalığın tanı araçlarının geliştirilmesi için genellikle indirekt ELISA testlerinin kullanıldığı hem sensitivitesi hem de spesifitesi bulunan testler kullanılmaktadır. Bu test tekniğinin doğruluğunu arttırmak için başka ELISA formatları geliştirilmiştir. Örnek olarak serumdaki antikorlar ile aynı epitopa bağlanan monoklonal antikorlar (mAbs) veya poliklonal antikorlar (pAbs)’ın kullanıldığı yarışmalı (competitive) ELISA, bloklamalı (blocking) ELISA ve yakalamalı (capture) ELISA gibi testler geliştirilmiştir (Sinnott ve diğerleri, 2017). Bu testlerde farklı türlere özgü sekonder antikorların kullanılması gerekmemekte ve aynı testte IgM ve IgG antikorları tespit edilebilmektedir (Yin ve diğerleri, 2012; de Sá ve diğerleri, 2014; Dong ve diğerleri, 2014; Sinnott ve diğerleri, 2014).

Yapılan çalışmalarda tanısal doğruluğu arttırmak için spesifik protozoon proteinlerinin doğal ve rekombinant formları kullanılarak bazı testler geliştirilmekte, böylece apikompleksa ailesindeki diğer parazitler ile gerçekleşebilecek çapraz reaksiyonların azaltılması hedeflenmektedir (Borsuk ve diğerleri, 2011; Moraveji ve diğerleri, 2012; Dong ve diğerleri,2013; Ybañez ve diğerleri, 2013; de Sá ve diğerleri, 2014).

*Neospora caninum*’a karşı spesifik antikorların tespiti amacıyla kullanılmak üzere ELISA testlerinde kullanılmak üzere kullanılan rekombinnat proteinler **Ek-2**’de gösterilmiştir.

Neosporosisin tanısıda etkili olan bir başka yöntem de immunoblotlama yöntemidir, ancak bu teknik daha az sıklıkla kullanılmaktadır (Sinnott ve diğerleri, 2017). İmmunoblot tekniği antikor tespiti ve serolojik testlerin perfomansını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip güvenilir bir metottur (Hu ve diğerleri, 2011). Immunoblot doğrulayıcı bir yöntem olarak kullanılır ve reaktif antijenlerin molekül ağırlığı gibi ek bilgiler sağlamaktadır (Ghalmi ve diğerleri, 2014). Parazite spesifik antijen formülasyonların kullanıldığı serolojik tanı metotları son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan konulardır. Genellikle NcSRS2 ve NcSAG1 hücre yüzey proteinleri gibi spesifik rekombinant *N. caninum* proteinleri antijen olarak kullanılmaktadır. İmmunoblot yöntemi antikor saptamasında en güvenli teknik olması sebebiyle serolojik testlerin geliştirilmesinde de kullanılır (Hu ve diğerleri, 2011).

Serolojik testler farklı amaçlar için kullanılabilmektedir (Dubey ve diğerleri, 2006), ancak seçilecek testtin uygulanabilirliği için değerlendirme yapılmadan testi tercih etmenin doğru olmadığı vurgulanmaktadır (Greiner and Gardner, 2000). Belirlenecek uygun cut-off değeri sığır neosporosisinde kullanılacak olan herhangi bir serolojik test için kritik öneme sahiptir (Alvarez-Garcı´a ve diğerleri, 2003; Jenkins ve diğerleri, 2002). Bununla birlikte bazı uygulamalar için uygun cut-off değerini belirlemenin yanında ayrıca test protokolünü değiştirmek de (antijen türü, antijen konsantrasyonu, serum ve konjugat seyreltmesi, belirli bir konjugat özgüllüğü v.b.) tavsiye edilmektedir (Dubey ve diğerleri, 2006). Testlerin çoğu sığırlarda abortun tanısını ortaya koymak için geliştirilmiştir. Ancak çiftliklerde sürü geleceğini yakından ilgilendiren; sürü içerisinde enfekte hayvanların belirlenmesi ve sürü dışına çıkarılması (Hall ve diğerleri, 2005) ayrıca sürüye yeni katılacak olan hayvanların katılmadan önce neosporosisten ari olmasının belirlenmesi için yapılacak faaliyetlerde de serolojik testler kullanılabilmektedir (Baillargeon ve diğerleri, 2001; Landmann ve diğerleri, 2002).

Sürü bazında abort vakalarının gözlenmesi, ölü doğumların olması veya neonatal mortalitenin oluşmasından sonra, sürü bazında serolojik tarama yapılması enfekte hayvanların bulunmasını, ayrıca akut-kronik fazdaki hayvanlar hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır. *Neospora caninum* ile enfekte fetüse sahip birçok inek abort sırasında veya buzağılamadan sonra serolojik testlerde pozitif sonuç verir (De Meerschman ve diğerleri, 2002; Otter ve diğerleri, 1997; Söndgen ve diğerleri, 2001; Wouda ve diğerleri, 1998a; Anderson ve diğerleri, 1997; Davison ve diğerleri, 1999c; Ho ve diğerleri, 1997a). *Neospora caninum* yönünden seronegatif olan bir hayvanda abort, ölü doğum veya neonatal ölümler gözlenmeyebilir. Ancak bazı durumlarda seronegatif ineklerden seropozitif buzağılar veya *N. caninum* ile enfekte fetüsün abortu şekillenebilir (Davison ve diğerleri, 1999b, 1999c; Sager ve diğerleri, 2001). Bunun konakta varolan değişken (dalgalı seyreden) antikor seviyelerinden kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir (Conrad ve diğerleri, 1993b). Bu dalgalanmalar abort olmasına yakın gebelik sırasında veya buzağılamadan sonra gözlenebilmektedir (Dannatt, 1998; Fioretti ve diğerleri, 2003; Guy ve diğerleri, 2001; Pare´ ve diğerleri, 1997; Quintanilla-Gozalo ve diğerleri, 2000; Stenlund ve diğerleri, 1999; Guy ve diğerleri, 2001; Schares ve diğerleri,1999c; Wouda ve diğerleri, 1998b; Stenlund ve diğerleri, 1999). Antikor seviyeleri daha az sensitiviteye sahip olan testlerde belirlenen limitlerin altına düşerek yanlış negatif sonuç verebilmektedir (Dannatt, 1998; Dijkstra ve diğerleri, 2003; Wouda ve diğerleri, 1998b). Hayvan enfekte olmasına rağmen spesifik antikor gelişmeyebilir ya da oluşan antikorlar kullanılan testlerde tespit edilemeyebilir. Bu durum ookistler ile deneysel olarak enfekte edilmiş bir danada rapor edilmiştir (De Marez ve diğerleri, 1999).

Neosporosis kaynaklı abort yapan hayvanların *N. caninum* spesifik antikor seviyesi, abort yapmayıp enfekte olan düvelerin spesifik antikor seviyesinden daha yüksektir (Dubey ve diğerleri, 1997; McAllister ve diğerleri, 1996a; Quintanilla-Gozalo ve diğerleri, 2000; Schares ve diğerleri, 1999c, 2000; Waldner ve diğerleri, 1998). Burada kullanılan serolojik testler, *N. caninum* ile enfekte olmuş tüm düveleri tespit etmek için ayarlanmamış olup, sadece yüksek antikor seviyeli hayvanları tespit etmek için kullanılan serolojik testlerdir ve seropozitiflik ile abort (Schares ve diğerleri, 1999a) ya da seropozitiflik ile vertikal bulaşma arasındaki ilişkiyi göstermek için kullanılmaktadır (Davison ve diğerleri, 1999c). Özellikle ELISA’da, endemik abort görülen sürülerdeki düvelerin antikor seviyelerinin epidemik abort görülen sürülerdeki düvelerin antikor seviyelerine göre çok daha fazla olduğu görülmüştür (Schares ve diğerleri, 1999c, 2000). Bu etki birkaç ticari ELISA kiti ile denenmiş ve test uygulanırken abort tanısı için uygun cut-off değerleri dikkate alınmıştır. Serolojik testler hem epidemik hem de endemik durumlarda pozitif abort serumları ile birlikte değerlendirilmelidir (Dubey ve diğerleri, 2006).

Sürünün, *N. caninum* ile enfekte olduğu bulaşma yolunun belirlenebilmesi için sürü düzeyinde ek analizler yapılması gerekmektedir. Bu amaçla ELISA testleri kullanılabilmektedir. Bu testler *N. caninum* spesifik IgG aviditesini ölçerek sürü düzeyinde son enfeksiyonun belirtilerini bulabilmek için kullanılabilmektedir. Ancak bireysel hayvanlar için avidite test sonuçlarının dikkatli yorumlanması gerekmektedir. Çünkü bireysel hayvanlar birkaç yıl boyunca enfekte olmasına rağmen düşük antikor avidite yanıtını koruyabilmektedir (Björkman ve diğerleri, 2003). Ayrıca düvelerden doğan yavruların düveler ile analizi yapılarak enfeksiyon yönü bulunabilmektedir (Thurmond ve diğerleri, 1997). Düveler ile yavruları arasında seropozitiflik yönünden pozitif bir ilişki bulunan sürülerde, enfeksiyonun baskın yönü vertikal bulaşma olarak saptanabilir. Enfeksiyonun yönü ve baskınlığı ile ilgili daha fazla bilgi, farklı yaş gruplarının veya birlikte barındırılan hayvan gruplarının seroprevalanslarını karşılaştırarak elde edilebilmektedir (Dijkstra ve diğerleri, 2001a).

Sığır fetüsünde, 120. günler civarında immun sistem aktive olmaya başlar (Swift and Kennedy, 1972) ve birçok fetüsde transplasental yollan gelen *N. caninum* taşizoitlerine karşı spesifik antikorlar gelişir (Bae ve diğerleri, 2000; Barr ve diğerleri, 1995; Bartley ve diğerleri, 2004; Buxton ve diğerleri, 1997; De Meerschman ve diğerleri,2002; Gondiim ve diğerleri, 2004b; Pereira-Bueno ve diğerleri, 2003; Reichel ve Drake, 1996; Slotved ve diğerleri, 1999; Söndgen ve diğerleri, 2001; Wouda ve diğerleri, 1997a). Bu antikorlar dominat olarak IgG1’in yanında ayrıca IgM ve IgG2 türündedirler (Andrianarivo ve diğerleri, 2001; Buxton ve diğerleri, 1997; Slotved ve diğerleri, 1999). Fetüsün kanında, pleural ve peritonal vücut boşluğundaki serosangionöz sıvılardan ve abomasal içeriklerden alınan örneklerde *N. caninum* spesifik antikorları aranabilmektedir. Fetal sıvılarda uygulanan IFAT ve ELISA testlerinin düşük sensitiviteye sahip olduğunu belirten birkaç rapor bulunmaktadır (Alvarez-Garcı´a ve diğerleri, 2003; Barr ve diğerleri, 1995; Gottstein ve diğerleri, 1998; Reichel ve Drake, 1996; Slotved ve diğerleri, 1999; Schock ve diğerleri, 2000; Söndgen ve diğerleri, 2001; Wouda ve diğerleri, 1997a). Özellikle sığır fetüsünün altı aylıktan küçük olduğu veya enfeksiyon ile fetüs ölümü arasında kısa bir zaman geçmiş olması gibi durumlarda fetal örneğin serolojik testeki düşük sensitivetesinin immun sistemin eksikliğinden kaynaklanıyor olabileceği belirtilmektedir (Wouda ve diğerleri, 1997a). Son zamanlarda Western blot’a dayalı testlerin fetal serolojik çalışmalarda yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu vurgulanmıştır (Alvarez-Garcı´a ve diğerleri, 2002; Söndgen ve diğerleri, 2001).

Fetal enfeksiyon klinik semptom göstermeyen enfekte buzağıların doğmasına neden olmakla birlikte bazı buzağılarda nörolojik bozukluklar da şekillenebilmektedir (Barr ve diğerleri, 1991b; De Meerschman ve diğerleri, 2005; Dubey ve De Lahunta, 1993; Dubey ve diğerleri, 1990a). *Neospora caninum*’a bağlı intrauterin enfeksiyon buzağıda parazite karşı spesifik antikoların gelişmesini tetiklemektedir (Anderson ve diğerleri, 1997; Ho ve diğerleri, 1997a). Serolojik testlerin tatbiki için yeni doğan buzağılarda prekolostral dönemde materyal alınması daha sağlıklı sonuç verecektir. Çünkü kolostral IgG antikorları yanlış pozitif reaksiyon verebilmektedir (Jenkins ve diğerleri, 1997; Pare´ ve diğerleri, 1996). Kolostrum ile alınan antikorların buzağıda birkaç ay bulunduğu tespit edilmiştir (Hietala and Thurmond, 1999; Wouda ve diğerleri, 1998a). Süt numunelerinde ELISA yöntemi ile yapılan çalışmalar sürü bazında etkenin seroprevalansı hakkında bilgi edinmeye (Bartels ve diğerleri, 2005; Chanlun ve diğerleri, 2002; Schares ve diğerleri, 2003; Varcasia ve diğerleri, 2006) yarar. Yine ELISA, *N. caninum* enfeksiyonundan eradike edilmiş sürülerin korunmasını ve bu parazit ile enfekte olmuş sürüleri tanımlamak için potansiyeli olan bir yöntemdir (Bartels ve diğerleri, 2005; Chanlun ve diğerleri, 2006).

**2.6.4. Moleküler Yöntemler ile Teşhis**

Moleküler tabanlı tanı yöntemleri arasında yer alan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), maliyeti yüksek olmasına rağmen, *Neospora caninum*’un saptanmasında sensitif, spesifik ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle önemli bir yer tutmaktadır (Tramuta ve diğerleri, 2011). PZR yöntemi parazitin tanısı, DNA miktarının ölçümü, DNA dizilimi ve parazitin yeni konaklarının tanımlanması için de kullanılabilmektedir (Dubey ve diğerleri, 2011). Yapılan çalışmalarda, *N. caninum*’un geniş bir genetik değişkenliği olduğundan, farklı biyolojik davranışları olabileceği düşünülmektedir. Bu genetik değişkenliği göstermek için mikrosatellit-DNA sekans analizi kullanılmıştır (Bacigalupe ve diğerleri, 2013). Mikrosatellitler basit sekans tekrarları olarak da bilinirler ve yüksek değişken lokasyonda ökaryot ve prokaryot genomlarda 1-6 bazda bir tekrar ederler (Campero ve diğerleri, 2015b). Birçok çalışmada *N. caninum* izolatının genetik karakterizasyonunda mikrosatellit lokalizasyonu kullanılmıştır (Brom ve diğerleri, 2014; Salehi ve diğerleri, 2015; Qian ve diğerleri, 2016; Medina-Esparza ve diğerleri, 2016).

**2.7. Canlı *N. caninum* İzolasyonu**

*Neospora caninum*’u canlı olarak izole etmek amacıyla yapılan hücre kültürleri veya fareler üzerindeki biyolojik deneyler genellikle başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Canlı *N. caninum* izolasyonu sadece sığır, koyun, manda, bison, at, beyaz kuyruklu geyik gibi birkaç ara konak üzerinde yapılmış ve son yıllardaki izolasyon çalışmaları **Tablo** **3**’de özetlemiştir. Günümüze kadar izolasyon için yapılan çalışmalarda, enfeksiyon fetüsü etkiledikçe her evredeki parazit de fetüs ile birlikte ölmektedir. Muhtemelen bu nedenle Conrad ve diğerleri (1993a) histolojik yöntemle *N. caninum* ile enfekte olduğu belirtilen 49 fetüsten sadece ikisinden paraziti izole edebilmiştir. *Neospora caninum*’u kongenital enfekte buzağıların nöral dokularından izole etmek daha kolaydır. Çünkü bu buzağılarda doku kistleri mevcut olup, takizotlere göre doku kistleri otolize karşı çok daha dirençlidir. Konak doku, tripsin ve pepsin ile muamele edilerek parazitin konsantrasyonu arttırılabilir. Pepsin konak dokuya nüfuz ettiğinde taşizoitler ölürken, bradizoitler etkilenmeyebilirler. Pepsin ile yapılan prosedürlerde; asit birçok bakteriyi öldürdüğü ve santifiruj tekrarı gerekmediği için tripsin ile yapılan prosedürlere göre daha avantajlı olup kronik olarak enfekte hayvan dokularından *N. caninum* izolasyonu için önerilmektedir (Dubey, 1998). *Neospora caninum*’un ilk izolasyonu 1988 yılında köpekten elde edilmiş ve bunu birçok ülkede yapılan sığır ve diğer ara konaklardaki (kuzu, su aygırı) izolasyon çalışmaları takip etmiştir (Dubey ve diğerleri, 2007). Bu izolatların biyolojik karakterizasyonları ile; parazitin genetik çeşitlilik gösterdiği, *in vivo* patojenitesinde önemli varyasyonların olduğu ve *in vitro* ortamda gelişme özelliklerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır (Schock ve diğerleri 2001; Regidor-Cerrillo ve diğerleri, 2006; Atkinson ve diğerleri, 1999; Miller ve diğerleri, 2002; Collantes-Ferna´ndez ve diğerleri, 2006; Pe´rez-Zaballos ve diğerleri, 2005). Geçmişte dünya çapında yapılan izolasyon çalışmalarının çoğu semptomatik bulgu, ölü doğum veya abortlar üzerinde yoğunlaşmıştır. *N. caninum*’un biyolojik karakterizasyonu hakkında daha fazla bilgi almak amacıyla yapılacak olan yeni izolasyonlar üzerindeki çalışmalarda sağlıklı ve asemptomatik hayvanların kullanılması gerekmektedir (Regidor-Cerrillo ve diğerleri 2008). Asemptomatik hayvanlardan elde edilen izolatların virülens değeri düşük olduğu için aşı uygulamaları gibi immunoprofilaktik çalışmalarda kullanılabilirler (Campero ve diğerleri, 2015b).

**Tablo 3.** *Neospora caninum*’un izolasyon çalışmaları.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Konakçı** | **Ülke** | **Doku/Organ** | **İzolat Sayısı** | **Referans** |
| Sığır | Brazilya | Buzağı Beyni  (4 aylık Asemptomatik) | 1  (Nc-Goiás 1) | García-Melo ve diğerleri, 2009 |
| Sığır | İsrail | Fetüs Beyni | 2  (NcIs491, NcIs580) | Fish ve diğerleri, 2007 |
| Sığır | Polonya | Buzağı Beyni  (Asemptomatik) | 1  (NC-PolB1) | Go´zdzik ve Cabaj, 2007 |
| Sığır | Slovakya | İnek | 1  (Nc-SKB1) | Reiterová ve diğerleri, 2011 |
| Sığır | İspanya | Buzağı Beyni  (Asemptomatik) | 9  (Nc-Spain 6, 7, 8, 9, 10, Nc-Spain 2H,3H, 4H, 5H) | Regidor-Cerrillo ve diğerleri, 2008 |
| Sığır | İspanya | Buzağı Beyni  (Asemptomatik) | 1  (Nc-Spain 1H) | Rojo-Montejo ve diğerleri, 2009b |
| Avrupa  Bizonu | Polonya | Kan | 2  (NC-PolBb1 and 2) | Bien´ ve diğerleri, 2010 |
| Köpek | Almanya | Dışkı,  KO fare  Hücre Kültürü | 3  (NC-GER7, 8, 9) | Basso ve diğerleri, 2009b |
| Köpek | Polonya | Dışkı,  Knock Out fare  Hücre Kültürü | 1  (NC-P1) | Basso ve diğerleri, 2009a |
| Sığır | Brezilya | Buzağı Beyni | 1 (NC-SP1) | Oliveira ve diğerleri, 2017 |
| Sığır | Brezilya | Fetüs Beyni ve Böbrek | 1 (BNC-PR4) | Rosangela ve diğerleri, 2018 |
| Sığır | Çin | Kan | 1 (NC-Bj) | Pan Hao ve diğerleri, 2014 |
| Kurt | A.B.D | Beyin ve Kalp | 2 (NcWolfMn1, NcWolfMn2) | Dubey ve diğerleri, 2014 |

İlk olarak Cornelissen ve diğerleri (1981) tarafından fare beyninden *T.* gondii’yi ayrıştırmada kullanılan Percoll gradiyent yöntemi daha sonra konak dokusundan *N. caninum*’u ayrıştırmak için de kullanılmıştır (Fioretti ve diğerleri, 2000; McGuire ve diğerleri, 1997; Stenlund ve diğerleri, 1997). Beyin homojenatından alınan örnek bireysel olarak gama interferon ile genetiği zayıflatılmış fareye parazit kolonilerinin toplanması amaçlı inoküle edilmiştir (Dubey ve diğerleri, 2004). Buna rağmen *N. caninum* bradizoitlerinin hücre kültüründe veya farede enfeksiyon oluşturma yeteneği taşizoitlere göre daha düşüktür. Buna ek olarak, bradizoitlerin hücre kültürüne inoküle edilmeden önce pepsin veya tripsin aracılığı ile doku kistinden ayrıştırılması gerekmektedir, çünkü doku kistlerinin hücre kültürünü enfekte etme yeteneği yoktur (Dubey ve diğerleri, 2006). Hücre kültürlerinde *N. caninum*’un çoğaltılması için birçok memeli hücresi kullanılmıştır (Lindsay ve Dubey, 1989c). Doku kültüründen oluşturulan homojenat hücre kültürlerine inkübe edildiğinde, *N. caninum* için hücre kültürleri en az iki ay boyunca bekletilmelidir, çünkü etken yavaş gelişim gösterir ve taşizoitler 60 günden önce mikroskobik olarak gözle görülemeyebilirler.

Canlı *N. caninum* izolasyonu için immünsupresif farelerin kullanımı hücre kültüründen daha etkili bir yöntemdir. Fioretti ve diğerleri (2000)’nin, sekiz aylık buzağıdan *N. caninum*’u izole ettikleri çalışmalarında gebeliğin 230. gününde IgG ve IgM antikorları yönünden pozitiflik saptanarak, kazanılmış *N. caninum* enfeksiyonu tanısı konulmuştur. İkinci önemli özellik de, gebeliğin 280. gününde sağlıklı bir buzağı doğmasına rağmen, plasentanın inflamasyon odakları içeriyor olması ve fareye yapılan inokülasyon sonucunda canlı *N. caninum* izole edilmiş olmasıdır. Üçüncü önemli özelliği ise kalın duvarlı *N. caninum* doku kisti, buzağı 8 aylık yaşta öldürüldüğünde buzağı beyninde bulunmuştur ve bu buzağı klinik olarak sağlıklı olmasına rağmen hücre kültüründe ve farede canlı *N. caninum* elde edilebilmiştir. İlk defa inekten canlı *N. caninum* izolasyonu Sawada ve diğerleri (2000) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada iki yaşındaki bir ineğin beyni kullanılmıştır. Bu inek iki kez *N. caninum* enfeksiyonu sonucunda abort yapmış ve 2. abortundan 24 gün sonra ölmüştür. Protozoon enfekte beynin histolojik kesitlerinde gösterilmemesine rağmen inekte suppuratif olmayan ensefalitise rastlamıştır.

*Neospora caninum* izolasyonu için uygulanacak standart bir protokol tanımlanmamıştır (Dubey ve diğerleri, 2006). Genel olarak izolasyon için seropozitif bir hayvandan alınan örneklerin, etkenin gelişimi için uygun farelere inokule edilmesi (*in vivo* üreme) ve farelerden alınan örneklerin, uygun hücre kültürlerine ekilmesi (*in vitro* üreme) olarak özetlenebilir. Birçok çalışmada seropozitif hayvanın belirlenmesi prekolostral serum örneğine serolojik testlerin uygulanması ile yapılabilir. Seropozitiflik veren hayvanların beyin ve diğer doku örnekleri immunohistokimya (IHC) ve histopatolojik (HP) yönden incelenebilir ve etkenin varlığının kesin tespiti yapılabilir. Etken biyolojik çalışmada kullanılacak fareye inokule edilmeden önce dokularda kesin olarak varlığının tespiti gerekmektedir. Uygun bulunan materyaller tripsin içeren fizyolojik solusyonlar ile homojenize edilebilir. Daha sonra homojenat tuzlu fosfat solusyonu (PBS) ve antibiyotik-antimikotik solüsyonlar ile karıştırılır ve immunsupresif farelere inokule edilir. Etkeni alan farelere, serolojik testlerin yanı sıra IHC, HP ve PZR uygulamaları yapılabilir. Farenin beyin, peritonel sıvı gibi yapılarından alınan materyalden hazırlanan homojenatın hücre kültürüne ekimi yapılır (Campero ve diğerleri, 2015b). Birçok bilim insanı sığır dokusundan *N. caninum*’u geliştirmeye yönelik araştırmalarında VERO hücre kültürünü kullanmasına rağmen, belirlenmiş bir hücre kültürü referansı yoktur (Lei ve diğerleri, 2005) (**Tablo 4**).

**Tablo 4.** Sığırdan elde edilen *N. caninum* izolatları

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Tür** | **Kaynak** | **İzolasyon** | | | **Referans** |
| **Tripsin** | **Hücre Kültürü** | **Fare** |  |
| Avusturalya | NC-NOWRA | 7günlük buzağı | %0.05Tripsin 30 dak | VERO | KO | Miller ve diğerleri; 2002 |
| Brazilya | BCN/PR3 | Fetüs | %0.05Tripsin 30 dak | VERO | SW, gerbil | Locatelli-Dittrich ve diğerleri, 2004 |
| Brazilya | BNC-PR1 | 3 aylık buzağı | %0.05Tripsin 30 dak | VERO | - | Locatelli-Dittrich ve diğerleri, 2003 |
| İtalya | NC-PVI | 45 günlük buzağı | %0.25Tripsin 45 dak | VERO | - | Magnino vediğerleri,1999,2000 |
| İtalya | NC-PGI | 8 aylık buzağı | - | VERO | SW\* | Fioretti ve diğerleri,2000 |
| Japonya | JPA-1 | 14 günlük buzağı | %0.25Tripsin 45 dak | CPAE | Nude | Yamaneve diğerleri,1997 |
| Japonya | BT-3 | İnek | - | - | Nude | Sawada ve diğerleri,2000 |
| Kore | KBA-1 | 1 günlük buzağı | %0.25Tripsin 30 dak | VERO | - | Kim ve diğerleri, 1998a, 2000 |
| Kore | KBA-2 | Fetüs | %0.25Tripsin 30 dak | VERO | - | Kim ve diğerleri, 1998b, 2000 |
| Malezya | Nc-MalB1 | 1 günlük buzağı(ölü) | - | - | BALB/c | Cheah ve diğerleri,2004 |
| Yeni Zelanda | NcNZ 1 | İnek | %2 Tripsin 30 dak | VERO | - | Okeomave diğerleri,2004b |
| Yeni Zelanda | NcNZ 2 | 2 günlük buzağı | %2 Tripsin 30 dak | VERO | - | Okeoma ve diğerleri,2004b |
| Yeni Zelanda | NcNZ 3 | Ölü doğum | %2 Tripsin 30 dak | VERO | - | Okeoma ve diğerleri,2004b |
| Portekiz | NC-Porto1 | Fetüs | %2 Tripsin 60 dak | - | SW\*\* | Canada ve diğerleri, 2002a |
| İspanya | NC-SP-1 | Fetüs | %2 Tripsin 60 dak | - | SW\*\* | Canada ve diğerleri, 2004b |
| İsveç | NC-SweB1 | Ölü doğum | %0.25Tripsin 30 dak\*\*\* | VERO | - | Stenlund ve diğerleri, 1997 |
| Birleşik Krallık | NC-LivB1 | Ölü doğum | %0.5Tripsin 30 dak | VERO | - | Davison ve diğerleri, 1999b |
| Birleşik Krallık | NC-LivB2 | Fetüs | YB | YB | YB | Trees ve Williams, 2000 |
| A.B.D. | BPA-1 | Fetüs | %0.05Tripsin 60 dak | - | - | Conrad ve diğerleri, 1993a |
| A.B.D. | BPA-2 | Fetüs | %0.05Tripsin 60 dak | - | - | Conrad ve diğerleri, 1993a |
| A.B.D. | BPA-3 | 2 günlük buzağı | YB | CPAE | - | Marsh ve diğerleri, 1995 |
| A.B.D. | BPA-4 | 6 günlük buzağı | YB | CPAE | - | Marsh ve diğerleri, 1995 |
| A.B.D. | NC-Beef | Buzağı | YB | YB | YB | McAllister ve diğerleri, 1998, 2000 |
| A.B.D. | NC-Illinois | Buzağı | YB | YB | YB | Gondiim ve diğerleri, 2002 |

\* Swiss Webster, 2,5 mg metilprednisolon asetat.

\*\* Deksametazon 10 mg/ml.

\*\*\* %30 Percoll ile santirifuj edilmiştir.

YB: Yeterli bilgi mevcut değildir.

**2.8. Neosporosis’in Kontrolü**

*Neospora caninum*’unkontrolü için seçenekler yıllardır araştırılmakta ve tartışılmaktadır (Thurmond ve Hietala, 1995; Baillargeon ve diğerleri 2001; Nishikawa ve diğerleri 2002; Reichel ve Ellis, 2002, 2009; Dubey ve diğerleri, 2007). *N. caninum* için hali hazırda geliştirilmiş kesinliği bilinen bir tedavi yoktur. *Neospora caninum* ile ilişkili abortların kontrolünün sağlanmasında tek gerçekçi ve ekonomik yöntem sürü bazında aşılama uygulamaktadır (Reichel ve diğerleri, 2006). Neosporosise karşı geçmişte birçok aşı geliştirme çalışmaları yapılmıştır (Reichel ve diğerleri, 2009). İnaktive taşizoitleri temel alan ölü aşı çalışmaları yapılmış, fakat etkinliğine güvenilemediği için geniş çaplı bir kabul görmemiştir (Choromanski ve diğerleri, 2000; Romeo ve diğerleri, 2004). Gebelik öncesinde canlı taşizoit kullanılarak aşılamaların, ölü doğum ve abortlara karşı immun direnç sağlayabileceği düşünülmüştür (Miller ve diğerleri, 2005; Williams ve diğerleri, 2007). Bu immun direncin gama interferon (IFN) gibi hücresel bağışıklık mekanizması ile gerçekleştirilebileceği öngürülmüştür.

İnaktive aşıların (Neoguard™) yanı sıra *N. caninum* enfeksiyonlarına karşı korunma için daha ekonomik ve etki düzeyi yüksek olan canlı aşılar üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Williams ve diğerleri, 2007; Weber ve diğerleri, 2013). Neosporosis’in kontrolü için yapılan geçmiş dönem çalışmalarının ana konusu aşı geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Rojo-Montejo ve diğerleri, 2011). *Neospora caninum* antijenin sub-unit ve rekombinant olarak kullanılması (Moore ve diğerleri, 2011; Mansilla ve diğerleri, 2012, Hemphill ve diğerleri, 2013; Uchida ve diğerleri, 2013) ve doğal yolla attenüye edilmiş *N. caninum* izolatının canlı aşı olarak kullanılması ile sürülerde etkene bağlı abort riskinin azaltılması hedeflenmiştir (Williams ve diğerleri, 2007; Rojo-Montejo ve diğerleri, 2013; Weber ve diğerleri, 2013).

Wiliam ve diğerleri (2007) ile Weber ve diğerleri (2013), farklı yıllarda yaptıkları çalışmalar sonucunda *N. caninum*’un kontrolünde aşılamanın en etkili yöntem olduğunu gösterdiklerinden bu yana son beş yıldaki neosporosis enfeksiyonuna bağlı koruyucu önlemler aşı çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır (Williams ve diğerleri, 2007; Weber ve diğerleri, 2013). Aşılama dışında etken kontrolü endojen ve eksojen bulaşmayı önlemek üzerine olmuştur (Reichel ve diğerleri, 2013). Endojen bulaşmanın kontrolünde tohumlamaya ayrılan ineklerden sadece seronegatif olanların seçilmesi ya da damızlık değeri yüksek seropozitif ineklerin embriyo transferi ile gebe bırakılması uygulanmalıdır. Ayrıca abort şekillenen tüm inekler sürüden ayrılmalı ve teste tabi tutulmalıdır. Eksojen bulaşmada ise köpek dışkılarının yiyecek ve suyu kontamine etme riski minimum düzeyde tutulmalı ve fetüs ile atık yapmış ineklerin plasenta gibi yapılarının köpeklerle buluşması önlenmelidir (Reichel ve diğerleri, 2013). IBR (infectious bovine rhinotracheitis), BVD (bovine viral disease) ve miyotoksin daha önceden *N. caninum* ile enfekte olmuş sığırlarda immun suppresif etkiler göstererek parazitin vertikal bulaşması ve abort riskinin artışına sebep olabileceği hipotezi geliştirilmiştir (Lanyon ve diğerleri, 2014). VanLeeuwen ve diğerleri (2010) çalışmalarında sadece BVD nin kullanımında enfeksiyonun yokluğunda bile *N. caninum* enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir (VanLeeuwen ve diğerleri, 2010).

*In vitro* tarama ile hücre kültüründe *N. caninum* taşizoitlerine karşı etkili birkaç bileşiğin olduğu gözlenmiştir (Lindsay ve Dubey, 1989; Lindsay ve diğerleri, 1996, 1997). Deneysel olarak enfekte edilmiş farelere uygulanan sulfadiazinin birtakım etkileri olmuştur. Bir diğer olguda neosporosisli bir köpekte güçlendirilmiş sülfonamid ve klindamisin uygulamasının klinik neosporosis tedavisinde kullanılmıştır (Ruehlmann ve diğerleri 1995; Barber ve Trees, 1996; Reichel ve diğerleri, 1998, 2007). Toltrazuril ile intravenöz olarak *N. caninum* taşizoitleri ile enfekte hiperakut dönemdeki bir buzağıya uygulanmış ve tedavi edici olduğu bildirilmiştir (Kritzner ve diğerleri, 2002). Ancak birçok araştırmacı kullanılan etkenin bilinmeyen güvenlik profili ve ette kalıntı bırakması nedeniyle kullanımının yaygınlaştırılmasının zor olacağını düşünmüşlerdir (Reichel ve diğerleri, 2013). VanLeeuwen ve diğerleri, 2010 yılında Kanada genelinde 240 süt çiftliğinin risk faktörü analizini yapmışlar ve yem katkı maddesi olarak monensin alan ineklerin almayan ineklere göre *N. caninum* ile enfekte olmalarının 1,5 kat daha az (P <0.05) olası olduğunu bulmuşlardır **(**VanLeeuwen ve diğerleri, 2010a)

*Neospora caninum* ara konak olarak bulunduğu sığırlarda vertikal ve horizontal olarak bulaşmaktadır. Bazı sığırlar semptom vermeseler de gebelikte atıklara ya da yavrularına bulaştırarak *N. caninum* ile enfekte buzağıların doğmasına neden olmaktadırlar. Bu enfekte buzağılar semptom göstermeseler de enfekte olmayan buzağılarla karşılaştırıldıklarında iki kat daha fazla atık yapma ihtimallerinin olduğu gösterilmiştir (Dubey ve diğerleri, 2007). Bu çalışmada *N. caninum* sıklığının sanılandan daha fazla görüldüğüne ve ekonomik kayıplara neden olduğuna dikkat çekilmek istenmiştir. Özellikle ithal hayvan alımının sık yapıldığı bu dönemde ithal hayvanlarda ilk defa *N. caninum* sıklığı araştırılmış ve önlemek için yapılabilecekler ile son aşı çalışmaları gözden geçirilmiştir.

Neosporosis özellikle köpek ve sığırlarda olmak üzere birçok hayvan türünde görülen bulaşıcı protozoal bir hastalıktır. *Neospora* kaynaklı doğal enfeksiyonlarda meydana gelen kayıplar abort, düşük süt üretimi, zayıf buzağı doğumları, pedigriden gelen değerli genetik yapının yüksek oranda bozulması olarak sayılabilir. Hastalık sığırlarda önemli bir abort nedeni olarak literatüre geçmiştir. Etken hayvanlarda tekrarlayan enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Hastalığın kontrolü için en önemli yol, kesin tanı konulan hayvanların sürüden çıkartılmasıdır.

Damızlık ve süt sığırcılık işletmelerinde gözlenen abortlar gerek oluşturdukları ulusal ve/veya yerel düzeylerdeki ekonomik kayıplar gerek ülkemiz hayvancılığına menfi etkileri dolayısıyla ülke hayvancılığının geleceğini direkt olarak etkilemesi açısından önem arz etmektedir. Aborta neden olan etiyolojik ajan/ajanların ortaya konması sadece abortların gözlendiği sürülerin yönetimi ve korunması açısından değil aynı zamanda sürdürülebilir ve ekonomik getirisi olan bir yetiştiricilik için elzemdir. Yöremizde ve çevre illerimizdeki ithal damızlık sığır yetiştiriciliği yapan çiftliklerde gözlenen ve etiyolojisi tam olarak tespit edilememiş abort vakaları giderek artmıştır. Sığırcılık işletmelerindeki erişkin sığırlarda nadiren klinik belirti gösteren ve genelde asemptomatik seyredip, taşıyıcı hayvanlarca yeni nesillere aktarılan *N. caninum* kaynaklı neosporosis yaygınlığı hakkında elde edilecek her türlü veri bölgemiz sığır çiftliklerindeki abort salgınlarının yorumlanmasında sürü yönetimi açısından önemli bilgiler verecek ve işletmelerin ekonomik kayıplarını minimize etmede oluşturulacak planlamaların hazırlanmasına ciddi katkılar sağlayacaktır. İzmir ve yöresindeki ithal edilmiş sığır çifliklerinde daha önceden yapılmış sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bunun yanında, son yıllarda artan sığır itahalatı ile ithal edilmiş olan sığırlardaki neosporosis kaynaklı risklerin boyutları tam olarak bilinmemekte ve bu enfeksiyon ithalat sırasında göz önünde bulundurulmamaktadır. Ayrıca hastalığın bulaş yolları, klinik bulguları hastalığın kontrolü için yapılabileceklerin (özellikle abortların önlenmesi için geliştirilmiş yeni aşı çalışmaları) gözden geçirilmesi önemlidir.

Bu kapsamda, bu tez çalışmasında farklı işletmelerde, farklı ülkelerden gelen sığırlarda neosporosis yaygınlığının serolojik yöntemle tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda;

* İzmir yöresindeki ithal sığır barındıran damızlık işletmelerde neosporosis’in yaygınlığı nedir? [Farklı ülkelerden ithal edilmiş damızlık sığır barındırılan farklı işletmeler seçilecek ve bu işletmelerdeki sığırlardan kan örnekleri toplanarak serolojik olarak ELISA yöntemi ile *N. caninum* enfeksiyonun seroprevalansı araştırılacaktır]
* Elde edilen verilerin yapılacak olan istatistiksel analizleri ile hayvanların yaşı, ırkı ve menşei olduğu ülke ile seropozitiflik oranı arasındaki ilişki nedir?
* Enfeksiyonun seroprevalansının belirlenmesinde denenecek olan *N. caninum* SRS2 indirekt ELISA testi ile ticari ELISA kitlerinin etkinliği nedir?
* Neosporosis’in yerel (çiftlik) ve/veya ülke bazında kontrolü için alınabilecek önlemler nelerdir?

gibi sorulara cevap olabilecek verilere ulaşılması hedeflenmektedir. Elde edilcek veriler ile neosprososis yaygınlığı ortaya konularak hastalığa dikkat çekilmesi, oluşan ekonomik kayıpların önlenebilmesi için alınacak tedbirlerin ne denli gerekli olduğunun ortaya konulması açısından önemlidir.

**3. GEREÇ VE YÖNTEM**

**3.1. Çalışma Bölgeleri ve Kullanılacak Serum Örneklerinin Toplanması**

İzmir yöresinde yer alan damızlık sığır ithalatı yapan yedi ve Aydın ili Koçarlı ilçesinde damızlık sığır ithalatı yapan bir çiftlik olmak üzere, toplam sekiz çiftlikten sadece ithal hayvanların asgari %10’u olacak şekilde kan numuneleri toplanmıştır (**Tablo 5**). Tire ilçesinden dört farklı çiftlikten toplam 283, Menderes ilçesinden 68, Foça ilçesinden 75, Bayındır ilçesinden 87 ve Aydın ili Koçarlı ilçesinden 100 olmak üzere toplam 613 ithal sığır serum örneği alınmıştır. Bu çalışmada kullanılan örnekler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Aydın ADÜ-HADYEK) 2020 yılı I. Oturumda 64583101/2020/004 sayılı karara uygun olarak alınmıştır.

**Tablo 5.** Çalışmada kullanılan ithal sığırların lokalizasyon ve sayıları.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **İl/İlçe** | **Çitflik** | **Örnek Sayısı** | **Örneklem Tip** |
| İzmir/Tire | T1 | 85 | Dişi Sığır |
| İzmir/Tire | T2 | 65 | Dişi Sığır |
| İzmir/Menderes | M1 | 68 | Dişi Sığır |
| İzmir/Tire | T3 | 55 | Dişi Sığır |
| İzmir/Foça | F1 | 75 | Dişi Sığır |
| İzmir/Tire | T4 | 78 | Dişi Sığır |
| İzmir/Bayındır | B1 | 87 | Dişi Sığır |
| Aydın/Koçarlı | K1 | 100 | Dişi Sığır |

Kan numuneleri 10 ml’lik antikoagülansız serum tüplerine hayvanların *vena jugularis* ve/veya venacoccygea’larından alınarak taşıma kapları ile soğuk zincire dikkat edilerek Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına ulaştırılmıştır. Toplanan kan örnekleri laboratuvara getirildikten sonra oda ısısında bir süre bekletilmiş ve 1800 devirde 10 dakika santrifüj edilip kanın şekilli kısmından ayrılan serum örnekleri 1,5ml’lik ependorflara koyularak *N. caninum* türüne karşı ineklerde / düvelerde oluşan özgül antikor seviyeleri indirekt ELISA (SRS2 rekombinant antijeni ve ticari kit) ile belirleninceye kadar -20˚C’de muhafaza edilmiştir. Ayrıca *N. caninum* SRS2 indirekt ELISA testinde kullanılacak olan negatif (C-) ve pozitif (C+) referans kontrol serum örnekleri Dr. Frank Katzer tarafından *N. caninum* ile deneysel enfekte hayvanlardan elde edilerek (Moredun Araştırma Enstitüsü, Edinburgh, UK) ikili iş birliği kapsamında anabilim dalımıza gönderilmiş ve hali hazırda stoklarımızda yer almaktadır.

**3.2. *Neospora caninum* SRS2 İndirekt ELISA Testinde Kullanılacak Rekombinant Proteinin Ekpsreyonu**

*Neospora caninum* SRS2 indirekt ELISA testinde kullanılacak olan SRS2 rekombinant proteininin üretilmesi amacıyla kullanılan ve içerisinde klonlanmış halde *N. caninum* SRS2 proteinini kodlayan gen bölgesini ihtiva eden sentez vektörünün (pGEX™) yer aldığı *Escherichia coli* hücreleri Dr. Frank Katzer tarafından laboratuvarımıza ilgili proje kapsamında kullanılmak üzere gönderilmiştir. *Neospora caninum* SRS2 rekombinant proteininin üretilmesi amacıyla -80˚C’de saklanan gliserol stokları buz üzerine alınarak bir süre çözülmeye bırakıldıktan sonra steril öze kullanılarak alınan bir damla 20 ml LB medyum (içerisinde 100 mg/ml ampisilin ihtiva eden) içerisine ekilip 37˚C’lik çalkalamalı inkübatör içinde gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün üreyen hücrelerin miktarları spektrofotometrede OD600’de okutularak medyum içerisindeki hücre miktarı okuması OD600 = 0,6–1,0 değerine geldiğinde üreyen hücreler 1/20 oranında dilüye edilerek içerisinde 100 mg/ml ampisilin bulunan daha büyük hacimdeki (200 ml) LB medyum içerisine konulmuş ve hücreler OD600 değeri ~0.4’e yükselene kadar çalkalamalı etüvde 200 rpm’de üremeleri sağlanmıştır. Daha sonra hücreler %0,2 oranında L–arabinoz eklenerek hücrelerdeki plasmid vektördeki rekombinant protein sentezi indüklenerek hücreler 2–4 saat daha çalkalamalı etüvde inkübe edilmeye devam edilmiştir. Süre sonunda hücreler 14000 rpm’de 20 dakika boyunca +4˚C’de santrifüj edilmiş rekombinant proteinleri ihtiva eden hücreler dipte toplanmış ve üstteki süpernatant dökülerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Rekombinant SRS2 proteinlerinin purifikasyonu denatüre koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, dipte toplanan hücrelerin üzerine 8 ml GuHCl solüsyonu eklenerek pellet süspanse edilmiş ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalamalı rotorda inkübe edilerek hücre yüzeylerinin lize edilmesi ve ortamda rekombinant proteinleri degrade edebilecek proteaz gibi enzimlerin denature hale getirilmesi sağlanmıştır. Bu işlemden sonra hücreler buz üzerine konarak sonikatörde üç kez her siklus beş saniye olacak şekilde sonikasyona tabi tutularak hücre membranına bağlı halde bulunan rekombinant proteinler membrandan ayrılarak açığa çıkartılmıştır. Daha sonra sonike edilen hücreler 10000 rpm’de 20 dakika boyunca +4˚C’de santrifüj edilerek içerisinde sentezlenen rekombinant SRS2 proteinlerini barındıran üstteki sıvı temiz bir tüpe konulup buz üzerinde bekletilmiştir. Ortamda bulunan N terminal bölgesinde 6xHistidin ile işaretli (His-tag) rekombinant proteinlerin purifikasyonu için histidinleri bağlama özelliği bulunan Ni–agaroz taneleri içeren solüsyon kullanılmıştır. Bu amaçla Ni-agaroz tanelerini içeren solüsyondan iki ml alınarak 10 ml’lik kolonlar içerisine konularak tanelerin oda sıcaklığında kolonun dibinde toplanmaları sağlanmış ve takiben üstte toplanan sıvı kısım aspire edilerek kolondan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra taneler bir kez deionize su, iki kez de bağlanma solüsyonu ile yıkandıktan sonra buz üzerinde bekletilen ve içerisinde rekombinant SRS2 proteinlerini ihtiva eden sıvı içerisinde Ni–agaroz taneleri bulunan kolonlar içerisine eklenerek 6xHis ile işaretli (His-tag) rekombinant proteinlerin 30 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalamalı rotorda yavaşça inkübe edilerek agaroz tanelere bağlanmaları sağlanmıştır. Çalkalama işlemi tamamlandıktan sonra kolonlar dik konuma getirilerek rekombinant proteinlerin bağlandığı taneciklerin dibe çökmeleri sağlanmış ve daha sonra dipteki taneler sırası ile ikişer kez pH değerleri kademeli olarak azalan, 4’er ml bağlanma solüsyonu (pH 7,8), yıkama solüsyonu (pH 6,0) ve yıkama solüsyonu (pH 5,3) ile yıkanarak Ni–agaroz taneler üzerine bağlanmış olabilecek muhtemel non-spesifik proteinler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemini takiben, 6xHistidin işaretli rekombinant proteinlerin elüye edilmesi için kolon düşük pH değerine sahip 5 ml elüsyon solüsyonu (pH 4,0) ile bağlandıkları agarozdan ayrılarak alttaki tüplerde saf olarak toplanmıştır. Geriye kalan rekombinant proteinler SDS-PAGE ile değerlendirilinceye kadar -20˚C’de saklanmıştır. Pürifiye edilen rekombinant SRS2 proteinlerinin saflık dereceleri %12’lik poliakrilamid konsantrasyonuna sahip SDS-PAGE yöntemi ile, Laemmli (1970) tarafından belirtilen yönteme göre Biorad Protean II elektroforez sistemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan %12’lik ayrışma ile üst kısımdaki %5 konsantrasyonda istifleyici jel polimerizasyonlarını tamamladıktan sonra jel üzerine konulan 10 gözlü tarak yardımı ile oluşturulan gözlere sırası ile protein marker ve örnekler eklenmiş ve takiben proteinler 100 voltluk akımda iki saat boyunca elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez sonunda proteinler Commasie Blue G-250 ile boyanarak sentezlenen rekombinant proteinlerin saflık düzeyleri belirlenmiştir.

**3.3. *Neospora caninum* SRS2 İndirekt ELISA Testinde Kullanılacak Rekombinant Proteinin Miktarlarının Belirlenmesi**

*Neospora caninum* SRS2 indirekt ELISA testinde kullanılacak olan rekombinant proteinler elüye edilerek 1,5 ml’lik ependorf tüplerde toplanan saflaştırılmış proteinlerin miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Protein miktarları Smart™ BCA protein Assay Kit (INtRON Biotech Inc., USA) protokolünde belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Buna göre ilk önce, Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich®, USA) içeren sekiz farklı standart eppendorflarda hazırlanmıştır. Standartların final konsantrasyonları sırasıyla 2,000 µg/ml, 1,500 µg/ml, 1,000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml, 0 µg/ml (Blank) olacak şekilde kit içeriğinde bulunan stok BSA solüsyonu ve laboratuvarda hazırlanan steril PBS kullanılarak hazır hale getirilmiştir. Ardından kit içeriğinde yer alan Solüsyon A ve Solüsyon B kullanılarak hazırlanan Working Solution (WS) her bir örnek için 200 µl olacak şekilde hesaplanmış ve toplamda SolA (50) / SolB (1) oranında karıştırılarak WS hazırlanmıştır. Protein ölçümü yapılacak olan serum örnekleri ve hazırlanan BSA standartları iki tekrarlı olacak şekilde 25 µl hacimde kuyucuklara yüklenmiştir. Ayrıca standartlar ile örnekler arasına sekiz kuyucuk olacak şekilde 225 µl hacimde PBS eklenerek “blank-boş” sırası oluşturulmuştur. Bu işlemlerin ardından daha önce hazırlanan WS solüsyonundan 200 µl hacimde “blank” kuyuları haricinde kalan tüm kuyucuklara ilave edilmiş ve plate’in üzeri şeffaf ve steril yapışkan bir şeritle kapatılmıştır. Böylece toplamda örnek ve WS oranı kit protokolünde belirtildiği üzere (1:8) olacak şekilde hazır hale getirilmiştir. Hazırlanmış plate ELISA okuyucuda (MultiSkan Go, Thermo Fischer Scientific, USA) koyulmuş ve sırasıyla; 30 saniye çalkalama ardından 37℃’de 30 dakikalık inkubasyon, plate’in oda sıcaklığına getirilmesi için beş dakika bekleme adımı ve sonunda 562 nm dalga boyunda olacak şekilde absorbansların belirlenmesi işlemleri cihaz içinde gerçekleştirilmiştir.

Protein ölçümü sonrasında elde edilen absorbans değerlerinin doğruluk ve hassaslık durumlarını belirlemek için çıkan sonuçlar Excel programına aktarılmıştır. Standartların ve örneklerin absorbans değerleri blank kuyularının absorbans değerlerinden çıkarıldıktan sonra her ikisinin de ortalamaları elde edilmiştir. Elde edilen değerler tablo haline getirilmiş ve dağılım grafiği oluşturulmuştur. Dağılım grafiğinde ortaya çıkan eğilim çizgisi yapılandırılarak grafik üzerinde ana denklem belirlenmiş ve R2 değeri hesaplanmıştır. Oluşan denklemin doğruluğunu gösteren R2 değerinin ≈0,99 olmasına dikkat edilmiştir. Belirlenen absorbanslar denklem üzerine yerleştirilerek nihai protein ölçüm değeri olarak ortaya konulmuştur.

**3.4. İndirekt Enzim İşaretli İmmunosorbant (ELISA) Testi**

Deneysel enfekte ve saha serum örneklerinde SRS2 rekombinant proteinine karşı oluşan IgG seviyeleri indirekt ELISA yöntemi kullanılarak incelenmiştir. ELISA testinde konjugat olarak tavşanlarda üretilmiş, horse radish peroksidaz ile işaretli, anti-bovine IgG (Sigma; A6296) kullanılmıştır. Stok konjugat 50 µl’lik hacimlere bölünerek –20℃’de saklanmış ve çözdürüldüğünde kullanılıncaya kadar +4oC’de muhafaza edilmiştir. İndirekt ELISA testinde kullanılacak olan SRS2 rekombinant proteininin 96 gözlü plaklara bağlanması amacıyla 0.1M karbonat-bikarbonat tampon solüsyonu, pH 9.6 (Sigma) kullanılmıştır. Solüsyon karbonat-bikarbonat’ın bir kapsülünün 100 ml deiyonize su içerisinde çözdürülmesi ile taze olarak hazırlanmıştır. ELISA’da, yıkama solüsyonu olarak içerisinde %0,05 oranında polioksiksetilen sorbitan monolaurate (Tween 20, Sigma) ihtiva eden fosfat tampon tuz solüsyonu (PBS; 144mM Sodyum klorid, 1.47mM Potasyum dihidrojen orthofosfat, 8.1mM di-Sodyum hidrojen orthofosfat dodecahidrat, 2.68 mM Potasyum klorid, pH 7.4) kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon en fazla bir ay boyunca oda ısısında muhafaza edilmiştir. Bloklama solüsyonu olarak içerisinde %4 yağsız süt (Marvel) bulunan PBS / %0.05 Tween20 (PBS/T) kullanılmıştır. Testte kullanılan serum ve konjugatlar içerisinde %2 Marvel ihtiva eden PBS-T (içerisinde %0,05 oranında Tween 20 ihtive fosfat tampon tuz saline, pH 7.4) ile 1:200 oranında sulandırılarak gözlere ilava edilmiştir. İkincil antikor olarak kullanılan horse radish peroksidaz (HRP) ile işaretlenmiş anti–bovine IgG molekülü (Sigma) 1:2000 oranında PBS-T ile sulandırılarak kullanılmıştır. Oluşan antijen–antikor birleşmesinin belirlenmesi amacıyla taze olarak içerisinde sodyum perborat bulunan 10 ml fosfat–sitrat tampon solüsyonuna (100 ml deiyonize su içerisinde bir kapsül) 1 mg substrat/tabletin eritilmesi ile hazırlanmış 3, 3', 5, 5'–tetrametilbenzidin dihidroklorid (TMB, Sigma) substratı kullanılmıştır.

Rekombinant SRS2 antijeni kullanılarak uygulanacak olan indirekt ELISA testinin standardizasyonu amacıyla, SRS2 indirekt ELISA testinde kullanılacak olan antijen ve antikor dilüsyonlarının belirlenmesi için önce iki katlı (Örnek; 1/20, 1/40, .….…. , 1/3200) antijen dilüsyonları hazırlanarak, sabit dilüsyondaki serum örnekleri ile deneme testleri yapılarak kullanılacak olan antijenden en iyi sonuç alınan dilüsyon belirlenmiştir. Kullanılacak olan serumun optimal dilüsyonunun belirlenmesi amacıyla aynı işlem bu kez sabit antijen dilüsyonuna karşı yukarıdaki gibi iki katlı dilüye edilmiş serum örnekleri kullanılarak yapılacak olan ELISA testleri ile tayin edilmiştir. Yapılan tüm ELISA testlerin de kullanılacak olan konjugat dilüsyonu Dr. Frank Katzer tarfından önerilen oranda (1/2000) kullanılmıştır.

SRS2 İndirekt ELISA testinin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla Dr. Frank Katzer tarafından gönderilen pozitif ve negatif serum örnekleri kullanılmıştır. SRS2 indirekt ELISA protokolünün standardizasyonu amacıyla test edilen serum örneklerine ait optik dansite (OD) değerleri ilk olarak aşağıdaki formül kullanılarak yüzde pozitif (PP) değerine çevrilmiştir (Wright ve diğerleri 1993):

Medyan OD C++ değeri; en az üç pozitif kontrole (C++) ait OD değerlerine ait ortanca değeri ifade etmektedir. Optimize edilen SRS2 indirekt ELISA’da kullanılacak olan kesim (cut–off) noktası ise ikişer adet negatif ve pozitif serum örneklerine ait PP değerlerine ait ters yönlü kümülatif frekans dağılımları birbiri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu amaçla PP değerlerinin sıklık (frekans) değerleri ile kümülatif yüzdeleri belirlenmiş ve takibinde negatif kümülatif yüzde ve ters yönlü pozitif kümülatif yüzde dağılımları karşılaştırılarak her antijen için 0–100 arasındaki (1 PP aralığında) bir kesim noktası belirlenmiştir (Greiner ve ark 1995a, b).

Hasta hayvanların teşhisinde kullanılacak SRS2 rekombinant proteinine karşı oluşan IgG’lerin belirlenmesi amacıyla yapılan ELISA testi 96 gözlü polistiren mikro ELISA plakları (High binding plates, Greiner; 655061) kullanılarak yapılmıştır. Karbonat–bikarbonat solüsyonu içerisinde sulandırılarak hazırlanmış olan antijenden her göze 100 µl gelecek şekilde eklendikten sonra plak kaplayıcılar (ICN Biomedical) ile üzerleri kapatılmış ve plaklar mikroplate çalkalamalı inkübatörü içerisinde 30 saniye boyunca oda sıcaklığında nazikçe çalkalanmıştır. Daha sonra plaklar +4˚C’de gece boyunca bekletilmiş ve ertesi gün tüm gözler çok kanallı otomatik pipetler kullanılarak her göze 300 µl PBS-T solüsyonu gelecek şekilde üç defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra her plak gözüne oluşabilecek özgül olmayan bağlanmaların önüne geçmek amacıyla 300 µl bloklama solüsyonu (PBS-T + %4 süt tozu) konularak 37˚C’de bir saat boyunca mikroplate çalkalayıcısında inkübe edilmiştir. Bloklama işleminden sonra plaklar üç kez yıkanarak daha sonra plak gözlerine 100’er µl PBS-T+%2 Marvel içerisinde 1:200 oranında sulandırılarak hazırlanmış test edilecek serum örnekleri her plakta iki tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir.

Ayrıca her plağa ikişer adet pozitif serum (C+) ve negatif serum (C-) ile bir plak gözüne de PBS kontrol eklenmiştir. Daha sonra plakların üstleri kapatılarak 37˚C’de iki saat boyunca mikroplate çalkalayıcısında inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonu takiben plaklar tekrar PBS-T ile üç kez yukarıda anlatıldığı şekilde yıkanmıştır. Daha sonra her göze 100 µl horseradish peroksidaz ile işaretli 1: 2000 oranında dilüye substrat eklenerek 37˚C’de bir saat boyunca mikroplate çalkalayıcında inkübe edilmiştir. Takibinde, plaklar üç kez PBS-T ile yıkandıktan sonra her göze 50 µl TMB substratı eklenerek 5-15 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde bekletilerek renk oluşması sağlanmış ve en son enzimatik reaksiyonun durdurulması amacıyla her göze 50 µl 0.2M sulfirik asit eklenmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan renk ELISA plak okuyucusunda (Multiscan Go microplate reader, Thermo Scientific) 450 nm filtre kullanılarak absorbans değerleri (optik dansiteleri; OD) belirlenmiştir. Pozitif ve negatif kontrol serum örneklerinden elde edilen OD okumaları baz alınarak test edilen serum örneklerindeki antikor titreleri yani pozitiflik belirlenmiştir.

Bunun yanında saha serum örnekleri kullanılarak SRS2 indirekt ELISA ile elde edilen sonuçlar ve rekombinant SRS2 proteininin neosporosis seroprevalansının ELISA yöntemi ile belirlenmesindeki etkinliğinin karşılaştırmalı olarak tespiti amacıyla sahadan toplanan serum örneklerinde *N. caninum*’a karşı oluşan IgG seviyeleri indirekt ELISA yöntemi ile ticari ID SCREEN® *Neospora caninum* İndirekt ELISA kiti (ID. Vet, Fransa) kullanılarak üretici firma tarafından tarif edildiği şekilde incelenmiştir. Daha sonra her iki test ile elde edilecek olan sonuçlar arasındaki uyum kappa (κ) testi ile ölçülerek iki ELISA testinin etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Kısaca; ELISA kitinin içerisinden çıkan plaklar alınarak her kutucuğa çok kanallı mikropipetler yardımı ile 90 µl dilüsyon buffer 2 eklendi. Plakta yer alan iki kutucuğa pozitif ve iki kutucuğa da negatif kontrol olarak belirlenip 10 µl negatif kontrol ve 10 µl pozitif kontrol serum örnekleri eklendi ve geri kalan kutucuklara 10 µl serum örnekleri eklenmiştir. Serum örnekleri eklenmesinden sonra plateler 21˚C’de 45 ±4 dakika inhibe edilmiştir. Daha sonra yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkama işlemi için yıkama solüsyonu 180 ml distile suya kitte yer alan 20 ml yıkama solüsyon konsantrasyonu eklenerek hazırlanmıştır. Çok kanallı mikropipet yardımıyla 300 µl alınarak her bir plak göze eklenerek yıkama işlemi uygulanmıştır. Her yıkamadan sonra plak usülünce çalkalanarak kalan antijenlerin ve diğer bileşenlerin ayrılması sağlanmış ve daha sonra plak kâğıt havlular üzerine ters olarak kapatılarak içlerindeki fazlalık yıkama solüsyonlarından temizlenmiştir. Bu işlem üç kez tekrar edilmiştir. Yıkama işleminden konjugat dilüsyon buffer hazırlanmıştır. Protokole göre 10X’lik konjugat buffer’dan 1X dilüsyon hazırlanmış ve tüm kuyucuklara 100 µl eklenmiştir. Konjugat dilüsyon buffer eklenmesinden sonra plateler 21˚C’de 30 ±3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra yukarıda belirtildiği gibi yine üç kez yıkama işlemi uygulanmış ve son yıkama işleminden sonra her kutucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklenerek 21 ºC’de 15 ±2 dakika inhibe edilmiştir. Daha sonra her kutucuğa 100 µl durdurma (stop) solüsyonu eklenmiş ve ELISA plakları 450 nm’de ELISA (MultiSkan Go, Thermo Fischer Scientific, USA) cihazında ölçümleri yapılmıştır.

Bu çalışmada testin geçerli olması için pozitif kontrol OD (ODPC) değerinin 0,35’den büyük olması ve pozitif kontrol değerinin negatif kontrol değerine bölümünden sonucun 3’den büyük olması gerekmektedir. Test sonucunun hesaplanması; serum örneğinden negatif kontrolden çıkartılması, pozitif kontrolden negatif kontrolün çıkartılması ve bu iki sonucun bölünmesi test protokolünde belirtildiği gibi düzeltilerek gerçek % değer test kitinde belirtildiği şekilde aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır;

*Neospora caninum* ticari test kitinin prosedürüne göre; %40’dan küçük değerler negatif, %40-50 arası değerler şüpheli ve %50’nin üzerindeki değerler ise pozitif olarak değerlendirilmiştir.

**3.5. İstatistiksel İnceleme**

*Neospora caninum* SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA kiti ile pozitiflik tespit edilen örnekler ırk, yaş, bölge ve menşei yönlerinden istatistiksel olarak ki – kare testi kullanılarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir (SPSS 22.00, software program). P değeri 0,05'ten düşük olduğunda, gözlemlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir. Bunun yanında iki farklı ELISA testinin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla kappa (κ) uyum testi uygulanacak ve κ <0 iki test arasında hiçbir uyum olmadığını, gösterirken, 0,81 ile 0,99 arasındaki bir κ değeri neredeyse mükemmel uyumu, 0,41 ile 0,60 arasındaki bir κ değeri ise orta düzeyde uyum olduğunu gösterecektir (Viera ve Garrett, 2005; MacHugh, 2012).

**3.6. SRS2 İndirekt ELISA Testinde Kullanılan Reaktiflerin Dilüsyonları ve Kesim (cut-off) Noktasının Belirlenmesi**

**3.6.1.** **ELISA Testinin Standardizasyonu**

ELISA testinde kullanılacak olan antijen, antikor ve konjugat oranlarının belirlenmesi amacıyla ilk aşamada iki katlı (Örnek; 1/10, 1/20, … 1/1280) hazırlanan antijen dilüsyonları sabit dilüsyondaki serum örneği ve konjugat ile denenerek kullanılacak olan antijenin en iyi sonuç verdiği dilüsyon belirlenmiştir. ELISA testinde yüksek pozitif serum (C++), düşük pozitif serum (C+), yüksek negatif serum (C--) ve düşük negatif serum (C-) eklenmiştir. ELISA testinde kullanılacak olan negatif (C-), düşük pozitif (C+) ve yüksek pozitif (C++)’lik gösteren referans kontrol serum örnekleri Dr. Frank Katzer tarafından gönderilen pozitif (yüksek pozitif) ve negatif (yüksek negatif) serum örnekleri ve Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından pozitif (düşük pozitif) raporlanmış ve hastalıktan ari bir hayvandan (düşük negatif) elde edilen serumlar kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan ELISA okuması ve akabinde yapılan hesaplamalar sonucunda yüksek pozitif ile düşük pozitif ve yüksek negatif ile düşük negatif sonuçlar arasındaki fark değerlendirilerek en iyi rekombinant antijen dilüsyonun 1/20 olduğu görülmüştür. Yine aynı şekilde serumun optimal dilüsyonunun belirlenmesi amacıyla aynı işlem bu kez sabit antijen dilüsyonuna karşı 1/10 ve 1/20 şeklinde dilüye edilmiş serum örnekleri ve iki katlı (1/50, 1/100…1/400) dilüye edilmiş konjugat kullanılmıştır. ELISA okuması ve akabinde yapılan hesaplamalar sonucunda yüksek pozitif ile düşük pozitif ve yüksek negatif ile düşük negatif sonuçlar arasındaki fark değerlendirilerek optimal serum dilüsyonu 1/200 olarak tayin edilmiştir. Konjugat oranının belirlenmesi amacıyla sabit antijen dilüsyonuna karşı 1/10 ve 1/20 oranlarında dilüye edilmiş serum örnekleri ve iki katlı (1/1000, 1/2000, …. , 1/8000) şeklinde dilüye edilmiş konjugat kullanılmıştır. ELISA okuması ve akabinde hesaplamalar sonucunda pozitif ve negatif sonuçlar yorumlandığında konjugat dilüsyonu (HRPO işaretli antibovine IgG) oranının 1/2000 olarak karar kılınmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, SRS2 rekombinant proteini ile yapılan indirekt ELISA testinde kullanılan *Neospora*’ya ait SRS2 rekombinant antijen, referans serum titrasyonları ve konjugat dilüsyonu **Tablo 6**’de verilmiştir.

SRS2 indirekt ELISA testinin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla Dr. Frank Katzer tarafından gönderilen pozitif ve negatif serum örnekleri kullanılmıştır. SRS2 indirekt ELISA protokolünün standardizasyonu amacıyla test edilen serum örneklerine ait optik dansite (OD) değerleri ilk olarak yüzde pozitif (PP) değerine çevrilmiştir (Wright ve diğerleri, 1993).

**Tablo 6.** Standardize edilmiş SRS2 İndirekt ELISA’da kullanılan optimal antijen ve serum dilüsyonları.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Antijen ismi** | **Rekombinant antijen dilüsyonu** | **Serum dilüsyonu** | **Konjugat dilüsyonu**  **(HRPO işaretli antibovine IgG)** |
| SRS2 | 1/20 | 1/200 | 1/2000 |

Medyan OD C++ değeri; en az üç pozitif kontrole (C++) ait OD değerlerine ait ortanca değeri ifade etmektedir. Optimize edilen SRS2 indirekt ELISA’da kullanılacak olan kesim (cut–off) noktası ise bilinen negatif ve pozitif serum örneklerine ait PP değerlerine ait ters yönlü kümülatif frekans dağılımları birbiri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu amaçla PP değerlerinin sıklık (frekans) değerleri ile kümülatif yüzdeleri belirlenmiş ve takibinde negatif kümülatif yüzde ve ters yönlü pozitif kümülatif yüzde dağılımları karşılaştırılarak her antijen için 0–100 arasındaki (1 PP aralığında) bir kesim noktası belirlenmiştir (Greiner ve diğerleri, 1995a,b).

SRS2 indirekt ELISA’da kullanılan pozitif ve negatif serumların frekans dağılımları birbirlerinden oldukça farklılık göstermiştir (**Şekil 3**). Negatif serum örneklerinin de kendi içerisinde birbirlerinden oldukça bağımsız bir dağılıma sahip olduğu gözlenmiştir. SRS2 indirekt ELISA’nın kesim noktasının belirlenmesi amacıyla pozitif ve negatif serum örneklerine ait sırasıyla ters yönlü pozitif kümülatif yüzde ve negatif kümülatif yüzde dağılımları karşılaştırılmıştır (**Şekil 4**). Ancak yapılan yüzde dağılımlarında uygun bir kesim noktasının belirlenmesi mümkün olamamıştır. Bu sebeple saha örneklerinin değerlendirilmesi her plak için ayrı ayrı yapılmıştır. Bu amaçla, her plaktaki bilinen pozitif ve negatif serum örneklerinin ortanca PP değerleri ve standart sapma değerleri belirlenmiştir. Daha sonra pozitif ve negatif serum örneklerine ait ortanca PP değerlerinin orta noktası belirlenerek bu değerin üzerinde kalan örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

**Şekil 3.** *Neospora* SRS2 indirekt ELISA’da kullanılan pozitif ve negatif serumların frekans dağılımları.

**Şekil 4.** *Neospora* ELISA’da kullanılan SRS2 rekombinant proteinine ait TG–ROC analiz sonuçları.

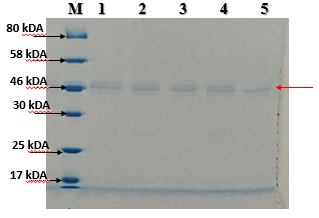
**4. BULGULAR**

**4.1.** ***Neospora caninum* SRS2 İndirekt ELISA Testinde Kullanılmak Amacıyla Üretilen Rekombinant Protein**

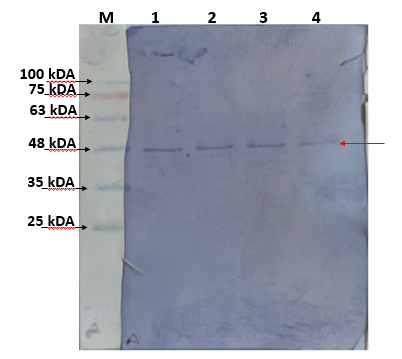
SRS2 indirekt ELISA testinde kullanılacak olan 6xHistidin proteini ile işaretli (His-tag) *Neospora caninum* SRS2 rekombinant proteinleri histidinleri bağlama özelliği bulunan Ni–agaroz yönetemiyle (HisPur™ Ni-NTA Thermo Scientific™) denatüre koşullar altında pürifiye edilmiştir. Elde edilen elüsyonlardaki protein miktarları Smart™ BCA protein Assay Kit (INtRON Biotech Inc., ABD) protokolünde belirtildiği şekilde ELISA okuyucuda (ThermoFisher Scientific Multiskan™ Go) ölçülerek belirlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda elüsyonlardaki protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standard protein dilüsyon dağılımlarını gösteren grafik **Şekil 5**’teverilmiştir. Buna göre, hazırlanan standard dilüsyonlarının çizgisel bir dağılım gösterdiği yani standart dilüsyonların hazırlanması aşamasında oluşabilecek muhtemel pipetleme hatasının asgari düzeyde olduğu ve buna elde edilen SRS2 elüsyonlarındaki protein miktarlarının en az sapma ile belirlendiği görülmektedir.

Pürifikasyon sanrasında, ELISA’da kullanılacak olan SRS2 rekombinant proteinlerine ait farklı elüsyonların protein miktarları miligram / mililitre cinsinden **Tablo 7**’da verilmiştir. Pürifiye edilen rekombinant SRS2 proteinlerin saflık dereceleri %12’lik poliakrilamid konsantrasyonuna sahip SDS-PAGE yöntemi ile Laemmli (1970), tarafından belirtilen yönteme göre Biorad Protean II elektroforez sistemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Elektroforez sonunda proteinler Commasie Blue G-250 ile boyanarak sentezlenen rekombinant proteinlerin saflık düzeyleri belirlenmiştir. Commasie Blue G-250 ile boyalı SDS-PAGE incelendiğinde rekombinant proteinlerin L-arabinoz ile başarıli bir şekilde indüklendiği ve elde edilen elüsyonların gerek saflık derecelerinin gerekse de miktarlarının oldukça iyi olduğunu göstermiştir (**Resim 3**). Pürifiye edilen rekombinant SRS2 proteininin immunojenitesi Towbin ve diğerleri, (1990) tarafından belirtildiği şekilde yapılan western blotlama yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla yapılan western blotlama sonucunda elde edilen sonuçlar bize sentezlenen rekombinant proteinin enfekte sığır immun serumları ile oldukça iyi reaksiyon vererek immunojen olduklarını (**Resim 4**) ve ileride yapılması planlanan ELISA testlerinde başarı ile kullanılabileceğini göstermiştir.

**Şekil 5.** Ölçümü yapılan elüsyonlardaki protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standard protein dilüsyon dağılımlarını gösteren grafik.

****

**Resim 3**. SRS2 rekombinant proteinin elüsyonlarının Commasie Blue G-250 ile boyalı SDS-PAGE jel elektroforezi görüntüsü. M; 7-175 kDa arasında boyanmış protein belirteçleri (New England Biolabs®, İngiltere), 1-5; ~46 kDa ağırlığındaki saflaştrırılmış SRS2 rekombinant proteinler elüsyonları.



**Resim 4.** Pürifiye rekombinant SRS2 protein elüsyonlarının immunojenitelerinin belirlenmesi amacıyla deneysel enfekte hayvanlardan elde edilmiş pozitif serum örneği kullanılarak yapılan western blot sonucu. M; 11- 245 kDa arasında BLUeye prestained protein belirteçleri (GeneDireX, ABD), 1-5; rekombinat protein elüsyonlarının Neo ve (+) serum ile incelenmesi. Kırmızı ok işareti ile belirtilen bantlar ~46 kDa ağırlığındaki saflaştrırılmış SRS2 rekombinant proteinlerini göstermektedir.

**Tablo 7.** ELISA’da kullanılan *Neospora* SRS2 rekombinant proteinine ait ELISA ölçümleri

|  |  |
| --- | --- |
| **Örnek** | **Protein Miktarı (mg/ml)** |
| Elüsyon 1 | 0,28 |
| Elüsyon 2 | 0,28 |
| Elüsyon 3 | 0,28 |
| Elüsyon 4 | 0,28 |
| Elüsyon 5 | 0,28 |
| Elüsyon 6 | 0,28 |
| Elüsyon 7 | 0,28 |
| Elüsyon 8 | 0,28 |
| Elüsyon 9 | 0,28 |
| Elüsyon 10 | 0,28 |
| Elüsyon 11 | 0,28 |
| Elüsyon 12 | 0,28 |
| Elüsyon 13 | 0,28 |
| Elüsyon 14 | 0,28 |
| Elüsyon 15 | 0,28 |
| Elüsyon 16 | 0,28 |
| Elüsyon 17 | 0,28 |
| Elüsyon 18 | 0,28 |
| Elüsyon 19 | 0,28 |

**4.2. Saha Serum Örneklerinin SRS2 ve Ticari ELISA Testi Sonuçları**

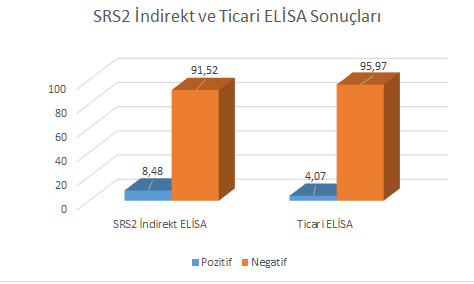
Çalışma kapsamında İzmir yöresinde yer alan damızlık sığır ithalatı yapan yedi ve Aydın ili Koçarlı ilçesinde damızlık sığır ithalatı yapan bir olmak üzere toplam sekiz adet çiftlikten toplanan ithal sığır serum örnekleri *N. caninum*’a karşı mevcut olabilecek antikor varlığı yönünden SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA kiti kullanılarak iki farklı ELISA testi ile incelenmiştir. Serum örneklerinin toplandığı çiftlikler, yerleşim yerleri ve her bir çiftlikten toplanan örneklerin çiftlikteki hayvan sayılarının temsil yüzdeleri **Tablo 8**’de verilmiştir.

**Tablo 8.** Örnek alınan çiftlik, toplanan örneklerin çiftlikteki hayvan sayılarını temsil yüzdeleri ve ELISA sonuçları.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Toplanan Örnekler** | | | | **SRS2 indirekt ELISA (%)** | | **Ticari ELISA (%)** | | |
| **İl ve ilçeler** | **Çiftlik** | **Örnek Sayısı** | **Yüzdesi (%)** | **Pozitif** | **Negatif** | **Pozitif** | **Negatif** | **Şüpheli** |
| **İzmir** | | | | 43(%8,4) | 470 (%91,6) | 15 (%2,9) | 495 (%96,4) | 3 (%0.6) |
| Tire\* | T1 | 85 | 13,86 | 8 (%9,4) | 77 (%90,5) | 0 | 85 | 0 |
| T2 | 65 | 10,60 | 5 (%7,7) | 60 (%92,3) | 2 (%3,1) | 63 (%96,9) | 0 |
| T3 | 55 | 8,97 | 2 (%3,6) | 53 (%96,3) | 9 (%16,4) | 43 (%78,2) | 3 (%5,4) |
| T4 | 78 | 12,74 | 20\*(%25,6) | 58 (%74,3) | 0 | 78 (%100) | 0 |
| Menderes | M1 | 68 | 11,09 | 0 | 68(%100) | 0 | 68 (%100) | 0 |
| Foça | F1 | 75 | 12,23 | 2 (%2,7) | 73 (%97,3) | 1 (%1,3) | 74 (%98,6) | 0 |
| Bayındır | B1 | 87 | 14,19 | 6 (%6,9) | 81 (%93,1) | 3 (%3,4) | 84 (%96,5) | 0 |
| **Aydın** | | | | 9 (%9) | 91(%91) | 10\*(%10) | 87 (%87) | 3 (%3) |
| Koçarlı | K1 | 100 | 16,31 | 9 (%9) | 91(%91) | 10 (%10) | 87 (%87) |  |
| **Genel Toplam** | | 613 |  | 52 (%8,5) | 561 (91,5) | 25 (%4,1) | 582 (%95) | 6 (%0.9) |

*(\*); ki – kare testi kullanılarak yapılan istatistik analizi sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı bulunan (p<0.05) bölgeleri/illeri belirtmektedir.*

Aydın ve İzmir illerinden toplanan toplam 613 serum örneğinin SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELİSA yöntemleriyle incelenmesi sonucunda belirlenen pozitif ve negatif örneklerin dağılımı **Şekil 6**’te gösterilmiştir. Buna göre, Aydın ve İzmir illerinden toplanan toplam 613 serum örneğinin SRS2 indirekt ELISA yöntemiyle incelenmesi sonucunda 52 örnekte pozitiflik (%8,5) belirlenmiştir. İzmir ilinden toplanan toplam 513 serum örneğinin %8,4’ü (43/513) pozitif sonuç verirken, Aydın ilinden toplanan 100 serum örneğinde ise pozitifliğin %9 (9/100) oranında olduğu saptanmıştır (**Tablo 8**). Aydın ve İzmir illeri birbiri ile karşılaştırıldığında iki il arasında belirlenen seroprevalans arasında istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenememiştir (p=0.839). İlçeler arasında en fazla pozitif örneğe (%12,4; 35/283) Tire ilçesinde yer alan dört farklı çiftlikten toplanan serum örneklerinde rastlanmıştır (p=0.004). Bunu, %9 ile Koçarlı, %6,9 ile Bayındır ve %2,7 ile Foça ilçeleri izlemiştir. Tire ilçesinde yer alan çiftlikler kendi içerisinde karşılaştırıldığında pozitif örnekler sırasıyla T4 (n=20), T1 (n=8), T2 (n=5) ve T3 (n=2) çitliklerinden toplanan örneklerde rastlanmıştır. Yapılan analizlerde Tire ilçesindeki çiftlikler kendi içerisinde incelendiğinde T4 kodlu çiftlikte belirlenen en yüksek seropozitiflik diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir (p=0,001). Tire ilçesindeki çiftliklerin tamamı (T1, T2, T3, T4) damızlık süt işletmesi olup, tüm işletmelerde ithal hayvanlar bulunmaktadır. Çiftliklerden T1 çiftliği Avusturya’dan, T2 çiftliği Slovakya’dan, T3 ve T4 çiflikleri Almanya’dan damızlık sığır ithalı yapılmış sığırlar barındırmaktadır.



**Şekil 6.** SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA sonuçlarının yüzde dağılım grafiği.

SRS2 indirekt ELISA yöntemiyle incelenmesi sonucu pozitif olduğu belirlenen toplam 52 pozitif örneğin (%8,5) sığır ırkları arasındaki pozitiflik oranları **Tablo 9**’da verilmiştir. Buna göre, örnek toplanan 422 Holstein ırkı (Holstein siyah alaca; Holstein-S.A., Holstein kırmızı alaca; Holstein-K.A. ve Holstein siyah alaca melezi; Holstein-S.A.M.) hayvanda %9 oranında (38/422) pozitiflik belirlenirken, bunların 34’ü Holstein-SA ırkı hayvanlarda, 4’ü ise Holstein-K.A. ırkı hayvanlarda belirlenmiştir. Bunun yanında incelenen 191 Simental ırkı sığır (Simental ve Simental melezi; Simental M.) serumunda bu oran %7,3’e (14/191) gerilemiş ve sadece Simental ırkında pozitiflik belirlenirken, Simental M. ırkı hayvanlarda herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Yapılan analizlerde ırklara göre pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.073).

**Tablo 9.** Irklara göre saha serum örneklerinin SRS2 İndirekt ELISA ve ticari ELISA testi sonuçları.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Irk** | **Toplam** | **SRS2 indirekt ELISA (%)** | | **Ticari ELISA (%)** | | |
| **Pozitif** | **Negatif** | **Pozitif** | **Negatif** | **Süpheli** |
| Holstein | | 38 (%9) | 384(%91) | 22 (%5,2) | 394(%93,3) | 6(%1,4) |
| Holstein-S.A. | 357(%58,2) | 34 (%9,5) | 323(%90,5) | 17 (%4,8) | 336(%94,1) | 4(%1,1) |
| Holstein-K.A. | 62(%10,1) | 4 (%6,5) | 58(%93,5) | 5 (%8,1) | 55(%88,7) | 2(%3,2) |
| Holstein-S.A. M. | 3(%0,4) | 0 | 3(%100) | 0 | 3(%100) | 0 |
| Simental | | 14 (%7,3) | 177(%92,7) | 3 (%1,6) | 188(%98,4) | 0 |
| Simental | 122(%19,9) | 14 (%11,4) | 108(%88,6) | 3 (%2,4) | 119(%97,6) | 0 |
| Simental M. | 69(%11,25) | 0 | 69(%100) | 0 | 69(%100) | 0 |
| Genel Toplam | 613 | 52 (%8,5) | 561(%91,5) | 25(%4,1) | 582(%95) | 6(%0,9) |

Çalışmada SRS2 İndirekt ELISA yöntemi kullanılarak test edilen örneklerde seropozitiflik toplam 52 örneğin toplandığı inek ve/veya düvelere göre pozitiflik oranları **Tablo 10**’da verilmiştir. Buna göre, örnek toplanan 25 düvenin hepsi negatif iken, 588 inekten toplanan örnekler arasında %8,8 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Belirlenen seropozitiflik inek ve düveler arasında gözlenen pozitiflik oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,120).

**Tablo 10.** Hayvan dönemlerine göre saha serum örneklerinin SRS2 İndirekt ELISA ve ticari ELISA testi pozitiflik oranları.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Hayvan Dönem** | **Toplam** | **SRS2 indirekt ELISA (%)** | | **Ticari ELISA (%)** | | |
| **Pozitif** | **Negatif** | **Pozitif** | **Negatif** | **Şüpheli** |
| İnek | 588(%96) | 52 (%8.8) | 536(%91,2) | 23 (%3.9) | 559(%95,1) | 6(%1) |
| Düve | 25(%4) | 0 | 25(%100) | 2(%8) | 23(%92) | 0 |
| Genel Toplam | 613 | 52(%8,5) | 561(%91,5) | 25(%4,1) | 582(%95) | 6(%0,9) |

SRS2 indirekt ELISA yöntemiyle incelenmesi sonucu pozitif olduğu belirlenen toplam 52 pozitif örneğin (%8,5) serum toplanan sığırların menşeilerine göre pozitiflik oranları Tablo 11’de verilmiştir. Buna göre, Hollanda ve Macaristan’dan ithal edilen hayvanlarda herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Bunun yanında, pozitiflik belirlenen sığırların, 34’ü (%8,6) Almanya’dan, 13’ü (%10,7) Avusturya’dan, 5’i (%7,7) ise Slovakya’dan ithal edilen hayvanlar olduğu saptanmıştır. Menşeilere göre pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.458).

**Tablo 11.** Menşeilerine göre saha serum örneklerinin SRS2 İndirekt ELISA ve ticari ELISA testi pozitiflik oranları**.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Menşei** | **Toplam** | **SRS2 indirekt ELISA (%)** | | **Ticari ELISA (%)** | | |
| Pozitif | Negatif | Pozitif | Negatif | Şüpheli |
| Almanya | 397(%64,7) | 34 (%8,6) | 363(%91,4) | 20 (%5) | 371(%93,4) | 6(%1,5) |
| Avusturya | 121(%19,7) | 13 (%10,7) | 108(%89,3) | 3 (%2,5) | 118(%97,5) | 0 |
| Hollanda | 17(%2,8) | 0 | 17(%100) | 0 | 17(%100) | 0 |
| Slovakya | 65(%10,7) | 5 (%7,7) | 60(%92,3) | 2 (%3) | 63(%97) | 0 |
| Macaristan | 13(%2,1) | 0 | 13(%100) | 0 | 13(%100) | 0 |
| Genel Toplam | 613 | 52(%8,5) | 561(%91,5) | 25(%4,1) | 582(%95) | 6(%0,9) |

Aydın ve İzmir illerinden toplanan 613 serum örneğinin ticari ELISA kiti kullanılarak yapılan inceleneme sonucunda %4,1 oranında seropozitiflik belirlemiştir (**Şekil 6**). İzmir ilinden toplanan toplam 513 serum örneğinin %2,9’u (15/513) tanesi pozitif sonuç verirken, Aydın ilinden toplanan 100 serum örneğinde ise pozitifliğin %10 (10/100) oranında olduğu saptanmıştır (**Tablo 8)**. Bunun yanında, *N. caninum* ticari test kitinin prosedürüne göre; %40’tan küçük değerler negatif, %40-50 arası değerler şüpheli ve %50’ın üzerindeki değerler ise pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ticari ELISA kiti kullanılarak yapılan inceleme sonucunda Aydın ve İzmir illerinden toplanan üçer adet toplam altı örnekte (%0,9) elde edilen sonuçlar doğrultusunda ilgili örneklerde şüpheli sonuç elde edilmiştir. İzmir ili Tire ilçesindeki T3 çifltliğinden toplanan 55 örneğin üçü (%5,4) ile Aydın ili Koçarlı ilçesindeki K1 çiftliğinden toplanan 100 örnekten üçü (%3) şüpheli olarak saptanmıştır (**Tablo 8**). Aydın ve İzmir illleri birbiri ile karşılaştırıldığında iki il arasında belirlenen seropozitiflik arasında istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmiş (p=0.000) ve Aydın’dan toplanan %10 oranında pozitiflik tespit edilirken İzmir’de %2,9 oranında pozitiflik tespit edilmiştir.

İlçeler arasında en fazla pozitif örneğe Koçarlı ilçesinde (%10; 10/100) rastlanmış, bunu %3,9 ile Tire, %3,4 ile Bayındır ve %1,3 ile Foça ilçeleri izlemiştir. Tire ilçesinde yer alan dört farklı çiftlikten toplanan serum örnekleri kendi içerisinde karşılaştırıldığında pozitif örneklere sırasıyla T3 (n=9) ve T2 (n=2) çitliklerinden toplanan örneklerde rastlanmıştır. Koçarlı ve Tire’de belirgin yüksek pozitiflik oranları saptanmış olmasına rağmen ilçeler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenememiştir (p=0.09).

Ticari ELISA kiti kullanılarak yapılan inceleme sonucu pozitif olduğu belirlenen toplam 25 örneğin (%4,1) sığır ırkları arasındaki pozitiflik oranları **Tablo 9**’da verilmiştir. Buna göre, örnek toplanan 422 Holstein ırkı (Holstein siyah alaca; Holstein-SA, Holstein kırmızı alaca; Holstein-KA ve Holstein siyah alaca melezi; Holstein-SA M) hayvanda %5,2 oranında (22/422) pozitiflik belirlenirken, bunların 17’si Holstein-SA ırkı hayvanlarda, 5 tanesi ise Holstein-KA ırkı hayvanlarda belirlenmiştir. Bunun yanında incelenen 191 Simental ırkı sığırlar (Simental ve Simental melezi; Simental M) serumda bu oran %1,6’e (3/191) gerilemiş ve sadece Simental ırkında pozitiflik belirlenirken, Simental M ırkı hayvanlarda herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Yapılan analizlerde ırklara göre pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.142).

Tticari ELISA kiti kullanılarak test edilen toplam 25 örneğin inek ve/veya düvelere göre pozitiflik oranları **Tablo 10**’da verilmiştir. Buna göre, 25 düvenin sadece iki tanesi pozitif iken, 588 inekten toplanan örnekler arasında %3,9 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. İnek ve düveler arasında gözlenen pozitiflik oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,137).

Ticari ELISA kitiyle pozitif olarak saptanan örneklerin menşeilerine göre pozitiflik oranları **Tablo 11**’de verilmiştir. Buna göre, Hollanda ve Macaristan’dan ithal edilen hayvanlarda herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Bunun yanında, pozitiflik belirlenen sığırların, 20’si (%5,3) Almanya’dan, 3’ü (%2,5) Avusturya’dan, 2’si (%3) ise Slovakya’dan ithal edilen hayvanlar olduğu saptanmıştır. Menşeilere göre pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.582).

SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA kiti ile test edilen örneklerden elde edilen sonuçlardaki uyumun belirlemesi amacıyla kappa (κ) uyum testi yapılmış ve iki testin karşılaştırılmasını gösteren veriler **Tablo 12**’de verilmiştir. Buna göre, ticari ELISA kiti ile negatif olan toplam 47 örnek SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile pozitif olarak tespit edilirken, ticari ELISA kiti ile pozitif olan toplam 22 örnek de SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile negatif olarak belirlemiştir. SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile belirlenen 47 pozitif örneğin, ikisi İzmir ili Foça ilçesindeki F1 çiftliğinden, sekizi İzmir ili Tire ilçesindeki T1 çiftliğinden, 20’si Tire ilçesindeki T4 çiftliğinden, beşer tanesi sırasıyla Tire ilçesindeki T2 ve Bayındır ilçesindeki B1 çiftliklerinden, son olarakta yedisinin Aydın ili Koçarlı ilçesindeki K1 çiftliğinden alınan numunelerde tespit edilmiş olup, bu numuneler ticari ELISA kiti ile negatif sonuç vermiştir. Bunun yanında, ticari ELISA kiti ile pozitif olarak tespit edilen 22 örnek incelediğimizde, bunlardan bir tanesinin İzmir ili Foça ilçesindeki F1 çiftliğinden, iki tanesinin Tire ilçesindeki T2 çiftliğinden, iki örneğin Bayındır ilçesindeki B1 çiftliğinden, sekiz tanesinin Tire ilçesindeki T3 çiftliğinden ve dokuz örneğin de Aydın ili Koçarlı ilçesindeki K1 çiftliğinden alınan numuneler olup, bu örnekler SRS2 indirek ELISA yöntemi ile negatif sonuç vermiştir. Ticari ELISA kitinin prosedürüne göre %40-50 arası değerlerde şüpheli olarak değerlendirilen altı örnekten üçü Aydın ili Koçarlı ilçesindeki K1 çiftliğinde ve kalan üçü ise İzmir ili Tire ilçesi T3 çiftliklerinden olduğu belirlenmiştir. Ticari ELISA kiti ile şüpheli olduğu değerlendirilen iki örnek SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile pozitif olarak sonuç verirken, geriye kalan diğer dört şüpheli örneğin SRS2 indirekt ELISA kitiylede negatif olduğu tespit edilmiştir.

Bunun yanında hem ticari ELISA kiti hem de SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile sadece üç örnekte pozitiflik tespit edilebilmiştir. Bu örneklerin; İzmir ili Tire ilçesinde bulunan T3 çiftliğinde Almanya menşeili sığırdan, Aydın ili Koçarlı ilçesinde bulunan K1 çiftliğinden alınan Almanya menşeili sığırdan ve İzmir ili Bayındır ilçesinde B1 çiftliğinde Avusturya menşeili sığırdan alınan numunlerin oldukları görülmüştür.

Kappa (κ) uyum testi sonucunda elde edilen 0.41 ile 0.60 arasındaki kappa değeri (κ = 0.042) iki test arasında orta düzeyde uyum olduğunu göstermiştir (Viera ve Garrett, 2005; MacHugh, 2012).

**Tablo 12**.SRS2 indirekt ELISA ve ticari ELISA kiti ile elde edilen sonuçların karşılatırılması

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kullanılan test** | | **SRS2 indirek ELISA** | | **Toplam** | **Kappa uyum testi** |
| Negatif | Pozitif | κ değeri |
| **Ticari ELISA kiti** | Negatif | 535 | 47 | 582 | 0.042 |
| Pozitif | 22 | 3 | 25 |
| Şüpheli | 4 | 2 | 6 |
| **Toplam** | | 561 | 52 | 613 |

**5. TARTIŞMA**

*Neospora caninum* kaynaklı neosporosis başta köpek ve sığırlar olmak üzere birçok hayvan türünde görülen bulaşıcı protozoal bir hastalıktır (Dubey, 1999a; Dubey, 1999b). *Neospora caninum* dünya çapında özellikle sığırlarda abortların ve kongenital bozuklukların başlıca sebeplerinden biridir (McAllister ve diğerleri, 1998). Sığırlarda transplasental enfeksiyon parazit için önemli bir bulaşma kaynağı olmakla beraber, asıl bulaşma son konak olan köpek dışkıları ile atılan ookistlerin oral yolla alınması ile şekillenmektedir (McAllister ve diğerleri, 1998). Neosporosis kaynaklı ekonomik kayıpları kantitatif olarak ölçmek oldukça zor olup, örneğin; Avusturalya’da süt endüstirisi *Neospora* enfeksiyonlarına yılda yaklaşık 85 milyon AUD doları harcamaktadır (Trees ve diğerleri, 1999). *Neospora* kaynaklı doğal enfeksiyonlardan meydana gelen kayıplar abort, düşük süt üretimi, zayıf buzağı doğumları, pedigriden gelen değerli genetik yapının yüksek oranda bozulması kaynaklıdır (Dubey ve diğerleri; 2007).

Neosporosis’in etkilerine bakıldığında; kongenital enfekte buzağılar klinik semptom göstermeyip sürü içerisinde enfeksiyon kaynağı olarak kalabilmekte ve etken bazı hayvanlarda tekrarlayan enfeksiyonlara da neden olabilmekte iken, enfekte doğan düvelerin ilerleyen dönemlerde gebe kaldıklarında atık yapma ihtimalinin etken ile karşılaşmamış hayvanlara göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Dubey ve diğerleri; 2007). Neosporosis’in tanısı; atık fetüs ve plasentanın histolojik incelemeleri ve enfekte hayvanların serumlarında *Neospora*’ya özgü antikorların IFAT ve/veya ELISA gibi yöntemler kullanılarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Latham ve diğerleri, 2003). *Neospora caninum* ile ilişkili abortların kontrolünün sağlanmasında tek gerçekçi ve ekonomik yöntem sürü bazında aşılama uygulanmasıdır (Reichel ve diğerleri, 2006).

Gerek çalışmanın yapıldığı Ege bölgesinde gerekse de bölgeye komşu illerde ithal damızlık sığır yetiştiriciliği yapan çiftliklerde gözlenen ve etiyolojisi tam olarak tespit edilememiş abort vakaları giderek artmaktadır. İzmir ve yöresindeki ithal edilmiş sığırların yetiştirildiği çiftliklerde neosporosis’in yaygınlığı ile ilgili olarak çalışma bulunmamakta olup, ithal hayvanlarda neosporosis kaynaklı abortlar daha önce Kars ilinde araştırılmıştır (Mor, 2012). Bunun yanında, son yıllarda artan sığır ithalatı ile farklı ülkelerden getirilen sığırlardaki neosporosis kaynaklı risklerin boyutları tam olarak bilinmemekte ve bu enfeksiyondan ari belgesi ithalat sırasında ön koşul olarak aranmadığından tedarikçiler ve T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından neosporosis göz ardı edilmektedir. Ayrıca hastalığın bulaş yolları, klinik bulguları ile kontrolü ve özellikle oluşan abort kaynaklı ekonomik kayıpların önlenmesi için uygulanacak protokollerin oluşturularak hayata geçirilmesi oldukça önemlidir.

*Neospora caninum* birçok hayvan türünü ara konak olarak kullanma yeteneğine sahip olan zorunlu hücre içi bir parazit olup (Dubey ve diğerleri, 1993), parazitin hücre içerisine girmesinde rol alan farklı yüzey proteinleri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar bu yüzey proteinlerinden *N. caninum* surface antigen 1 (NcSAG1) ve *N. caninum* SAG1-related sequence 2’nin (NcSRS2) adezyon ve invazyon sürecinde daha fazla rol aldığını göstermiştir (Hemphill ve diğerleri, 1996). Ayrıca NcSAG1 veya NcSRS2’ye karşı geliştirilen monoklonal antikorların *N. caninum*’un konak hücrelerine invazyonunu engelleyebileceği de gösterilmiştir (Nishikawa ve diğerleri, 2000). *Neospora caninum* ile enfekte sığır T-lenfosit hücre düzeyleri rekombinant taşizoit yüzey proteini olan NcSRS2 ile uyarıldığında hızlıca çoğalarak interferon gama (IFN-γ) üretmektedir. Ancak, NcSAG1 yüzey proteini ile yapılan denemelerde IFN-γ da artış gözlenmemiştir (Staska ve diğerleri, 2005). NcSRS2-lipopeptitleri tarafından indüklenen bağışık yanıt, yani periferik monoklonal kan hücrelerinde (PBMC) T-lenfosit proliferasyonu ve PBMC tarafından IFN-γ salgılanması, önceki çalışmalarda canlı *N. caninum* enfeksiyonu esnasında indüklenen bağışık yanıta benzerlik göstermektedir (Lopez-Gatius ve diğerleri, 2007; Staska ve diğerleri, 2005; Williams ve diğerleri, 2007).

Neosporosis kaynaklı enfeksiyonlarda hayvanlarda oluşan antikor yanıtın tespitine dayalı serolojik testlerden biri olan ELISA testinde farklı antijenler kullanılmaktadır (Sinnott ve diğerleri, 2017). Bunlar arasında yer alan immünodominant yüzey antijenlerine dayalı serolojik testler gerek tekrarlanabilir ve gerekse de kullanılan antijenin rekombinant olarak üretilebilir olması yönleriyle total hücre lizatı temelli antijen karışımlarına dayalı testlere göre özgüllük açısından üstünlük sağlamaktadır (Nishikawa ve diğerleri, 2001c). İmmunodominant yüzey antijeni olan NcSRS2 kullanılarak yapılan ELISA testleri de oldukça özgül ve hassas serolojik tanı yöntemi olarak hastalığın yaygınlığının belirlenmesi amacıyla yapılacak çalışmalarda oldukça faydalı sonuçlar vereceği bildirilmiştir (Nishikawa ve diğerleri, 2001c). Parazitin konağa adezyonu ve invazyonunda etkin rol alması ve IFN-γ salınımını arttırması gibi nedenlerden dolayı bu tez çalışmasında ithal sığırlardan toplanan serum örneklerinde *N. caninum*’a karşı oluşan antikorların belirlenmesi amacıyla rekombinant SRS2 indirekt ELISA tabanlı tanı yönteminin geliştirilerek etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

ELISA testinin optimizasyonunda yüksek affiniteli serum örneklerinin kullanılması testin duyarlılığını etkileyebildiğinden dolayı testin optimizasyonunda kullanılacak serum örneklerinin seçimi ve miktarı önem taşımaktadır. Serolojik testlerde temel nokta tanıda kullanılan cut–off değerinin belirlenmesidir (Vizard ve diğerleri, 1990). Güvenilir bir cut–off noktasına sahip olan testler saha şartlarında ve/ veya deneysel serumlar ile enfekte olan ve olmayan hayvanların ayırımında kullanılabilir olmalıdır (Mboloi ve diğerleri, 1999; Vizard ve diğerleri, 1990). Optimize edilen SRS2 indirekt ELISA’da kullanılacak olan kesim (cut–off) noktasının belirlenmesi amacıyla yapılan yüzde dağılımlarında uygun bir kesim noktasının belirlenmesi mümkün olamamıştır. Bu sebeple saha örneklerinin değerlendirilmesi her plak için ayrı ayrı yapılmıştır. İndirekt ELISA yönteminde, cut-off değerlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılacak olan örnek büyüklüğü beklenmeyen değişkenliklerin önlenebilmesi için yeterli sayıda ve kullanılan referans serum örnekleri hedef populasyonu temsil edebilecek sayıda olmalıdır (Metz, 1998; Greiner ve diğerleri 1995). Tanısal amaçlı kullanılan testin duyarlılık ve özgüllüğünü etkileyebilecek birçok farklı faktörü dengeleyebilmek için en az 300 bilinen pozitif ve 1000 bilinen negatif örnek kullanılması önerilmektedir (Jacobson, 1996). Ancak, bu proje kapsamında geliştirilmesi planlanan ELISA testinde kullanılacak yeterli sayıda bilinen serum örneği (pozitif ve negatif) temin edilemediğinden tespit edilen cut-off değerleri güvenilir bulunmamış ve bunun yerine örneklerin değerlendirilmesi her plak için ayrı ayrı olacak şekilde standart sapma ve ortanca değerler göz önüne alınarak yapılmıştır.

Genel olarak sığırlarda *N. caninum* enfeksiyonunun teşhisi için enfeksiyona yakalanan hayvanlardaki *N. caninum*'a özgü oluşanantikor düzeylerini serolojik yöntemler kullanılarak tespit edildiği yöntemler tercih edilmektedir (Dubey ve Schares, 2006). Bununla birlikte, kullanılan yöntemlerle elde edilen sonuçlar referans laboratuvarlarca elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında bazı tutarsızlıklar ile karşılaşılabilmektedir (Aguado-Martínez ve diğerleri, 2006). Genellikle kontrol programlarında, neosporosis’in tespitine yönelik serolojik testler kullanılmakta ve bu gibi kontrol programlarında doğrulanmış/kabul görmüş ticari ELISA kitleri ile çalışılması gerekliliğine dikkat çekmişlerdir (Aguado-Martínez ve diğerleri, 2006). Ticari olarak mevcut ELISA testleri, son birkaç yılda önemli ölçüde değişim göstermiştir (Aguado-Martínez ve diğerleri, 2006). Kanada’da yapılan bir çalışmada; iki ticari ELISA kiti karşılaştırılmış ve iki testin de eşit derecede iyi çalıştığı ve iki testin performansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gösterilmiştir (Wu ve diğerleri, 2022). İran’da yapılan başka bir çalışmada indirekt ELISA yöntemi kullanılarak sığır ve mandalarda farklı rekombinant Ncgra7 fragmentleri kullanılarak enfeksiyonun tespiti incelenmiştir (Hossein ve diğerleri, 2015). Mısır’da neosporosisin develer üzerinde oluşturuduğu risk faktörleri ticari ELISA kiti kullanılarak incelenmiştir (Selim ve diğerleri, 2020). Bu projede kullanılan ticari ID SCREEN® *Neospora caninum* indirekELISA kiti de (ID. Vet, Fransa), yüksek düzeyde uyum ile yüksek duyarlılık ve özgünlük (>%95) göstermektedir (Alvarez-García ve diğerleri, 2013). Toplanan serum örneklerinin incelenmesinde ticari ELISA kitinde belirtilen protokoller herhangi bir değişlik yapılmadan kullanılmıştır ve sonuçlar 450 nm’de spektrofotometrede (MultiSkan Go, Thermo Fischer Scientific, USA) okunarak protokolde belirtilen formüller (Alvarez-García ve diğerleri, 2013) kullanılarak pozitif, negatif veya şüpheli olarak değerlendirilmiştir. ID SCREEN® *Neospora caninum* indirek ticari test kitinin prosedürüne göre verilen formül ile yapılan hesaplamalar sonucunda %40’dan küçük değerler negatif, %40-50 arası değerler şüpheli ve %50’ın üzerindeki değerler ise pozitif olarak değerlendirilmektedir. Bu durum bize, in-house ELISA testi sonucunda muhtemelen enfeksiyona özel antikor düzeyleri belli bir seviyenin altında olan hayvanlarda testin şüpheli sonuç verebildiğini göstermektedir. Bu proje kapsamında, ticari ELISA kiti ile yapılan incelemeler sonucunda şüpheli olarak değerlendirilen altı örnek, pozitif ve negatif olarak değerlendirilen sonuçların yanında ayrı bir kategori altına alınarak değerlendirilmiştir.

Türkiye geneline hayvan varlığı açısından bakıldığında dünya ortalamasının üzerinde olduğu ancak buna karşın verim yönünden incelendiğinde yeterli seviyede olamadığı anlaşılmaktadır. Süt veriminin yanında ülkedeki et açığını kapatmak ve kırmızı et arzı oluşturabilmek için etçi ve kombine ırka ait damızlık hayvan sayısının arttırılması gerekmektedir. Ekonomik olarak incelendiğinde aynı kilogram yem verilerek elde edilecek süt miktarı ve günlük canlı ağırlık artışı ancak hedef ırka ait işletmelerde istenilen sonucu verecektir. İzmir yöresinde, yöredeki damızlık hayvan açığını kapatmak, yetiştiricilik yönüne göre (sütçü, etçi, kombine) mevcut hayvanlardan daha verimli hayvan popülasyonunun sayısını arttırmak, belli başlı hastalıklardan (brusellosis, tüberkülosis gibi) ari hayvanlardan oluşan yüksek verimli sürüler oluşturabilmek için yetiştiriciler T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı’nın izni ve gerekli gördüğü hallerde yurt dışından damızlık canlı hayvan ithalatı yapmaktadırlar. İzmir yöresinde damızlık hayvan ithalatı 2016 yılından bu yana devam etmektedir. Yıllara göre İzmir yöresine giriş yapan damızlık hayvan sayısı incelendiğinde; 2015 yılında 3042 adet, 2016 yılında 3847 adet, 2017 yılında 3412 adet, 2018 yılında 3252 adet, 2019 yılında 1262 adet ve 2020 yılında 1989 adet ve 2021 yılında 2174 adet büyükbaş olduğu görülmektedir (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, İzmir İl Müdürlüğü 2021 yılı verileri). İzmir yöresi hayvan popülasyonu, süt sığırcılığı ve besi hayvancılığı yönünden ülkenin önde gelen yörelerindendir. Modern çiftlik sayısının fazla olmasının yanı sıra ithalat ile gelen damızlık hayvan sayısı da oldukça fazladır. Hayvancılık yönünden ileriye yatırım yapma potansiyeli yüksek bir yöre olması ve ithal hayvan girişinin fazla olması bugüne kadar kamu otoriteleri tarafından göz ardı edilmiş olan neosporosis gibi bazı protozoal hastalıkların ithalat yoluyla ülkemize girmesinde bu yörenin önemini attırmaktadır. Aynı zamanda, daha önceki yıllarda İzmir yöresinde ithal damızlık sığırlarda *N. caninum* etkeninin varlığı ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

İzmir ili için özellikle Tire ilçesi, hayvan varlığının çok yüksek olduğu ve bunun yanında hayvan örgütlerinin (birlik, kooperatif) bulunduğu, bu suretle hayvan ithalatının daha kolay ve uygulanabilir olduğu bir yöredir. Tire ilçesi için 2015 yılından 2021 yılına kadar yapılan hayvan ithalatına bakıldığında 3489 adet olduğu bilinmektedir. Foça ilçesine yine 2015-2021 yılları arası yapılan hayvan ithalatına bakıldığında 2427 adet sığır olduğu, Menderes ilçesine bakıldığında ise 2114 adet, İzmir ili Bayındır ilçesine 2015-2021 tarihleri arası 1209 adet damızlık sığır ithalatı yapıldığı anlaşılmaktadır (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, İzmir İl Müdürlüğü 2021 yılı verileri). Her dört ilçede de seçilen çiftliklerde belli bir düzeyde biyo-güvenlik önlemi bulunmakta, veteriner hekimlik hizmetleri ya sorumlu veteriner hekim bulundurarak ya da düzenli olarak işletme dışından hizmet alarak giderilmektedirler. Aydın ilinde bulunan Koçarlı ilçesinden ise, ithal hayvan sayısının fazla olduğu ve yine biyo-güvenlik önlemlerine dikkat eden bir çiftlik seçilmiştir. Belirlenen çiftliklerin tamamı herhangi bir klinik (abort, ölüm doğum, kongenital bozukluklar) şikâyeti olmayan, sadece ithal hayvan girişinin yapıldığı çiftliklerdir.

*Neospora caninum* seroprevalanslarının sığır ırkına göre farklılık gösterdiğine dair birçok ülkede yapılmış çalışmalar mevcuttur (Bartels ve diğerleri, 2006). Ancak ırklara göre seropozitiflik oranlarındaki değişkenliğin, hastalığa karşı ırk predispozisyonundan ziyade değişik ırklar için kullanılan üretim sistemlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmaktadır (Dubey ve diğerleri, 2007). İspanya’da yapılmış bir çalışmada, yerli İspanyol ırklarının seropozitif olma olasılığının Holstein Friesian, Rubia Gallega veya melez ırklardan daha az olduğu bulunmuş, ancak bunun ırk farklılığına bağlı olmadığı yerli ırkların ağırlıklı olarak çok düşük yemleme kapasitesine sahip yüksek meralarda bulunduğu için sürü besleme yönetimindeki farklılıklar ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Bartels ve diğerleri, 2006). Çorum ili Oğuzlar yöresinde yapılmış bir çalışmada, seropozitif olarak tespit edilen iki örneğin Simental ırkı sığır olmasının nedeninin, alınan örneklerin büyük bir kısmınn (%58) Simental ırkına ait hayvanlardan olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür (Kula ve Gökpınar, 2021). Burdur yöresinde yapılan Holstein, Montofon, Simental ırkı ve melez ırklar odaklı çalışmada; Holstein ırkı sığırların seropozitifliği %5,7, Montofon ırkı sığırların seropozitifliği %5,1, Simental ırkı sığırların seropozitifliği %3,6, melez ırkların seropozitifliği %4,5 olarak tespit edilmiş ve yapılan istatiksel incelemede ırklar arasında anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Köse ve diğeleri, 2021)

Bu proje kapsamında yapılan analizler, SRS2 indirekt ELISA yöntemiyle incelenmesi sonucu pozitif olduğu belirlenen toplam 52 pozitif örneğin (%8,5) sığır ırkları arasındaki pozitiflik oranları Tablo 9’da verilmiştir. Buna göre, örnek toplanan 422 Holstein ırkı (Holstein siyah alaca; Holstein-S.A., Holstein kırmızı alaca; Holstein-K.A. ve Holstein siyah alaca melezi; Holstein-S.A.M.) hayvanda %9 oranında (38/422) pozitiflik belirlenirken, bunların 34’ü Holstein-SA ırkı hayvanlarda, 4 dört tanesi ise Holstein-KA ırkı hayvanlarda belirlenmiştir. Bunun yanında incelenen 191 Simental ırkı sığırlar (Simental ve Simental melezi; Simental M.) serumda bu oran %7,3’e (14/191) gerilemiş ve sadece Simental ırkında pozitiflik belirlenirken, Simental M ırkı hayvanlarda herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Yapılan analizlerde ırklara göre pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.073).

Ticari ELISA kiti kullanılarak yapılan incelenme sonucu pozitif olduğu belirlenen toplam 25 pozitif örneğin (%4,1) sığır ırkları arasındaki pozitiflik oranları **Tablo 9**’da verilmiştir. Buna göre, örnek toplanan 422 Holstein ırkı (Holstein siyah alaca; Holstein-S. A, Holstein kırmızı alaca; Holstein-K.A. ve Holstein siyah alaca melezi; Holstein-S.A. M.) hayvanda %5,2 oranında (22/422) pozitiflik belirlenirken, bunların 17 tanesi Holstein-S.A. ırkı hayvanlarda, beş tanesi ise Holstein-K.A. ırkı hayvanlarda belirlenmiştir. Bunun yanında incelenen 191 Simental ırkı sığırlar (Simental ve Simental melezi; Simental M) serumda bu oran %1,6’e (3/191) gerilemiş ve sadece Simental ırkında pozitiflik belirlenirken, Simental M ırkı hayvanlarda herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Yapılan analizlerde ırklara göre pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.142). Kullanılan her iki yöntemde de ırklara göre istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanmamıştır. Kan numunesi toplanan tüm çiftlikler beslenme tipi olarak benzer olup kapalı sistem besleme yapılmaktadır. Hastalığın sığır ırklarına göre farklılık gösterdiği daha önceki çalışmalara bakıldığında ırkların farklılığından ziyade bakım-besleme koşulları, besleme tipi, işletme yönetimi gibi faktörlerin ön planda olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca yapılan bu tez çalışmasında, ithal olarak yurt dışından getirilen Simental ırkı sığırlar (Simental ve Simental melezi; Simental M.) ve Holstein ırkı sığırlardan (Holstein siyah alaca; Holstein-S.A., Holstein kırmızı alaca; Holstein-K.A. ve Holstein siyah alaca melezi; Holstein-S.A.M.) olmak üzere kısıtlı sayıda farklı sığır ırklarından kan numunesi alınmış olup ülkedeki yerli ırklar çalışmaya dahil edilmediği için sığır ırkları arasında anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Seropozitiflik oranlarıyla yaş arasındaki ilişkinin incelendiği birçok çalışmada yaş ile *N. caninum* seropozitifliği arasındaki ilişkili ile ilgili farklı sonuçlar mevcuttur. *Neospora caninum*’un horizontal geçiş oranının yüksek olduğu besi ve süt sığırlarında seropozitif olma riski yaş veya gebelik sayısıyla orantılı olarak artış gösterebilmektedir (Dyer ve diğerleri, 2000; Jensen ve diğerleri, 1999; Rinaldi ve diğerleri, 2005; Sanderson ve diğerleri, 2000). İspanya'da yapılmış bir çalışmada seropozitif olma riskinin yaşla birlikte artarken, İsveç'te yapılmış başka bir çalışmada azaldığı gösterilmiştir (Bartels ve diğerleri, 2006). Düve ve ineklerin buzağılara göre *N. caninum*’a karşı yaş ile birlikte horizontal olarak bulaşma riskinin artacağı düşünülerek daha yüksek seroprevalans göstermişlerdir (Rinaldi ve diğerleri, 2005). Erzurum’da yapılmış bir araştırmada, bir yaşlı (%13.04), 1-3 yaş arası (%9.43) ve 3 yaştan büyük (%10.67) sığırlarda seropozitiflik oranları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olduğu bildirilmiştir (Balkaya ve diğerleri, 2012). Peru’da 219 sütçü sığırla yapılan çalışmada 102 (%46,6) hayvan pozitif olarak tespit edilmiş, bu hayvanların iki (%10) tanesi 15-24 aylık iken, 24 (%26,1) tanesi 2-4 yaşında, 76 (%71) tanesi ise beş yaşından büyük olduğu anlaşılmaktadır (Marcos ve diğerleri, 2019). Türkiye’de Afyonkarahisar ilinde iki yaşından küçük ve iki yaşından büyük sığırlarda yapılan bir çalışmada anlamlı bir sonuç çıkmamış ve yaşın hastalık üzerinde bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Çelik ve diğerleri, 2013). Burdur yöresinde yapılan bir çalışmada seroprevalans iki ile dört yaş arasındaki sığırlarda %7,7, iki yaşından küçük sığırlarda %6,4, ve dört yaşından büyük sığırlarda %4,2 olarak tespit edilmiştir (Köse ve diğerleri, 2021). Bu projede kan numunesi toplanan sığırların tümü damızlık sığır, düve ya da ilk doğumlarını yapan inekler olması ve üç yaş altında olmaları nedeni ile yaş ile hastalık arasında bir bağlantı kurulamamıştır. Bu durumu incelemek için geniş bir yaş aralığında benzer ortamlardaki (beslenme yönü) sığırlarda çalışılması gerekmektedir

İnek ve düvede *N. caninum* seroprevalansının incelendiği çalışmalarda *N. caninum* nedenli abortların ineklere göre düvelerde fazla olduğu saptanmıştır (Thurmond ve diğerleri, 1997). Arjantin’de 2011-2015 yılları arasında düve ve inekler üzerinde yapılan bir çalışmada *N. caninum* enfeksiyonu tespit edilen bir işletmede etken için alınan koruyucu önlem ve koruma stratejileri sonrasında düvelerde *N. caninum* seroprevalansı ve *N. caninum*’a bağlı abort sayısında ineklere kıyasla gözle görülür bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir (Horacio ve diğerleri, 2019). Dört yaşından büyük inekler ve düvelerin seroprevalansının incelendiği bir çalışmalda 48 düveden 14 (%29,2) tanesi pozitifken, 171 adet ineğin 88 (%51,5) tanesi pozitif saptanmış ve ineklerin düvelere göre daha fazla *N. caninum* antikoruna sahip olduğu belirtilmiştir (Marcos ve diğerleri, 2019). Burdur yöresinde abort yapan, infertil, gebe ve sağlıklı sığırlarda Neosporosisin seroprevalansı üzerine yapılan bir çalışmada sırasıyla %16,3, %6,9, %6,3, %2,4 gibi sonuçlar elde edilmiş ve yapılan istatiksel inceleme de abort yapan sığır ile sağlıklı sığırlar arasında anlamlı bir sonuç elde edilmiştir (Köse ve diğerleri, 2021). SRS2 indirekt ELISA yöntemi kullanılarak test edilen örneklerde seropozitiflik toplam 52 örneğin toplandığı inek ve/veya düvelere göre pozitiflik oranları **Tablo 10**’da verilmiştir. Buna göre, örnek toplanan 25 düvenin tamamı negatif iken, 588 inekten toplanan örneklerde %8,8 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Belirlenen seropozitiflik inek ve düveler arasında gözlenen pozitiflik oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,120). Ticari ELISA yöntemi kullanılarak test edilen örneklerde seropozitiflik toplam 25 örneğin toplandığı inek ve/veya düvelere göre pozitiflik oranları **Tablo 10**’da verilmiştir. Buna göre, örnek toplanan 25 düvenin sadece iki tanesi pozitif iken, 588 inekten toplanan örnekler arasında %3,9 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (**Tablo 10**). Belirlenen seropozitiflik inek ve düveler arasında gözlenen pozitiflik oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,137). SRS2 indirekt ELISA yöntemi kullanılarak test edilen örneklerde seropozitiflik saptanmazken, ticari ELISA yöntemi kullanılarak test edilen örneklerde yalnızca iki adet seropozitif sığır saptanmış ve anlamlı farklılık bulunmamıştır. Ülkemize ithalatı yapılan damızlık sığırların yüksek bir çoğunluğu gebe düve olarak tercih edilmekte ve ilk doğumları ülkemizde gerçekleşmektedir. Süt verimi yüksek inek ırklarında *N. caninum*’a bağlı abortların görülmesi laktasyon döneminde yüksek süt verimine bağlı strese girmesi ve buna eşlik eden gebeliğin 2. döneminde bağışıklık sisteminin aşağı yönlü regüle olmasının bu duruma yol açabileceği bildirilmiştir (Haddad ve diğerleri, 2005). Bunun yanında Kaliforniya’da sütçü ırkın olduğu bir sürüde kongenital enfekte bir düvenin riski seronegatif bir düveye göre yedi kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Thurmond ve diğerleri, 1997). Bu çalışmayı oluşturan düve ve ineklerin benzer çiftliklerden ithal edilmiş olmaları, çalışmaya dahil edilen düve sayısının inek sayısına göre çok daha az olması anlamlı bir farkın çıkmasını engellemiş olabilir ve her iki yöntemde de benzer sonuçlara ulaşılması inek-düve kıyaslamasında anlamlı farklılık olmadığını göstermiştir.

Türkiye’ye ithal hayvan girişinin serbest olduğu dönemlerde Orta Avrupa, Batı Avrupa, Güney Amerika gibi dünyanın farklı coğrafyalarından sığır girişi olduğu bilinmektedir. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığının ilgili yönetmeliklei gereği (17.12.2011 tarih ve 28145 sayılı gereği T.C. Resmî Gazete) ithal hayvanlar ülkemize girişte bir dizi teste tabii tutulmakta ancak bu testlerin içinde *N. caninum’un* neden olduğu neosporosisbulunmamakta dolayısıyla hastalığın kontrolü ve varlığı ülkemize hayvan girişi esnasında saptanamamaktadır. İthalatın fazla yapıldığı bölgelerden Güney Amerika’da hastalık %3,9-97,2 gibi değişken oranlarda saptanırken, Avrupa’da %0,7 – %65 arasında oranlarda bildirilmiştir (Asmare ve diğerleri, 2013; Bártová, 2015; Dubey ve diğerleri, 2011; Dubey ve diğerleri, 2007; İbrahim ve diğerleri, 2012; Kamga-Waladjo ve diğerleri, 2010; Klun ve diğerleri, 2019; Kuruca ve diğerleri, 2013; Dumanlı ve diğerleri, 2013; Njiro ve diğerleri, 2011). SRS2 indirekt ELISA yöntemiyle incelenmesi sonucu pozitif olduğu belirlenen toplam 52 pozitif örneğin (%8,5) serum toplanan sığırların menşeilerine göre pozitiflik oranları **Tablo 11**’de verilmiştir. Buna göre, Hollanda ve Macaristan’dan ithal edilen hayvanlarda herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Bunun yanında, seropozitif olarak belirlenen sığırların, 34’ünün (%8,6) Almanya’dan, 13’ünün (%10,7) Avusturya’dan, 5’inin (%7,7) ise Slovakya’dan ithal edilen hayvanlar olduğu görülmüştür. Menşeilere göre pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.458). Ticari ELISA kitiyle pozitif olarak saptanan örneklerin menşeilerine göre göre pozitiflik oranları **Tablo 11**’de verilmiştir. Buna göre, Hollanda ve Macaristan’dan ithal edilen hayvanlarda herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir. Bunun yanında, pozitiflik belirlenen sığırların, 20’sinin (%5,3) Almanya’dan, üçünün (%2,5) Avusturya’dan, ikisinin (%3) ise Slovakya’dan ithal edilen hayvanlar olduğu saptanmıştır. Menşeilere göre pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.582). Almanya’da 100 hayvan ile yapılan bir çalışmada %1-2 oranında hayvanın seropozitif saptandığı (Weber ve diğerleri, 2000; Bartels ve diğerleri, 2006), Macaristan’da 97 hayvan ile yapılan çalışmada sığırların %10’unun pozitif olarak saptandığı (Hornok ve diğerleri, 1998), Slovakya’da 105 hayvanla ile yapılan başka bir incelemede ise %22 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (Dubinsky ve diğerleri, 2006). Hollanda’da 9340 tane sığır ile yapılan incelemede %10-39 aralığında seropozitiflik saptanmıştır (Dijkstra ve diğerleri, 2001; Bartels ve diğerleri, 2006). Yapılan bu tez çalışmasında ise örnek toplanan çiftliklerdeki ithal hayvanların belirtilen ülkelerden olması nedeni ile ülkeye hayvan girişinde hastalığın seropozitifliğinin sorgulanmasını beraberinde getirmektedir. Her iki yöntem kullanılarak seroprevalansın bulunmasına yönelik incelemelerde çıkan sonuçlar ithal edilen hayvanların menşei ülkelerinde çıkan sonuçlarla paralellik göstermektedir. Hastalığın menşei ülke yönünden yaklaşımdaki kritik nokta seroprevalansı yüksek olan bir menşei ülkeden ülkemize girişte etkenin varlığının araştırılması ve daha sonra millileştirme işlemlerinin yapılması yönünde olması önerilmektedir.

SRS2 indirek ELISA ve ticari ELISA yöntemleriyle elde edilen sonuçlardaki uyumun belirlemesi amacıyla kappa (κ) uyum testi yapılmış ve iki testin karşılaştırılmasını gösteren veriler **Tablo 12**’de verilmiştir. Buna göre, ticari ELISA yöntemi ile negatif olan toplam 47 örnek SRS2 indirek ELISA yöntemi ile pozitif olarak tespit edilirken, ticari ELISA kiti ile pozitif olan toplam 22 örnek SRS2 indirek ELISA yöntemi ile negatif olarak belirlemiştir (**Ek-3**). SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile pozitif olan 47 örnek incelendiğinde; örneklerden iki tanesi İzmir ili Tire Foça ilçesindeki F1 çiftliğinden, sekiz tanesi İzmir ili Tire ilçesindeki T1 çiftliğinden, 20’si Tire ilçesindeki T4 çiftliğinden, beşi Tire ilçesindeki T2 çiftliğinden, beşi Bayındır ilçesindeki B1çiftliğinden ve yedi tanesi ise Aydın ili Koçarlı ilçesindeki K1 çiftliğinden alınan numunelerde olduğu bilinmekte olup, bu numuneler ticari ELISA kiti ile incelendiğinde negatif sonuç verdiği görülmüştür. Ticari ELISA yöntemi ile pozitif olarak tespit edilen 22 örnek incelendiğinde; bir adeti İzmir ili Foça ilçesindeki F1 çiftliğinden, iki tanesi Tire ilçesindeki T2 çiftliğinden, iki tanesi Bayındır ilçesindeki B1 çiftliğinden, sekiz tanesi Tire ilçesindeki T3 çiftliğinden ve dokuz adeti Aydın ili Koçarlı ilçesindeki K1 çiftliğinden alınan numunelerde olduğu bilinmekte olup, bu numuneler SRS2 indirek ELISA yöntemi ile incelendiğinde negatif sonuç verdiği görülmüştür. Ticari ELISA kiti ile şüpheli olan altı tane örnek incelendiğinde; bir adet örneğin Aydın ili Koçarlı ilçesindeki K1 çiftliğinde ve bir adet örneğin İzmir ili Tire ilçesi T3 çiftliğinden alınan numunelerin şüpheli olduğu ve bu iki tane numunenin SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile incelendiğinde pozitif olarak sonuçlandığı görülmektedir. Ticari ELISA yöntemi ile geri kalan dört adet şüpheli numune SRS2 indirekt ELİSA yöntemi ile incelendiğinde negatif sonuç verdiği anlaşılmaktadır. Bunun yanında hem ticari ELISA kiti ile hem de SRS2 indirek ELISA yöntemi ile sadece üç örnekte pozitiflik tespit edilebilmiştir. Bu örnekler; İzmir ili Tire ilçesinde bulunan T3 çiftliğinde Almanya menşeili sığırdan, Aydın ili Koçarlı ilçesinde bulunan K1 çiftliğinden alınan Almanya menşeili sığırdan ve İzmir ili Bayındır ilçesinde B1 çiftliğinde Avusturya menşeili sığırdan alınan numunelerin incelenmesi sonucu pozitif olarak bulunmuştur. Kappa (κ) uyum testi sonucunda elde edilen 0.41 ile 0.60 arasındaki kappa değeri (κ = 0.042) iki test arasında orta düzeyde uyum olduğunu göstermiştir (Viera ve Garrett, 2005; MacHugh 2012).

*Neospora caninum*’unkontrolü için seçenekler yıllardır araştırılmakta ve tartışılmaktadır (Thurmond ve Hietala, 1995; Baillargeon ve diğerleri 2001; Nishikawa ve diğerleri 2002; Reichel ve Ellis, 2002, 2009; Dubey ve diğerleri 2007). *Neospora caninum* için hali hazırda geliştirilmiş kesinliği bilinen bir tedavi yoktur. *N. caninum* ile ilişkili abortların kontrolünün sağlanmasında tek gerçekçi ve ekonomik yöntem sürü bazında aşılama uygulamaktır (Reichel ve diğerleri, 2006). Wiliam ve diğerleri (2007) ile Weber ve diğerleri (2013), farklı yıllarında yaptıkları çalışmalar sonucunda *N. caninum*’un kontrolünde aşılamanın en etkili yöntem olduğunu gösterdiklerinden bu yana son beş yıldaki neosporosis enfeksiyonuna bağlı koruyucu önlemler aşı çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır (Williams ve diğerleri 2007; Weber ve diğerleri, 2013). Neosporosise karşı geçmişte birçok aşı geliştirme çalışmaları yapılmıştır (Reichel ve diğerleri, 2009). İnaktif takizotleri temel alan ölü aşı çalışmaları yapılmış, fakat etkinliğine güvenilemediği için geniş çaplı bir kabul görmemiştir (Choromanski ve diğerleri, 2000; Romeo ve diğerleri, 2004). Gebelik öncesinde canlı takizoit kullanılarak aşılamaların, ölü doğum ve abortlara karşı immun direnç sağlayabileceği düşünülmüş (Miller ve diğerleri, 2005; Williams ve diğerleri, 2007) ve bu immun direncin gama interferon (IFN) gibi hücresel bağışıklık mekanizması ile gerçekleştiği öngürülmüştür. Aşılama dışında hastalık kontrolü endojen ve eksojen bulaşmayı önlemek üzerine olmuştur (Reichel ve diğerleri 2013). Endojen bulaşmanın kontrolünde tohumlamaya ayrılan ineklerden sadece seronegatif olanların seçilmesi ya da damızlık değeri yüksek seropozitif ineklerin embriyo transferi ile gebe bırakılması uygulanmalıdır (Reichel ve diğerleri, 2013). Ayrıca abort şekillenen tüm inekler sürüden ayrılmalı ve teste tabi tutulmalıdır (Reichel ve diğerleri, 2013). Eksojen bulaşmada ise köpek dışkılarının yiyecek ve suyu kontamine etme riski minimum düzeyde tutulmalı ve fetüs ile atık yapmış ineklerin plasenta gibi yapılarının köpeklerle buluşması önlenmelidir (Reichel ve diğerleri, 2013). IBR (infeksiyöz bovine rhinotracheitis), BVD(bovine viral disease) ve mitotoksin daha önceden *N. caninum* ile enfekte olmuş sığırlarda immun suppresif etkiler göstererek parazitin vertikal bulaşması ve abort riskinin artışına sebep olabileceği hipotezi geliştirilmiştir (Lanyon ve diğerleri, 2014).

*Neospora caninum* ara konak olarak bulunduğu sığırlarda vertikal ve horizontal olarak bulaşmaktadır. Bazı sığırlarda klinik semptom göstermeden abort şekillenebilmekte ya da intra-uterin yolla (vertikal) yavrulara bulaştırarak geçerek *N. caninum* ile enfekte buzağıların doğmasına neden olmaktadır ve asemptomatik enfekte buzağıların enfekte olmayan buzağılarla karşılaştırıldıklarında iki kat daha fazla atık yapma ihtimallerinin olduğu gösterilmiştir (Dubey ve diğerleri, 2007). Hastalığın yeni nesillerde subklinik seyretmesi ve buna bağlı olarak oluşan ekonomik kayıplar enfeksiyona karşı uygulanması gereken koruma kontrolü daha da önemli hale gelmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sığırların yanı sıra koyunlarda da enfeksiyonun tespit edildiği olduğu görülmektedir. Kuzey Mısır’da 430 koyun ile yapılan bir çalışmada %8,6 oranında seropozitiflik bulunmuştur (Selim ve diğerleri, 2021). Koyunların da hastalığa ara konak olabileceği düşünülmeli, özellikle koyunların otlatıldığı mera alanlarına köpek gibi son konakların girişlerin engellemesi veya kontrol altında tutulması planlanmalıdır. Bunun yanında sığır ile koyunun beraber otlatıldığı ya da sürü olarak bakım beslemesinin beraber yapıldığı durumlarda yine koyunların ara konak olabileceği hatırlanmalı ve planlama ve risk faktörleri bu şekilde hazırlanmalıdır. Büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bilinen neosporosis için sürü biyogüvenliği büyük önem arz etmektedir. Çiftlikte mümkün olduğunca köpek bulundurulmamalı, çiftlik giriş çıkışları kontrol edilmelidir. Köpek bulundurulması durumunda ise kontrol altına alınması, olabildiğince sabit tutulması gerekmektedir. Sürü sağlığı ve sürü geleceği açısından belirli periyodlarda tanı yöntemleri kullanılarak sürü taraması yapılması hastalığın belirlenmesi açısından önemlidir. Sürü bazında abort, ölü doğum ya da fötal ölümlerin arttığı durumlarda ayırıcı tanı hastalık listesine *N. caninum* etkeni alınmalı, pozitif çıkan sığırlar acilen sürüden uzaklaştırılmalıdır. Hastalığın vertikal yolla bulaşabileceği unutulmamalı pozitif çıkan annelerin buzağıları da teste tabi tutularak pozitif çıkan yavrular da sürü dışı bırakılmalıdır.

Her iki yöntem kullanılarak incelenen numuneler sonucunda seropozitiflik saptanan çiftlik / işletmelerde öncelikle biyogüvenlik önlemlerinin arttırılması gerekmektedir. Hastalığın horizontal bulaşmasına neden olan köpeklerin çiftlikte başıboş dolaşmaları, sadece ticari veya kontrol altında mama veya yem ile beslenmesi önerilmektedir. Sığır abortları sonucu ortaya çıkan fetüs ve plasentaya ulaşmaları engellenmelidir. Etkenin vertikal bulaşması doğrudan işletme geleceğini etkileyeceği için seropozitif hayvanlar acil bir şekilde sürü dışı edilmeli veya yüksek verime sahipse embriyo transferi uygulanmalıdır. Seropozitif hayvanlardan doğan buzağılar tespit edilmeli ve testte tabii tutularak asemptomatik vakaların önüne geçilmeli, seropozitif düvelerin sürüde bulundurulması engellenmelidir. Seropozitif olarak tespit edilen buzağılar da sürü dışı bırakılması önerilmektedir. Sürüde oluşan tüm abort vakalarında *N. caninum* da düşünülerek ayırıcı tanıda bulunması gerektiği düşünülmelidir. Türkiye’ye zaman zaman yoğun şekilde canlı hayvan ithalatı yapıldığı bilinmektedir. Menşei ülkeden Türkiye’ye girişte T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı’nca istenilen hastalık test listesinde neosporosisin de bulunması, ithal edilecek hayvanlara *N. caninum* odaklı inceleme yapılması ve seropozitif çıkan hayvanların ülkeye girişinin engellenmesi ya da millileştirme işleminin yapılmaması önerilmektedir. Millileştirme işlemi yapılan hayvanların girişi yapılan riskli bulunan işletmelere özellikle düvelere belirli periyodlar halinde seroprevalans taraması yapılması önerilmektedir. Son yıllarda damızlık hayvan ithalatının fazla yapıldığı, Macaristan, Avusturya, Slovakya, Almanya Fransa gibi *N. caninum* seroprevalansı yüksek olan Avrupa ülkelerinden ülkemize girişte hastalığa karşı protokollerin oluşturulması ve yürütülmesi koruyucu önlemler açısından önem arz etmektedir.

**6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Neosporosis, *Neospora caninum* (*N. caninum*) tarafından üç enfeksiyöz formu olan bulaşıcı, protozoal bir hastalık olup farklı hayvan türlerinde klinik bulgulara yol açar (Dubey ve diğerleri, 2007). Neosporosis kaynaklı ekonomik kayıpları kantitatif olarak ölçmek zordur, bununla birlikte oluşan kayıpların oldukça önemli olduğu düşülnülmektedir (Trees ve diğerleri, 1999). *Neospora caninum* kaynaklı doğal enfeksiyonlarda meydana gelen kayıplar; abort, düşük süt üretimi, zayıf buzağı doğumları, pedigriden gelen değerli genetik yapının yüksek oranda bozulması şeklinde sayılabilir (Dubey ve diğerleri, 2007). *Neospora caninum* enfeksiyonunun tanısında ışık mikroskobu, patolojik-immunopatolojik inceleme, elektron mikroskobu, serolojik ve moleküler testler kullanılabilmektedir (Barber ve diğerleri, 1995; Lally ve diğerleri, 1996). ELISA ve IFAT testleri neosporosisin teşhisinde kullanılabilecek serolojik testlerdir. ELISA testi tutarlı, objektif ve hızlı sonuç veren bir test olup, geniş sürülerdeki seroprevalans taramalarında kolaylıkla uygulanabilir bir testtir. *Neospora caninum* hücre içi zorunlu bir parazittir ve hücre içine girmesinde NcSAG1 ve Nc-SRS2 gibi yüzey proteinleri rol oynamaktadır. İmmunodominant yüzey antijeni olan NcSRS2 kullanılarak yapılan ELISA testleri de oldukça özgül ve hassas serolojik tanı yöntemi olarak hastalığın yaygınlığının belirlenmesi amacıyla yapılacak çalışmalarda oldukça faydalı sonuçlar vereceği bildirilmiştir (Nishikawa ve diğerleri, 2001c).

SRS2 indirekt ELISA yöntemi ile 613 örnekte yapılan incelemede 52 (% 8,2 ) serum numumesinin pozitif olduğu saptanmıştır. Aydın ve İzmir illerinden toplanan toplam 613 serum örneğinin ticari ELISA yöntemi kullanılarak yapılan inceleneme sonucunda 25 (%4,1) adet numunenin seropozitif olduğu saptanmıştır. *Neospora caninum* enfeksiyonun henüz etkili bir tedavi yöntemi yoktur. Bu nedenle hastalığın erken tanıya ulaşılması ve bulaş yollarının kontrol altına alınması önem arz etmektedir. Bu bağlamda çiftlikte köpek bulundurulmamalı, çiftlik giriş çıkışları kontrol edilmelidir. Köpek bulundurulması durumunda ise kontrol altına alınması, olabildiğince sabit tutulması gerekmektedir. Sürü sağlığı ve sürü geleceği açısından belirli periyodlarda tanı yöntemleri kullanılarak sürü taraması yapılması hastalığın belirlenmesi açısından önemlidir. Sürü bazında abort, ölü doğum ya da fötal ölümlerin arttığı durumlarda ayırıcı tanı hastalık listesine *N. caninum* alınmalı, pozitif çıkan sığırlar acilen sürüden uzaklaştırılmalıdır. Hastalığın vertikal yolla bulaşabileceği unutulmamalı, pozitif çıkan annelerin buzağıları da testte tabi tutularak pozitif çıkan yavrular da sürü dışı bırakılmalıdır. Hayvan ithalatının yoğun olduğu, ülkeye ithal sığırın sayııca fazla girdiği durumlarda; özellikle menşei ülke göz önünde bulundurularak ülkeye girişte istenen hastalık listesine *N. caninum* etkeninin de eklenmesi ve menşei işletmelerde ‘’NEOSPORA ARİ’’ belgesinin bulundurulması önem arz etmektedir.

**KAYNAKLAR**

Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Arnaiz-Seco, I., Carnero, M., Ortega-Mora, L. M. (2006, Eylül, 7-8). *New insights on the interpretation of unclearresults in the serological diagnosis of bovine neosporosis.* COST Action854. In: Final Conference, Liège, Belgium.

Aguiar, D. M., Cavalcante, G. T., Rodrigues, A. A. R., Labruna, M. B., Camargo, L. M. A., Camargo, E. P., Gennari, S. M. (2006). Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Veterinary Parasitology*, 142:71–77.

Ahn, H. J., Kim, S. D. Y., Nam, H. W. (2003). ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *Korean Journal of Parasitology*, 41:175–177.

Akca, A., Gokce, H. I., Guy, C. S., McGarry. J. W., Williams, D. J. (2005). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in local and imported cattle breeds in the Kars province of Turkey. *Research in Veterinary Science*, 78(2), 123-126. doi: 10.1016/j.rvsc.2004.08.006.

Aktaş, M., Şaki, C. E., Altay, K., Şimşek, S., Ütük, A. E., Köroğlu, E., Dumanlı, N. (2005). Doğu Anadolu bölgesinin bazı illerinde bulunan sığırlarda *Neospora caninum*’un araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(1), 22-25.

Alan, M, Cetin, Y., Sendag, S., Akkan, H. A., Karaca, M. (2011). Seroprevalence of Antibodies Against *Neospora caninum* in Cows in Van Province. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(5), 767-771.

Alvarez-Garcı´a, G., Collantes-Ferna´ndez, E., Costas, E., Rebordosa, X., Ortega-Mora, L.M. (2003). Influence of age and purpose fortesting on the cut-off selection of serological methods in bovineneosporosis. *Veterinary Research*, 34, 341–352.

Alvarez-García, G., García-Culebras, A., Gutiérrez-Expósito D., Navarro-Lozano V., Pastor-Fernández I., Ortega-MoraL. M. (2013). Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary Parasitology,* 198 (2013) 85– 95.

Anderson, M. L., Andrianarivo, A. G., Conrad, P. A. (2000). Neosporosis in cattle. *Animal Reproduct Science*, 60-61: 417-431. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00117-2.

Anderson, M. L. J. P., Reynolds, J. D., Rowe, K. W., Sverlow, A. E., Packham, B. C., Barr, Conrad, P. A. (1997). Evidence of vertical transmission of *Neospora sp*. infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 210:1169– 1172.

Anderson, M. L., Ban, B.C., Conrad, P. A. (1994). Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice,* 10: 439-461.

Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Ban, B. C., Dubey, J. P., Hoffman, R. L., Conrad, P. A. (1991). Neospora like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198: 241-244.

Anderson, M. L., Palmer, C. W., Thurmond, M. C., Picanso, J. P., Blanchard, P. C., Breitmeyer, R. E., … Ban, B.C. (1995). Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 207: 1206-1210.

Anderson, M. L., Reynolds, J. P., Rowe, J. D., Sverlow, K. W., Packham, A. E., Barr, B., C., Conrad, P. A. (1997). Evidence of vertical transmission of *Neospora sp*. infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 210, 1169–1172.

Andrianarivo, A. G., Choromanski, L., McDonough, S. P, Packham, A. E., Conrad, P. A.(1999). Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants associated with bovine abortions. *International Journal of Parasitolog*y, 29(10):1613-1625.

Andrianarivo, A. G., Barr, B. C., Anderson, M. L., Rowe, J. D., Packham, A. E., Sverlow, K. W., Conrad, P. A. (2001). Immune responsesin pregnant cattle and bovine fetuses following experimentalinfection with *Neospora caninum.* *Parasitology Research*, 87, 817–825. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00116-2.

Asmare, K., Regassa, F., Robertson, L. J., Skjerve, E. (2013). Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 193(1- 3), 85-94. 8.

Atkinson, R. A., Cook, R. W., Reddacliff, L. A., Rothwell, J. K., Broady, W., Harper, P. A., Ellis, J. T. (2000). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. Austra*lian Veterinary Journal*, 78:262–266. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb11752.x

Atkinson, R., Harper, P. A., Ryce, C., Morrison, D. A., Ellis, J. T. (1999). Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology,* 118, 363–370.

Bacigalupe, D., Basso, W., Caspe, S. G., Moré, G., Lischinsky, L., Gos, M. L., … Venturini, M. C. (2013). *Neospora caninum* NC-6 Argentina induces fetopathy in both serologically positiveand negative experimentally inoculated pregnant dams. *Parasitology Research*, 112,2585–2592. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3424-1.

Bae, J. S., Kim, D. Y., Hwang, W. S., Kim, J. H., Lee, N. S. Nam, H. W. (2000). Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. *Korean Journal Parasitology*, 38:245–249.

Baillargeon, P., Fecteau, G., Pare´, J., Lamothe, P., Sauve´, R. (2001) Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of control- ling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218, 1803–1806.

Balkaya, I., Bastem, Z., Avcıoğlu, H., Onalan, S. (2012) Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle in Eastern Turkey. *Israel Journal of Veterinay Medicine*, 67, 109-112.

Ban, B. C., Rowe, J. D., Sverlow, K. W., BonDurant, R. H., Ardans, A. A., Oliver, M. N. Conrad, P. A. (1994b). Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6: 207-215.

Barber, J. S., Holmdahl, O. J. M., Owen, M. R., Guy, F., Uggla, A., Trees, A. J. (1995). Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 111: 563-568.

Barber, J. S. Trees, A. J. (1996). Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Veterinary Record*, 139, 439–443.

Barr, B. C., Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Daft, B. M., Kinde, H, Conrad, P.A. (1990). Bovine fetalencephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Veterinary Pathology*, 27: 354-361.

Barr, B. C., Anderson, M. L., Dubey, J. P., Conrad, P. A., (1991a). Neospora-like protozoal infections. *Veterinary Pathology*, 28(2):110-6. doi: 10.1177/030098589102800202.

Barr, B. C., Anderson, M. L., Sverlow, K. W., Conrad, P. A. (1995) Diagnosis of bovine fetal Neospora infection with an indirectfluorescent antibody test. *Veterinary Record*, 137, 611–613.

Barr, B. C., Conrad, P. A., Dubey, J. P., Anderson, M. L. (1991b) Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 3, 39–46.

Bartels, C. J. M., Arnaiz-Seco, J. I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., Von lumröder, D., … Ortega-Mora, L. M. (2006). Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary Parasitology,* 137:17–27.

Bartels, C. J. M., Van Maanen, C., Van der Meulen, A. M., Dijkstra, T, Wouda, W. (2005). Evaluation of three enzyme-linked immunosorbentassays for detection of antibodies to *Neospora caninumin* bulk milk. *Veterinary Parasitology*, 131, 235–246.

Bartley, P. M., Kirvar, E., Wright, S., Swales, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., … Innes, E. A. (2004). Maternal and fetal immune responses ofcattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *Journal Comparative Pathology*, 130, 81–91.

Bártová, E., Sedlák, K., Budíková, M. (2015). A study of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody seroprevalence in healthy cattle in the Czech Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22, 32-34.

Basso, W., Herrmann, D. C., Conraths, F. J., Pantchev, N., Vrhovec, M. G., Schares, G. (2009a). First isolation of *Neospora caninum* from the faecesof a dog from Portugal. *Veterinary Parasitology,* 159, 162–166.

Basso, W., Schares, S., Barwald, A., Herrmann, D. C., Conraths, F. J., Pantchev, N., … Schares, G. (2009b). Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Veterinary Parasitology,* 160, 43–50.

Baszler, T. V., Knowles, D. P., Dubey, J. P., Gay, J. M., Mathison, B. A, McElwain, T. F., (1996). Serological diagnosis of bovine neosporosisby *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitiveinhibition enzyme-linked mmunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiolog,* 34, 1423–1428.

Batmaz, H., Şentürk, S., Aydın, L. (2004). Clinical neosporosis in a dog in Turkey. *Australian Veterinary Practitioner*, 34, 108-110.

Bergeron, N., Fecteau, G., Pare´, J., Martineau, R., Villeneuve, A. (2000). Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Que´bec. *The Canadian Veterinary Journal,* 41:464–467.

Bergeron, N., Girard, C., Pare´, J., Fecteau, G., Robinson, J., Baillargeon, P. (2001). Rare detection of *Neospora caninum* inplacentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 13, 173–175.

Bıyıkoğlu, G., Aksoy, E., Bozkır, M., Küçükayan, U., Ertürk, A. (2003a, Eylül, 8-12). *İç Anadolu Bölgesi sığırlarında Neospora caninum’un varlığının araştırılması*. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi*.* Konya- Türkiye.

Bıyıkoğlu, G., Öncel, T., Bağcı, Ö. (2003b, Eylül, 8-12). *Trakya sığırlarında Neospora caninum’un seroprevalansı*. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi*.* Konya- Türkiye.

Bien´, J., Moskwa, B., Cabaj, W. (2010). In vitro isolation and identification of the first *Neospora caninum* isolate from European bison (Bison bonasusbonasus L.). *Veterinary Parasitology,* 173, 200–205.

Bildfell, R., Davidson, J., Dubey, J. P. (1994). Neospora-induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. *The Canadian Veterinary Journal*, 35: 122.

Biyikoglu, G., Öncel, T., Bagci, Ö. (2005). Serological survey of *Neospora caninum* infection. *Indian* *Veterinary Journal,* 82:345–346.

Bjerkas, I., Jenkins, M. C., Dubey, J. P. (1994). Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Mar;1(2):214-21. doi: 10.1128/cdli.1.2.214-221.1994

Björkman, C., Gondiim, L. F. P., Na¨slund, K., Trees, A. J., McAllister, M. M. (2005). IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. *Veterinary Parasitology*, 128, 195–200.

Björkman, C., Hemphill, A. (1998). Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunology*, 20, 73–80.

Björkman, C., McAllister, M. M., Frössling, J., Na¨slund, K., Leung, F., Uggla, A. (2003). Application of the *Neospora caninum* IgGavidity ELISA in assessment of chronicreproductive losses afteran outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, 3–7.

Björkman, C., Na¨slund, K., Stenlund, S., Maley, S. W., Buxton, D., Uggla, A. (1999). An IgG avidity ELISA to discriminate betweenrecent and chronic *Neospora caninum* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 41–44.

Björkman, C., Johansson, O. Stenlund, S. Holmdahl, O. J. M., Uggla, A. (1996). Neospora species infection in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 208:1441–1444.

Björkman, C., Alenius, S., Emanuelsson, U., Uggla, A. (2000). *Neospora caninum* and bovine virus diarrhea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Veterinary Journal*, 159:201–206.

Boger, L. A., Hattel, A. L. (2003). Additional evaluation of undiagnosed bovine abortions cases may reveal fetal neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 113, 1-6. doi: 10.1016/s0304-4017(03)00041-4.

Boulton, J. G., Gill, P. A., Cook, R. W., Fraser, G. C., Harper, P. A. W., Dubey, J. P. (1995). Bovine Neospora abortion in north-eastern New South Wales. *Australian Veterinary Journal,* vol.72 No.3 pp.119-120 ref.18.

Borsuk, S., Andreotti, R., Leite, F. P. L., da Silva Pinto, L., Simionatto, S., Hartleben, C.P., … Berne, M. E. A. (2011). Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. *Veterinary Parasitology*, 177, 33–38. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.026.

Brom, P. R. F., Regidor-Cerrillo, J., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L. M., Guimarães, M. S., da Silva, A. C. (2014). Genetic characterisation of *Neospora caninum* strains fromclinical samples of zebuine foetuses obtained in abattoirs in Goiás, Brazil. *Veterinary Parasitology,* 204 (3–4). http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.011.

Buxton, D., Caldow, G. L., Maley, S. W., Marks, J., Innes, E. A. (1997a). Neosporosis and bovine abortion in Scotland. *Veterinary Record*, vol. 141, no. 25, pp. 649- 651.

Bartels, C. J. M., Arnaiz-Seco, J. I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., von Blumröder, D., … Ortega-Mora, L. M. (2006). Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary Parasitology*, 15;137(1-2):17-27. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.12.016. Epub 2006 Jan 18.

Cabaj, W., Choromanski, L., Rodgers, S., Moskwa, B., Malczewski, A. (2000). *Neospora caninum* infections in aborting dairy cows in Poland. *Acta Parasitologica*, vol.45 No.2 pp.113-114 ref.12.

Caetano-da-Silva, A., Ferre, I., Aduriz, G., G., A´ lvarez-Garcı´a, del-Pozo, I., Atxaerandio, R., … Ortega- Mora, L. M. (2004). *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. *Veterinary Parasitology,* 124:19–24. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.06.023.

Campero, C. M., Anderson, M. L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., Poso, M. A. (1998). *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Veterinary Record,* vol. 143, no. 8, pp. 228-229

Campero, L. M., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D. P., … Venturini, M.C. (2015a). Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, 47,295–301. http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.07.002.

Campero, L. M., Venturini, M. C., Moore, D. P., Massola, L., Lagomarsino, H., García, B., … Campero, C. M. (2015b). Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. *Experimental Parasitology*, 155, 8–12. http://dx.doi.org/10.1016/j. exppara.2015.04.009.

Canada, N., Meireles, C. S., Rocha, A., Correia da Costa, J. M., Erickson, M.W., Dubey, J.P. (2002b). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally-infected aborted bovine fetuses. *Journal Parasitology*, 88, 1247–1248. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[1247:IOVTGF]2.0.CO;2.

Canada, N., Meireles, C. S., Rocha, A., Sousa, S., Thompson, G., Dubey, J. P., … Correia da Costa, J.M. (2002a). First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 110, 11–15. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00333-3.

Canada, N., Carvalheira, J. Meireles, C. S., Correia da Costa, J. M., Rocha A. (2004). Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. *Theriogenology,* 62:1229–1235. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.004.

Canada, N., Meireles, C. S., Mezo, M., Gonza´lez-Warleta, M., Correia da Costa, J. M., Sreekumar, C., … Dubey, J. P. (2004b). First isolation of *Neospora caninum* from an aborted bovine fetus in Spain. *Journal Parasitology*, 863–864. doi: 10.1645/GE-306.

Cardoso, J. M. S., Amaku, M., dos Santos Araújo, A. J. U., Gennari, S. M., (2012). A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 187, 553–557. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.019.

Chanlun, A., Emanuelson, U., Chanlun, S., Aiumlamai, S., Björkman, C. (2006). Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. *Veterinary Parasitology*, 136, 243–250. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.11.025.

Chanlun, A., Na¨slund, K., Aiumlamai, S., Björkman, C. (2002). Useof bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection indairy herds in Thailand. *Veterinary Parasitology,* Ararlık, 11, 110, 35–44. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00315-1.

Cheah, T. S., Mattsson, J. G., Zaini, M., Sani, R. A., Jakubek, E. B., Uggla, A., Chandrawathani, P. (2004). Isolation of *Neospora caninum* from a calf in Malaysia. *Veterinary Parasitology*, 126, 263–269. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.08.012.

Choromanski, L., Block, W. (2000). Humoral immune responses and safety of experimental formulations of inactivated Neospora vaccines. *Parasitology Research*, 86:851– 853.

Cole, R. A., Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Toivio-Kinnucan, M. A., Blagburn, B. L. (1994). Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* by western blot analysis and immunoelectron microscopy. *American Journal of Veterinary Research,* 55, 1717–1722.

Collantes-Ferna´ndez, E., Lo´pez-Pe´rez, I., Alvarez-Garcı´a, G., Ortega-Mora, L. M. (2006) Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. *Infection and Immunity*, 74, 2491–2494. Doi:10.1128/IAI.74.4.2491-2494.2006.

Collantes-Ferna´ndez, E., Rodriguez-Bertos, A., Arnaiz-Seco, I., Moreno, B., Aduriz, G., Ortega-Mora, L.M. (2005). Influenceof the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology,* Şubat, 65 629–641. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.06.003.

Collery, P. M. (1995). Neospora abortion in cattle in Ireland. *Veterinary Record*, vol. 136, no. 23, p. 595.

Conrad, P. A., Sverlow, K., Anderson, M., Rowe, J., BonDurant, R., Tuter, G., … Ardans, A. (1993b). Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental Neospora infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Kasım, 1, vol. 5, no. 4, pp. 572-578.

Conraths, F., Bauer, J., C., Becker, W. (1996). Detection of antibodies against *Neospora caninum* in cows on Hessian farms with abortion and fertility problems. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 103:221–224.

Conraths, F. J., Schares, G., Tchernychova, G., Bessonov, O. A. S. (2000). Seroepidemiological evidence for bovine neosporosis and *Neospora caninum*- associated abortions in the Russian Federation. *International Journal for Parasitology*, 30: 890–891.

Conraths, F. J., Ortega, L. M. (2005). *Options for control of protozoal abortion in ruminants—practicalexperience*. Workshop conclusions In: Proceedings of the 20th International Conferenceof World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, vol. 20. supplementary pages.

Corbellini, L. G., Driemeier, D., Cruz, C. F., Gondiim, L. F., Wald, V. (2002). Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, vol. 103, no. 3, pp. 195-202. doi: 10.1016/s0304-4017(01)00600-8.

Corbellini, L. G., Pescador, C. A., Frantz, F., Wunder, E., Steffen, D., Smith, D. R., Driemeier, D. (2006). Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Veterinary Journal*, 172:114–120. doi: 10.1016/j.tvjl.2005.03.006.

Cox, B. T., Reichel, M. P., Griffiths, L. M. (1998). Serology of a Neospora abortion outbreak on a dairy farm in New Zealand: a case study. *New Zealand* *Veterinary Journal*, 46:28–31. https://doi.org/10.1080/00480169.1998.36046

Cramer, G., Kelton, D., Duffield, T. F., Hobson, J. C., Lissemore, K., S., Hietala, K., Peregrine, A. S. (2002). *Neospora caninum* serostatus and culling of Holstein cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 221:1165–1168. doi: 10.2460/javma.2002.221.1165.

Crowther, J. R. (1998). Detection of viruses in livestock. *Parasitology*, vol. 117, pp. S29-40. doi: 10.1017/s0031182099004199.

Çelik, H. A., Kozan, E., Eser, M., Yılmaz, O., Birdane M. K., Sarımehmetoğlu, H. O. (2013). A research on seroprevalence of *Neospora caninum* in cattle. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 60, 99-102, 2013. https://doi.org/10.1501/Vetfak\_0000002560

Çırak, M. Y. (1999). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Sistemleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 19:242-248.

Dannatt, L. (1997). *Neospora caninum* antibody levels in an endemically infected dairy herd. *Cattle Practice,* 5:335–337

Dannatt, L., (1998). *Neospora caninum* antibody levels in an endemically-infected dairy herd. *Irish Veterinary Journal,* 51, 200–201.

Davison, H. C., Otter, A., Trees, A. J. (1999). Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, 29:1683–1689. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00129-0.

Davison, H. C., Guy, F., Trees, A. J., Ryce, C., Ellis, J. T., Otter, A., … Holt, J.J. (1999b). In vitro isolation ofNeospora caninum from a stillborn calf in the UK. *Research in Veterinary Science*, Ağustos, 67, 103–105. doi: 10.1053/rvsc.1998.0272.

De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Gasbarre, L. (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocystsfrom dogs: humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology*, 1647–1657. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00154-x.

De Meerschman, F., Focant, C., Boreux, R., Leclipteux, T., Losson, B. (2000). Cattle neosporosis in Belgium: a case-control study in dairy and beef cattle. *International Journal for Parasitology*, 30:887–890

De Meerschman, F., Speybroeck, N., Berkvens, D., Rettigner, C., Focant, C., Leclipteux, T., Cassart, D., Losson, B., (2002). Fetal infection with Neospora caninum in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology,* vol. 58, Issue 5, 58, 933–945.

De Meerschman, F., Focant, C., Detry, J., Rettigner, C., Cassart, D., Losson, B. (2005). Clinical, pathological and diagnostic aspectsof congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. *Veterinary Record*, Temmuz, 157, 115–118. doi: 10.1136/vr.157.4.115.

De Melo, C. B., Leite, R. C., de Souza, G. N., Leite, R. C., (2001). Frequeuncia de infeccoa por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produc¸a˜o de leite e fatores predisponentes a` infeccoa em bovinos em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 10:67–74

De Melo, C. B., Leite R. C., Lobato, Z. I. P. (2004). Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpes virus 1 and bovine viral diarrhea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 119:97–105. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.12.002.

Demir, A. P., Ekşi, F., Ütük, A. E. (2020). Estimating the total economic costs of *Neospora caninum* infections in dairy cows in Turkey. *Tropical Animal Health and Production,* 52:3251–3258. Doi: 10.1007/s11250-020-02351-1.

de Sá, G.L., De Borba Pacheco, D., Monte, L.G., Sinnott, F. A., Xavier, M. A., Rizzi, C., … Hartleben, C.P. (2014). Diagnostic potential of Anti-rNcp-43 polyclonal antibodies for the detection of *Neospora caninum*. *Current.Microbiology*, 68, 472–476. http://dx.doi.org/10.1007/s00284-013-0499-y.

Dijkstra, T., Barkema, H. W., Eysker, M., Beiboer, M. L., Wouda, W. (2003). Evaluation of a single serological screening of dairyherds for *Neospora caninum* antibodies. *Veterinary Parasitology,* 110,161–169. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00323-0.

Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Wouda, W. (2001). Evidenceof post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutchdairy herds*. International Journal Parasitology*, 209–215. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00160-0.

Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Kohsaka, T., Ike, K., Park, E.Y. (2013). Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology andapplication on the detection of N. caninum. *PLoS One,* 8, 1–9. http://dx.doi.org/10. 1371/journal.pone.0053264.

Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Park, E.Y., (2012). Development of a diagnostic method for neosporosis in cattle using recombinant Neospora caninum proteins. *BMC Biotechnol*. 12, 19. http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-12-19.

Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Park, E.Y. (2014). Tracking Neospora caninum parasites using chimera monoclonal antibodies against its surface antigen-related sequences(rNcSRS2). *Journal of Bioscience Bioengineering*, 117, 351–357. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.003.

Dubey, J. P. (1999a) Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 214: 1160-1163

Dubey, J. P., Carpenter J. L., Speer C. A., Topper, M. J., Uggla, A. (1998). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 192:1269-1285

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Adams, D. S., Gay, J. M., Baszler, T. V., Blagburn, B.L., Thulliez, P. (1996). Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research,* 57: 329-336

Dubey, J. P., Lindsay, DS. (1993). Neosporosis. *Parasitology Today*, 9(12):452-458

Dubey, J. P., Schares, G. (2011). Neosporosis in animals the last five years. *Veterinary parasitology*, 180(1-2), 90-108. 15. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.031.

Dubey, J. P., Schares, G., Ortega-Mora, L. M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical microbiology reviews*, 20(2), 323-367. doi: 10.1128/CMR.00031-06.

Dubey, J.P., (1999). Recent advances in Neospora and neosporosis. *Veterinary Parasitology*., Ağustos,1 84: 349-367. doi: 10.1016/s0304-4017(99)00044-8

Dubey, J.P., (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal Parasitology*, 41: 1-16. doi: 10.3347/kjp.2003.41.1.1.

Dubey, J. P., Graham, D., de Young, H. R., Dahl, W. E., Eberhard, M. L., Nace, E. K., … Lehmann, T. (2004). Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *Journal of Parasitology*, 90: 67–71. doi: 10.1645/GE-110R.

Dubey, J. P., Zarnke, R., Thomas, N. J., Wong, S. K., Van Bonn, W., Briggs, M., … Thulliez, P. (2003). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, Sarcocystis neurona, and Sarcocystis canis-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology,* 116:275–296. doi: 10.1016/s0304-4017(03)00263-2.

Dubey, J. P., Romand, S., Thulliez, P., Kwok, 0. C., Shen, S. K., Gamble, H. R. (1999). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America. *Journal of Parasitology*, vol. 85, no. 5, pp. 968-969. DOI: 10.2307/3285839.

Dubey, J. P., Lindsay, D.S. (1990a). Neosporosis in dogs. *Veterinary Parasitology*, 36: 147-151

Dubey, J. P., Schares, G. (2006). “Diagnosis of bovine neosporosis”, *Veterinary Parasitology,* 140(1-2), 1-34. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.035.

Dubey, J. P. (1999). “Recent advances in Neospora and neosporosis”, *Veterinary Parasitology,* 84, 349-367. doi: 10.1016/s0304-4017(99)00044-8.

Dubey, J. P. (1998). Refinement of pepsin digestion method forisolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology*, Ocak, 74, 75–77. doi: 10.1016/s0304-4017(97)00135-0.

Dubey, J. P., Buxton, D., Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology,* 134, 267–289. doi: 10.1016/j.jcpa.2005.11.004.

Dubey, J. P., De Lahunta, A., (1993). Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Applied Parasitol*, 34, 229–233.

Dubey, J. P., Hartley, W. J., Lindsay, D. S. (1990a). Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *Journal of the American Veterinary Medicine Assocaiton*, 197, 1043–1044.

Dubey, J. P., Hughes, H. P. A., Lillehoj, H. S., Gamble, H. R., Munday, B. L. (1987). Placental transfer of specific antibodies during ovine congenital toxoplasmosis. *American Journal of Veterinary Rescearch*, 48: 474-476

Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Adams, D. S., McAllister, M. M., Anderson-Sprecher, R., Baszler, T. V., … Uggla, A. (1997). Antibody responses of cowsduring an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescentantibody test and different enzyme-linked immunosorbentassays. *Journal of Parasitology*, 83, 1063–1069.

Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Kwok, O. C. H., Ferreira, L. R., Choudhary, S., Verma, S. K., … Carstensen, M. (2013). Congenital transmission of *Neospora caninum* in white-tailed deer (Odocoileus virginianus). *Veterinary Parasitology,* 196, 519–522. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.004.

Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Ferreira, L. R., Choudhary, S., Verma, S.K., Kwok, O.C.H., … Carstensen, M., (2014). Isolation of viable Neospora caninum from brains of wild gray wolves (Canis lupus). *Veterinary Parasitology*, volume 201, Issues 1–2, 17 Mart 2014, Pages 150-153. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.12.032.

Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J… Choudhary, S. (2011). Gray wolf (Canis lupus) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 27;181(2-4):382-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.018.

Dubey, J. P., Miller, S., Lindsay, D. S., Topper, M. J. (1990f). *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 2: 66-69.

Dubey, J. P., Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 140, 1–34. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.035.

Dubey, J. P., Sreekumar, C., Knickman, E., Miska, K. B., Vianna, M. C. B., Kwok, O. C. H., … Greene, C. E. (2004). Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermatedogs*. International Journal of Parasitology*, 34, 1157–1167.

Dubinsky, P., Reiterova, K., Moskwa, B., Bobakova, M., Durecko, R., Cabaj, W. (2006). *Neospora caninum* as a potential cause of abortions in dairy cows. *Slovenian Veterinary Research*, 31: 175–177. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.008.

Duffield, T. F., Peregrine, A. S., McEwen, B. J., Hietala, S. K., Bagg, R., Dick, P. (2001). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in 25 Ontario dairy herds and its association with periparturient health and production. *Bovine Practititoner*, 35: 8–12.

Duivenvoorden, J., Lusis, P. (1995). Neospora abortions in eastern Ontario dairy herds, The *Canadian Veterinary Journal*, vol. 36, no. 10, p. 623.

Dumanlı, N. ve Aktaş, M., (2010). *Veteriner Protozooloji*, Medisan Yayınevi,Ankara.

Dyer, R. M., Jenkins, M. C., Kwok, O. C. H., Douglas, L. W., Dubey, J. P. (2000). Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy attle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Veterinary Parasitology,* 90: 171–181. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00253-3

Ellis, J.T., Amoyal, G., Ryce, C., Harper, P.A.W., Clough, K.A., Homan, W.L., Brindley, P.J., (1998). Comparison of the largesubunit ribosomal DNA of Neospora and Toxoplasma and development of a new genetic marker for their differentiationbased on the D2 domain. *Moleculer and Celluler Probes,* 12, 1–13. doi: 10.1006/mcpr.1997.0143.

Erol, U., Danyer, E., Tuncer, S., Korkmaz, Ç., Deniz, A. (2019). Atık yapan sığırlarda Anti-*Neospora caninum* antikorlarının yaygınlığının araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi,* Cilt 30, Sayı 1, 78-81, 30.06.2019. https://doi.org/10.35864/evmd.549209.

Estill, C., (2004, Haziran 11-16). In: *Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congresson Neospora-associated Abortion and Field ExperienceWith a Commercial Vaccine in a Dairy Herd*, Quebec City, Canada.

Eşki, F, Ütük, A. E. (2018). Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle in Adana province of Turkey. *Van Veterinary Journal*, 29(2), 93-99.

Ferrari, A., Donofri, G. O, Dellepiane, M., Cabass, C. S. İ, Bigliardi, E., Cavirani, S. (1997). Anticorpi verso *Neospora caninum* in bovine da latte con aborto a carattere enzootico. *Atti della Societa. Italiana di Buiatria,* 29: 223–227.

Fioretti, D. P., Pasquai, P., Diaferia, M., Mangili, V., Rosignoli, L. (2003). *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *Journal of Veterinary Medicine Series B,* 50: 399–404. https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00686.x.

Fioretti, D.P., Rosignoli, L., Ricci, G., Moretti, A., Pasquali, P., Polidori, G.A. (2000). *Neospora caninum* infection in a clinicallyhealthy calf: parasitological study and serological follow-up. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health,* 47, 47–53. doi: 10.1046/j.1439-0450.2000.00304.x.

Fish, L., Mazuz, M., Molad, T., Savitsky, I., Shkap, V. (2007). Isolation of *Neospora caninum* from dairy zero grazing cattle in Israel. *Veterinary Parasitology*, 149, 167–171. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.009

French, N. P., Clancy, D., Davison, H. C., Trees, A. J. (1999). Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *International Journal of Parasitology*, 29: 1691–1704. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00131-9.

Frössling, J., Lindberg, A., Björkman, C. (2006). Evaluation of an iscom ELISA used for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Preventive Veterinary Medicine*, 74:120–129. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.11.012.

Frössling, J., Uggla, A., Björkman, C. (2005). Prevalence and transmission of Neospora caninum within infected Swedish dairy herds. *Veterinary Parasitology*, 128:209–218. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.12.006

Garci´a-Va´zquez, Z., Cruz-Va´zquez, C., Medina-Espinoza, L., Garcı´a- Tapia, D., Chavarria-Martinez, B. (2002). Serological survey of Neospora caninum infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 106:115–120.

Garci´a-Va´zquez, Z., Rosario-Cruz, R., Ramos-Aragon, A., Cruz-Vazquez, C., Mapes-Sanchez, G. (2005). *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology,* 134: 61–65. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.07.007.

Garcia-Melo, D. P., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L. M., Collantes-Fernandez, E., Oliveira, V., Oliveira, M., Silva, A. C. (2009). Isolation and biological characterisation of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. *Acta Parasitology*, 54, 180–185. https://doi.org/10.2478/s11686-009-0018-2

Ghalmi, F., China, B., Jenkins, M., Azzag, N., Losson, B. (2014). Comparison of different serological methods to detect antibodies specific to *Neospora caninum* in bovine andcanine sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 26, 136–140. http://dx.doi.org/10.1177/1040638713515480.

Givens, M. D, Marley, M. S. D. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, 70(3), 270-285. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.

Go´ zdzik, K., Cabaj, W. (2007). Characterization of the first Polish isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Acta Parasitology*, 52, 295–297.

Gondiim, L. F. P, Sartor, I.F., Hasegawa, M., Yamane, I. (1999). Seroprevalance of Neospora caninum in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology*., (1999). 86: 71-75. Doi:10.1016/S0304-4017(99)00129-6.

Gondiim, L. F. P., McAllister, M. M., Anderson-Sprecher, R. C., Björkman, C., Lock, T. F., Firkins, L. D., … Fischer, W. R. (2004). Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *Journal of Parasitology*, 90: 1394–1400. doi: 10.1645/GE-359R.

Gondiim, L.F.P., Gao, L., McAllister, M.M. (2002). Improved productionof Neospora caninum oocysts, cyclical oral transmissionbetween dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *Journal of Parasitology*. 88, 1159–1163. https://doi.org/10.2307/3285488.

Gondiim, L.F.P., McAllister, M.M., Pitt, W.C. and Zemlicka, D.E. (2004a). Coyotes (Canis latrans) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology,* 34, 159-161. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.01.001.

Gonzales, L., Buxton, D., Atxaerandio, R., Aduriz, G., Maley, S., Marco, J.C., Cuervo, L.A. (1999) Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Veterinary Record,* 144:145–150. doi: 10.1136/vr.144.6.145.

Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., Thu¨r, B., Busato, A., Sta¨rk, K. D. C., Müller, N. (1998). Molecular and immuno diagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *International of Journal Parasitology,* 28, 679–691. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00006-X

Greiner, M. (1995a). Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft- EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. *Journal of Immunological Methods*, 185: 145-146. https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00078-O

Greiner, M., Sohr, D., Gobel, P. (1995b) A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal of Immunological Methods,* 185 123-132. doi: 10.1016/0022-1759(95)00121-p.

Greiner, M., Gardner, I.A. (2000). Application of diagnostic tests inveterinary epidemiologic studies. *Prevente Veterinary Medicine,* 45, 43–59. doi: 10.1016/s0167-5877(00)00116-1.

Guimara˜es, J. S., Souza, S. L. P., Bergamaschi, D. P., Gennari, S. M. (2004). Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana´ state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 124:1–8. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.002.

Guy, C. S., Williams, D. J. L., Kelly, D. F., McGarry, J. W., Guy, F., Björkman, C., … Trees, A. J. (2001). *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *The Veterinary Record*, 149:443– 449. DOI: 10.1136/vr.149.15.443.

Haddad, J. P. A., Dohoo, I. R., VanLeewen, J. A. (2005). A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle—a Canadian perspective. *The Canadian* *Veterinary Journa,* 46:230–243.

Haerdi, C., Haessig, M., Sage, H. R., Greif, G., Staubli, D., Gottstei, B. N. (2006). Humoral immune reaction of newborn calves congenitally infected with *Neospora caninum* and experimentally treated with toltrazuril. *Parasitology Research*, 99:534–540. doi: 10.1007/s00436-006-0199-7.

Hall, C. A., Reichel, M. P., Ellis J. T. (2005). Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary Parasitology*, 128:231– 241. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.12.012.

Hamidinejat, H., Shapouri, M. R. S. A., Namavari, M. M., Shayan, P., Kefayat, M., (2015). Development of an indirect ELISA using different fragments of recombinant Ncgra7 for detection of *Neospora caninum* infection in cattle and water buffalo. *Iranian Journal of Parasitology*, 10, 69–77.

Harkins, D., Clements, D. N., Maley, S., Marks, J., Wright, S., Esteban, I., … Buxton, D. (1998) Western blot analysisof the IgG responses of ruminants infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondiii*. *Journal of Comparative Pathology*, 119, 45–55. https://doi.org/10.1016/S0021-9975(98)80070-4

Harmelin, A., Perl, S., Nyska, A., Yakobson, B., Shpigel, N., Orgad, U., Dubey, J. P. (1995). Neosporosis associated bovine abortion in Israel. *Veterinary Record,* 136: 80.

Hartley, W. J., Bridge, P. S. (1975). A case of suspected congenital Toxoplasma encephalomyelitis in a lamb associated with a spinal cord anomaly. *British Veterinary Journal*, 131: 380-384. DOI: 10.1016/s0007-1935(17)35233-8

Hattel, A. L., Castro, M. D., Gummo, J. D., Weinstock, D., Reed, J.A., Dubey, J. P., (1998). Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Veterinary Parasitology,* 74, 307–313. DOI: 10.1016/s0304-4017(97)00158-1.

He, P., Li, J., Gong, P., Liu, C., Zhang, G., Yang, J., … Zhang, X. (2013). *Neospora caninum* surface antigen (p40) is a potential diagnostic marker for cattleneosporosis. *Parasitology Research*, 112, 2117–2120. http://dx.doi.org/10.1007/s00436- 013-3309-3.

Helman, R.G., Stair, E.L., Lehenbauer, T. W., Rodgers, S., Saliki, J. T. (1998). Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasison the distribution of brain lesions in aborted fetuses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigaiton*. 10, 292–295. https://doi.org/10.1177/104063879801000314.

Hemphill, A., Debache, K., Monney, T., Schorer, M., Guionaud, C., Alaeddine, F., … Mueller, J. (2013). Proteins mediatingthe *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 5, 23–36. doi: 10.2741/e593.

Hemphill, A., Gottstein, B. (1996). Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology Research,* 82:497–504. doi: 10.1007/s004360050152.

Heuer, C., Nicholson, C. R., Mun˜oz Bielsa, J., Weston, J. F. (2003, Kasım 17-21). *Epidemiology and* *Economics on Efficacy of a Vaccine Against Neospora caninum Related Abortions in New Zealand Dairy Herds* [Conference Proceedings]. 10th International Symposium for Veterinary, Vina delar, Chile.

Hiasa, J., Kohara, J., Nishimura, M., Xuan, X., Tokimitsu, H., Nishikawa, Y. (2012a). ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation. *Veterinary Parasitology,* 187, 379–385. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.036.

Hiasa, J., Nishimura, M., Itamoto, K., Xuan, X., Inokuma, H., Nishikawa, Y. (2012b). Enzyme-linked immunosorbent assays based on *Neospora caninum* dense granüle protein 7 and profilin for estimating the stage of neosporosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19, 411–417. http://dx.doi.org/10.1128/CVI.05669-11.

Hietala, S. K., Thurmond, M. C. (1999). Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *International of Journal Parasitology,* 29, 1669–1676. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00102-2.

Ho, M. S. Y., Barr, B. C., Rowe, J. D., Anderson, M. L., Sverlow, K. W., Packham, A., … Conrad, P.A. (1997a). Detection of *Neospora sp*. from infected bovine tissues by PCR and probehybridization. *Journal of Parasitology*, 83, 508–514.

Hobson, J. C., Duffield, T. F., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S. K., Leslie, K. E., … Peregrine, A. S. (2002). *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221:1160–1164. doi: 10.2460/javma.2002.221.1160.

Holmdahl, O. J. M., Björkman, D., Uggla, A. (1995). A case of Neospora associated bovine abortion in Sweden. *Acta Veterinary Scandinavica,* 36: 279-281. doi: 10.1186/BF03547697.

Horacio L., Agustín, S., Alejandro, R., Joaquín, A., Franco, F., Ángel, B., … Dadín M. (2019). Controlling Endemic *Neospora caninum-*Related Abortions in a Dairy Herd From Argentina. *Fronteirs in veterinary science,* 12 December 2019 doi: 10.3389/fvets.2019.00446.

Hornok, S., Na¨slund, K., Hajto´s, I., Tanyi, J., Tekes, L., Varga, I., … Björkman, C. (1998). Detection of antibodies to *Neospora caninum* in bovine postabortion blood samples from Hungary. *Acta Veterinary Hungarica*. 46:431– 436.

Hornok, S., Edelhofe, R., Hajto, I. (2006). Seroprevalence of neosporosis in beef and dairy cattle breeds in Northeast Hungary *Acta Veterinary Hungarica*, 54: 485–491. doi: 10.1556/AVet.54.2006.4.6.

Hamıdınejat, H., Shapouri M. R. S. A., S., Namavari, M. M., Shayan, P., Kefayat, M. (2015). Development of an Indirect ELISA Using Different Fragments of Recombinant Ncgra7 for Detection of *Neospora caninum* Infection in Cattle and Water Buffalo. *Iran Journal of Parasitology*, 2015 Jan-Mar; 10(1): 69–77.

Howe, D. K., Crawford, A. C., Lindsay, D., Sibley, L. D. (1998). Thep29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, 66, 5322–5328. DOI: 10.1128/IAI.66.11.5322-5328.1998

Hu, J., Ferroglio, E., Trisciuoglio, A. (2011). Immunoblot diagnosis of infection with *Neospora caninum* in cattle based on recombinant NcSAG4 Antigen. *Parasitology Research*, 108, 1055–1058. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2286-7.

Huong, L. T., Ljungstro¨m, B. L., Uggla, A., Björkman, C. (1998). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Veterinary Parasitology*, 75:53–57. doi: 10.1016/s0304-4017(97)00178-7.

Hur, K., Kim, J. H., Hwang, W. S., Hwang, E. K., Jean, Y. H., Lee, B. C., … Kim, D. Y. (1998). Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in Korean dairy cattle by indirect immunofluroescent antibody assay. *Korean Jorunal of Veterinary Research,* 38:859–866.

Imre, K., Morariu, S., Ilie, M. S., Imre, M., Ferrari, N., Genchi, C., Darabus, G. (2012). Serological survey of *Neospora caninum* infection in cattle herds from western Romania. *Journal of Parasitology*, 98, 683-685. doi: 10.1645/GE-3023.1.

Innes, E. A., Wright, S. E., Maley, S. (2001). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 2001; 31: 1523-1534. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00284-3.

Innes, E. A., Bartley, P. M., Maley, S. W., Wright, S. E. and Buxton, D. (2007). Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine,* 5495-5503, 2007. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.044.

İbrahim A. M. E., Elfahal, A. M., Hussein, A.R.M.E. (2012). First report of *Neospora caninum* infection in cattle in Sudan. *Tropical Animal Health Produciton*, 44, 769-772. https://doi.org/10.1007/s11250-011-9963-5.

İça, A., Yıldırım, A., Düzlü, Ö., İnci, A. (2006). Kayseri yöresinde sığırlarda *Neospora caninum*’un seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30(2), 92-94.

Jacobson, R., (1996, Eylül, 8-15) *Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases.* In Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, Commission, O.I.E.S. Office International de Epizooties: Paris.

Jardine, J. E., Last, R.D. (1993). *Neospora caninum* in aborted twin calves. *Journal of the South Africa Veterinary Association*, 64: 101-102.

Jenkins, M. C., Parker C., Hill, D., Pinckney, R. D., Dubey, J. P. (2007). *Neospora caninum* detected in wild rodents. *Veterinary Parasitology,* 143:161–165.

Jenkins, M., Baszler, T., Björkman, C., Schares, G., Williams, D. (2002). Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum* associatedbovine abortion. *International of Journal Parasitology,* 32, 631–636. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00363-0.

Jenkins, M. C., Caver, J. A., Björkman, C., Anderson, T.C., Romand, S., Vinyard, B., … Dubey, J. P. (2000). Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern UnitedStates. *Veterinary Parasitology,* 94, 17–26. DOI: 10.1016/s0304-4017(00)00373-3

Jenkins, M. C., Wouda, W., Dubey, J. P. (1997). Serological responseover time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattleafter a neosporosis-induced abortion. *Clinical Diagnosis Laboratory Immunology,* 4, 270–274. doi: 10.1128/cdli.4.3.270-274.1997.

Jensen, A. M., Björkman, C., Kjeldsen, A. M., Wedderkop, A., Willadse, C., Uggla, A., Lind P. (1999). Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prevente Veterinary Medicine,* 40:151–163. DOI: 10.1016/s0167-5877(99)00048-3

Jiménez-Ruiz, E., Álvarez-García, G., Aguado-Martínez, A., Salman, H., Irache, J. M., Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L. M. (2012). Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-e{open}-caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice. *Vaccine, 30*, 4983–4992. http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.033.

Jin, C., Yu, L., Wang, Y., Hu, S., Zhang, S. (2015). Evaluation of *Neospora caninum* truncated dense granule protein 2 for serodiagnosis by enzyme-linkedimmunosorbent assay in dogs. *Experimental Parasitology,* 157, 88–91. http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.07.003.

Kamga-Waladjo, A. R., Gbati, O. B., Kone, P., Lapo, R. A., Chatagnon, G., Bakou, S. N., … Tainturier, D. (2010). Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar–Senegal, West Africa. *Tropical animal health and production*, 42(5), 953-959. 22. DOI: 10.1007/s11250-009-9513-6

Kashiwazaki, Y., Gianneechini, R. E., Lust, M., Gil, J. (2004). Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology,* 120: 139–144. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.01.001.

Kashiwazaki, Y., Pholpark, S., Charoenchai, A., Polsar, C., Teeverapanya, S., and Pholpark, M. (2001). Postnatal neosporosis in dairy cattle in northeast Thailand. *Veterinary Parasitology*, 94:217–220.

Kefayat, M., Hamidinejat, H., Seifiabadshapoori, M. R., Namavari, M. M., Shayan, P., Gooraninejad, S. (2012). Cloning and expression of *Neospora caninum* dense-granule 7 in *E. coli*. *Journal of Parasitic Diseases*, 38, 196–200. http://dx.doi.org/10.1007/s12639-012- 0221-1.

Kim, J. H., Lee, J. K., Hwang, E. K., Kim, D. Y. (2002). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle, *The Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 64, no. 10, pp. 941-943. doi: 10.1292/jvms.64.941.

Kim, J. H., Hwang, E. K., Sohn, H. J., Jean, Y. H., Yoon, S. S., Kim, D. Y. (1998b). Repeated bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*, 38, 853–858.

Kim, J. H., Sohn, H. J., Hwang, E. K., Hwang, W. S., Hur, K., Jean, Y. H., … Kim, D. J. (1998a). In vitro isolation of a bovine Neospora in Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*. 38, 139–145.

Kim, J. H., Sohn, H. J., Hwang, W. S., Hwang, E. K., Jean, Y. H., Yamane, I., Kim, D. Y., (2000). In vitro isolation and characterization of bovine Neospora caninum in Korea. *Veterinary Parasitology*, 90, 147–154. DOI: 10.1016/s0304-4017(00)00224-7.

Klein, F., Ould-Amrouche, A., Osdoit C., Touratier, A., Sanaa, M. (2000). *Neospora caninum*: une enqueˆte se´roe´pide´miologique dans l’Orne. *Bulletin GTV*, 7:41–45.

Klein, F., Hietala, S. K., Berthet, H., Very, P., Gradinaru, D. (1997). *Neospora caninum*: enqueˆte se´rologique sur les avortements des bovins normands et charolais. *Le Point Veterinaire*, 28:1283–1286.

Klun, I., Ćirković, V., Maletić, M., Bradonjić, S., DjurkovićDjaković, O. (2019). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection and associated risk factors in dairy cattle in Serbia. *Parasitology Research*, 1-9., 3.

Koiwai, M., Hamaoka, T., Haritan, M., Shimizu, S., Tsutsui, T., Eto, M., Yamane, I. (2005). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan. *Veterinary Parasitology,* 130:15–18. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.03.009.

Koiwai, M., Hamaoka, T., Haritan, M., Shimizu, S., Zeniya, Y., Eto, M., … Yamane, I. (2006). Nationwide seroprevalence of *Neospora caninum* among dairy cattle in Japan. *Veterinary Parasitology*, 135:175–179. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.08.014.

Kritzner, S., Sager, H., Blum, J., Krebber, R., Greif, G., Gottstein, B. (2002). An explorative study to assess the efficacy ofToltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,* 1, 4. doi: 10.1186/1476-0711-1-4.

Kul, O, Kabakci N, Yildiz, K., Ocal, N., Kalender, H., İlkme, N., A. (2009): *Neospora caninum* associated with epidemic abortions in dairy cattle: The first clinical neosporosis report in Turkey*. Veterinary Parasitology*, 159, 69-72. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.019. Epub 2008 Oct 15.

Kul, O. (2012). Epidemiology and Pathogenesis of *Neospora caninum* Infection: Special Emphasis to Neosporosis Status of Turkey. *Animal Health, Production and Hygiene*, 1(2), 70-79, 2012.

Kula, D., Gökpınar S. (2021). Oğuzlar Yöresindeki Sığırlarda *Neospora caninum* ve *Besnoitia besnoiti*’nin Seroprevelansı. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*. 45(2):108-112.

Kurtdede, A., Küplülü, S., Ural, K., Cingi, Ç. C., Guzel, M., Karakurum, M. C., Haydardedeoglu, A. E. (2006). Serodiagnosis of bovine neosporosis with immunocomb assay in Ankara region. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 53:207–209.

Kuruca, L., Spasojević-Kosić, L, Simin, S., Savović, M., Laus, S., Lalosević, V. (2013). *Neospora caninum* antibodies in dairy cows and domesic dogs from Vojvodina, Serbia. *Parasite*, 20, 40. doi: 10.1051/parasite/2013036.

Köse O., Adanır, R., Kocamüftüoğlu, M., Çetin, Y. (2021). Investigation of Neospora caninum Seroprevalence and Association with Reproductive Problems in Cows in Burdur Province of Turkey. *Iran Journal of Parasitol*ogy. Jul-Sep; 16(3): 386–393. doi: 10.18502/ijpa. v16i3.7091.

Kyaw, T., Virakul, P., Muangya, M., Suwimonteerabutr, J. (2004). *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle in central Thailand. *Veterinary Parasitology*, 121:255–263.

Lally, N. C., Jenkins, M. C., Dubey, J. P. (1996). Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an ELISA for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1996; 3: 275-279.

Landmann, J. K., Jillella, D., O’Donoghue, P. J., McGowan, M. R., (2002). Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *AustralianVeterinary Journal.* 80, 502–503.

Langoni, H., Matteucci, G., Medici, B., Camossi, L. G., Richini-Pereira, V. B., Da Silva, R. C. (2012). Detection and molecular analysis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* from dogs with neurological disorders. *Revista da Sociedade Brasileria de Medicina Tropical*, 45, 365–368.http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000300016.

Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., Brownlie, J. (2014) Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal,* 199,201– 209.dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024.

Latham, S. M. (2003) *The epidemiology of Neospora caninum*, PhD thesis. University of Glasgow, İngiltere.

Lehenbauer, T. W., Rodgers, S. J., Helman, R. G., Saliki, J. T. (1998). Epidemiology of *Neospora caninum* infection in Oklahoma beef and dairy cattle. Proc. 31st Ann. Conv. *American Assocation of Bovine Practitioner*, 31:225.

Lei, Y., Davey, M., Ellis, J.T. (2005). Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial andfibroblast cell lines in vitro. *Parasitology,* 131, 583–590. doi: 10.1017/S0031182005008310.

Li, W., Liu, J., Wang, J., Fu, Y., Nan, H., Liu, Q. (2015). Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. *Parasitology* *Research,* 2893–2902.http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4490-3.

Liao, M., Xuan, X., Huang, X., Shirafuji H., Fukumoto, S., Hırata H., Suzuki H., Fujisaki K., (2005). Identification and characterization of cross-reactive antigens from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 130(Pt 5):481-8. doi: 10.1017/s0031182004006948.

Lindsay, D. S., Butler, J. M., Blagburn, B. L. (1997). Efficacy of decoquinate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. *Veterinary Parasitology,* 68, 35–40. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01054-0

Lindsay, D. S., Butler, J. M., Rippey, N. S., Blagburn, B. L. (1996). Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolatereductase/thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine. *American Journal of Veterinary Research,* 57,68–72.

Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Duncan, R. B., (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology,* 82:327–333. DOI: 10.1016/s0304-4017(99)00054-0.

Lindsay, D. S. (1999). *International Journal for Parasitology*, 29 https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00121-6.

Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1989). In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *Journal of Parasitology*, 75, 163–165. https://doi.org/10.2307/3282960.

Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1989c). Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research*, 50: 1981-1983.

Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Dubey, J. P. (1992). Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *Journal of Parasitology*, 78: 70-72. https://doi.org/10.2307/3283689.

Lo´pez-Gatius, F., Garcı´a-Ispierto, I., Santolaria, P., Ya´niz, J. L., Lo´pez- Be´jar, M., Norgareda, C., Almerı´a, S., (2005). Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. *Journal of Veterinay Medicine B,* 52:147–152.

Lo´pez-Gatius, F., Lo´pez-Be´jar, M., Murugavel, K., Pabo´n, M., Ferrer, D., Almerı´a, S. (2004). Neospora-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *Journal of Veterinay Medicine B,* 51:348–352.

Lo´pez-Gatius, F., Pabo´n, M., Almerı´a, S. (2004). *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology,* 62:606–613.

Lo´pez-Gatius, F., Santolaria, P., Ya´niz, J. L., Garbayo, J. M., Almerı´a, S. (2005). The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in Neospora seropositive dairy cows. *Journal of Veterinay Medicine B*, 52:88–92

Locatelli-Dittrich, R., Richartz, R. R. T. B., Gasino-Joineau, M. E., Pinckney, R. D., de Sousa, R. S., Leite, L. C., Thomaz-Soccol, V. (2003). Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana´, southern Brazil. *Veterinary Record*, 153, 366–367.

Locatelli-Dittrich, R., Thomaz-Soccol, V., Richartz, R.R.T.B., Gasino-Joineau, M.E., van der Vinne, R., Pinckney, R.D. (2004). Isolamento de Neospora caninum de feto bovino de rebanho leiteiro no Parana´. *Revista Brasileria de Parasitologia Veterinaria,* 13,103–109.

Locatelli-Dittrich, R., Thomaz-Soccol, V., Richartz, R.R.T.B., Gasino-Joineau, M. E., van der Vinne R., Silva, R., Leite, L. C., … Pinckney, R. (2001). Detecc¸a˜o de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras e bezerros no estado do Parana´. *Archives of Veterinary Science,* 6:37–41.

Lopez-Gatius, F., Almeria, S., Donofrio, G., Nogareda, C., Garcia-Ispierto, I., Bech-Sabat, G., Santolari, P., … Beckers, J. F. (2007). Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology,* 68:1067-1073.

Lv, Q., Xing, S., Gong, P., Chang, L., Bian, Z., Wang, L., … Li, J. (2015). A 78 kDa host cell invasion protein of *Neospora caninum* as a potential vaccine candidate. *Experimental Parasitology*, 148, 56–65. http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.10.006.

MacHugh, L. M. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica (Zagreb)*,22(3):276-82.

Magnino, S., Vigo, P. G., Fabbi, M., Colombo, M., Bandi, C., Genchi, C. (1999). Isolation of a bovine Neospora from a newborn calf in Italy. *Veterinary Record*, 144:456.

Magnino, S., Vigo, P.G., Bandi, C., Bazzocchi, C., Fabbi, M., Genchi, C. (2000). Small-subunit rDNA sequencing of the Italianbovine *Neospora cani*num isolate (NC-PV1 strain). *Parassitologia,* 42, 191–192.

Mainar-Jaime, R. C., Thurmond, M. C., Berzal-Herranz, B., Hietala, S. K. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Veterinary Record*, 145:72–75. doi: 10.1136/vr.145.3.72.

Mansilla, F. C., Franco-Mahecha, O. L., Lavoria, M. A., Moore, D. P., Giraldez, A. N., Iglesias, M. E., … Capozzo, A. V. (2012) The immune enhancement of a novel soy lecithin/beta-glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. *Vaccine, 30*, 1124–1131. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.007.

Marcos, E. S., M., Cesar A. B. C., Roberto C. E. R., Marco A. Q. H., Alessandra M. B., Luis A. L. A. (2019). Evaluation of abortions spontaneously induced by *Neospora caninum* and risk factors in dairy cattle from Lima, Peru. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 28, n. 2, p. 215-220, apr.-june 2019 Doi: https://doi.org/10.1590/S1984-29612019026.

Marsh, A. E., Barr, B. C., Sverlow, K., Ho, M., Dubey, J. P., Conrad, P. A. (1995). Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine Neospora to similar coccidial parasites. *Journal of Parasitology*, 81, 530–535.

Mayhew, I. G., Smith, K. C., Dubey, J. P., Gatward, L. K., McGlermon, N. J. (1993). Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. *Journal of Small Animal Practice,* 1991; 32: 609-612. https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1991.tb00902.x

Mboloi, M. M., Bekker, C. P. J., Kruitwagen, C., Greiner, M. and Jongejan, F. (1999) Validation of the indirect MAP-1B enzyme-linked immonosorbent assay for diagnosis of experimental Cowdria ruminantium infection in small ruminants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 66-72. DOI: 10.1128/CDLI.6.1.66-72.1999.

McAIiister, M. M., Huffman, E. M., Hietala, S. K., Conrad, P. A., Anderson, M. L. Salman, M. O. (1996a). Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8: 355-357. DOI: 10.1177/104063879600800313.

McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A., McGuire, A. M. (1998), Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology*, vol. 28, no. 9, pp. 1473-1478.

McAllister, M., Huffman, E. M., Hietala, S. K., Conrad, P. A., Anderson, M. L., Salman, M. D. (1996a). Evidence suggesting a pointsource exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 355–357.

McAllister, M. M., Björkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D. G. (2000). Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Parasitology Today,* 217, 881–887. DOI: 10.1016/s0169-4758(00)01831-7.

McAllister, M. M., Parmley, S. F., Weiss, L. M., Welch, V. J., McGuire, A. M. (1996b). An immunohistochemical method fordetecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii* infected tissue*s* cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *Journal of Parasitology*, 82, 354–355.

McGuire, A. M., McAllister, M. M., Jolley, W. R. (1997). Separation and cryopreservation of *Neospora caninum* tissue cysts frommurine brain. *Journal of Parasitology*, 83, 319–321.

Mclntosh, D. W., Haines, D. M. (1994). Neospora infection in an aborted fetus in British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal*, 35: 114-115.

McNamee, P. T., Trees, A. I., Guy, F., Moffett, D., Kilpatrick, D. (1996). The diagnosis and prevalence of neosporosis in Northern Ireland cattle. *Veterinary Record*, 138: 419-420. doi: 10.1136/vr.138.17.419.

Medina-Esparza, L., Regidor-Cerrillo, J., García-Ramos, D., Álvarez-García, G., Benavides, J., Ortega-Mora, L. M., Cruz-Vázquez, C. (2016). Genetic characterization of *Neospora caninum* from aborted bovine foetuses in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology,* 228, 183–187. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.009.

Mele´ndez, J. A. S., Garcı´a, J. J. M., Ramos, J. J. Z., Valde´s, V. M. R., Vidal, G. H., Aranda, G. D., Romero, R. R., Alejo, L. C. G., Ramı´rez, R. A´. (2005). Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ganado bovino del noreste de Me´xico. *Veterinari Mexico*, 36:303–311.

Melo, D. P. G., Silva, A. C., Ortega-Mora, L. M., Bastos, S. A., Boaventura, C. M. (2006). Prevaleˆncia de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregio˜es de Goiaˆnia e Ana´polis, Goia´s, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,* 15:105–109.

Metz, C. E. (1998). ROCKIT *0.9B. Beta Version*, www-radiology.uchicago. edu/krl/toppage11.htm.

Miller, C., Quinn, H., Ryce, C., Reichel, M. P., Ellis, J. T. (2005). Reduction in transplacentaltransmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. *International of Journal Parasitology,* 35:821– 828. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.03.006.

Miller, C. M., Quinn, H. E., Windsor, P. A., Ellis, J. T. (2002). Characterisation of the first Australianisolate of *Neospora caninum* from cattle. *Australian Veterinary Journal,* 80, 620–625. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2002.tb10967.x.

Mineo, T. W. P., Alenius, S., Na¨slund, K., Montassier, H. J., Björkman, C. (2006). Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,* 15:188–192.

Minervino, A. H. H., Cassinelli, A. B. M., de Lima, J. T. R., Soares, H. S., Malheiros, A. F., Marcili, A., Gennari, S. M. (2012). Prevalence of anti- *Neospora caninum* and anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from two different indigenous communities in the Brazilian Amazon Region. *Journal of Parasitology*, 98, 1276–1278. http://dx.doi.org/10. 1645/GE-3151.1.

Moen, A. R., Wonda, W. (1995, Kasım, 8). *Field experiences with bovine Neospora abortion in Dutch dairy herds.* Proceedings, Symposium Neospora Abortus Bij Het Rund,Morra 2, Drachten, pp.11-17.

Moen, A. R., Wouda, W., van Werven, T. (1995a, Aralık, 13). *Clinical and sero-epidemiological follow-up study in four dairy herds with an outbreak of Neospora abortion. Proc.* Dutch Society for Veterinary Epidemiology and Economics. Lelystad, pp. 93-103.

Moore, D. P. (2005). Neosporosis in South America. *Veterinary Parasitology,* 127:87–97. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.10.001.

Moore, D. P., Campero, C. M., Odeo´n, A. C., Posso, M. A., Cano, D., Leunda, M. R., … Spa¨th, E. (2002). Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Veterinary Parasitology,* 107:303–316. Doi: 10.1016/s0304-4017(02)00129-2

Moore, D. P., Echaide, I., Verna, A. E., Leunda, M. R., Cano, A., Pereyra, S., … Campero, C. M. (2011) Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. *Veterinary Parasitology*, 175, 245–251. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.020.

Moore, D. P., Leunda, M. R., Zamorano, P. I., Odeo´n, A. C., Romera, S. A., Cano, A., … Campero, C. M., (2005). Immune response to *Neospora caninum* in naturallyinfected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigenduring the second trimester of gestation. *Veterinary Parasitology*, 130, 29–39. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.03.010.

Mor, N., Akça, A. (2012). Kars Yöresinde sığır ve köpeklerde *Neospora caninum* üzerine epidemiyolojik araştırmalar: gruplar arası çalışma. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18, 193-199.

Morales, E., Trigo, F. J., Ibarra, F., Puente, E., Santacruz, M. (2001). Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13:413–415. doi: 10.1177/104063870101300508.

Moraveji, M., Hosseini, A., Moghaddar, N., Namavari, M. M., Eskandari, M. H., (2012). Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Veterinary Parasitology*, Volume 189, Issues 2–4, 26, Pages 211-217. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.010.

Munhoz, A. D., Silva, W., Flausino, R. T., Almeida, C. R. R., Lopes, C. W. G. (2006). Distribuic¸a˜o de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras dos municı´pios de Resende e Rio Claro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 15:101–104.

Nazir, M. M., Maqbool. A., Khan, M. S., Sajjid, A., Lindsay, D. S. (2013). Effects of age and breed on the prevalence of *Neospora caninum* in commercial dairy cattle from Pakistan. *Journal of Parasitology*, 99, 368-370. 28. doi: 10.1645/GE-3173.1.

Nietfeld, J. C., Dubey, J. P., Anderson, M. L., Libal, M. C., Yaeger, M. J., Neiger, R. D. (1992). Neospora-like protozoan infection as a causeof abortion in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 4, 223–226. doi: 10.1177/104063879200400228.

Nishikawa, Y., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikam I. T. (2000) Monoklonak antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. *International Journal For Parasitology,* 30: 51-58. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00162-9.

Nishikawa, Y., Kousaka, Y., Tragoolpua, K., Xuan, X., Makala, L., Fujisaki, K., Mikami, T., Nagasawa, H., (2001c). Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of Neospora infection. *Journal Of Clinical Microbiology*, 39, 3987–3991. doi: 10.1128/JCM.39.11.3987-3991.2001.

Nishikawa, Y., Mikami, T., Nagasawa, H. (2002). Vaccine development against Neospora caninum infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(1):1-5. doi: 10.1292/jvms.64.1.

Njiro, S. M., Kidanemariam, A.G., Tsotetsi, A. M., Katsande, T. C., Mnisi, M., Lubisi, B. A, … Williams, R. (2011). A study of some infectious causes of reproductive disorders in cattle owned by resourcepoor farmers in Gauteng Province, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 82(4), 213-218. DOI:10.4102/jsava. v82i4.76.

Ogawa, L., Freire, R. L., Vidotto, O., Gondiim, L. F. P., Navarro, I. T. (2005). Occurrence of antibodies to Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Parana´ State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57:312–316. https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000300006.

Ogino, H., Watanabe, E., Watanabe, S., Agawa, H., Narita, M., Haritani, M. Kawashima, K. (1992). Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. *Journal of Comparative Pathology*, 107: 231-237. https://doi.org/10.1016/0021-9975(92)90039-W.

Okeoma, C. M., Williamson, N. B., Pomroy, W. E., Stowell, K. M., Gillespie, L. M. (2004b). Isolation and molecular characterisation of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal,* 52, 364–370. doi: 10.1080/00480169.2004.36453.

Oliveira, D. S., Rodrigo M. S., Juliana A., Herbert S. S. (2017). Isolation and biological and molecular characterization of *Neospora caninum* (NC-SP1) from a naturally infected adult asymptomatic cattle (Bos taurus) in the state of São Paulo, Brazil. *Parasitology*, 144(6):1-5. doi: 10.1017/S0031182016002481.

Ooi, H. K., Huang, C. C., Yang, C. H., Lee, S. H. (2000). Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. *Veterinary Parasitology,* 90:47–55. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00211-9.

Ortega, Y. R., Torres, M. P., Mena, K. D. (2007). Presence of *Neospora caninum* specific antibodies in three dairy farms in Georgia and two in Texas. *Veterinary Parasitology*, 144:353–355. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.09.040.

Osawa, T., Wastling, J., Acosta, L., Ortellado, C., Ibarra, J., Innes, E. A. (2002). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Veterinary Parasitology,* 110:17–23. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00309-6.

Osawa, T., Wastling, J., Maley, S., Buxton, D., Innes, E.A. (1998). A multiple antigen ELISA to detect Neospora-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Veterinary Parasitology,*  79, 19-34, 1998. doi: 10.1016/s0304-4017(98)00156-3.

Otranto, D., Llazari, A., Testini, G., Traversa, D., di Regalbono, A. F., Badan, M., Capelli, G. (2003). Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary Parasitology* 118:7–18. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.10.008.

Otter, A. Griffiths, I. B., Jeffrey, M. (1993). Bovine *Neospora caninum* abortion in the UK. *Veterinary Record*, vol. 133, no. 15, p. 375. doi: 10.1136/vr.133.15.375-b.

Otter, A. Jeffrey, M. Griffiths, I. B., Dubey, J. P. (1995). A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Veterinary Record*, vol. 136, no. 24, pp. 602-606. doi: 10.1136/vr.136.24.602.

Otter, A., Jeffrey, M., Scholes, S. F. E., Helmick, B., Wilesmith, J. W., Trees, A. J. (1997). Comparison of histology with maternal andfetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Veterinary Record*, 141, 487–489. doi: 10.1136/vr.141.19.487.

Ould-Amrouche, A., Klein, F., Osdoit, C., Mohamed, H. O., Touratier, A., Sana, M., Mialot, J. P. (1999). Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Veterinary Research,* 30:531–538.

Öcal, N., Atmaca, H. T., Albay, M. K., Deniz, A., Kalender, H., Yildiz, K., Kul, O. (2014). A new approach to *Neospora caninum* infection epidemiology: neosporosis in integrated and rural dairy farms in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,* 38(2), 161-168. https://doi.org/10.3906/kim-1204-50.

Öncel, T., Bıyıkoğlu, G. (2003). Sakarya yöresi süt sığırlarında *Neosporosis caninum*. *Uludağ Üniversitesi Journal of Veterinary Medicine,* 22, 1-2.

Pan, H., Na Y., Xia C., Jing L., Daoyu Y., Qun, L. (2014). Fırst ısolatıon of *Neospora canınum* from blood of a naturally ınfected adult daıry cow ın Beıjıng, Chına. *The Journal of Parasitology*, Vol. 100, no. 6 (december 2014), pp. 812-816. doi: 10.1645/14-498.1.

Pan, Y., Jansen, G. B., Duffield, T. F., Hietala, S., Keltoni D., Lin, C. Y., Peregrine, A. S. (2004). Genetic susceptibility to *Neospora caninum* infection in Holstein cattle in Ontario. *Journal of Dairy Science*, 87:3967–3975. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73537-7.

Pare, J. Hietala, S. K., Thurmond, M. C. (1995). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of Neospora sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,*  vol. 7, no. 3, pp. 352-359.

Pare´, J., Fecteau, G., Fortin, M., Marsolais, G. (1998). Seroepidemiologic study of Neospora caninum in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association,*  213: 1595–1598.

Pare´, J., Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1994). Congenital Neospora infection in dairy cattle. *Veterinary Record*, 134:531–532. DOI:10.1136/vr.134.20.531.

Pare´, J., Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1996). Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calf hood mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research,* 60:133–139.

Pare´, J., Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1997). Neospora caninum antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *Journal of Parasitology*, 83:82–87.

Patitucci, A. N., Pe´rez, M. J., Israel, K. F., Rozas, M. A. (2000). Prevalencia de anticuerpos se´ricos contra *Neospora caninum* en dos reban˜os lecheros de la IX regio´n de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 32:209–214. http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2000000200008.

Pe´rez-Zaballos, F. J., Ortega-Mora, L. M., Alvarez-Garcia, G., Collantes-Ferna´ndez, E., Navarro-Lozano, V., Garcı´a-Villada, L., Costas, E. (2005). Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *Journal of Parasitology*, 91, 507–510. doi: 10.1645/GE-381R1.

Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozalo, A., Perez-Perez, V., Espi-Felgueroso, A., A ´ lvarez, G., Collantes-Ferna´ndez, E., Ortega-Mora, L.M. (2003). Evaluation by different diagnostic techniquesof bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain.*Veterinary Parasitology,* 111, 143–152. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00361-8.

Pfeiffer, D. U., Williamson, N. B., Reichel, M. P. (2000*). Long-term serological monitoring as a tool for epidemiological investigation of* Neospora caninum *infection in a New Zealand dairy herd, p. 616–618.* Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge, CO

Piagentini, M., Moya-Araujo, C.F., Prestes, N.C., Sartor, I.F. (2012). *Neospora caninum* infection dynamics in dairy cattle. *Parasitology Research,* 111, 717–721. http://dx.doi.org/ 10.1007/s00436-012-2891-0.

Pinheiro, F. A., Borsuk, S., Berne, A. M., Pinto S. L., Andreotti, R., Roos, T., …. Leivas F. P. L. (2013). Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in Pichiapastoris and its application for serodiagnosis of Neospora infection. *Pathogens*, GlobalHealth 107, 116–121. http://dx.doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000082.

Pinheiro, F. A., Borsuk, S., Berne, A. M., Pinto S. L., Andreotti, R., Roos, T., …. Leivas F. P. L. (2015). Use of ELISA based on NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in Pichia pastoris for diagnosing neosporosis in sheep and dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology,* 24, 148–154. http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015015.

Pişkin, F. Ç., Ütük, A. E. (2009). Ölü doğum ve abort yapan ineklerde *Neospora caninu*m prevalansı. *Etlik Veteriner Mikrobiyoojl Dergisi,* 20, 23-26.

Pitel, P. H., Pronost, S., Chatagnon, G., Tainturier, D., Fortier, G., Ballet, J. J. (2001). Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of N. caninum in cattle and dogs. *Veterinary Parasitology*,102:269–277. oi: 10.1016/s0304-4017(01)00544-1.

Pitel, P. H., Pronost, S., Legendre, M. F., Chatagnon, G., Tainturier, D., Fortier, G. (2000). Infection des bovins par *Neospora caninum*: deux anne´es d’observations dans l’Ouest de la France. *Le Point Vétérinaire,* 31:53–58.

Qian, W., Wang, T., Yan, W., Han, L., Zhai, K., Duan, B., Lv, C. (2016). Occurrence and first multilocus microsatellite genotyping of *Neospora caninum* from naturally infected. *Parasitology Research,* 115, 3267–3273. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5142-y.

Quinn, H. E., Ellis, J. T., Smith, N. C. (2002) *Neospora caninum* a cause of immune-mediated failure of pregnancy. *Trends in Parasitology*, 2002; 18: 391-394. DOI: 10.1016/s1471-4922(02)02324-3.

Quintanilla-Gozalo, A., Pereira-Bueno, J., Tabare´s, E., Innes, E. A., Gonza´lez-Paniello, R., Ortega-Mora, L. M. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *International of Journal Parasitology,* 29:1201–1208. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00084-3.

Quintanilla-Gozalo, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L.M. (2000). Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection–abortion and gestational antibody fluctuations*. International of Journal Parasitology,* 30, 900–906.

Raafat, M. S. (2016). The common zoonotic protozoal diseases causing abortion. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4):1116–1129.

Ragozo, A. M. A., Paula, V. S. O., Souza, S. L. P., Bergamaschi, D. P., Gennari, S., M. (2003). Ocorreˆncia de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados Brasileiros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12:33–37.

Razmi, G. R., Mohammadi, G. R., Garrosi, T., Farzaneh, N., Fallah, A. H., Maleki, M. (2006). Seroepidemiology of Neospora caninum infection in dairy cattle herds in Mashhad area, Iran. *Veterinary Parasitology,* 135:187–189. oi: 10.1016/j.vetpar.2005.09.004.

Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Pereira-Bueno, J., Aduriz, G., Navarro-Lozano, V., Risco-Castillo, V., … Ortega-Mora, L.M. (2008). Isolation and genetic characterizationof *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. *Parasitology,* 135, 1651–1659. doi: 10.1017/S003118200800509X.

Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Dı´az, S., Go´mez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M. (2006). Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *Journalof Parasitology,* 92, 517–524. doi: 10.1645/GE-713R.1.

Reichel, M. P., Ellis, J. T. (2006.) If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense. *Veterinary Parasitology*, 142:23–34. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.027.

Reichel, M. P., Ellis, J. T. (2009). *Neospora caninum*—how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle. *International of Journal Parasitology,* 39:1173–1187. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.007

Reichel, M. P. (2000) *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Australian Veterinary Journal*, (2000); 78: 258-261. 5. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb11751.x.

Reichel, M. P. (1998). Prevalence of Neospora antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. *New Zealand* *Veterinary Journal,* 46:38. https://doi.org/10.1080/00480169.1998.36049.

Reichel, M. P., Alejandra Ayanegui-Alcerreca, M., Gondiim, L. F., Ellis, J. T. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question. *International Journal for Parasitology,* 43, 133–142. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022.

Reichel, M. P., Ellis, J. T. (2002). Control options for *Neospora caninum* infections in cattle—current state of knowledge. *New Zealand* *Veterinary Journal,*50:86–92

Reichel, M. P., Ellis, J. T., Dubey, J. P. (2007). Neosporosis and hammondiosis in dogs. *Journal of Small Animal Practice,* 48, 308–312.doi: 10.1111/j.1748-5827.2006.00236.x.

Reichel, M. P., Thornton, R. N., Morgan, P. L., Mills, R. J., Schares, G. (1998). Neosporosis in a pup. *New Zealand Veterinary Journal,* 46, 106–110. doi: 10.1080/00480169.1998.36069.

Reichel, M. P., Drake, J. M., (1996). The diagnosis of Neospora abortions in cattle. *New Zealand Veterinary Journal,* 44, 151–154. https://doi.org/10.1080/00480169.1996.35960

Reichel, M. P., Pfeiffer, D. U. (2002). An analysis of the performance characteristics ofserological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 107, 197–207. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00086-9.

Reiterova, K., ˇSpilovska, S., ˇCobadiova, A., Mucha, R. (2011). First in vitroisolation of *Neospora caninum* from a naturally infected adult dairycow in Slovakia. *Acta Parasitologica*, 56, 111–115.

Rinaldi, L., Fusco, G., Musella, V., Veneziano, V., A. Guarino, Taddei, R., Cringoli, G., (2005). *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. *Veterinary Parasitology,* 128:219–230.

Risco-Castillo, V., Marugán-Hernández, V., Fernández-García, A., Aguado-Martínez, A., Jiménez-Ruiz, E., Rodríguez-Marco, S., Álvarez-García, G., Ortega-Mora, L.M. (2011). Identification of a gene cluster for cell-surface genes of the SRS superfamily in Neospora caninum and characterization of the novel SRS9 gene. *Parasitology*, 2011 Dec;138(14):1832-42. doi: 10.1017/S0031182011001351.

Rodriguez, I., Choromanski, L., Rodgers, S., Weinstock, D. (2003). Survey of *Neospora caninum* antibodies in dairy and beef cattle from five regions of the United States. *Veterinary Therapeutics*, 3:396–401.

Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernandez, E., Regidor-Cerrillo, J., Alvarez-Garcia, G., Marugan-Hernandez, V., Pedraza-Diaz, S., Blanco-Murcia, J., Prenafeta, A., Ortega-Mora, L.M. (2009b). Isolation and characterizationof a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Veterinary Parasitology*, 159, 7–16. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.009.

Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernandez, E., Regidor-Cerrillo, J., Rodriguez-Bertos, A., Prenafeta, A., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M. (2011). Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against Neosporacaninum infection in mice. *Veterinary Parasitology,* 175, 220–229. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.028.

Romero, J. J., Perez, E., Frankena, K. (2004). Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under fieldconditions. *Veterinary Parasitology*, 123:149 –159. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.06.016.

Romero, J. J., Perez, E., Dolz, G., Frankena, K. (2002). Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialized Costa Rican dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 53:263–273. https://doi.org/10.1016/S0167-5877(01)00290-2.

Romero, J. J., Van Breda, S., Vargas, B., Dolz, G., Frankena, K. (2005). Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology*, 64:1928–1939. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.03.023.

Ruehlmann, D., Podell, M., Oglesbee, M., Dubey, J. P. (1995). Canine neosporosis: a case report and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association,* 31, 174–183. doi: 10.5326/15473317-31-2-174.

Dittrich, L. R., Regidor-Cerrrilo, J., Ortega-Mora, L. M., Koch, O. M., Busch, A. P. B., Gonçalves, A. K., Cruz, A. A. (2018). Isolation of *Neospora caninum* from kidney and brain of a bovine foetus and molecular characterization in Brazil. *Experimental Parasitology.* Volume 185, February 2018, Pages 10-16. DOI: 10.1016/j.exppara.2018.01.004.

Sadrebazzaz, A., Haddadzadeh, H., Esmailnia, K., Habibi, G., Vojgani, M., Hashemifesharaki, R. (2004). Serological prevalence of *Neospora caninum* in healthy and aborted dairy cattle in Mashhad, Iran. *Veterinary Parasitology,* 5;124(3-4):201-4*.* doi: 10.1016/j.vetpar.2004.06.027.

Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, A., Boerlin, … L., Gottstein, B. (2001). A Swiss case-controlstudy to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortionsby PCR, histopathology and serology. *Veterinary Parasitology*, 102, 1–15. doi: 10.1016/s0304-4017(01)00524-6.

Sager, H., Hu¨ssy, D., Kuffer, A., Schreve, F., Gottstein, B. (2005). Mise en e´vidence d’un de ‘‘abortion strom’’ (transmissiontransplacentaire exoge´ne de *Neospora caninum*) dans une exploitation de vaches laitie`res: une premie`re en Suisse.Schweiz. *Archieve Tierheilkd*, 147, 113–120. DOI: https://doi.org/10.1024/0036-7281.147.3.113

Salehi, N., Haddadzadeh, H. R. (2015). Genetic diversity of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite markers. *Parasitology International*, Oct;64(5):357-61. doi: 10.1016/j.parint.2015.05.005.

Sanderson, M. W., Gay, J. M., Baszler, T. V. (2000). *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Veterinary Parasitology*, 90:15–24. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00234-x.

Sartor, I. F., Garcia Filho, A., Vianna, L. C., Pituco, E. M., Dal Pai, V., Sartor, R. (2005). Ocorreˆncia de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da regia˜o de Presidente Prudente, sp. *Arquivos do Instituto Biológico*,72:413–418.

Sartor, I. F., Hasegawa, M. Y., Canavessi, A. M. O., Pinckney, R. D. (2003). *Ocorreˆncia de anticorpos de Neospora caninum em vacas leiteiras avaliados pelos me´todos ELISA e RIFI no municı´pio de Avare´*, SP SEMINA: CIENCIAS AGRARIAS. 24:3–10

Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C. H., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T. (2000). Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Veterinary Parasitology,* 90, 247–252. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00248-x.

Schares, G., Ba¨rwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Klo¨ss, D., Schroder, R., R. Labohm, Dra¨ger, K., Fasen, W., Hess, R. G., and Conraths, F. J. (2004). Potential risk factors for bovine Neospora caninum infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology* 129:301–309.

Schares, G., Ba¨rwald, A., Staubach, C., So¨ndgen, P., Rauser, M., Schro¨der, R., ... Conraths, F.J. (2002). p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencingepidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary Parasitology*, 106, 293–305. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00103-6.

Schares, G., Ba¨rwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Klo¨ ss, D., Wurm, R., … Conraths, F.J. (2003). Regional distribution of bovine Neosporacaninum infection in the German state of Rhineland-Palatinatemodelled by logistic regression*. International of Journal Parasitology*, 33, 1631–1640. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00266-2.

Schares, G., Conraths, F.J., Reichel, M.P. (1999a). Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera froma dairy herd in New Zealand. *International of Journal Parasitology,* 29, 1659–1667. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00104-6.

Schares, G., Dubremetz, J. F., Dubey, J. P., Ba¨rwald, A., Loyens, A., Conraths, F. J. (1999b). Neospora caninum: identification of 19-,38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granüle antigen using monoclonal antibodies. *Experimental Parasitology*. 92, 109–119. https://doi.org/10.1006/expr.1999.4403.

Schares, G., Conraths, F. J., Reichel, M. P. (1999). Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *International of Journal Parasitology,* 29:1659–1667. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00104-6.

Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Ba¨rwald, A., Conraths, F. J. (1998). The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. *Veterinary Parasitology*, 80:87–98. doi: 10.1016/s0304-4017(98)00195-2.

Schares, G., Rauser, M., So¨ndgen, P., Rehberg, P., Ba¨rwald, A., Dubey, J. P., … Conraths, F.J. (2000). Use of purifiedtachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *International of Journal Parasitology,* 30, 1123–1130. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00092-8.

Schares, G., Rauser, M., Zimmer, K., Peters, M., Wurm, R., Dubey, J. P., … Conraths, F.J. (1999c). Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *Journal of Parasitology,* 85, 688–694.

Schock, A., Buxton, D., Spence, J. A., Low, J. C., Baird, A. (2000). Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotlandwith special reference to *Neospora caninum*. *Veterinary Record*, 147, 687–688.

Schock, A., Innes, E. A., Yamane, I., Latham, S. M., Wastling, J. M. (2001). Genetic and biologicaldiversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 123, 13–23. doi: 10.1017/s003118200100796x.

Scott, H. M., Sorensen, O., Wu, J. T. Y., Chow, E. Y. W., Manninen, K., VanLeeuwen, J. A. (2006). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, *Neospora caninum*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Canadian Veterinary Journal*, 47:981– 991

Selahi, F., Namavari, M., Hosseini, M. H., Mansourian, M., Tahamtan, Y. (2013). .Development of a disperse dye immunoassay technique for detection of antibodiesagainst *Neospora caninum* in cattle. *Korean Journal Parasitology*, 51, 129–132. http://dx.doi. org/10.3347/kjp.2013.51.1.129.

Selim, A., Abdelhady, A. (2020). Neosporosis among Egyptian camels and its associated risk factors. *Tropical Animal Health and Production*, Volume 52, 3381–3385. https://doi.org/10.1007/s11250-020-02370-y.

Selim, A., Khater, H., Almohammed. H. (2021). A recent update seroprevalance of ovine neosporosis in Northern Egypt an its associated risk factors. *Scientific Reports,* 11:14043. doi: [10.1038/s41598-021-93596-9](https://doi.org/10.1038%2Fs41598-021-93596-9).

Sevgili, M., Altas, M. G., Keskin, O. (2005). Seroprevalence of *Neospora caninum* in cattle in the province of Sanliurfa. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29:127–130.

Shivaprasad, H. L., Ely, R., Dubey, J. P. (1989). A Neospora-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Veterinary Parasitology*, 34:145-148. https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90174-X.

Slotved, H. C., Jensen, L., Lind, P. (1999). Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine foetuses with *Neospora caninum* infection. *International of Journal Parasitology*, 29, 1165–1174. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00095-8.

Simsek, S, Utuk, A. E., Koroglu, E., Dumanli, N., Risvanli, A. (2008). Seroprevalence of *Neospora caninum* in repeat breeder dairy cows in Turkey. *Archives animal breeding*, 51(2), 143-148. DOI:10.5194/aab-51-143-2008.

Sinnott, F. A., Monte, L. G., Collares, T. F., Silveira, R. M., Borsuk, S. (2017). Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years2011–2016). *VeterinaryParasitology*, 239 (2017) 19–25. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.04.008. Epub 2017 Apr 7.

Sinnott, F. A., Monte, L. G., Collares, T. F., De Matos, B. M., Pacheco, D. B., Borsuk, S., … Hartleben, C.P. (2014). Blocking ELISA using recombinant ncsrs2 protein for diagnosing bovine neosporosis. *Current Microbiology,* 70, 429–432. http://dx.doi.org/10.1007/s00284-014-0737-y.

Söndgen, P., Peters, M., Ba¨rwald, A., Wurm, R., Holling, F., Conraths, F.J., Schares, G., (2001). Bovine neosporosis: immunoblotimproves foetal serology. *Veterinary Parasitology*, 102, 279–290. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00543-X.

Staska, L. M., Davies, C. J., Brown, W. C., McGuire, T. C., Suarez, C. E., Park, J. Y., … Baszler, T. V. (2005). Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4+ cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected Holstein cattle. *Infection and Immunity*, 73:1321-1329. doi: 10.1128/IAI.73.3.1321-1329.2005.

Stenlund, S., Björkman, C., Holmdahl, 0. J., Kindahl, H. Uggla, A. (1997). “Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*”, *Parasitology Research* vol. 83, no. 3, pp. 214-219.

Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Uggla, A., Björkman, C. (1999). Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 85:227–234. doi: 10.1016/s0304-4017(99)00120-x.

Suteeraparp, P., Pholpark, S., Pholpark, M., Charoenchai, A., Chompoochan, T., Yamane, I., Kashiwazaki, Y. (1999). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. *Veterinary Parasitology*, 86:49–57.

Systema Natura, 2010. http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=637468& src=0, 10.06.2015

Swift, B. L., Kennedy, P. C. (1972). Experimentally induced infectionof in utero bovine fetuses with bovine parainfluenza 3 virus. *American Journal of Veterinary Research*, 33, 57–63.

Takashima, Y., Takasu, M., Yanagimoto, I., Hattori, N., Batanova, T., Nishikawa, Y., Kitoh, K. (2013). Prevalence and dynamics of antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 antigens of *Neospora caninum* in cattle during the gestation period. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75, 1413–1418. http://dx.doi.org/10.1292/jvms.13-0198.

Thilsted, J. P., Dubey, J. P. (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 1: 205-209. https://doi.org/10.1177/104063878900100301

Thompson, G., Canada, N., do Carmo Topa, M., Silva, E., Vaz, F., Rocha, A. (2001). First confirmed case of *Neospora caninum*-associated abortion outbreak in Portugal. *Reproduction in Domestic Animals*, 36:309–312. https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00307.x

Thornton, R. N., Thompson, E. J., Dubey, J. P. (1991). Neosporn abortion in New Zealand cattle. *New Zealand* *Veterinary Journal*, vol. 39, pp. 129-133.

Thornton, R. N., Gajadhar, A. Evans, J. (1994). Neospora abortion epidemic in a dairy herd. *New Zealand Veterinary Journal*, 42- 190-191.

Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1997) Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research,* 58:1381–5.

Thurmond, M. C., Anderson, M. L., Blanchard, P. C. (1995b), Secular and seasonal trends of Neospora abortion in California dairy cows. *Journal of Parasitology*, vol. 81, no. 3, pp. 364-367.

Thurmond, M. C., Hietala, S. (1995). Strategies to control Neospora infection in cattle. *The Bovine Practitioner*, 29, 60–63. https://doi.org/10.21423/bovine-vol1995no29p60-63.

Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., Doho, I. R., Stryhn, H., Keefe, G. P., Haddad, J. P. (2005). Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. *Veterinary Microbiology*, 109:147–158. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.05.011

Toolan, D. P. (2003) *Neospora caninum* abortion in cattle – a clinical perspective. *Irish Veterinary Journal,* 2003; 56: 404-410.

Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Goria, M., Dondo, A., Ferroglio, E., … Rosati, S. (2011). Development of a set of multiplex standard polymerase chainreaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinicalsamples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 657–664. http://dx.doi.org/10.1177/1040638711407880.

Trees, A. J., Davison, H. C., Innes, E. A., Wastling, J. M. (1999): Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 29, 1195-1200.

Trees, A. J., Williams, D. J. L. (2005). Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.  *Trends in Parasitology*, 21:558–561.

Trees, A. J., McAllister, M. M., Guy, C. S., McGarry, J. W., Smith, R. F., Williams D. J. L. (2002). *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Veterinary Parasitology,* 109:147–154. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00234-0.

Trees, A. J., Williams, D. J. L. (2000). Neosporosis in the United Kingdom. *International of Journal Parasitology*, 30, 891–893.

Tuo, W., Zhao, Y., Zhu, D., Jenkins, M. C. (2011). Immunization of female BALB/c mice with Neospora cyclophilin and/or NcSRS2 elicits specific antibody response and prevents against challenge infection by *Neospora caninum*. *Vaccine, 29*: 2392–2399. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.041.

Uchida, M., Nagashima, K., Akatsuka, Y., Murakami, T., Ito, A., Imai, S., Ike, K. (2013). Comparative study of protective activities of *Neospora caninum* bradyzoite antigens,NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4, in a mouse model of acute parasitic infection. *Parasitology Research,* 112, 655–663. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012- 3182-5.

Uggla, A., Stenlund, S., Holmdahl, O. J. M., Jakubek, E. B., Thebo, P., Kindahl, H., Björkman, C. (1998). Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *International of Journal Parasitology,* .28,1467–1472.

Uzêda, R. S., Schares, G., Ortega-Mora, L. M., Madruga, C. R., Aguado-Martinez, A., Corbellini, L. G., … Gondiim, L. F. P. (2013). Combination of monoclonal antibodies improves immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 197, 477–486. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.008.

Va´clavek, P., Sedla´k, K., Hu°rkova´, L., Vodra´ka, P., Sebesta, R., Koudela, B. (2007). Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. *Veterinary Parasitology*, 143:35–41. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.020.

Van Maanen, C., Wouda, W., Schares, G., von Blumro¨der, D., Conraths, F.J., Norton, R., … Hemphill, A. (2004). An interlaboratory comparison of immunohistochemistryand PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovinefoetal tissues. *Veterinary Parasitology*, 126, 351–364. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.08.016.

VanLeeuwen, J. A., Tiwari, A., Plaizier, J. C., and Whiting T. L. (2006). Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. *Canadian Veterinary Journal.* 47:783– 786.

VanLeeuwen, J. A., Haddad, J. P., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Tiwari, A., Scott, H. M. (2010). Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 129–138. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.11.013.

Varcasia, A., Capelli, G., Ruiu, A., Ladu, M., Scala, A., Björkman, C. (2006). Prevalence of *Neospora caninum* infection in Sardiniandairy farms (Italy) detected by iscom ELISA on tank bulkmilk. *Parasitology Research,* 98, 264–267. doi: 10.1007/s00436-005-0044-4.

Venturini, L., Di Lorenzo, C., Venturini, C., Romero, J. (1995). Anticuerpos anti *Neospora sp*., en vacas que abortaron. *Veterinaria Argentina,* 12:167–170.

Venturini, M. C., Venturini, L., Bacigalupe, D., Machuca, M., Echaide, I., Basso, W., … Dubey, J. P. (1999). *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *International of Journal Parasitology*, 29:1705–1708. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00143-5.

Viera, A. J., Garrett, J. M. (2005). Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic. *Family medicine*, 2005;37(5):360-3.

Vizard, A. L., Anderson, G. A., Gasser, R. B. (1990). Determination of the optimum cut-off value of a diagnostic test. *Preventive Veterinary Medicine,* 10: 137-143. https://doi.org/10.1016/0167-5877(90)90059-Q.

Von Blumro¨der, D., Schares, G., Norton, R., Williams, D. J. L., Esteban-Redondo, I., Wright, S., … Conraths, F.J. (2004). Comparison and standardisation of serological methodsfor the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Veterinary Parasitology,* 120, 11–22. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.12.010.

Vural, G., Aksoy, E., Bozkir, M., Kuçukayan, U., Erturk, A. (2006). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle herds in Central Anatolia, Turkey. *Veterinarski Arhiv*, 76(4), 343-349].

Waldner, C. L., Janzen, E. D., Ribble, C. S. (1998). Determination ofthe association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213,685–690.

Weber, A., Zetzmann, K., Ewringmann, T. (2000). Vorkommen von Antiko¨rpern gegen *Neospora caninum* bei Ku¨hen in nordbayerischen Besta¨nden mit Abortproblemen. *Tierarztliche Umschau*, 55:28–29.

Weber, F. H., Jackson, J. A., Sobecki, B., Choromanski, L., Olsen, M., Meinert, T., … Ellis, J. T. (2013). On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of Neospora caninum for prevention of neospora-associated fetal lossin cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20, 99–105. doi: 10.1128/ CVI.00225-12.

Weston, J. F., Williamson, N. B., Pomroy, W. E. (2005). Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. *New Zealand* *Veterinary Journal*, 53:142–148. doi: 10.1080/00480169.2005.36492.

Weston, J. F., Heuer, C., Parkinson, T., Williamson, N., (2012a). Causes of abortion on New Zealand dairy farms with a history of abortion associated with *Neospora caninum*. *New Zealand* *Veterinary Journal*, 60, 27–34. http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2011.631171.

Wierzchon, M., Katkiewicz, M., Marciniak, K. (2006). Neosporosis occurrence in cattle. *Medycyna Weterynaryjna*, 62:1041–1044.

Wilkowsky, S. E., Bareiro, G. G., Mon, M. L., Moore, D. P., Caspe, G., Campero, C. M., … Romano, M. I. (2011). An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,*  971–976. http://dx.doi.org/10.1177/1040638711416845.

Williams, D. J., Guy, C. S., Smith, R. F., Ellis, J., Bjorkman, C., Reichel, M. P., Trees, A. J. (2007). Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infection and Immunity*, 75:1343–1348. doi: 10.1128/IAI.00777-06.

Williams, D. J. McGarry, J. Guy, F. Barber, J., Trees, A. J. (1997). Novel ELISA for detection of Neospora-specific antibodies in cattle. *Veterinary Record*, vol. 140, no. 13, pp. 328-331. doi: 10.1136/vr.140.13.328.

Williams, D. J., Davison, H. C., Helmick, B., McGarry, J., Guy, F., Otter, A., Trees, A. J. (1999). Evaluation of a commercial ELISAfor detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle. *Veterinary Record*, 145, 571–575. doi: 10.1136/vr.145.20.571.

Williams, D. J., Guy, C. S., McGarry, J. W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R. F., … Trees, A. J. (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: thetime of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121, 347–358. doi: 10.1017/s0031182099006587.

Wladyslaw, C., Leszek, C., Sandy, R., Bozena, M., Andrzej, M. (2000). *Neospora caninum* infections in aborting dairy cows in Poland. *Acta Parasitology,*  45: 113- 114.

Wouda, W. (1998). *Neospora abortion in cattle. Aspects of diagnosis and epidemiology*, PhD Dissertation. Utrecht 1998.

Wouda, W., de Gee, A. L. W., Moen, A. R., Van Knapen, F. (1995, Kasım, 8). *Laboratory experiences with bovine Neospora abortion in Dutch dairy herds*. Proceedings, Symposium Neospora Abortus Bij Het Rund,Mona 2, Drachten, pp. 3-9.

Wouda, W., Brinkhof, J., van Maanen, C., de Gee, A. L. W., Moen, A. R. (1998b). Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunolog,* 5:711–716. doi: 10.1128/cdli.5.5.711-716.1998

Wouda, W., Moen, A. R., Schukken, Y. H. (1998a). Abortion risk inprogeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, 49, 1311–1316. doi: 10.1016/S0093-691X(98)00078-8.

Wouda, W., Moen, A. R., Visser, I. J. R., van Knapen, F. (1997b). Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic andsporadic abortion cases and different age classes with regardto lesion severity and immunohistochemical identification oforganisms in brain, heart, and liver. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 180–185. doi: 10.1177/104063879700900212.

Wouda, W., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., (1997a). Serological diagnosisof bovine fetal neosporosis. *Journal of Parasitology*, 83, 545–547.

Wright, P. F., Nilsson, E., van Rouij, E. M. A., Lelenta, M., Jeggo, M. H. (1993). Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Revue Scientific et Techniques (İnternational Office of Epizootics)*, 12. 435-450. doi: 10.20506/rst.12.2.691.

Wu J. T. Y., Dreger, S., Chow, E. Y. W., Bowlby, E. E. (2022). Validation of 2 commercial *Neospora caninum* antibody enzyme linked immunosorbent assays. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2002 Oct; 66(4): 264–271.

Yaeger, M. J., Shawd-Wessels, S., Leslie-Steen, P. (1994). Neospora abortion storm in a midwestern dairy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 506-508. doi: 10.1177/104063879400600424.

Yamane, I., Kokuho, T., Shimura, K., Eto, M., Shibahara, T., Haritani, M., … Conrad, P. A. (1997). In vitro isolation and characterisation of a bovine Neospora species in Japan. *Research in Veterinary Science*, vol. 63, no. 1, pp. 77-80. doi: 10.1016/s0034-5288(97)90162-4.

Ybañez, R. H. D., Terkawi, M. A., Kameyama, K., Xuan, X., Nishikawa, Y. (2013). Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 forserodiagnosis of Neospora caninum infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20, 1617–1622.http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00352-13.

Yıldız, K., Gökpınar, S., Sürsal, N., Değirmenci, R. (2017). Seroprevalence of *Neospora caninum* in Dairy Cattle Raised in Çiçekdaği District of Kırşehir Province. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 41(3), 135. DOI:10.5152/tpd.2017.5218.

Yildiz, K., Kul, O., Babur, C., Kilic, S., Gazyagci, A. N., Celebi, B., Gurcan, I. S. (2009). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: Special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 306-310. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.06.004

Yin, J., Qu, G., Cao, L., Li, Q., Fetterer, R., Feng, X., ... Tuo, W., (2012). Characterization of *Neospora caninum* microneme protein 10 (NcMIC10) and its potential use as a diagnosticmarker for neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 187, 28–35. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.003.

Yu, J., Li, Q. u, and Xia, Z. (2007). Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People’s Republic of China. *Veterinary Parasitology*, 143:79–85. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.031.

Zárate-Martínez, J. P., Rosete-Fernández, J. V., Socci-Escatell, G. A., Socci-Escatell, Fragoso-Islas, A., Olazarán-Jenkins, S., Granados-Zurita, L., Ríos-Utrera, A. (2021). Prevalence of Neospora caninum bovine serum antibodies in the Central and Southern Gulf of Mexico regions. *Journal MVZ* *Cordoba*, 26(1):1-7. DOI:10.21897/rmvz.1996.

Zintl, A., Pennington, S. R., Mulcahay, G. (2006). Comparison ofdifferent methods for the solubilisation of *Neospora caninum* (Phylum Apicomplexa) antigen. *Veterinary Parasitology,* 135, 205–213. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.10.005.

**EKLER**

**Ek 1.** Süt sığırlarında *N. caninum* antikorlarının serolojik prevalansı.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Hayvan Sayısı** | **Pozitivite (%)** | **Kulanılan Test(a)(b)** | **Referans** |
| Arjantin | 2020 | 17-66 | IFAT | Venturini ve diğerleri, 1995; Venturini ve diğerleri, 1999; Moore, 2005; Moore ve diğerleri, 2002 |
| Avusturalya | 266 | 24 | IFAT | Haerdi ve diğerleri, 2006; Atkinson ve diğerleri, 2000 |
| 266 | 10 | ELISA |
| Belçika | 711 | 12 | IFAT | De Meerschman ve diğerleri, 2000 |
| Brezilya | 5722 | 11-35 | IFAT | Gondiim ve diğerleri, 1999; de Melo ve diğerleri,2006; Ragozo ve diğerleri, 2003; Guimares ve diğerleri, 2004; Ogawa ve diğerleri, 2005; Corbellini ve diğerleri, 2002; Corbellini ve diğerleri, 2006; Aguiar ve diğerleri, 2006; Sartor ve diğerleri, 2003 |
| 3923 | 11-46 | ELISA-IDEXX  ELISA-IH-ISCOM  ELISA-CHEKIT | de Melo ve diğerleri, 2001; de Melo ve diğerleri, 2004; Mineo ve diğerleri, 2006; Locatelli-Dittrich ve diğerleri, 2001;Munhoz ve diğerleri, 2006; Sartor ve diğerleri,2005 |
| Kanada | 41705 | 5-26 | ELISA-IDEXX  ELISA-WT-IHCA  ELISA-BIOVET | Scott ve diğerleri,2006; VanLeeuwen ve diğerleri, Tiwari ve diğerleri, 2005; Pare´J. ve diğerleri, 1998; Pan ve diğerleri, 2004; Hobson ve diğerleri, 2002; Haddad ve diğerleri, 2005; Duffield ve diğerleri, 2001; Cramer ve diğerleri, 2002; Bergeron ve diğerleri, 2000 |
| Şili | 371 | 16-30 | IFAT | Patitucci ve diğerleri, 2000 |
| Kosta Rika | 5745 | 40-44 | ELISA-WHT-IHCA | Romero ve diğerleri, 2002; Romero ve diğerleri, 2005 |
| Çekya | 407 | 3 | IFAT | Va´clavek ve diğerleri, 2007 |
| 463 | 4 | ELISA-IDEXX |
| Danimarka | 1561 | 22 | ELISA-IH-COM | Jenkins ve diğerleri, 2007 |
| Fransa | 8351 | 11-26 | ELISA-IDEXX | Klein ve diğerleri,1997; Klein diğerleri, 2000; Ould-Amrouche ve diğerleri, 1999; Pitel ve diğerleri, 2000; Pitel ve diğerleri, 2001 |
| Almanya | 4649 | 4-27 | IFAT | Conraths ve diğerleri,1996; Schares ve diğerleri, 1998 |
| 100 | 1-2 | ELISA-IDEXX | Weber ve diğerleri, 2000; Bartels ve diğerleri, 2006 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Hayvan Sayısı** | **Pozitivite (%)** | **Kulanılan Test(a)(b)** | **Referans** |
| Macaristan | 97 | 10 | ELISA-IH-ISCOM | Hornok ve diğerleri,1998 |
| 518 | 3-4 | IFAT | Hornok ve diğerleri, 2006 |
| İran | 810 | 15 | IFAT | Sadrebazzaz ve diğerleri, 2004 |
| 337 | 46 | ELISA-IDEXX | Razmi ve diğerleri, 2006 |
| İrlanda | 489 | 3-12 | IFAT | McNamee ve diğerleri, 1996 |
| İtalya | 7612 | 14-28 | IFAT | Magnino ve diğerleri, 1999; Ferrari ve diğerleri, 1997 |
| 1601 | 11-31 | ELISA-CHEKIT  ELISA-IDEXX  ELISA-MASTAZYME | Otranto ve diğerleri, 2003; Rinaldi ve diğerleri, 2005; Paradies ve diğerleri, 2004 |
| Japonya | 2565 | 6-20 | IFAT | Koiwai ve diğerleri, 2005; Koiwai ve diğerleri, 2006 |
| Kore | 1688 | 21-49 | IFAT | Hur ve diğerleri, 1998 |
| 1344 | 12-23 | ELISA-IgG-IH  ELISA-Ncp43p | Bae ve diğerleri, 2000; Ahn ve diğerleri, 2003 |
| Meksika | 2044 | 16-59 | ELISA-IDEXX  ELISA-WT-IH | Garcı´a-Va’zquez, ve diğerleri, 2002; Garcı´a-Va´zquez ve diğerleri, 2005; Morales ve diğerleri, 2001; Mele´ndez, ve diğerleri, 2005 |
| Hollanda | 9340 | 10-39 | ELISA-WT-IH | Dijkstra ve diğerleri, 2001; Bartels M. ve diğerleri, 2006 |
| Yeni Zelanda | 1537 | 11-46 | IFAT | Cox ve diğerleri, 1998; Weston ve diğerleri, 2005; Thornton ve diğerleri,1994; Reichel ve diğerleri, 2002 |
| 1594 | 7-53 | ELISA-WT-IH | Pfeiffer ve diğerleri 2000; Reichel 1998; Schares ve diğerleri, 1999 |
| Paraguay | 297 | 36 | ELISA-WT-IH | Osawa ve diğerleri, 2002 |
| Çin | 262 | 18 | ELISA-CIVTEST | Yu ve diğerleri, 2007 |
| Polonya | 461 | 10-15 | ELISA-IDEXX | Wierzchon ve diğerleri, 2006; Cabaj ve diğerleri, 2000 |
| Portekiz | 119 | 49 | ELISA-IDEXX | Thompson ve diğerleri, 2001 |
| 1351 | 28-46 | NAT | Canada ve diğerleri, 2004 |
| Rusya | 391 | 10 | ELISA | Conraths ve diğerleri, 2000 |
| Slovakya | 105 | 22 | ELISA-IDEXX | Dubinsky ve diğerleri, 2006 |
| İspanya | 285 | 11 | IFAT | Caetano-da-Silva ve diğerleri, 2004 |
| 11681 | 12-37 | ELISA-WT-IHCA  ELISA-WT-IH  ELISA-IDEXX  ELISA-CIVTEST | Mainar-Jaime ve diğerleri, 1999; Quintanilla-Gozalo ve diğerleri, 1999; Lopez-Gatius, ve diğerleri, 2004; Caetano-da-Silva ve diğerleri, 2004; Bartels ve diğerleri, 2006; Lo´pez-Gatius ve diğerleri, 2004; Lo´pez-Gatius ve diğerleri, 2005; Lo´pez-Gatius ve diğerleri, 2005 |
| İsveç | 6402 | 2-63 | ELISA-ISCOM | Stenlund ve diğerleri, 1999; Frössling ve diğerleri, 2006; Bartels ve diğerleri, 2006; Björkman ve diğerleri, 2000 |
| Tayvan | 613 | 45 | IFAT | Ooi ve diğerleri, 2000 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Hayvan Sayısı** | **Pozitivite (%)** | **Kulanılan Test(a)** | **Referans** |
| Tayland | 987 | 6-70 | IFAT | Suteeraparp ve diğerleri, 1999; Kashiwazaki ve diğerleri, 2001 |
|  | 713 | 5-15 | ELISA-VMRD  ELISA-IHSCOM | Kyaw ve diğerleri, 2004; Chanlun ve diğerleri, 2002 |
| Tanzanya |  |  | ELISA-INDIREK |  |
| Türkiye | 4416 | 5-14 | ELISA-VRDM  ELISA-IDEXX  ELISA-MASTAZYME | Kurtdede ve diğerleri, 2006; Vural G. ve diğerleri, 2006; Akca ve diğerleri, 2005; Biyikoglu ve diğerleri, 2005; Öncel T. ve diğerleri, 2003; Sevgili ve diğerleri,2005 |
| Birleşik Krallık | 4390 | 17-60 | ELISA-MASTAZYME | Dannatt, 1997; Davison ve diğerleri,1999 |
| A.B.D. | 1482 | 28-43 | IFAT | Pare´ ve diğerleri, 1994 |
| 6446 | 15-61 | ELISA-WT-IHCA  ELISA-IDEXX | Pare´ ve diğerleri, 1996; Pare’ ve diğerleri, 1997; Rodriguez ve diğerleri, 2003; Lehenbauer ve diğerleri, 1998 |
| 414 | 11-32 | IB-Süt Örneği | Ortega ve diğerleri, 2007 |
| Uruguay | 155 | 62 | IFAT | Kashiwazaki. ve diğerleri, 2004 |
| Vietnam | 200 | 6 | ELISA-IH-ISCOM | Huong ve diğerleri, 1998 |

(a) WT, Tüm taşizoit ekstartı; IH,; WT-IHCA, kinetik ELISA; BIOVET-*Neospora caninum*, (indirect ELISA, takizoitlerin lizatı; BIOVET Laboratuvarları, Kanada); CHEKIT, CHEKIT Neospora (indirect ELISA, takizoitlerin deterjan lizatı; IDEXX Laboratuvarları, Hollanda); IDEXX, IDEXX HerdChek *Neospora caninum* antikor (indirect ELISA, takizoitlerin lizatı; IDEXX Laboratuvarları); MASTAZYME, MASTAZYME NEOSPORA (indirekt ELISA, formaldehitle fikselenmiş tüm takizoitler; MAST GROUP, Birleşik Krallık); VMRD, *Neospora caninum* cELISA (competitive ELISA,gp65 takizoitlerin yüzey antijeni; VMRD); CIVTEST, CIVTEST BOVIS NEOSPORA (indirekt ELISA, takizoitlerin lizatı; Hipra Laboratuvarları S.A.,İspanya); IH-ISCOM, immün uyarıcı kompleks parçacıklara dahil edilmiş deterjan-özütlenmiş takizoit antijeni; IH-p38, doğal saflaştırılmış yüzey antijeni NcSRS2; IH-Ncp43P, rekombinant NcSRS2

**Ek 2.** Serolojik çalışmalarda *N. caninum*’a karşı spesifik antikorların tespitinin geliştirilmesi.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Test Tipi** | **Antijen** | **Sensitivite: Se**  **Spesifite: Sp-%** | **Örnek sayısı ve Türü** | **Referans** |
| İndirekt ELISA | NvGRA  Rekombinant Proteini | Sığır:  Se:94.64  Sp:90.38  Manda:  Se:98.57  Sp:86.54 | 108 sığır serumu  122 manda serumu | Hamidinejat ve diğerleri 2015 |
| İndirekt ELISA | NcSRS2  Rekombinant Proteini | Koyun:  Se:100  Sp:94.5  Köpek:  Se:100  Sp:93.3 | 110 koyun serumu  65 köpek serumu | Fernandes Pinheiro ve diğerleri 2015 |
| İndirekt ELISA | NcGRA2  Rekombinant Protein | A | Deneyimsel Enfekte köpek serumu | Jin ve diğerleri 2015 |
| ELISA(Blocking) | NcGRA2  Rekombinant Protein | Sığır:  Se:98.7  Sp:88.7 | 152 sığır serumu | Sinnott ve diğerleri 2014 |
| Latex agglutinasyon Testi (LAT) | NcGRA6  Recombinant Protein | Köpek:  Se:76  Sp:100  Sığır:  Se:60  Sp:100 | 100 köpek serumu  100 sığır serumu | Ghalmi ve diğerleri 2014 |
| ELISA (blocking) | NcSRS2  Rekombinant Protein | A | 24 sığır serumu | deSá ve diğerleri 2014 |
| Yarışmalı ELISA | NcSAG1  Rekombinant Protein | A | Sığır serumu | Dong ve diğerleri 2013 |
| İndirekt ELISA | Ncp40  Rekombinant Protein | Se:98.2  Sp:98.6 | 682 sığır serumu | He ve diğerleri 2013 |
| İndirekt ELISA | Kesilmiş  Rekombinant Protein  NcSRS2 | Se:100  Sp:97.8 | 139 sığır serumu | Pinheiro ve diğerleri, 2013 |
| İndirekt ELISA | Rekombinant Protein  NcSAG1 veNcGRA7 | A | 129 sığır serumu | Takashima Y. ve diğerleri, 2013 |
| İmmunohistokimya | Purifiye edilmiş  Taşizoit | A | Sığır dokusu taşizoit kültürü ile yapay olarak hazırlandı. | Uzêda ve diğerleri, 2013 |
| İndirekt ELISA | Rekombinant Protein NcSUB1(fragment NcSUB1t; fragment  NcSUB1tr); | NcSUB1t:  Se:94.59  Sp:80  NcSUB1tr:  Se:95.95  Sp:100 | 79 abort öyküsü olan ve 4 deneysel enfekte edilmiş sığır | Ybañez ve diğerleri, 2013 |
| Capture ELISA | Rekombinant Protein  NcMIC10 | Se:90  Sp:100 | 10 Keçi serumu | Yin ve diğerleri, 2012 |
| **Test Tipi** | **Antijen** | **Sensitivite: Se**  **Spesifite: Sp-%** | **Örnek sayısı ve Türü** | **Referans** |
| Latex agglutinasyon Testi (LAT) | Rekombinant Protein  NcSAG1 | A | 164 sığır serumu | Moraveji ve diğerleri, 2012 |
| İndirekt ELISA | Rekombinant Protein  NcSRS2, NcSAG1, NcGRA2 | Se:91.7  Sp:100 | 32 sığır serumu | Dong ve diğerleri, 2012 |
| İndirekt ELISA | Rekombinant Protein  NcGRA7, NcSAG1 | A | 58 abort öyküsü olan ve 4 deneysel enfekte edilmiş sığır | Hiasa ve diğerleri, 2012a |
| İndirekt ELISA | Rekombinant Protein  NcGRA7, NcPF | A | 174 köpek serumu | Hiasa ve diğerleri, 2012b |
| İndirekt ELISA | Kesilmiş Rekombinant Protein  NcSRS2 | Se:95  Sp:96 | 497 sığır serumu | Borsuk ve diğerleri,2011 |
| Immunoblot | Rekombinant Protein  NcSAG4 | A | 52 sığır serumu | Hu ve diğerleri;2011 |
| Antijen baskılı immun çalışma  (APIA) | Rekombinant Protein  NcSAG1 | Se:85  Sp:96 | 232 sığır serumu | Wilkowsky ve diğerleri, 2011 |

A: Sensitivite ve Spesifite oranları belirtilmemiştir.

**Ek 3.** SRS2 İndirekt ELISA ve ticari ELİSA yöntemi ile seropozitif ve şüpheli saptanan örneklere ait bilgiler.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **İlçe** | **Yaşı** | **Gebelik Durumu** | **Hayvan Dönemi** | **Gebelik Sayısı** | **Çiftlik** | **Irkı** | **Menşei** | **Doğum** | **Ülkeye Giriş** | **SRS2 İndirekt ELISA** | **Ticari ELİSA** |
| Test Sonucu | |
| Foça | 2 | Gebe | İnek | 1 | F1 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Foça | 2 | Gebe | İnek | 1 | F1 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Foça | 2 | Gebe | İnek | 1 | F1 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T1 | S | Avusturya | 2016 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T1 | S | Avusturya | 2016 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T1 | S | Avusturya | 2016 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T1 | S | Avusturya | 2016 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T1 | S | Avusturya | 2016 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T1 | S | Avusturya | 2016 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T1 | S | Avusturya | 2016 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T1 | S | Avusturya | 2016 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HKA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | **Pozitif** | **Pozitif** |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **İlçe** | **Yaşı** | **Gebelik Durumu** | **Hayvan Dönemi** | **Gebelik Sayısı** | **Çiftlik** | **Irkı** | **Menşei** | **Doğum** | **Ülkeye Giriş** | **SRS2 İndirekt ELISA** | **Ticari ELİSA** |
| Test Sonucu | |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T4 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T2 | HSA | Slovakya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T2 | HSA. | Slovakya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T2 | HSA | Slovakya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T2 | HSA | Slovakya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T2 | HSA | Slovakya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T2 | HSA | Slovakya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 3 | Gebe | İnek | 1 | T2 | HSA | Slovakya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | Pozitif | Negatif |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | Negatif | Negatif |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | **Pozitif** | **Pozitif** |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | Negatif | Pozitif |
| Bayındır | 3 | Gebe | İnek | 1 | B1 | S | Avusturya | 2015 | 2018 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HKA | Almanya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HKA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Negatif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HKA | Almanya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HKA | Almanya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Pozitif | Negatif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Negatif |
| Koçarlı | 1 | Boş | Düve | 0 | K1 | HSA | Almanya | 2017 | 2018 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 1 | Boş | Düve | 0 | K1 | HKA | Almanya | 2017 | 2018 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HKA | Almanya | 2014 | 2016 | **Pozitif** | **Pozitif** |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HKA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | Pozitif |
| Tire | 2 | Boş | İnek | 1 | T3 | HSA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | Negatif |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HKA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | **Şüpheli** |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HKA | Almanya | 2015 | 2017 | Pozitif | **Şüpheli** |
| Tire | 2 | Gebe | İnek | 1 | T3 | HKA | Almanya | 2015 | 2017 | Negatif | **Şüpheli** |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | **Şüpheli** |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HSA | Almanya | 2014 | 2016 | Pozitif | **Şüpheli** |
| Koçarlı | 3 | Gebe | İnek | 1 | K1 | HKA | Almanya | 2014 | 2016 | Negatif | **Şüpheli** |

**S;** Simental ırkı sığırı, **HSA;** Holstein Siyah Alaca ırkı sığırı, **HKA;** Holstein Kırmızı Alaca ırkı sığırı ifade edilmektedir

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“İzmir Yöresindeki İthal Sığırlarda *Neospora caninum* Enfeksiyonunun Seroprevalansı” başlıklı Doktora tezimdeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Halil LİMONCU

… / … / …

**ÖZ GEÇMİŞ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Soyadı, Adı** | **: LİMONCU Halil** |
| **Uyruk** | **:** **TR** |
| **Doğum Yeri ve Tarihi** | **: Aydın** |
| **E-mail** | **: veterinerlimoncu@gmail.com** |
| **Yabancı Dil** | **: İngilizce** |

**EĞİTİM**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Derece** | **Kurum** | **Mezuniyet tarihi** |
| Lisans | Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi | 2013 |

**İŞ DENEYİMİ**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Yıl** |  |  | **Yer/Kurum** | **Ünvan** |
| 2013-2014 |  |  | Bursa Koyun Keçi Yetiştiriciler Birliği | Danışman Veteriner Hekim |
| 2013-2014 |  |  | Agrita Tarım A.Ş. | Sorumlu Veteriner Hekim |
| 2014-2015 |  |  | Iğdır İl Tarım ve Orman Müdürlüğü | Veteriner Hekim |
| 2015-2018 |  |  | İzmir İl Tarım ve Orman Müdürlüğü | Veteriner Hekim |
| 2018-2020 |  |  | Boyabat İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü | Veteriner Hekim |
| 2020- |  |  | Bursa Yenişehir İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü | Veteriner Hekim |

**AKADEMİK YAYINLAR**

1. **MAKALELER**
2. **PROJELER**
3. **BİLDİRİLER**
4. **Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler**
5. **Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler**
6. **Halil LİMONCU**, Metin PEKAĞIRBAŞ, Hakan KANLIOĞLU, Heycan AYDIN, Beril KOÇ, Tülin KARAGENÇ, **Hüseyin Bilgin BİLGİÇ (2021) ‘**İzmir yöresindeki ithal sığırlarda Neospora caninum enfeksiyonunun seroprevalansı’. 22. Parazitoloji Kongresi, 11 – 15 Ekim 2021, Didim, Aydın (http://turkiyeparazitolojidernegi.org/wp/wp-content/uploads/2021/10/UPK22\_OZET\_KITABI.pdf). (**Özet Bildiri/Sözlü Sunum**).