

(DOKTORA TEZİ)

**TRAKYA’DA SIĞIRLARDAN BULUNAN THEILERIA VE
BABESIA TÜRLERİNİN VE BUNLARIN SIĞIRLARDAN
YAYGINLIĞININ REVERSE LINE BLOTTING (RLB)
TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

ZAHİDE BİLGİN

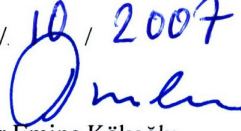
**DANIŞMAN
PROF. DR. ERKUT TÜZER**

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

16 / 10 / 2007


Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : PARAZİTOLOJİ
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : PARAZİTOLOJİ (Veteriner Fakültesi)
Tez Sahibi : ZAHİDE BİLGİN
Tez Başlığı : TRAKYA'DA SIĞIRLARDA BULUNAN THEILERIA VE BABESIA TURLERİNİN VE BUNLARIN SIĞIRLARDA YAYGINLIĞININ REVERSE LINE BLOTTING (RLB) TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI
Sınav Yeri : İSTANBUL ÜNİV. VETERİNER FAKÜLTESİ
Sınav Tarihi : 10 / 10 / 2007

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof.Dr.Erkut TÜZER (Danışman), İstanbul Ü. Veteriner F., Parazitoloji AD



2.Prof.Dr.Abdullah İNCİ, Erciyes Ü., Veteriner F., Parazitoloji AD, Kayseri



3.Doç.Dr.Nuri TURAN, İstanbul Ü. Veteriner F., Mikrobiyoloji AD



4.Doç.Dr.Aynur GÜLANBER, İstanbul Ü. Veteriner F., Parazitoloji AD



5.Doç.Dr.Serdar ARUN, İstanbul Ü. Veteriner F., Patoloji AD



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Zahide BİLGİN (İmza)



İTHAF

DünyaMı Bilenlere...

TEŞEKKÜR

Karşılaştığım tüm zorluklara ve engellemelere rağmen desteği sayesinde bugünlere gelebildiğim Danışman Hocam Prof.Dr. Erkut TÜZER'e..

Laboratuvar çalışmalarımın bir bölümünü tamamlamamda yardımlarını gördüğüm Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD'nın bütün öğretim üye ve yardımcılara; bilhassa Yrd. Doç.Dr. Anıl İÇA'ya.. özellikle de dostluk ve misafirperverlikleri için..

Prof.Dr. Abdullah İnci'ye.. tüm iyi niyetliliği ve cömertliğiyle, "Hocam"olduğu için.. tezim, sayesinde tamamlanabildiği için..

Prof.Dr. Hüseyin YILMAZ ve Doç.Dr. Nuri TURAN'a.. her zaman yanımda oldukları, tüm öğrettikleri ve sabırları için..

İkinci Danışman hocam Doç.Dr. Zati VATANSEVER'e.. paylaşımcılığı, yardımları ve desteği için..

Saha çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm veteriner hekim meslektaşlarıma..

Dostlarıma, arkadaşlarıma.. yanımda olduğunuz ve sevginiz için..

Aileme.. bugünümü borçlu olduğum özgüveni verdikleri, yanısıra insan olma onurundan bir pay.. ve sevgi, ve emekleri için..

Kalpten teşekkür ediyorum..

Binlerce kez,, bütün sevgimle...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-478/25062004

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tarihçe	2
2.1.1. Babesiosis'in Tarihçesi	2
2.1.2. Theileriosis'in Tarihçesi.....	3
2.2. Babesia ve Theileria'nın Sınıflandırmadaki Yerleri.....	4
2.3. Babesiosis.....	6
2.3.1. Etiyoloji.....	6
2.3.2. Vektörleri ve Dünyada Dağılımı.....	9
2.3.3. Yaşam Çemberi.....	10
2.3.3.1. Omurgalı konakta gelişim.....	10
2.3.3.2. Vektör kenede gelişme	11
2.3.4. Patogenez.....	14
2.3.5. Klinik ve Patolojik Bulgular.....	16
2.3.5.1. Nekropsi Bulguları	17
2.3.6. Bağışıklık.....	17
2.3.6.1. Doğal Bağışıklık.....	17
2.3.6.2. Kazanılmış Bağışıklık	19
2.3.6.3. Stres	19
2.3.6.4. Çapraz bağışıklık.....	19

2.3.6.5. Antikorların önemi	20
2.3.6.6. Irk direnci.....	20
2.3.7. Tedavi Korunma ve Kontrol.....	20
2.3.7.1. Etiyolojik Tedavi.....	20
2.3.7.2. Korunma ve Kontrol.....	21
2.3.8. İnsanlarda Babesiosis	22
2.4. Theileriosis	22
2.4.1. Etiyoloji	22
2.4.2. Vektörleri ve Dünya’da dağılımı	24
2.4.3. Yaşam Çemberi.....	28
2.4.3.1. Omurgalı Konakta Gelişim.....	28
2.4.3.2. Vektörde Gelişme.....	29
2.4.4. Patogenez.....	31
2.4.5. Patolojik ve Klinik Bulgular.....	33
2.4.5.1. Nekropsi Bulguları	34
2.4.6. Bağışıklık.....	34
2.4.7. Tedavi Kontrol ve Korunma.....	35
2.4.7.1. Tedavi	35
2.4.7.2. Kontrol ve korunma.....	36
2.5. Babesiosis ve Theileriosis’in Tanısı	37
2.6. Türkiye’de Babesiosis ve Theileriosis	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Kan Örneklerinin Toplanması	49
3.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	49
3.2.1. Kan örneklerinden DNA izolasyonu.....	49
3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Optimizasyon.....	51
3.2.2.1. Primerlerin Seçimi.....	51
3.2.2.2. Pozitif ve negatif kontrol	52
3.2.2.3. PCR Karışımı ve Amplifikasyon Koşulları	52
3.2.3. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile İncelenmesi.....	53
3.2.4. Reverse Line Blotting (RLB)	53
3.3. İstatistik.....	60
3.4. Gereç ve Yöntem Bölümünde Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	60

3.4.1. Cihazlar	60
3.4.2. Solüsyonların hazırlanması	61
4. BULGULAR.....	66
4.1. PCR ve RLB sonuçları.....	66
4.2. <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının yerleşim yerlerinde rastlanma sıklığı.....	66
4.3. <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının sığırlarda yaygınlığı.....	66
4.4. <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının yaş gruplarında görülme oranları	67
4.5. <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> İnfeksiyonlarının Dişi ve Erkek Sığırlarda görülme oranları	67
4.6. Klinik Bulgular.....	67
5. TARTIŞMA	82
KAYNAKLAR	89
ETİK KURUL KARARI.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	107

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Sığırlarda görülen <i>Babesia</i> türleri, vektörleri ve coğrafik dağılımı (Bock ve ark. 2004, Kuttler 1988 ve Vogl 2004'den adapte edilmiştir)	9
Tablo 2.2: Sığırlarda görülen <i>Theileria</i> türleri, vektörleri ve coğrafik dağılımı (Bishop ve ark. 2004)	25
Tablo 2.3: <i>Theileria</i> türlerinin konaktaki uzun dönemli formları (Maritim ve ark. 1998)	35
Tablo 3.1: Çalışmada örnek alınan il, ilçe, yerleşim yerleri	63
Tablo 3.2: Örnek alınan sığır sayısı ve illerdeki sığır mevcutları	64
Tablo 3.3: Örnek alınan sığırların cinsiyetlerine ve yaşlarına göre sayıları	65
Tablo 4.1: Örnek alınan 77 yerleşim yerinde <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının görüldüğü yerler	72
Tablo 4.2: Trakya'da sığırlarda <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının illere göre yaygınlığı	73
Tablo 4.3: Edirne ilinde sığırlarda <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının yaygınlığı ..	74
Tablo 4.4: İstanbul ili Trakya kısmında sığırlarda <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının yaygınlığı	75
Tablo 4.5: Kırklareli ilinde sığırlarda <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının yaygınlığı	76
Tablo 4.6: Tekirdağ ilinde sığırlarda <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyonlarının yaygınlığı	77
Tablo 4.7: <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> ile infekte bulunan sığırların yaşları	78
Tablo 4.8: Sığırlarda yaş gruplarında <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> infeksiyon oranları	79
Tablo 4.9: <i>Babesia bovis</i> , <i>Theileria annulata</i> ve <i>T. buffeli/orientalis</i> infeksiyonlarının yaşla ilişkisinin istatistiksel değerlendirilmesi	80
Tablo 4.10: Karşılaştırılabilir yaş gruplarındaki dişi ve erkek sığırlarda infeksiyon oranları	81

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Babesia spp. ve Theileria spp. için “neighbour-joining” algoritım kullanılarak 18S rDNA analizine dayanan filogeni şeması (Kjemtrup ve ark. 2000).....	5
Şekil 2.2: Babesia bigemina (Kessler ve ark. 2002)	7
Şekil 2.3: Babesia bovis (Kessler ve ark. 2002)	7
Şekil 2.4: Babesia divergens (Camacho ve ark. 2007).....	8
Şekil 2.5: Babesia bigemina’nın yaşam çemberi (Bockve ark. 2004)	13
Şekil 2.6: Babesia bovis’le infekte eritrositlerin beyin kapillerlerinde kümelenmesi (Kessler ve ark. 2002).....	14
Şekil 2.7: Theileria annulata (Mahin 2007).....	24
Şekil 2.8: Theileria parva (Theilériose 2007)	24
Şekil 2.9: Theileria parva şizontlarının neden olduğu lenfosit proliferasyonu (Theilériose 2007).....	25
Şekil 2.10: Theileria annulata’nın yaşam çemberi (Mehlhorn 2004).....	32
Şekil 3.1: Miniblotter (Immunetics Inc.).....	55
Şekil 3.2: Şematik olarak hibridizasyonun prensibi (Biotech 2004).....	56
Şekil 3.3: Şematik olarak RLB membranında prob ve ampikon dizilimleri ve pozitif sinyaller (Biotech 2004)	56
Şekil 4.1: PCR Ürünlerinin Elektroforezi sonucunda gözlenen bantlar.....	69
Şekil 4.2: RLB sonuçları	70
Şekil 4.3: Trakya’da RLB ile Sığırlarda Babesia ve Theileria enfeksiyonu görülen ilçeler	71

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- 16S ssu rRNA : 16S small subunit ribosomal RNA
- 18S ssu rRNA: 18S small subunit ribosomal RNA
- C3, C3b : Komplement unsurları
- CFT : Komplement fiksasyon testi
- ECL : Electro-Chemi-Luminescence
- EDAC : (1-etil-3 dimetilaminopropil karbodimin, demineralize suda)
- EDTA : (di-sodium ethylenediaminetetra-acetate)
- EDTA : Ethylenediamine tetra-acetate
- ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay
- G6PD : Glucose-6-phosphate dehydrogenase
- GSHPx : Glutathione peroxidase
- IFAT : İndirekt floresan antikor testi
- IFN γ : İnterferon gamma
- IgG : İmmunglobulin G
- MPSP : Major piroplasm surface protein
- MSS : Merkezi sinir sistemi
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
- RLB : Reverse Line Blotting
- SDS : Sodium dodecyl sulphate
- SPAG-1 : Theileria sporozoit yüzey antijenlerinden birisi
- SSPE : (Sodium-chlorure mono-SodiumPhosphate EDTA)
- ssurRNA: Small subunit ribosomal DNA
- TAE buffer : (Tris-acetate-EDTA) tamponu
- Tams1 : Theileria annulata merozoit yüzey antijenlerinden birisi (major antijen)
- Th1 : T-Helper 1
- TNF α : Tümör nekroz edici faktör alfa

ÖZET

Bilgin, Z. (2007). Trakya’da sığırlarda bulunan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin ve bunların sığırlarda yaygınlığının Reverse Line Blotting (RLB) tekniği ile araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Trakya’da sığır *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonları üzerindeki mevcut literatürler mikroskopik ve serolojik bulgulara dayanmakta ve bu bulgular çelişkili sonuçlar göstermektedir. Bu durum moleküler bir araştırma yapılmasını gerekli kıldı. 2004-2006 yaz aylarında Trakya’yı temsilen 20 ilçede bulunan 77 yerleşim yerinden tesadüfi seçilen meraya çıkmış 230 sığırdan kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden DNA izolasyonunu takiben 18S rDNA’da yer alan *Babesia* ve *Theileria* cinslerince ortaklanılan bir gen bölgesinin amplifikasyonu amacıyla PCR (Polymerase Chain Reaction) işlemi yapıldı. PCR ürünlerinin türlere özgü oligonükleotidlerin kovalent olarak bağlandığı bir membranla hibridizasyonu sağlanarak RLB (Reverse Line Blotting) işlemi gerçekleştirildi. Gidilen 77 yerleşim yerinden 3’ünde (%3,9) *Babesia bovis*, 3’ünde (%3,9) *Theileria annulata* ve 22’sinde (%28,57) *T.buffeli/orientalis* infeksiyonu bulundu. 230 sığırdan 3’ünde (%1,3) *B.bovis*’e, 6’sında (%2,61) *T.annulata*’ya, 42’sinde (%18,26) *T.buffeli/orientalis*’e rastlandı. Birden fazla türle oluşan karışık (miks) infeksiyon görülmedi. İnfekte 51 sığır arasında *B.bovis* infeksiyonunun yaygınlığının %5,88, *T.annulata* infeksiyonunun yaygınlığının %11,76 ve *T.buffeli/orientalis* infeksiyonunun yaygınlığının %82,35 olduğu bulundu. *Theileria annulata* saptanan iki hayvanda şiddetli klinik belirti gözlemlendi. Trakya bölgesinde *T.buffeli/orientalis*’in varlığı ilk defa gösterildi. Bu çalışmada saptanan *T.buffeli/orientalis* prevalansı özellikle Türkiye’nin diğer bölgelerinde yapılan çalışmalardan elde edilen bulgularla kıyaslandığında oldukça yüksek bulundu. Trakya’da *T.buffeli/orientalis*’in vektör potansiyeli tartışmalı bir durum arz etmektedir ve bu çalışma bölgedeki vektör keneler üzerinde daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiğini gösterdi. PCR ve RLB’nin güvenilir ve ekonomik olduğu ve epidemiyolojik araştırmalarda olduğu kadar rutin uygulamalarda da kullanımının uygun olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler : Sığır, *Babesia*, *Theileria*, PCR, RLB

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-478/25062004

ABSTRACT

Bilgin, Z. (2007). Detection and Distribution of Babesia and Theileria Species Infecting Cattle In Thrace (Turkey) by Reverse Line Blotting (RLB). Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Parasitology. PhD Thesis. İstanbul.

Existing literature on bovine Babesia and Theileria infections in Thrace region (Turkey) is based on microscopical and serological findings with some controversial results, thus making a molecular investigation necessary. The blood samples were collected from 230 cattle exposed to field conditions during summer seasons of 2004-2006. Sampling was done randomly, from 77 locations in 20 towns in the region. Following DNA extraction from blood samples, PCR (Polymerase Chain Reaction) assay was performed to amplify a 18S rDNA region conserved to Babesia and Theileria species. RLB (Reverse Line Blotting) assay relied on hybridisation of PCR products to a membrane with covalently linked species specific oligonucleotides. Out of 77 locations visited; Babesia bovis and Theileria annulata was found in 3 (3,9%) locations and T.buffeli/orientalis was found in 22 (28,57%) locations. Of the 230 cattle; 3 (1,3%) were positive for B.bovis, 6 (2,61%) for T.annulata and 42 (18,26%) for T.buffeli/orientalis and none with mixed infections. Among 51 cattle infected; infection rates for B.bovis, T.annulata and T.buffeli/orientalis were %5,88, %11,76 and %82,35, respectively. Two animals infected with T.annulata showed severe clinical signs. Theileria buffeli/orientalis is shown to exist in Thrace for the first time. This study bears a remarkably high prevalence of T.buffeli/orientalis infection in Thrace especially with respect to results obtained from other regions of Turkey. The vector potential of T.buffeli/orientalis in Thrace poses a questionable status and this study implies necessity for further studies on tick vectors in the region. PCR and RLB are found to be convenient and economical and can be utilised in epidemiological studies as well as routine practices.

Key Words: Cattle, Babesia, Theileria, PCR, RLB

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-478/25062004

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Babesiosis ve theileriosis sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan infeksiyonlardır. Ayrıca *Babesia* etkenlerinden *Babesia divergens* zoonoz özellikte olup dalağı çıkarılan veya immun sistemi baskılanan kişilerde malaria ile karıştırılan ölümcül infeksiyonlara neden olmaktadır (Urquhart ve ark. 1987, pp. 234, 239).

Trakya yöresinde sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin dağılımı üzerine yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Tüzer 1980, Alp 1993, 1995, Alp ve Güvenen 2001). İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda mikroskopik bakıya dayalı olarak *T. mutans* sanılan parazitin görüldüğü bildirilmiş (Tüzer 1980) ancak daha sonra bu parazitin *T. mutans* olamayacağının anlaşılmasından sonra *T. buffeli/orientalis* yönünden bir araştırma yapılmamıştır. Yine aynı çalışmada tarama yapılan sığırlarda *T. annulata*, *Babesia bigemina* ve *B. bovis* tespit edilmiştir. İstanbul'da ELISA ile *B. bovis*'e (Alp 1993), IFAT ile *T. annulata*'ya (Alp 1995) ve Tekirdağ ilinde IFAT ile *T. annulata*'ya ve *B. bovis*'e (Alp ve Güvenen 2001) karşı antikorlar saptanmıştır. Tüm bu çalışmalarda kullanılan yöntemlerin, var olan türleri kesin olarak ortaya koymada ve sığırlarda taşıyıcılık durumunu doğru olarak belirlemede yetersiz olduğu bulunmuştur. Mikroskopik ve serolojik bakıların yeterince duyarlı olmaması, serolojide kros reaksiyonların olabilmesi ve serolojinin paraziti değil antikorları ortaya koyması; güvenilir bulgular ortaya çıkmasını engellemektedir. Ayrıca bu çalışmalar tüm Trakya'yı kapsamadığı gibi son yapılan çalışmanın üzerinden oldukça uzun bir süre geçmiştir. *T. buffeli/orientalis*, *B. divergens* ve *B. major*'un bölgede var olup olmadığını belirleyecek moleküler tekniklerin kullanıldığı bir çalışma ise bulunmamaktadır. Bu etkenlerden *B. divergens*'in aynı zamanda zoonoz olması nedeniyle varlığının ve varsa yaygınlık durumunun belirlenmesi özellikle önemlidir. Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı mevcut bir bilimsel açığı kapatmak amacıyla bu çalışmanın yapılmasına gerek duyulmuştur.

Bu çalışmayla Trakya yöresindeki sığırlarda *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. major*, *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis*'in varlığı ve yaygınlığı ilk defa moleküler düzeyde Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Reverse Line Blotting (RLB) teknikleri ile araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

2.1.1. Babesiosis'in Tarihçesi

Romanya Hükümeti sığırlarda görülen endemik bir hastalığın nedenini araştırmak ve çözüm yolu bulmak için 1887 yılında Dr. Victor Babes Başkanlığı'nda bir komisyon kurmuştur. Dr. Babes araştırmaları sonucunda “enzootik hemoglobinüri” ismini verdiği infeksiyonun etkeninin intraeritrositik bir organizma olduğuna karar vermiş ve 1888 yılında bu organizmaya *Haematococcus bovis* ismini vermiştir. Babes'in araştırma ekibinde bulunan Starcovici ise 1893 yılında etkeni *Babesia bovis* olarak yeniden adlandırmıştır. Diğer taraftan Amerika'da 1889 yılında, Smith Texas ateşi hastalığının etiyolojik ajanını gözlemlediğini bildirmiş ancak bu etkeni kendisinden yirmi yıl önce ilk görenin Stiles olduğunu belirterek isim vermemiştir. 1893 yılında Smith ve Kilborne Texas ateşi etkenine *Pyrosoma bigeminum* ismini önermiş; daha önemlisi, patojen bir protozoonun artropod bir ara konak (*Boophilus annulatus*) tarafından bulaştırılabileceğini ilk defa belirtmişlerdir (Kuttler 1988). Arjantin'de ise Liegnieres 1903'te biri büyük diğeri ondan küçük iki paraziti *Piroplasma bigemina*'nın iki farklı suşu zannetmiş daha sonra 1910'da küçük olanını *Piroplasma argentinum* olarak adlandırmıştır. İngiltere'de 1911'de M'Fadyean ve Stockman *Piroplasma divergens* adını verdikleri yeni bir paraziti tanımlamışlardır ve İngiltere'de *B. major*'u görmüşler fakat *Piroplasma bigemina* olduğunu zannetmişlerdir. Sergeant ve ark. 1924'te Cezayir'de *Babesia berbera* adlı bir başka paraziti, yine Sergeant ve ark. Fransa'dan Cezayir'e gelen sığırlarda *B. major* adlı paraziti tanımlamışlardır. Hoyte 1976'da *Piroplasma argentinum*, *Babesia berbera* ve Rusya'da tanımlanan *Françaiella colchicha*'nın *Babesia bovis*'in sinonimleri olduğunu açıklamıştır (Tüzer 1980, pp. 1, 12)

Starcovici, Smith ve Kilborne, üzerinde çalıştıkları etkenlerin yakın ilişkili ancak birbirinden farklı iki tür olduğu konusunda hemfikir olmakla beraber, bu türler sinonim olarak kabul görmüştür (Kuttler 1988). Daha sonraları başka isimler de önerilmiş olup bu isimlerden en bilineni *piroplasma*'dır. *Piroplasma* ismi günümüzde de geçerliliğini sürdürmekte; babesiosis ve theileriosis için genel olarak piroplasmosis tabiri sıklıkla kullanılmaktadır (Uilenberg 2006).

Sığırlarda görülen *Babesia* türlerini isimlendirenler aşağıdaki gibidir (Mimioğlu ve ark. 1969 p.921-927, Kuttler 1988):

Babesia bigemina (Smith ve Kilborne, 1893) Wenyon, 1926

Babesia bovis (Babes, 1888) Starcovici, 1893

Babesia divergens (M'Fadyean ve Stockman, 1911) Rakovee, 1955

Babesia major Sergeant, Donatien, Parrot, Lestoquard ve Plantureux, 1926

Babesia ovata Minami ve Ishihara, 1968

Babesia occultans Gray ve de Vos, 1981

Babesia jakimovi Nikolskii ve ark., 1977

2.1.2. Theileriosis'in Tarihçesi

Koch 1897 yılında Dar-es-salam bölgesinde sığırlarda “Redwater” hastalığını araştırırken hasta sığırların eritrositlerinde *B. bigemina* parazitinin yanı sıra *B. bigemina*’dan daha ufak, çomak, oval ve yuvarlak yapılı organizmalar bulunduğunu görmüş; bunların *B. bigemina*’nın genç formları olduğunu düşünmüştür. Rodezya’nın güneyinde ve Güney Afrika’da o dönemde çıkan Rodezya kene sıtması salgını üzerine Koch, Theiler gibi araştırmacılar bu hastalığın etiyolojisi ve bulaşmasına yönelmişlerdir. Stephens ve Christophers 1903’te hastalık etkenine *Piroplasma kochi* ismini önermiş; bundan bir yıl sonra ise Koch, uzun yıllar Koch cisimcikleri olarak tanınacak olan plazma cisimciklerini tanımlamıştır. Theiler, 1904 yılında etkene *Theileria parva* ismini vermiştir. Bu cisimciklerin esasen *T. parva*’nın şizogoni dönemini gösterdiği ise 1910, 1911 yıllarında Gonder tarafından bildirilmiştir. Dschunkowsky ve Luhs 1904 yılında Kafkasya’da sığırlarda “tropikal piroplasmosis” ismini verdikleri hastalık etkenini *Piroplasma annulatum* olarak adlandırmış; 1907 yılında Bettencourt, Franca ve Borges *Theileria* cins adını önererek etkenin ismini *Theileria annulata* olarak değiştirmişlerdir (Neitz 1957, p.276-278).

Sığırlarda görülen *Theileria* türlerini isimlendirenler aşağıdaki gibidir (Soulsby 1982, p.729; Sparagano 1999):

Theileria parva (Theiler, 1904) Bettencourt, Franca ve Borges, 1907

Theileria lawrenci Neitz, 1955

Theileria annulata (Dschunkowsky ve Luhs, 1904) Bettencourt, França ve Borges, 1907

Theileria mutans (Theiler, 1906) Franca, 1909

Theileria buffeli (Neveu-Lemaire, 1912)

Theileria orientalis Yakimov ve Sudachenkov, 1931.

Theileria sergenti Yakimov ve Dekhterev, 1930.

2.2. Babesia ve Theileria'nın Sınıflandırmadaki Yerleri

Babesia ve *Theileria* cinslerinin klasik kitaplarda (Soulsby 1982, pp. 509-513; Kreier ve Baker 1987, pp. 2-5) verilen, klasifikasyondaki yerleri aşağıdaki gibidir.

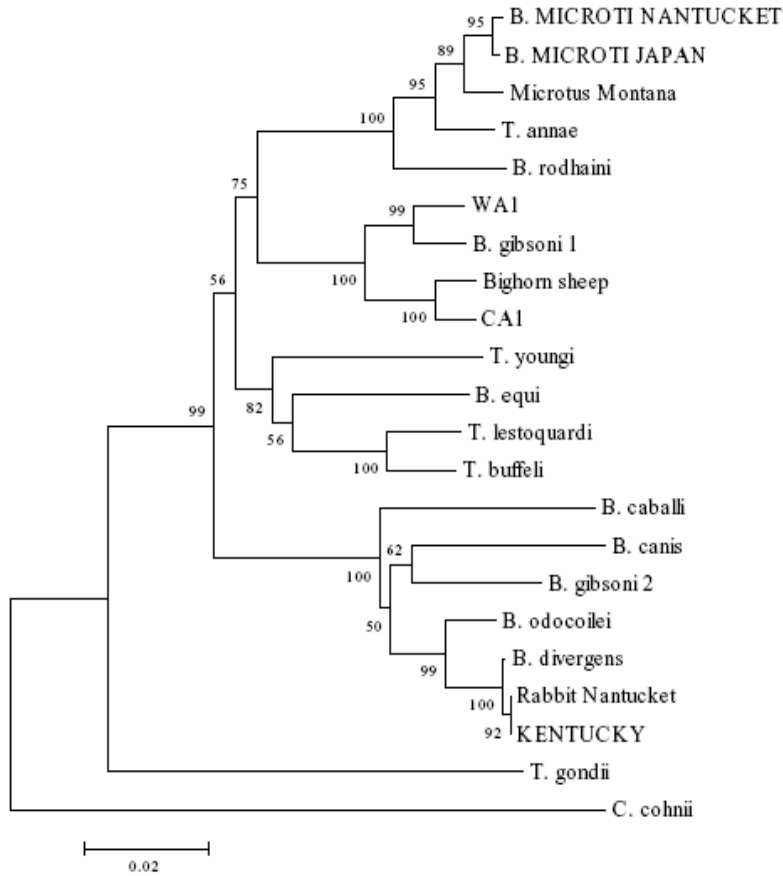
	Canlılar
Alem	: Protista Haeckel, 1866
Altalem	: Protozoa (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858
şube	: Apicomplexa Levine, 1970
Sınıf	: Sporozoea Leuckart, 1879
Altsınıf	: Piroplasmia Levine, 1961
Takım	: Piroplasmida Wenyon, 1926
Aile	: Babesiidae Poche, 1913
Cins	: <i>Babesia</i> Starcovici, 1893
Aile	: Theileriidae du Toit, 1918
Cins	: <i>Theileria</i> Bettencourt, França <i>et</i> Borges, 1907

Babesia ve *Theileria*'nın Systema Natura 2000'da verilen yeni klasifikasyondaki yerleri ise aşağıdaki gibidir (Brands 1989-2005).

	Biota (Canlılar)
Domain	: Eukaryota Chatton, 1925
Alem	: Protozoa (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858
Altalem	: Biciliata
Aşağıalem (Infrakingdom)	: Alveolata Cavalier-Smith, 1991
şube	: Myzozoa Cavalier-Smith & Chao, 2004
Altşube	: Apicomplexa Levine, 1970

Sınıf	: Aconoidasida Mehlhorn, Peters & Haberkorn, 1980
Takım	: Piroplasmorida Wenyon, 1926
Aile	: Babesiidae Poche, 1913
Cins	: <i>Babesia</i> Starcovici, 1893
Aile	: Theileriidae du Toit, 1918
Cins	: <i>Theileria</i> Bettencourt, França <i>et</i> Borges, 1907

Yeni taksonomi çalışmaları filogenetik (cladistic) yaklaşımı içermekte ve 18S rRNA, MPSP gibi spesifik DNA bölgesi dizilimleri baz alınarak parazit cinslerinin ve türlerinin birbirleriyle genetik benzerlik ve yakınlıklarının analizine dayanmaktadır (Kjemtrup ve ark. 2000) (Şek 2.1).



Şekil 2.1: Babesia spp. ve Theileria spp. için “neighbour-joining” algoritmi kullanılarak 18S rDNA analizine dayanan filogeni şeması (Kjemtrup ve ark. 2000).

2.3. Babesiosis

2.3.1. Etiyoloji

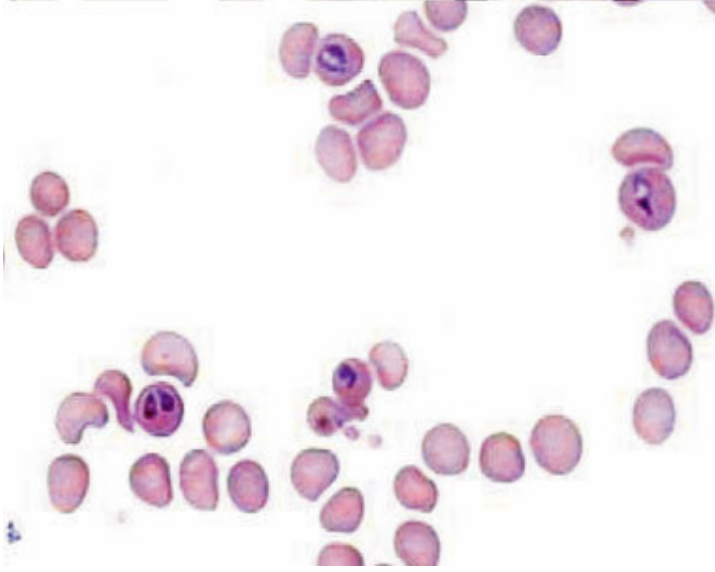
Babesia merozoitleri 1-5 µm boyutlarında küçük yapılardır. Merozoit tek bir plazma membranı ve bu membranın altında kesik kesik yapıda çift kat başka membranlarla çevrelenmiştir. Merozoitin ön kısmında polar halka, micronem ve rhostiri isimli organeller bulunmaktadır. Bu organellerin tümüne birden apical complex ismi verilmektedir. Polar halka, merozoitin ön kısmında, plazma membranın altında yer alan çift kat membran tarafından oluşturulmuştur. Rhostiriler hücrenin ön kısmında yer alan göz yaşı benzeri şekilli electron-dense yapılardır. Micronemler ise rhostirilerin etrafında yerleşmiş küçük ozmofilik yapılardır. Rhostirilerin ve micronemlerin fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte bu organellerin merozoitin eritrosite girişinde rol oynayan proteolitik enzimler içerdiği düşünülmektedir. *Babesia bovis* merozoitlerinde çekirdeğin hemen önünde elektron-dense küre biçimli iki adet yapıya sıklıkla rastlanmakta ancak bu yapıların da işlevi bilinmemektedir. Merozoit stoplazmasında bunlara ilave olarak serbest halde ribozomlar, endoplazmik reticulum ve mitokondri benzeri organeller de bulunmaktadır. Hücre çekirdeği genellikle merozoitin orta noktasında yerleşmiş durumdadır. İki adet membranla çevrelenmiş olan çekirdeğin içeriği homojen ve düşük densiteli bir yapıdadır. Serbest haldeki ekstrasellüler merozoit, plazma membrana fibrillerle bağlanmış bir yüzey örtüsüne sahiptir. Bu yüzey örtüsü merozoit eritrosite girdiği zaman kaybolmaktadır. *Babesia bovis* merozoitleri immün serumla inkübe edildiğinde yüzey örtüsü kalınlaşmakta ve merozoitlerin agregasyonuna neden olmaktadır (Igarashi ve ark. 1988).

Babesia türleri, armut biçimli formlarına göre genel olarak küçük ve büyük *Babesia*'lar olarak ikiye ayrılmaktadır. Ancak küçüklük ve büyüklük sınırları yazarlara göre değişmektedir. Brown ve ark. (1990, p. 161)'ına göre bu sınır <3 µm veya >3 µm olarak, Urquart ve ark. (1987, p.235)'ye göre 1-2,5 µm veya 2,5-5 µm olarak ve Kreier ve Baker (1987, p. 190)'ye göre ise 1-2 µm veya 2-5 µm olarak ayrılmaktadır.

Sığırlarda görülen *Babesia* türlerinin eritrositik formlarının morfolojileri aşağıdaki gibidir (Levine 1985, Friedhoff 1988 ve Soulsby 1982'den adapte edilmiştir):

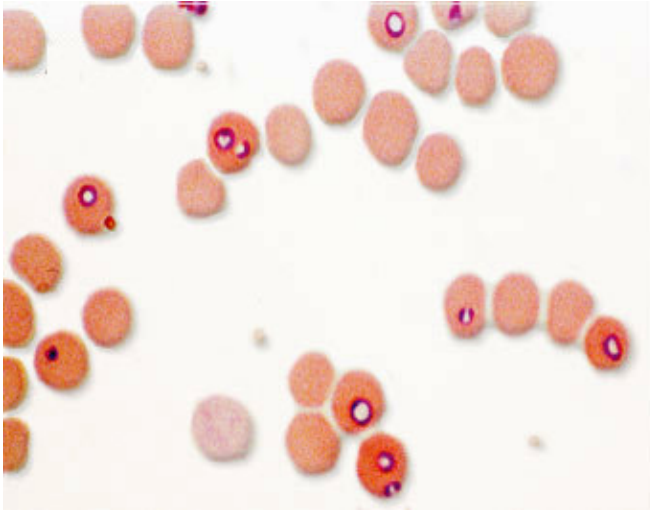
Babesia bigemina: Konakta eritrosit içindeki parazitler armut, yuvarlak, oval, veya düzensiz biçimlerde. Armut formları tipik olarak ikili formlar halinde bulunur.

Bu ikili yapı arasında dar bir aç ı bulunur. İkili armut formları yaygındır. Yuvarlak formları 2-3 µm çapında, uzun formları 4-5 X 2 µm boyutlarındadır (Şekil 2.2).



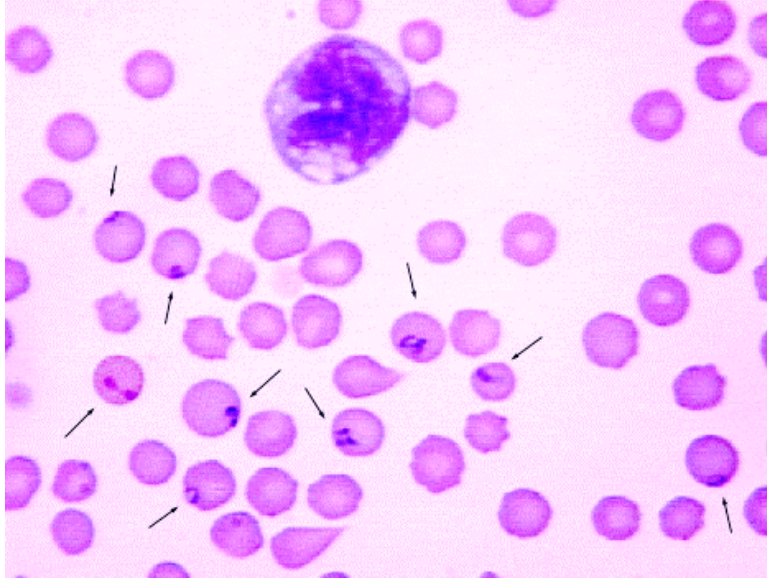
Şekil 2.2: *Babesia bigemina* (Kessler ve ark. 2002)

Babesia bovis: Konakta eritrosit içindeki parazitlerin, ortasında büyük bir vakuol ve kenarında çekirdek olan şövalye yüzüğü benzeri yuvarlak formları yaygındır. Ayrıca ikili armut ve gözlük benzeri formlarda bulunur. Bu parazit eritrositin kenarına yakın olarak yerleşmez. Armut formu 2-2,4 X 1.5 µm boyutundadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: *Babesia bovis* (Kessler ve ark. 2002)

Babesia divergens: Narin yapılı parazitlerdir. Konakta eritrosit içindeki parazitlerin birbirinden ayrık (neredeyse düz açı oluşturan) golf sopası benzeri ikili formları yaygındır. Ayrıca armut biçimli ve çok az sayıda da yuvarlak formları bulunur. Birbirinden ayrık formlarından bazıları eritrosit kenarına içerden teğet olarak durur. Bu formlarından herbiri 1.5-2 X 0.4 μm boyutlarındadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Babesia divergens (Camacho ve ark. 2007)

Babesia major: Bu parazit *B. bigemina*'ya benzer fakat biraz daha küçüktür. Eritrositin ortasında yerleşir. İkili armut formları arasındaki açı dardır. Armut formunun büyüklüğü 2.6-3.7 X 1.5 μm 'dir.

Babesia jakimovi: 4.5X 2 μm boyutlarında büyük *Babesia*'lardandır. Patojenitesi oldukça yüksek olup Doğu Avrupa'da tehdit oluşturmaktadır.

Babesia ovata: *B. bigemina* ve *B. major*'ı andıran 3.2 X 1.7 μm boyutlarında büyük *Babesia*'lardandır. Patojenitesi yüksek değildir.

Babesia occultans: *B. bigemina*'dan biraz daha küçüktür. 2.9 X 1.2 μm boyutlarında olan parazit fazla patojen değildir.

2.3.2. Vektörleri ve Dünyada Dağılımı

Babesia'lar yalnızca keneler tarafından bulaştırılmakta olup, kene dışında başka bir vektör kesinlik kazanmamıştır. Ne keneler ne de haematophagous başka bir artropod için mekanik bulaştırmadan da söz edilemez. Prenatal veya iatrojenik infeksiyonlar ise epidemiyolojik açıdan kayda değer bulaşmalar değildir. Keneler gerçek vektör olup *Babesia*'nın yaşam çemberinin büyük bölümü kenede geçmekte ve keneler infeste ettikleri hayvanlara *Babesia*'ların infektif dönemi olan sporozoitleri nakletmektedirler. Keneler infeksiyonu transstadial ve/veya transovarial olarak bulaştırır. Transstadial bulaşma ancak iki veya üç konaklı kenelerde söz konusudur. Diğer taraftan transovarial terimi etimolojik olarak ovaryumlara bulaşmayı anlatır ve ovaryumlara bulaşmanın da mutlak surette yumurtaya bulaşmayı karşılamadığı düşünülürse transoval (yumurtaya bulaşma) bulaşma daha uygun olmakla beraber fazla kabul görmemiştir (Friedhoff 1988).

Sığırlarda görülen *Babesia* türleri ve vektörlüklerini yapan ixodid kene türleri Tablo 2.1'deki gibidir:

Tablo 2.1: Sığırlarda görülen *Babesia* türleri, vektörleri ve coğrafik dağılımı (Bock ve ark. 2004, Kuttler 1988 ve Vogl 2004'den adapte edilmiştir)

Türler	Vektörleri	Coğrafi Dağılım
<i>B. bigemina</i>	<i>Boophilus annulatus</i> , <i>B. decoloratus</i> , <i>B. microplus</i> , <i>B. geigyi</i> , <i>Rhipicephalus evertsi</i>	Orta ve Güney Amerika, Avrupa'nın Güneyi, Afrika, Asya, Avustralya
<i>B. bovis</i>	<i>B. annulatus</i> , <i>B. microplus</i> , <i>B. geigyi</i> , <i>Ixodes ricinus</i>	Orta ve Güney Amerika, Avrupa'nın Güneyi, Afrika, Asya, Avustralya
<i>B. divergens</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Avrupa'nın Kuzeyi
<i>B. major</i>	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Avrupa ve Kuzey Afrika
<i>B. jakimovi</i>	<i>I. ricinus</i>	Sibirya, Rusya'nın Kuzeyi
<i>B. ovata</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Japonya
<i>B. occultans</i>	<i>Hyalomma marginatum rufipes</i>	Güney Afrika

2.3.3. Yaşam Çemberi

Babesia parazitleri beslenme, gelişim ve çoğalma için mutlak surette konak hücresine bağımlıdır. Konak hücreyle arasında kompleks ve çok kapsamlı bir ilişki bulunan parazitin bu ilişkisinin tüm bilinmeyenleriyle ve detaylarıyla anlaşılması yeni anti-babesial ilaçların ve aşılarda geliştirilebilmesi için de gereklidir. *Babesia* parazitinin gelişimini omurgalı son konakta ve enfeksiyonun vektörlüğünü yapan kenede incelemek mümkündür.

2.3.3.1. Omurgalı konakta gelişim

Kene kan emerken tükürük sıvısındaki sporozoitleri konağa enjekte eder. Lenfositler veya lenfoblastlar içinde ekstra-eritrositik şizogoni geçiren *Babesia equi*, *B. microti* ve *B. rodhaini* hariç tutulursa *Babesia* sporozoitleri direkt eritrositlerin içine girer.

Eritrositlere Giriş ve Çoğalma

Ekstrasellüler parazitlerin konak hücrelerine girişinde endositoz veya aktif olarak membranı deliş söz konusudur. *Babesia* parazitleri eritrositlere endositozla girmektedir (Igarashi ve ark. 1988). Endositoz üç aşamada incelenebilir.

Eritrosit membranının tanınması ve membrana bağlanma

Merozoit eritrositlere başlangıçta rastgele temas eder ancak daha sonra aktin ve miyozinin rol aldığı bir mekanizmayla apical complex'ın bulunduğu ucunu aktif olarak eritrosit membranına temas edecek şekilde döndürür. Bu spesifik orientasyon, eritrosit membranında invaginasyona neden olur (Pinder ve ark. 1998, Igarashi ve ark. 1988). Başlangıçta merozoitin yüzey örtüsü eritrositle zayıf bir bağlanma gerçekleştirir. Apical complex'ın eritrosite temas edecek pozisyonu almasıyla birlikte penetrasyon başlar (Cooke ve ark. 2005). Merozoitlerin yüzeyinde C3 proteini olduğu ve eritrositlerde bulunan C3 reseptörlerine bağlanmanın penetrasyonda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. C3b reseptörünün *B. bigemina*'nın gelişimi için gerekli; ancak *B. bovis*'in gelişmesinde gerekli olmadığı gösterilmiştir (Soulsby 1982).

Eritrosit membranının merozoitin çevresinde parazitöfor vakuol oluşturmak üzere invaginasyonu

Eritrosit membranına bağlanmanın ardından rhoptrilerin içeriklerinin salgılanmasıyla birlikte eritrosit invagine olmaya ve parazitöfor vakuol oluşmaya başlar.

Merozoitin vakuolün içine giren kısımlarında yüzey örtüsü kaybolurken eritrosit dışında kalan bölümünde yüzey örtüsü hala görülmektedir (Igarashi ve ark. 1988).

Merozoitin girişiyle birlikte eritrosit membranının kapanması

Merozoit tamamen invagine olduktan sonra eritrosit membranının yüzeydeki iki ucu birleşir ve vakuol oluşturulmuş olur. Böylelikle merozoit biri kendisine, diğeri de eritrositten köken alan parazitofor vakuole ait olmak üzere iki adet membranla çevrelenmiş olur. Penetrasyonun çok erken evrelerinde görülebilen bu iki membranın konaktan köken alan dış kısmındakisi hızla parçalanmaya başlar ve merozoit parazitofor vakuol membranı olmaksızın yaşamına devam eder. Bu durum *Babesia* merozoitlerinin gelişmeleri sırasında onlara bir esneklik sağlar ve bu sayede merozoitler birbirinden farklı morfolojik şekillerde olabilmektedir (Soldati 2004, Igarashi ve ark. 1988).

Parazitin gelişmesi ve aseksüel çoğalma

Merozoit, eritrosit içine girdikten sonra trofozoite dönüşür. Trofozoit pinositozla beslenir ve hemoglobini tam olarak sindirir. Sindirimin tam olmasına bağlı olarak; eritrositlerde pigment oluşumu şeklinde gözlenen rezidüel maddeler (hemozoin) *Babesia* cinsinde görülmemektedir (Uilenberg 2006).

Trofozoit tomurcuklanma veya binary fission yoluyla çoğalmaya başlar ve her trofozoitten iki adet kız hücre (merozoit) oluşur (Bock ve ark. 2004). Oluşan bu kız hücrelerin her biri yeni bir eritrositi infekte eder. *Babesia bovis*'in eritrositlerdeki yaşam siklusunun yaklaşık 17 saat olduğu bildirilmiştir (Jackson ve ark. 2001). *Babesia* parazitleri konak savunma sisteminden sürekli yüzey örtüsünü değiştirerek antijenik varyasyonla korunur (Allred ve Al-Khedery 2006). Çoğalma konak ölünceye veya konak bağışıklık sistemi çoğalmayı durduruncaya dek devam eder (Igarashi ve ark. 1988).

Mackenstedt ve ark. (1995) *B. bigemina*'da diğer merozoitlerden farklı olarak diploid sayıda kromozomu bulunan ovoid merozoitler tespit etmiş ve bunlara gamont precursor demişlerdir. Bu merozoitlerin, çoğalmaya devam etmeyip kene tarafından alınmayı bekleyen gametositler olduğu düşünülmektedir.

2.3.3.2. Vektör kenede gelişme

1900'lü yılların başlarında Koch, kenelerde diken benzeri, uzun ve ışınal (ray) yapılar gördüğünü bildirmiş, *strahlenkörper* ismini verdiği bu yapıların *Babesia*

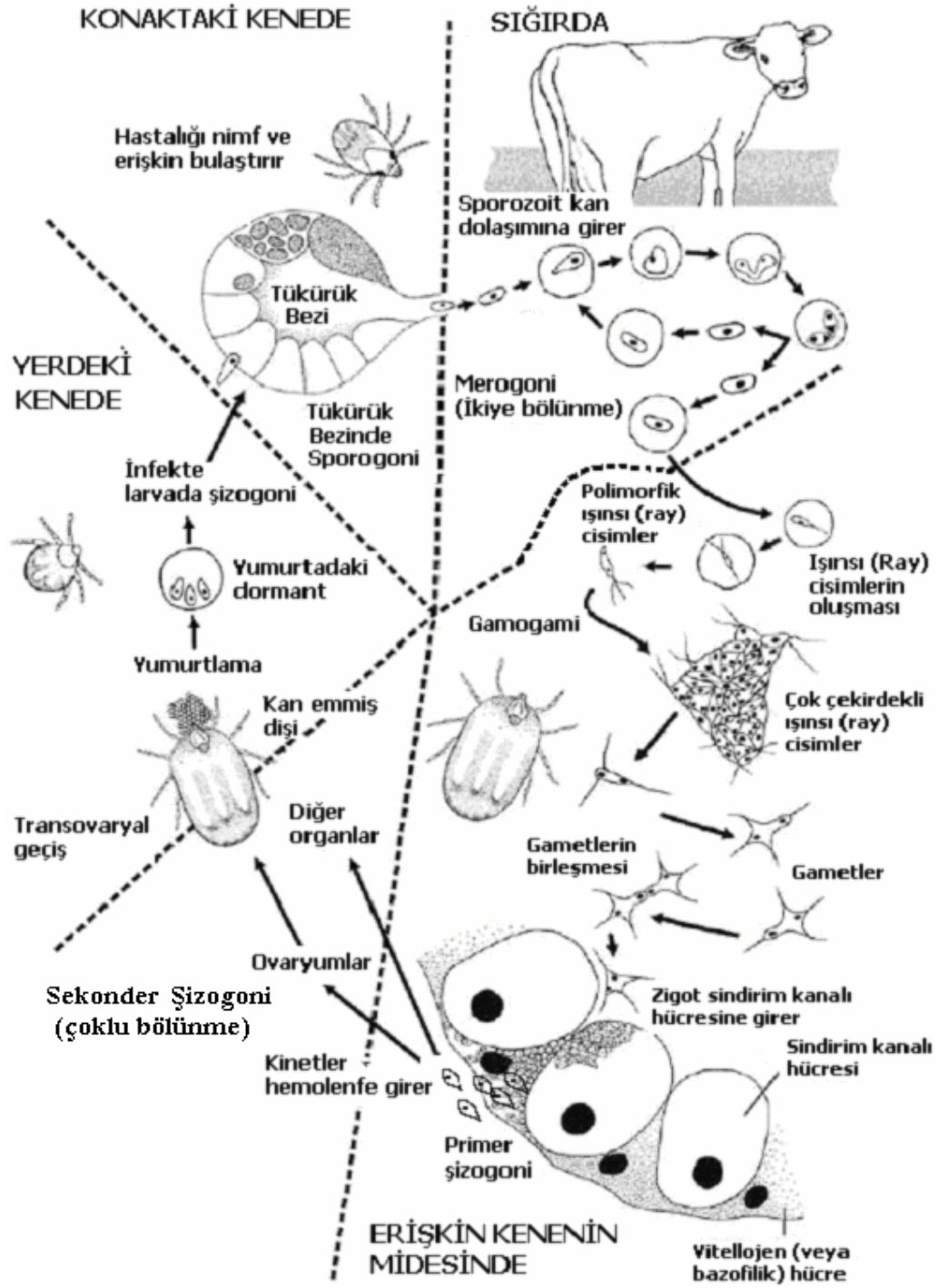
parazitlerinin seksüel gelişme formlarından biri olabileceğini önermiştir. Geçen yıllar içinde Koch'un tanımladığı yapıların gametler olduğu görüşü kabul görmüştür (Igarashi ve ark. 1988).

Kenenin kan emmesi sırasında alınan eritrositler içindeki merozoitler (gamont veya gametositler), kenenin midesinde gametogoni dönemini başlatırlar. İlk olarak ray body'ler (ışın cisimleri) oluşur. Oluşan bu ray body'ler hala eritrosit içindedirler ve çok çekirdekli ray body'lerden oluşan büyük kümeler oluşturmak üzere bölünerek çoğalmaya başlarlar. Bölünme süreci bittiğinde her bir ray body artık tek çekirdekli ve haploid olup, bunların gametler olduğu kabul edilmektedir (Mackenstedt ve ark. 1995). Ray body'lerin (gametler) büyüklüğü ve şekli birbirine benzemekte ancak bir tanesi diğerinden daha elektron dense olmasıyla farklılık göstermektedir. Bu iki ray body birleşerek (singami) yuvarlak şekilli zigotu meydana getirirler (Gough ve ark. 1998). Zigot, selektif olarak kenenin sindirim kanalındaki epitel hücrelerini, daha sonra da bazofilik hücreleri infekte eder ve bu hücrelerin içinde kinetler (vermiküller) oluşur (Soulsby 1982, Bock ve ark. 2004). Şizogoni yoluyla çoğalan kinetlerin baş kısmı ok ucuna benzer yapıda olup hareketlidirler ve hemolenfe geçerek hemositler, kas lifleri, Malpighi tüplerinin hücreleri, dişi kenelerin ovaryumları gibi değişik organlara yerleşirler (Zintl ve ark. 2003, Igarashi ve ark. 1988). Buralarda ikincil kinetler oluşur ve yeniden tekrarlı şizogoni yoluyla çoğalırlar. Kinetler son olarak tükürük bezlerine gelerek sporogoni yoluyla çok çekirdekli sporoblastları oluştururlar. Kenenin konaktan kan emmeye başlamasıyla birlikte sporoblastlar parçalanarak sporozoitler (ufak yapılı haploid merozoitler) meydana gelir (Bock ve ark. 2004). Oluşan sporozoitler son konak için infektif olup, bulaşma ancak sporozoitlerle gerçekleşir (Gough ve ark. 1998).

Kinetler yumurta içinde, sonra da larvada çoğalmaya devam eder. Oluşan sporozoitler kan emme sırasında konağa enjekte edilir. Bulaşmanın, kenenin genellikle nimf ve erişkin dönemlerinde olduğu kabul edilmektedir (Igarashi ve ark. 1988).

Babesia bovis infeksiyonunda olduğu gibi çoğu türlerden meydana gelen infeksiyonlarda sporozoitlerin konağa geçişi, kenenin konağa tutunmasından yaklaşık 2-3 gün sonra olur (Riek, 1966). Ancak *B. bigemina* infeksiyonunda larva kan emmeye başladıktan sonra infektif sporozoitlerin oluşumuna kadar yaklaşık dokuz gün geçmekte; bu nedenle de infeksiyon kenenin yalnızca nimf ve erişkin döneminde nakledilmektedir (Bock ve ark. 2004).

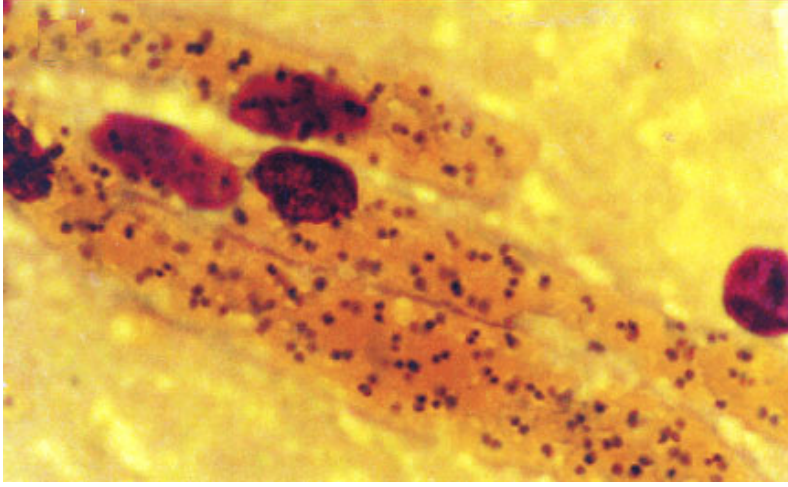
Babesia bigemina'nın yaşam çemberi Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5: *Babesia bigemina*'nın yaşam çemberi (Bockve ark. 2004)

2.3.4. Patogenez

Babesia bovis'in yol açtığı infeksiyonlarda patogenez parazitli eritrositlerin beyin dahil (Şekil 2.6) iç organların mikropiller sisteminde kümelenmesine ve bu damarları tıkamasına bağlı olarak gelişir. Dolaşımda stasis sonucu şok, organlarda anoksi ve doku hasarlarına bağlı olarak bir çok organın yetmezliği, serebral babesiosis gibi şekillerde seyreden ve belirgin klinik tabloya yol açan infeksiyonlardır (Nevils ve ark. 2000).



Şekil 2.6: Babesia bovis'le infekte eritrositlerin beyin kapillerlerinde kümelenmesi (Kessler ve ark. 2002)

Babesia bovis infekte ettiği eritrositlerin membranında “stellate protrusions” veya “knobs” denen çıkıntı biçimli yapılar oluşmasına neden olmakta; bu yapıların infekte eritrositlerin endotel hücreleriyle temasında ve yapışmada rol oynadığı kabul edilmektedir (Aikawa ve ark. 1997).

Babesia bigemina ve muhtemelen *B. divergens* gibi kapillar damarlarda akümüle olmayan ve dolayısıyla tıkama yapmayan türlerden ileri gelen infeksiyonlarda ise patogenez büyük ölçüde intravasküler hemoliz, anemi ve anoksiye bağlıdır. *Babesia bigemina*, *B. divergens* ve *B. jakimovi* infeksiyonlarının patojenitesinin yüksek olabileceği, *B. major*'ın ise az patojen ve belirgin klinik tabloya yol açmayan bir tür olduğu kabul edilir (Zintl ve ark. 2003). Patogenez *Babesia bovis* hariç tutulursa parazitemi ile doğru orantılı olarak ağırlaşır. *Babesia bovis* infeksiyonunda parazitli eritrositler kapillar damarlarda akümüle olduğu için dolaşım kanında çok düşük oranda parazit sirkülasyonu olmakla beraber, patojenitesi çok fazladır. Diğer türlerde bu tip

olaylar en azından büyük ölçekte olmadığından dolaşım kanındaki parazit sayısı çok daha fazla olmaktadır (Bock ve ark. 2004). Bunlara bağlı olarak babesiosis'in patogeneğinde iki önemli faktör rol alır:

1-Damarlarda ve kan bileşenlerinde olan değişiklikler

2-İntravasküler hemoliz

Birincisi parazitli eritrositlerin kümelenerek kapillar damarları tıkadığı *Babesia bovis*'de, ikincisi ise eritrosit kümelenmesinin olmadığı ve dolayısıyla kapiller blokajın olmadığı diğer türlerde geçerlidir.

Damarlarda olan değişiklikler

Akut-faz döneminde, parazitemi henüz fazla yüksek değilken plazma bileşiminde değişimler meydana gelir. Kinin ve aktif kallikrein düzeyi artar, kininogen düzeyi azalır. Bunlara bağlı olarak damarlarda dilatasyon, kan akışında yavaşlama, küçük damar duvarlarında bozulmalar olur; damar duvarlarının geçirgenliği artar. Conglutinin ve fibronectin düzeylerinin azalması sonucu eritrositlerde kümelenme ve kapillar damarlarda tıkanmalar meydana gelir. Fibrinogen ve ilgili ürünler artar, plasminogen azalır ve bu da koagulasyon bozuklukları ve eritrositlerin akümülyasyonuna neden olur. *Babesia bovis* infeksiyonlarında akut dönemde kanda FLP (fibrinogen-like protein) görülmesi; koagulasyon bozukluklarının DIC'e (disseminated intravascular coagulation: yaygın intravasküler koagulasyon) bağlı olarak şekillendiğini düşündürmüştür. Araştırmaların çoğalmasıyla birlikte klasik bir DIC tablosu şekillenmediği, ancak fibrinogen metabolizmasında ciddi bozukluklar ve buna bağlı olarak hiperkoagulasyon geliştiği belirtilmiştir (Wright ve Goodger 1988, Soulsby 1982).

İntravasküler Hemoliz

Babesiosis'de en önemli patolojik etki eritrosit hasarıdır. Parazitli ve hasarlı eritrositler nötrofiller ve makrofajlar tarafından fagosit edilir. İnfeksiyonun kontrolünde dalak kökenli makrofajların aktivasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir. Fagositöz, infeksiyon başlangıcında nonspesifik; daha ileri dönemde antikorla opsonize olarak spesifiktir (Brown ve ark. 2006a). Salgılanan kinin ve benzeri maddelerin eritrosit yüzeyinin ozmotik geçirgenliğini bozması nedeniyle eritrositler kolayca lize olur (Wright ve Goodger 1988).

Babesia bovis kimi zaman kronik infeksiyona yol açabilmektedir. Konak, hastalığı kontrol edebilen bir immun yanıt geliştirse dahi parazit kanda çoğu zaman mikroskopik olarak tespit edilemeyecek düzeylerde çoğalmasına devam eder. *Babesia bovis*'in kronik ve asemptomatik infeksiyonlar oluşturabilmesi, konağın savunma sistemiyle parazitin konağın immun yanıtından kaçış mekanizmaları arasında bir denge olduğunu göstermektedir. Konağın parazitin proliferasyonunu engelleyen immun mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Ancak hiperimmun sığırlardan pasif olarak homolog IgG transferinin akut infeksiyonlardan korunma sağladığı gösterilmiştir (O'Connor ve Allred 2000).

Babesiosis'in patogeneğinde parazitin yanı sıra konağa ve çevreye ilgili faktörler de rol oynar (Bkz: 2.3.6. Bağışıklık).

2.3.5. Klinik ve Patolojik Bulgular

Babesiosis'in tipik klinik belirtileri yüksek ateş, iştahsızlık, anemi, dehidrasyon, ikter ve hemoglobinüridir (Zintl ve ark. 2005).

Damarlarda olan değişiklikler ve tıkanmalara bağlı olarak *B. bovis* infeksiyonunda değişik yerlerde ödem ve kanamalar, dokularda anoksi ve nekrozlar, serebral, renal ve pulmoner fonksiyon bozukluğu, dolaşımda stasis sonucu hipotansif şok ve ölümler şekillenebilir (Kuttler 1988, Brown ve ark. 2006a). İntravasküler hemoliz görülen diğer *Babesia* türlerinde ise hemoliz sonucu şekillenen anemiye bağlı olarak anoksi, hemoglobinemi, hemoglobinüri, ikter, kemik iliğinde hiperplazi, kardiyak şok ve ölüm görülebilmektedir (Wright ve Goodger 1988).

Babesia bigemina ve *B. divergens* infeksiyonları subklinik ile akut seyir arasında değişkenlik gösterebilir. İnfeksiyonun seyrini belirleyen en önemli faktör paraziteminin derecesidir. Akut infeksiyonlarda eritrositlerin %40'dan fazlasının infekte olabildiği görülmüştür. Prepatent süre *B. bigemina*'da 12-18, *B. bovis* ve *B. divergens*'te 6-12 gün civarındır (Bock ve ark. 2004).

İlk klinik bulgu yüksek ateştir (>40°C) ve genellikle 3-7 gün sürer. Takiben iştahsızlık, depresyon, zayıflama, solunum sayısında artış gibi semptomlar gözlenir. Genellikle hemoglobinüri mevcuttur. Hastalığın ileri safhalarında tremorlar ve koma şekillenebilir. Gebe hayvanların ateşe bağlı olarak düşük yapması, erkeklerde iki aya varan bir süre fertilitede düşüş mümkündür. *Babesia bovis*'te serebral babesiosis

geliştiği durumlarda hayvanlarda ılđınca hareketler, koordinasyon bozukluğu ve ölüm görülür (Bock ve ark. 2004).

Babesia bovis en patojen *Babesia* türü olup, infekte ettiği hayvanların yarısından fazlasını öldürebilir. Buna karşın *B. bigemina* ve *B. divergens* infeksiyonlarında ölüm oranı çok daha düşük seviyededir (Zintl ve ark. 2005). Subakut infeksiyonlarda klinik bulgular belirsizdir.

2.3.5.1. Nekropsi Bulguları

Deri altı anemik ve ikteriktir. Seröz zarlarda peteşiel kanamalar, vücut boşluklarında sıvı bulunabilir. Karaciğerde hipertrofi gözlenir. Solgun, ikterik olup; safrakesesi koyu sarı-yeşil safra ile iyice doludur. Hücresel bağışıklık aktivitesine (lenfosit ve monosit-makrofaj aktivasyonu) bağlı olarak dalakta hipertrofi ve hiperplazi gözlenebilir. Dalak sert kıvamlıdır; kesildiğinde pulpa kesit yüzünden dışarı taşar. Böbrekler koyu renklidir. Diğer organlarda konjesyon ve peteşiel kanamalar gözlenir. Akciğer ve beynin etkilendiği durumlarda pulmoner ödem yanısıra beyin gri maddesinin pembe renk aldığı görülür. Kan ince ve suludur (Bock ve ark. 2004).

2.3.6. Bağışıklık

2.3.6.1. Doğal Bağışıklık

Parazitlerin konakta canlılığını sürdürebilmesi için konağın ölümüne yol amayacak bir infeksiyon düzeyini koruması gerekmektedir. Çoğu patojenler gibi parazitler de konakta infeksiyonu yok edemeyecek ancak infeksiyonu kontrol altında tutabilecek doğal bir immun yanıt gelişimini stimüle edecek stratejiler geliştirmişlerdir. Parazitlerin değişik komponentleri memelilerde bulunan TLR'e (Toll-like receptors: jeton benzeri reseptörler) bağlanarak doğal immun yanıtı uyarırlar. Çeşitli lökosit alt kümelerinde bulunan TLR'lerin görevi değişik PAMP'e (Pathogen-associated molecular patterns: patojene ilgili moleküler motifler) bağlanmasıdır. Bu bağlanmanın neticesinde doğal immun yanıt uyarılır ve kazanılmış immun yanıtın başlaması için gerekli olan antijen sunan hücrelerin sitokinler ve kostimülatör moleküller üretmesi sağlanır. Lipopeptide, bakteriyel lipopolysaccharide, non-methylated DNA CpG motifleri gibi bir çok PAMP'ı tanıyan farklı TLR'ler saptanmıştır. *Babesia bovis* merozoit ekstraktlarının sığır PBMC'nin (peripheral blood mononuclear cells: periferel kan mononükleer hücreleri) proliferasyonunu non-spesifik olarak aktive ettiği tespit

edilmiştir. Takibeden araştırmalarda bu durumun kısmen de olsa *B. bovis* DNA'sında bulunan non-methylated CpG motiflerinin B hücrelerinde proliferasyonu aktive etmesi olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmalarda non-methylated CpG motiflerinin tanınmasından sorumlu olan TLR9'un sığırlarda bulunduğu ve fonksiyonel olduğu da gösterilmiştir (Brown ve ark. 2006b). İnsanlarda bugüne dek en azından on adet TLR tespit edilmesine karşılık sığırlarda yalnızca dört adet TLR olduğu bildirilmesine (Brown ve ark. 2006b) karşılık Menzies ve Ingham'ın (2006) yaptığı araştırmada ise insanlarda tanımlanmış her bir TLR'ün sığırlarda da homologlarının bulunduğu saptanmıştır.

Kolostrum antikorları

Enzootik bir bölgede infekte anneden doğan buzağılar kolostrumla antikorları (IgG) pasif olarak alırlar. Bu antikorlar yaklaşık 6 hafta göreceli bir koruma sağlar (Dalglish 1993).

Yaş direnci

Babesiosis'de doğumdan başlayarak 3'üncü ayda belirgin olan, 6'ıncı ayda en yüksek düzeye ulaşan, 9'uncu hatta 12'inci aya kadar süren bir yaş direnci vardır (Levy ve ark. 1982). Bu nedenle infeksiyon bir yaşımdan büyük hayvanlarda problem oluşturur. Yaşın artmasıyla daha şiddetli klinik tablo oluşur. Yaş direnci infeksiyona engel olmaz, ancak infeksiyonun şiddetli seyretmesine engel olur (Brown ve ark. 2006a). Yaş direnci şeklinde gözlenen bu bağışıklık türü antikordan bağımsızdır. Bağışık olmayan anadan doğan buzağılarda da *B. bovis* ve *B. bigemina*'ya karşı direnç gözlenmiş (Bock ve ark. 2004) ancak kimi literatürler bu buzağıların 2 aylığa kadar dönemde infeksiyonla karşılaşması durumunda infeksiyona duyarlı olduklarını bildirmiştir (De Waal ve Combrink 2006). Guglielmone ve ark. (1997) immün serumun, primer infeksiyonun geç devrelerinde veya parazitler perifer kandan elimine edildikten sonra oluştuğunu göstermiştir.

Yaş direncinin mekanizması özellikle *B. divergens*, *B. bigemina* gibi türlerde fazlaca araştırılmamış ancak *B. bovis* infeksiyonlarına yönelik bazı çalışmalar bulunmaktadır (Zintl ve ark. 2005). *Babesia bovis* infeksiyonlarında T-helper 1 (Th1) hücreleri, IFN γ ve TNF α 'yı parazit antijenleriyle birlikte mononükleer fagositleri/ makrofajları reaktif nitrojen ve oksijen salgılamaları yönünde aktive ederler. İnfekte

eritrositlerin fagositozu ise infeksiyonun temizlenmesi açısından çok fazla önemli değildir. Bu mekanizma buzağuların infeksiyona direnç göstermesinde etkili olmasına karşın erişkin hayvanlarda ciddi hastalık semptomlarından sorumludur (Goff ve ark. 2003). Nitrik ve oksidatif radikaller konakta tahribat yapıcı bileşiklerdir. Tahribatı asgaride tutmak için efektör hücreyle hedef hücrenin birbirinden uzak yerleşimli olması iyi bir immun yanıt için uygun görünmektedir (Goff ve ark. 2001).

Dalağın önemi

Babesiosis'de bağışıklığın oluşmasında en önemli organ dalaktır. Dalağı çıkarılan hayvanlarda latent infeksiyonların klinik forma dönüştüğü ve şiddetli hastalık tablosu olduğu gözlenmiştir (Levy ve ark. 1982).

2.3.6.2. Kazanılmış Bağışıklık

İnfeksiyon sonrası bağışıklık

İnfeksiyonu atlatan sığırlar re-infeksiyona karşı *B. bigemina* ve *B. bovis*'de asgari 4 yıl bağışık kalmaktadır. Diğer taraftan hayvanlarda antikorların mevcut olması bağışıklığın göstergesi olmadığı gibi antikor bulunmaması da bağışıklığın olmadığı anlamına gelmez. İnfeksiyonu atlatan hayvanlarda, perifer kanda görülemeyen çok düşük sayıda parazit gelişmeye devam eder. Bu yüzden bağışıklığın premünisyon şeklinde olduğu kabul edilmektedir. Ancak ilaç tedavisi ile parazitler yok edilse bile hayvanın en az 6 ay infeksiyona karşı korunduğu (*B. bigemina*'da) anlaşılmıştır. Bu durumda steril bağışıklığın olduğu da belirtilmektedir (Bock ve ark. 2004).

2.3.6.3. Stres

Stres hayvanlarda bağışıklığı kırabilmektedir. Örneğin doğum sırasında veya sığırlarda şap hastalığı gibi hastalıklar sırasında oluşan strese bağışıklık kırılmakta ve hayvanda düşük sayıda olan parazitler tekrar çoğalarak klinik babesiosis nüksetmektedir (Zintl ve ark. 2003).

2.3.6.4. Çapraz bağışıklık

Farklı türler arasında genellikle koruyucu bir bağışıklık oluşmamaktadır. Ancak aynı türün suşları arasında karşılıklı yeterli bir bağışıklık olmakta ve klinik tablo oluşsa dahi fazla şiddetli seyretmemektedir. *Babesia bovis* infeksiyonunun *B. bigemina*'ya

karşı koruma sağlamadığı; ancak *B. bigemina*'ya karşı şekillenen bağışıklığın *B. bovis*'e karşı az da olsa koruma sağladığı bildirilmiştir (Bock ve ark. 2004).

2.3.6.5. Antikorların önemi

Bağışıklıkta antikorların önemli rolü vardır. Zira infeksiyondan korunma kolostrumla veya serumla başka hayvana nakledilebilmektedir. *Babesia bovis*'de ilk infeksiyonlarda antikora bağlı sitotoksitenin önemli olduğu, ancak reinfeksiyonlarda fagositozun önem kazandığı, fagositozda ise antikora bağlı opsonizasyonun etkin olduğu belirtilmektedir (Dalglish 1993).

2.3.6.6. Irk direnci

Bos indicus (Zebu sığırları), *Bos taurus*'a göre daha dayanıklıdır. Infeksiyon bunlarda nadiren şiddetli seyreder (Dalglish 1993).

2.3.7. Tedavi Korunma ve Kontrol

Babesiosis'in ekonomik kayıplarının önüne geçebilmek amacıyla kemoterapi, premünisyon ve attenüe parazitlerle aşılama gibi kontrol metodları uygulanmaktadır. Sığır babesiosis'ine yönelik ilk canlı aşı Avustralya'da geliştirilmiş, bu aşı Güney Afrika ve Güney Amerika'da kullanılmıştır (Costa-Junior ve ark. 2006, De Waal ve Combrink 2006).

2.3.7.1. Etiyolojik Tedavi

Literatürlerde pek çok etkili babesiasid belirtilmekte, ancak günümüzde pek azı ticari kullanımdadır. Amicarbalide, phenamidine, quinuronium sulphate, trypan blue bunlardan bazıları olarak sayılabilir (Soulsby 1982, Zintl ve ark. 2005).

Trypan blue *B. bigemina* ve diğer büyük *Babesia* türlerine etkili olan ilk ilaçtır. Daha sonraları acridine türevlerinden acriflavine hydrochloride geliştirilmiştir. Trypan blue gibi büyük *Babesia*'lara etkili olup *B. bovis* infeksiyonlarında daha az etkili bulunmuştur. Aynı gruptan olan quinuronium sulphate uzun yıllar boyunca *B. bovis*, *B. bigemina* ve *B. divergens* infeksiyonlarının tedavisinde tercih edilmiştir. Diamidine'ler grubundan amicarbalide diisethionate *B. bigemina*'ya etkilidir. Aromatik diamidine'ler grubundan phenamidine diisethionate ve pentamidine diisethionate *B. bigemina* infeksiyonlarında; diminazene aceturate ise sığırların genel olarak tüm *Babesia* infeksiyonlarında etkili bulunmuştur. Tetrasiklin grubu uzun etkili oxytetracycline ve terramycin gibi ilaçlar hayvanlar meraya çıktığı dönemde kullanıldığında *B. divergens*

infeksiyonları başta olmak üzere babesiosis'in etkilerinden korunma sağlarlar (Mehlhorn 2004).

Günümüzde sığırlarda en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlar ise diamidine'ler grubundan diminazene aceturate ve imidocarb dipropionate olup; yukarıda sayılan ilaçların çoğu başka hayvanlarda kullanım için satışa sunulmaktadır (Gray ve Murphy 1985).

Amicarbalide diisethionate: 5-10 mg/kg im dozda uygulanır. Imidocarb dipropionate: 1.2-2.4 mg/kg sc uygulanır. Diminazene aceturate: 3.5 mg/kg im dozda kullanıldığında *Babesia bovis* ve *B. bigemina*'ya hızla etkir; ayrıca *Babesia* infeksiyonlarına karşı kimyasal immunizasyon programlarında kullanılmaktadır (Mehlhorn 2004).

Imidocarb dipropionate klinik hastalıktan uzun süreli korunma sağlayan tek kemoproflaktik ajandır. Gray ve Murphy'ye göre (1985) 3 mg/kg dozda (subkutan) kullanıldığında *B. bovis*'de 4 hafta, *B. bigemina*'da 8 hafta ve *B. divergens*'de 3-6 hafta korunma sağlar. Hayvanlar ilaç uygulamasının yanısıra ilacın etki döneminde doğal saha şartlarında kenelerle karşılaştığı durumlarda iyi bir immun yanıt sağlanır (Purnell ve ark. 1980). İlacın önemli bir dezavantajı ise et ve sütte kalıntı süresinin uzun olmasıdır. Bu nedenle Avrupa'da pek çok ülkede kullanımına izin verilmemektedir (Zintl ve ark. 2003).

Zintl ve ark. (2005) ise tedavide antiparaziterlerin kullanılmasına odaklanmak yerine belki de vücudun periferel dolaşımında mevcut bulunan nitrik okside verdiği tepkiyi azaltmaya yönelik olarak non-steroidal antienflamatuar ajanların kullanımı yoluyla hastalık semptomlarının azaltılabileceğini düşünmektedir.

Allred ve Al-Khedery (2006), *Babesia* DNA metabolizmasını inhibe etme yeteneğinde ajanlar kullanılarak parazitin antijenik varyasyon göstermesinin engellenebileceğini ve bu sayede konak bağışıklık sisteminin paraziti elimine edebileceğini öngörmektedir.

2.3.7.2. Korunma ve Kontrol

Kontrol önlemleri duyarlı hayvanların bağışık kılınmasını, infekte hayvanların tedavisini, kene kontrolünü ve hayvan hareketlerinin kontrolünü içerir (Brown ve ark. 1990, p.170).

Akarisitlerle vektör kene kontrolü enzootik stabilitenin olmadığı yerlerde önemlidir. Ancak enzootik stabilite olan yerlerde supresif akarisit kullanımı enzootik stabilitenin oluşmasına da engel olur ve akarisit uygulamasında aksama meydana geldiğinde hayvanlarda ciddi hastalık tabloları şekillenir. Bir başka sakınca kenelerde direnç gelişimidir. Diğer taraftan akarisit uygulamaları masraflı olduğu kadar et ve sütte kalıntı bırakmaları ve çevreyi kirletmeleri gibi dezavantajlara da sahiptir (Norval ve ark. 1992).

Endemik bölgelerde yerli hayvanlar genç yaşta infekte olduklarından bunlar için kontrol önlemlerine gerek yoktur. Ancak bu gibi yerlere getirilen duyarlı ithal hayvanları bağışık kılmak ve bir müddet kene olmayan bölgede tutmak gerekir. Eğer hayvanları tek tek gözetim altında tutabilmek mümkünse bu durumda ilaç uygulayarak da kontrol yapılabilir. Problem vektör kenenin bölgede çok kısıtlı bir alanda olduğu durumlardır. Bu durumda infekte bölge iyi belirlenmeli ve hayvanların bu yerlere giriş çıkışları kontrol altına alınmalıdır (Brown ve ark. 1990, p.170).

Endemik bölgelerde ya kenesiz ve infeksiyonsuz bir seçeneği veya enzootik stabiliteyi oluşturulacak seçeneği tercih etmeli ve ona göre tedbir almalıdır (Brown ve ark. 1990, p.170).

Hayvanların immünizasyonu, bölgede bulunan türe karşı aşı yapılarak veya patojenitesi az bir suşla infekte edilerek sağlanır (De Waal ve Combrink 2006).

2.3.8. İnsanlarda Babesiosis

Geleneksel olarak insanlarda babesiosis etkeninin Amerika kıtasında *Babesia microti*, Avrupa kıtasında ise *B. divergens* olduğu kabul edilir. Jongejan ve Uilenberg'e (2004) göre ise Amerika'da bildirilen 300 kadar vakanın tamamı *B. microti* tarafından oluşturulmuş olmayıp, bir kısmı *B. divergens* benzeri başka bir *Babesia* türüdür. İtalyan ve Avusturyalı hastalarda *B. divergens*'den farklı yeni bir *Babesia* türü bildirilmiştir (Sparagano 2005, Kjemtrup 2000).

2.4. Theileriosis

2.4.1. Etiyoloji

Theileria sporozoitleri yaklaşık 0,75-1,5 µm çapında yuvarlağa yakın şekilli olup tripsine duyarlı bir yüzey örtüsüne sahiptir. Sporozoitin yaklaşık yarısını kaplayan çekirdek bir uçta, apical complex organelleri ise diğer uçta yer alır. Çekirdekle yakın

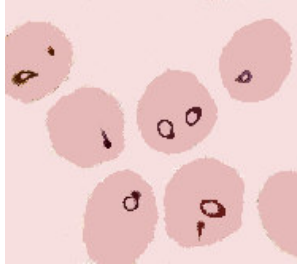
ilişkide olarak bir adet mitokondrion ve apicoplast ismi verilen organeller bulunur. Stoplazmanın geri kalan kısmında ise serbest halde ribozomlar, iki veya daha fazla olabilen rhoptriler ve çok sayıda elektron dense mikrosferler yer alır (Shaw 1997).

Theileria sporozoitleri *Babesia* sporozoitleriyle karşılaştırıldığında önemli morfolojik ve fonksiyonel farklılıklar görülür. Apical complex yalnızca polar halka ve apikal yerleşimli rhoptrilerden oluşur; konoid ve mikronemler bulunmaz. Apicomplexa'nın diğer fertlerinde parazitin motilitesinden ve konak hücresine girişinden sorumlu mikronemler, *Theileria* cinsinde yalnızca kenede hareketli kinet evresinde gözlenmekte; sporozoitlerinde ve merozoitlerinde görülmemektedir. Enzimsel salgılar ise yalnızca mikrosferler ve apikal yerleşimli rhoptrilerden yapılmaktadır. *Theileria* cinsinde sporozoiti tek kat bir plazma membranı çevreler ve yine diğer apicomplexa üyelerinden farklı olarak mikrotubuler destek yapı bulunmamaktadır. Tüm bunların sonucunda *Babesia* parazitlerinin aksine, *Theileria* sporozoitleri ve merozoitleri hareketsizdir (Soldati ve ark. 2004).

Merozoitlerin yapısı ve konak hücresine girişi bazı farklar dışında sporozoitlerde olduğu gibidir. Merozoitlerde de tıpkı sporozoitlerde olduğu gibi bir takım rhoptri bulunmasına karşılık; sporozoitlerde görülen mikrosferler veya dense granül ya da mikronemler gibi membrana bağlı sekretör yapılar bulunmamaktadır. Merozoitler de tıpkı sporozoitler gibi herhangi bir orientasyonda hücreye girebilmektedir (Shaw 2002).

Theileria annulata

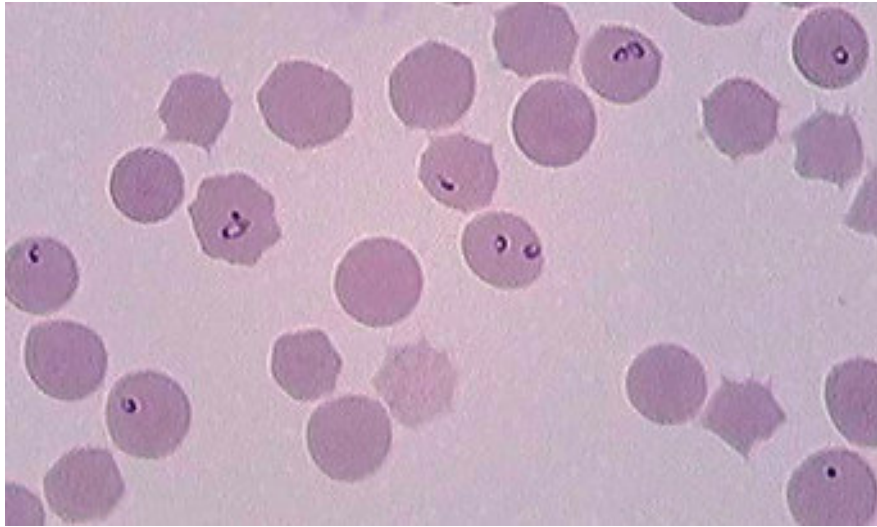
Lenf yumrusu veya dalaktaki lenfositler içinde bulunan şizontları ortalama 8 µm çapta olup daha da büyük olabilmektedirler. Makroşizontlardaki kromatin taneleri (çekirdekler) 0.4-1.9 µm, mikroşizonttakiler ise 0.3-0.8 µm çaptadır. Eritrositik formlarının çoğu (%70-80) oval, yuvarlak veya yüzük şeklindedir. Geri kalanların çoğu toplu iğne veya virgül şeklinde; bir kısmı ise anaplazmoid ve diğer şekillerdedir. Yuvarlakları 0,5-2,7 µm çapta, oval olanlar 2 X 0,6 µm boyutlarındadır. Toplu iğne veya virgül şeklinde olanlar 1,2-1,6 X 0,5 µm boyutunda, anaplazmoidler 0,5 µm çaptadır. Bir eritrositte birden fazla, bazen 8 adet parazitin yerleşebildiği bildirilmiştir (Uilenberg 1981, Neitz 1957 ve Soulsby 1982) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Theileria annulata (Mahin 2007)

Theileria parva parva

Eritrositik formlarının çoğu (%80'den fazlası) çomak şeklindedir. Geri kalanları yuvarlak, oval ve diğer formlar oluşturur. Çomak şeklinde olanlar 1.5-2 X 0.5-1 µm boyutlarındadır (Şekil 2.8). Şizontları *T. annulata*'nıninkilere benzer (Uilenberg 1981, Neitz 1957 ve Soulsby 1982) (Şekil 2.9).



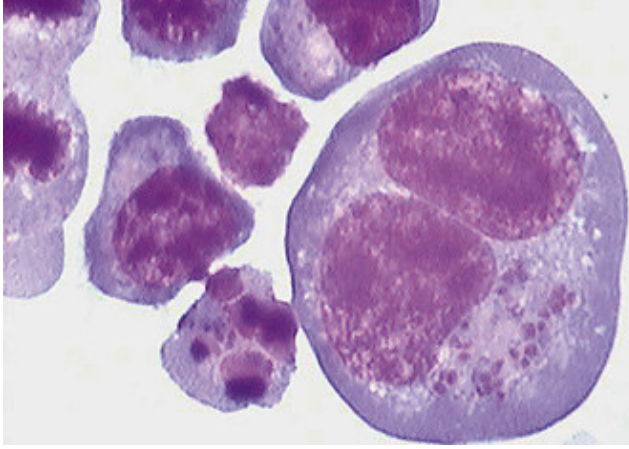
Şekil 2.8: Theileria parva (Theilériose 2007)

2.4.2. Vektörleri ve Dünya'da dağılımı

Sığırlarda theileriosis etkenleri *T. annulata*, *T. parva*, *T. taurotragi*, *T. velifera*, *T. buffeli/orientalis/sergenti* grup ve *T. mutans*'tır (OIE 2004b). Bazı araştırmacılar *T. sergenti*'yi ayrı bir tür olarak ele almaktadır (Bishop ve ark. 2004, Gubbels ve ark. 1999). Gubbels ve ark. (2000) yaptıkları çalışmalarıyla her üç türün tek tür olduğunu ve öncelikli ismin *T. buffeli* olması gerektiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte hala bir çok

yayında *T. buffeli/orientalis* olarak geçmektedir (Govaerts ve ark. 2002, Inoue ve ark. 2001).

Sığırlarda görülen *Theileria* türleri, vektörleri ve coğrafik dağılımı Tablo 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.9: *Theileria parva* şizontlarının neden olduğu lenfosit proliferasyonu (Theileriose 2007)

Tablo 2.2: Sığırlarda görülen *Theileria* türleri, vektörleri ve coğrafik dağılımı (Bishop ve ark. 2004)

Türler	Esas Vektörleri	Coğrafi Dağılım
<i>T. parva</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>R. zambesiensis</i> , <i>R. duttoni</i>	Doğu, Orta ve Güney Afrika
<i>T. annulata</i>	<i>Hyalomma anatolicum</i> ve diğer <i>Hyalomma</i> türleri	Avrupa’nın Güneyi, Asya’nın Güney, Doğu ve Batı bölgeleri
<i>T. mutans</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> ve dört <i>Amblyomma</i> türü daha	Afrika’nın Orta Doğusu, Batısı ve Güneyi
<i>T. velifera</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> ve diğer <i>Amblyomma</i> türleri	Afrika’nın Orta Doğusu, Batısı ve Güneyi
<i>T. taurotragi</i>	<i>R. appendiculatus</i> , <i>R. Zambesiensis</i> , <i>R. pulchellus</i>	Doğu, Orta ve Güney Afrika
<i>T. sergenti</i>	<i>Haemaphysalis</i> türleri	Japonya ve Kore
<i>T. buffeli/orientalis</i>	<i>Haemaphysalis</i> türleri	Avrupa, Asya, Avustralya, Afrika’nın Doğusu

Theileria parva Kompleks

Bu grupta yer alan *Theileria türleri* önceleri coğrafi yayılım, esas konaklar gibi kriterler göz önüne alınarak *Theileria parva parva*, *Theileria parva lawrencei* ve *Theileria parva bovis* olarak üç alt türe ayrılmıştır. Moleküler düzeyde çalışmaların bu üç türün genetik olarak birbirinden ayırt edilemediğini göstermesiyle trinomial sınıflandırma bilimsel ve biyolojik geçerliliği olmamakla beraber halen bazı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır (Dolan 1998). Esasen *T. parva* izolatları arasında genomik polymorphism bulunduğu ancak trinomial sınıflandırmaya karşılık gelmediği belirtilmiştir (Bishop ve ark. 2002). Yaygınlıkla kullanılması nedeniyle Uilenberg (1981), Neitz (1957) ve Soulsby (1982)'den adapte edilerek trinomial sınıflandırmaya burada da yer verilmiştir.

a-Theileria parva parva

Orta ve Doğu Afrika'da Doğu sahili humması (east coast fever) olarak bilinen hastalıktan sorumludur. Esas vektörü *Rhipicephalus appendiculatus*'tur; *Rhipicephalus duttoni* ve *R. zambesiensis* türleri de vektörlük yapabilmektedir. Patojen bir türdür. İthal sığırlarda %90-100 arasında değişen mortaliteyle seyreder (Uilenberg 1981, Neitz 1957 ve Soulsby 1982).

b-Theileria parva lawrencei

Tropik Afrika'nın orta ve doğu kısımlarında görülür. Esas konağı Afrika buffalosı olup bunlarda hafif bir enfeksiyona neden olur. Sığırlarda şizontları ve özellikle eritrositik formları çok nadir görülür. Zira hayvanlar bu döneme kalmadan ölürler. Sığır ve su mandası için çok patojendir. Vektörleri *Theileria p. parva* ile aynıdır. *Theileria p. parva* ile çapraz bağışıklık gelişir. Hastalık yabani hayvanların iki doğal yaşamı koruma alanı arasındaki dar bir koridorda görüldüğü için “koridor hastalığı” adı verilmiştir. *Rhipicephalus appendiculatus* vektörlük yapar. Parazit sığırdan sığıra 4-5 pasaj nakli yapılırsa *Theileria p. parva*'dan ayırt edilemez (Uilenberg 1981, Neitz 1957 ve Soulsby 1982).

c-Theileria parva bovis

Zimbabve'de görülür. Sığırlarda düşük mortaliteli bir *theileriosis*'e neden olur. Enfeksiyonu atlatan sığırlar uzun süre paraziti taşırlar. Sığırlarda dolaşım kanında parazitin eritrositik formları görülür. Hastalık “Ocak ayı hastalığı” veya “Zimbabve

theileriosis'ı" isimleriyle bilinir. Vektörü *Rhipicephalus appendiculatus*'dur (Uilenberg 1981, Neitz 1957 ve Soulsby 1982).

Theileria mutans

Eskiden Dünya'da oldukça yaygın olduğu (Türkiye'de de var olduğu) sanılmış, daha sonra bu türün Tropik Afrika'da görüldüğü anlaşılmıştır (Aktaş ve Altay 2004). Başlıca vektörü *Amblyomma* cinsi keneler olup, diğer pek çok kene cinsi vektörlük yapabilmektedir. Genellikle sığırlarda iyi huylu theileriosis'e neden olur, nadiren doğu Afrika'da bazı bölgelerde ciddi infeksiyonlara yol açar (Shah-Fischer ve Say 1989).

Theileria velifera

Tropikal Afrika'da esasen mandaların paraziti olup sığırlarda iyi huylu theileriosis'e neden olur. Parazit *Amblyomma* cinsi kenelerle nakledilir (Shah-Fischer ve Say 1989).

Theileria taurotragi

Afrika'da bir geyik çeşidinde (eland) görülür. Normalde sığırlar için patojen değildir. Ancak Güney Afrika'da sığırlarda dönme hastalığıyla birlikte görülür. Bu durum parazitli lenfoblastların merkezi sinir sisteminde akümüle olmasından ileri geldiği ileri sürülmüştür (Uilenberg 1981).

Theileria annulata

Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta-Doğu, Orta ve Güney Asya, Hindistan, Çin, Orta Doğu ve Türkiye'de yayılım göstermektedir. Oluşturduğu hastalık "Tropikal theileriosis", "Akdeniz sahili humması", "Mısır humması" gibi isimlerle bilinmektedir. *Hyalomma* cinsine ait 15 kadar kene türüyle nakledilmektedir (Gautam ve Dhar 1983).

Patojen bir türdür. Mortalite %10 - %90 arasında değişmektedir (Neitz 1957, Soulsby 1982).

Theileria buffeli/orientalis/sergenti

Theileria buffeli ilk olarak Asya su buffalosundan izole edilmiştir. Başlıca vektörleri *Haemaphysalis* cinsi kenelerdir. Ancak parazit *Dermacentor* ve *Amblyomma* cinsi kenelerde de tespit edilmiştir Ilıman iklim kuşağında, subtropik bölgelerde sığırlarda anemiyle seyreden iyi huylu *Theileria* etkenleri Japonya'da *T. sergenti*, Avustralya'da *T. buffeli* ve başka yerlerde *T. orientalis* olarak tanımlanmıştır (Sugimoto

ve Fujisaki 2002). *Theileria orientalis*, *T. sergenti* ve *T. buffeli*'nin taksonomisi halen tartışmalı olup literatürlerde bu isimler ayrı veya kombine olarak kullanılmaktadır (Gubbels ve ark 2000).

İyi huylu theileriosis etkenlerinden biri kabul edilmesine karşın zaman zaman patojenite kazanabilmektedir. Özellikle Avrupa ırklarında patojenitesi fazladır (He ve ark. 2005). *Theileria sergenti* ve *T. buffeli*'nin Asya'nın doğusunda ekonomik kayıplara neden olduğu belirtilmektedir (Bishop ve ark. 2004). Ağır parazitemili hayvanlarda şiddetli anemiye neden olabilir. Japonya, Kore, Kenya'da; daha az olarak Avrupa'nın güneyinde klinik vakalar rapor edilmiştir (Sugimoto ve Fujisaki 2002).

Stockham ve ark. (2000) Amerika Missouri'de bir sığırdaki klinik infeksiyon görülmesi üzerine yaptıkları incelemede etkenin filogenetik analizde *T. buffeli* çıktığını ve bu hayvanın içinde bulunduğu 75 başlık sürününün %29'unda parazitemi; %35'inde antikor tespit edildiğini bildirmişlerdir.

2.4.3. Yaşam Çemberi

2.4.3.1. Omurgalı Konakta Gelişim

Kene kan emerken tükürük sıvısındaki sporozoitleri konağa enjekte eder. Sporozoitler tamamen hareketsiz olup konak hücresi membranına girişte aktin veya miyozinin de rolü yoktur. Bu durum lenfoid hücrelere penetre olan sporozoitler için olduğu gibi, eritrositlere giren merozoitler için de geçerlidir. *Theileria* parazitlerinin penetrasyonunda apical complex'ın bulunduğu ucunun konak hücre membranına dönmesi zorunlu değildir, parazit her orientasyonda hücre içine girebilme yeteneğine sahiptir (Shaw 1999). Sporozoit veya merozoitin konak hücre membranına bağlanmasında fermuar dişlerinin birbirine geçmesi gibi mekanik bağlanma söz konusudur. Sporozoitin sekretör organellerinin sekresyona başlaması yalnızca parazit hücre içine girdikten sonra gerçekleşir. Apicomplexa'nın diğer üyelerinde ise enzim sekresyonu parazitin konak hücresine girmesinden önce ve girişi sırasında da gerçekleşir. *Theileria* cinsi bu yönüyle de farklılık göstermektedir. Ayrıca çoğu apicomplexa konak hücresinde parazitofor vakuol içinde yerleşirken *Theileria* parazitleri kendilerini çevreleyen konak membranından kurtularak stoplazma içinde konak hücresine ait mikrotübüllerle çevrelenmiş olarak yerleşir (Shaw ve Lewis 1992).

Konağa giren sporozoit lenfoid sistemin çekirdekli hücrelerine girer ve çok çekirdekli makroşizont haline dönüşür. Makroşizont mikroşizontları yapar. Bunların çekirdekleri çok küçüktür. Mikroşizonttan merozoitler meydana gelir (D'Oliveira ve ark. 1995, Bishop ve ark. 2004). Lenfositlerin parçalanmasıyla serbest kalan merozoitler eritrositler için infektiftir ve parazit bundan sonra eritrositlerde bir kaç kez ikiye bölünerek çoğalır (Bishop ve ark. 2004).

Konak hücrelerinde transformasyona neden olan *Theileria parva* ve *T. annulata* gibi türlerde çoğalma yönünde aktive olan lenfosit ikiye bölünerek çoğalırken senkronize biçimde şizont da ikiye bölünür (Gubbels ve ark. 2001). *Theileria annulata* infeksiyonlarında hücreye giren sporozoitin trofozoit formuna dönüşmesiyle şizontların oluşmasına kadar geçen süre 4 gün kadardır (Brown 1983). İnfekte hücreler başlangıçta lenf yumrusu içinde yerleşir, takriben 6. günde efferent lenf kanalıyla bulundukları yeri terk ederler (Nichani ve ark. 1999). *T. annulata* infeksiyonlarında, şizont safhası koruyucu immun yanıt oluşmasında ve patogeneizde en etkili safhadır (Glass 2001).

Theileria orientalis gibi iyi huylu theileriosis etkenlerinde ise şizontların lökositler içinde gelişmesi yoktur ve lenf yumrusu, dalak, karaciğer gibi organlarda geçici ve çok kısa bir süre bulunurlar. Şizontların görülmesi, sporozoitlerin inokülasyonundan yaklaşık 10 gün sonradır. Şizontlarla infekte hücreler genellikle periferel dolaşıma geçmez ve şizontlar patogeneizde önemli bir etkiye sahip değildir. Eritrositlerde piroplazm formlarının görülmesi de inokülasyondan yaklaşık 10 gün sonradır (Sugimoto ve Fujisaki 2002).

Eritrositlere çoklu invazyonun ve eritrosit içinde tekrarlı çoğalmanın olabildiği *T. annulata*, *T. sergenti* ve *T. mutans* gibi bazı türlerde gerçekleştiği gösterilmiştir. *T. parva* gibi diğer bazı türlerde ise piroplazmların ya hiç veya çok az değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Bishop ve ark. 2004).

Eritrositlerde parazitin yuvarlak ve oval formları oluşur, bazı araştırmacılar bu formların gamontlar olduğunu düşünmektedir (Mehlhorn 2004).

2.4.3.2. Vektörde Gelişme

Kene kan emerek eritrositik formları veya gamontları alır. Alınan parazitlerin çoğunun kenenin barsak lümeninde tahrip olduğu düşünülmektedir (Shaw ve Young 1994). Bununla birlikte bir kaç gün sonra dahi infekte eritrositler kenenin midesinde

tespit edilebilmektedir (Bishop ve ark. 2004). Mide lümeninde sindirim esnasında eritrositlerin lize olması ve parazitin açığa çıkmasıyla birlikte gametosit oluşumu başlar. Mehlhorn (2004)'a göre alınan gamontlardan makrogametler ve 4 çekirdekli mikrogamontlar oluşur. Mikrogamontların bölünmesiyle 4 adet mikrogamet meydana gelir. Mikrogamet ve makrogametlerin birleşmesiyle zigot oluşur.

Shaw (2002) ise mevcut bilgiler ışığında barsak lümeninde zigot oluşumunun, *Babesia* cinsinde olduğu gibi benzer büyüklük ve yapıda ray body'lerin (gametlerin) birleşmesi (fusion) ile olduğunu bildirmektedir. Gough ve ark. (1998) büyüklük ve şekilce benzer olan gametlerden bir tanesinin diğerine kıyasla daha elektron dense olduğunu ve ray body'lerin uç kısmında diken benzeri bir yapı bulunduğunu belirtmiştir. Bu yapının kene hücrelerine girişte rol oynadığı düşünülmektedir.

Alınan eritrositik formların ne kadarlık bir oranının gametositlere döndüğü veya gametogenezi etkileyen faktörlerin neler olduğu açıklık kazanmamıştır. Barsak lümeninde ray body'lerin oluşmasına kadar geçen süre *Theileria* türlerine göre farklılık gösterir. *T. taurotragi*'de 24 saatte ray body'lerin oluştuğu, *T. mutans*'da ise bu sürenin beş güne kadar uzayabildiği görülmüştür (Shaw 2002).

Theileria zigotları *Babesia* cinsinden farklı olarak çoğalmazlar ve mide duvarını delerek hemolenfe geçerler. Hemolenfdeki yuvarlak yapılı zigot daha sonra barsak epitel hücrelerine girerek iç tomurcuklanmayla daha uzun ve elipsoidal yapıdaki ookineti oluşturur. Ookinetler *Babesia* vermiküllerinden sayıca az olmalarına karşın daha iridirler. Her bir zigottan bir adet ookinet oluşur ve oluşan bu ookinetlerin çoğu tek çekirdekli. *T. parva*'da istisnai olarak çekirdek bölünmesi erken başlar ve intasellüler kinetlerde sıklıkla birden fazla çekirdek görülür. Kinet fiziksel ve kimyasal işlemler yardımıyla epitel hücreyi terk ederek önce hemosele, ardından kenenin tükürük bezine geçer. Yine *Babesia* cinsinden farklı olarak, ookinetlerin ovaryumlara veya başka hiç bir organa yerleşmesi söz konusu değildir (Shaw 2002, Uilenberg 2006). Kenenin gömlek değiştirip bir sonraki döneminde konağa tutunmasıyla birlikte tükürük bezindeki parazitler olgunlaşır ve sporogoni şeklinde çoğalmayla sporozoitler meydana gelir. İnfekte bir tükürük bezinde oluşan sporozoit sayısı *Theileria* türüne bağlı olduğu gibi, kenenin nimf veya erişkin döneminde olmasına bağlı olarak da oldukça değişkenlik göstermektedir (Shaw 2002). Tek bir infekte asini hücresinde 40-50,000 adet sporozoit bulunabilmektedir (Bishop ve ark. 2004).

Sporozoitlerin infektif hale gelmesi kenenin kan emmeye başlamasından bir kaç gün sonra olur. *T. annulata* için bu sürenin 3-7 gün sürdüğü bildirilmiştir (Bishop ve ark. 2004). Yalnızca transstadial bulaşmanın mümkün olduğu *Theileria* infeksiyonlarında *Babesia* infeksiyonlarından farklı olarak kene kan emerek *Theileria* etkenlerini son konağa verdikten sonra infeksiyondan ari duruma gelir; kenenin bir sonraki dönemi için dahi infektiviteden bahsedilemez (Uilenberg 2006).

Theileria annulata'nın yaşam çemberi Şekil 2.6'da şematize edilmiştir.

2.4.4. Patogenez

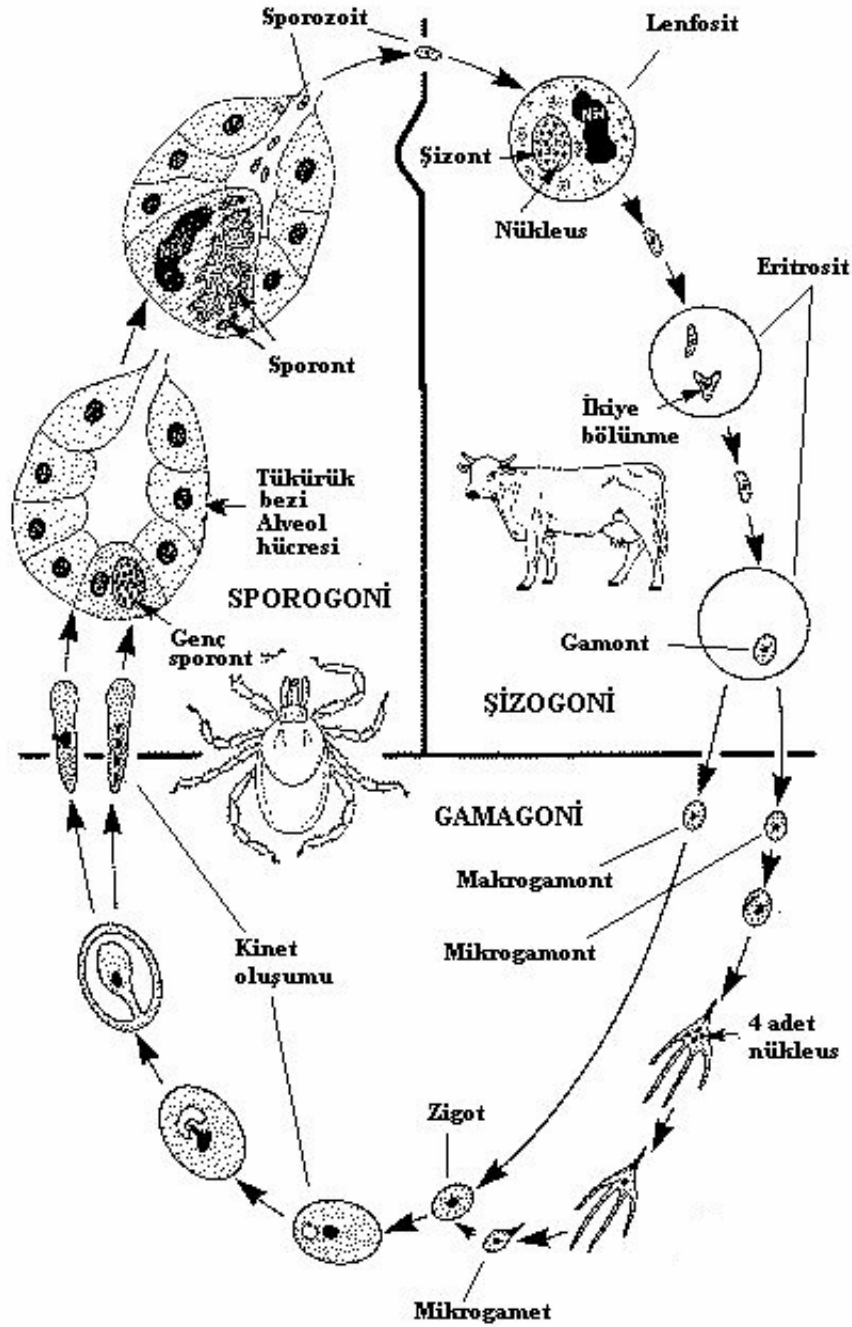
Theileriosis'de patogenezi belirleyen en önemli faktörlerden biri hastalığı oluşturan *Theileria* türünün lenfoid transformasyona ilgili olup olmadığıdır (Heussler 2002).

İntrasellüler yerleşen parazitler, konak hücreye girdikten sonra konağın humoral savunma sisteminden korunmuş olurlar. Bu durumda hücresel bağışıklık devreye girebileceği gibi konak hücre apoptoza giderek kendisiyle birlikte parazitin yaşamına son verebilir (Heussler 2002).

Bazı *Theileria* türleri konak hücreye girdikten sonra hücrenin transkripsiyon faktörlerini aktive ederek anti-apoptotik protein ekspresyonunu regüle etme yeteneğine sahiptir. Konak hücrenin bu şekilde kontrolsüz proliferasyonuna ve ölümsüz hale geçmesine **transformasyon** denilmektedir (Heussler 2002).

Theileria parva ve *T. annulata* benzer bir mekanizmayla lenfositlerde proliferasyona yol açmaktadır. İnfekte hücreler çoğalarak lenfo-hemopoetik sistem dahilinde yayılma gösterir. *T. parva* B lenfositler yanı sıra T lenfositlerde transformasyona yol açmaktadır. Kötü huylu theileriosis etkeni olarak kabul edilen bu türlerde patogenez büyük oranda lenfositlerdeki şizogoni dönemine, daha az olarak da eritrositlerdeki formlara ilgilidir (Heussler 2002). *T. annulata*'nın yapılan *in vitro* çalışmalarda sporozoitlerinin monositleri ve makrofajları tercih ettiği; daha yakın tarihli çalışmalarda ise CD5+ makrofajlarını ve B1 tip B hücrelerini spesifik olarak infekte edebildiği gözlenmiştir (Moreau ve ark. 1999). *In vivo* çalışmalar ise *T. annulata*'nın *in vitro* çalışmaların gösterdiğinden çok daha fazla tipte hücreyi infekte edebileceğini ve bunun da infeksiyonun patogenezi üzerinde doğrudan etkisi olabileceğini göstermektedir. *T. annulata* piroplazmalarının intra-eritrositik çoğalma özelliğinin olması

patogenezinde etkili bir başka faktördür (Stephens ve Howard 2002; Bishop ve ark. 2004).



Şekil 2.10: *Theileria annulata*'nın yaşam çemberi (Mehlhorn 2004)

Lenfoid transformasyona yol açmayan ve iyi huylu theileriosis etkeni olarak kabul edilen türlerde ise patogeneze eritrositik formlarla ilgilidir. İyi huylu theileriosis etkenleri arasında yer alan *T. mutans*, *T. buffeli*, *T. sergenti* gibi türlerde yüksek oranda intra-eritrositik merogoni görülmekte ve buna bağlı olarak da anemi ve eritrosit yıkımına bağlı patolojiler gelişmektedir (Bishop ve ark. 2004). İnfekte eritrositlerin yanı sıra infekte olmayan eritrositlerin de yıkımlanmasının anemide etkili olabileceği düşünülmektedir (Sugimoto ve Fujisaki 2002).

Theileria infeksiyonlarında parazit türünün patojenitesi kadar alınan parazit sayısı da hastalığın şiddetini belirleyicidir. Kimi zaman parazite karşı görülen direnç gerçekte vektöre karşı gelişmiş direnç olabilmektedir (Preston ve ark. 1992). Ayrıca sığır ırkları da infeksiyon üzerine doğrudan etkilidir. Egzotik ırklar, Holstein gibi Avrupa sığırları (*Bos taurus*) endemik bölgelerdeki yerli ırklara göre çok daha duyarlıdır (Preston ve ark. 1992, Glass ve ark. 2005).

2.4.5. Patolojik ve Klinik Bulgular

Hastalık perakut, akut, subakut veya kronik seyirlidir. *Theileria annulata* ve *T. parva* infeksiyonlarında çoğunlukla akut infeksiyon görülür. İnkubasyon süresi 10-25 gündür. İnfeksiyon fazla sayıda infekte kene ile gerçekleşmişse süre 4-5 güne kadar kısalabilir (Mehlhorn 2004).

Theileria parva infeksiyonu yüksek ateş, lenfadenopati, şiddetli pulmoner ödem ve zayıflamayla karakterizedir. Ateşi takiben gelişen şiddetli panlökopeni tablosu hayvan ölünceye veya iyileşinceye (genellikle 20-25 gün) kadar devam eder. Kulaklarda, çene altında, göz kapaklarında ödem ve göz yaşı akıntısı mevcuttur. Hastalığın son safhalarında dispne, öksürük ve bazı durumlarda şiddetli burun akıntısı görülebilir. Sarılık nadiren şekillenir; olsa bile hafif ya da belirsizdir. *Theileria parva* infeksiyonlarında bazen merkezi sinir sistemi komplikasyonları bildirilmiştir (Mehlhorn 2004).

Theileria annulata infeksiyonunda inkubasyon süresinin sonunda merozoitlerin eritrositleri infekte etmesini takibeden bir iki gün içinde 42°C'ye varan yüksek ateş görülür. Ateşle birlikte hayvan durgundur ve yüzeysel lenf yumrularının şişkin olduğu farkedilir. Hayvan halsizleşip zayıflarken vücuttaki bütün lenf yumrularının büyüdüğü ve süt veriminin azaldığı görülür. Gözlerden ve burundan akıntı gelmekte olup, göz kapakları şiştir. Kalp atışları hızlanır, rumen hareketleri ve geviş getirme durur.

Lökopeni (lenfositoliz ve leukopoesis'in baskılanması sonucu) ve eritrosit yıkımına bağlı olarak belirgin anemi şekillenir. Hayvan ikteriktir, bu dönemde hemoglobüri ve konjunktivalarda peteşiel kanamalar görülebilir (Mehlhorn 2004, D'Oliveira 1995).

2.4.5.1. Nekropsi Bulguları

Akciğerlerde şiddetli ödem vardır. Lenf yumruları şiş ve ödematöz olup, hemorajiler görülebilir. Karaciğer ve özellikle dalak büyümüştür. Renal kortexte multifokal hiperplazi, makroskopik olarak beyaz odaklar halinde gözlenebilir. Abomazumda ve birçok olayda ilave olarak ince bağırsaklarda, mukozalar şiş olup; kırmızı veya siyah renkli, etrafı yangılı ülserler karakteristiktir. Seröz zarlarda (özellikle perikardiumda) peteşiel kanamalar görülür. Bazı vakalarda beyinde de nekrotik infarktüs alanları gözlenebilir (Soulsby, 1982).

2.4.6. Bağışıklık

İnfeksiyonu atlatanlar reinfeksiyonlara karşı bağışıklıdır. Bu bağışıklık *Theileria parva*'da steril bağışıklık, *Theileria annulata*'da ise premünisyon şeklindedir. *T. lawrencei*'nin *T. parva* infeksiyonlarına karşı koruma sağlaması hariç tutulursa *Theileria* türleri arasında çapraz bağışıklık yoktur (Soulsby 1982).

Theileria annulata tarafından oluşturulan primer infeksiyonu atlatan hayvanlarda daimi taşıyıcılık (carrier state) durumu şekillenir (İlhan ve ark. 1998). Taşıyıcılık klasik anlamıyla, infekte olduktan sonra iyileşen bir hayvanın vektör keneler için rezervuarlık oluşturmasını ifade eder. İlhan ve ark. (1998) araştırma bulgularını, taşıyıcılığın parazitin yalnızca piroplazm formlarına değil; şizont formlarına da ilgili olduğuna delil saymıştır.

Theileria annulata infeksiyonlarında makrofajlara ve natural killer hücrelere bağlı doğal bağışıklık mekanizmalarının parazitin sporozoit, makroşizont ve merozoit gibi değişik yaşam devrelerinin proliferasyonuna doğrudan etki ettiği gösterilmiştir. Makrofajlarca salgılanan reaktif oksijen ve nitrojen bileşikleri ile TNF- α 'nın pro-apoptotik etkisi bulunmaktadır. *Theileria annulata* infeksiyonlarında makrofajlar ve natural killer hücreler doğal ve kazanılmış bağışıklığın sinerjik olarak şekillenmesinde rol oynamaktadır. Özellikle sitostatik ve sitotoksik etkiye sahip NO (nitrik oksit)'i üreten makrofajların bağışıklıktan sorumlu olduğu in-vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir (Richardson ve ark. 1998, Ayerdem ve ark. 2006).

Theileria orientalis gibi iyi huylu theileriosis etkenlerinin yol açtığı infeksiyonlarda hayvanlar genellikle hastalığı atlattır ancak muhtemelen hayat boyu taşıyıcı durumdadırlar. Beslenme ve bakım koşullarında ani değişimler, gebelik, laktasyon gibi stres faktörleri relapslara neden olabilir (Sugimoto ve Fujisaki 2002).

Enzootik stabilitenin olmadığı bölgelerde genç hayvanlarda maternal antikorlar göreceli bir koruma sağlar. Yaşlı hayvanlar ise kenelerle karşılaşmaları nedeniyle daha fazla risk altındadırlar. Enzootik stabilite görülen bölgelerde ise yaşlı hayvanlar kenelerle sürekli karşılaşmakta olup; premünüsyona bağlı olarak hastalığa az dirençlidirler. Bu bölgelerde gençler ve ithal ırklarda klinik hastalık şekillenir (Norval 1992).

Theileria türlerinde memeli konaklarda taşıyıcılık durumu ve parazitin konakta daimi kalan formları Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3: *Theileria* türlerinin konaktaki uzun dönemli formları (Maritim ve ark. 1998)

Theileria türleri	Uzun dönemde çoğalma		Kan ile Bulaşma
	Şizont	Piroplasm	
<i>T. mutans</i>	-	+	+
<i>T. taurotragi</i>	+	+	+
<i>T. velifera</i>	-	+	+
<i>T. p. parva</i>	+	-	-
<i>T. p. lawrencei</i>	+	-	-
<i>T. p. bovis</i>	+	-	-
<i>T. sergenti</i>	-	+	+
<i>T. orientalis</i>	-	+	+
<i>T. annulata</i>	+	+	+

2.4.7. Tedavi Kontrol ve Korunma

2.4.7.1. Tedavi

Theileria infeksiyonlarına karşı kemoterapi, aşılama ve vektör mücadelesi şeklinde kontrol metodları uygulanmaktadır (Karagenç ve Eren 2002).

Etiyolojik tedavi (Kemoterapi)

Antitheilerial aktivitesi yüksek ilk ilaç hydroxynaphthoquinon grubundan Menoctene olmuştur. Bu ilaç şu an kullanımda olmayıp yerini aynı gruptan, maliyeti daha düşük olan parvaquone ve buparvaquone almıştır. Buparvaquone theileriosis tedavisinde bilinen en etkili ilaçtır. Quinazolinone'lar grubundan halofuginone lactate da yine tedavide tercih edilebilecek bir alternatiftir. Tedavide antibabesial ilaçlar fazla etkili olmamakla beraber primaquin diphosphate ve imidocarb dipropionate'ın *T. orientalis* ve *T. sergenti* infeksiyonlarında parazitemiyi azalttığı gösterilmiştir. Parvaquone: 20 mg/kg im tek doz veya 48 saat arayla 10 mg/kg im, çift doz olarak uygulanabilir. Buparvaquone: 2.5 mg/kg im tek doz veya uygulanır. Şiddetli infeksiyonlarda 48 veya 72 saat sonra tekrarlanabilir. Halofuginon: 1.2 mg/kg po uygulanır. Güvenlik marjı düşük bir ilaçtır. Primaquin diphosphate: 1 mg/kg dozda uygulanır. Imidocarb dipropionate: 1.2 mg/kg dozda uygulanır. *Theileria* tedavisinde tetrasiklin grubu ilaçlar da kullanılmaktadır. Bu grup ilaçlar parazitin şizont dönemini baskılayıcı özellikte olmasıyla klinik infeksiyonlarda destek tedavi amacıyla veya kimyasal immunizasyon amaçlı kullanılmaktadırlar (Mehlhorn 2004).

2.4.7.2. Kontrol ve korunma

Akarisitlerle vektör kene kontrolü enzootik stabilitenin olmadığı yerlerde önemlidir. Ancak enzootik stabilite olan yerlerde supresif akarisit kullanımı enzootik stabilitenin oluşmasına engel olur ve akarisit uygulamasında aksama meydana geldiğinde hayvanlarda ciddi hastalık tabloları şekillenir. Bir başka sakınca kenelerde direnç gelişimidir. Diğer taraftan akarisit uygulamaları masraflı olduğu kadar et ve sütte kalıntı bırakmaları ve çevreyi kirletmeleri gibi dezavantajlara da sahiptir (Norval ve ark. 1992).

Günümüzde aşı uygulamaları, yanısıra buparvaquone ile ilaçlama ve akarisit mücadelesi tercih edilen kontrol yöntemleridir (Glass ve ark. 2005).

Aşı çalışmaları

Theileriosis'de aşı uygulamaları hastalığın endemik olduğu bölgelerde koruma sağlamaktadır. Tropikal theileriosis'e karşı makroşizont ile infekte hücre kültürlerinden (canlı, attenüe) hazırlanan aşılar korunmada önemli bir yer tutmaktadır (Karagenç ve

Eren 2002). Attenüe şizont aşıları genellikle çok iyi bir bağışıklık sağlamakta ve Türkiye’de de Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü’nde üretimi yapılmaktadır.

Theileria parva üzerine yapılan çalışmalarda ise parazitli lenfoblastların yüzeyinde *Theileria* antijenlerinin ekspresyonu görülmemiştir. Bu durum immün serum transferinin hayvanları infeksiyonlardan korumamasını izah etmektedir. Buna karşın endemik bölgelerdeki hayvanlarda sporozoit-spesifik antikorların bulunduğu ve bu antikorların nötralizasyonda etkili olduğu in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (Mehlhorn 2004). Bu şekilde oluşan antikorların büyük bölümünün 67 kDa proteinine spesifik olduğunun keşfinden sonra bu proteinin rekombinant immunojen olarak kullanıldığı aşı çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca pek çok merozoit yüzey örtüsü molekülleri tanımlanmıştır. 30-32 kDa protein aileleri *Theileria* ve *Babesia* türlerinin çoğunda bulunmaktadır. Günümüzde ise sporozoit yüzey antijenlerinden SPAG-1 ve 30 kDa merozoit yüzey antijeni Tams1, subunit aşı olarak kullanılabilecek antijenler olarak ön plana çıkmıştır (Karagenç ve Eren 2002).

2.5. Babesiosis ve Theileriosis’in Tanısı

Babesiosis tanısında vektör kenelerin aktif olduğu mevsimde (genellikle yazın) hayvanda yüksek ateş, anemi, ikter, hemoglobüri belirtilerinden çoğunun olması infeksiyondan şüphelendirir ve tanıya yardımcı faktörlerdir. Klinik bulguların yanısıra kandan hazırlanan sürme ve kalın damla preparatların ve değişik organ frotilerinin Giemsa ile boyandıktan sonra mikroskopik incelemesinden faydalanılmaktadır. Hastalığın kesin tanısı Giemsa yöntemiyle boyanmış yayma kan frotilerinde eritrositler içinde parazitleri görmekte olur. Ateşin yüksek olduğu zamanlar kanda parazitemi yüksektir. Daha sonra parazitler kanda çok azalır. Tekrarlı muayene gerekebilir (Kreier ve Baker 1987, p. 194, Soulsby 1982, p. 714). *Babesia bovis*’de parazitemi genellikle %1’i geçmez. Bu parazitten ileri gelen infeksiyonda parazitler daha ziyade kapillar damarlarda olduğundan; froti kulak veya kuyruk ucundan perifer kapillarlardan alınan kanla yapılmalıdır. *Babesia bovis*’den ölmüş hayvanlarda beyin, böbrek, karaciğer, dalak gibi organlardan baskı frotileri yapılır, Giemsa ile boyanır (OIE 2004a).

Mikroskopik bakı yöntemlerinde *Babesia*’ların piroplazmik formlarının görülmesi tanıya yardımcı olmakla birlikte her durumda tür tayini yapılamamakta ve çoğu zaman da parazit sayısının azlığına bağlı olarak mikroskopide etkene rastlanmamaktadır (Böse ve ark. 1995).

Babesiosis'in tanısında enzyime linked immunosorbent assay (ELISA), komplement fiksasyon testi (CFT), indirekt floresan antikor testi (IFAT), radioimmunoassay (RIA), aglutinasyon testleri gibi serolojik tekniklere de başvurulmaktadır. Serolojik testler genel olarak klinik bir infeksiyonun varlığını ortaya koymamaktadır. Antikorların varlığı, parazit olmadığı halde bile devam ettiği için yanlış pozitif sonuç verebilir. Serolojik testler hayvanlardaki antikorların yaygınlığını ortaya koymada dolayısıyla enzootik stabiliteyi belirlemede yardımcı olabilir. Ayrıca serolojik testlerin değişik *Babesia* türlerinin tanısında yeterli duyarlılık göstermediği ve türler arası kros reaksiyonlar görülebildiği bildirilmiştir. Komplement fiksasyon testi babesiosis tanısında kullanılan ilk serolojik testtir. Piroplasmosisde tanı amaçlı kullanılabilecek serolojik testler arasında özgüllüğü en yüksek testin CFT olduğu kabul edilir. Diğer taraftan CFT'nin duyarlılığı IFA testinden düşüktür ve bu nedenle sınırlı kullanım alanı bulmuştur. Aglutinasyon testleri içinde indirekt hemaglutinasyon testi, kapiller tüp aglutinasyon testi, jel presipitasyon testi, lam aglutinasyon testi gibi metodlar denenmiş ancak bunların da genel olarak duyarlılıklarının düşük olduğu gözlenmiştir. Radioimmunoassay *B. bovis* antikorlarının saptanmasında IFA testinden çok daha duyarlı bulunmuş ancak ayrıntılı bir test olması nedeniyle kullanımı iyi donanımlı laboratuvarlarla sınırlı kalmıştır. IFAT *Babesia* spp.'ye karşı oluşan antikorların saptanmasında yaygın olarak kullanılmışsa da testin *B. bigemina*'da özgüllüğü düşüktür. *Babesia bigemina* IFA testinde *B. bovis* antikorlarıyla kros reaksiyonlar vermesi özellikle her iki parazitin birlikte görüldüğü bölgelerde sorun yaratmaktadır. *Babesia bovis* tanısında uluslararası validasyona sahip bir ELISA testi geliştirilmiş ancak *B. bigemina* için bu mümkün olamamıştır. Hatta bir çalışmada *B. bigemina* antiserumunun fibrinojenle non-spesifik reaksiyonu gözlenmiştir. *Babesia divergens* için geliştirilmiş ELISA testleri de bulunmakla birlikte bunlar da uluslararası validasyona sahip değildir (El-Ghaysh ve ark. 1996, OIE 2004a, Weiland ve Reiter 1988).

Theileriosis tanısında da ateş, lenf yumrularının şişmesi, anemi, ikter, rumen hareketlerinin durması gibi klinik semptomlardan birkaçının birlikte görülmesi theileriosis'den şüphe ettirir. Kesin tanı parazitin görülmesiyle yapılır. Bunun için :

a-İnguinal veya preskapuler lenf yumrularından veya mümkünse dalaktan biyopsi (uzun kanülle) alınarak froti hazırlanır ve Giemsa yöntemiyle boyanır.

Lenfositler içinde şizontlar (Koch cisimcikleri) aranır. Şizontların hangi türe ait olduğunu belirlemek mümkün değildir. Ancak lenfositlerin yüksek bir yüzdesi infekte ise klinik tablo ile birleştirilerek karar verilir (E.Tüzer kişisel görüşme^{*}).

b-Perifer kandan yayma froti yapılır Giemsa ile boyanır. Eritrositler içinde parazitin eritrositik formları aranır. Klinik tablonun başlangıcında eritrosit içinde parazitler görülmez, eritrositlerin infekte olduğu durumda ise enfeksiyon ilerlemiş ve tedavi açısından geç kalınmış olunabilir. Kan örneklerinin mikroskopik bakışında bir çok kez türlerin ayrımı mümkün olmamakta ve yanılgılara yol açmaktadır. Ayrıca hayvanların taşıyıcı olduğu durumlarda veya akut enfeksiyon başlangıcında kanda çok az parazit görülebilir veya hiç görülemez. Eritrositlerin yüksek bir yüzdesinin infekte olması klinik enfeksiyon varlığını gösterir. Diğer yandan paraziteminin yüksekliği her zaman klinik tablonun şiddeti ile doğru orantılı değildir (Nagore ve ark. 2004).

Theileriosis tanısında da IFAT, ELISA, CFT, latex aglutinasyon testi gibi serolojik testler kullanılmaktadır. Bunlar arasında IFA testi özgüllüğünün, duyarlılığının yüksek olması ve uygulama kolaylığı nedenleriyle en fazla kabul gören serolojik test olmuştur. Bazı *Theileria* türleri arasında kros reaksiyonlar görülebilmesi ve infekte hayvanların her durumda tespit edilememesi testin dezavantajlarından (OIE 2004b). Darghouth ve ark. (1996) mikroskopik olarak inceledikleri ve *T. annulata* piroplazmalarını tespit ettikleri kan örneklerinin bir kısmında IFA testiyle antikor saptanamadığını bildirmiştir. *Theileria annulata* antikorlarının saptanmasına yönelik geliştirilmiş ELISA testleri bulunmaktadır. ELISA testinin IFA testinden daha uzun süre antikor saptayabildiği bildirilmiştir (Kachani ve ark. 1992). Son yıllarda rekombinant yüzey proteinleri kullanarak geliştirilen ELISA testleri de tropikal theileriosis tanısında başarılı sonuçlar vermektedir (Bakheit ve ark. 2004). Komplement fiksasyon testinin ise theileriosisin akut dönemlerinde antikorları tespit edebildiği ancak başlangıç dönemlerinde ve kronik evrelerde duyarlılığının yetersiz olduğu gözlenmiştir (Kuttler ve ark. 1967). Jeong ve ark. (2005) ise *T. sergenti* enfeksiyonunun tanısında latex aglutinasyon testini kullanmışlar ve bu testin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Serolojik testler hayvanlarda antijen veya antikor varlığını ortaya koymakta ancak parazit varlığı ve hayvanın taşıyıcı olup olmadığı hakkında bilgi vermemektedir. Ayrıca klinik enfeksiyonu atlatan hayvanlarda zamanla

^{*} Erkut Tüzer, Prof.Dr., İstanbul Üniv. Veteriner Fak.Parazitoloji ABD, Avcılar, İstanbul.

antikorlar kaybolmasına karşılık bu hayvanlarda parazitin vektör keneyi infekte edebilen piroplazmik formları uzun süre kalabilmektedir (D'Oliveira ve ark. 1995). Tüm bu nedenlerle serolojik tesler tedaviye esas olarak klinik infeksiyonun varlığını ortaya koymaz ancak prevalansı ve enzootik dengeyi belirlemede yardımcıdır.

***Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Tanısında Kullanılan Moleküler Teknikler**

Moleküler biyolojik tekniklerin geliştirilmesiyle son konak ve vektörde parazit DNA'sının saptanmasına yönelik olarak Polymerase Chain Reaction (PCR), nükleik asit probeleriyle DNA hibridizasyonu, Restriction Digestion, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analizleri gibi moleküler biyolojik yöntemler teşhiste ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanıma girmiştir (Lew ve Jorgensen 2005, OIE 2004a ve 2004b).

PCR'a dayalı olarak yapılmış çok sayıda çalışma ve yayın bulunmaktadır. Bu çalışmaların pek çoğu ise ağırlıklı olarak Suarez ve ark. (1991), Fahrimal ve ark. (1992), Figueroa ve ark. (1992, 1993) başta olmak üzere bazı araştırmacıların geliştirdiği metodlara dayanmaktadır.

PCR ile tanıda, hayvanlarda bulunabilecek birden fazla etkenin aranması ön plana çıkmıştır. Bu amaçla yapılan ilk çalışmalarda Figueroa ve ark. (1993) multiplex PCR kullanılarak *B. bovis*, *B. bigemina* ve *Anaplasma marginale* türlerini; Allsopp ve ark. (1993) ise altı farklı *Theileria* türünü aynı anda tespit etmiştir.

Babesia bovis DNA'sının PCR amplifikasyonunu ilk yapanlar Suarez ve ark. (1991) ile Wagner ve ark. (1992)'dir. Bir çok araştırmacı PCR testini mikroskopik bakı ve serolojik yöntemlerle karşılaştırmış ve PCR testinin duyarlılığının daha yüksek olduğunu bildirmiştir (Böse 1995, Calder ve ark. 1996, Almeria ve ark. 2001). Calder ve ark. (1996) SSrRNA gen bölgesi üzerinde *B. bovis*'e spesifik bir bölgenin amplifikasyonuna yönelik PCR işlemiyle taşıyıcı durumdaki hayvanları tespit etmiştir. Figueroa ve ark. 1992 yılında doymuş dişi *B. microplus* kenelerinin hemolenfinde ve yine aynı sene taşıyıcı hayvanlarda *B. bigemina* DNA'sını tespit etmişlerdir.

Theileria parazitlerine yönelik olarak da PCR ve nükleik asit problemlerinin kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır (Figueroa ve Buening 1995). Chen ve ark. (1991) *Rhipicephalus appendiculatus* kenelerinin tükürük bezlerinde *Theileria parva* DNA'sını saptayan problemler geliştirmiştir. Tanaka ve ark. (1993), Kawazu ve ark. (1992,

1995) sırasıyla 32, 33 ve 34-kDa major piroplazm antijenlerini kodlayan gen bölgelerinin amplifikasyonu ile *T. sergenti*'nin tanı metodunu geliştirmiştir. D'Oliveira ve ark. (1995) *T. annulata* tanısında 30-kDa merozoit yüzey antijenini kodlayan 721 bp'lik bir gen bölgesinin amplifikasyonuna dayalı PCR yöntemini geliştirmiş ve mikroskopik bakı, IFAT testleriyle kıyaslandığında duyarlılığının çok daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

Caccio ve ark. (2000) β -tubulin geninin amplifikasyonuna dayalı PCR-RFLP analizi ile iki *Theileria* ve yedi *Babesia* türünün; Spitalska ve ark. (2004) ise 18S geninin amplifikasyonuna dayalı RFLP testi ile vektör ve konaklarda *T. lestoquardi* ve *T. annulata* türlerinin ayrımını gerçekleştirmiştir.

Reverse Line Blotting de *Babesia* ve *Theileria* türlerinin tanısında kullanıma girmiş yöntemlerden biridir. RLB ilk olarak streptokok'ların serotiplendirilmesi amacıyla geliştirilmiştir (Kaufhold ve ark. 1994). Rijpkema ve ark. (1995) *Borrelia* spiroketlerinin tanısında RLB'yi kullanmışlar ve böylece RLB, kenelerdeki patojenlerin tanı ve ayrımında ilk defa kullanıma girmiştir.

Schouls ve ark. (1999) kenelerde *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato ve *Bartonella* türleri için 16S ssu rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonunu takiben RLB tekniği ile bu türlerin eş zamanlı tanısını koymuşlardır. Sparagano (1999), Sparagano ve Jongejan (1999) RLB tekniğini kenelerde; Gubbels ve ark. (1999), Ceci ve ark. (1999) ise sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin identifikasyonu amacıyla kullanmışlardır.

RLB tekniğinin popülerlik kazanmasıyla ve yapılan modifikasyonlarla, bir testte tespit edilebilen patojen sayısı da artmıştır. Gubbels ve ark. (1999) ve Sparagano ve ark. (2000) çalışmalarında 6 *Theileria* ve 3 *Babesia* türünün tanı ve ayrımını yaparlarken; Georges ve ark. (2001), içinde *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türlerinin de yer aldığı 21 farklı patojenin tanı ve ayrımını yapmışlardır.

Sparagano ve ark. (2003) kene, sığır ve koyunlarda parazit DNA'larının 16S ve 18S rRNA bölgelerinin amplifikasyonunu takiben yaptığı RLB işlemiyle piroplazm türleri yanı sıra *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türlerini de eş zamanlı olarak tespit etmiştir.

DNA aramaya yönelik RLB de dahil olmak üzere moleküler araştırmaların çoğu 18S rRNA geninin amplifikasyonunu temel almaktadır. Gen bankalarında bu genin DNA sekansları bulunduğu için güvenli olmakla beraber piroplazm genomlarında bu

genin fazla kopyası bulunmamaktadır (Criado ve ark. 2006). Dalrymple (1990) *B. bovis* genomunda 3 adet; Kibe ve ark. (1994) ise *T. parva* genomunda 2 adet ssu rRNA geni bulmuştur. Genomdaki kopya sayısı yüksek olan dizilimlerin hedeflenmesi PCR duyarlılığını da arttırır ancak bugüne kadar piroplazmlarda yeni genomik hedefler belirlenmesine yönelik fazla çalışma bulunmamaktadır (Criado ve ark. 2006). Salem ve ark. (1999) *B. bovis* ve *B. bigemina* parazitleri için, cytochrome *b* geninin amplifikasyonunun ribozomal DNA amplifikasyonuna dayalı testlerden %20 daha duyarlı sonuç verdiğini bildirmiştir. Criado ve ark. (2006) İspanya’da semptomatik bir köpekte *T. annulata* infeksiyonu saptamışlar, *T. annulata*’nın sığır izolatıyla karşılaştırdıklarında 18S rRNA sekanslarının aynı olmasına karşın cytochrome *b* geni sekanslarında farklılıklar olduğunu görmüşlerdir.

Sparagano ve ark. (2002) *Theileria annulata*’nın moleküler teşhisine yönelik çalışan farklı laboratuvarlarda PCR ve RLB testlerini ve elde edilen sonuçların laboratuvarlar arasında uyumluluğunu karşılaştırmıştır. Araştırmacılar RLB testini PCR’a göre daha duyarlı olduğunu; laboratuvarlarda elde edilen sonuçlar arasında ise %30 oranında uyumsuzluk bulunduğunu belirlemişlerdir.

Ceci ve ark. (1999) RLB testini mikroskopik bakıyla karşılaştırdıkları çalışmalarında mikroskopi PCR ve RLB bulguları arasında uyumsuzluklar olabildiğini, bununla beraber özellikle birden fazla etkenin görülebildiği bölgelerde RLB metodunun kullanımının önemli olacağını bildirmişlerdir.

Almeria ve ark. (2002)’na göre ise sığırlarda piroplazm infeksiyonlarının tespiti ve etken türlerinin birbirinden ayrımı amacıyla yönelik kullanılabilecek optimal test, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan RLB’dir.

Gelecekte multiplex real time PCR testlerinin veya oligonükleotid micro-array teknolojilerinin tanıda kullanıma girmesi ve RLB’nin yerini alması muhtemeldir. Ancak bugün için RLB tekniği hem pek çok patojeni aynı anda tespit edebilmesi hem de epidemiyolojik çalışmalarda kendini kanıtlamış olmasıyla, *Theileria* ve *Babesia* gibi kene kaynaklı hastalıkların tanısında en fazla tercih edilen bir testtir (Lew ve Jorgensen 2005).

2.6. Türkiye’de Babesiosis ve Theileriosis

Türkiye’de sığırlarda görülen *Babesia* ve *Theileria* etkenleri üzerine gerek son konak ve gerekse de vektör keneler üzerinde yapılmış çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma bulunmaktadır.

Türkiye’de *Theileria annulata*’nın varlığını ortaya ilk koyan Samuel ile Raif (1930) ve 1931 yılında Lestoquard ile Ekrem Erbin’dir (Lestoquard, Erbin. Kaynak: Mimioğlu ve ark. 1969, p:980). *Theileria annulata* prevalansını belirlemek üzere mikroskopik bakı ve serolojiye dayanan testler uzun yıllar kullanılmıştır. Mikroskopik bakıya dayanan araştırmalarda Karadeniz Bölgesi’nde Göksu (1970) %20, Mimioğlu (1955) %22,8, Dinçer ve ark. (1991) %32,8; Marmara Bölgesi’nde Tüzer (1980) %20,7; Ege Bölgesi’nde Erkut (1967) %43,2 olarak bulmuştur. Özcan ise (1961) Ankara civarında kan paraziti bulunan hayvanlar arasında *T. annulata* infeksiyonunu %94,3 oranında gözlemiştir.

Çakmak (1987) Türkiye’de sığır kan protozoonlarının serolojik teşhisini ilk defa gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada Ankara’nın Beytepe köyünde IFAT ile *T. annulata*’ya karşı %6,4 antikor tespit edilmiştir. Sayın ve ark. (1992) IFA testi kullanarak yaptıkları çalışmalarda Ankara ilçelerinde bulunan sığırlarda 1990 yılında %31,7; 1991 yılında ise %19 prevalans saptamıştır. Eren ve ark. (1998) Aydın yöresinde inceledikleri 100 sığırdaki mikroskopik bakıda %9 ve serolojik olarak IFA testiyle %31 *T. annulata* prevalansı belirlemişlerdir. Samsun ilinde sığırlarda IFA testiyle yaptıkları çalışmada Dinçer ve ark. (1991) %63; Adana ilinde Çakmak ve Öz (1993) ise %10,7 *T. annulata* prevalansı bulunduğunu bildirmişlerdir. Eren ve ark. (1995) Türkiye’nin değişik bölgelerinde yaptıkları çalışmalarda *T. annulata* yaygınlığının Ege Bölgesi’nde %40, Marmara Bölgesi’nde %33,3, Karadeniz Bölgesi’nde %46,8, İç Anadolu Bölgesi’nde %29 ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde ise %91,4 olduğunu göstermişlerdir. Aktaş ve ark. (2001a) Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde IFA testiyle yaptıkları seroprevalans çalışmasında *T. annulata*’ya karşı sırasıyla %42,8, %17,1 ve %34,8 oranlarında antikor saptamışlardır. İnci ve ark. (2002a) *Theileria annulata* prevalansı üzerine mikroskopi ve serolojiye dayalı olarak yaptıkları araştırmada elde ettikleri epidemiyolojik verilerin istatistiksel analizini yorumlamışlardır.

Keçeci ve ark. (1999) *Theileria annulata* üzerine infekte ve sağlıklı ineklerde karşılaştırmalı bir çalışma yaparak infeksiyonun hematolojik değerler ve kan

metabolitlerinin düzeyine etkisini araştırmışlardır. Ozan Temizer ve ark. (1999) *T.annulata* ile doğal infekte ve sağlıklı sığırlarda GSH-Px, G6PD, arginaz aktivitelerini incelemişler ve karaciğer ile diğer organlarda meydana gelen hasara bağlı olarak bozulan antioksidan savunma sistemi ile değişen biyokimyasal parametrelerin hastalığın patogenezinde rol oynadığını belirlemişlerdir. Sayın ve ark. (1999) Ankara yöresinden elde ettikleri *T. annulata* izolatlarının hücre kültürü üzerine çalışmışlardır. Sayın ve ark. (2000) değişik kökenli *T. annulata* izolatlarının virulansını karşılaştırmak ve atenuye şizont aşılarının değişik dozlarının etkinliğini belirlemek üzere deneysel infeksiyon oluşturmaya dayalı çalışmalar yapmışlardır. Aktaş ve Dumanlı (1999) çalışmalarında IFA testiyle sero-negatif olduğunu belirledikleri sığırlara *Theileria* şizont aşısı yaparak bir sene süresince her ay sığırların kanını piroplazm varlığı yönünden mikroskopik ve serolojik olarak incelemişlerdir. İnci ve ark. (2002b) Kayseri yöresinde yaptıkları çalışmayla Türkiye’de ilk defa olarak tropikal theileriosis’in ekonomik maliyetini ortaya koymuşlardır. Ayerdem ve ark. (2006) *T. annulata* ile doğal infekte sığırlarda infeksiyon ile monosit nitrik oksit düzeyleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla araştırma yapmışlardır. Türkiye’de bu konuda ilk defa yapılan bu çalışmada infeksiyon sırasında monositlerin nitrik oksit düzeyinin artış gösterdiğini saptamışlardır.

Türkiye’de sığırlarda *Babesia bigemina* ilk olarak 1890 yılında Nicolle ve Adilbey tarafından bildirilmiştir. Daha sonraları *B. bigemina*’yı Samuel ve Raif, İbrahim Ekrem, Lestoquard gibi araştırmacılar da bildirmiştir (Mimioğlu ve ark. 1969). Mikroskopik bakı ve serolojiye dayanan testler *Babesia* infeksiyonlarına yönelik araştırmalarda da uzun yıllar kullanılmıştır. Çakmak (1987) IFA testini kullanarak Ankara’da sığırlarda yaptığı çalışmasında *B. bigemina*’ya karşı antikor yaygınlığını %4,7, *B. bovis*’e karşı antikor yaygınlığını ise %9,7 oranlarında tespit etmiştir. Sayın ve ark. (1989) IFA testini kullanarak yaptıkları araştırmada Ankara yöresinde sığırlarda *B. bigemina* için %70,9, *B. bovis* için %32,2 seropozitiflik saptamışlardır. Dinçer ve ark. (1991) Karadeniz Bölgesi’nde yaptıkları çalışmada IFA testi kullanarak *B. bovis*’e karşı %46, *B. bigemina*’ya karşı %61, *B. divergens*’e karşı ise %75 oranında antikor bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma Türkiye’de *B. divergens*’in serolojik olarak bildirildiği ilk çalışmadır. İnci (1992) Ankara’nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis’in seroinsidensini IFA testi ve mikroskopik bakıyla karşılaştırmalı olarak araştırmış ve buna göre IFAT ile hayvanların %100’ünde *B. bigemina*’ya, %59’unda *B. bovis*’e özgün antikorlar saptamıştır. Araştırmacı mikroskopik olarak ise hayvanların %

18'inde *B. bigemina*, %9'unda ise *B. bovis* tespit etmiştir. Düzgün ve ark. (1992) 1986-1989 yılları arasında Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan sığır serumlarında ELISA testi ile *B. bovis* prevalansını %51,2 olarak saptamıştır. Eren (1993) 1990-1991 arasında Ankara ilinde sığırlarda mikroskopik bakıya ve IFA testine dayanan bir araştırma yapmış ve çalışmasında sığırların %49,2'sinde *B. bigemina*'ya, %10,4'ünde *B. bovis*'e karşı antikor tespit etmiş buna karşın mikroskopik bakıda yalnızca %2,09 oranında pozitiflik bulmuştur. İnci ve ark. (2002c) Kayseri yöresinde IFA testiyle incelediği 191 sığırın %23,03'ünde *B. bigemina*'ya, %1,04'ünde *B. bovis*'e ve %2,09'unda *B. divergens*'e karşı antikor bulmuştur. Aktaş ve ark. (2001b) IFAT ile Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde *Babesia* türlerinin sero-prevalansını araştırmıştır. Buna göre Elazığ'da incelenen serumların %31,9'unda *B. bigemina*, %1,4'ünde *B. bovis*, %3,5'unda *B. divergens*'e karşı; Malatya yöresinde incelenen serumların %7,1'inde *B. bigemina*, %0,6'sında *B. divergens*'e karşı; Tunceli yöresinde incelenen serumlarda ise %7,3'ünde *B. bigemina*, %0,6'sında *B. bovis* ve %1,2'sinde *B. divergens*'e karşı antikor saptanmıştır.

Theileria ve *Babesia* parazitlerinin teşhisine yönelik olarak moleküler çalışmalar da yapılmıştır. Tanyüksel ve ark. (2002) babesiosis teşhisinde PCR yöntemini ülkemizde ilk defa olarak kullanmışlardır. 1998-2000 yılları arasında topladıkları 464 sığır kanı ve kene ısırığı hikayesi olan 28 insandan alınan kan örneklerini mikroskopik bakı ve PCR yöntemiyle inceledikleri çalışmalarında insanlarda *Babesia* cinsine rastlamazken; sığırlarda *B. bovis*, *B. bigemina* ve *B. divergens* türlerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada *B. bovis* yaygınlığı Ankara, Burdur ve Samsun illerinde sırasıyla %12,68, %8, %3,85; *B. bigemina* Ankara ve Kayseri'de sırasıyla %8,45 ve %23,80; *B. divergens* ise yalnızca Samsun ilinde %3,37 oranlarında bulunmuştur. Vatansever ve Nalbantoğlu (2002) Ankara ili Polatlı ilçesinde nested PCR, IFAT ve mikroskopik bakı yöntemleriyle *Theileria annulata* yaygınlığını belirlemek üzere yaptıkları çalışmalarında sırasıyla %61,2, %44,9 ve %31,3 oranlarında prevalans saptamışlardır.

Türkiye'de uzun yıllar boyunca patojen olan *T. annulata* dışında iyi huylu theileriosis'e yol açan bir etken bulunduğu ve bu türün *T. mutans* olduğu sanılmıştır (Mimioğlu ve ark. 1971; Aktaş ve Altay 2004). Ancak daha sonra Afrika'da bulunan

gerçek *T. mutans*'ın Dünya'nın diğer yerlerinde *T. mutans* olarak bildirilen türden farklı olduğuna ilişkin kuvvetli deliller elde edilmiştir (Uilenberg 1983).

Türkiye'de sığırlarda *T. buffeli*'nin varlığı Reverse Line Blotting (RLB) tekniği kullanılarak ilk defa Vatansever ve ark. (2003a) tarafından Ankara'da ve İnci ve ark. (2003) tarafından Kayseri'de ortaya konmuştur.

İnci ve ark. (2003) Kayseri yöresinde 100 adet sığıra ait kan örneğini RLB metoduyla incelemişler ve 44 sığırdan *T. annulata*, 12 sığırdan ise *T. buffeli/orientalis* saptamışlardır. Vatansever ve ark.'nın (2003a) yaptığı araştırmada ise Ankara'da 10 ilçede 250 sığırın 124'ü RLB ile *Babesia/Theileria* pozitif bulunmuştur. Söz konusu çalışmada RLB ile *T. annulata*, *T. buffeli*, *B. bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens*'in yaygınlığı sırasıyla %41,6, %13,6, %5,2, %3,6, %3,2 olarak saptanmış, mikroskopik bakıda ise %29,6'sında *Theileria* ve %2,4'ünde *Babesia* piroplazmaları görülmüştür. IFAT ile ise *T. annulata* %28, *B. bigemina* %8,8, *B. bovis* %2,4 oranlarında pozitif bulunmuş; *B. divergens*'e karşı antikor saptanamamıştır.

İça (2004) Ankara bölgesi sığırlarında *Babesia* türlerinin prevalansını saptamaya yönelik olarak mikroskopik bakı, IFA ve RLB testlerini kullanmış ve bu metodların istatistiksel karşılaştırmasını yapmıştır. 300 sığır kan ve serumunu incelediği çalışmada mikroskopik bakı, IFA ve RLB testleri ile sırasıyla % 2,7, %9 ve % 10 pozitiflik saptamıştır. Bu çalışmada RLB sonuçlarına göre 300 hayvanın 10 tanesi *B. bovis*, 15 tanesi *B. bigemina* ve 8 adedi de *B. divergens* taşıyıcısıdır.

İça ve ark. (2007a) Kayseri yöresi sığırlarında görülen *Theileria* ve *Babesia* türlerinin araştırılması amacıyla RLB ve mikroskopik bakı yöntemlerini kullanmıştır. Mikroskopik bakıyla incelenen 337 sığır kan örneğinin %15,1'i *Theileria spp.* ve *Babesia spp.* yönünden pozitif bulunmuştur. RLB yöntemiyle ise hayvanların %18,1'inin *T. annulata*, %0,9'unun *T. buffeli/orientalis* taşıyıcısı olduğu saptanmıştır.

İça ve ark. (2007b) Kayseri yöresinde sığırları enfeste eden kene türlerinin ve bu kenelerde bulunan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin saptanmasına yönelik olarak 300 sığırdan ve bu sığırların barınaklarından 1160 adet ixodid kene toplamışlardır. Kenelerin tür identifikasyonu yapılmış ve buna göre *Boophilus annulatus* (%26,37), *Hyalomma marginatum marginatum* (%21,12), *Rhipicephalus turanicus* (%18,7) en yaygın türler bulunmuş, diğer türler yaygınlık sırasıyla *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Haemaphysalis parva*, *Hyalomma detritum detritum*, *Hyalomma a.*

excavatum, *Rhipicephalus bursa*, *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis sulcata* ve *Rhipicephalus sanguineus* olarak saptanmıştır. Toplanan keneler türlerine göre ayrılarak 43 adet kene havuzu oluşturulmuş ve her bir havuz RLB testi ile *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı yönünden incelenmiştir. 43 havuzun 6 tanesinde *B. bigemina*, 4 tanesinde *T. annulata*, 1 tanesinde *Babesia sp.* ve 1 tanesinde ise *T. annulata* ve *B. bigemina* ile miks infeksiyon saptanmıştır. RLB testi ile *Babesia sp.* olduğu görülen DNA örneğinin sekans analizinin yapılmasıyla birlikte Türkiye’de bilinen *Babesia* türlerinden farklı yeni bir türün var olduğu ortaya konmuştur. Genbank erişim numarası *Babesia sp.* (Kayseri 1) EF434786 olarak kaydedilen bu yeni *Babesia* türü *Hyalomma marginatum marginatum*’dan izole edilmiş olup Çin’de *Hyalomma* cinsi kenelerden izole edilen Kashi 1 ve Kashi 2 *Babesia sp.* ile ve yine *Babesia orientalis* ile filogenetik yakınlık göstermektedir.

Dumanlı ve ark. (2005) Elazığ, Malatya, Bingöl, Muş, Van, Erzincan, Erzurum, Kars, Adıyaman, Diyarbakır, Şanlıurfa il ve ilçelerinde 1500 civarı sığırdan PCR, IFA testleri ve mikroskopik bakı ile sırasıyla %37,8, %34,9 ve %19,7 oranlarında *T. annulata* yaygınlığı bildirmişlerdir.

Aktaş ve ark. (2006) Doğu Anadolu Bölgesi’nde *Theileria annulata* ve iyi huylu theileriosis etkenlerinin (*Theileria sergenti/buffeli/orientalis*) yaygınlığını belirlemek üzere 2004 yılında 252 kan örneğini PCR ile incelemiştir. Bu örneklerde *Theileria annulata*’nın oranı 39% (99/252) ve iyi huylu theileriosis etkenlerinin oranı 7% (18/252) bulunmuştur.

Trakya yöresinde sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin dağılımı üzerine yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Tüzer 1980, Alp 1993, 1995, Alp ve Güvenen 2001). İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda mikroskopik bakıya dayalı olarak *T. mutans* olarak kabul edilen paraziti görüldüğü bildirilmiş (Tüzer 1980); ancak daha sonra bu parazitin *T. mutans* olamayacağının anlaşılmasından sonra, *T. buffeli/orientalis* yönünden bir araştırma yapılmamıştır. Aynı çalışmada *T. annulata*’nın yaygınlığı %20,7, *T. mutans* sanılan etkenin yaygınlığı %14,06 olarak bulunmuş; tarama yapılan hayvanlarda *Babesia* türlerine rastlanmamasına karşın, klinik belirti gösteren 112 sığırdan 39’unda (%34,82) *B. bovis*, 14’ünde (%12,5) *B. bigemina* ve 15 hayvanda (%13,39) *T. annulata* saptanmıştır. İstanbul’da ELISA yöntemiyle *B. bovis* yaygınlığı araştırılmış ve antikorlar %29,9 oranında bulunmuştur (Alp 1993). İstanbul’da IFAT ile

T. annulata yaygınlığını belirlemek üzere yapılan çalışmada parazite karşı antikor oranı %18 bulunmuştur (Alp 1995). Son olarak Alp ve Güvenen (2001) Tekirdağ ilinde IFA testiyle inceledikleri 426 adet sığır serumunun %13,4'ünün *T. annulata*'ya, %9,9'unun *B. bovis*'e karşı antikor taşıdığını tespit etmişlerdir.

Trakya Bölgesi'nde *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının sığırlardaki yayılımı üzerine az sayıda araştırma bulunmasına karşın bu infeksiyonların kenelerde yayılımı bugüne dek incelenmemiştir. Gülanber (1996) Trakya Bölgesi'nde kene türlerinin yayılımı üzerine yaptığı doktora çalışmasında *Boophilus annulatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. bursa*, *Hyalomma marginatum* ve *H. anatolicum excavatum* türlerinin bulunduğunu; türlerin sığırlardaki yayılımın oranlarını da sırasıyla %7,79, %4,52, %3,46, %0,97 ve %0,19 olarak belirtmiştir. Mimioğlu (1954) ise *Haemaphysalis punctata*'nın da bölgede mevcut olduğunu bildirmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmada 2004, 2005 ve 2006 yaz aylarında Trakya yöresini temsil edecek şekilde 20 farklı ilçede 77 farklı yerleşim yerinde meraya çıkmış 230 sığır tesadüfi olarak seçilmiştir (Tablo 3.1, Tablo 3.2). Hayvanların yaş ve cinsiyetleri, klinik semptom varsa bu semptomlar kaydedilmiştir. Hayvanların vena jugularis'inden 10 ml steril vakumlu ve EDTA (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) içeren tüplere kan alınmış ve kan örnekleri buz kutuları içinde laboratuvara getirilmiştir.

Kan örneği alınan sığırların yaşları bir ile 13 arasındadır. Hayvanlara ait bilgiler hayvan sahiplerinden öğrenildi. Çalışmada erkek hayvana her yaş grubunda rastlanamazken, genç hayvanlar arasında erkek hayvanlar bulundu. Hayvanların yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 3.3'te verilmiştir.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Kan örneklerinden DNA izolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyonu ticari kit (Biotechnology Department Bio Basic Inc, Kanada firmasına ait EZ-10 Spin Column Blood Genomic DNA Minipreps Kit BS483 (1 adet) ve BS484 (2 adet)) kullanılarak yapıldı. Kitlerin içeriği aşağıdaki gibidir:

<u>İçindekiler</u>	<u>BS483, 50 Preps</u>	<u>BS484, 100 Preps</u>
TBP Buffer	120 ml	2x120 ml
TBM Buffer	25 ml	50 ml
TE (pH 8.0)	15 ml	30 ml
Proteinase K	2 mg	4 mg
Yıkama Solüsyonu	12 ml	24 ml
Elution Buffer	5 ml	10 ml
EZ-10 Column	50 adet	100 adet
2.0 ml Toplama Tüpü	50 adet	100 adet

Kitle birlikte ayrıca teslim edilen 2 mg ve 4 mg'lık vidalı kapaklı tüplerdeki Proteinase K enzimi içine sırasıyla 150 µl ve 300 µl steril su ilave edilerek -20° C'da muhafaza edildi. 12 ml ve 24 ml ambalajda gelen yıkama solüsyonu içine ise

kullanımdan önce sırasıyla 96 ml ve 48 ml %100 etanol ilave edildi. Proteinase K enzimi dışında tüm bileşenler oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Kan örneklerinden DNA izolasyonu firmanın önerdiği yöntemle aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Kan tüpleri vortexle (Boeco, Almanya) hafifçe çalkalandıktan sonra içinden pipetle (Nichiryo, Japonya) 0.5 ml kan alınarak 1.5 ml'lik steril DNase-free ependorf tüplerine (Axygen, Amerika) aktarıldı. Ependorf tüpleri 3000 rpm devirde 3 dakika süreyle santrifüje (CLP model 3410, Amerika) edildikten sonra üst sıvı döküldü.
2. Ependorf tüplerinin içine 0.8 ml TBP tamponu katılarak vortexle hafifçe karıştırıldıktan sonra 3000 rpm devirde 3 dakika süreyle santrifüje edildi ve üst sıvı döküldü.
3. İkinci maddede yapılan işlem tekrarlandı. Tüplerin dibindeki tortunun soluk pembe-mor renge döndüğünden emin olduktan sonra 4 numaralı işleme geçildi.
4. Tüplerin içine 0.5 ml TBM buffer konarak maximum devirde vortexlendikten sonra 3 µl Proteinase K enzimi ilave edilerek 55° C'da 30 dakika süreyle inkubasyona (Major-Science dry bath MD02N, Amerika) bırakıldı.
5. İnkubasyon sonucunda çözünmemiş materyal kalmış olması ihtimaline karşı tüpler 5000 rpm devirde 2 dakika santrifüje edilerek olası tortunun dibe çökmesi sağlandı. Üst sıvı yeni ve temiz ependorf tüplerine aktarılarak her bir tüpe 260 µl absolut etanol ilave edildi.
6. Karışım 2.0 ml'lik toplama tüpü içine yerleştirilen EZ-10 kolonlarına aktarıldıktan sonra 8000 rpm devirde 1 dakika santrifüje edilerek toplama tüpünde biriken sıvı döküldü.
7. Kolonlara 500 µl yıkama solüsyonu konularak 8000 rpm devirde 1 dakika santrifüje edildi.
8. Yedinci maddede yapılan işlem tekrar edildi.
9. Toplama tüpünde biriken sıvı boşaltılarak yıkama solüsyonunu mümkün olduğunca uzaklaştırmak amacıyla tüpler 8000 rpm devirde 1 dakika süreyle daha santrifüje edildi.

10. Toplama tüpleri atılarak kolonlar temiz 1,5 ml'lik ependorf tüpleri içine yerleştirildi. Her bir kolona içindeki membranı ortalamaya dikkat ederek 40 µl “elution buffer” konuldu ve 50 °C’da 2 dakika süreyle inkubasyona bırakıldı.
11. 10 000 rpm devirde 1 dakika süreyle santrifüje edilerek kolon membranında bulunan DNA’ların “elution buffer” ile birlikte ependorf tüpüne toplanması sağlandı.

Elde edilen DNA örnekleri kullanıma kadar -20 °C’da saklandı.

3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Optimizasyon

3.2.2.1. Primerlerin Seçimi

Çalışmada Georges ve ark. (2001) tarafından bildirilen ve *Theileria* ve *Babesia* cinslerinin 18S ssu rRNA’da (small subunit ribozomal RNA) bulunan V4 bölgesini amplifiye eden genel primerler kullanıldı. RLB işlemi için primer dizilerinden bir tanesi (reverse primer) biotinle işaretlendi. Çalışmada kullanılan forward primer (RLB-F2) ve reverse primer (RLB-R2) dizilimleri aşağıdaki gibidir:

RLB-F2 (5' -GACACAGGGAGGTAGTGACAAG -3')

RLB-R2 (5' biotin -CTAAGAATTTACCTCTGACAGT -3')

Primerlerin sentezi Biosearch firması tarafından Kanada’da yapıldı ve liyofilize halde teslim edildi. Her primer için firmanın önerdiği miktarlarda bi-distile DNase ve RNase free steril su kullanılarak, konsantrasyon 100 pmol/µL olacak şekilde sulandırıldı. PCR işlemleri süresince primerleri tekrarlı dondurup çözündürmenin zararlarından korumak ve PCR karışımı hazırlarken kolaylık olması amacıyla; hazırlanan primer karışımı önce vortexlendi, arkasından 10 saniye kadar santrifüje edildikten sonra steril ependorf tüplerine bölünerek 10 misli sulandırıldıktan sonra stok primer karışımları hazırlandı. Stok karışımlar kullanıma kadar -20°C’da muhafaza edildi ve kullanım aşamasında ise çözündükten sonra kısa süreli kullanımlar için tekrar dondurulmayıp +4°C’da saklandı.

3.2.2.2. Pozitif ve negatif kontrol

Amplifikasyon işlemlerinde pozitif kontrol olarak Doç. Dr. Tülin İlhan Karagenç* tarafından sağlanan *Theileria annulata* ve *Babesia bovis* izolatları; negatif kontrol olarak ise distile su kullanıldı.

3.2.2.3. PCR Karışımı ve Amplifikasyon Koşulları

Amplifikasyon amacıyla Bioron firmasınca sağlanan PCR kiti (BR101005, Kanada) kullanıldı. Kit içeriği aşağıdaki gibidir:

Taq Polymerase Storage and dilution buffer: 5000 ünite/ml

10 mM K-phosphate bufffer, pH 7.4, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol, 0.1% Triton X-100, 0.1% Tween-20.

Reaction buffer (x10) incomplete: 1 ml

160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM TrisHCl pH 8.8, 0,1% Tween-20

MgCl₂ : 1 ml, 100 mM

İlave olarak RLB-F2, RLB-R2 primerleri ve Deoksinükleotid karışımı.

PCR reaksiyonu için Georges ve ark. (2001) ve Gubbels ve ark. (1999) tarafından bildirilen miktarlar baz alınarak 50 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. Optimizasyon amacıyla farklı konsantrasyonlar ve farklı reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen PCR işlemleri sonucunda bazı adaptasyonlara gidildi.

PCR karışımı için 50 µl reaksiyon sıvısında, 5 µl 10X Reaction buffer, 6 µL (3mM) MgCl₂ , RLB-F2 ve RLB-R2 primerlerinin her birinden 5 µl (50 pmol), 0.375 µl deoksinükleotid karışımı (75 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.25 µl Taq Polymerase (1.25 u), 23.375 µl ultra saf su ve 5 µl DNA örneği olacak şekilde 200 µl'lik DNase RNase free PCR tüplerine (Axygen, Amerika) konuldu.

PCR tüpleri PCR cihazına (Thermo Hybaid PX2 Thermal Cycler) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutuldu. Amplifikasyon koşulları Gubbels ve ark. (1999)'nın bildirdiği şekilde uyarlandı. Buna göre PCR programı 94°C'de 1 dakika denatürasyonu takiben 50°C'da 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1.5 dakika uzama olmak üzere toplam 40 döngü üzerinden yapıldı. Son döngüyü takiben 72°C'de 10 dakikalık bekleme yapıldı ve tüpler cihazdan alınana kadar +4°C'da tutuldu.

* Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fak., Parazitoloji ABD, Aydın

3.2.3. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile İncelenmesi

PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla horizontal jel elektroforez yapıldı. 1XTAE buffer (Tris-acetate-EDTA) içinde %2 oranında agarose (A5093-100G-Sigma, Almanya) ısı ile çözündürülerek hazırlanan jelin soğumasına yakın % 0,1 oranında Ethidium Bromide eklendikten sonra elektroforez tankına döküldü. Tank içine taraklar yerleştirilerek jel katılaşmaya kadar beklendi. Jel hazır olduktan sonra taraklar uzaklaştırılarak jel tankı elektroforez tankının (Apollo) içine yerleştirildi ve tank 1 X TAE buffer ile dolduruldu.

Pozitif ve negatif örnekler de dahil olmak üzere PCR ürünlerinin 9 µl'si 1,5 µl loading buffer (SM0241-Fermentas, Litvanya) ile karıştırılarak jel kuyularına yüklendi ve 90 V elektrik akımında yaklaşık 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Jele örnekler yanısıra 100 bp DNA ladder (SM0241-GeneRuler, Fermentas) da yüklendi ve elektroforez sonucunda jeldeki örnekler transilluminatör cihazında (Spectroline transilluminator Select series, Kanada) UV ışığı altında incelendi.

PCR ürünlerinin elektroforezde kullanılmayan kısımları RLB işleminde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.4. Reverse Line Blotting (RLB)

Reverse line blotting işlemleri Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji A.B.D.'nda gerçekleştirildi. RLB işleminden sonuç alınamaması üzerine bir dizi deney ve denemeden sonra DNA ürünlerinin amplifikasyonunda kullanılan Biosearch firmasının sentezlediği RLB-R2 primerlerinin biotin ile işaretlenmesinin iyi yapılmadığı tespit edildi. Farklı firmaların sentezlediği biotin işaretli primerlerin RLB'de performanslarının farklı olabildiği, Doç.Dr.Zati Vatansever* tarafından da belirtildi. Bunun üzerine gidilen Anabilim Dalı'nda var olan ve çalışmalarımı gözetiminde yaptığım Yrd. Doç. Dr. Anıl İça'nın** ürünlerini sorunsuz kullandığı MWG (Almanya) firmasının ürettiği malzemeler kullanılarak tüm PCR işlemleri yeniden yapıldı.

* İkinci tez danışmanı, Ankara Üniv. Veteriner Fak.Parazitoloji ABD, Ankara.

** Erciyes Üniv. Veteriner Fak. Parazitoloji ABD, Kayseri

Reverse Line Blotting Prensibi

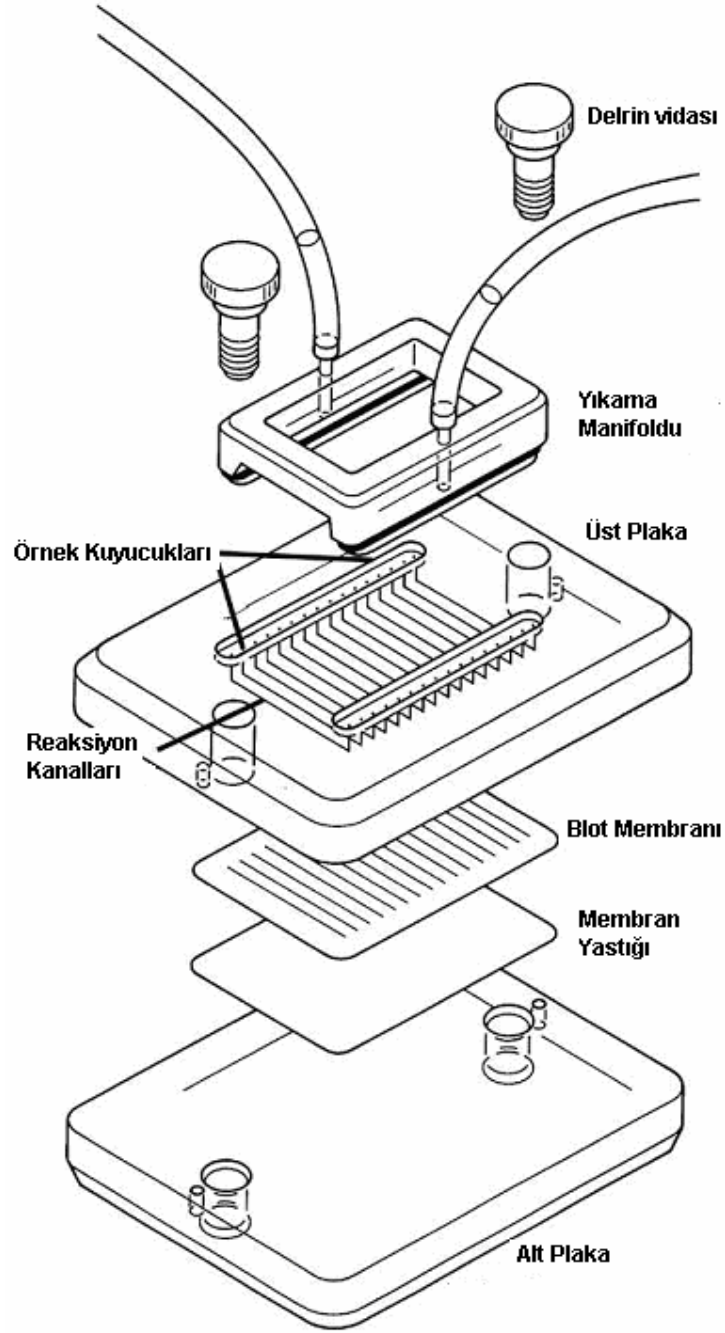
Reverse Line Blotting tekniği, 18S ve/veya 16S rDNA bölgelerinin amplifikasyonu ve elde edilen ampikonların daha önceden bir membrana kovalent olarak bağlanmış tür spesifik problarla hibridizasyonu esasına dayanır. Problar membranda farklı sıralara dizilmiş olup, her bir ampikonun aynı anda tüm problarla karşılaşması yönüyle de birden fazla etkene ait gen dizilimlerinin eş zamanlı tanısını ve ayrımını sağlar. Test başlıca 4 aşamadan oluşmaktadır (Biotech 2004, Gubbels 1999, Vatansever ve ark. 2003b):

1-Genel PCR: Bu aşamada kullanılacak primerler aranacak parazitlerin ortak 16S veya 18S ssrDNA bölgesinden bir DNA parçasını amplifiye edecek şekilde seçilir. Reverse primer biotinle işaretlenmiştir. PCR sonucunda elde edilen ürünler, aranacak parazitlerin tümünde ortak olan DNA bölgesi ürünlerini içermektedir.

2-Probların membrana bağlanması: Genel primerlerle amplifiye edilen bölge içinden her parazite özgü problar seçilmekte ve bunlar 5' uçlarında amino grubu içerecek şekilde sentezlettirilmektedir. Oligonükleotidler (Problar) miniblotter (Şekil 3.1) tanklarındaki oluklara ayrı ayrı dökülerek Biodyne-C membrana kovalent olarak bağlanması sağlanmaktadır.

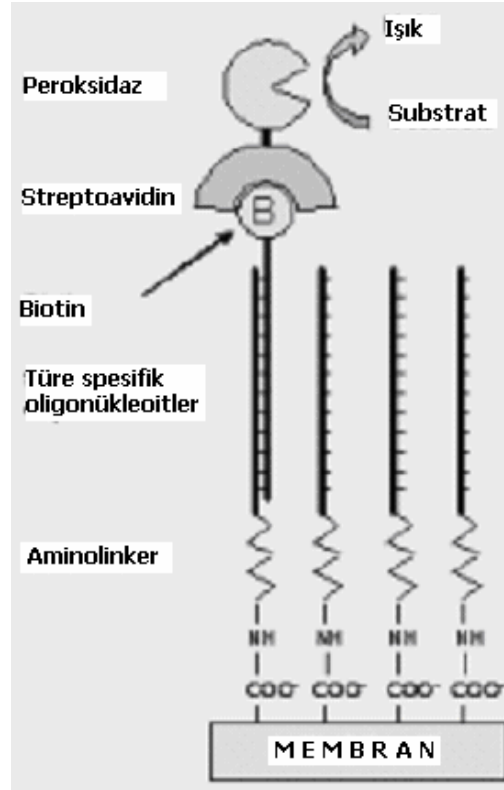
3-PCR ürünleri ile probların hibridizasyonu: Membran, daha sonra tanktaki oluklarla dik aç yapıacak şekilde döndürülür. Biotin işaretli primerlerle amplifiye edilen PCR ürünleri denatüre edilerek tankın oluklarına dökülür ve membrana sabitlenmiş aminolinkerlı oligonükleotidlerle (problarla) hibridizasyonu sağlanır (Şekil 3.2).

4-Sonuçların görüntülenmesi: Membran yıkandıktan sonra peroxidase ile işaretlenmiş streptavidinle muamele edilerek streptavidin-biotin kompleksinin oluşması sağlanır. Oluşan kompleksin görünür hale gelmesi için membran son olarak ECL (electrochemiluminescence) belirteciyle muamele edilir ve oluşan reaksiyon (Şekil 3.3) karanlık bir ortamda hyperfilm'e aktararak banyo edilir.



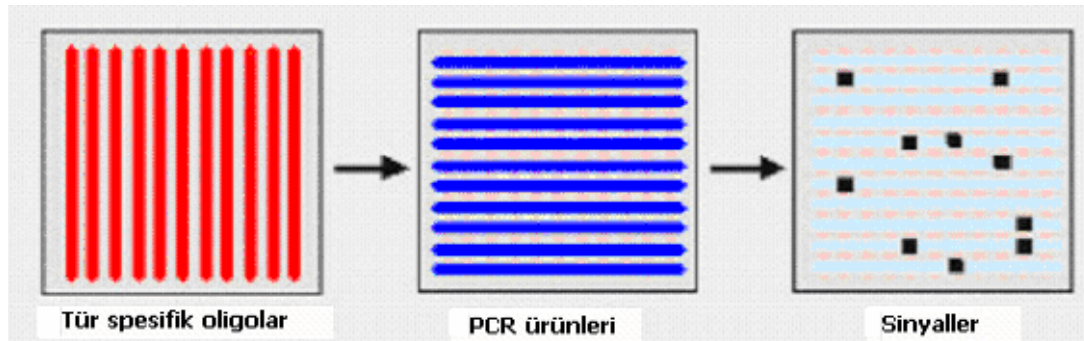
Şekil 3.1: Miniblotter (Immunetics Inc.^{*})

^{*} <http://www.immunetics.com/products/miniblotters/partsdiagram.htm>



Şekil 3.2: Şematik olarak hibridizasyonun prensibi (Biotech 2004)

Sırasıyla propların membrana, biotininle işaretli PCR ürünlerinin proplara, peroksidazla işaretli streptavidinin biotine bağlanması ve ECL ilavesinde ışık oluşması



Şekil 3.3: Şematik olarak RLB membranında prob ve amplikon dizilimleri ve pozitif sinyaller (Biotech 2004)

RLB problemlerinin seçimi

Georges ve ark. (2001) tarafından bildirilen *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *T. annulata* ve *T. orientalis* için spesifik oligonükleotid dizileri, yanısıra hem *Babesia* hem de *Theileria* cinslerini birlikte tanıyan bir “catch-all” dizi kullanıldı. Oligonükleotidler negatif yüklü Biodyne C membrana (PL60314-Pall Biosupport group, İngiltere) kovalent olarak bağlanabilmesi amacıyla 5’ ucunda amino grubu [N-terminal N-trifluoroacetamidohexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl phosphoramitide (TFA)-C6 aminolinker] içerecek şekilde özel bir firmaya sentez ettirildi (MWG1-0,2-MWG, Almanya).

Prob dizilimleri aşağıdaki gibidir:

<u>Özgül Olduğu Tür</u>	<u>5’ –3’ Dizilimleri</u>
<i>B. divergens</i>	GTTAATATTGACTAATGTTCGAG
<i>B. bovis</i>	CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG
<i>B. bigemina</i>	CGTTTTTCCCTTTTGTGG
<i>B. major</i>	TCCGACTTTGGTTGGTGT
<i>T. annulata</i>	CCTCTGGGGTCTGTGCA
<i>T. buffeli / orientalis</i>	GGCTTATTTTCGWTTGATTTT
<i>Catch-all</i>	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG

RLB işlemleri Gubbels ve ark. (1999), Georges ve ark. (2001) ile Mokrousov ve Narvskaya (2004)’nın bildirdiği yöntemlere göre yapıldı.

RLB membranının hazırlanması

1. Oligonükleotid probeları 500 mM NaHCO₃ (pH 8,4) kullanılarak optimum konsantrasyon için 50-1500 pmol/150 µl oranları arasında sulandırıldı.
2. Biodyne-C membran taze hazırlanmış 10 ml %16’lık EDAC (1-etil-3 dimetilaminopropil karbodimin, demineralize suda) (E7750-Sigma, Almanya) içinde 10 dakika aktive edilerek oda ısısında plastik bir kap içinde inkübe edildi.
3. Membran su ile yıkandıktan sonra forsepsler kullanılarak miniblotterın (MN45 Immunetics, Cambridge) yastığı üzerine yerleştirildi. Miniblotterın üst kapağı

membran üzerine konarak vidalarını sıkmak suretiyle membran sabitlendi. Manifold yardımıyla membran üzerinde kalan fazla su slotlardan vakumlanmak suretiyle uzaklaştırıldı.

4. Slotlar pipet kullanılarak 150 µl sulandırılmış oligonükleotid solüsyonu ile doldurularak problemlerin hibridizasyonu sağlandı. Bu işlem sırasında ilk ve son slotların boş kalmasına özen gösterildi. Söz konusu iki slotta 2X SSPE buffer (AI0806-Amresco, U.S.A) ile 1:100 oranında sulandırılmış mürekkep doldurularak RLB uygulamaları sırasında membranın düzgün yerleşmesini temin amacıyla membran işaretlendi.
5. Tüm problemler, oda ısısında 1-2 dakika inkübe edildikten sonra oligo solüsyonları pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
6. Miniblotterin kapağı açılarak membran pens yardımıyla uzaklaştırıldı ve 10 dakikadan uzun olmamak şartıyla inaktive etmek için 100 mM NaOH'de (AI0583-Amresco, U.S.A) inkübe edildi (10 dakikadan fazla süren inkübasyon zayıf sinyal hibridizasyonuna sebep olmaktadır).
7. Membran daha sonra 60°C'da 5 dakika 2X SSPE/0.1 SDS karışımında yıkandı (Techne Hybridiser HB-1D).
8. 20 mM EDTA içinde önce oda ısısında bekletildi ve kullanıma kadar +4°C'da muhafaza edildi.

Reverse Line Hibridizasyonu

1. 40 µl PCR ürünü bulunan PCR tüplerine 110 µl 2XSSPE/0.1SDS ilave edildi. (SDS: AI0227- Amresco, U.S.A)
2. Pozitif ve negatif kontrollerin de dahil olduğu sulandırılan örnekler 100°C'da 10 dakika denatüre edilerek sürenin bitiminde hemen buz üzerine alınarak aniden soğutuldu.
3. Membran oda ısısında, sallanan bir platformda 2XSSPE/0.1 SDS ile 5 dakika inkübe edildi.
4. Membran oligonükleotid uygulanan yönüne 90° açı yapacak şekilde miniblottera yerleştirildi. Mürekkeple işaretlenmiş hattın numara hattının altında olmasına dikkat edildi.

5. Miniblotterın üst kapağı membran üzerine konarak vidalarını sıkmak suretiyle membran sabitlendi. Manifold yardımıyla membran üzerinde kalan fazla su slotlardan vakumlanmak suretiyle uzaklaştırıldı.
6. Bir pipet yardımıyla hava kabarcığı oluşmamasına dikkat ederek sulandırılmış PCR ürünleri slotlara dolduruldu. Miniblotter slotlar arasında geçiş olmaması için hiç sallanmadan inkübatöre yerleştirildi ve düz bir zeminde ve 42°C’da 1 saat hibridizasyona bırakıldı.
7. Miniblotter inkübatörden çıkarıldı ve örnekler pipetle aspire edilerek uzaklaştırıldı.
8. Membran pensle alınarak 52°C’da 2XSSPE/0.5SDS’de 2 defa onar dakika yıkandı.
9. Membran 42°C’da 30 dakika 10 ml Horseradish peroksidazla işaretlenmiş streptavidin konjugatı (S5512-Sigma, Almanya) ile inkübe edildi. Konjugat kullanmadan önce 2XSSPE/0.5SDS’de 1:4000 oranında sulandırıldı.
10. Membran 42°C’da 2XSSPE/0.5SDS’de 2 defa 10’ar dakika yıkandı.
11. Membran oda ısısında 2XSSPE’de 2 defa 3-5’er dakika yıkandı.
12. Yıkama işlemleri sonunda membran 10 ml (her şişeden 5’er ml) ECL tespit sıvısı (BI20-500-120-Biological Industries, İsrail) ile 1 dakika muamele edildi.
13. Membran arada hava kabarcığı olmayacak şekilde iki asetat arasına yerleştirildi.

RLB Ürünlerinin İncelenmesi ve Türlerin Tayini

Karanlık bir odada asetatın üstüne ECL hyperfilm (ALRPN2106-Amersham Biotech, U.S.A) yerleştirildi ve sinyal yoğunluğuna göre 30 saniye ile 1 saat arasında bekletildi. Bir dakikalık süre genellikle yeterli olmakla birlikte banyo sonucuna göre asetatın üstüne yeni film konarak çekimler tekrarlandı ve banyo süresi ayarlandı. Banyo edilen filmin üzerinde streptavidin-biotin kompleksinin varlığı durumunda probe ve PCR ürünleri sıralarının kesiştiği yerlerde oluşan siyah lekeler, o parazit türü için pozitif kabul edildi.

Çalışma tamamlandıktan sonra pozitif örnekler kullanılarak son bir RLB işlemi yapıldı ve membran, jel görüntüleme sistemi (Syngene GeneGenius Bio Imaging System) kullanılarak fotoğraflandı.

Biodyne C Membranın Temizlenmesi ve Saklanması

Tüm işlemler bittikten sonra membranı temizlemek ve sadece oligonükleotidleri membranda bırakmak için membran 90°C’da %1 SDS’de 2 defa 30’ar dakika; takiben 20 mM EDTA ile 15 dakika inkübe edildi.

Biodyne C membran daha sonra yeniden kullanılıncaya kadar, içinde 20 mM EDTA bulunan plastik bir kap içinde ve +4°C’da saklandı.

3.3. İstatistik

Daha önce yapılan çalışmaların (Tüzer 1980, Alp 1993, 1995, Alp ve Güvenen 2001) bulgularına göre *T. annulata*’nın yaygınlığı %21’in, eskiden *T. mutans* sanılan etkenin yaygınlığı %15’in, *B. bovis*’in yaygınlığı %30’un altında olduğundan; *B. bigemina* ise *B. bovis*’e göre daha az sayıda hayvanda görüldüğünden, tahmini yaygınlık aranacak bütün parazitler için %30 olarak öngörülmüş ve $\pm$ %5 mutlak kesinlikle %90 güven limitini sağlamak üzere en az 227 sığır (Thrusfield 1986) üzerinde çalışılması hedeflenmiştir.

Çeşitli yaş gruplarında *Theileria* ve *Babesia* türlerine ait RLB bulgularının karşılaştırılması amacıyla Pearson ki-kare testi kullanıldı (SPSS, 9.0).

Prevalans oranlarının güven aralıkları modifiye Wald metoduna (Agresti ve Coull 1998) göre “QuickCalcs online Calculators for Scientists”^{*} ile hesaplandı.

3.4. Gereç ve Yöntem Bölümünde Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.4.1. Cihazlar

1. Pipetler (Nichiryo, Japonya)
2. Vortex (Boeco, Almanya)
3. Thermoblock (Major-Science dry bath MD02N, Amerika)
4. Mikrosantrifüj (CLP model 3410, Amerika)
5. Thermal cyclers (Thermo Hybaid PX2)
6. Horizontal elektroforez (Apollo Instrumentation MD 75.710)
7. Güç Kaynağı (Labnet power station 300, Kanada)

^{*} Graphpad Software, QuickCalcs online Calculators for Scientists. Erişim 15.01.2007, <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>

8. Transillüminatör(Spectroline transilluminator Select series, Kanada)
9. Miniblotter (MN45 Immunetics, Cambridge)
10. Hibridizasyon fırını (Techne Hybridiser HB-1D)
11. Jel görüntüleme sistemi (Syngene GeneGenius Bio Imaging System)

3.4.2. Solüsyonların hazırlanması

10 X TAE buffer (Tris-acetate-EDTA) hazırlanması (3 L için)

145.2g Tris base

60mL 0.5M EDTA pH 8.0

34.26mL Glacial Acetic Acid

HCl ile pH 7.6-7.8 olacak şekilde ayarlanır ve distile su ile 3000mL'ye tamamlanır.

500 mM NaHCO₃ (pH 8,4) hazırlanması

42,005g NaHCO₃

Distile su ile 1000mL'ye tamamlanır.

%16 EDAC EDAC (1-etil-3 dimetilaminopropil karbodimin) hazırlanması

1,6g EDAC distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.

20 X SSPE (3M NaCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA) hazırlanması

350.7g NaCl

55.2g NaH₂PO₄(H₂O)

14.89g EDTA

2000mL'ye tamamlanır. Kaynatılarak çözünme sağlanır, oda ısısına soğuyunca NaOH ile pH 7.0 olacak şekilde ayarlanır.

10 X SDS (sodium dodecyl sulphate) hazırlanması

SDS 100g

Distile su ile 1000mL'ye tamamlanır.

2 X SSPE/0.1 SDS

100 ml 20X SSPE

10 ml 10 % SDS

2 ml 0.5 M EDTA

Distile su ile 1 Litre'ye tamamlanır.

2 X SSPE/0.5SDS

100 ml 20X SSPE

50 ml 10 % SDS

2 ml 0.5 M EDTA

Distile su ile 1 Litre'ye tamamlanır.

Tablo 3.1: Çalışmada örnek alınan il, ilçe, yerleşim yerleri

İl	İlçe	Yerleşim yeri (Mahalle, Nahiye, Köy)
Edirne	Merkez	Merkez, Yıldırım mah, Çatma, Elçili, İskenderköy, Kemalköy, Korucuköy, Sazlıdere, Ulgaç, Yolüstü
	Enez	Merkez, Karacahalil
	İpsala	Balabancık, Hacı beldesi, Pazardere, Tevfikiye
	Keşan	Akhoca, Beyköy, Danişment, Erikli, İzzetiye, Koruklu, Kozköy, Orhaniye
	Lalapaşa	Büyünnü, Çatma, Hanzabeyli, Ortakçı, Sinanköy, Süleymandanişment
	Süloğlu	Arpaç, Kerametli, Tatarköy
	Uzunköprü	Çöpköy, Malkoç, Saklı Malkoç, Sığırcalı
	7 İlçe	37 Yerleşim yeri
İstanbul	Çatalca	Halaşlı
	Silivri	Beyciler, Büyükçavuşlu
	2 İlçe	3 Yerleşim yeri
Kırklareli	Merkez	Çeşmeköy, İnece, Ürünlü
	Babaeski	Merkez, Çiğdemli, Ertuğrul, Kuleli, Kuzuçardağı, Mandıra, Nadırlı, Oruçlu
	Demirköy	Merkez, Yenimahalle, Boztaş, İğneada-Limanköy, Sivrilere, Yeşilceköy,
	Kofçaz	Beyci, Devletiağaç, Karaabalar, Malkoçlar,
	Pınarhisar	Evciler, Kaynarca, Kurudere
	5 İlçe	24 Yerleşim yeri
Tekirdağ	Çerkezköy	Kızılpınar, Veliköy
	Hayrabolu	Yurtbekler-Karacakılavuz
	Malkara	Gözsüz, İbrice, Karacahalil, Sarnıç,
	Muratlı	Arzulu, Ballıhoca, Yukarısirt
	Saray	Büyükyoncalı, Küçükyoncalı
	Şarköy	Yayaağaç
	6 İlçe	13 Yerleşim yeri
4 İl	20 İlçe	77 Yerleşim yeri

Tablo 3.2: Örnek alınan sığır sayısı ve illerdeki sığır mevcutları

İl	İlçe	Örnek alınan	Toplam	İl mevcudu
Edirne	Merkez	17	67	173 704
	Enez	4		
	İpsala	8		
	Keşan	9		
	Lalapaşa	14		
	Süloğlu	10		
	Uzunköprü	5		
İstanbul	Çatalca	8	16	74 550 (149 099 / 2)
	Silivri	8		
Kırklareli	Merkez	19	81	126 423
	Babaeski	17		
	Demirköy	15		
	Kofçaz	20		
	Pınarhisar	10		
Tekirdağ	Çerkezköy	4	66	160 343
	Hayrabolu	16		
	Malkara	17		
	Muratlı	14		
	Saray	7		
	Şarköy	8		
4 İl	20 İlçede	230	230	535 020

Tablo 3.3: Örnek alınan sığırların cinsiyetlerine ve yaşlarına göre sayıları

Yaş	Dişi	%	Erkek	%	Toplam
1 yaş	9	50	9	50	18
1,5 yaş	10	33,33	20	66,67	30
2 Yaş	17	85	3	15	20
2,5 Yaş	6	85,71	1	14,29	7
1-2,5 yaş Toplam	42	56	33	44	75
3 Yaş	27	100		0	27
3,5 Yaş	6	100		0	6
4 Yaş	41	100		0	41
5 Yaş	42	100		0	42
5,5 Yaş	4	100		0	4
6 Yaş	16	100		0	16
6,5 Yaş	1	100		0	1
7 Yaş	11	100		0	11
7,5 Yaş	1	100		0	1
8 Yaş	1	100		0	1
9 Yaş	2	100		0	2
10 Yaş	1	100		0	1
12 Yaş	1	100		0	1
13 Yaş	1	100		0	1
3-13 Yaş Toplam	155	100	0	0	155
Genel Toplam	197	85,65	33	14,35	230

4. BULGULAR

4.1. PCR ve RLB sonuçları

Çalışmada *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı, alınan örneklerin *Babesia* ve *Theileria* için ortak DNA bölgesinin uygun primerlerle PCR yöntemiyle çoğaltılması, amplifiye olan ürünlerin elektroforezde incelenmesi (Şekil 4.1) ve DNA ürünlerinin RLB ile türler yönünden pozitif ve negatif kontrollerle birlikte değerlendirilmesiyle (Şekil 4.2) belirlenmiştir.

4.2. *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının yerleşim yerlerinde rastlanma sıklığı

Çalışma sırasında Trakya'yı temsilen 4 il 20 ilçede 77 yerleşim yerine gidilerek 230 sığırdan kan örnekleri alındı. Gidilen 20 ilçeden 15'inde *Babesia* ve/veya *Theileria* infeksiyonu görüldü (Şekil 4.3). Gidilen 77 yerleşim yerinden 3'ünde (%3,9) *Babesia bovis*, 3'ünde (%3,9) *Theileria annulata* ve 22'sinde (%28,57) *Theileria buffeli/orientalis* infeksiyonu saptandı (Tablo 4.1).

4.3. *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının sığırlarda yaygınlığı

Trakya'da kan örnekleri alınan 230 sığırdan 3'ünde (%1,3) *Babesia bovis*, 6'sında (%2,61) *Theileria annulata*, 42'sinde (%18,26) *T. buffeli/orientalis* ve 51'inde (%22,17) *Theileria* veya *Babesia* saptandı (Tablo 4.2). Birden fazla türle oluşan karışık (miks) infeksiyon bulunmadı.

Babesia ve *Theileria* ile infekte 51 sığır arasında *Babesia bovis* infeksiyonunun yaygınlığının %5,88, *Theileria annulata* infeksiyonunun yaygınlığının %11,76 ve *T. buffeli/orientalis* infeksiyonunun yaygınlığının % 82,35 olduğu bulundu (Tablo 4.2).

İllerde infeksiyonların yaygınlığı bakımından Edirne ilinde 67 sığırdan 1'i (%1,49) *Babesia bovis*, 3'ü (%4,48) *Theileria annulata*, 9'u (%13,43) *T. buffeli/orientalis* ile ve 13'ü (%19,40) *Theileria* veya *Babesia* ile infekte bulundu. İnfeksiyonların ilçelerdeki durumu Tablo 4.3'te verilmiştir.

İstanbul ilinin Trakya kısmında 16 sığırdan kan örneği alınmış, bunlardan 6'sında (%37,5) *Theileria buffeli/orientalis* saptandı (Tablo 4.4).

Kırklareli ilinde 81 sığırdan 1'i (%1,23) *Babesia bovis*, 3'ü (%3,7) *Theileria annulata*, 24'ü (%29,63) *T. buffeli/orientalis* ile ve 28'i (%34,57) *Babesia* veya *Theileria* ile infekteydi. Enfeksiyonların ilçelerdeki durumu Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tekirdağ ilinde 66 sığırdan kan örneği alınmıştır. Bunlardan 1'i (%1,52) *Babesia bovis*, 3'ü (%4,55) *Theileria buffeli/orientalis* ve 4'ü (%6,06) *Babesia* veya *Theileria* ile infekte bulundu. İlçelerdeki enfeksiyon durumu Tablo 4.6'da görülmektedir.

4.4. *Babesia* ve *Theileria* enfeksiyonlarının yaş gruplarında görülme oranları

Örnek alınan ve *Babesia* veya *Theileria* ile infekte bulunan sığırların yaşları Tablo 4.7'de, belirli yaş aralıklarında enfeksiyon oranları Tablo 4.8'de verilmiştir. Enfeksiyona yakalanma bakımından bir yaş ve üzeri yaş gruplarında gruplararası anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 5.9).

4.5. *Babesia* ve *Theileria* enfeksiyonlarının Dişi ve Erkek Sığırlarda görülme oranları

Kan örneği alınan 3 yaş ve daha yukarısında erkek sığır olmadığından bu yaşa kadar olan dişi ve erkekler karşılaştırılmıştır. Buna göre 3 yaşına kadar olan toplam 42 dişi hayvandan 3'ünde (%7,14) *Theileria annulata*, 4'ünde (%9,52) *Theileria buffeli/orientalis* ve toplam 7 (%16,67) sığırdaki *Babesia* veya *Theileria* enfeksiyonu saptandı. Buna karşılık bu yaşa kadar olan toplam 33 erkek hayvandan 1'inde (%3,03) *Babesia bovis*, 6'sında (%18,18) *Theileria buffeli/orientalis* ve toplam 7 (%21,21) sığırdaki *Babesia* veya *Theileria* enfeksiyonu bulundu (Tablo 4.10).

4.6. Klinik Bulgular

1- Edirne, Süloğlu ilçesi Kerametli köyünden 1,5 yaşındaki bir hayvanda 41 °C ateş, preskapuler lenf yumrularında büyüme, konjunktivada peteşiler ve anemi, iştahsızlık, durgunluk görülmüş, hayvan sahibi daha önce yanındaki bir hayvanın benzeri belirtilerle öldüğünü ifade etmiştir. Klinik bulgular saptanan bu hayvandan alınan kan örneğinde RLB ile *Theileria annulata* tespit edildi.

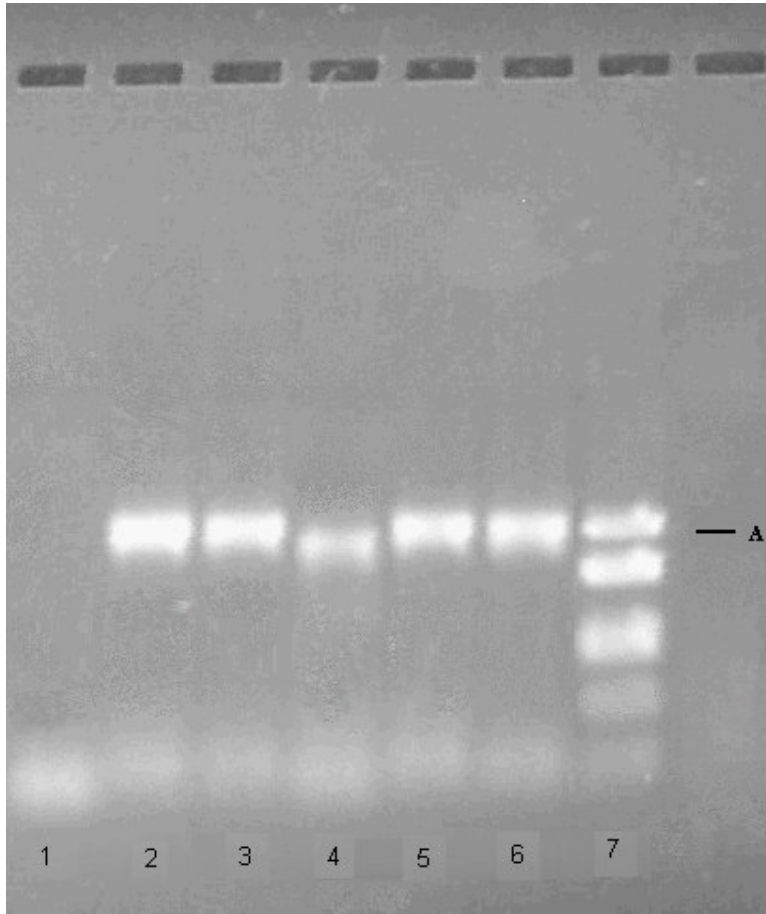
2- Edirne Keşan ilçesi Kozan köyünden 4 yaşındaki bir hayvanda 40,5 °C ateş, konjunktivalarda anemi ve hafif ikter, iştahsızlık, durgunluk görülmüştür. Bu hayvandan alınan kan örneğinde RLB ile *Theileria annulata* saptandı.

3- Kırklareli Merkez ilçe Çeşmeköy’de 6 yaşında bir hayvanda 38,5 °C ateş, preskapuler lenf yumrularında hafif büyüme, mukozalarda hafif ikter, durgunluk, iştahsızlık gözlemlendi. Hayvanın kan örneğinde RLB ile *Theileria annulata* olduğu bulundu.

4- Kırklareli Merkez ilçe Çeşmeköy’de 1 ve 4 yaşlarında iki hayvanda preskapuler lenf yumrularında şişme belirlendi. Bu hayvanların kan örneklerinde RLB ile *Theileria annulata* olduğu tespit edildi.

5- Edirne Enez ilçe merkezinde 5 yaşındaki bir hayvanın sahibi, daha önce hayvanın çok ağır theileriosis benzeri bir hastalık geçirdiğini, yanındaki hayvanın öldüğünü ifade etmiştir. Bu hayvanda RLB ile *Theileria buffeli/orientalis* saptandı.

6-Edirne Enez ilçe merkezinde 2 ve 6,5 yaşlarında, Kırklareli Merkez ilçe Çeşmeköy’de 1 yaşlarında ve Tekirdağ Malkara ilçesi Karacahalil köyünde 4 yaşında toplam 4 hayvanın daha önce theileriosis benzeri bir hastalık geçirdiği ifade edilmiş, ancak alınan kan örnekleri RLB’de negatif bulundu.



Şekil 4.1: PCR Ürünlerinin Elektroforezi sonucunda gözlenen bantlar

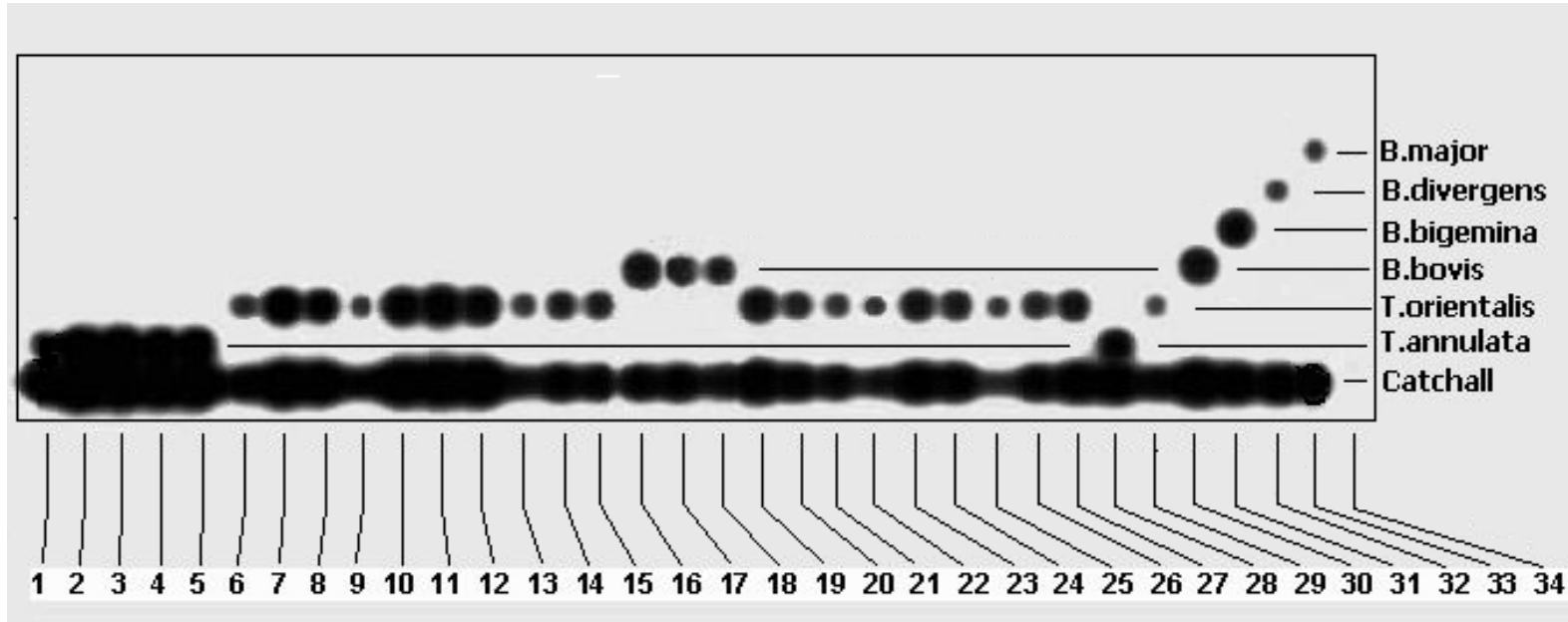
A) *Babesia-Theileria* ortak DNA bölgesi (~460-520 bp)

1) Negatif kontrol

2) Pozitif kontrol

3-6) Pozitif örnekler

7) Moleküler belirteç (100 bp)

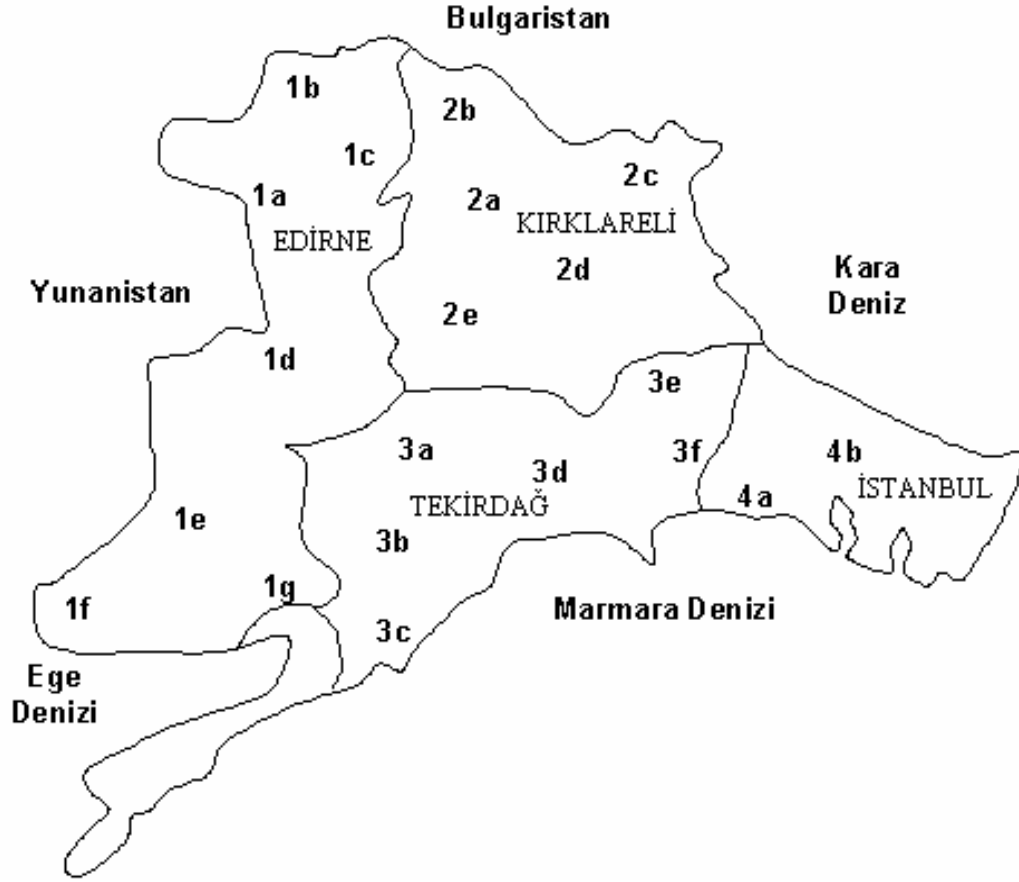


Şekil 4.2: RLB sonuçları

1-5) *Theileria annulata* pozitif örnekler,
 19-27) *Theileria buffeli/orientalis* pozitif örnekler
 30) *Babesia bovis* pozitif kontrol
 33) *Babesia major* pozitif kontrol

6-15) *Theileria buffeli/orientalis* pozitif örnekler,
 28) *Theileria annulata* pozitif kontrol,
 31) *Babesia bigemina* pozitif kontrol
 34) No-DNA negatif kontrol

16-18) *Babesia bovis* pozitif örnekler
 29) *Theileria buffeli/orientalis* pozitif kontrol
 32) *Babesia divergens* pozitif kontrol,



Şekil 4.3: Trakya’da RLB ile Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* enfeksiyonu görülen ilçeler

1a) Edirne Merkez (<i>B. bovis</i> , <i>T. buffeli/orientalis</i>)	2d) Kırklareli Pınarhisar (<i>T. buffeli/orientalis</i>)
1b) Edirne Lalapaşa (<i>T. buffeli/orientalis</i>)	2e) Kırklareli Babaeski (-)
1c) Edirne Süloğlu (<i>T. annulata</i>)	3a) Tekirdağ Hayrabolu (<i>T. buffeli/orientalis</i>)
1d) Edirne Uzunköprü (<i>T. buffeli/orientalis</i>)	3b) Tekirdağ Malkara (-)
1e) Edirne İpsala (<i>T. buffeli/orientalis</i>)	3c) Tekirdağ Şarköy (-)
1f) Edirne Enez (<i>T. buffeli/orientalis</i>)	3d) Tekirdağ Muratlı (-)
1g) Edirne Keşan (<i>T. annulata</i>)	3e) Tekirdağ Saray (<i>B. bovis</i> , <i>T. buffeli/orientalis</i>)
2a) Kırklareli Merkez (<i>T. annulata</i> , <i>T. buffeli/orientalis</i>)	3f) Tekirdağ Çerkezköy (-)
2b) Kırklareli Kofçaz (<i>B. bovis</i> , <i>T. buffeli/orientalis</i>)	4a) İstanbul Silivri (<i>T. buffeli/orientalis</i>)
2c) Kırklareli Demirköy (<i>T. buffeli/orientalis</i>)	4b) İstanbul Çatalca (<i>T. buffeli/orientalis</i>)

Tablo 4.1: Örnek alınan 77 yerleşim yerinde *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının görüldüğü yerler

İl	İlçe	İnfekte hayvanların bulunduğu köy / yerleşim yeri		
		<i>B. bovis</i>	<i>T. annulata</i>	<i>T. buffeli/orientalis</i>
Edirne	Enez	-	-	Merkez
Edirne	İpsala	-	-	Pazardere
Edirne	Keşan	-	Kozköy	-
Edirne	Lalapaşa	-	-	Büyünnü, Ortakçı, Süleymandanışment
Edirne	Merkez	Sazlıdere	-	Ulgaç
Edirne	Süloğlu	-	Kerametli	-
Edirne	Uzunköprü	-	-	Sığırcalı
İstanbul	Çatalca	-	-	Halaşlı
İstanbul	Silivri	-	-	Beyciler, Büyükçavuşlu
Kırklareli	Babaeski	-	-	-
Kırklareli	Demirköy	-	-	Merkez, Yenimahalle, İğneada-Limanköy, Boztaş
Kırklareli	Kofçaz	Malkoçlar	-	Beyci, Malkoçlar, Devletlibahçe
Kırklareli	Merkez	-	Çeşmeköy	Çeşmeköy
Kırklareli	Pınarhisar	-	-	Evciler, Kurudere
Tekirdağ	Hayrabolu	-	-	Yurtbekler-Karacakılavuz
Tekirdağ	Malkara	-	-	-
Tekirdağ	Muratlı	-	-	-
Tekirdağ	Saray	Büyükyoncalı	-	Küçükyoncalı
Tekirdağ	Çerkezköy	-	-	-
Tekirdağ	Şarköy	-	-	-
4 il	20 ilçe	3 Yerleşimde	3 Yerleşimde	22 Yerleşimde
Yerleşim yerlerinde dağılım oranı		% 3,9 ^A (3 / 77)	% 3,9 ^B (3 / 77)	% 28,57 ^C (22 / 77)

^A %95 Güven aralığı %0,88 - % 11,3 arasında

^B %95 Güven aralığı %0,88 - % 11,3 arasında

^C %95 Güven aralığı % 19,64 - % 39,54 arasında

Tablo 4.2: Trakya’da sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının illere göre yaygınlığı

İller	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Babesia bovis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria annulata</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria buffeli/orientalis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	Toplam infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)
Edirne	67	1	1,49	7,69	3	4,48	23,08	9	13,43	69,23	13	19,40
İstanbul	16	-	-	-	-	-	-	6	37,5	100	6	37,5
Kırklareli	81	1	1,23	3,57	3	3,7	10,71	24	29,63	85,71	28	34,57
Tekirdağ	66	1	1,52	25	-	-	-	3	4,55	75	4	6,06
Toplam	230	3*	1,3 ^A	5,88 ^{A1}	6*	2,61 ^B	11,76 ^{B1}	42*	18,26 ^C	82,35 ^{C1}	51*	22,17 ^D

*Karışık (miks) infeksiyon görülmemiştir.

^A %95 Güven aralığı % 0,26 - % 3,94 arasında ,

^{A1} %95 Güven aralığı % 1,41 - % 16,54 arasında

^B %95 Güven aralığı %1,07 - % 5,71 arasında,

^{B1} %95 Güven aralığı %5,14 - %23,75 arasında

^C %95 Güven aralığı % 13,78 - % 23,79 arasında,

^{C1} %95 Güven aralığı %69,52 - %90,66 arasında

^D %95 Güven aralığı % 17,27 - % 27,99 arasında

Tablo 4.3: Edirne ilinde sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının yaygınlığı

İlçeler	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Babesia bovis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria annulata</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria buffeli/orientalis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	Toplam infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)
Enez	4	-	-	-	-	-	-	1	25	100	1	25
İpsala	8	-	-	-	-	-	-	1	12,5	100	1	12,5
Keşan	9	-	-	-	1	11,11	100	-	-	-	1	11,11
Lalapaşa	14	-	-	-	-	-	-	5	35,71	100	5	35,71
Merkez	17	1	5,88	50	-	-	-	1	5,88	50	2	11,76
Süloğlu	10	-	-	-	2	20	100	-	-	-	2	20
Uzunköprü	5	-	-	-	-	-	-	1	20	100	1	20
Toplam	67	1*	1,49	7,69	3*	4,48	23,08	9*	13,43	69,23	13*	19,40

*Karışık (miks) infeksiyon görülmemiştir.

Tablo 4.4: İstanbul ili Trakya kısmında sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının yaygınlığı

İlçeler	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Babesia bovis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria annulata</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria buffeli/orientalis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	Toplam infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)
Çatalca	8	-	-	-	-	-	-	3	37,5	100	3	37,5
Silivri	8	-	-	-	-	-	-	3	37,5	100	3	37,5
Toplam	16	0	0	0	0	0	0	6	37,5	100	6	37,5

Tablo 4.5: Kırklareli ilinde sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının yaygınlığı

İlçeler	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Babesia bovis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria annulata</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria buffeli/orientalis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	Toplam infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)
Babaeski	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
Demirköy	15	-	-	-	-	-	-	8	53,33	100	8	53,33
Kofçaz	20	1	5	9,09	-	-	-	10	50	90,91	11	55
Merkez	19	-	-	-	3	15,79	75	1	5,26	25	4	21,05
Pınarhisar	10	-	-	-	-	-	-	5	50	100	5	50
Toplam	81	1*	1,23	3,57	3*	3,70	10,71	24*	29,63	85,71	28*	34,57

*Karışık (miks) infeksiyon görülmemiştir.

Tablo 4.6: Tekirdağ ilinde sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının yaygınlığı

İlçeler	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Babesia bovis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria annulata</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	<i>Theileria buffeli/orientalis</i> ile infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)	İnfekte hayvanlar arasında yaygınlık(%)	Toplam infekte hayvan sayısı	Yaygınlık (%)
Çerkezköy	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
Hayrabolu	16	-	-	-	-	-	-	1	6,25	100	1	6,25
Malkara	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
Murath	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
Saray	7	1	14,29	33,33	-	-	-	2	28,57	66,67	3	42,86
Şarköy	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
Toplam	66	1*	1,52	25	0	0	0	3*	4,55	75	4*	6,06

*Karışık (miks) infeksiyon görülmemiştir.

Tablo 4.7: *Babesia* ve *Theileria* ile infekte bulunan sığırların yaşları

Yaş (Yıl)	İncelenen Hay. Sayısı	<i>B. bovis</i> ile infekte	<i>T. annulata</i> ile infekte	<i>T. buffeli/orientalis</i> ile infekte	Toplam infekte
1 Yaşında	18	-	1	2	3
1,5 Yaşında	30	1	2	5	8
2 Yaşında	20	-	-	3	3
2,5 Yaşında	7	-	-		0
3 Yaşında	27	-	-	4	4
3,5 Yaşında	6	-	-	3	3
4 Yaşında	41	1	2	6	9
5 Yaşında	42	1	-	9	10
5,5 Yaşında	4	-	-	-	0
6 Yaşında	16	-	1	4	5
6,5 Yaşında	1	-	-	-	0
7 Yaşında	11	-	-	2	2
7,5 Yaşında	1	-	-	1	1
8 Yaşında	1	-	-	-	0
9 Yaşında	2	-	-	2	2
10 Yaşında	1	-	-	-	0
12 Yaşında	1	-	-	1	1
13 Yaşında	1	-	-	-	0
Toplam	230	3	6	42	51

Tablo 4.8: Sığırlarda yaş gruplarında *Babesia* ve *Theileria* infeksiyon oranları

Yaş (Yıl)	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Babesia bovis</i> ile infekte hayvan sayısı	İnfeksiyon oranı (%)	<i>Theileria annulata</i> ile infekte hayvan sayısı	İnfeksiyon oranı (%)	<i>Theileria buffeli/orientalis</i> ile infekte hayvan sayısı	İnfeksiyon oranı (%)	Toplam infekte hayvan sayısı	İnfeksiyon oranı (%)
1-1,5 Yaşlarında	48	1	2,08	3	6,25	7	14,58	11	22,92
2-2,5 Yaşlarında	27	-	-	-	-	3	11,11	3	11,11
3-3,5 Yaşlarında	33	-	-	-	-	7	21,21	7	21,21
4-4,5 Yaşlarında	41	1	2,44	2	4,88	6	14,63	9	21,95
5-5,5 Yaşlarında	46	1	2,17	-	-	9	19,57	10	21,74
6-13 Yaşlarında	35	-	-	1	2,86	10	28,57	11	31,43
Toplam	230	3	1,3	6	2,61	42	18,26	51	22,17

Tablo 4.9: *Babesia bovis*, *Theileria annulata* ve *T. buffeli/orientalis* infeksiyonlarının yaşla ilişkisinin istatistiksel değerlendirilmesi

Parazitler		Yaş Grupları						Ki-kare
		1 ve 1,5	2 ve 2,5	3 ve 3,5	4	5 ve 5,5	6 ve 6,5	
<i>B. bovis</i>	+n	1	0	0	1	1	0	2,162 Ö.D.
	%	2,1	0	0	2,4	2,2	0	
<i>T. annulata</i>	+n	3	0	0	2	0	1	6,184 Ö.D.
	%	6,3	0	0	4,9	0	2,9	
<i>T. buffeli/orientalis</i>	+n	7	3	7	6	9	10	4,459 Ö.D.
	%	14,6	11,1	21,2	14,6	19,6	28,6	

*Ö.D.: Yaş grupları arası farklılık önemli değil (P>0,05)

Tablo 4.10: Karşılaştırılabilir yaş gruplarındaki dişi ve erkek sığırlarda infeksiyon oranları

Yaş grupları	İncelenen Sığır Sayısı	<i>B. bovis</i> ile İnfekte	%	<i>T. annulata</i> ile İnfekte	%	<i>T. buffeli/orientalis</i> ile İnfekte	%	Toplam İnfekte Sığır Sayısı	%
1-1,5 Dişi	19	0	0	3	15,79	2	10,53	5	26,32
1-1,5 Erkek	29	1	3,45	0	0	5	17,24	6	20,69
2-2,5 Dişi	23	0	0	0	0	2	8,70	2	8,70
2-2,5 Erkek	4	0	0	0	0	1	25	1	25
Dişi Topl.	42	0	0	3	7,14	4	9,52	7	16,67
Erk.Topl.	33	1	3,03	0	0	6	18,18	7	21,21

5. TARTIŞMA

Moleküler biyolojik tekniklerin geliştirilmesiyle son konak ve vektörde parazit DNA'sının saptanmasına yönelik olarak Polymerase Chain Reaction (PCR), nükleik asit probelarıyla DNA hibridizasyonu, Restriction Digestion, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analizleri gibi moleküler biyolojik yöntemler teşhiste ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanıma girmiştir (OIE 2004a ve 2004b).

Günümüzde ise PCR-RLB tekniği hem pek çok patojeni aynı anda tespit edebilmesi, hem de epidemiyolojik çalışmalarda kendini kanıtlamış olmasıyla; theileriosis ve babesiosis gibi kene kaynaklı infeksiyonların tanısında en fazla tercih edilen bir test olduğu bildirilmiştir (Gubbels ve ark. 1999, Lew ve Jorgensen 2005).

PCR ve RLB testleriyle yapılan prevalans çalışmalarına benzer coğrafyaya sahip olduğumuz Akdeniz ülkelerinden örnekler verilebilir.

Güney Avrupa'da sığırlarda daha çok theileriosis görülmektedir. *Theileria annulata* en patojen tür olup *T. buffeli/orientalis* İtalya'nın güneyinde endemiktir (Georges ve ark. 2001). Sparagano ve ark. (2003) İtalya'da kimi çiftliklerde *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis*'in %100'e varan infeksiyon oranlarında seyrettiğini; *B. bovis* ve *B. bigemina* gibi *Babesia* türlerinin ise yalnızca yıl sonunda görüldüğünü bildirmişlerdir.

Garcia-Sanmartin ve ark. (2006) İspanya'nın kuzeyinde sığırlarda RLB tekniğini kullanarak *Theileriosis* ve *Babesiosis*'in yaygınlığını araştırmışlar ve inceledikleri hayvanların %42,6'sında *T. buffeli*, %8,4'ünde *T. annulata*, %3'ünde *B. major*, %2,7'sinde *B. bovis* ve %1,1'inde *B. divergens* saptamışlardır. Almeria ve ark. (2002) ise İspanya Minorca'da PCR ve RLB teknikleri ile inceledikleri 133 sığırın 129'unun *babesia* veya *theileria* türlerinden en az biriyle infekte olduğunu görmüşlerdir.

Yurdumuzda da PCR tekniği ile sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* etkenlerinin saptanmasına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Tanyüksel ve ark. (2002) yılında babesiosis teşhisinde PCR yöntemini ilk defa olarak kullanmışlar ve çalışmalarında *B.bovis* yaygınlığını Ankara, Burdur ve Samsun illerinde sırasıyla %12,68, %8, %3,85;

B. bigemina yaygınlığını Ankara ve Kayseri’de sırasıyla %8,45 ve %23,80; *B. divergens* yaygınlığını ise yalnızca Samsun ilinde %3,37 oranlarında bulunmuştur.

Vatansever ve Nalbantoğlu (2002) Ankara ili Polatlı ilçesinde nested PCR, IFA ve mikroskopik bakı yöntemleriyle *Theileria annulata* yaygınlığını sırasıyla %61,2, %44,9 ve %31,3 olarak saptamışlardır.

Vatansever ve ark. (2003a) Ankara’da yaptıkları çalışma ile Türkiye’de sığırlarda *T. buffeli*’nin varlığını Reverse Line Blotting (RLB) tekniği ile ilk defa olarak ortaya koymuştur. Ankara’da 10 ilçede 250 sığırın 124’ü RLB ile *Babesia/Theileria* pozitif bulunmuştur. Söz konusu çalışmada RLB ile *T. annulata*, *T. buffeli*, *B. bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens*’in yaygınlığı sırasıyla %41,6, %13,6, %5,2, %3,6, %3,2 bulunmuş, mikroskopik bakıda ise %29,6’sında *Theileria* ve %2,4’ünde *Babesia* piroplazmaları görülmüştür. IFAT ile ise *T. annulata* %28, *B. bigemina* %8,8, *B. bovis* %2,4 oranlarında pozitif bulunmuş; *B. divergens*’e karşı antikor saptanamamıştır.

Aktaş ve ark. (2006) Doğu Anadolu Bölgesi’nde *Theileria annulata* ve iyi huylu theileriosis etkenlerinin (*Theileria sergenti/buffeli/orientalis*) yaygınlığını belirlemek üzere 2004 yılında 252 kan örneğini PCR ile incelemiştir. Bu örneklerde *Theileria annulata*’nın oranı 39% (99/252) ve iyi huylu theileriosis etkenlerinin oranı %7 (18/252) bulunmuştur.

RLB testi PCR’a göre daha duyarlı bir test olmasına (Sparagano ve ark. 2002) rağmen çalışmamızda primer kaynaklı bir sorun yaşanmıştır. Değişik firmalarca sentezlenen biotin işaretli primerlerin RLB’de performanslarının farklı olabildiği, Doç.Dr.Zati Vatansever* tarafından da belirtilmiştir. Biotinle işaretlemenin iyi yapılamadığı durumlarda RLB’de sinyal yoğunluğu az olmakta veya hiç sinyal alınamayabilmektedir. Bu sorun aynı dizilime sahip, ancak bir başka firma tarafından sentezlenmiş primerler kullanılarak çözülmüştür.

Kullanılan malzemeler konusunda dikkatli olunduğu takdirde, RLB’de kullanılan membran ise bir kere hazırlandıktan sonra en az 20 defa kullanılabilmekte ve bu da epidemiyolojik çalışmalarda bir avantaj olarak öne çıkmaktadır. RLB, günümüzde sığırlarda piroplazm infeksiyonlarının tespiti ve etken türlerinin birbirinden ayrımı

* İkinci tez danışmanı, Ankara Üniv. Veteriner Fak.Parazitoloji ABD, Ankara.

amacına yönelik kullanılabilecek optimal bir test olarak kabul edilmektedir (Almeria ve ark. 2002).

Bu çalışmada Trakya Bölgesi'nde bulunan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin PCR-RLB ile saptanması ve yaygınlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. 2004-2006 yaz aylarında Trakya'yı temsilen 20 ilçede 77 yerleşim yerinden, bir yaş ve üzeri 230 sığırdan kan örnekleri alınmıştır. RLB ile yapılan arama sonucu 77 yerleşim yerinden 3'ünde (%3,9) *Babesia bovis*, 3'ünde (%3,9) *Theileria annulata* ve 22'sinde (%28,57) *Theileria buffeli/orientalis* enfeksiyonu bulunmuştur.

Örnek alınan 230 sığırdan 3'ünde (%1,3) *Babesia bovis*'e, 6'sında (%2,61) *Theileria annulata*'ya, 42'sinde (%18,26) *T. buffeli/orientalis*'e ve toplam 51'inde (%22,17) *Theileria* veya *Babesia*'ya rastlanmıştır; birden fazla türle oluşan karışık (miks) enfeksiyon görülmemiştir. *Babesia* veya *Theileria* ile enfekte 51 sığır arasında *Babesia bovis* enfeksiyonunun yaygınlığının %5,88, *Theileria annulata* enfeksiyonunun yaygınlığının %11,76 ve *T. buffeli/orientalis* enfeksiyonunun yaygınlığının %82,35 olduğu saptanmıştır. Enfeksiyona yakalanma bakımından yaş grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Daha önceki çalışmalarda *Theileria buffeli/orientalis*'in yaygınlığı Doğu Anadolu Bölgesi'nde %7 (Aktaş ve ark. 2006), Kayseri yöresinde %12 (İnci ve ark. 2003) ve %0,9 (İça ve ark. 2007a), Ankara'da ise %13,6 (Vatansever ve ark. 2003a) bulunmuş olup Trakya Bölgesi'nde hepsinden yüksek olup %18,26 olarak saptanmıştır. Bu durum Avrupa'nın güneyinde *T. buffeli/orientalis*'in endemik olmasıyla uyumlu bir sonuç olarak gözükmektedir (Georges ve ark. 2001, Garcia-Sanmartin ve ark. 2006).

Trakya yöresinde sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin dağılımı üzerine sınırlı sayıda araştırma yapılmış (Tüzer 1980, Alp 1993, 1995, Alp ve Güvenen 2001); ancak tüm Trakya'yı kapsayan bir çalışma bulunmamaktadır. İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda mikroskopik bakıya dayalı olarak *T. mutans*'in görüldüğü bildirilmiş (Tüzer 1980) Ancak daha sonra Afrika'da bulunan gerçek *T. mutans*'in Dünya'nın diğer yerlerinde *T. mutans* olarak bildirilen türden farklı olduğuna ilişkin kuvvetli deliller elde edilmesinden (Uilenberg 1983) sonra bu yörede *T. buffeli/orientalis* yönünden bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Tüzer (1980) tarafından 256 sığırdan yapılan taramada mikroskopik olarak *T. annulata*'nın yaygınlığı %20,7, *T. mutans* sanılan etkenin yaygınlığı %14,06 olarak

bulunmuş; tarama yapılan hayvanlarda *Babesia* türlerine rastlanmamasına karşın klinik belirti gösteren 112 sığırdan ise 15 hayvanda (%13,39) *T. annulata*, 39 hayvanda (%34,82) *B. bovis* ve 14 hayvanda (%12,5) *B. bigemina* saptanmıştır.

PCR ve RLB testlerinin duyarlılığının ve özgüllüğünün mikroskopik bakıyla karşılaştırıldığı çalışmalarda PCR ve RLB'nin mikroskopik bakıdan çok daha duyarlı ve özgül olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (D'Oliveira ve ark. 1995). Sunulan bu çalışmada tam tersi bir durum var gibi gözükmektedir. Tüzer'in (1980) *T. mutans* olarak gördüğü etkenin prevalansı bu çalışmada bulunan *T. buffeli/orientalis*'inkine yakın olmakla birlikte aynı araştırmacının *T. annulata* prevalansı bu çalışmada PCR-RLB ile bulunanın çok üzerindedir.

Kan örneklerinin mikroskopik bakısında bir çok kez türlerin ayrımının mümkün olmadığı göz önüne alınırsa (Nagore ve ark.2004), Tüzer'in (1980) belirttiği rakamların kümülatif olarak theileriosis etkenleri olarak değerlendirilmesi daha uygun görünmektedir. Bu durumda ortaya çıkan %31,64'lık theileriosis prevalansı da çalışmamızda PCR-RLB ile bulunan %20,87'nin üzerindedir.

Vektör kene faaliyetlerine bağlı olarak, seçilen odakların farklı olması gibi pek çok nedenle prevalansta yıllar arasında dalgalanmalar olması normaldir. İki çalışma arasında 25 sene gibi bir zaman farkı olduğu ve bu zaman dilimi içinde etken identifikasyonuna yönelik başka çalışma yapılmadığı göz önüne alınırsa yorum yapmanın güçlüğü de ortaya çıkacaktır.

Materyal toplama çalışmaları sırasında, bölgede akarisitlerin kullanımının yaygın olduğu gözlenmiştir. Hayvan yetiştiricilerinin çoğu piroplazm infeksiyonlarına “kırçan”, “kene sıtması” gibi isimlerle aşına olup, ağır ve ölümlü seyreden hastalıkların çoğunlukla hayvanların meraya çıktığı Mayıs ayı gibi gözlendiğini bildirmiştir. Hastalık görüldüğü durumlarda ise, çoğu zaman veteriner hekime başvurmadan kemoterapi uygulanmakta, ağır infeksiyonlarda hayvanın kesimi yoluna gidilmektedir. Ayrıca *Theileria* aşısı da halk arasında iyi bilinmekte ve veteriner hekimler tarafından aşılama hizmeti verilmektedir.

Tüm bu sayılan nedenler gerek hayvandaki ve gerekse de vektördeki taşıyıcılık durumunu etkilemektedir ve yıllar içinde prevalansın azalması olası bir sonuçtur.

Babesia bovis yönünden incelendiğinde sunulan bu çalışmada *B. bovis* 3 örnekte (%1,3) tespit edilmiş olup bu sonuç Tüzer (1980)'in *B. bovis* enfeksiyonuna rastlamamış olması sonucuyla uyumludur.

Her iki türün vektörlüğünü yapan kenelerin aynı olduğu göz önüne alındığında, Trakya Bölgesi'nde *B. bigemina*'nın da bulunması gerekir. Tüzer (1980)'in klinik olarak şüpheli hayvanlarda *Babesia bigemina*'yı (%12,5) *Babesia bovis*'den (%34,82) çok daha az oranda görmesi *Babesia bigemina* enfeksiyonun çok daha az yaygın olduğuna işaret etmektedir. Çalışmamızda *B. bovis* enfeksiyonunun yaygınlığının %1,3 gibi çok düşük bir oranda çıkması *B. bigemina*'ya rastlayamamış olmamıza bir açıklık getirebilir. *B. bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarının lokalize odaklarda görülüyor olması ve tesadüfi örnekleme yapılırken bu odaklara gidilmemiş olması da mümkündür.

Bu bölgede çalışma yapan bir başka araştırmacı Alp (1993)'dir. İstanbul'da ELISA testi kullanarak yaptığı prevalans çalışmasında *B. bovis*'e karşı hayvanların %29,9'unda antikor saptamıştır (Alp 1993). Aynı araştırmacı (Alp 1995) yine İstanbul'da IFAT ile *T. annulata* yaygınlığını incelemiş ve hayvanların %18'inde antikor bulunduğunu bildirmiştir.

Alp (1993, 1995), Trakya bölgesiyle kıyaslandığında çok daha dar bir alanı incelemiş, ayrıca İstanbul için Anadolu yakasının da içinde olduğu sınırlı sayıda odakta örnekleme yapmıştır. Alp'in bulgularına göre bu odakların *B. bovis* ve *T. annulata* için endemik olduğu söylenebilir; ancak odak sayısı, örnekleme ve test metodu olarak bu çalışmayla karşılaştırılması doğru olmaz. Özellikle *B. bovis* için belirtilen %29,9'luk serolojik prevalans oranı çalışmamızda PCR-RLB ile Trakya geneli için saptanan %1,3'lük etken prevalansının çok üstünde gibi gözükmektedir.

Trakya yöresi için elimizdeki son prevalans çalışmasında Alp ve Güvenen (2001), Tekirdağ ilinde IFA testiyle inceledikleri 426 adet sığırın %13,4'ünün *T. annulata*'ya, %9,9'unun *B. bovis*'e karşı antikor taşıdığını tespit etmiştir. Tekirdağ ili için bizim çalışmamızda *Babesia bovis* için %1,52, *Theileria orientalis* için ise %4,55 oranlarında prevalans bulunmuştur. Bu ilde *Babesia bovis*'in mevcut olmasıyla her iki çalışma uyumludur. Bizim çalışmamızda *T. annulata* saptanmamış olmakla beraber bu ilde enfeksiyonun olmadığını göstermez. Enfeksiyonu atlatan hayvanlar taşıyıcı olarak kalmakta ancak bu hayvanlarda parazitin eritrositik formları her zaman görülememekte, parazit çok zaman lenfoid dokularda yerleşebilmektedir (İlhan ve ark. 1998). Ayrıca

Alp ve Güvenen (2001)'in çalışmalarında saptadıkları serolojik pozitiflik türler arası çapraz reaksiyonlar görülebilmesine bağlı olarak *T. buffeli/orientalis*'in de dahil olduğu bir seropozitiflik oranı olabilir.

Trakya bölgesinde *Babesia* ve *Theileria* infeksiyonlarının sığırlardaki yayılışı üzerine az sayıda araştırma bulunmasına karşın bu infeksiyonların kenelerde yayılımı bugüne dek incelenmemiştir.

Gülenber (1996) Trakya Bölgesi'nde kene türlerinin yayılımı üzerine yaptığı doktora çalışmasında *Boophilus annulatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. bursa*, *Hyalomma marginatum* ve *H. anatolicum excavatum* türlerinin bulunduğunu; türlerin sığırlardaki yayılımlarının da sırasıyla %7,79, %4,52, %3,46, %0,97 ve %0,19 olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamız bulgularına göre Trakya'da *Babesia* ve *Theileria* türleri arasında en yaygın görüleni *Theileria buffeli/orientalis*'dir. Mimioğlu (1954) bu parazitin vektörlerinden olan *Haemaphysalis punctata*'nın bölgede mevcudiyetini bildirmiş, ancak Gülenber (1996) çalışmasında herhangi bir *Haemaphysalis* türüne rastlamamıştır. Literatürlerde Gülenber'in saptadığı kene türlerinin *T. buffeli/orientalis*'in vektörlüğünü yaptığıyla ilgili bir kayda rastlanmamıştır. Savini ve ark. (1998) iyi huylu theileriosis etkenlerinin *Haemaphysalis* cinsi keneler yanı sıra *Rhipicephalus* cinsi kenelerle de naklediliyor olabileceğini belirtmişse de bu durum kesinlik kazanmış değildir. Bu nedenlerden dolayı *T. buffeli/orientalis*'in olası vektörleri üzerinde ayrıntılı araştırmaya gerek vardır.

Kan örneklerinin toplanması sırasında hastalık geçirmiş veya o sırada geçiren 10 adet sığıra rastlanmıştır. Klinik bakıda babesiosis veya theileriosis yönünden 2 hayvanda şiddetli, 3 hayvanda ise hafif hastalık semptomları görülmüş ve bu hayvanlarda RLB testi ile *T. annulata* saptanmıştır. Daha önce şiddetli theileriosis veya babesiosis benzeri bir hastalık geçirdiği söylenen bir hayvanda *Theileria buffeli/orientalis* bulunmuş ve yine geçmişte theileriosis veya babesiosis benzeri hastalık geçirdiği söylenen 4 hayvanda ise parazite rastlanmamıştır.

Theileria buffeli/orientalis saptanan hayvan, *Theileria annulata* infeksiyonunun sıklıkla görüldüğü söylenen ve gözlemlediğimiz kadarıyla bölge dahilinde en fazla aşı çalışmasının yapıldığı Enez ilçesindendir. Bu hayvanın yanında, aynı sürüden onunla birlikte hasta olan bir başka hayvanın ise öldüğü belirtilmiştir.

Theileria buffeli/orientalis normalde iyi huylu bir theileriosis etkenidir. Ancak bazı durumlarda, özellikle Avrupa ırklarında (Holstein gibi) patojenite kazanabilmekte ve ağır anemiyle seyreden hastalığa neden olabilmektedir (He ve ark. 2005). Bu hayvanın geçirdiği hastalığın etkeninin *Theileria buffeli/orientalis* olmaması mümkündür.

Diğer taraftan bölgede ziyaret edilen hemen her odakta kene kaynaklı olduğu söylenen ve veteriner hekimlerin piroplasmose olarak genellediği ölümle seyredebilen vakalar görüldüğü bildirilmiştir. Odaklar bazında nadir görülen bu olaylar yekünde yüksek rakamlara denk gelmektedir. Bu vakalardan numune alınıp incelenmedikçe etkenler hakkında bir şey söylemek mümkün değildir. Ancak *T. buffeli/orientalis*'in en yaygın tür olması ve bölgede hemen her yerde suni tohumlama uygulamalarıyla yaygın olarak Holstein cinsi sığırlar yetiştirildiği göz önüne alındığında; en azından bazı klinik vakalarda, hastalık etkeninin *T. buffeli/orientalis* olabileceği düşünülebilir.

Bu çalışma Trakya Bölgesi'nde yaklaşık 25 yıl gibi bir süre sonra *Babesia* ve *Theileria* etkenlerinin direkt tanısı üzerine yapılmış ilk çalışmadır. Çalışmamız aynı zamanda Trakya Bölgesi'nde *Babesia* ve *Theileria* türlerinin tespiti ve yayılımlarının belirlenmesine yönelik ilk moleküler çalışma olup, bu bölgede *T. buffeli/orientalis*'in varlığı da ilk defa gösterilmiştir. Çalışmada zoonotik özellikte olan *Babesia divergens*'e rastlanmamıştır. Bu parazit bölgede var olsa bile çok az oranda bulunuyor olabilir. PCR-RLB testi aynı anda çok sayıda parazitin saptanabilmesi, tek bir testte çok sayıda örnek işlenebilmesi ve RLB membranının defalarca kullanılabilmesi yönüyle epidemiyolojik araştırmalar ve rutin uygulamalar için uygun bir testtir.

Çalışmamızda Trakya Bölgesi'nin babesiosis ve theileriosis infeksiyonlarının epidemiyolojileri yönünden bilinmezlerle dolu olduğu anlaşılmıştır. İnfeksiyon etkenlerinin vektörlerde ve konaklarda serolojik ve moleküler yöntemlerle kombine olarak incelenmesi; enzootik denge veya dengesizlik durumunun ortaya konabilmesi için gerekli unsurlardır. Trakya Bölgesi'nde detaylı araştırmalar yapılması, infeksiyonlardan koruma ve kontrol stratejilerinin belirlenmesini ve ekonomik kayıpların önüne geçilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Agresti, A., and Coull, B. (1998): Approximate is better than 'exact' for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician* **52**: 119-126.
- Aikawa, M., Kawazu, S., Kamio, T., Matsumoto, Y., Naya, T., Torii, M. ve ark. (1997): Membrane knobs of unfixed *Babesia bovis* infected erythrocytes: new findings as revealed by atomic force microscopy and surface potential spectroscopy. *Parasitology International*, **46**: 241-246.
- Aktaş, M., Dumanlı, N. (1999): Elazığ yöresinde tropikal theileriosise karşı aşılanan sığırlarda saha çalışmaları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **13**(2): 79-87.
- Aktaş, M., Sevgili, M., Dumanlı, N., Karaer, Z., Çakmak, A., (2001a): Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde *Theileria annulata*'nın sero-prevalansı. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **25**: 359-363.
- Aktaş, M., Dumanlı, N., Karaer, Z., Çakmak, A., Sevgili, M. (2001b): Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde *Babesia* türlerinin sero-prevalansı. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **25**: 447-451.
- Aktaş, M., Altay, K. (2004): Sığır theileriosisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **18**(2): 79-86.
- Aktaş, M., Altay, K., Dumanlı, N. (2006): A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Veterinary Parasitology*, **138**: 179-185.
- Allred, D.R., Al-Khedery, B. (2006): Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. *Veterinary Parasitology*, **138**: 50-60.
- Allsopp BA, Baylis HA, Allsopp MT, Cavalier-Smith T, Bishop RP, Carrington DM, Sohanpal B, Spooner P. (1993): Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. *Parasitology*; **107**: 157-65.
- Almeria, S., Castella, J., Ferrer, D., Sparagano, O., Estrada-Pena, A. (2001): First report of *Babesia bovis* in Spain. *The Veterinary Record*, **149**: 716-717.
- Almeria, S., Castella, J., Ferrer, D., Gutierrez, J.F., Estrada-Pena, A., Sparagano, O. (2002): Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **969**: 78-82.

- Alp, H. (1993): İstanbul ili sığırlarında *Babesia bovis*'in yaygınlığının ELISA ile saptanması. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **24**(1): 57-67.
- Alp, H. (1995): İstanbul ili sığırlarında tropical theileriosis'in yaygınlığı ve yayılma oranının belirlenmesi. İstanbul Üniv Sağıl Bil Enst Parazitoloj ABD (Doktora tezi).
- Alp, H.G., Güvenen, A.R. (2001): Tekirdağ ilinde *Theileria annulata* ve *Babesia bovis* enfeksiyonlarının seroprevalansı. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **32**: 1-2.
- Ayerdem, B., İnci, A., Uyanık, F., İça, A., Çakmak, A., Yıldırım, A. (2006): Sığırlarda doğal *Theileria annulata* enfeksiyonlarında monosit nitrik oksit düzeyleri. *Sağılık Bilimleri Dergisi*, **15**(2): 116-121.
- Bakheit, M.A., Schnittger, L., Salih, D.A., Boguslawski, K., Beyer, D., Fadl, M., ve ark. (2004): Application of the recombinant *Theileria annulata* surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis. *Parasitology Research*, **92**(4): 299-302.
- Biotech (2004): RLB Hybridisation: Reverse line blot hybridisation in the detection of tick-borne disease. Bti Eylül 2004, Erişim 13.01.2007, <http://www.biotech-online.com/pdf/10644.pdf>.
- Bishop, R., Geysen, D., Skilton, R., Odongo, D., Nene, V., Allsopp, B. ve ark. (2002): *Genomic polymorphism, sexual recombination and molecular epidemiology of Theileria parva*. İçinde: Dobbelaere, D.A.E., McKeever, D.J. (eds.). *World Class Parasites (3), Theileria*. Kluwer Academic Publishers, London. pp.23-41.
- Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S., Gardner, M., Nene, V. (2004): *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology*, **129**: S271-S283.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W. (2004): Babesiosis of cattle. *Parasitology*, **129**: S247-S269.
- Böse, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R.J., Friedhoff, K.T., De Vos, A.J. (1995): Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, **57**: 61-74.
- Brands, S.J. (comp.) (1989-2005): *Taxon: Order Piroplasmorida Wenyon, 1926*. Systema Naturae 2000, The Taxonomicon, Universal Taxonomic Services, Amsterdam. Erişim 15.01.2007, <http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon> ve <http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=124009&tree=0.1>

- Brown, C.G.D. (1983): *Theileria*. İçinde: Jensen, J.B. (ed). *In vitro cultivation of protozoan parasites*, CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 243-284.
- Brown, C.G.D., Hunter, A.G., Luckins, A.G. (1990). *Diseases caused by protozoa*. İçinde: Sewell, M.M.H. ve Brocklesby, D.W. *Handbook on Animal Diseases in the Tropics (4th ed)*. Baillire Tindall, London. pp. 161-226.
- Brown, W.C., Norimine, J., Knowles, D.P., Goff, W.L. (2006a): Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology*, **138**: 75-87.
- Brown, W.C., Norimine, J., Goff, W.L., Suarez, C.E., McElwain, T.F. (2006b): Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunology*, **28**: 315-327.
- Caccio, S., Camma, C., Onuma, M., Severini, C. (2000): The β -tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1181-1185.
- Calder, J.A.M., Reddy, G.R., Chieves, L., Courtney, C.H., Littell, R., Livengood, J.R., Norval, R.A.I., Smith, C. and Dame, J.B. (1996): Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**: 2748-2755.
- Camacho, A.T., Telford, S.R. Ve Spielman, A. (2007). Blood, Bone Marrow, Spleen Parasites, Sporozoa Order: Piroplasmida, *Babesia divergens*. Erişim 16.01.2007, http://www.Cdfound.To.It/HTML/Bab_Divergens.Htm#Divergens
- Ceci, L., Jongejan, F., Carelli, G., Tassi, P., Sparagano, O. (1999): Identification of *Theileria buffeli/orientalis* and *Babesia bigemina* in Apulian cattle using molecular techniques and study of changes in blood parameters. *Parassitologia*, 41 Suppl **1**: 31-32.
- Chen, P.P., Conrad, P.A., Ole-MoiYoi, O.K., Brown, W.C., Dolan, T.T. (1991): DNA probes detect *Theileria parva* in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasitology Research*, **77**: 590-594.
- Cooke, B.M., Mohandas, N., Cowman, A.F., Coppel, R.L. (2005): Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. *Veterinary Parasitology*, **132**: 273-295.
- Costa-Junior, L.M., Rabelo, E.M.L., Filho, O.A.M., Ribeiro, M.F.B. (2006): Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and

- Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Veterinary Parasitology*, **139**: 231-236.
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R., ve ark. (2006): New data on epizootology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome *b* genes. *Veterinary Parasitology*, **142**: 238-247.
- Çakmak, A. (1987): Untersuchungen zur inzidenz von hamoparaziten in einer rinderherde in der provinz Ankara. Tierarztl. Hochsch., Diss., Hannover.
- Çakmak, A., Öz, İ. (1993): Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **40**(1): 70-77.
- Dalglish, R.J. (1993): *Babesiosis*. İçinde: Warren, K.S. (ed). *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. Blackwell, Boston. pp. 352-385.
- Dalrymple, B.P. (1990): Cloning and characterization of the rRNA genes and flanking regions from *Babesia bovis*: use of the genes as strain discriminating probes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **43**: 117-124.
- Darghouth, M.E.A., Bouattour, A., Ben-Miled, L., Sassi, L. (1996): Diagnosis of *Theileria annulata* -infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. *Veterinary Research*, **27**: 613-627.
- De Waal, D.T., Combrink, M.P. (2006): Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, **138**: 88-96.
- Dinçer, Ş., Sayın, F., Karaer, Z., Çakmak, A., Friedhoff, K.T., Müller, I., İnci, A., Yukarı, B.A. ve Eren, H. (1991): Karadeniz Bölgesi Sığırlarında Bulunan Kan Parazitlerinin Sero-İnsidensi Üzerine Araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **38**(1-2): 206-226.
- D'Oliveira, C., Van Der Weide, M., Habela, M.A., Jacquiet, P., Jongejan, F. (1995): Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**(10): 2665-9.
- Dolan, T.T (ed.) (1998). Nomenclature in *Theileria*. In Theileriosis in Eastern, Central and Southern Africa. *Proceedings of a Workshop on East Coast Fever Immunization –Malawi 1998*, Appendix I. Erişim 15.01.2007, <http://www.fao.org/Wairdocs/ILRI/x5549E/x5549e18.htm>

- Dumanlı, N., Aktaş, M., Çetinkaya, N., Çakmak, A., Köroğlu, E., Saki, C.E. ve ark. (2005): Prevalance and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Veterinary Parasitology*, **127**: 9-15.
- Düzgün, A., Alabay, M., Çerçi, H., Emre, Z., Çakmak, A. (1992): A serological survey using ELISA for *Babesia bovis* infection of cattle in Turkey. *IAEA. TECDOC*. **657**: 175-177.
- El-Ghaysh, A., Sundquist, B., Christensson, D.A., Hilali, M., Nassar, A.M. (1996): Observations on the use of ELISA for detection of *Babesia bigemina* specific antibodies. *Veterinary Parasitology*, **62**(1-2): 51-61.
- Eren, H. (1993): Ankara yöresinde Sığır babesiosisinin sero-prevalansı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **40**(1): 23-37.
- Eren, H., Çakmak, A., Yukarı, B.A. (1995): Türkiye'nin farklı bölgelerinde *Theileria annulata*'nın seroprevalansı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **42**(1): 57-226.
- Eren, H., Özlem, M.B., Sert, H., Kaplan, A. (1998): Aydın yöresi sığırlarında *Theileria annulata*'nın prevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **22**(2): 177-179.
- Erkut, H.M. (1967): Ege Bölgesi sığırlarında piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. *Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **8**(16): 120-130.
- Fahrimal, Y., Goff, W.L., Pasmer, D.P. (1992): Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using Polymerase Chain Reaction of parasite DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**(6): 1374-1379.
- Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S., Buening, G.M. (1992): Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by Polymerase Chain Reaction amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**(10): 2576-2582.
- Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S., Buening, G.M. (1993): Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, **50**: 69-81.
- Figueroa, J.V., Buening, G.M. (1995): Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne haemoparasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, **75**: 75-92.
- Friedhoff, K.T. (1988): *Transmission of Babesia*. İçinde: Ristic, M. (ed.). *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Florida. pp. 23-52.

- Garcia-Sanmartin, J., Nagore, D., Garcia-Perez, A.L., A Juste, R., Hurtado, A. (2006): Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BioMed Central Veterinary Research*, **2**: 16.
- Gautam, O.P., Dhar, S. (1983): Bovine tropical theileriosis: A review 1. Prevalance, transmission and symptoms. *Tropical Veterinary Animal Science Research*, **1**(1): 1-18.
- Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F. and Sparagano, O. (2001): Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology*, **99**: 273-286.
- Glass, E.J. (2001): The balance between protective immunity and pathogenesis in tropical theileriosis: what we need to know to design effective vaccines for the future. *Research in Veterinary Science*, **70**: 71-75.
- Glass, E.J., Preston, P.M., Springbett, A., Craigmile, S., Kirvar, E., Wilkie, G. Ve ark. (2005): *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. *International Journal for Parasitology*, **35**: 337-347.
- Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Tuo, W., Valdez, R.A. (2001): The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunology*, **23**: 463-471.
- Goff, W.L., Johnson, W.C., Horn, R.H., Barrington, G.M., Knowles, D.P. (2003): The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunology*, **25**(4): 185-188.
- Gough, J.M., Jorgensen, W.K., Kemp, D.H. (1998): Develoepment of tick gut forms of *Babesia bigemina* in vitro. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, **45**: 298-306.
- Govaerts, M., Verhaert, P., Jongejan, F. and Goddeeris, B.M. (2002): Characterisation of the 33 kDa piroplasm surface antigen of *Theileria orientalis/sergenti/buffeli* isolates from West Java, Indonesia. *Veterinary Parasitology*, **104**: 103-117.

- Göksu, K. (1970): Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları (Piroplasmosis, Babesiosis, Theileriosis) ve Anaplasmosis'in yayılışı durumları. *Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **40**(4): 24-29.
- Gray, J.S., Murphy, T.M. (1985): Bovine babesiosis in Ireland. *Irish Veterinary News*, 9-14.
- Gubbels, J. M., de Vos, A. P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L. M., de Vries, E., Jongejan, F. (1999): Simultaneous Detection of Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(6): 1782-1789.
- Gubbels, M.-J., Hong, Y., van der Weide, M., Qi, B., Nijman, I.J., Guangyuan, L. and Jongejan, F. (2000): Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *International Journal for Parasitology*, **30**(8): 943-952.
- Gubbels, M.J., Katzer, F., Shiels, B.R., Jongejan, F. (2001): Study of *Theileria annulata* population structure during bovine infection and following transmission to ticks. *Parasitology*, **123**: 553-561.
- Guglielmone, A.A., Lugaresi, C.I., Volpogni, M.M., Anziemi, O.S., Vanzini, V.R. (1997): Babesial antibody dynamics after cattle immunisation with live vaccines, measured with an indirect immunofluorescent test. *Veterinary Parasitology*, **70**: 33-39.
- Gülenber, A. (1996): Trakya'da sığırlarda ixodid kene enfestasyonları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji ABD Doktora tezi.
- He, W., Kazuhiko, O., Sugimoto, C., Onuma, M. (2005): *Theileria orientalis*: Cloning a cDNA encoding protein similar to thiol protease with haemoglobin-binding activity. *Experimental Parasitology*, **111**(3):143-53.
- Heussler, V.T. (2002): *Theileria survival strategies and host cell transformation*. İçinde: Dobbelaere, D.A.E., McKeever, D.J. (eds.). World Class Parasites (3), *Theileria*. Kluwer Academic Publishers, London. pp.69-85.
- Igarashi, I., Aikawa, M., Kreier, J.P. (1988): *Worldwide impact of Babesiosis*. İçinde: Ristic, M. (ed.). *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Florida. pp53-71.
- Inoue, M., Van Nguyen, D., Meas, S., Ohashi, K., Sen, S., Sugimoto, C. and Onuma, M. (2001): Survey of *Theileria* parasite infection in cattle in Cambodia and Vietnam

- using piroplasm surface protein gene-specific chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine*, **63**: 1155-1157
- İça, A. (2004): Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin Reverse Line Blotting ve İndirek Floresan Antikor Testi ile karşılaştırmalı tanısı. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1**(2): 77-85.
- İça, A., İnci, A., Yıldırım, A. (2007a): Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **31**(1): 33-38.
- İça, A., Vatansever, Z., Yıldırım, A., Düzlü, Ö., İnci, A. (2007b): Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. *Veterinary Parasitology*, **148**: 156-160.
- İlhan, T., Williamson, S., Kırvar, E., Shiels, B., Brown, C.G.D. (1998): *Theileria annulata*: carrier state and immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **849**: 109-125.
- İnci, A. (1992): Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **39**(1-2): 153-167.
- İnci, A., Çakmak, A., İça, A., Günay, O. (2002a): Kayseri yöresinde tropikal theileriosis'in istatistiksel analizi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **26**(1): 38-41.
- İnci, A., Çakmak, A., Çam, Y., Karaer, Z., Atasever, A., İça, A. (2002b): Kayseri yöresinde tropikal theileriosis'e bağlı ekonomik kayıplar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **26**(2): 156-160.
- İnci, A., Çakmak, A., Karaer, Z., Dinçer, Ş., Sayın, F., İça, A. (2002c): Kayseri yöresinde sığırlarda Babesiosis'in seroprevalansı. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **26**: 1345-1350.
- İnci, A., Karaer, Z., Çakmak, A., Günay, O., Atasever, A., Nalbantoğlu, S., ve ark. (2003): Kayseri yöresinde sığırlarda Tropikal Theileriosis'in epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. DPT 98-K12139 numaralı proje final raporu.
- Jackson, L.A., Waldron, S.J., Weier, H.M., Nicoll, C.L., Cooke, B.M. (2001): *Babesia bovis*: culture of laboratory-adapted parasite lines and clinical isolates in a chemically defined medium. *Experimental Parasitology*, **99**: 168-174.

- Jeong, W., Kweon, C.H., Kim, J.M., Jang, H., Paik, S.G. (2005): Serological investigation of *Theileria sergenti* using latex agglutination test in South Korea. *Journal of Parasitology*, **91**(1): 164-169.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004): The global importance of ticks. *Parasitology*, **129**: S3-S14.
- Kachani, M., Spooner, R., Rae, P., Bell-Sakyi, L., Brown, D. (1992): Stage-specific responses following infection with *Theileria annulata* as evaluated using ELISA. *Parasitology Research*, **78**(1): 43-47.
- Karagenç, T.İ., Eren, H. (2002): Tropikal theileriosis’de aşılama. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **26**(3): 266-270.
- Kaufhold, A., Podbielski, A., Baumgarten, G., Blokpoel, M., Top, J., Schouls, L. (1994): Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*; **119**: 19 - 26.
- Kawazu, S., Sugimoto, C., Kamio, T., Fujisaki, K. (1992): Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *Theileria buffeli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **56**: 169-175.
- Kawazu, S, Kamio, T., Sekizaki, T., Fujisaki, K. (1995): *Theileria sergenti* and *T. buffeli*: polymerase chain reaction-based marker system for differentiating the parasite species from infected cattle blood and infected tick salivary gland. *Experimental Parasitology*, **81**(4): 430-435.
- Keçeci, T., Handemir, E., Çakmak, A. (1999): *Theileria annulata*’nın neden olduğu akut ve latent *Theileriosis*’in sığırlarda bazı hematolojik değerler ile kan metabolitlerinin düzeyleri üzerindeki etkileri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **23**(1): 78-82.
- Kessler, R.H., Madruga, C.R., Soares, C.O. ve de Araujo, F.R. (2002). Tristeza parasitária dos bovinos: quando vacinar é preciso. Embrapa Gado de Corte, documentos 131: venda pela internet campo grande ms, novembro de 2002. Erişim 15.01.2007, <http://www.cnpgec.embrapa.br/publicacoes/doc/doc131/01introducao.html>.

- Kibe, M.K., Ole-MoiYoi, O.K., Nene, V., Khan, B., Allsopp, B.A., Collins, N.E. ve ark. (1994): Evidence for two single copy units in *Theileria parva* ribosomal RNA genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **66**: 249-259.
- Kjemtrup, A.M., Thomford, J., Robinson, T., Conrad, P.A. (2000): Kjemtrup, A.M., Thomford, J., Robinson, T., Conrad, P.A. (2000): Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. *Parasitology*, **120**: 487-493.
- Kreier, J.P. ve Baker, J.R. (1987): *Parasitic Protozoa*. Winchester, Mass, USA: Allen and Unwin, Inc.
- Kuttler, K.L., Robinson, R.M., Rogers, W.P. (1967): The detection of specific complement-fixing antibodies in serum of white-tailed deer (*Odocoileus Virginianus*) with *Theileria* infection. *Canadian Journal of Comparative Medical and Veterinary Sciences*, **31**(12): 354-357.
- Kuttler, K.L. (1988): *Worldwide impact of Babesiosis*. İçinde: Ristic, M. (ed.). *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Florida. pp1-22.
- Levine, N.D. (1985): Veterinary Protozoology, p291-299, 313-328. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Levy, M.G., Clabaugh, G., Ristic, M. (1982): Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infection and Immunity*, **37**(3): 1127–1131.
- Lew, A., Jorgensen, W. (2005): Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: Babesiosis and Anaplasmosis. *African Journal of Biotechnology*, **4**(4): 292-302.
- Mackenstedt, U., Gauer, M., Fuchs, P., Zapf, F., Schein, E., Mehlhorn, H. (1995): DNA measurements reveal differences in the life cycle of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitology Research*, **81**(7): 595-604.
- Mahin, L. (2007). *Theileria annulata*. Erişim 14.01.2007, <http://lucyin.walon.org/lv/theileria1.jpg>
- Maritim, A.C., Kariuki, D.P., Young A.S., Mutugi J.J. (1998): *The importance of the carrier state of Theileria parva in the epidemiology of theileriosis and its control by immunization*. İçinde: Dolan, T.T. (ed.). *Theileriosis in Eastern, Central and Southern Africa. Proceedings of a Workshop on East Coast Fever Immunization – Malawi 1998*, Part 3. Erişim 15.01.2007,

<http://www.fao.org/Wairdocs/ILRI/x5549E/x5549e0v.htm#the%20importance%20of%20the%20carrier%20state%20of%20theileria%20parva%20in%20the%20epidemiology%20of%20th>

Mehlhorn, H. (2004): Babesiosis, Theileriosis. İçinde: Encyclopedic reference of parasitology (2nd ed), Online version: II, Universitat Würzburg, Springer-Verlag Heidelberg. Erişim 15.01.2007,

<http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/frame.php>

Menzies, M., Ingham, A. (2006): Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **109**: 23-30,

Mimioğlu, M. (1954): Die Schildzecken (Ixodiden) der Haustiere in der Türkei. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1**(2): 20-32.

Mimioğlu, M. (1955): Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde Haematuria vesicalis bovis'li sığırlarda parazitolojik araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2**: 183-192.

Mimioğlu, M., Göksu, K. ve Sayın, F. (1969): Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*: 248.

Mimioğlu, M., Ulutaş, M. ve Güler, S. (1971): Yurdumuz sığırlarında theileriosis etkenleri ve diğer kan parazitleri. *Ajans Türk Matbaacılık*, Ankara.

Mokrousov, I., Narvskaya, O. (2004): Protocols. İçinde: Methods for DNA fingerprinting and genotypic detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. (Workshop) S. Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia.

Moreau, M.F., Thibaud, J.L., Mile, L.B., Chaussepied, M., Baumgartner, M., Davis, W.C. ve ark. (1999): *Theileria annulata* in CD5(+) macrophages and B1 B cells. *Infection and Immunity*, **67**: 6678-6682.

Nagore, D., Garcia-Sanmartin, J., Garcia-Perez, A.L., A Juste, R., Hurtado, A. (2004): Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Veterinary Parasitology*, **123**: 41-54.

Neitz, W.O. (1957): Theileriosis, Gonderiosis and Cytauxzoonoses: A review. *Onderstepoort journal of Veterinary Research*, **27**: 275-430.

- Nevils, M.A., Figueroa, J.V., Turk, J.R., Canto, G.J., Le, V., Ellersieck, M.R., Carson, C.A. (2000): Cloned lines of *Babesia bovis* differ in their ability to induce cerebral babesiosis in cattle. *Parasitology Research*, **86**: 437-443.
- Nichani, A.K., Thorp, B.H., Brown, C.G., Campbell, J.D., Brown, D.J., Ritchie, M., ve ark. (1999): In vivo development of *Theileria annulata*: major changes in efferent lymph following infection with sporozoites or allogeneic schizont-infected mononuclear cells. *Parasitology*, **118**: 327-333.
- Norval, R.A.I., Perry, B.D., Young, A.S. (1992): The epidemiology of *Theileriosis* in Africa. *Academic Press*, London.
- O'Conner, R.M., Allred, D.R. (2000): Selection of *Babesia bovis*-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms. *Journal of Immunology*, **164**(4): 2037-2045.
- OIE (2004a): Manual Of Standards, Diagnostic Tests and Vaccines 2000: Chapter 2.3.8. Bovine Babesiosis. Erişim 15.12.2006, http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00059.htm, Updated: 23.07.2004.
- OIE (2004b): Manual Of Standards, Diagnostic Tests and Vaccines 2000: Chapter 2.3.11. Theileriosis. Erişim 15.12.2006, http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00062.htm, Updated: 23.07.2004.
- Ozan Temizer, S., Yaralıoğlu, S., Yılmaz, S., Özer, E., şaki, C.E., Sevgili, M. (1999): *Theileria annulata* ile enfekte sığırılarda GSH-Px, G6PD, arginaz aktiviteleri ile bazı biyokimyasal parametreler. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **23**: 553-557.
- Özcan, H.C. (1961): Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerine araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, **43**: 106.
- Pinder, J.C., Fowler, R.E., Dluzewski, A.R., Bannister, L.H., Lavin, F.M., Mitchell, G.F. ve ark. (1998): Acto-myosin motor in the merozoite of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *Journal of Cell Science*, **111**: 1831-1839.
- Preston, P.M., Brown, C.G.D., Bell-Sakyi, L.J., Richardson, W., Sanderson, A. (1992): Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* X *Bos indicus* calves. Response to infection with graded doses of sporozoites. *Research in Veterinary Science*, **53**: 230-243.

- Purnell, R.E., Lewis, D., Young, E.R. (1980): Investigations on the prophylactic effect of treatment with imidocarb dipropionate on *Babesia divergens* infections in splenectomized calves. *British Veterinary Journal*, **136**: 452-456.
- Richardson, J.O., Forsyth, L.M.G., Brown, C.G.D., Preston, P.M. (1998): Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. *Veterinary Research Communications*, **22**: 31-45.
- Riek, R.F. (1966): The life cycle of *Babesia argentina* in the vector *Boophilus microplus*. *Australian Journal of Agricultural Research*. **17**: 247-254.
- Rijpkema, S.G., Molkenboer, M.J., Schouls, L.M., Jongejan, F., Schellekens, J.F. (1995): Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**: 3091 – 3095.
- Salem, G.H., Liu, X., Johnsrude, J.D., Dame, J.B., Roman-Reddy, G. (1999): Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. *Molecular and Cellular Probes*, **13**: 107-113.
- Savini, G., Onuma, M., Scaramozzino, P., Kakuda, T., Semproni, G., Langella, V. (1998): First report of *Theileria sergenti* and *T.buffeli/orientalis* in cattle in Italy. *Tropical Veterinary Medicine*, **849**: 404-407.
- Sayın, F., Friedhoff, K.T., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., ve ark. (1989): Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. Türk Vet. Hek. I. Bilim Kongresi, Bildiri özetleri, Tebliğ no:103, 26-29 Eylül, İstanbul.
- Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., ve ark. (1992): Epidemiological study on tropical theileriosis around Ankara. *Veteriner Hekimliği Öğreniminin 150. yılı*. 263-278.
- Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., ve ark. (1999): Ankara yöresinden elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **23**(4): 426-431.
- Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., ve ark. (2000): Türkiye’de tropikal theileriosis üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, **47**: 1-11.

- Schouls, L.M., Van De Pol, I., Rijpkema, S.G.T., Schot, C.S. (1999): Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(7): 2215-2222.
- Shah-Fischer, M., Say, R.R. (1989): Manual of tropical veterinary parasitology. C.A.B. Int, Wallingford, UK.
- Shaw, M.K., Lewis, G.T. (1992): How individual cells develop from a syncytium: merogony in *Theileria parva* (Apicomplexa). *Journal of Cell Science*, **101**: 109-123.
- Shaw, M.K., Young, A.S. (1994): The biology of *Theileria* species in ixodid ticks in relation to parasite transmission. *Advances in Disease Vector Research*, **10**: 23-63.
- Shaw, M.K. (1997): The same but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells. *International Journal for Parasitology*, **27**(5): 457-474.
- Shaw, M.K. (1999): *Theileria parva*: Sporozoite entry into bovine lymphocytes is not dependent on the parasite cytoskeleton. *Experimental Parasitology*, **92**: 24-31.
- Shaw, M.K. (2002): *Theileria* development and host cell invasion. İçinde: Dobbelaere, D.A.E., McKeever, D.J. (eds.). World Class Parasites (3), Theileria. Kluwer Academic Publishers, London. pp.1-23.
- Soldati, D., Foth, B.J., Cowman, A.F. (2004): Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends in Parasitology*, **20**: 567-574.
- Soulsby, E.J.L. (1982): Helminths, Arthropods and Domesticated Animals (7th ed.). p.706-718, 728-736. Bailliere Tindal, London.
- Sparagano, O. (1999): Molecular Diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. *Journal of Veterinary Parasitology*, **13**(2): 83-92.
- Sparagano, O., Jongejan, F. (1999): Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens. *Parassitologia*, 41 Suppl 1: 101-105.
- Sparagano, O., Loria, G.R., Gubbels, M.J., De Vos, A.P., Caracappa, S., Jongejan, F. (2000): Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species in cattle in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **916**: 533-539.
- Sparagano, O.A.E., Carelli, G., Ceci, L., Shkap, V., Molad, T., Vitale, F., ve ark. (2002): Pan Mediterranean comparison for the molecular detection of *Theileria annulata*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **969**: 73-77.
- Sparagano, O., Torina, A., Machete, J., Canella, V., Caracappa, S. (2003): Multiple identification of tick-borne pathogens (Piroplasmidae, Anaplasmatidae and Ehrlichiae) in livestock by PCR and Macro-array-based methods. İçinde: *The 11th*

- International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology*. Bangkok, Thailand.
- Sparagano, O.A.E. (2005): Impact of ticks and tick-borne diseases on agriculture and human populations in Europe. *Journal of Agricultural Sciences*, **143**: 463-468.
- Spitalska, E., Torina, A., Cannella, V., Caracappa, S. and Sparagano, O. (2004): Discrimination between *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in their vectors and hosts by RFLP based on the 18S rRNA gene. *Parasitology Research*, **94**: 318-320.
- Stephens, S.A., Howard, C.J. (2002): Infection and transformation of dendritic cells from bovine afferent lymph by *Theileria annulata*. *Parasitology*, **124**: 485-493.
- Stockham, S.L., Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., Schmidt, D.A., Scott, M.A., Robinson, T.W. ve ark. (2000): Theileriosis in a Missouri beef herd caused by *Theileria buffeli*: Case report, herd investigation, ultrastructure, phylogenetic analysis and experimental transmission. *Veterinary Parasitology*, **37**: 11-21.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Hines, S.A., Perryman, L.E., McElwain, T.F. (1991): Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **46**: 45-52.
- Sugimoto, C., Fujisaki, K. (2002): *Non transforming Theileria parasites of ruminants*. İçinde: Dobbelaere, D.A.E., McKeever, D.J. (eds.). *World Class Parasites (3), Theileria*. Kluwer Academic Publishers, London. pp.93-107.
- Tanaka, M., Onoe, S., Matsuba, T., Katayama, S., Yamanaka, M., Yonemichi, H. (1993): Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**(10): 2565-2569.
- Tanyüksel, M., Vatansever, Z., Karaer, Z., Araz, E., Haznedaroğlu, T., Yukarı, B.A. ve ark. (2002): Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **26**(1): 42-47.
- Theilériose (2007). Departement Veterinaire, Erişim 18.01.2007, <http://www.itg.be/jaarverslag00/fr/dep-diergeneeskunde.htm> .
- Thrusfield, M. (1986): *Veterinary Epidemiology*. Butterwoths, London.

- Tüzer, E. (1980). *İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen Babesia, Theileria ve Anaplasma türleri ve bunlarda oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma*. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi.
- Uilenberg, G. (1981): *Theileria species of domestic livestock*. İçinde: Irvin, A D., Cunningham, M P., Young A.S. (eds.). *Advances in the control of theileriosis*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The Netherlands. pp.4–37.
- Uilenberg, G. (1983): *Tick-Borne Livestock Diseases and Their Vectors; 2.Epizootiology of tick-borne diseases*. İçinde: *Ticks and tick-borne diseases, selected articles from the World Animal Review*. FAO, Rome.
- Uilenberg, G. (2006): Babesia –A historical overview. *Veterinary Parasitology*, **138**: 3-10.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. and Jennings, F.W. (1987): *Veterinary Parasitology*, Longman Sci. and Techn., Essex, İngiltere.
- Vatansever, Z., Nalbantoğlu, S. (2002): Sahada *Theileria annulata* ile enfekte sığırların nested PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), IFA (İndirekt Floresan Antikor Testi) ve kan frotisi bakışı ile saptanması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **26**: 1465-1469.
- Vatansever, Z., İça, A., Deniz, A., Nalbantoğlu, S., Karaer, Z., Çakmak, A. ve Sparagano, O. (2003a): Ankara Yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB) ve indirekt floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13.Ulusal Parazitol Kongr., 8-12 Eylül 2003, Konya. Program ve Özet Kitabı, p.194.
- Vatansever, Z., İça, A., Deniz, A., Nalbantoğlu, S., Karaer, Z., Çakmak, A. ve Sparagano, O. (2003b): Kenelerle nakledilen hastalıkların eşzamanlı tanısında makroarray teknolojisinin kullanımı: Reverse line blotting tekniği. 13.Ulusal Parazitol Kongr., 8-12 Eylül 2003, Konya. Program ve Özet Kitabı, p.195.
- Vogl, S. (2004): Molekular-phylogenetische Differenzierung von Babesien des Rinde. Tierärztl. Fak. Ludwig-Maximilians-Univ.München, Inst. Vergl. *Tropenmedizin und Parasitologie*, (Dissertation).
- Wagner, G., Cruz, D., Holman, P., Waghela, S., Perrone, J., Shompole, S. ve Rurangirwa, F., (1992): Non-immunologic methods of diagnosis of babesiosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 Suppl 3:193-9.

- Weiland, G., Reiter, I. (1988): *Worldwide impact of Babesiosis*. İçinde: Ristic, M. (ed.). *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Florida. Pp143-162.
- Wright, I.G. ve Goodger, B.V. (1988): *Pathogenesis of babesiosis*. İçinde: Ristic, M. (ed.). *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Florida. pp99-118.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., Gray, J.S. (2003): *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**: 622-636.
- Zintl, A., Gray, J.S., Skerrett, H.E., Mulcahy, G. (2005): Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunology*, **27** (4): 115–120.

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ ETİK KURULU

İstanbul University Veterinary Faculty Ethic Committee

Karar No:2004/97

27.07.2004

İlgi: İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlığı'nın 2-3546 sayı ve 22/07/2004 tarihli yazısı

Fakültemiz Parazitoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Zahide BİLGİN'in "Trakya'da Sığırlarda Bulunan *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin ve Bunların Sığırlarda Yaygınlığının Reverse Line Blotting (RLB) Tekniği ile Araştırılması" başlıklı araştırma projesi kurulumuz tarafından incelenmiş ve "**Etik Kurul İlkelerine Uygun Bulunmuştur**".

Prof.Dr. Tamer DODURKA

Başkan
(İzinli)

Prof.Dr. Oya KELEŞ

Başkan Yardımcısı

Doç.Dr. Mustafa ÖZCAN

Raportör

Doç.Dr. Ayşen FIRAT

Üye
(İzinli)

Yard.Doç.Dr.Dr. Altan ARMUTAK

Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zahide	Soyadı	BİLGİN
Doğ.Yeri	Bulgaristan	Doğ.Tar.	01.07.1972
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	11888517122
Email	z.bilgin@istanbul.edu.tr	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lisans	İ.Ü. Veteriner Fakültesi	1995
Lisans	İ.Ü. Veteriner Fakültesi	1995
Lise	Özel İzmir Amerikan Lisesi	1990

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Ens.	2001-halen

Bildiği Yabancı diller

Yabancı Dil	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	94	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

LES / ALES Puanı

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı		65,9	
ALES Puanı		77.2	

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Ofis Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri vb

Polat E, **Bilgin Z**, Yakar H, Altaş K, Tüzer E, (2003).,İstanbul’da sahihsiz ve sahipli köpeklerde iç organlar leiyşmanyazının serolojik olarak araştırılması.,XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi. (8-12 Eylül 2003 Konya) Özetler Kitabı., p.159, 2003

Tüzer,E., Turan,N. **Bilgin,Z**. TÜBİTAK TOVAG 104V004 (VHAG 2070) nolu “*İstanbul’da Köpeklerde Leishmaniosis’in Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Saptanması ve Yaygınlığının Araştırılması*“ başlıklı proje

04-08 Ekim 2004 tarihleri arasında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı ve Hebrew Üniversitesi Tıp Fakültesi ile ortaklaşa düzenlenen “Tıbbi Önemi Olan Eklembacahlılar” kursu