

Atlarda Protozoal Myeloensefalit

Veli Y. ÇIRAK*

Geliş Tarihi: 08.03.2004

Kabul Tarihi: 13.05.2004

Özet: Atlarda protozoal myeloensefalit (EPM), *Sarcocystis neurona*'nın neden olduğu sinirsel bir hastalıktır. Son konak opossumlar olup, atlar sarkokistlerin bulunmamasından dolayı atipik arakonak kabul edilmektedirler. Kedi, rakun, armadillo, su samuru ve kokarcalar arakonaklardır. EPM atlarda özellikle merkezi sinir sistemini etkilemekte; odak tarzında kas atrofisi ve asimetrik yürüyüş bozukluğu gibi çeşitli semptomlara yol açmaktadır. Klinik EPM teşhisinde beyin omurilik sıvısının *S. neurona*'ya spesifik antikorlar yönünden Western blot ile muayenesi gerekir. Tedavide sülfadiazin+pirimethamin'in yanı sıra alternatif olarak toltrazuril, ponazuril, diklazuril ve nitazoksanid kullanılır.

Anahtar Kelimeler: At, protozoal myeloensefalit, *Sarcocystis neurona*, opossum.

Equine Protozoal Myeloencephalitis

Summary: Equine protozoal myeloencephalitis (EPM) is a neurological disease of horses most commonly caused by *Sarcocystis neurona*. Opossums serve as definitive hosts and horses are considered as aberrant hosts because no sarcocysts are found in horses. Cats, raccoons, armadillos, sea otters and skunks are defined as intermediate hosts. EPM mainly affects the central nervous system of horses and causes a variety of clinical signs including asymmetric gait deficits with focal muscle atrophy. For the clinical diagnosis of EPM, examination of cerebrospinal fluid by Western blot for *S. neurona* specific antibodies is necessary. Treatment involves the use of sulfadiazine+pyrimethamine and, toltrazuril, ponazuril, diclazuril and nitazoxanide are possible alternatives.

Key Words: Horse, protozoal myeloencephalitis, *Sarcocystis neurona*, opossum.

Giriş

1974 yılında üç ayrı araştırmacı grubu tarafından segmental myelitis klinik tablolulu atlarda saptanan parazitler, *Toxoplasma gondii*⁵ veya *T. gondii* benzeri protozoon¹ olarak tanımlanmış, ancak Dubey ve ark.¹⁰ gördükleri bu protozoonun *Toxoplasma* olmadığını bildirmişlerdir. Bu parazitin atlarda neden olduğu hastalığa ise "equine protozoal myeloencephalitis" (EPM) adı verilmiştir³⁶. Simpson ve Mayhew⁴⁴ elektron mikroskopunda yapısal özelliklerini inceledikleri protozoonun *Sarcocystis* cinsinden olduğuna dair önemli bulgular elde etmişlerdir. Kuzey Amerika'da birkaç farklı odakta incelenen EPM olgularında, morfolojik olarak hep tek tip parazitlere

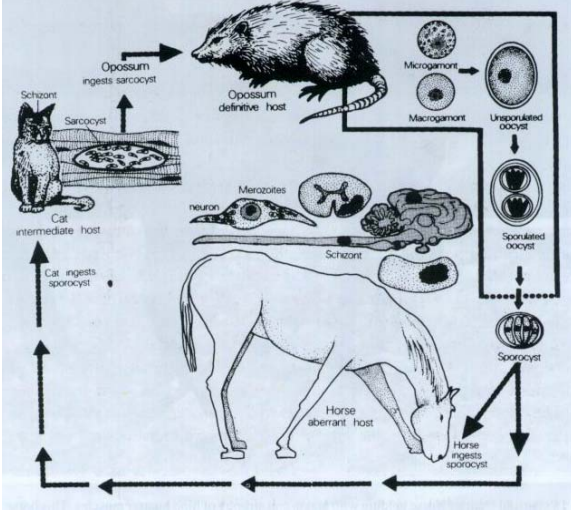
rastlanmış ve ilk defa atlardan izole edilen bu protozoon *Sarcocystis neurona* adı verilmiştir¹¹. *S. neurona*, diğer *Sarcocystis* türleri, *T. gondii*, ve birkaç *Eimeria* türü ile "random amplified polymorphic DNA" metoduyla karşılaştırılmış ve *S. neurona*'yı diğer türlerden ayıran bir random primer tespit edilmiştir²⁵. Özellikle *S. neurona* ve *S. falcatula*'nın nss-rRNA gen sekansları birbirine çok yakın olmasına rağmen, biyolojik, morfolojik ve moleküler veriler bu iki türün farklı olduklarını ortaya koymuştur¹³.

Morfoloji ve Yaşam Çemberi

S. neurona, coccidia alt sınıfında (Apicomplexa: Sarcocystidae) yer alan bir protozoon

* Yrd. Doç. Dr., Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji ABD, Bursa.

olup son konağı “opossum”dur (*Didelphis virginiana*-Kuzey Amerika opossumu ve *D.albiventris*-Güney Amerika opossumu)^{13,14} (Şekil 1). Opossum, keselisıçangiller familyasından kediye benzeyen sivri suratlı omnivor bir hayvandır. Arakonak olarak rakun, kedi, armadillo, su samuru ve kokarcaların kaslarında sarkokistler teşhis edilmiş^{3,4,16,19,48}, at gibi çeşitli memelilerin de atipik arakonak olarak rol oynadıkları bildirilmiştir¹⁵.



Şekil 1:

Sarcocystis neurona'nın yaşam çemberi¹⁵

Figure 1:

Life cycle of *Sarcocystis neurona*¹⁵

Doğal enfekte opossumun dışkılarından elde edilen sporokistlerin, laboratuvarda yetiştirilen kedi ve rakunlara deneysel olarak yedirilmesiyle iskelet kaslarında sarkokistler gelişmiştir^{17,46}. Sarkokistler yaklaşık 700 µm uzunluğunda, kalın kist duvarı ise 1-2 µm olup ince uzun çıkıntılar taşır. Bradizoitler ince ve ufaktırlar (yaklaşık 5 µm uzunluğunda). Enfekte kedilerin kasları laboratuvarda yetiştirilen opossumlara yedirilmiş ve dışkıyla sporokist çıkardıkları gözlenmiştir. Sporokistler 10x8 µm büyüklüğündedir.

Sporokistlerin arakonaklar tarafından alındıktan sonra merkezi sinir sistemi (MSS)'ne muhtemelen lökositler aracılığıyla taşındığı tahmin edilmektedir⁸. Fenger ve ark.²² opossumdan topladıkları sporokistleri atlara yedirerek klinik EPM oluşturmuşlardır. Bu atlarda *S. neurona*'ya spesifik antikolar, nörolojik rahatsızlık ve doğal enfekte atlardakine benzer lezyonlar oluşmasına rağmen *S. neurona* histolojik olarak veya hücre kültürü denemelerinde tespit edilememiştir. Doğal enfekte atların MSS'nde, özellikle beyin ve

omurilikte *S. neurona*'nın sadece aseksüel safhaları tespit edilebilmiştir. *S. neurona*'nın şizont ve merozoitleri nöronlarda, mononükleer hücrelerde ve glia hücrelerinde bulunur¹⁰. Tek bir nöronda 13 şizont olabildiği gibi birkaç yüz merozoit de olabilmektedir. Şizont ve merozoitler, paraziter vakuol olmaksızın konak hücre stoplazmasında bulunurlar. Histolojik kesitlerde merozoitlerin 3-5 µm uzunluğunda ve bir adet merkezi veziküler çekirdeğin olduğu görülmüştür. Roptriler ise bulunmamaktadır. *S. neurona* MSS'nde endopolygeni yoluyla çoğalır. Endopolygeni'de çekirdek loblu bir şekil almakta merozoitlerden şizontların oluşması aşamasında merozoitin çekirdeği büyüyerek dört veya daha fazla çekirdekçiğe bölünmektedir. Tek hücreli şizont erken safhada makrofaj veya dejenere olmuş konak hücrelerine benzemektedir. Bir çekirdek içerisinde birden fazla çekirdekçiğin varlığı *S. neurona*'yı dejenere konak hücrelerinden ayırmaya yarar. Merozoitler, şizontların merkezinde veya periferinde bulunurlar. Bazı merozoitler buldukları konak hücrelerini terk ederek diğer hücreleri enfekte ederler ve oralarda bir şizogoni generasyonu başlar. Ancak çoğu merozoit oluştukları hücre içinde kalırlar ve diğer şizogoni generasyonlarını başlatırlar. Bunlardan ancak birkaçı olgun şizont haline dönüşür. MSS'ndeki olgun şizontlar 30 µm uzunluğunda, oval, yuvarlak, uzamış veya düzensiz şekillerde olabilir¹⁰.

Patojenite ve Klinik Belirtiler

EPM'de patojenite ve klinik belirtiler, parazitin MSS'nde yerleştiği bölgeye göre şekillenmektedir. Örneğin, beynin de etkilendiği durumlarda depresyon, davranış değişiklikleri veya nöbetler görülebilirken, beyin kökü ve omurilikteki lezyonlar anormal yürüyüşe; asend ve desend alanların etkilenmesi ise inkoordinasyona yol açabilir³². Kranial sinir çekirdeklerinin zarar görmesiyle de fasiyal sinir paralizi, başın yana doğru eğilmesi, bir veya daha fazla bacakta ataksi, yana doğru eğik durma eğilimi, dilin paralizi, idrar yapamama, yutkunma güçlüğü, masseter ve temporal kaslarda atrofi gibi bozukluklar görülür^{31,32,36,37,40}. Bacak kaslarını inerve eden gri hücrelerin şiddetli harabiyeti neticesinde kaslarda zayıflama ve atrofi görülebilir. Kuadriseps ve gluteal kaslar genelde atrofiye uğramalarına rağmen *S. neurona*'ya kaslarda rastlanmamıştır. Bazı atlarda üst solunum yolu fonksiyon bozuklukları, atipik topallık ve hatta

nöbetler gözlenir. Şiddetli vakalarda ayakta durma, yürüme ve yutkunma güçlüğü belirgindir ve hastalık çok hızlı ilerler. Bazı atlarda ise hastalığın ilerlemesi bir süre için duraklama periyoduna girer. Erken safhada görülen sendeleyerek yürüme sık sık torasik ve/veya pelvik topallıkla karıştırılır. Bir çok vakada ataksinin de gözlemlendiği belirtiler aşamalı bir şekilde gelişirken, bazı atlarda hafif klinik belirtileri takiben hızlı bir ilerleme safhası görülür. Fiziksel muayenede; hayati fonksiyonlar genellikle normal olmasına rağmen bazı atlar zayıf ve hafif durgundurlar. Nörolojik muayenede; sık sık hipotalamik bölgeler veya tam duyu kaybı dikkati çeker. Nörolojik hastalık belirtisi gösteren her at EPM'ye yakalanmış olabileceği riskini taşır. İlk muayenede çoğu atların kan değerleri normal değerlerdedir. Odak şeklindeki kas atrofiyle beraber seyreden asimetrik yürüyüş bozukluğu tanıda kolaylık sağlar.

Tanı

Kan ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'nın biyokimyasal analizi: EPM, tam kan sayımında, serum kimyasal değerlerinde veya BOS'nun renginde, berraklığında, hücre sayısında, protein, enzim, glukoz ve elektrolit konsantrasyonunda ölçülebilir değişikliklere neden olmaz³¹. Ancak bu analizler, örneğin BOS'nun muayenesi enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan nörolojik hastalıkların ayırımında yararlıdır. BOS ve serumdaki albumin konsantrasyonlarının oranı (albumin bölümü: AQ) da BOS'nun kalitesini değerlendirmeye yarar. Albumin serumda en fazla bulunan bir proteindir ve BOS'nda üretilmediği için BOS'nda varlığı halinde kandan gelmiş olması gerekir. Eğer BOS'ndaki albumin konsantrasyonu ve/veya AQ yüksek bulunmuş ise, ya kan-beyin bariyerinin permeabilitesi artmış ya da numune yanlışlıkla kanla kontamine olmuş olabilir. Zira BOS'nun çok az miktarda dahi kanla karışık olması yanlış *S. neurona* teşhislerine yol açabilir³⁸.

Serum ve BOS'nda antikor tespiti: Serum ve BOS'nda immunblot (Western blot) yöntemiyle *S. neurona*'ya spesifik antikorlar tespit edilir. Hücre kültüründe yetiştirilen merozoitler antijen olarak kullanılırlar. Bu doğrultuda serum ve BOS'nda anti-*S. neurona* antikorlarını tespit eden ticari bir immunblot testi geliştirilmiştir¹⁵. *S. neurona* seropozitif çıkan atlara EPM teşhisi koyarken aynı zamanda BOS'nun da muayene edilmesi önerilmektedir⁴¹. İmmunblot sonuçları,

doğruluk değerlendirmesi yapmak için, "Altın Standard" olarak kabul edilen ölüm sonrası muayene sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Gransstrom²⁴,un bu şekilde yaptığı bir karşılaştırma neticesinde, BOS ile yapılan immunblot testinin duyarlılığı ve spesifitesi %89 olarak belirlenmiştir. *S. neurona* kaynaklı EPM tanısında serum örneklerinde IFAT ve direk aglutinasyon testi (SAT)'inden de olumlu sonuçlar alınmıştır^{7,30}.

PCR: BOS'nda, *S. neurona* DNA'sının PCR ile teşhisi de tanıda önemlidir³⁴. Bu şekilde *S. neurona* antikorları yönünden negatif olan BOS örneklerinde parazit DNA'sı teşhis edilmiştir.

Patolojik bulgular: EPM'de en belirgin lezyonlar MSS'nde oluşur^{1,5,10}. Akut lezyonlarda rastgele dağılmış çok odaklı hemoraji alanları, subakut lezyonlarda solgundan koyu sarı-kahverengiye kadar olabilen alanlar, kronik lezyonlarda ise yumuşamış odaklar dikkati çeker. Beyin kökü beyin diğer alanlarından daha sık etkilenmesine rağmen, lezyonların çoğu omurilikte gözlenir. Mikroskopik bakıda birbiriyle birleşmiş hemoraji ve yangı odakları^{1,5,10,26} ve lenfosit, nötrofil, eozinofil, çok çekirdekli dev hücreler ve gitter hücrelerin karışımından meydana gelen infiltratlar gözlenir. *S. neurona* safhalarının sayısı genelde az ve hematoksilen/eosin (H&E) ile boyanmış histolojik kesitlerde görülmeleri zordur. Çok fazla lezyonun şekillendiği durumlarda bile etken sayısının genelde düşük olması lezyonların oluşmasında sitokin ve/veya metabolitlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Hemorajik lezyonların sebebi de bilinmemektedir, zira parazitlere genelde extravasküler alanlarda rastlanmaktadır.

Mikroskopik ayırıcı tanı: Ayırıcı tanıda dikkate alınması gereken önemli organizmalar *T. gondii*, *Neospora* ve *Sarcocystis* türleridir. *T. gondii* yapısal ve antijenik olarak *S. neurona*'dan farklıdır. *T. gondii* endodyogeny, *S. neurona* ise endopolygeny yoluyla çoğalır. *T. gondii*'de immatür safha görülmezken, *S. neurona*'da merozoit üretiminden önce, büyük loblu veya bölünen bir çekirdeği olan immatür şizontlar gözlenir. Nadiren *Neospora* türleri klinik EPM vakaları ile ilişkilendirilmişlerdir³³. Ancak *Neospora* etkenleri yapısal olarak *T. gondii*'ye benzemelerinden dolayı *S. neurona*'dan ayrılırlar. Atlarda *S. neurona* enfeksiyonu şimdiki kadar sadece sinir dokusunda tespit edilirken, diğer *Sarcocystis* türlerine damar endoteliumu gibi başka dokularda da rastlanabilmektedir.

İmmunhistokimya: İmmunhistokimyasal metodlar, *S. neurona*'yı diğer organizmalardan ayırmaya yarar. Bu testlerde *S. neurona*'ya spesifik serum kullanılmalıdır, zira *Sarcocystis*'lere yönelik antikor ihtiva eden serumlar *S. neurona* antijenleri ile çapraz reaksiyon verirler²⁶. Kısa süre önce bir *S. neurona* suşunun merozoitlerinde farklı iki immundominant protein epitoplarına bağlanan monoklonal antikorlar üretilmiştir³⁵.

Tedavi

EPM'den şüphelenilen atlarda klinik belirtilerin başlamasından hemen sonra tedaviye başlanmalıdır. Hasta atların %70-75'inin tedavi sonrasında iyileştiği bildirilmektedir¹⁵. Tedavide uzun yıllar sülfonamidler (sülfadiazin: 20 mg/kg dozda ağızdan günde veya iki günde bir defa) ve pirimethamin (1 mg/kg dozda günde 1 defa 120 gün veya daha uzun bir süre) kullanılmıştır (klasik tedavi)^{32,36}. BOS'nun pozitif olduğu durumlarda ve/veya atlar nörolojik hastalık belirtileri göstermeye devam ettiklerinde tedavi süresi uzayabilir. Tedaviye, klinik belirtiler önemli oranda düzelineceye ve BOS immunblotta negatif oluncaya kadar devam edilir. Klasik tedaviye cevap vermeyen veya komplikasyon şekillenmiş atlarda alternatif olarak diklazuril tedavisi yapılır⁶. Diklazuril'in aynı zamanda profilaktik olarak kullanılabileceği de belirtilmiştir. Toltrazuril'in metaboliti olan ponazuril'in de *S. neurona*'ya karşı in vitro aktivitesinin olduğu tespit edilmiş, farelerde de kısmi bir koruyucu etkisinin olduğu gözlenmiştir²³. EPM'de etkili bir diğer ilaç nitazoksanid olup ilk 7 gün için ağızdan 25 mg/kg, daha sonra 30. güne kadar 50 mg/kg dozda uygulanır³⁷. EPM tedavisinde immunstimülanlarla destek tedavisi de yapılabilir. Ancak klinik belirtileri kötüleştirmesinden dolayı EPM şüpheli atlarda kortikosteroid kullanımından kaçınılmalıdır.

Bağışıklık ve Hastalıktan Korunma

S. neurona'ya karşı koruyucu hücresel bağışıklığın, özellikle CD8 lenfositlerin önemli rolü olduğu belirtilmektedir⁵⁰. *S. neurona*'nın iki tane yüzey proteinine (Sn14 ve Sn16) yönelik olan antikorların hücre kültüründe, merozoitlerin hücrelere girişlerini inhibe edici etkilerinin olduğu bildirilmiş²⁹ ve humoral bağışıklığın da önemine dikkat çekilmiştir. Ölü *S. neurona* merozoitleri enjekte edilen atlarda antikor oluşması

muhtemel bir *S. neurona* aşısı geliştirme çabalarını ümitlendirmiştir. Bu doğrultuda kısa süre önce ABD'de ticari bir aşıya koşullu lisans verilmiştir²⁷. Diğer taraftan atların mera alanları, yem depoları ve su kaynaklarının opossumlar tarafından rahatça ulaşılamayacak tarzda izole edilmeleri de korunmada etkili tedbirlerdendir.

Epizootiyoloji

Atlarda EPM'ye en çok kuzey, orta ve güney Amerika'da rastlanmaktadır ve ABD'de en sık teşhis edilen nörolojik hastalıktır¹⁵. Diğer ülkelerden şimdiye kadar bildirilen klinik EPM vakalarının çoğu Amerika'dan ithal edilmiş hayvanlara aittir^{28,49}. Kısa süre önce Fransa'da iki çiftlikte sağlıklı atların %36'sında anti-*S. neurona* antikorlarının tespit edilmesi, başka parazit (suşların) veya konakların olasılığına işaret etmektedir³⁹.

ABD ve Kanada'daki 10 odakta 364 EPM vakası histolojik olarak teşhis edilmiş; hastalığın daha çok 1-5 ve >13 yaş grubunda görüldüğü ve bir ırk tercihinin olmadığı gözlenmiştir²¹. ABD, Arjantin ve Brezilya'daki at ve diğer tektırnaklı hayvanlarda *S. neurona* prevalansının %30-89 arasında değiştiği saptanmıştır^{2,12,20,47}. Klinik EPM, daha çok sporadik vakalar şeklinde ortaya çıkmakta ve bir odakta birden fazla vakalara nadiren rastlanmaktadır^{32,36}. Daha önce EPM teşhis edilen çiftliklerde yeniden EPM görülme ihtimali henüz hiç EPM vakası görülmeyen çiftliklere göre 2.5 kez daha fazladır⁴³. EPM'nin kışa nazaran ilkbahar ve yazın görülme riski 4 katına, sonbaharda ise 6 katına çıkmaktadır. EPM görülme riski opossum görülen (ormanlık) bölgelerde bulunan atlarda, hiç opossum görülmeyen bölgelerde bulunan atlara göre 2-2.5 kat daha fazladır. Diğer taraftan hayvanların antrenman, nakliye, yaralanma veya doğum gibi genel sağlık durumlarını etkileyen faktörler ile EPM arasında sıkı bir korelasyon bulunmaktadır. EPM tanısı konan atların iyileşme olasılıkları tedavi uygulananlarda uygulanmayanlara göre 10 kat daha fazla bulunmuştur. Ancak şiddetli klinik belirti gösteren atların hafif klinik belirti gösterenlere nazaran iyileşme şansları düşüktür⁴². Alınan sporokist sayısı ile atlarda antikor oluşma süresi, nörolojik semptomların şiddeti ve mikroskobik lezyonların oluşumu arasında bir doğru oranı saptanmıştır⁴⁵.

Opossumlarda *S. neurona* prevalansı konusunda henüz kapsamlı bilgiler bulunmamakla birlikte ABD'de opossum popülasyonlarında

yüksek olduğu tahmin edilmektedir⁹. Opossumların dışkısında genelde az sayıda sporokist görülmesine rağmen bağırsakta lamina propriyada bulunan milyonlarca sporokist aylarca lumene bırakılarak arakonaklar için sürekli bir enfeksiyon kaynağı oluşturmaktadırlar. Sporokistlerin birçok dezenfektana dayanıklı olduğu, ancak 55°C'de 5 dakika içerisinde enfektivitelerini kaybettikleri gözlenmiştir¹⁸.

Sonuç olarak EPM, bugüne kadar en fazla Amerika kıtasında görülen bir hastalık olmasına rağmen, etken biyolojisindeki konak, arakonak, farklı suşlar gibi konularda hala bilinmeyen noktaların bulunmasından dolayı gelecekte tüm dünya atlarını yakından ilgilendiren bir konu olarak ortaya çıkma durumu söz konusu olabilir.

Kaynaklar

1. BEECH J, DODD DC. *Toxoplasma*-like encephalomyelitis in the horse. *Vet Pathol.* 1974; 11: 87-96.
2. BENTZ BG, EALEY KA, MORROW J, CLAYPOOL PL, SALIKI JT. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in equids residing in Oklahoma. *J Vet Diagn Invest.* 2003; 15: 597-600.
3. CHEADLE MA, TANHAUSER SM, DAME JB, SELTON DC, HINES M, GINN PE, MACKAY RJ, GREINER EC. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *Int J Parasitol.* 2001; 31: 330-335.
4. CHEADLE MA, YOWELL CA, SELTON DC, HINES M, GINN PE, MARSH AE, MACKAY RJ, DAME JB, GREINER EC. The striped skunk (*Mephitis mephitis*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *Int J Parasitol.* 2001; 31: 843-849.
5. CUSICK PK, SELLS DM, HAMILTON DP, HARDENBROOK HJ. Toxoplasmosis in two horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1974; 164: 77-80.
6. DİRİKOLU L, LEHNER F, NATTRASS C, BENTZ BG, WOODS WE, CARTER WG, KARPIESIUŁ W, JACOBS J, BOYLES J, HARKINS JD, GRANSTROM DE, TOBİN T. Diclazuril in the horse: its identification and detection and preliminary pharmacokinetics. *J Vet Pharmacol Ther.* 1999; 22: 374-379.
7. DUARTE PC, DAFT BM, CONRAD PA, PACKHAM AE, GARDNER IA. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. *J Vet Diagn Invest.* 2003; 15: 8-13.
8. DUBEY JP. Migration and development of *Sarcocystis neurona* in tissues of interferon gamma knockout mice fed sporocysts from a naturally infected opossum. *Vet Parasitol.* 2001; 95: 341-351.
9. DUBEY JP, BLACK SS, RICKARD LG, ROSENTHAL BM, LINDSAY DS, SHEN SK, KWOK OC, HURST G, RASHMİR-RAVEN A. Prevalence of *Sarcocystis neurona* sporocysts in opossums (*Didelphis virginiana*) from rural Mississippi. *Vet Parasitol.* 2001; 95: 283-293.
10. DUBEY JP, DAVIS GW, KOESTNER A, KIRYU K. Equine encephalomyelitis due to a protozoan parasite resembling *Toxoplasma gondii*. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 165: 249-255.
11. DUBEY JP, DAVIS SW, SPEER CA, BOWMAN DD, DE LAHUNTA A, GRANSTROM DE, TOPPER MJ, HAMİR AN, CUMMINGS JF, SUTER MM. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J Parasitol.* 1991; 77: 212-218.
12. DUBEY JP, KERBER CE, GRANSTROM DE. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *J Am Vet Med Assoc.* 1999 ; 215: 970-972.
13. DUBEY JP, LINDSAY DS. Isolation in immunodeficient mice of *Sarcocystis neurona* from opossum (*Didelphis virginiana*) faeces, and its differentiation from *Sarcocystis falcatula*. *Int J Parasitol.* 1998; 28: 1823-1828.
14. DUBEY JP, LINDSAY DS, KERBER CE, KASAİ N, PENA HF, GENNARİ SM, KWOK OC, SHEN SK, ROSENTHAL BM. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001; 95: 295-304.
15. DUBEY JP, LINDSAY DS, SAVİLLE WJ, REED SM, GRANSTROM DE, SPEER CA. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet Parasitol.* 2001; 95: 89-131.
16. DUBEY JP, ROSYPAL AC, ROSENTHAL BM, THOMAS NJ, LINDSAY DS, STANEK JF, REED SM, SAVİLLE WJ. *Sarcocystis neurona* infections in sea otter (*Enhydra lutris*): evidence for natural infections with sarcocysts and transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*). *J Parasitol.* 2001; 87: 1387-1393.
17. DUBEY JP, SAVİLLE WJ, LINDSAY DS, STİCH RW, STANEK JF, SPEERT CA, ROSENTHAL BM, NJOKU CJ, KWOK OC, SHEN SK, REED SM. Completion of the life cycle of *Sarcocystis neurona*. *J Parasitol.* 2000; 86: 1276-1280.

18. DUBEY JP, SAVILLE WJ, SREEKUMAR C, SHEN SK, LINDSAY OS, PENA HF, VIANNA MC, GENNARI SM, REED SM. Effects of high temperature and disinfectants on the viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts. *J Parasitol.* 2002; 88: 1252-1254.
19. Dubey JP, Saville WJ, Stanek JF, Lindsay DS, Rosenthal BM, Oglesbee MJ, Rosypal AC, Njoku CJ, Stich RW, Kwok OC, Shen SK, Hamir AN, Reed SM. *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. *Vet Parasitol.* 2001; 100: 117-129.
20. Dubey JP, Venturini MC, Venturini L, McKinney J, Pecoraro M. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Vet Parasitol.* 1999; 86: 59-62.
21. FAYER R, MAYHEW IG, BAIRD JD, DILL SG, FOREMAN JH, FOX JC, HIGGINS RJ, REED SM, RUOFF WW, SWEENEY RW, TUTTLE P. Epidemiology of equine protozoal myeloencephalitis in North America based on histologically confirmed cases. A report. *J Vet Intern Med.* 1990; 4: 54-57.
22. FENGER CK, GRANSTROM DE, GAJADHAR AA, WILLIAMS NM, MCCRILLIS SA, STAMPER S, LANGEMEIER JL, DUBEY JP. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). *Vet Parasitol.* 1997; 68: 199-213.
23. FRANKLIN RP, MACKAY RJ, GILLIS KD, TANHAUSER SM, GINN PE, KENNEDY TJ. Effect of a single dose of ponazuril on neural infection and clinical disease in *Sarcocystis neurona*-challenged interferon-gamma knockout mice. *Vet Parasitol.* 2003; 114: 123-30.
24. GRANSTROM DE. Equine Protozoal Myeloencephalitis: parasite biology, experimental disease, and laboratory diagnosis. In: *Proceedings of the International Equine Neurology Conference 1997*, Ithaca, NY, 4.
25. GRANSTROM DE, MACPHERSON JM, GAJADHAR AA, DUBEY JP, TRAMONTIN R, STAMPER S. Differentiation of *Sarcocystis neurona* from eight related coccidia by random amplified polymorphic DNA assay. *Mol Cell Probes.* 1994; 8: 353-356.
26. HAMIR AN, MOSER G, GALLIGAN DT, DAVIS SW, GRANSTROM DE, DUBEY JP. Immunohistochemical study to demonstrate *Sarcocystis neurona* in equine protozoal myeloencephalitis. *J Vet Diagn Invest.* 1993; 5: 418-422.
27. <http://www.epmvaccine.com>
28. KATAYAMA Y, WADA R, KANEMARU T, SASAGAWA T, UCHIYAMA T, MATSUMURA T, ANZAI T. First case report of *Sarcocystis neurona*-induced equine protozoal myeloencephalitis in Japan. *J Vet Med Sci.* 2003; 65: 757-759.
29. LIANG FT, GRANSTROM DE, ZHAO XM, TIMONEY JF. Evidence that surface proteins Sn14 and Sn16 of *Sarcocystis neurona* merozoites are involved in infection and immunity. *Infect Immun.* 1998; 66: 1834-1838.
30. LINDSAY DS, DUBEY JP. Direct agglutination test for the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in experimentally infected animals. *Vet Parasitol.* 2001; 95: 179-86.
31. MACKAY RJ. Equine protozoal myeloencephalitis. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1997; 13: 79-96.
32. MACKAY RJ, DAVIS SW, DUBEY JP. Equine protozoal myeloencephalitis. *Comp Cont Educ Pract Vet.* 1992; 14: 1359-1367.
33. MARSH AE, BARR BC, MADIGAN J, LAKRITZ J, NORDHAUSEN R, CONRAD PA. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J Am Vet Med Assoc.* 1996; 209: 1907-1913.
34. MARSH AE, BARR BC, MADIGAN J, LAKRITZ J, CONRAD PA. Sequence analysis and polymerase chain reaction amplification of small subunit ribosomal DNA from *Sarcocystis neurona*. *Am J Vet Res.* 1996; 57: 975-981.
35. MARSH AE, HYUN C, BARR BC, TINDALL R, LAKRITZ J. Characterization of monoclonal antibodies developed against *Sarcocystis neurona*. *Parasitol Res.* 2002; 88: 501-506.
36. MAYHEW IG, DE LAHUNTA A, WHITLOCK RH, POLLOCK RVH. Equine protozoal myeloencephalitis. In: *Proceedings of the 22 nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.* Dallas, TX, Nov-Dec 1976, 107-114.
37. McCLURE SR, PALMA KG. Treatment of equine protozoal myeloencephalitis with nitazoxanide. *J. Equine Vet. Sci.* 1999; 19: 639-641
38. MILLER MM, SWEENEY CR, RUSSELL GE, SHEETZ RM, MORROW JK. Effects of blood contamination of cerebrospinal fluid on western blot analysis for detection of antibodies against *Sarcocystis neurona* and on albumin quotient and immunoglobulin G index in horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1999; 215: 67-71.

39. PITEL PH, LINDSAY DS, CAURE S, ROMAND S, PRONOST S, GARGALA G, MITCHELL SM, HARY C, THULLIEZ P, FORTIER G, BALLETT JJ. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. *Vet Parasitol.* 2003; 111: 1-7.
40. RONEN N. Putative equine protozoal myeloencephalitis in an imported Arabian filly. *J S Afr Vet Assoc.* 1992; 63: 78-79.
41. ROSSANO MG, KANEENE JB, SCHOTT HC 2ND, SHELINE KD, MANSFIELD LS. Assessing the agreement of Western blot test results for paired serum and cerebrospinal fluid samples from horses tested for antibodies to *Sarcocystis neurona*. *Vet Parasitol.* 2003; 115: 233-238.
42. SAVILLE WJ, MORLEY PS, REED SM, GRANSTROM DE, KOHN CW, HINCHCLIFF KW, WITTUM TE. Evaluation of risk factors associated with clinical improvement and survival of horses with equine protozoal myeloencephalitis. *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 217: 1181-1185.
43. SAVILLE WJ, REED SM, MORLEY PS, GRANSTROM DE, KOHN CW, HINCHCLIFF KW, WITTUM TE. Analysis of risk factors for the development of equine protozoal myeloencephalitis in horses. *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 217: 1174-1180.
44. SIMPSON CF, MAYHEW IG. Evidence for *Sarcocystis* as the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J Protozool.* 1980; 27: 288-292.
45. SOFALY CD, REED SM, GORDON JC, DUBEY JP, OGLEEBEE MJ, NJOKU CJ, GROVER DL, SAVILLE WJ. Experimental induction of equine protozoan myeloencephalitis (EPM) in the horse: effect of *Sarcocystis neurona* sporocyst inoculation dose on the development of clinical neurologic disease. *J Parasitol.* 2002; 88: 1164-1170.
46. STANEK JF, DUBEY JP, OGLESBEE MJ, REED SM, LINDSAY DS, CAPITINI LA, NJOKU CJ, VITTITOW KL, SAVILLE WJ. Life cycle of *Sarcocystis neurona* in its natural intermediate host, the raccoon, *Procyon lotor*. *J Parasitol.* 2002; 88: 1151-1158.
47. TILLOTSON K, MCCUE PM, GRANSTROM DE, DARGATZ DA, SMITH MO, TRAUB-DARGATZ JL. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in northern Colorado. *J Equine Vet Sci.* 1999; 19: 122-126.
48. TURAY HO, BARR BC, CALDWELL A, BRANSON KR, COCKRELL MK, MARSH AE. *Sarcocystis neurona* reacting antibodies in Missouri feral domestic cats (*Felis domesticus*) and their role as an intermediate host. *Parasitol Res.* 2002; 88: 38-43.
49. WEIGAND K, GRABNER A. Equine protozoal Myeloencephalitis bei einem importierten Paint-Horse. *Pferdeheilkunde* 1997; 13: 231-235.
50. WITONSKY SG, GOGAL RM JR, DUNCAN RB, LINDSAY DS. Protective immune response to experimental infection with *Sarcocystis neurona* in 57BL/6 mice. *J Parasitol.* 2003; 89: 924-931.