

## NEOSPOROSİS

**Doç.Dr.Gülay VURAL**

[gvural@penvet.gov.tr](mailto:gvural@penvet.gov.tr)

Neosporosis, *Neospora caninum* tarafından oluşturulan ve geniş bir omurgalı hayvan soyunda görülen protozoer bir hastalıktır. *N. caninum* ilk olarak 1988 yılında bir köpeğin merkezi sinir sisteminden izole edilmiştir. 1957 yılından bu yana saklanan doku örneklerinde *Neospora caninum*'un varlığı tespit edilmiş olup, bundan önceki yıllarda *Toxoplasma gondii*'ye olan benzerliğinden dolayı yanlış teşhis edildiği bildirilmiştir (DUBEY ve LINDSAY, 1996).

### Sınıflandırma

*Neospora caninum*' un PCR çalışmaları ile nükleotid dizileri DNA sıklığı ve ribozomal RNA'ları incelenmiş ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır (DUBEY ve LINDSAY, 1996).

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

### Morfoloji

*Neospora caninum* 'un takizoit ve doku kistleri ile bunların içlerindeki bradizoitler, köpek dışkı ile atılan ookistleri belirlenmiştir.

Takizoit form özellikle beyin, omurilik, plasenta, fetüs olmak üzere birçok organdan izole edilmiştir. Takizoitlere özellikle makrofajlarda, polimorf çekirdekli lökositlerde, sinir hücrelerinde ve birçok değişik hücre tipinde rastlanmaktadır. Giemsa ve Wright boyasıyla boyandıktan sonra ovoid formda görülürler. Elektron mikroskopla yapıları incelendiğinde organel yönünden oldukça gelişmiş oldukları gözlenir. Takizoitlerin yapısında hücre çeperi, mikronem, konoid, 8-12 anterior ve 4-6 posterior roptri, nükleus, nükleus zarı, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve mitokondri bulunur. Takizoitler 4-7 -

1,5-5 µm çapında tipik apikompleksan şekilde olup, hücre içerisinde parazitofor vakuolde bulunanlar kabaca muz şeklindedir. Hücre içerisinde serbest olanlar ise yuvarlağa yakın şekildedir. Serbest olanlar ikili, üçlü veya daha fazla sayıdan oluşan gruplar halinde spinal sıvıdaki mononükleer hücreler, kan damarları çevresindeki sinir hücreleri ve diğer vücut hücrelerinde bulunurlar. Bir veya iki çekirdek taşırlar. Tek plazmolemma içeren peliküle sahip olan iç tarafta çift katlı membran kompleksi vardır. Polar halka ve buradan çıkan 22 adet subpelikular mikrotübül ve konoidin arkasında iki apikal halka bulunur. Parazitin ön yarımında 12 roptri, konoid hizasında ise 6-8 roptri vardır. Mikronem ön yarımında fazla sayıda arka yarımında ise azdır. Sitoplazmada 2-8 adet ovalimsi elektron koyu cisimcik yer alır. Çekirdek ve çekirdekçik parazitin arka yarımına yerleşmiştir. Ayrıca golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, ribozomlar ve 1-2 adet mitokondri bulunur. Mikropor yoktur. Parazitofor vakuolde intravakuoler tübüller mevcuttur (DUBEY ve LINDSAY, 1996; SPEER ve ark.,1999).

*Neospora caninum* bradizoitlerinin ölçüleri ise 7,3-1,5 µm'dir. Bradizoitler, takizoit formda bulunan organellere sahiptir. *Neospora caninum* bradizoitleri, diğer Coccidia sınıfı altında bulunan protozoonların bradizoitlerinden, mikropor içermemesiyle ayrılır. Parazitin doku kistleri yuvarlak veya ovalimsi yapıda olup, periyodik asid schiff boyası (PAS), Wright Giemsa ve immunoperoksidaz boyaları ile çok boyanırlar. Kistler 24,3-19,2 µm büyüklüğündedir. Mikropordan yoksun 50-200 civarında bradizoit içermektedir. *N. caninum* kistlerinin duvarları da 0.74-4 µm kalınlığındadır ve iki tabakadan oluşur. Bunlar ince primer yapıdaki kist duvarı birinci tabakayı, kalın granüler duvarında ikinci tabak olan dış tabakayı oluşturur. Sadece merkezi sinir sisteminde bulunan doku kistleri ,1-4 µm kalınlıkta bir duvara sahip olup, septum benzeri yapılarla bölümlere ayrılmakta ve kist duvarında lipid benzer yapılar görülmekte, ayrıca vesiküler yapılar bulunmaktadır. Kistler içerisinde bulunan bradizoitler ise ince yapılı ve 3-4,3-0.9-1.1 µm çapında olup, sinir hücrelerinde paket halinde bulunur ve PAS pozitif granüller fazladır. Takizoitlerde ise bu granüller daha azdır (JARDİNE,1996; SPEER ve ark.,1999).

Ookistler köpeklerin dışkıyla dışarı atılmaktadır. Yuvarlak oval formda 11,7 x 11,3 µm boyutlarındadır. Mikropil içermemektedir. Sporozoitler elipsoidal olup stieda cisimciği içermez ve 8,4 x 6,5 µm ölçülerindedir. Ookistler morfolojik olarak *Hammondia heydorni* ookistlerine benzemektedir (LINDSAY ve ark.,1999).

## **BİYOLOJİ**

*Neospora caninum* sporozoa sınıfında bulunan diğer protozoonlara benzer bir gelişme göstermektedir. *Neospora caninum* köpeklerin sindirim sisteminde endodiyogeni ile çoğalmakta, ookistler dışkı ile dışarı atılmaktadır. Ookistler yem ve sularla arakonaklar

tarafından alınmaktadır. Köpekten köpeğe plasental bulaşma sözkonusu olabilmektedir. Hastalığa yakalanmış köpeklerde enfeksiyonun ömür boyu sürdüğü kabul edilmektedir. Takizoitler ve bradizoitler köpek dahil *N.caninum*'a infekte olabilen bütün canlılarda bulunurlar (DUBEY ve LINDSAY, 1996; LINDSAY ve DUBEY,1989; MCALISTER ve ark.,1998).

Sığırlarda sığıra bulaşım plasental yolla olabilmektedir. Ancak enfeksiyonun bir sürüde ilk kez ortaya çıkmasında, sürüye enfekte bir dişi katılması ya da oosist atan son konak karnivor dışkısı ile bulaşık gıdanın alınması etkin olmaktadır. Hayvanlarda yaş ırk ve mevsimlere bağlı olarak bulaşmada bir değişiklik bulunmadığı ve etkenlerin sığırlarda tekrarlayan abortlara neden olabileceği, ancak abortun tekrarlama süresi veya kaç gebelik boyunca devam ettiği tartışmalı bir konudur (DUBEY ve LINDSAY, 1996; UMUR ve ARSLAN,1996).

### **YAYILIŞI**

Neosporosis başta Avusturalya, Kanada, Danimarka, İrlanda, İsrail, Hollanda, Japonya, Meksika olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde sığırlarda görülmektedir (DUBEY ve LINDSAY,1996; BUXTON ve ark,1997; PEREZ ve ark.,1998 ).

Neosporosis'te Kuzey İspanya'da süt inekçiliği yapılan işletmelerde yapılan taramalarda % 30,6 (MAİNER JAİME ve ark., 1999); Portekiz'de yine süt inekçiliği yapılan işletmelerde % 49 (THOMPSON ve ark., 2001); Kore'de et sığırcılığı yapılan işletmelerde % 4.1 (KIM ve ark, 2002); Arjantin'de süt inekçiliği yapılan işletmelerde % 56,9 (CAMPERO ve ark.,1998); Kanada'da et sığırcılığı yapılan işletmelerde % 9 (WALDNER ve ark., 2001); Avustralya'da süt işletmelerinde % 30 (Atkinson ve ark., 2000); Meksika'da süt sığırcılığı yapılan işletmelerde % 59 (VASQUEZ ve ark., 2002); Polonya'da süt sığırlarında %15,6 (CABAJ ve ark., 2000) seroprevalans saptanmıştır.

Neosporosis'e diğer hayvanlarda da rastlanmaktadır. Keçi, koyun, at, geyik, kedi, maymun, tilki, rakun, fare ve sıçanlarda değişik ülkeler üzerinde yapılan çalışmalarda *N. caninum* takizoitlerine rastlanmıştır (DUBEY ve LINDSAY,1996).

### **KLİNİK SEMPTOMLAR**

*Neospora caninum* sığır, koyun ve keçilerde aborta neden olmaktadır. *N. caninum*'un ergin sığırlarda spesifik bir klinik semptomu belirlenmemiştir fakat tekrarlayan abortlar, zayıf ve kondüsyonu düşük buzağuların doğması, buzağularda nöromusküler bozukluklar, doğumu takiben üç beş gün içersinde görülürse de bazen bu

işaretlerin görülmesi iki haftaya kadar uzayabilir. Enfekte buzağılar düşük doğum ağırlığındadırlar ve ayağa kalkma gücünü çekerler. Bazen ön ekstremiteler arkaya doğru uzatılarak vücut bir düzlemde tutulmaya çalışılır, fakat ekstremiteler eklemlerden elle bükülebilir durumdadır. Sinirlerin muayenesinde patellar reflekslerin azaldığı, pelvik bölgenin ön kısmında reflekslerin kaybolduğu görülür (DUBEY ve LINDSAY,1996; BARLING ve ark.,2000 ).

Hastalıkla ilgili klinik bulguların en iyi gözlemlendiği hayvan köpeklerdir. Arka bacaklarda gerginlik, anormal yürüyüş, halsizlik gibi belirtilerle birlikte bazen hayvan arka ayakları üzerinde duramayıp ön ayaklarından destek alarak yürür. Bunun yanı sıra ayak refleksleri ve patellar refleksler normaldir. Ayrıca baş ve boyun hareketlerinde düzensizlik ve kaslarda da kuvvetsizlik vardır. Bir köpekte özellikle maseter kasında olmak üzere kaslarda atrofi, bir diğer köpekte ise dermatitis belirlenmiş, özellikle anüsün ventralinden başlayan ülseratif ve fistüler bir deri lezyonunun geliştiği gözlenmiştir. Köpekler her yaşta *N. caninum*'la enfekte olabilirler. Fakat 5 haftalıktan daha büyük köpek yavrularında klinik belirtiler, daha da şiddetli olarak göze çarpar. Özellikle köpeklerde gittikçe artan paraliz, omurilik anomalileri, boyun ağrıları, disfaji ve sonunda ölüm görülür. Klinik olarak paraliz gelişmiş köpeklerde vücut ısısının yüksek olduğu dikkati çeker ve klinik bulgular oluşan meningoensefalomyelitisin göstergesidir. Deneysel olarak oluşturulmuş *N. caninum* enfeksiyonları, köpeklerde uterusu yavru ölümlerine ve hastalıklı yavruların doğumuna neden olur. Hasta olarak doğan yavruların birkaçı ölür, geriye kalanlar ise normal olarak hayatlarına devam ederler (DUBEY ve ark.,1988; DUBEY ve LINDSAY,1996).

## **PATOLOJİ**

*Neospora caninum* takizoit ve bradizoitlerine genelde beyinde ve iskelet kaslarında rastlanır. Toxoplasma enfeksiyonlarında görülen patolojik lezyonlar neosporosis enfeksiyonları için de kabul görmektedir. *Neospora caninum* enfeksiyonlarına özgü patogenez fütusta, neonatal dönemde birbirinin aynısıdır.

Abort olmuş keçi fütusunda makroskobik olarak cerebral sıvıların her iki ventrikülleri genişletmesi sonucu cerebellumun normalden küçülmesi ve bunun sonucunda hemisferlerin atrofiye olması sonucu oluşan hydrocephalus, subkutan ödemler ve peteşial cutaneous hemorajiler belirlemiştir. Abort olmuş yavruda mikroskobik olarak deride mononükleer hücrelerin yaygın infiltrasyonu ve böbreklerde intersitisyel nefritis gibi lezyonlar da tanımlanmıştır (DUBEY ve LINDSAY,1996).

*Neospora caninum* enfeksiyonuna yakalanmış köpeklerde makroskobik lezyonlar pek görülmemekle birlikte arka ayaklardaki paraliz, ataksi ve ülseratif dermatitis gibi

linik bulgular neosporozisi düşündürmelidir. Karaciğer vücut ağırlığının % 5-6'sı kadar büyümüş ve soluk sarı renktedir. Hepatositlerde nekroz vardır ve % 25'inden fazlası yıkılmıştır. Akciğer konjesyoneldir. Bazen diffüz bir pneumoni tablosu görülür. Miyokartta hücre infiltrasyonları ile birlikte kalp kası hücrelerinin içerisinde takizoitlere rastlanabilir. Şiddetli nonpurulent ve nekrotik bir meningoensefalomyelitis, ayrıca vaskulitise birlikte beyin, beyincik ve medulla spinaliste kan damarlarının etrafında tek tek veya yığınlar halinde takizoitlerin görülmesi hastalık için tipik histopatolojik bulgu olarak kabul edilebilir. Parazitin takizoit formu ile bradizoit formunu birbirinden ayırmak için 4-6 mm kalınlığında kesilmiş kesitlerin PAS ile boyanması gerekir. Takizoitler PAS ile boyanmazken bradizoitler boyanmaktadır (DUBEY ve LINDSAY,1996).

Sığırlarda ve Koyunlarda neosporozis ile ilgili patolojik bulgular anadan ziyade atık fetus ve zayıf doğmuş buzağılardır. Patolojik bulgular köpeklerdeki lezyonlara benzerlik göstermektedir. Abort olmuş fötuslarda, lezyonlar ise çoğunlukla beyin spinallerinde ve kalpte görülür. Laboratuvara tanı için materyal gönderilirken ya fetusun tamamı ya da aborte fetusun beyni gönderilmektedir. Bunların yanısıra akciğer ve böbreklerde de lezyonlara rastlanabilir. Kalp genişlemiş, karkas ödemlidir. Histopatolojik olarak multifokal nekrotik nonpurulent ensefalitis ve myokarditis görülebilir. Bu bulgular sığır neosporozisi için karakteristik olarak kabul edilebilir. Nonpurulent ensefalitis ortada nekrotik odak ve etrafında neuroglia hücreleri ile mononükleer hücrelerden oluşur. Lezyonlu bölgelerde takizoitlere de rastlamak mümkündür. Ancak takizoitlerin identifikasyonu için immunohistokimyasal metodlar kullanılmalıdır. Abort olmuş fötusa ait plasenta kotiledonlarında *N. caninum* ile ilgili nekrozlar görülmektedir (DUBEY ve LINDSAY,1996; GONZALES ve ark., 1999; PEREZ ve ark.,1998).

## **TANI**

Neosporosis'de klinik belirtilere bakılarak tanıya gitmek hemen hemen olanaksızdır. *Neospora caninum* infeksiyonlarında klinik belirtiler çok değişik olmakta, bu nedenle genellikle birçok hastalıkla karıştırılabilmektedir. Klinik tanıya yardımcı olabilecek karakteristik belirtilerin hemen görülmemesi nedeniyle birçok hastalığı birden düşündürebilecek genel belirtilerle birlikte neosporosis de düşünülmalıdır. Ancak *N. caninum* infeksiyonu akla geldiği veya düşünüldüğü zaman, abort, merkezi sinir sistemi bozuklukları ve encephalomyelitis gibi klinik belirtiler yanında kesin tanıya yardımcı olabilecek laboratuvar tanı yöntemlerinin de uygulanması gerekmektedir. Son yıllarda doku kesitlerindeki *N. caninum*'un identifikasyonunda Avidin-biotin-peroxidase complex (ASPC) immunperoksidaz testi geliştirilmiştir. Bu testle tavşanlarda üretilmiş *N. caninum*'un antikoru kullanılmaktadır. Böylece *N. caninum* takizoitlerini ve bradizoitlerini apicomplexa şubesindeki diğer kistlenen parazitlerden kolayca ayırmak

mümkün olmaktadır. *Neospora caninum* gibi dokularda kistlenen *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Cystoisospora* ve *Sarcocystis*'ler *N. caninum* 'dan ayrılabilir. *Sarcocystis*'in şizont ve gametleri iyi sınırlanmış parazitik vakuol içinde bulunurlar. Kist duvarı kalın yapıda olan *Besnoitia* spp. ise konakçı hücrenin nükleusunu içine alır ve bu parazitin henüz köpeklerde bulunduğu rapor edilmemiştir. Köpeklerin en yaygın kistlenen paraziti olan *Cystoisospora* spp. ise özellikle bağırsak hücrelerinde parazitik vakuol içerisinde yerleşir ve şizontları çevre dokularda bulunmaz. *Frankelia* spp. küçük memelilerin parazitidir ve kistleri sadece beyinde görülür. *Hammondia heydorni*'nin son konağı köpeklerdir ve gelişmelerinde iki konak kullanırlar. Fakat *H. heydorni*'nin şizont ve gametonları köpeklerin bağırsak epitellerinde gelişir ve konak hücrede parazitik vakuol içinde bulunur. *Neospora caninum* 'un ışık mikroskopik yapısı *T. gondii*'ye benzer. Ancak *N. caninum* konak hücrede parazitik vakuol olmaksızın serbest olarak lokalize olabilmektedir ve çok sayıda rhoptri taşır (DUBEY ve LINDSAY,1996; SCHARES ve ark.,1999).

#### **Işık mikroskobu ile teşhis:**

Bu teşhiste amaç, protozoon etkeninin direkt olarak ışık mikroskobunda görülmesi esasına dayanır. Bunun için beyin-omurilik sıvısı, kemik iliği ponksiyonu ve ateşli olgularda kan alınarak sürme preparatları yapılır. Preparatlarda takizoiti görmek için Giemsa ve Wright, doku kistlerini görmek için periodic acid schiff (PAS) ve Wright-Giemsa boyaları kullanılır. Eğer muayene materyali biyopsi ise doku kesitleri hematoksilin-eozin ile boyanır. Alınan materyal birkaç ml hacminde sıvı ise bu sıvı 2000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek çökeltiden preparat hazırlanır ve aynı boyama yöntemleriyle boyanır (DUBEY ve LINDSAY,1996) .

#### **Elektron mikroskobunda teşhis:**

*N. caninum*'da mikronemler plazmoleme dik olarak yerleşirken *T. gondii*'de mikronem düzenli olarak bir yerleşim göstermiştir. Toksoplazma kistleri ince duvar olup beyin iskelet kalp kasını tercih ettikleri halde *Neospora caninum* kistleri Toksoplazma *gondii* kistlerine göre kalındır (0,5 µm'den kalın) ve merkezi sinir sistemini toksoplazmaya oranla daha çok tercih eder (DUBEY ve LINDSAY,1996).

#### **Patolojik, İmmuno-patolojik teşhis :**

Üç köpektten elde edilen beyin dokusu parçalarında avidin-biotin immünohistokimyasal tekniği kullanılarak bradizoit ve doku kistlerinin varlığını ortaya konmuştur. Bu tekniğin ayırıcı teşhiste oldukça spesifik olduğu belirtilmektedir (JARDINE;1996).

### **Serolojik Teşhis:**

*Neospora caninum*'a özgü antikorları belirlemek için kullanılan serolojik testler tanı için önemli asıl testlerdir. Bu testlerden özellikle IFAT ve ELISA neosporosis teşhisinde fazlaca kullanılır. Serolojik testlerde doku kültüründen hazırlanan *N. caninum* takizoitleri antijen olarak kullanılırlar. Fareler üzerinde yapılan çalışmada *N. caninum* ile *T. gondii* arasında antijenik olarak farklılık bulunduğu ve bu iki protozoon arasında çapraz reaksiyonun meydana gelmediği saptanmıştır (DUBEY ve LINDSAY, 1996; BJÖRKMAN ve ark., 1997; BJÖRKMAN ve UGGLA, 1997).

### **IFAT**

Canlı hayvanlarda neosporosis teşhisi IFAT ile IgM'ye karşı hazırlanan floresans işaretli antiserumla çalışır. IFAT anti-nükleer antikor (ANA) ve Romatoid Faktör (RF) içeren serumlarla da yalancı negatif sonuçlar verebilmektedir(DUBEY ve LINDSAY,1996).

### **ELISA**

IFAT testine göre daha hassas ve spesifik bir testtir. RF ve ANA'nın neden olduğu yalancı pozitiflik bu testte görülmez (DUBEY ve LINDSAY,1996)

### **KÜLTÜR**

Neosporosisin tanısında kültürün fazla bir pratik değeri yoktur. Beyin omurilik sıvısından elde edilen materyalin veya *N. caninum* kistlerinin yada in vivo olarak deney hayvanlarından sağlanan taşıyıcıların doku kültürlerinde üretilmesiyle hem teşhis yapılabilir ve hem de elde edilecek takizoitler sitolojik, sitokimyasal ve antijenik çalışmalar için olanak sağlar (CONRAD ve ark., 1993).

### **TEDAVİ**

Bu güne kadar *Neospora caninum*'a karşı spesifik bir ilaç belirlenmemiştir. Bu protozoer infeksiyonun sağaltımında toxoplasmosis infeksiyonlarında tavsiye edilen preparatlar kullanılabilir. Kullanılan ilaçlar sadece takizoitlere etkilidir. Neospora infeksiyonlarının sağaltımı konusunda in vitro olarak yapılan bir çalışmada; 0,005 mg/ml lasalocid sodium, 0,05 mg/ml monensin sodyum, 0,01 mg/ml prithrexim, 0,05 mg/ml pyrimethamine ve 5,0 mg/ml trimethoprime'in sığırların monosit hücre kültüründen köken alan hücre içi *N. caninum* takizoitlerinin gelişmesini önlemede etkili olduğunu belirtilmiştir. Aynı çalışmada 10,0 mg/ml amprolium hydroclorid, 200 mg/ml sulfametaksazole ile tedavi edilen kültürler, kontrollerle karşılaştırıldığında da kayda değer bir farkı görülmemiştir (LINDSAY ve DUBEY,1986). Deneysel olarak oluşturulan neosporosis infeksiyonlarında sulfadiazine ve amprolium'un etkileri immunosupressif fareler kullanılarak incelenmiş, sonuçta takizoit inokulasyonundan 7 gün sonra verilen bu

iki ilacında neosporiosis sağaltımında etkili olmadığı belirlenmiştir (DUBEY ve LINDSAY,1996).

### **KORUNMA KONTROL**

Hastalığın yayılmasında arakonak ve son konak olan köpeklerin rolü büyüktür. Bu yüzden köpeklerin gelişigüzel dışkılamaları önlenmelidir. Köpeklerin yoğun yaşadığı meralara sığırların sokulmaması ve yine köpeklerin ahırlara yaklaştırılmaması önem taşımaktadır. Hastalığın bulaşma yollarından birisi de kontamine atıktır. Böyle fötusların köpekler tarafından yenilmesi engellenmelidir (DUBEY ve LINDSAY, 1996).

Son yıllarda hastalıktan korunma amacı ile aşı geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. *Neospora caninum* takizoitlerinden hazırlanan bir aşı şu anda hastalığın yaygın olduğu bölgelerde kullanılmaktadır (ANDRIANARIVO ve ark., 1999).