T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VPR-YL-2006-0001

EGE BÖLGESİ'NDE KÖPEK BABESİOSİS'İNİN YAYGINLIĞI

HAZIRLAYAN: **Veteriner Hekim Gülcan KIRLI**

DANIŞMAN: **Yrd. Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ**

AYDIN-2006

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ ..... **I**

ABSTRACT ..... **II**

ÇİZELGELER LİSTESİ ..... **III**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **IV**

KISALTMALAR VE SİMGELER ..... **V**

1. GİRİŞ **1**

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR **2**

2.1. Tanım **2**

2.2. Tarihçe **2**

2.3. Sınıflandırmadaki Yeri **3**

2.4. Etiyoloji **3**

2.5. Morfoloji **3**

2.6. Epizootiyoloji **6**

2.7. Yaşam Döngüsü **9**

2.8. Patogenezis **12**

2.9. Klinik Bulgular **13**

2.10. Laboratuvar Bulguları **16**

2.11. Nekropsi Bulguları **17**

2.12. Bağışıklık **18**

2.13. Tanı **18**

2.13.1. Moleküler Tanı Yöntemleri **19**

2.14. Sağaltım **21**

2.15. Korunma ve Kontrol **22**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **23**

3.1. DNA Ekstraksiyonu **23**

3.2. PCR (Polimerase Chain Reaction) **24**

3.3. Reverse Line Blot Hibridizasyon Tekniği **25**

3.3.1. PCR **25**

3.3.2. Reverse line blot hibridizasyon **26**

Sayfa No

3.4. Sekans Analizi **28**
3.5. İstatistik Analiz **28**
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA **29**
4.1. Araştırma Bulguları **29**
4.1.1. *Babesia canis* spesifik PCR sonuçları **29**
4.1.2. *Theileria/Babesia* soy PCR sonuçları **30**
4.1.3. RLB sonuçları **31**
4.1.4. Sekans analizi sonuçları **33**
4.1.5. İstatistik analiz sonuçları **36**
4.2. Tartışma **37**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **40**
ÖZET **41**
SUMMARY **42**
TEŞEKKÜR **43**
KAYNAKLAR **44**
ÖZGEÇMİŞ **51**

ÖZ

Bu çalışmanın amacı Ege Bölgesindeki köpeklerde babesiosise neden olan türler ile bu türlerin alt türlerini saptamak ve köpek babesiosisinin yaygınlığını ortaya çıkarmaktır. Çalışma için Ege Bölgesindeki 6 farklı yerleşim merkezindeki (Aydın, Kuşadası, Selçuk, Bodrum, Marmaris, Manisa) bulunan barınaklardaki 320 sokak köpeğinden ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dahiliye Kliniklerine getirilen 63 adet sahipli köpekten kan alınmıştır. Alınan kanlardan DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra *Babesia canis*'e spesifik primerler kullanılarak PCR uygulanmıştır. PCR sonuçlarına göre toplam 383 köpekten 40 tanesi (%10.4) pozitif olarak bulunmuştur. 40 pozitif örnek reverse line blot (RLB) hibridizasyon tekniği ile incelenerek *B. canis*'in alt tür tespiti yapılmış ve alt türün *B. canis vogeli* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 6 farklı yerleşim merkezinden seçilen birer pozitif örnek ile ADÜ Veteriner Fakültesi Dahiliye Kliniğine getirilen örneklerden seçilen bir adet pozitif örnek sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonuçlarında ise örneklerin % 99 oranında *B. canis vogeli* (*B. canis* spp. Okinawa suşu)'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *B. canis*, *B. canis canis, B. canis vogeli, B. canis rossi,* PCR, RLB, Köpek

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of *Babesia canis* that causes babesiosis in dogs in Aegean Region. We also aimed to determine the subspecies of *B. canis* in this region. Blood samples were collected from 320 stray dogs captured and kept in municipal shelters located in Central Aydin, Kusadasi, Selcuk, Central Manisa, Bodrum, Marmaris, all within the Aegean region of Turkey. Also, an additional 63 blood samples were obtained from owned dogs that had been admitted to the Small Animal Clinic of Veterinary Faculty, Adnan Menderes University. DNA was extracted from whole blood and PCR was performed by using *B. canis* specific primers. PCR results revealed that 40 dogs (10.4%) were infected with *B. canis*. In order to identify the subspecies of *B. canis* positive PCR samples reverse line blot hybridisation technique was used. The results showed that all positive samples were positive for *B. canis vogeli*. In addition to this, the PCR products of 18S rRNA gene of *B. canis* isolated from seven infected dogs, one isolate originating from each of the six different locations and one from the Small Animal Clinic of Veterinary Faculty, ADU were sequenced. The results of sequence analysis indicate that they are closely related to *B. canis vogeli* (*B. canis* spp. Okinawa strain) with 99 % similarity.

Key words: *B. canis*, *B. canis canis, B. canis vogeli, B. canis rossi,* PCR, RLB, dog

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa No

Tablo. 1 Türkiye'de köpeklerde bildirilen babesiosis olguları 7

Tablo. 2 RLB hibridizasyon tekniğinde kullanılan oligonükleotidler, sulandırma konsantrasyonları ve sekansları 27

Tablo. 3 Yerleşim merkezlerine göre *Babesia canis* PCR sonuçları 29

Tablo. 4 Kan örneklerinin *Theileria*/*Babesia* soy PCR sonuçları 31

Tablo. 5 Pozitif örneklerin yerleşim merkezleri arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi 36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil. 1 Köpeklerdeki babesiosis etkenlerinin gelişme formları..... 4

Şekil. 2 *Babesia canis* 5

Şekil. 3 *Babesia gibsoni*..... 6

Şekil. 4 Köpeklerde babesiosis'in yaşam döngüsü 10

Şekil. 5 *B. canis*-spesifik PCR görüntüsü 30

Şekil. 6 *Theileria/Babesia* soy PCR görüntüsü..... 30

Şekil. 7 RLB sonuçları..... 32

Şekil. 8 RLB sonuçları..... 32

Şekil. 9 Her bölgeden bir pozitif PCR örneğinin sekans analiz sonuçları 33

KISALTMALAR ve SİMGELER

PCR	:	Polymerase Chain Reaction
RLB	:	Reverse Line Blot Hybridization
ssr RNA	:	Small Subunit Ribosomal RNA
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFAT	:	İmmun Floresan Antikor Testi
ARDS	:	Yetişkin Respiratorik Üzüntü Sendromu
ARF	:	Akut Renal Yetmezlik
IMHA	:	Immun Mediated Hemolitic Anemia
DIC	:	Dissemine Intravascular Koagulopathie
SPA	:	Soluble Parasite Antigen
MCV	:	Mean Corpuscular Volume
ALT	:	Alaninamino Transferans
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetat
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat

1. GİRİŞ

Köpeklerde babesiosis, *İxodidae* ailesine bağlı bazı kene türlerinin vektörü olduğu protozoal bir hastalıktır. Babesiosis genel olarak tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde görülmekte olup; köpekler yanında yabani karnivorlarda da rastlanmaktadır (Quinn et al.,1997; Kjemtrup et al.,2000; Lobetti,2002; Cleveland et al.,2002).

Babesiosis köpeklerde dünyada yaygın olarak görülen bir hastalık olup; PCR'la Japonya'da 80 köpekten 12'si; Macaristan'da 44 köpekten 39'u; Hollanda'da 23 köpekten 18'i; Slovenya'da 238 köpekten 14'ü; Güney Afrika'da ise 297 köpekten 44'ü *Babesia* pozitif bulunmuştur (Inokuma et al.,2004; Matjila et al.,2004; Duh et al.,2004; Matjila et al.,2005; Földvari et al.,2005). Kliniklere hemoglobinüri, anemi, ateş ve ikterus belirtileri gösteren çok sayıda köpek getirilmesine rağmen, *Babesia* etkenlerinin kan frotilerinde görülme oranının düşük olması nedeniyle hastalık genelde tespit edilememekte ve hastalar genel tedavi uygulanarak gönderilmektedir. Özellikle hastalığı nakleden kenelerin yurdumuzda yaygın olarak bulunması babesiosis'in ülkemizde de yaygın olduğunu düşündürmektedir (Çoşkuner, 1971). Ancak Türkiye'de bu konu üzerine yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olması nedeniyle hastalığın yaygınlığı net olarak bilinmemektedir.

Yapılan literatür taramalarında Türkiye'de köpeklerde babesiosis ile ilgili çok az sayıda çalışma yapıldığı görülmüştür (Özcan,1961; Ulutaş et al.,2003; Ulutaş et al.,2005). Özellikle Aydın ve çevresinde bir vaka bildirimi ve *Babesia canis* saptanan yedi köpekte akut faz oranlarını inceleyen çalışma dışında bu konu ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır (Ulutaş et al.,2003; Ulutaş et al.,2005). Bu çalışmada Ege Bölgesi'nde köpeklerde moleküler tanı yöntemlerinden PCR tekniği kullanılarak *Babesia canis'*in varlığının araştırılması ve alt türlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Tanım

Köpeklerde babesiosis, hemolitik anemi, ikterus, hemoglobinüri ve ateş gibi klinik semptomlar ile karakterize protozoal bir hastalıktır (Kjemtrup et al.,2000; Lobetti,2002; Cleveland et al.,2002).

2.2. Tarihçe

Köpek babesiosis'inin tarihçesi çeşitli araştırıcılarca Mimioğlu et al. (1969), Uilenberg et al. (1989), Birkenheuer et al. (2004) belirtilmiştir. Apikompleksa kökünde yer alan *Babesia* etkenleri ilk defa Romanya sığırlarında Babés (1888) tarafından keşfedilmiştir. Sığırlardaki *Babesia* etkenlerinin tanımlanmasının ardından *Babesia canis* Piana ve Galli-Valerio (1895) tarafından ilk olarak *Pyrosoma bigeminum var. canis* adıyla tanımlanmıştır. Nuttall (1910) Doğu Afrika'da çakallarda tespit ettiği intraeritrositik piroplasmı *Piroplasma rossi* olarak adlandırmıştır. Daha sonra bu parazit hakkında yeni bilgiler edinilmiş ve *Piroplasma rossi* cins adı değiştirilerek bir müddet *Rossiella rossi* olarak kullanılmıştır. Neitz ve Steyn (1947) *Babesia canis* ile *Babesia rossi*'nin aralarında morfolojik olarak belirgin bir farklılık olmadığını ve muhtemelen aynı tür ya da aynı alt tür içinde yer almaları gerektiği kanısına varmışlardır. Reichenow (1937) *Babesia canis vogeli*'ye boyutlarının büyük olması nedeniyle 1926'da Sergent ve arkadaşlarının sığırlardaki *Babesia major* tanımlaması gibi *B. major* adını vermiş, daha sonra *Babesia vogeli* olarak değiştirmiştir. Ancak *Babesia vogeli* tanımı unutulmuş ve tek başına bir tür olarak genelde kullanıma geçmemiştir. Uilenberg ve ark. (1989) bu etkenlerin morfolojik açıdan benzerlik göstermelerine rağmen genetik ve antijenik farklılıkları, vektör spesifitesi, enzimatik özellikler, patojenite ve lokalize oldukları coğrafi dağılım farklılıkları, kros reaksiyon vermeleri ve serolojiye dayanarak taksonomik düzeyde *Babesia canis*'i nomenklatürde trinominal sistemde üç alt türe ayırmak gerektiğini önermişlerdir. *Babesia canis canis,B. canis rossi, B. canis vogeli* olarak kullanılmaya başlanmıştır. Patton (1910) tarafından *B. gibsoni* çakallarda keşfedilmiştir (Mimioğlu et al.,1969; Uilenberg et al., 1989; Birkenheuer et al.,2004).

2.3. Sınıflandırmadaki Yeri

Günümüzde kullanılan ve geçerliliğini koruyan sistematiğe göre *Babesia* türleri aşağıda belirtildiği gibi apikompleksa kökü içerisinde yer almaktadır (Soulsby,1982).

Alem: Animale

Alt Alem: Protozoa

Kök: Apicomplexa

Sınıf: Sporozoa

Sınıf Altı: Piroplasmia

Dizi: Piroplasmida

Aile: Babesidae

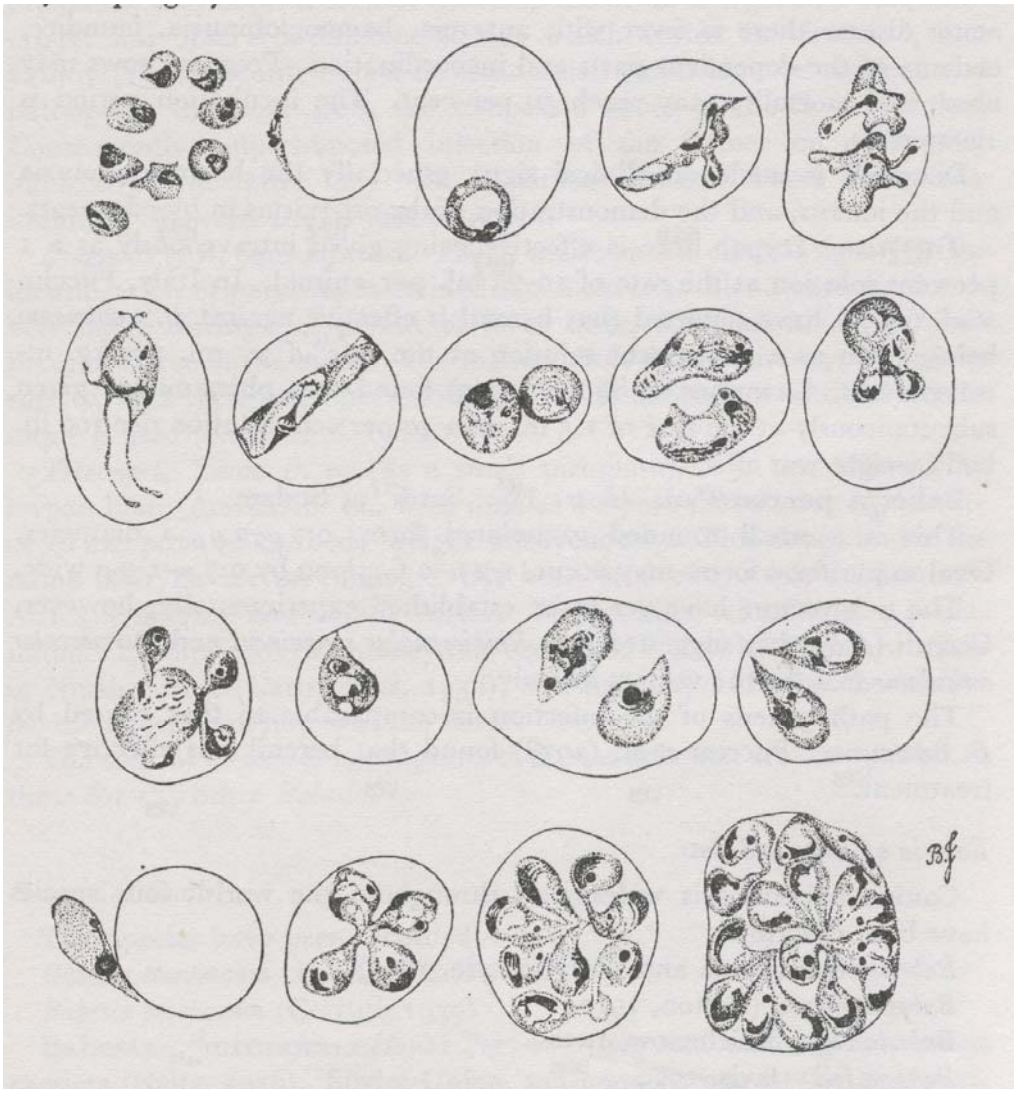
Soy: *Babesia*

2.4. Etiyoloji

Köpeklerde babesiosis'e neden olan iki tür, *Babesia canis* ve *Babesia gibsoni*'dir. *Babesia canis*'in, *B. canis canis, B. canis rossi* ve *B. canis vogeli* olmak üzere üç alt türü tanımlanmıştır. Bazı kaynaklarda *B. canis vogeli*, *B. vogeli* olarak köpeklerde babesiosis'e neden olan üçüncü bir tür olarak ele alınmıştır (Bunnag et al.,1988; Quinn et al.,1997; Kontos et al.,1997; Ripberger,1999; Matjila et al., 2004).

2.5. Morfoloji

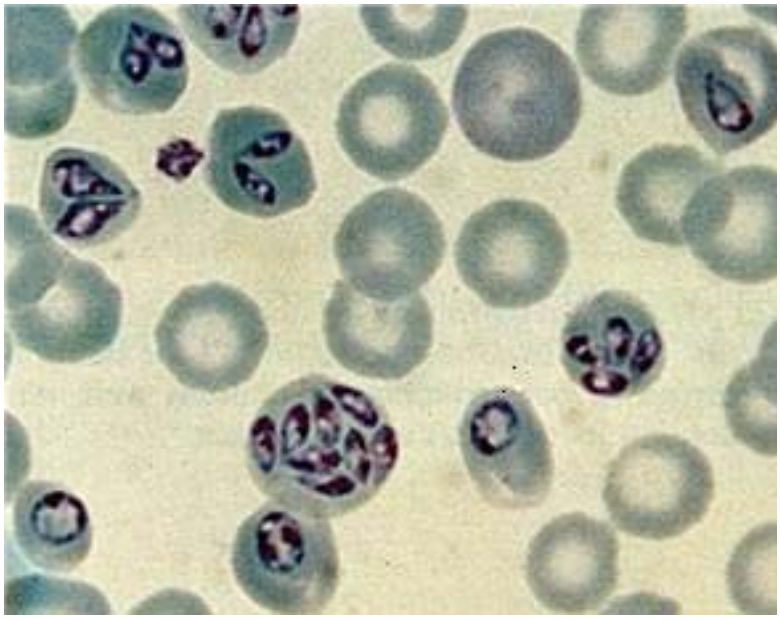
Babesia türleri eritrositler içerisinde tek ya da birden fazla sayıda yerleşim gösterir. Çeşitli boyama yöntemleri ile hazırlanan kan frotilerinde eritrsoit formları amoboid, yuvarlak, oval, taşlı yüzük ve armut formlarında, stoplazması açık mavi ve perifere ya da bir kutba lokalize olmuş kırmızı kromatin şeklinde görülür (Şekil. 1) (Macwilliams,1987).



Şekil. 1 Köpeklerdeki babesiosis etkenlerinin gelişme formları (Soulsby,1982).

Babesia türleri genişliğinin üç mikrondan büyük ya da küçük olmasına göre isimlendirilir. Genişliği üç mikrondan büyük olanlarına "Büyük *Babesia* Türleri", genişliği üç mikrondan küçük olanlarına ise "Küçük *Babesia* Türleri" adı verilir (Eren,1992; Conrad et al.,1992; Carret et al.,1999; Caccio et al.,2002; Muhlnickel et al.,2002).

Babesia canis "Büyük *Babesia* Türü" olup, 2.4 x 5.0 mikrometre boyutlarında, eritrosit içinde genellikle tek armut formunda ya da merozoitlerin ikiye bölünmesi suretiyle çift armut formunda yer alır (Quinn et al.,1997; Tüzer et al.,1999; Kjemtrup et al.,2000). Stoplazması vakuollüdür ve bir ucu nokta şeklinde düğmeli, bir ucu ise küttür (Mimioğlu et al.,1969; Solusby,1982). Bir eritrosit içerisinde on altı kadar *B. canis*'e rastlanabilir (Şekil.2) (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Tüzer et al.,1999).



Şekil. 2 *Babesia canis* (www.legalpracahorro.com.br).

Babesia gibsoni ise "Küçük *Babesia* Türü " olup, 1,0 x 3,2 mikrometre boyutlarında, pleomorfiktir. Genellikle de farklı nükleus ve stoplazması ile eritrosit içerisinde yuvarlak, oval ya da taşlı yüzük gibi çeşitli biçimlerde rastlanmaktadır (Şekil. 3). Bu tür bölünürken uzun, ufak nokta cisimcikler, tetrat ya da bantlar halinde gözlenebilmektedir. Aynı zamanda çoğu küçük *Babesia* türlerinde etkenlerin bölünme aşamasında "maltese cross" formu (eş zamanlı dört merozoit oluşumu)'nun yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (Kjemtrup et al.,2000). Bir eritrosit içerisinde ise beş etkene birden rastlanabilir (Macwilliams,1987; Conrad et al.,1991; Quinn et al.,1997; Turgut,2000; Kocan et al.,2001).

Şekil. 3 *Babesia gibsoni*(www.yamagiku.co.jp/pathology).

2.6. Epizootiyoloji

Babesiosis; tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde, özellikle kene populasyonuna bağlı olarak dağılım gösterir (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997). *Babesia canis* dünyada yaygın olup; Avrupa, Amerika, Asya, Afrika ve Avusturalya'da görülmektedir (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Ripberger,1999; Lobetti,2002). Alt tipleri olan *B. canis canis* daha çok Avrupa'da; *B. canis vogeli* Asya, Avrupa, Kuzey Afrika, Orta Doğu, Avusturalya ve Kuzey Amerika'da; *B. canis rossi* ise Güney Afrika'da görülmüştür (Kjemtrup et al.,2000; Lobetti,2002; Birkenheuer et al.,2003; Baneth et al.,2004). *Babesia gibsoni* ise sınırlı coğrafik alanda dağılım göstermekte olup; Asya ve Afrika'nın büyük bölümünde görülmektedir (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Ripberger,1999; Lobetti,2002). Ancak son yıllarda Kuzey Amerika'da da *B. gibsoni* enfeksiyonuna rastlandığı bildirilmiştir (Kjemtrup,2000; Kocan et al.,2001). Türkiye'de köpeklerde şimdiye kadar bildirilen olgular ise Tablo. 1'de gösterilmiştir.

Tablo. 1 Türkiye'de köpeklerde bildirilen babesiosis olguları

ÖZCAN (1961)	3 Aylık köpek
	(yeme ve içmede tamamen kaybolma, asites)
ULUTAŞ ve ark. (2003)	4 Aylık Rotweiller, 1 Erkek, 1 Dişi kardeş
	(iştahsızlık, halsizlik, abdominal genişleme)
ULUTAŞ ve ark. (2005)	12 Yaşlı Alman Shepherd, 24 Yaşlı Cocker Spaniel
	(Ilımlı hastalık tablosu)
	4 Yaşlı iki Rottweiler, 22 Yaşlı Terrier, 36 Yaşlı Boxer
	(Şiddetli hastalık tablosu)
	7 Yaşlı Terrier
	(Komplike hastalık tablosu)

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda küçük *Babesia* türlerinin moleküler filogenetik analizlerinde genetik olarak en az üç farklı formunun olduğu, bunların ise üç farklı taksonomik grup içerisinde Asya, İspanya ve Kaliforniya orijinli köpeklerden elde edilen küçük piroplasmlar olduğu tespit edilmiştir (Birkenheuer et al.,2003; Muhlnıckel et al.,2002; Kjemtrup,2000; Zahler et al.,2000). Bunlar içerisinde *B. gibsoni*'nin Asya genotipi ve ABD-Kaliforniya genotipi Kuzey Amerika'da tespit edilmiştir. Küçük *Babesia* piroplasmından biri de Avrupa'da ilk olarak rapor edilen ve *Theileria anna*e olarak isimlendirilen *B. gibsoni'*nin İspanya isolatıdır (Zahler et al.,2000; Birkenheuer et al.,2003). Yapılan filogenetik analizlerde *B. gibsoni* 1 ve *B. gibsoni* 2 olarak adlandırılan Asya isolatlarının *Babesia* cinsi içerisinde; Kaliforniya isolatının ise filogenetik analizler sonucunda *Theileria* cinsi içerisinde yer aldığı belirtilmektedir (Zahler et al.,2000).

Babesia canis köpek, kurt, tilki ve çakallarda enfeksiyona neden olmaktadır (Macwilliams et al.,1987; Bunnag et al.1988; Yukarı,2000). Ayrıca İspanya'da yapılan bir araştırmada *B. canis canis* atlarda, *B. equi* ise asemptomatik olarak köpeklerde tespit edilmiştir (Criado-Fornelio et al.,2003a). Ancak PCR'a dayanan bu araştırmada kontaminasyondan kaynaklanan çapraz reaksiyonların da göz önünde tutulması ve araştırmanın yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca son yıllarda İspanya ve

Portekiz'de yapılan çalışmada ssr RNA geninin *B. canis canis* olarak tanımlanan bölgesindeki DNA dizisi üç kedide amplifiye edilmiştir. Bu çalışma kedilerde *Babesia canis* enfeksiyonunun moleküler olarak ilk kanıtı olarak geçmektedir (Criado-Fornelio et al.,2003c). İsrail'de yapılan bir çalışmada ise iki evcil kedide tespit edilen *Babesia* etkeninin morfolojik ve klinik açıdan incelenmesi ve genetik karakterizasyonunun yapılması amaçlanmış. Bu çalışmada yapılan genetik analizlerde belirgin dizilim farklılıklarının olması, bu bölgenin daha önce *B. canis*'in alt türlerinin belirlendiği bölge olması ve bu parazitin merozoit ve trofozoit safhalarının daha küçük boyutta olması bu kedi genotipinin yeni bir *Babesia* alt türü olarak tanımlanmasına neden olmuştur. Bu alt tür *B. canis subspecies presentii* olarak isimlendirilmiştir (Baneth et al., 2004).

Babesia gibsoni'nin köpek, kurt, çakal, tilki dahil olmak üzere yaban gelinciği ve porsuk gibi yabani karnivorlarda da enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Macwilliams,1987; Bunnag et al.,1988). *Babesia canis* ve *Babesia gibsoni* ile oluşturulan deneysel enfeksiyonlar ise tilkilerde ve boz kurtlarda görülmüştür (Macwilliams,1987). Bununla birlikte Fransa'da yapılan araştırmalarda bazı köpek ırklarının (Spaniel, Cocker, Griffon, Yorkshire terrier, Doberman, Pekinese) babesiosise daha duyarlı olduğu, bazı köpek ırklarının (Beagle, Fox terrier, Porcelain, Teckel, Mongrel) ise dirençli olduğu tespit edilmiştir (Martinod et al.,1986). Diğer araştırmalarda da Greyhound ırkında enfeksiyonun diğer köpek ırklarına oranla görülme oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Turgut,2000; Kraje,2001; Plotnick,2003).

Babesia canis canis'in vektörü *Dermacentor reticulatus*, *B. canis vogeli*'nin vektörü *Rhipicephalus sanguineus*, *B. canis rossi*'nin vektörü *Haemaphysalis leachii*, *B. gibsoni*'nin vektörü ise *Rhipicephalus sanguineus* ve *Haemaphysalis bispinosa* soylarına bağlı üç konakçılı kene türleridir (Macwilliams,1987; Uilenberg et al.,1989; Lobetti,2002). *B. gibsoni*'yi *Haemaphysalis longicornis*'in de naklettiği bildirilmektedir (Conrad et al.,1991; Inokuma et al.,2003; Inokuma et al.,2004). Bu kene türleri *Babesia* türlerini hem transtadial hem de transovarial yolla nakletmektedir (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Lobetti,2002). Transstadial nakilde kene bir gelişme döneminde aldığı etkeni diğer bir gelişme döneminde kan emme esnasında konağa aktarır (Larva döneminde aldığı etkeni nimf döneminde nakletmesi gibi). Transovarial nakil ise dişi kenede ovaryumların enfekte olması sonucu yumurtalardan çıkan enfekte larvaların nimf aşamasında etkeni konağa aktarması sonucu oluşur (Soulsby,1982; Yukarı,2000). Enfeksiyonun iatrojenik olarak bulaşmasında da kan transfüzyonu büyük rol oynar (Macwilliams,1987; Lobetti,2002). Ayrıca mekanik olarak

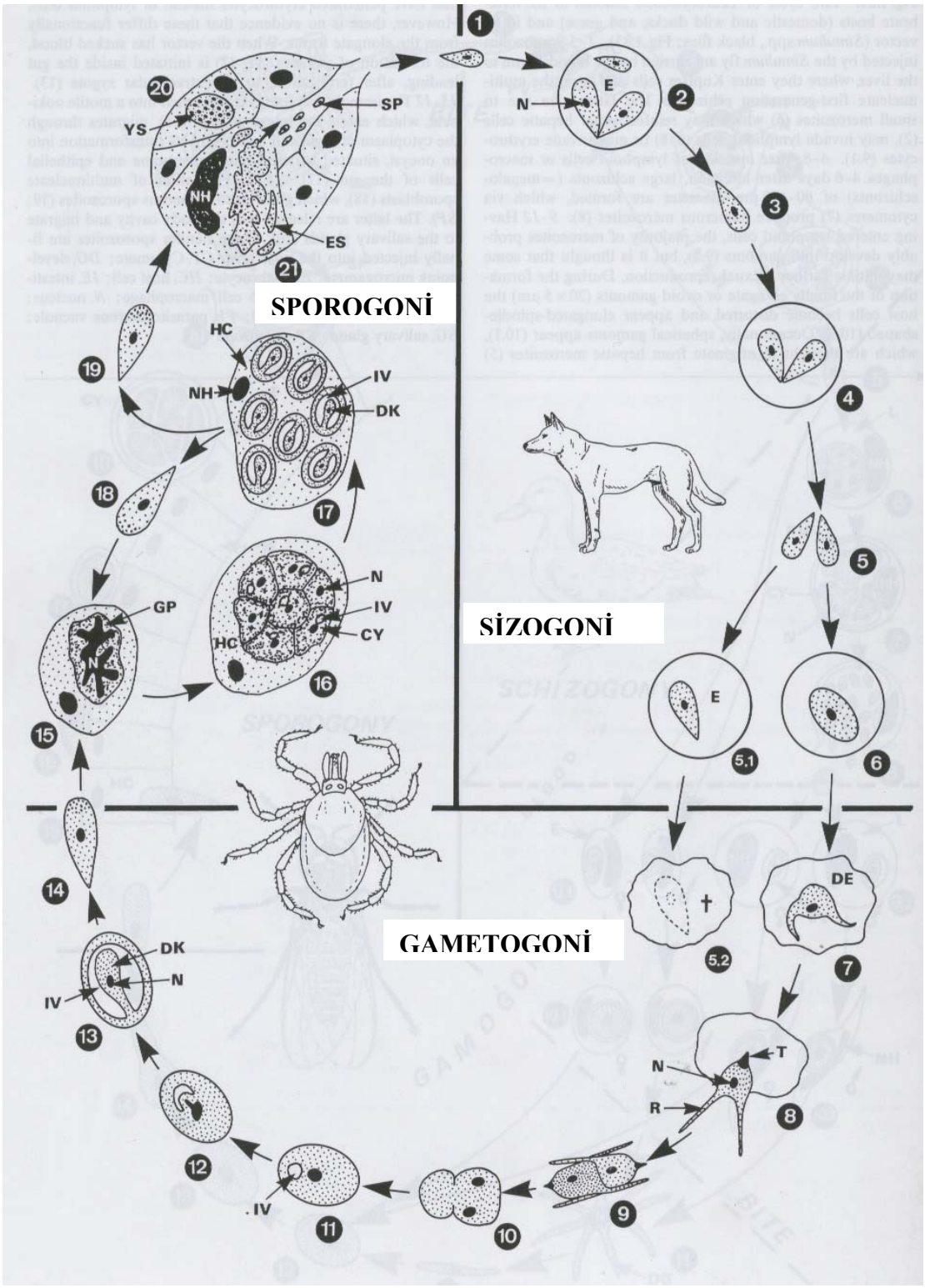
kan emici sineklerin hastalığı nakledebildiği tahmin edilmektedir (Macwilliams,1987). *Babesia canis* ile enfekte kanın duyarlı köpeklere inokulasyonunda ise inokulasyon sonrası 3-4 gün süren geçici bir parazitemi tablosu gözlenmiş ve yaklaşık on gün boyunca dolaşımda etkenlere rastlanmamıştır. İnokulasyonun ondördüncü gününde ise çok daha şiddetli bir parasitemi tablosu görülmüş ve yirminci günde pik seviyeye ulaştığı gözlenmiştir (Ewing,1965; Soulsby,1982; Macwilliams,1987).

Doğal enfeksiyonu takiben oluşan inkubasyon periyodu *B. canis*'te 10 gün ile 3 hafta arasında değişir. *Babesia gibsoni*'de ise bu süre 2-4 hafta arasında değişmektedir (Macwilliams,1987).

Genç köpekler ve köpek yavruları babesiosise daha duyarlıdır (Mimioğlu et al.,1969; Bunnag et al.,1988; Quinn et al., 1997; Soulsby,1982). Özellikle de üç yaşından küçük, iki-sekiz haftalık köpek yavrularında babesiosis şiddetli seyreder (Ripberger,1999). Bazı kaynaklarda ise *B. gibsoni* enfeksiyonunun 4 aylıktan küçük hayvanların ancak % 10'unda görüldüğü bildirilmiştir (Macwilliams,1987; Ripberger,1999). Aynı zamanda splenektomi, immunsupresyon, eş zamanlı görülen hastalıklar ve stres hastalığa karşı direnci düşürür (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997).

2.7. Yaşam Döngüsü

Her ne kadar çeşitli hayvan türlerine özgü *Babesia* türleri bulunsa da biyolojik gelişimleri etken, vektör, konakçı sistemine göre seyreder ve birbirine benzemektedir (Soulsby,1982).



Şekil. 4 Köpeklerde babesiosis'in yaşam döngüsü (Bunnag et al.,1988).

Enfekte kenenin kan emmesi esnasında tükrük bezi asini hücrelerinde bulunan sporoblastlar konağın vücut ısısının etkisiyle 48–72 saat içerisinde aktive olup sporozoitlere dönüşürler ve konağa aktarılırlar. Konakçı hayvana verilen sporozoitler burada trofozoit olurlar. Trofozoitin eritrositlere girişi penetrasyona bağlıdır (Soulsby,1982). Bu penetrasyon trofozoit ile eritrosit membranının teması ile başlar. Parazitin ön ucu eritrosit membranına doğru dönerek eritrosit-parazit membranı kaynaşır. Enzim deposu olan rhoptirilerden salınan enzimler eritrosit membranının eritilmesinde kullanılır. Eritrosit membranı çentiklenir, invagine olur ve parazit oluşan vakuolle birlikte eritrosit içine girer. Etken, eritrosit içerisine eritrositten bir parça ile girdiğinden eritrositin yabancı cisim etkisinden koru Eritrosit içerisinde önce yuvarlak bir form alır, bir süre sonra amoboid ve armut formlarına dönüşür. Daha sonra da merogoni olarak isimlendirilen ikiye bölünme yoluyla çoğalarak merozoite dönüşürler ve gelişimlerini sürdürürler. Bu gelişme sırasında eritrositleri parçalar ve kan plazmasına dökülen etkenler yeni eritrositleri enfekte ederler. Vektör kene ise kan emme esnasında eritrositlerle birlikte merozoitleri alır. Bu enfekte eritrositler kenenin bağırsağında parçalanarak etkenler bağırsak boşluğunda serbest hale geçer. Etkenlerin bir kısmı sindirilir. Kalan dayanıklı merozoitler ise oval gamont yönünde farklılaşma gösterir. Bu oval gamontlardan çıkıntılar gelişerek ışınsal uzantılı yapılar şekillenir. Bu yapılardan makro ve mikrogametler oluşur (*Babesia* türlerinde makro ve mikrogametler birbirine benzer). Mikrogamet, makrogameti döller ve zigot oluşur. Oluşan zigot hareketli olup, kenenin bağırsak epitel hücrelerine girer. Burada zigot içerisinde gelişen vakuolun yapısının değişimiyle kinet oluşur. Oluşan kinet gelişip büyüdükten sonra çoğa bölünmek suretiyle sporokinetleri oluşturur. Sporokinetler zigotu parçalayarak bağırsak boşluğuna dökülürler. Tekrar bağırsak epitel hücrelerine girip çoğalmasını sürdürebildiği gibi, malpighi tubuluslarına, epidermis hücrelerine, kaslara ve hemolenfe giderler. Eğer kene dişi ise sporokinetler ovaryumlara da giderek oluşacak yeni nesillerin enfekte olmasına yol açarlar (Transovarial nakil). Sporokinetlerin bir kısmı ise hemolenf yoluyla tükrük bezi asini hücrelerine gelir ve burada sporogoni dönemini geçirirler. Önce endopoligoni yoluyla çoğalarak sporoblastları oluştururlar. Daha sonra da sporozoitler meydana gelir (Soulsby, 1982; Bunnag et al.,1988).

Vektör kenelerde transovarial nakilde keneler etkeni larva aşamasında aldığı için ancak nimf aşamasında enfeksiyonu konağa nakleder. Transstadial nakilde ise, bir gelişme döneminde aldığı etkeni diğer bir gelişme döneminde konağa nakleder. Örneğin iki konaklı bir kene larva aşamasında konağa tutunur ve hayvan enfekte ise etkenleri alır. Doymuş nimf

halde toprağa düşer, gömlek değiştirir ve aç olgun olur. Aç olgun aşamasında tekrar duyarlı bir hayvandan kan emerse, etkenleri de bu konağa verir. Genellikle transovarial nakil tek konakçılı kene türlerinde, transstadial nakil ise iki ve üç konakçılı kenelerde görülmektedir (Soulsby, 1982).

2.8.Patogenezis

Hemolitik anemi köpeklerde görülen başlıca semptomdur. İntravaskuler/ ekstravaskuler ya da her ikisi birden kaynaklı olabilir. Anemi, inflamatorik ajanların salınımı ve vaskuler endotelyal zarardan kaynaklanan hipoksi ve doku hasarı ile sonuçlanır. Hastalığın şiddeti multiorgan disfonksiyonu ile birlikte seyreden hemolitik anemi ya da hipotensif şok gelişmesine bağlıdır (Jacobson et al.,1994; Kraje,2001).

Babesiosis'de immun aracılı hemolitik anemi (Immun Mediated Hemolitic Anemia; IMHA) ile arasındaki ilişki nadir olarak bildirilmiştir. IMHA, eritrosit membran ilişkili antikorlardan kaynaklanan eritrositlerin yapı bozukluğunun artışı olarak tanımlanmaktadır. Bu ya eritrosit membranının normal ya da yabancı olarak algılanması ve değişikliğe uğraması şeklinde oluşur. Babesiosis'de oluştuğu düşünülen IMHA, genellikle immunglobulinler ve/veya komplement aracılığıyla oluşur. Bu durumda eritrositlerin fagositozunu takiben intravasküler aglutinasyon meydana gelir. Babesiosis ile IMHA arasındaki önemli özellik anti-babesial sağaltıma rağmen hemolizin devam etmesidir (Jacobson et al.,1994).

Babesiosis'de en çok dikkati çeken ve sürekli görülen hemostatik anormallik trombositopenidir. Bu her iki komplikasyonlu (ilerleyen anemiden multiple organ disfonksiyonuna kadar görülen komplikasyonlar) ve komplikasyonsuz (yalnızca değişen derecelerde aneminin görüldüğü) durumda da rutin olarak görülmektedir. Ağır bir trombositopeninin varlığında bile klinik olarak belirgin hemorajiler babesiosisde nispeten nadirdir. Ancak thrombosit disfonksiyonu gibi thrombosit ilişkili hemorajileri başlatan ek mekanizmalar görülme oranını artırabilir. Çok şiddetli hemorajiler trombus ile bağlantılı olabilir ve bu durumda kalp, karaciğer, beyin, akciğerler, kaslar gibi çok sayıda organ etkilenmektedir. Şiddetli ya da ölümcül durumlarda ise hemorajiler görülmektedir. Babesiosis hemoliz, vaskuler endotel hasarı, asidoz, hipoksi, vaskuler durgunluk, şok ve muhtemelen endotoksemi gibi durumlarla ilişkilidir ve bunların hepsi DIC (Dissemine Intravascular Coagulopathie)'e hazırlayıcıdır (Jacobson et al.,1994; Ripberger,1999).

Köpeklerde intravaskuler hemolizis akut renal yetmezliğin (ARF) nedeni olarak gösterilebilir. Bu deskuamasyona uğramış tubular hücreler ve/veya hemoglobin castlar tarafından renal tubullerin bloke olmasından kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte intravaskuler hemoliz ve ARF arasında direkt nedensel bağlantı yoktur. Fakat eş zamanlı immunolojik ya da inflamatör süreçlerden kaynaklanmaktadır (Jacobson et al.,1994).

Babesiosis'de pulmoner ödemin patofizyolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir. İki mekanizmadan kaynaklanabilmektedir. Biri alveolar kapillar permeabilitenin artışı, diğeri ise artan hidrostatik basınçdır. Kapillar permeabilite artışı; DIC, pulmoner trombo-embolizm, hepatik hastalık ve 'şok akciğer' olarak bilinen ya da yetişkin respiratorik üzüntü sendromu (ARDS)'dan oluşabilmektedir (Jacobson et al.,1994; Kraje,2001).

Babesia canis'in serebral formunda görülen beyin kapillarındaki tıkanma ise köpeklerin beyinlerindeki kapillar damarlar içerisindeki parazit içeren eritrositlerin çok sayıda olması ile birlikte endotele karşı parazitli hücrelerin yanyana dizilmeleri sonucunda oluşmaktadır. Bu da parazitli hücrelerin endotele yapıştığını gösterir. Yapışmanın ultrastrüktural mekanizması ise tespit edilememiştir. Akut formda perifer kanda parazitemi % 1–2 iken, beyin kapillarlarında bu oranın % 90'a kadar ulaştığı tespit edilmiştir (Soulsby,1982; Jacobson et al.,1994).

2.9. Klinik bulgular

Köpeklerdeki *Babesia* enfeksiyonunda; hayvanın yaşı, bireysel özelliklerinin farklılığı, bağışıklık durumu, enfeksiyonun safhası, enfeksiyona karşı gelişen cevap, splenektomi uygulanıp-uygulanmaması ve eş zamanlı gelişen hastalıklar klinik belirtileri etkileyen faktörler arasında yer alır (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Ripberger,1999).

Babesiosis'de prepatent süre 10 ile 21 gün arasında değişmektedir. Takiben geçici bir parazitemi ve daha sonra sekonder bir parazitemi gelişir (Kraje,2001). Klinik açıdan *Babesia canis* enfeksiyonunda hastalığın seyrine göre karakteristik olarak ateş, değişen derecelerde hemolitik anemi, hemoglobinüri, trombositopeni, ikterus ve çok sayıda organda fonksiyon bozukluğu görülmektedir (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Ripberger,1999; Bicalho et al.,2004).

Hastalık perakut, akut, kronik ve subklinik seyir gösterir. Ayrıca *Babesia canis*'de serebral form da görülmektedir (Soulsby,1982; Macwilliams,1987; Kraje,2001).

Perakut babesiosis 24 saat den daha kısa sürede klinik bulguların görüldüğü ve köpeğin kollaps durumunda olduğu safhadır. Daha çok köpek yavrularında görülmektedir. Çoğunlukla şiddetli intravaskuler hemoliz ile birlikte şiddetli solgunluk, hemoglobinüri ve yüksek oranda kene enfestasyonu vardır. Özellikle genç köpeklerde yüksek parazitemi görülebilir. Bu safhadaki köpeklerin çoğunda sonradan diğer komplikasyonlarda gelişir. Genellikle de ölüm hızla gelişen dolaşım yetmezliği sonucu hypotensif şok ve pulmoner ödem sonucu görülür. Özellikle serebral babesiosis ve perakut babesiosis arasındaki fark belirsizdir. Ölüm yaygın olarak görülmektedir (Soulsby,1982; Macwiliams,1987; Jacobson and Clark, 1994; Turgut,2000). Soulsby (1982), Kraje (2001) yayınlarında belirtildiği gibi; Maegraith ve ark. (1957), şiddetli ve ölümcül seyreden köpeklerdeki *Babesia* enfeksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada paraziteminin derecesi ile klinik bulgular arasında herhangi bir direkt ilişkiye rastlamamışlardır.

Akut formda klinik belirti olarak hemolitik anemi ile birlikte göze çarpan belirtiler depresyon, zayıflık (zaafiyet), ateş (40–41,5^{o}C), iştahsızlık, letharji, dehidrasyon, susama, mukozalarda solgunluk, sarılık, solumada güçlük ve nabızda hızlanma görülür. İdrarda yüksek oranda bilirubin vardır ve idrar sarı ya da koyu kırmızı renktedir. Belirsiz hemoglobinemi ve hemoglobinüri vardır. Enfeksiyonda devam eden eritrosit parçalanmasının sonucu olarak da splenomegali ve lenfadenopati görülür. Bu belirtilerin yanısıra baş ve bacaklarda ödem, mukozalarda peteşi, stomatitis, gastritis, gözde keratitis-iritis ve kaslarda myositis gözlenebilir. Görülen ölümler ise genellikle kalp spazmı ve akut solunum yetmezliği sonucudur (Mimioğlu et al.,1969; Macwilliams,1987; Turgut,2000).

Kronik formda klinik belirtilerin belirgin olmaması nedeni ile bu formun tanımlanması zor olmakla birlikte; aralıklı ateş, iştahsızlık, düşük kondisyon kaybı ve hafif derecede ilerleyen anemi görülür. İkterus hafiftir ve hayvan ya ilerleyen zaafiyet ve kaşeksiden ölür ya da iyileşme belirtileri göstermeye başlar. Bu form 1–3 ay sürer. Kurtulan hayvanlar premunisyon kazanır. Eğer endemik bölgede iseler premunisyon hayat boyunca kalır (Mimioğlu et al.,1969; Macwilliams,1987; Kraje,2001).

Hastalığın subklinik-latent formu ise genellikle endemik bölgelerde görülür. Ancak stres oluşturan durumlarda tekrar klinik belirtiler ortaya çıkar (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Ripberger,1999).

Klinik olarak *B. canis* enfeksiyonlarında merkezi sinir sistemi bulguları daha az yaygındır. Nörolojik bulgularda paresis ve epilepsi belirtileri görülür (Soulsby,1982). Nörolojik semptomların yanısıra inkoordinasyon, hind-quarter paresis, kas tremorları, nystagmus, anisocoria, intermittent bilinç kaybı, nöbetler, uyuşukluk ve koma hali de görülmektedir. Ek olarak saldırganlık, sendeleyerek yürüme, havlama da gözlenebilmektedir (Soulsby,1982; Jacobson et al.,1994). Soulsby (1982)'in bildirdiğine göre Piercey (1947), akut serebral köpek babesiosis'inin ani ölümlerle karakterize olduğunu belirtmiştir. Purchase (1947)'e göre Soulsby (1982) bu durumda olan hayvanın perifer kanında etkenin nadir olarak rastlandığını; ancak histolojik kesitlerinde ve beyin sürme preparatlarında bol miktarda etken olduğunu bildirmiştir. Soulsby (1982) Maegraith ve ark. (1957) atfen oluşturulan akut deneysel enfeksiyonda sinirsel semptomlara rastlamamışlardır (Soulsby,1982). Enfeksiyonda perifer sinirlerin etkilendiği durumlarda ise lokomotor bozukluklar, ayaklarda romatizmal kas ağrısı, topallık hatta felç görülebilmektedir (Tüzer et al.,1999).

Atipik bulgular ise kataral bronşitisden pnömoniye kadar değişiklik gösterir. Subkutanöz ödem, asites ve purpura hemorajika görülebilir. Buna bağlı olarak iriste, ağızın mukoz membranında, dudaklarda, abdominal duvarın yüzeyinde ve bacakların iç kısmında ekimotik ya da peteşiyal kanamalara rastlanır. *Babesia canis* enfeksiyonunun Güney Amerika'da kanlı kulaklar anlamına gelen 'Nambiuvu' formunda ise, köpeklerin kulak kenarlarında özellikle de yaz aylarında kanamalara rastlanır (Mimioğlu et al.,1969; Tüzer et al.,1999).

Babesia canis'in genellikle *Ehrlichia canis* ile birlikte enfeksiyona neden olduğu bildirilmektedir. Genç köpeklerde her iki parazit birlikte olduğunda öldürücü enfeksiyonların geliştiği; fakat tek başlarına ağır seyretmedikleri bildirilmektedir (Soulsby,1982; Tüzer et al.,1999; Kraje,2001). Bu yüzden şimdiye kadar sadece *B. canis*'e atfedilen klinik tablonun oluşmasında *E. canis*'in de rolü olduğu, hastalığın önce *B. canis* ile başladığı daha sonra *E. canis* ile devam ettiği öne sürülmektedir (Tüzer et al.,1999).

Babesia gibsoni ise çakallarda hafif derecede patojen olduğu halde; köpeklerde yüksek derecede patojen olup, şiddetli enfeksiyona neden olmaktadır. (Mimioğlu,1969; Shaw et al.,2001). Klinik bulgularında yaygın olarak letharji, anoreksi ve anemi görülür. Bu bulguların yanısıra akut hastalık boyunca intermittent bir ateş gözlenebilir. Sıklıkla da belirgin bir hepatosplenomegaliye neden olmaktadır. Akut dönemden kurtulan hayvanlarda ateşin hafiflemesi ile birlikte hastalık kronik bir seyir takip etmektedir. Ölüm birkaç ay ya da birkaç

hafta sonra görülür. *Babesia gibsoni* enfeksiyonunda ikterus ve hemoglobinüri nadir olarak görülürken; *B. gibsoni*'nin *B. canis*'e nazaran daha fazla kronik formda seyir gösterdiği bildirilmektedir (Soulsby,1982; Macwilliams,1987; Conrad et al.,1991; Kontos et al.,1997; Fukumoto et al.,2001; Kraje ,2001).

2.10. Laboratuvar bulguları

Aktif eritrogenezis sonucu olarak anizositoz, makrositoz, polykromazi, retikülositoz ve metarubrisitoz dikkati çeker (Turgut,2000). Retikulositozise rağmen eritrositleri kaplayan globulinlerin oluşturduğu sferositozis nedeniyle MCV (Mean Corpuscular Volume) düşüktür (Macwilliams,1987). Ayrıca eritrositler 5,5–8,5 milyon / mm^3 normal değerinden 1–2 milyon / mm^3 değerine düşer. Kanda lökosit sayısı artar. Trombositopeni ve yaygın intravaskuler koagulasyon görülmektedir (Mimioğlu et al.,1969; Macwilliams,1987; Turgut,2000; Cleveland et al.,2002).

Metabolik olarak ise azotemi, laktik asidemi, metabolik asidosis ve karaciğer nekrozuna bağlı olarak gelişen, özellikle de köpeklerde karaciğerin spesifik enzimi olan ALT (Alanin Aminotransferans)'nin serum aktivitesinin arttığı görülür. Üriner analizler sonucunda ise bilirubinüri ve hemoglobinüri görülür (Mimioğlu et al.,1969; Macwilliams,1987; Turgut,2000; Cleveland et al.,2002).

2.11. Nekropsi bulguları

Nekropside genel bir ikterus tablosu, derialtı ve intramuskuler dokuda ödem, mukozalarda peteşiel kanamalar görülür. Eritrosit yıkımına bağlı olarak kan ince ve sulu bir görünümdedir. Sidik kesesindeki idrar kırmızı ve koyu kahverengi bir renktedir. Dalak büyümüş ve yumuşak bir hal almış, pulpası koyu kırmızı, kesit yüzü ise taşkındır. Karaciğer büyümüş ve sarı bir renk almıştır. Karaciğerde konjesyondan sentrilobuler nekrozise kadar değişen patolojik lezyonlar görülmüştür. Kalp ise soluk ve sarımtrak bir renktedir. Böbrekde sarımsı bir renk ve yumuşak bir kıvam vardır. Histolojik kesitlerinde ise nefritis görülür. Plöra, kalp, bronşlar ve bağırsaklarda küçük kanamalara rastlanır. Vücut yağları sarı jelatinöz bir hal almıştır. Aynı şekilde muköz membranlar da sarımsı renktedir. Plöra, perikard ve periton boşluğunda değişen derecelerde sıvı toplanması görülür. *Babesia canis'*de görülen serebral formda, beyin ve spinal kordda ödem görülür (Mimioğlu et al.,1969; Turgut,2000). Patolojik değişikliklerinde ise kapillar yatakta parazit içeren eritrositlerin parçalanması,

konjesyon ve makroskobik / mikroskobik hemorajiler görülür. Ödem ise değişken bir bulgudur. Serebral babesiosis'li köpeklerin beyinlerinde damar dışındaki eritrositlerin çoğunun parazit içermediği, damarlar içerisindeki parazit içeren eritrositlerin ise çok sayıda olması ile birlikte endotelyuma karşı parazitli hücrelerin yanyana dizilmeleri dikkat çekmektedir, bu da parazitli hücrelerin endotelyuma yapıştığını gösterir (Jacobson et al.,1994).

Enfekte hücreler ise beyin, göz, periorbital doku damarlarında, dalak, böbrek, iskelet kasları ve bağırsak lenf yumrularında toplanır. Bunlar göz venalarında bilateral tromboz, lenfoid dokularda nekroz, iskelet kaslarında yer yer nekrozlar ve beyinde lezyonlara neden olurlar (Mimioğlu et al.,1969; Turgut,2000).

*Babesia gibsoni'*de ise belirgin olarak karaciğer ve dalak büyümesi gözlenir. Ancak sarılık çok sık olarak görülmediği için buna ilişkin patolojik bulgulara rastlanmayabilir (Mimioğlu et al.,1969; Soulsby,1982).

2.12. Bağışıklık

Babesia canis ile *B. gibsoni* arasında çapraz bağışıklıkbulunmamaktadır. Ayrıca Levin'e göre *B. canis* ile alt türü *B. canis vogeli* arasında da çapraz bağışıklık yoktur (Mimioğlu et al.,1969). Bu nedenle Mimioğlu et al. (1969), Reichenow (1937)'a atfen *B. canis* ve *B. vogeli* olarak bu iki türü birbirinden ayırmış ise de; Mimioğlu et al. (1969), Poisson (1937)'a atfen *B. canis* ile *B. canis vogeli*'nin aynı tür olduğunu belirtmektedir (Mimioğlu et al.,1969).

*Babesia canis'*in bir suşudan hazırlanan soluble parazit antijeni (SPA) ile aşılanan köpeklerde, deneysel olarak farklı bir *B. canis* suşunun tekrar verilmesi ile çapraz-korunma gözlenmemiştir (Schetters et al.,1995). Bu *B. canis*'in alt türleri arasındaki antijenik varyasyonun olduğunu göstermektedir. Ayrıca Avrupa *B. canis* isolatı ve Güney Afrika *B. canis rossi* isolatından elde edilen SPA karışımı heterolog *B. canis* enfeksiyonuna karşı koruyucu bağışıklığı azalttığını tespit etmişlerdir (Schetters et al.,2001).

2.13. Tanı

Tanıda, babesiosis'in bölgedeki epidemiyolojik durumu, bölgenin bulunduğu iklim kuşağı, mevsim, kene yoğunluğu, bölgede bulunan kene populasyonlarının bilinmesi

destekleyicidir. Ayrıca klinik bulgular ve laboratuvar bulguları da göz önünde bulundurulmalıdır (Mimioğlu et al.,1969; Soulsby,1982; Macwilliams,1987).

Kesin tanı etkenlerin tespit edilmesine dayanır. Bununla ilgili olarak IFAT (İndirekt Floresan Antikor Testi), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gibi serolojik testler, splenektomi uygulanmış köpeklere şüpheli kandan yapılan inokulasyon, kene diseksiyonu, şüpheli kandan hazırlanan frotiler ve PCR gibi son yıllarda gelişen moleküler tanı yöntemleri kullanılarak teşhise gidilebilir. Ayrıca epidemiyolojik çalışmalarda toplanan kenelerin enfektivite oranının tespit edilmesi de tanıda önemlidir (Soulsby,1982; Quinn et al.,1997; Vercammen et al.,1997; Ripberger,1999; Kraje,2001; Lobetti,2002; Cleveland et al.,2002). Tercihen Giemsa, Romanowsky, Field's, Wright's ya da Diff-Quik boyaları ile boyanan kan frotilerinde *B. canis* ve *B. gibsoni* morfolojik özelliklerine dayanarak tespit edilmeye çalışılır. Ancak köpeklerde *Babesia'*nın trofozoitlerinin kan frotilerinde tespiti, değişken parazitemi nedeniyle çok zordur. Çoğu durumda eritrositler içinde parazitler ya az ya da nadir olarak bulunur. Özellikle kapillar damarlardan alınan kanda, venalardan alınan kandan daha çok parazit tespit edilebilir. Çünkü etkeni içeren eritrositler kapillar damar sisteminde toplanmaya eğilimlidirler. Genelikle kan kulak ucu ve tırnak yatağından alınır. Kan alınırken ilk damlasının alınmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca parazit içeren eritrositler santrifüj edilen kan örneğinin buffy coat tabakasının altında toplanır. Bu tabakanın alt bölgesinden alınarak hazırlanan frotiler incelenebilir. Kemik iliği aspiratından hazırlanan frotilerde de parazitlere rastlanır. Preparatlar incelenirken eritrositler üzerindeki trombositlerin parazitler ile karıştırılmamasına da dikkat edilmelidir (Soulsby,1982; Quinn et al.,1997; Vercammen et al.,1997; Ripberger,1999; Kraje,2001; Lobetti,2002; Cleveland et al.,2002).

Ölü dokulardan hazırlanan frotilerde de parazit tespitine gidilebilir. Histolojik kesitlerde, özellikle karaciğer, dalak, meningsler, akciğer, gastrointestinal sistemin kapillar ve küçük venalarında çok sayıda parazite rastlanır (Macwilliams,1987).

2.13.1. Moleküler Tanı Yöntemleri

Şimdiye kadar yaygın olarak kullanılan IFAT ve ELISA gibi serolojik testlerin yanısıra parazitin varlığının direkt olarak ortaya konması amacıyla moleküler tanı yöntemlerinden olan PCR da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Quinn et al.,1997; Ripberger et al.,1999; Shaw et al.,2001). Serolojik testlerin *Babesia* türleri arasında kros-reaksiyon göstermesi nedeniyle, tür ve alt türlerin ayırt edilmesinde etkin olmaması; ayrıca ışık

mikroskobunda tespit edilemeyen ve serolojik açıdan incelenmiş *Babesia* ile enfekte köpeklerde, yanlış negatif sonuçların gözlenmiş olması, moleküler yöntemlerin tercih edilmesine sebep olmuştur. Moleküler yöntemler ise sadece *Babesia'*nın alt türlerinin tespitinde değil; aynı zamanda semptomatik ya da mikroskobik olarak kan frotilerinde tespit edilemeyen etkenlerin identifikasyonunda kullanılan güçlü yöntemlerdir (Birkenheuer et al.,2003; Földvari et al., 2005).

PCR: Işık mikroskobu ile yapılan mikroskobik incelemeden daha sensitif ve serolojik testlerden daha spesifiktir (Birkenheuer et al.,2003). Japonya'da yapılan bir çalışmada 80 sokak köpeğin kan örneğinden hazırlanan DNA örneklerini PCR kullanalarak test etmiştir (Inokuma et al.,2004). Önce *Babesia*-cins spesifik primerleri kullanılarak PCR uygulanmış ve bunu takiben yapılan türe spesifik PCR'da *B. canis- B. gibsoni* primerleri kullanılmıştır. PCR sonuçlarına göre; *Babesia*-cins spesifik PCR'da 12 köpek pozitif, *Babesia* türe spesifik PCR'da 5 köpek *B. canis* pozitif, 7 köpek *B. gibsoni* pozitif bulunmuştur. *Babesia canis* pozitif örneğin % 99.94 oranında *B. canis vogeli*'ye, *Babesia gibsoni* pozitif örneğin ise % 100 oranında homolog *B. gibsoni* Asya genotipine benzer olduğu tespit edilmiştir (Inokuma et al.,2004). Yine PCR yöntemi üzerine Macaristan'da yapılan bir çalışmada 44 köpeğin kan örneklerinden çıkartılan DNA'lar kullanılarak *Babesia*-cins spesifik PCR uygulanmış ve 44 köpekten 39'u pozitif bulunmuştur. Bu 39 pozitiften 5 tanesi seçilerek yapılan sekans analizi sonucunda ise % 99.8 oranında *B. canis canis'*e benzerlik saptanmıştır (Földvari et al.,2005).

PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism): Çabuk tanı sağlayan, serolojik testlerden çok daha yararlı ve sensitif bir yöntemdir. Parazitemin % 0.01'e kadar düşük olduğu durumlarda bile *B. canis*'in alt türleri ve diğer *Babesia* türleri arasındaki ayrım kolayca yapılabilir. Serolojik testlerin aksine eş zamanlı enfeksiyonların tespitinde çok daha etkilidir. Köpeklerde babesiosis'in epidemiyolojik saha çalışmalarında kolaylık sağlar (Carret et al.,1999). Son zamanlarda PCR-RFLP kombine moleküler tanı yöntemi kullanılarak büyük köpek piroplasmlarının ayırt edilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (Caccio et al.,2002). ssrRNA geninin kısmi dizilimlerindeki polimorfizmlere dayanarak *B. canis canis, B. canis vogeli* ve *B. canis rossi'*nin RFLP yöntemi ile coğrafik orijini, vektör spesifitesi ve patojenitesi farklı köpeklerde isolatlarını karakterize etmişlerdir (Zahler et al.,1998; Carret et al.,1999).

RLB (Reverse line blot hibridizasyon): Eş zamanlı olarak taşınan *Theileria* ve *Babesia*'nın farklı türlerinin tespit edilmesinde geliştirilen bir metottur. 2005 yılında

Hollanda'da yapılan çalışmada 23 köpekten kan örnekleri alınmış; kanların DNA ekstraksiyonu yapılarak hem PCR yöntemi hem de RLB yöntemi kullanılarak *Babesia* enfeksiyonu açısından incelenmiştir (Matjila et al.,2005). Uyguladıkları PCR yönteminde daha önceki RLB üzerine yapılan çalışmalara dayanarak 18S rRNA geninin 460-540 bp.'lık V4 bölgesinden seçilen RLB-F2 (5′-GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G-3′) ve RLB-R2 (biotin-5′-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT-3′) primerleri kullanılmıştır (Gubbels et al.,1999; Matjila et al.,2004). PCR sonucunda 18 köpek *Babesia* pozitif bulunmuş. RLB hibridizasyon tekniğinde PCR'da *Babesia* pozitif bulunan köpeklerin *B. canis canis* alt türü olduğu tespit edilmiştir (Matjila et al.,2005).

2.14. Sağaltım

Köpeklerde babesiosis'de virulansı düşük türlerle enfekte olan hayvanlarda çoğunlukla sağaltım uygulanmaksızın ya da destekleyici/semptomatik sağaltımla iyileşme gözlenmektedir (Quinn et al.,1997; Ripberger,1999). Diminazene aceturate, phenamidine isethionate ve imidocarb dipropionate köpeklerde babesiosis'in sağaltımında etkilidir (Soulsby,1982; Quinn et al.,1997; Shaw et al.,2001; Lobetti,2002; Plotnick,2003).

Diminazene aceturate 3,5 mg/kg dozunda intramuskuler olarak yalnızca tek doz uygulanır. İlacın sağaltım aralığı düşüktür (Bunnag et al.,1988; Quinn et al.,1997; Lobetti,2002). Phenamidine isethionate 15 mg/kg dozunda 24 saat aralıklarla iki doz, subkutan olarak uygulanır (Quinn et al.,1997; Tüzer et al.,1999). İmidocarb dipropionate 5 mg/kg dozunda intramuskuler olarak kullanılır ve yalnızca *Babesia canis* enfeksiyonuna etkilidir (Tüzer et al.,1999; Turgut,2000).

Trypan blue klinik bulguları hafifletir, parazitemiyi durdurur; ancak enfeksiyonu tamamen yok edemez. Diğer ilaçlara nazaran yan etkisi çok daha azdır. 10 mg/kg dozunda dikkatli bir şekilde intravenöz olarak uygulanır (Lobetti,2002). Clindamycin köpek babesiosis'inde çok şiddetli, inatçı ve virulent durumlarda başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (Ripberger,1999). Acaprin'in ise köpeklerde büyük *Babesia* etkenlerine karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Soulsby,1982; Bunnag et al.,1988). 0,25 ml / 5 kg dozunda 24 saat aralıklarla 1–2 enjeksiyon subkutan olarak uygulanır. Ancak sağaltım aralığı düşüktür (Soulsby,1982; Bunnag et al.,1988).

Anemi hayvanın yaşamını tehdit eder boyutta ise sağlıklı bir hayvandan kan transfüsyonu yapılması gereklidir. Ayrıca semptomatik ve destekleyici olarak; sıvı sağaltımı,

kemoterapi ve metabolik asidosise yönelik sodyum bikarbonat uygulaması yapılır (Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Lobetti,2002).

2.15. Korunma ve Kontrol

Köpeklerde babesiosise karşı korunmada alınacak önlemlerin en başında vektör kenelerin kontrol altına alınması gelmektedir. Bu amaçla köpeklerin yaşadığı klübe, barınak veya alanların periyodik olarak akarisid, insektisid ilaçlarla ilaçlanması önemlidir. Ayrıca köpeklerde tasma, dökme, banyo ya da sprey tarzında uygulanan akarisid ve insektisid ilaçlar gerekli korumayı sağlamaktadır (Soulsby,1982; Macwilliams,1987; Quinn et al.,1997; Cleveland et al.,2002).

Korunmada kullanılan diğer bir seçenek ise aşılamadır. Doku kültüründen elde edilen, avirulent suşdan hazırlanan Pirodox isimli bir ticari preparat vardır. Ancak bu aşı yalnızca Fransa'da bulunmakta olup, yurdumuzda kullanılmamaktadır (Cleveland et al.,2002; Lobetti,2002).

Endemik bölgelerde hastalığın tamamen yok edilmesi istenen bir durum değildir, çünkü köpeklerin kanındaki az miktarda etken premunisyonu sağlamakta ve etkene karşı duyarlılığı ortadan kaldırmaktadır (Lobetti,2002).

Korunmada ayrıca; kan transfüzyonu yapılacak köpeklere *Babesia* etkenleri yönünden incelenmiş kan verilmelidir. Endemik olmayan bölgelerde ise bölgedeki taşıyıcı hayvanların tespiti ve gerekli önlemlerin alınması önemlidir (Mimioğlu et al.,1969; Soulsby,1982; Macwilliams,1987; Lobetti,2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmanın materyalini Ege Bölgesindeki 6 farklı yerleşim merkezinin (Aydın, Kuşadası, Selçuk, Bodrum, Marmaris, Manisa) barınaklarında bulunan 320 köpek ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dahiliye Kliniğine getirilen 63 farklı yaş ve ırktaki sokak köpeğinden alınan kan örnekleri oluşturmuştur. Her bir köpekten yaklaşık 2 ml kan EDTA'lı tüplere alındı. Kanların taşınması esnasında soğuk zincir kullanıldı. Kanlar 200'er µl olarak eppendorf tüplere ayrıldıktan sonra kullanım aşamasına kadar -80 ^{o}C'de saklandı.

3.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA, her bir EDTA'lı kan örneğinin 200 µl'sinden Wizard® Genomic DNA Purifikasyon Kiti kullanılarak, protokole uygun olarak hazırlandı (Promega Corporation, Madison, USA). Bu kite dayanarak tüm kandan genomik DNA izolasyonu şu şekilde yapıldı; her bir kan örneği steril 1,5 ml'lik eppendorf tüplere 200'er µl kondu. Üzerlerine 600 µl Cell lysis solüsyonu eklenip; 10 dk. oda sıcaklığında inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresince tüpler 2–3 kez alt-üst edildi. 10 dk. sonunda örnekler 13,000 -16,000 x g'de 20 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dipteki pelete dokunulmadan süpernatant atıldı. Kan örnekleri -80 ºC'de dondurulduğu için yukarıda anlatılan basamaklar iki kez tekrarlandı. Dipte kalan beyaz kan hücreleri süspansiyon haline gelene kadar 10–15 sn. hafifçe vortekslendi. Üzerine 200 µl Nuclei Lysis Solüsyonu eklendi ve beyaz kan hücrelerinin lize olması için 5-6 kez pipete edildi. Daha sonra 37 ºC'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda üzerlerine 1 µl RNAse Solüsyonu eklenerek tüpler 2–5 kez alt-üst edildi. 37 ºC'de 15 dk. inkubasyona bırakıldı. 15 dk. sonunda 70 µl Protein Presipitasyon Solüsyonu eklendi ve 10–20 sn. vortekslendi. Daha sonra 13,000 - 16,000 x g 'de 3 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dipte kalan koyu kahverengi protein peletine dokunulmadan süpernatant alındı. 1.5 ml'lik vida kapaklı tüpler içerisinde bulunan 200'er µl'lik İsopropanol üzerine eklendi. Tüplerde İsopropanol içerisinde yüzen beyaz küçük DNA bulutu görülünceye kadar hafifçe sallandı ve sonra 13,000–16,000 x g 'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda isopropanol, dipteki DNA rahatsız edilmeden döküldü. DNA üzerine 200 µl % 70'lik etanol konularak tüp hafifçe alt-üst edildi. DNA peletinin etanolde yıkanması sağlandıktan sonra 13,000 - 16,000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Daha sonra etanol dikkatli bir şekilde dipteki DNA peletine dokunulmadan pipetle çekilerek atıldı. Tüpler temiz kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek

kapatıldı ve 10–15 dk. kuruması beklendi. 10–15 dk. sonunda tüplere 70 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenerek 65 ºC'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda rehidrasyon solüsyonu içerisindeki DNA kullanım aşamasına kadar +4 ºC'de saklandı.

3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Bu çalışmada 18S ssrRNA gen dizilimine dayanarak hazırlanmış türe spesifik, genin 455 bp amplifiye eden iki adet PCR primeri seçilerek kullanıldı (Inokuma et al.,2004). *Babesia canis* spesifik primerleri: Can 172F (5′- GTT TAT TAG TTT GAA ACC CGC – 3′) forward, Can 626R (5′– GAA CTC GAA AAA GCC AAA CGA – 3′) reverse olarak kullanıldı (Thermo electron, GmbH, Germany). PCR için her bir ependorf tüpünde 5 µl hedef DNA içeren 40 µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışımda 100 µM. dNTP (Deoksinükleosid trifosfat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP) (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Germany), 25 pmol forward-reverse primerleri (100 pmol/µl), 1.25 U TaqBead Hot Start Polymeraz (Promega TaqBead^{TM} Hot Start Polymerase), 1.06 mM $MgCl_2$ (Promega, Madison, WI, USA), 4 µl 10 x PCR buffer (100 mM Tris-HCL, pH 9,0 (25 °C); 15 mM MgCl; 500 mM KCl; 0,1% gelatin; 1% Triton X–100) (Promega, Madison, WI, USA), 27.05 µl Milli Q [double distile su]) kullanıldı. Amplifikasyon aşamasında GeneAmp PCR Sistem 2400 Thermal Cycler cihazı kullanıldı (Perkin Elmer, Foster City, California). PCR şartlarında ise;

95 ºC'de 5 dk. başlangıç denaturasyon aşaması 1 siklus;

94 ºC'de 30 sn. denaturasyon,

55 ºC'de 30 sn. primer annealing,

72 ºC'de 90 sn. ekstensiyon aşamaları 40 siklus;

72 ºC'de 10 dk. final ekstensiyon aşaması 1 siklus uygulandı.

Her PCR reaksiyonu pozitif ve negatif kontrol DNA örnekleri içerdi. Pozitif DNA örneği dahiliye kliniğine getirilen mikroskopik olarak *B. canis* teşhisi konulan bir köpekten elde edildi. Elde edilen PCR ürünleri ethidium bromide içeren % 2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle koşturuldu. Elde edilen PCR ürünleri ethidium bromide içeren % 2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle koşturuldu. Jel ultra viyole (UV) ışık altında incelendi. Jelin en başına konan DNA belirleyicisi yardımıyla gözlenen bantların baz çifti belirlenerek pozitif örnekler tespit edildi.

3.3. Reverse Line Blot Hibridizasyon Tekniği

3.3.1. PCR

Babesia-Theileria soy PCR'ı için RLB-F2 (5′- GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G -3′) forward primeri, RLB-R2 (5′- CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT -3′) biotin ile işaretlenmiş reverse primeri kullanıldı (Thermo electron, GmbH, Germany) (Gubbels et al.,1999). PCR için her bir ependorf tüpünde 4 µl hedef DNA içeren 36 µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımında 28.05 µl Milli Q (double distile su), 4 µl 10 x PCR buffer (100 mM Tris-HCL, pH 9.0 (25 °C); 15 mM MgCl; 500 mM KCl; 0.1% gelatin; 1% Triton X–100) (Promega, Madison, WI, USA), 1.25 U TaqBead Hot Start Polymeraz (Promega TaqBead^{TM} Hot Start Polymerase), 1.06 mM MgCl2 (Promega, Madison, WI, USA), 200 µM dNTP/dUTP (200 mM herbir dATP, dCTP, dGTP ile 100 mM dTTP ve dUTP), 25 pmol forward-reverse primerleri (100pmol/µl) (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Germany) kullanıldı. Amplifikasyon aşamasında GeneAmp PCR Sistem 2400 Thermal Cycler cihazı kullanıldı (Perkin Elmer, Foster City, California). PCR şartlarında ise; 95 ºC'de 5 dk. başlangıç denaturasyon aşaması 1 siklus;

94 ºC'de 20 sn. denaturasyon,

67 ºC'de 30 sn. annealing,

72 ºC'de 30 sn. ekstensiyon aşamaları 2 siklus

Her iki siklus sonunda annealing sıcaklığı 57 ºC'ye ulaşıncaya kadar iki derece düşürüldü (Touchdown PCR); 57 ºC'ye ulaşıldığında sikluslara aşağıdaki gibi devam edildi.

94 ºC'de 20 sn. denaturasyon,
57 ºC'de 30 sn. annealing,
72 ºC'de 30 sn. ekstensiyon aşamaları 40 siklus;
72 ºC'de 10 dk. final ekstensiyon aşaması uygulandı.

Elde edilen PCR ürünleri ethidium bromide içeren % 2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle koşturuldu. Jel, UV altında incelendi ve kullanılan DNA belirleyicisi aracılığıyla pozitif örnekler kontrol edildi.

3.3.2. Reverse line blot hibridizasyon

RLB hibridizasyon tekniği daha önce tarif edildiği gibi yapıldı (Gubbels et al.,1999; Matjila et al.,2004). Reverse line blot için Biodin-C membran ve N-terminal

N- (triflorasetamidoheksil-siyanoetil,N,N-diisopropil fosforamid [TFA]) -C6 amino linker ile muamele edilmiş spesifik oligonükleotidler kullanıldı. Biodin-C membran 10 ml % 16 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) karbodimid (EDAC) (Sigma, St. Louis, Mo.) ile 10 dk. oda sıcaklığında aktive edildi. Membran 2 dk. distile su ile yıkandı ve MN45 miniblottera (Immunetics, Cambridge, Mass.) yerleştirildi. *Theileria / Babesia* soyuna ait catch-all, *B. canis canis, B. canis vogeli, B. canis rossi, B. gibsoni, T. annulata, B. bovis* spesifik oligonükleotidleri 50 – 3200 pmol / 150 µl 500 mM $NaHCO_3$ (pH 8.4) ile sulandırıldı. Kullanılan oligonükleotidler, sulandırma konsantrasyonları ve sekansları Tablo. 2'de gösterilmiştir. Sulandırılan oligonükleotidler membrana yüklendi. 1 dk. oda sıcaklığında inkube edildi. Bu süre içerisinde oligonükleotidler aminolinkerler aracılığıyla membrana kovalent olarak bağlandı. 1 dk. sonunda oligonükleotidler pipetle membrandan aspire edildi. Membran daha sonra 100 ml 100 mM NaOH ile 10 dk. oda sıcaklığında inaktive edildi. 100 ml 2x SSPE (20x SSPE: 360 mM NaCl, 20 mM NaH_2PO_4 ve 2 mM EDTA içerir [pH 7.4]) - %0.1 SDS (Sodyumdodesilsülfat) ile membran 60 ºC'de 5 dk. yıkandı. 2x SSPE - %0.1 SDS dökülerek membran üzerine 20 mM EDTA eklendi. 15 dk. oda sıcaklığında yıkandı. 15 dk. sonunda EDTA (Etilendiamintetraasetat) dökülerek membran üzerine bir miktar EDTA kondu ve kullanım aşamasına kadar +4 ºC'de saklandı. *Theileria/Babesia* PCR ürünlerinden 10µl alınarak 150 µl 2x SSPE - %0.1 SDS ile sulandırıldı. Sulandırılan PCR ürünleri 100 ºC'de 10 dk. DNA thermal cycler'da denatüre edildi. Ürünler hemen buz üzerine alındı. Bu arada membran 100 ml 2x SSPE - %0.1 SDS ile oda sıcaklığında 5 dk. yıkandı.

Tablo. 2 RLB hibridizasyon tekniğinde kullanılan oligonükleotidler, sulandırma konsantrasyonları ve sekansları

Oligonükleotidler	Sulandırma konsantrasyonu (pmol)	Tür-spesifik oligonükleotid sekansı (5′→ 3′)
T/B catch all	50	TAA TGG TTA ATA GGA (AG)C (AG) GTT G
B. canis rossi	200	CGG TTT GTT GCC TTT GTG
B. canis vogeli	400	AGC GTG TTC GAG TTT GCC
B. canis canis	400	TGC GTT GAC GGT TTG AC
B. gibsoni	900	TAC TTG CCT TGT CTG GTT T
T. annulata	100	CCT CTG GGG TCT GTG CA
B. bovis	200	CAG GTT TCG CCT GTA TAA TTG AG

5' Biotin ile işaretli

Membran uygulanan oligonükleotidlerin tersi yönünde 90º çevrilerek miniblotter'a yerleştirildi. Membran üzerinde kalan sıvılar pipetle aspire edildi. Bu arada dilüye PCR ürünleri buzdan alınarak birkaç saniye santrifüj edildi ve tekrar buz üzerine yerleştirildi. PCR ürünleri miniblotter'a yüklendi ve 42 ºC'deki etüvde 1 saat hibridizasyon için inkubasyona bırakıldı. 1 saat sonunda membran üzerindeki PCR ürünleri pipetle aspire edildi. Membran miniblotterdan alınarak 100 ml 2x SSPE - %0.5 SDS ile 10 dk. 50 ºC'de iki kez yıkandı. Membran 10 ml 2x SSPE - %0.5 SDS içine 2.5 µl peroksidaz ile işaretli streptavidin konjugat (Boehringer, Mannheim, Germany) konularak hazırlanan dilüsyonla 30 dk. 42 ºC'de inkube edildi. Daha sonra konjugat dökülerek membran 100 ml 2x SSPE - %0.5 SDS ile 42 ºC'de 10 dk. iki kez yıkandı. 20 dk. sonunda membran oda sıcaklığında 100 ml 2x SSPE ile 5'er dk. iki kez yıkandı. Süre sonunda 2x SSPE dökülerek membran 10 ml ECL tespit sıvısında (Amersham, Little Chalfont, Buckingharmshire, United Kingdom) 1 dk. inkube edildi. Membran iki asetat kağıdı arasına konarak hazırlanan film kaseti içerisine yerleştirildi. 10 dk. beklendi ve röntgen odasında filmin banyosu yapıldı. Daha sonra membran tekrar kullanıma hazır hale getirilmek için 80 ºC'de 100 ml %1 SDS ile 2 kez yıkandı. Oda sıcaklığında ise 15 dk. bir kez 20 mM EDTA ile yıkandı ve az miktarda 20 mM EDTA eklenerek +4 ºC'de kullanım aşamasına kadar saklandı.

3.4. Sekans Analizi

Sekans analizi için Aydın, Kuşadası, Manisa, Bodrum, Marmaris, Selçuk ve ADÜ Vet. Fak. Dahiliye kliniğinden olmak üzere 7 farklı bölgeden *Babesia canis* spesifik PCR sonuçlarına göre pozitif olan PCR ürünleri birer tane seçilerek *B. canis* spesifik primerleri ile birlikte İontek İlaç, Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Araştırma, Geliştirme San. ve Tic. A.Ş. (İstanbul) firmasına gönderilmiştir. Örneklerin sekans analizleri çift yönlü yaptırılmıştır.

İontek firmasında, gönderilen örneklerin saflaştırılmasının ardından, sekans analizleri otomatik DNA dizi cihazında kapiller sistemde ve Sanger tarafından geliştirilen enzimatik sentez yöntemi kullanılarak yapılmıştır (www.iontek.com.tr). Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda (A,G,T,C) sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar iliştirilmiştir. Elektroforez, örnekler bir kapillerden geçirilirken uygulanmıştır. Floresan işaretli boyaları uyarmak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak için ise bir CCD kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırt edilebilir. Floresan

miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar internette Genbank'ta BLAST analizi yapılarak değerlendirilmiştir.

3.5. İstatistik Analiz

Yerleşim merkezleri arasında *B. canis*'in bulunma oranı bakımından farklılık bulunup bulunmadığını tespit etmek için Ki-Kare testi kullanılarak istatiksel açıdan değerlendirme yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

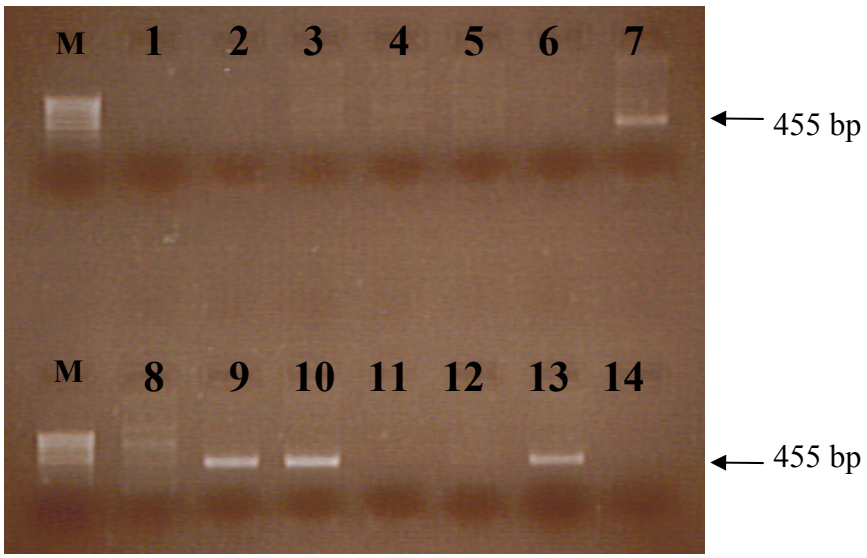
4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. *Babesia canis* spesifik PCR sonuçları

Babesia canis spesifik primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçlarına göre (Şekil 5) toplam 383 köpekten 40 tanesi *Babesia canis* pozitif bulunmuştur. Yerleşim merkezlerine göre *Babesia canis* pozitif örneklerin dağılımı Tablo. 3'de verilmiştir.

Tablo. 3 Yerleşim merkezlerine göre *Babesia canis* PCR sonuçları

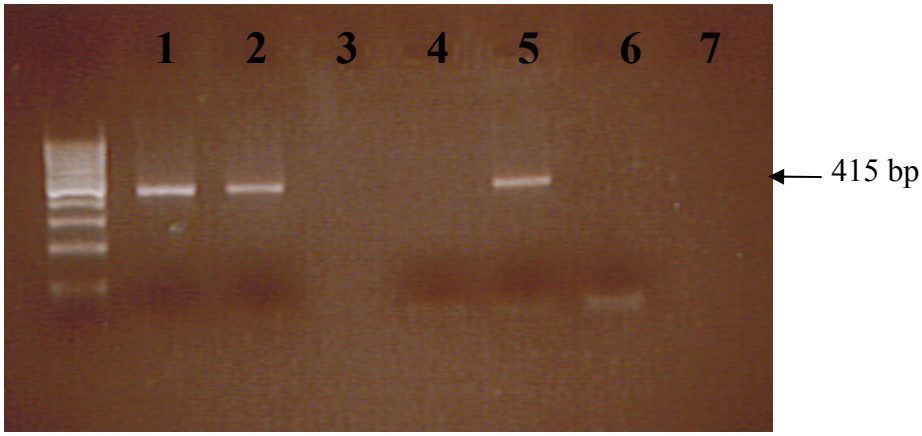
	Hayvan sayısı	***Babesia canis***	
		Pozitif	**(%)**
Kuşadası	71	4	5.63
Selçuk	64	12	18.75
Manisa	23	3	13.04
Marmaris	50	2	4.0
Aydın	62	3	4.84
Bodrum	50	12	24.0
Dahiliye	63	4	6.35
Toplam	383	40	10.44



Şekil. 5: *Babesia canis*-spesifik PCR görüntüsü: **(7), (9), (10)** no'lu örnekler *B. canis* pozitif. **(M)** DNA belirleyici **(13)** Pozitif Kontrol **(14)** Negatif Kontrol

4.1.2. *Theileria/Babesia* soy PCR sonuçları

Sadece *Babesia canis* spesifik PCR sonuçlarına göre pozitif bulunan örneklerin *Theileria-Babesia* soyuna spesifik primerler kullanılarak PCR'ı yapılmıştır (Şekil 6). Bu PCR sonucuna göre de örneklerin pozitifliği bir kez daha tespit edilmiştir (Tablo. 4).



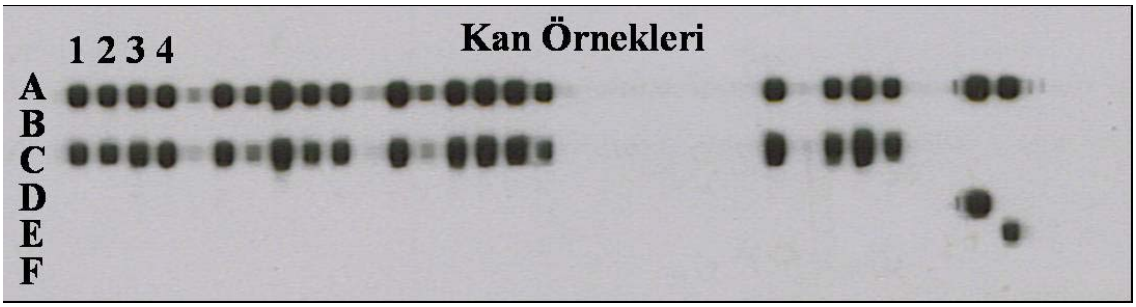
Şekil. 6: *Theileria/Babesia* soy PCR görüntüsü: **(1), (2), (5)** no'lu örnekler *Babesia* pozitif

Tablo. 4 Kan örneklerinin *Theileria/Babesia* soy PCR sonuçları

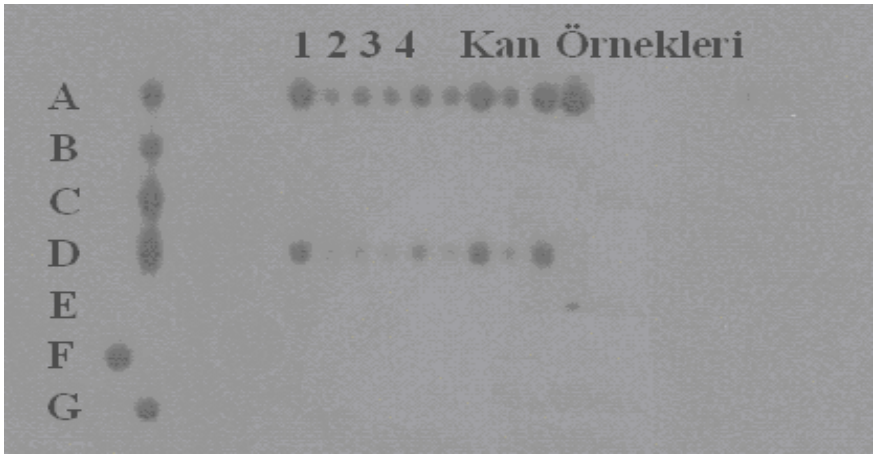
	Hayvan sayısı	T / B cins spesifik PCR	
		Pozitif	(%)
Kuşadası	71	4	5.63
Selçuk	64	12	18.75
Manisa	23	3	13.04
Marmaris	50	2	4.0
Aydın	62	3	4.84
Bodrum	50	12	24.0
Dahiliye	63	4	6.35
Toplam	383	40	10.44

4.1.3. RLB sonuçları

Theileria /Babesia soyuna ait catch-all, *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi*, *B. gibsoni, T. annulata ve B. bovis* spesifik probları kullanılarak yapılan Reverse line blot hybridizasyon tekniği sonuçlarına göre örneklerin *Babesia canis*'in alt türü *B. canis vogeli* olduğu tespit edilmiştir. *Theileria/Babesia* soy PCR'ı sonucunda elde edilen 40 pozitif örnek RLB'de pozitif olarak belirlenmiş ancak 15 tanesi membranda çok zayıf pozitif olarak görüntülenmiştir (Şekil 7-8).



Şekil. 7 Problar; (A)*Theileria/Babesia* catch all, **(B)***B. canis canis*, **(C)***B. canis vogeli*, **(D)***B. canis rossi*, **(E)***Theileria annulata*, **(F)***Babesia bovis***. Örnekler; (1)**82, **(2)**95, **(3)**128, **(4)**137, **(5)**139, **(6)**K39, **(7)**186, **(8)**189, **(9)**154, **(10)**235, **(11)**243**(12)**D1, **(13)**D17, **(14)**273, **(15)**274, **(16)**281, **(17)**283, **(18)**A25, **(19)**K7, **(20)**K30, **(21)**165, **(22)**D22, **(23)**98, **(24)**295, **(25)**103, **(26)**118, **(27)**127, **(28)**144, **(29)**140, **(30)**su, **(31)**boş, **(32)***T. annulata*, **(33)***B. bovis***.**



Şekil. 8 Problar; (A)*Theileria/Babesia* catch all, **(B)***B. canis canis*, **(C)***B. canis rossi*,**(D)***B. canis vogeli*, **(E)***B. gibsoni,* **(F)***Theileria annulata*,**(G)***Babesia bovis* **Örnekler; (1)**153, **(2)**258, **(3)**262, **(4)**267, **(5)**271, **(6)**278, **(7)**286, **(8)**300, **(9)**134**, (10)***B. gibsoni*

4.1.4. Sekans analizi sonuçları

Her bölgeden birer adet seçilen güçlü pozitif örneklerin sekans analizi İontek Firmasında yapılmıştır. BLAST 2.1 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) programı kullanılarak Aydın(235), Kuşadası(K39), Selçuk(82), Marmaris(189), Bodrum(274), Manisa(154), Dahiliye(D1) örneklerinin gen dizilimleri Genbanktan elde edilen sekans bilgileri ile karşılaştırıldığında; örneklerin % 99 oranında *B. canis vogeli* (*B. canis* sp. Okinawa suşu)'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Inokuma et. al.,2004). Aynı zamanda *B. canis vogeli* Mısır, Brezilya, Dog-78, Dog-59 suşlarına % 99 oranında yakınlık tespit edilmiştir. Ayrıca % 99 oranında *B. canis canis*'e, % 97 oranında *B. canis rossi* Dog-76 ve Dog-74 suşuna ve *Babesia* sp. Xinjiang 1648 suşuna yakınlık tespit edilmiştir. Alınan sekans analizi sonuçlarına göre örneklerin gen dizilimi aşağıda Şekil. 9A-G'de gösterilmiştir.

Şekil. 9A

Aydın Can 626Reverse

GGNGGTACNAAAAAACTACGAGCTTTTTACTGCAACAAGTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCC
CTCCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTTGGGTCACCATCATTCCAATTACAAGACATTAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTCCCTGT
GTCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTAATTCCCCGT
TACCCGTTGCTGCCTCGGTAGGCCAATACCCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAGAAACTTGAATGGTCCATCGCTAAATGCGATTCGCCAGTTTA
TTATGAATCACCGAAAGCCAAGGCGGGTTTCAACTNAATAAACA

Aydın Can 172Forward

TGTGTTTTNNNGTNANAGCGAATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCA
GCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTA
GCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
ACTTTAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTTCNGAGTTCAAA

Şekil. 9B

Kuşadası Can626Reverse

GNGGGTNATAAANAAACTACGAGCTTTTTACTGCAACAAGTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGC
CCTCCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTTGGGTCACCATCATTCCAATTACAAGACATTAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTCCCTG
TGTCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTAATTCCCCG
TTACCCGTTGCTGCCTCGGTAGGCCAATACCCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAGAAACTTGAATGGTCCATCGCTAAATGCGATTCGCCAGTTT
ATTATGAATCACCGAAAGCCAAGGCGGGTTTCAACTNAATAAACANNNNC

Kuşadası Can172Forward

GGNTNTTTTTNAGTNATAGCGAATCGCATTTGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCA
GCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTA
GCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
ACTTTAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTTTCGAGTTCAA

Şekil. 9C

Selçuk Can 626Reverse

GTAAANAAAAAACTACGAGACTTTTTACTGCAACAAGTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCT
CCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTTGGGTCACCATCATTCCAATTACAAGACATTAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTCCCTGTGT
CAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTAATTCCCCGTTA
CCCGTTGCTGCCTCGGTAGGCCAATACCCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAGAAACTTGAATGGTCCATCGCTAAATGCGATTCGCCAGTTTATT
ATGAATCACCGAAAGCCAAGGCGGGTTTCAACCTNAAAAAAACAA

Selçuk Can 172Forward

TNTNTTNTNATATGGCGATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCAA
CGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAT
CCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAA
TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTT
TAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTTCNGAGTTCAAA

Şekil. 9D

Manisa Can 626Reverse

GGTTACTAAAAAACTACGAGCTTTTTACTGCAACAAGTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCT
CCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTTGGGTCACCATCATTCCAATTACAAGACATTAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTCCCTGTGT
CAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTAATTCCCCGTTA
CCCGTTGCTGCCTCGGTAGGCCAATACCCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAGAAACTTGAATGGTCCATCGCTAAATGCGATTCGCCAGTTTATT
ATGAATCACCGAAAGCCAAGGCGGGTTTCAACTTAAATAAACA

Manisa Can 172Forward

GTTTTNTATAANAGCGAATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCAA
CGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAT
CCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAA
TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTT
TAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTTCCGAGTTCAA

Şekil. 9E

Bodrum Can 626Reverse

ANGNTACTNAACAAACTACGAGCTTTTTACTGCAACAAGTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCC
CTCCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTTGGGTCACCATCATTCCAATTACAAGACATTAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTCCCTGT
GTCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTAATTCCCCGT
TACCCGTTGCTGCCTCGGTAGGCCAATACCCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAGAAACTTGAATGGTCCATCGCTAAATGCGATTCGCCAGTTTA
TTATGAATCACCGAAAGCCAAGGCGGGTTTCAANTAAAANAAACAA

Bodrum Can 172Forward

TNNTTTNTNTNATAGCGAATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCA
ACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAA
TCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCA
ATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACT
TTAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTCCGAGTTCAAA

Şekil. 9F

Marmaris Can 626Reverse

ANGTAACNAAGAAACTACGAGCTTTTTACTGCAACAAGTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCC
TCCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTTGGGTCACCATCATTCCAATTACAAGACATTAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTCCCTGTG
TCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTAATTCCCCGTT
ACCCGTTGCTGCCTCGGTAGGCCAATACCCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAGAAACTTGAATGGTCCATCGCTAAATGCGATTCGCCAGTTTAT
TATGAATCACCGAAAGCCAAGGCGGGTTTCACNNAAAAANAAANAA

Marmaris Can172Forward

TTNNGTTTNNAGATAATNGCGAATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGC
AGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAC
CCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGT
AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTG
AACTTTAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTCCAAGTTCANA

Şekil. 9G

Dahiliye Can 626Reverse

GGTTACNAAAAAAACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAAGTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCC
CTCCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTTGGGTCACCATCATTCCAATTACAAGACATTAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTCCCTGT
GTCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTAATTCCCCGT
TACCCGTTGCTGCCTCGGTAGGCCAATACCCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAGAAACTTGAATGGTCCATCGCTAAATGCGATTCGCCAGTTTA
TTATGAATCACCGAAAGCCAAGGCGGGTTTCANCNAAAAANAAANAA

Dahiliye Can 172Forward

TNNGTTNNNTTATNGCGAATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCA
ACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAA
TCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCA
ATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACT
TTAGCGTGTTCGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTCCNAAGTTCAAA

Şekil.9 Her bölgeden bir pozitif PCR örneğinin sekans analiz sonuçları

4.1.5. İstatistik analiz sonuçları

Yerleşim merkezleri arasında *B. canis* pozitif örnekler açısından farklılıkları tespit etmek amacıyla istatistiksel değerlendirme (Ki-Kare Testi) yapılmıştır. Tablo. 5'de Ki-kare değeri verilmiştir. Bulunan Ki-kare değeri sonucuna göre *B. canis*'in bulunma oranı bakımından yerleşim merkezleri arasındaki fark önemli bulunmuştur (P<0.005).

Tablo. 5 Pozitif örneklerin yerleşim merkezleri arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

	Hayvan sayısı	**PCR**	
		Pozitif(%)	**χ2**
Kuşadası	71	5.634	
Selçuk	64	18.75	
Manisa	23	13.04	
Marmaris	50	4.0	37.998*
Aydın	62	4.84	
Bodrum	50	24.0	
Dahiliye	63	6.35	
Toplam	383	10.44	

* P<0.005

4.2. Tartışma

Türkiye'de köpek babesiosisi ve yaygınlığı üzerine bu güne kadar yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yalnızca 1961 yılında klinik belirtilere dayanarak bir köpekte ve 2003 yılında iki köpekte hem klinik belirti hem de morfolojik olarak babesiosis görüldüğü bildirilmiştir (Özcan,1961; Ulutaş et al.,2003). Son olarak 2005 yılında *Babesia canis*-spesifik PCR sonucunda *B. canis* pozitif tespit edilen 7 köpekte akut faz değerlerinin incelendiği çalışma bulunmaktadır (Ulutaş et al.,2005). Bu nedenlerden dolayı yaptığımız çalışma Türkiye'de köpek babesiosisi üzerine ilk çalışma olması ve moleküler yöntemler ile *Babesia canis* alt türünün belirlenmesi açısından önemlidir.

Yurt dışında bu hastalık üzerine çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Yamane et al.,1993; Hauschild et al.,1995; Zahler et al.,1998; Carret et al.,1999; Birkenheuer et al.,2003; Matjila et al.,2004; Inokuma et al.,2004; Duh et al.,2004; Földvari et al.,2005). Özellikle de günümüzde yaygın olarak kullanılmaya başlanan PCR moleküler tanı yöntemine dayalı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Japonya'da yapılan bir çalışmada 80 sokak köpeğinde 18S ribosomal RNA geninden seçilen primerlerin kullanıldığı PCR tekniği kullanılarak *B. canis* ve *B. gibsoni*'nin varlığı araştırılmıştır (Inokuma et al.,2004). PCR sonuçlarına göre; *Babesia*-cins spesifik PCR'da 12 köpek pozitif, *Babesia* türe spesifik PCR'da 5 köpek *B. canis* pozitif, 7 köpek *B. gibsoni* pozitif bulunmuştur. *Babesia canis* pozitif örneğin % 99.94 oranında *B. canis vogeli*'ye, *Babesia gibsoni* pozitif örneğin ise % 100 oranında homolog *B. gibsoni* Asya genotipine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Inokuma et al.,2004). Vektör *Rhipicephalus sanguineus* kenesinin subtropik iklime sahip Japonya'da olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak bulunması nedeniyle elde ettiğimiz *B. canis*-spesifik PCR ve RLB sonuçları ile bu çalışma arasında *B. canis vogeli* açısından paralellik tespit edilmiştir. Ancak *B. gibsoni* çalışmamızda sadece RLB tekniğinde 40 adet örnekde bakılması nedeniyle bu örneklerde *B. gibsoni* tespit edilemedi. Slovenya'da 2000-2002 yılları arasında 238 köpekte yapılan çalışmada ise ssr RNA geninden seçilen *Babesia*-cins spesifik primerleri kullanılarak PCR uygulanmış, PCR sonucunda 14 köpek *Babesia* pozitif bulunmuştur. Sekans analizi sonucuna göre pozitiflerden 11'inin *B. canis canis*, 3'ünün ise *B. canis vogeli* olduğu bildirilmiştir (Duh et al.,2004). Yaptığımız çalışmanın sonuçlarında *B. canis canis* tespit edilememiştir. Bunun sebebi *B. canis canis*'in vektörü olan *Dermacentor reticulatus*'un yurdumuzda görüldüğüne dair bir bildirimin bulunmamasından kaynaklanabilmektedir. 2005 yılında yine PCR yöntemi üzerine Macaristan'da yapılan bir çalışmada *Babesia*-cins spesifik PCR sonucunda 44

köpekten 39'unda 450 bp.'lık pozitif PCR ürünü elde edilmiş ve 5 tanesi seçilerek sekans analizi yapılmıştır. Sekans sonucunda % 99.8 oranında *B. canis canis'*e benzerlik saptanmıştır (Földvari et al.,2005). Yapılan tüm bu çalışmalarla elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırıldığında *B. canis'*in tespit edilen alt türleri açısından farklılıklar görülmektedir. Bunun sebebi *B. canis*'in alt türlerini taşıyan vektörlerin coğrafik dağılımlarının farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır.

RLB Hibridizasyon tekniğine dayalı olarak Güney Afrika'da yapılan bir çalışmada 297 köpekten 44 tanesi *Babesia* sp. pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerin RLB sonucunda ise 31'i *Babesia canis rossi,* 13 tanesi *B. canis vogeli* tespit edilmiştir. Bu çalışmada Güney Afrika'da *B. canis vogeli* ilk defa bildirilmiştir (Matjila et al.,2004). Bu da *Rhipicephalus sanguineus* kenesinin dünyada geniş dağılım gösterdiğini kanıtlamaktadır (Uilenberg et al.,1989). Bu çalışmaya dayanarak uyguladığımız RLB hibridizasyon tekniği sonuçlarına göre yalnızca *B. canis*'in *B. canis vogeli* alt türünün tespit edilmesi yurdumuzda özellikle kahverengi köpek kenesi olarak da bilinen *Rhipicephalus sanguineus'*un yaygın olarak bulunması gösterilebilir (Coşkuner,1971). Gerek elde ettiğimiz RLB sonuçlarında gerekse de sekans analizinde *Babesia canis vogeli*'nin tespit edilmesi Ege Bölgesi'nde *B. canis vogeli*'nin varlığını da doğrulamaktadır.

Çalışmamızda daha çok barınaklarda bulunan sokak köpekleri kullanılmış olup; istatistiksel açıdan değerlendirme yapıldığında *B. canis*'in bulunma oranı bakımından bölgeler arasında belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılıkların gözlenmesinde enfeksiyon kaynağı olarak köpek barınaklarının gösterilebileceği gibi, geldikleri yerden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Belki bu çalışma Ege bölgesinden ziyade köpek barınaklarındaki enfestasyon oranlarını yansıtmaktadır. Ancak Türkiye'deki köpek barınaklarındaki uygulamalarda, köpekler tekrar sokağa bırakılabildikleri için bölgeye enfeksiyonun yayılmasında da etkili olabilmektedirler. Bu da babesiosisin epidemiyolojisinin bölgelere göre farklılık göstermesine neden olmaktadır. Ayrıca vektör kenelerin iklimsel açıdan farklı coğrafik lokalizasyon göstermesi ve bölgelerde uygulanan vektör mücadelesine bağlı olarak da epidemiyolojide farklılıklar gözlenmektedir.

Son zamanlarda PCR-RFLP kombine moleküler tanı yöntemi kullanılarak ssr RNA geninin bir kısmına ait dizilimindeki polimorfizmlere dayanarak büyük köpek piroplasmlarının ayırt edilebilmesi geliştirilmektedir (Carret et al.,1999; Caccio et al.,2002). Önceki çalışmalarda *B. canis* grubu içerisinde üç alt türün yer aldığı ve bunların vektör

spesifitesi, antijenik varyasyon ve coğrafi dağılımlarına dayanarak alt türlere ayrıldığı gösterilmektedir (Uilenberg et al.,1989). Bu önemli farklılıklara rağmen, morfolojik düzeyde üç alt türün ayırt edilememeleri sebebiyle; ayırıcı tanılarında yine moleküler metodlara güvenilmektedir. Bu çalışmalar köpeklerin *Babesia* türlerinin taksonomik düzeyde tekrar ele alınmasını ve sayısının belirlenmesinin gerekliliğini göstermektedir (Zahler et al.,1998). Bizim çalışmamızda ise büyük *Babesia* türlerinden *B. canis vogeli*'nin tespit edilmesi Türkiye açısından büyük *Babesia* türlerinin değerlendirilmesi için önemli bir adımdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonucunda Ege Bölgesi'nin 6 farklı yerleşim merkezinde bulunan barınaklardaki 320 köpekten ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesine getirilen 63 sahipli köpekden alınan kan örneklerinin 40 tanesi, PCR yöntemi sonucunda *Babesia canis* pozitif tespit edilmiştir. Reverse line blot hibridizasyon tekniği sonucunda ise *B. canis* pozitif örneklerin *B. canis vogeli* alt türü olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma Türkiye'de köpek babesiosisi üzerine PCR ve RLB hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılan ilk araştırma olması yanında, Türkiye'de köpeklerde *B. canis*'in alt türü olan *B. canis vogeli*'nin varlığı ilk olarak bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre Ege Bölgesi'nde 40 adet *Babesia canis* pozitif köpeğe rastlanması bu hastalığın Veteriner Hekimler tarafından dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca Türkiye'nin diğer bölgelerinde benzer çalışmalar yapılarak Türkiye'deki köpek babesiosis'inin durumu tespit edilmeli ve kene faunası incelenerek vektör kenelerin belirlenmesi yönünde çalışmalar sürdürülmelidir.

ÖZET

Köpeklerde babesiosis *İxodidae* ailesinde yer alan bazı kene türlerinin vektörü olduğu; *B. canis* ve *B. gibsoni* türleri tarafından oluşturulan protozoal bir hastalıktır. Bu hastalık dünyada yaygın olup; tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde görülmektedir.

Bu çalışma, Ege Bölgesi'ndeki köpeklerde babesiosis'in yaygınlığını tespit etmek amacıyla planlanmıştır. Çalışmada 6 ayrı yerleşim merkezinde (Aydın, Kuşadası, Selçuk, Bodrum, Marmaris, Manisa) barınaklarda bulunan ve ADÜ Veteriner Fakültesi Dahiliye kliniğine getirilen sahipli köpeklerden toplam 383 kan örneği alınmıştır. Kan örneklerinin DNA'ları Wizard® Genomic DNA Purifikasyon Kiti kullanılarak hazırlanmıştır. 18S ssr RNA gen dizilimine dayanarak seçilen *Babesia canis*-spesifik primerleri (Can 172Forward – Can 626Reverse) ile PCR moleküler tanı yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen PCR sonucuna göre 383 köpekten 40 (%10.4) tanesi *B. canis* pozitif tespit edilmiştir. Daha sonra Babesia-soy PCR'ını takiben uygulanan Reverse line blot (RLB) hibridizasyon tekniği sonucunda ise *B. canis* pozitif örneklerin *B. canis vogeli* alt türü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her bölgeden birer adet pozitif örnek seçilerek sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonucunda örneklerin % 99 oranında *B. canis vogeli* (*B. canis* sp. Okinawa suşu)'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan değerlendirme yapıldığında ise bölgeler arasında *B. canis*'in bulunma oranı bakımından farklılıkların önemli olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada Ege Bölgesi'nde köpeklerde *B. canis*'in yaygın olarak bulunduğu ve alt türünün ise *B. canis vogeli* olduğu ilk olarak tespit edilmiştir.

SUMMARY

Babesiosis of dog is a protozoal disease which is transmitted by Ixodidae ticks and caused by *B. canis* and *B. gibsoni*. It occurs worldwide in tropical, subtropical and warm regions all around the world.

In this study, to determine the prevalence of *Babesia canis* that causes babesiosis in dogs by using PCR in Aegean Region. We also aimed to determine the subspecies of *B. canis* in this region. Blood samples were collected from 320 stray dogs captured and kept in municipal shelters located in Central Aydin, Kusadasi, Selcuk, Central Manisa, Bodrum, Marmaris, all within the Aegean region of Turkey. Also, an additional 63 blood samples were obtained from owned dogs that had been admitted to the Small Animal Clinic of Veterinary Faculty, Adnan Menderes University. DNA was extracted from EDTA-anticoagulated blood samples using Wizard® Genomic DNA Purification Kit according to the manufacturer's intruductions. Amplification of the 18S ssrRNA gene was performed using *B. canis* primes (Can172 forward and Can626 reverse). PCR results revealed that 40 dogs (10.4%) were infected with *B. canis*. In order to identify the subspecies of *B. canis* positive PCR samples reverse line blot hybridisation technique was used. These 40 positive *B. canis* DNA samples were again PCR amplified by using *Theileria / Babesia* genus spesific primers, then screened with RLB hybridisation. The results indicated that they were positive for *B. canis vogeli*. In addition to this, the PCR products of 18S rRNA gene of *B. canis* isolated from seven infected dogs, one isolate originating from each of the six different locations and one from the Small Animal Clinic of Veterinary Faculty, ADU were sequenced. The results of sequence analysis indicate that they are closely related to *B. canis vogeli* (*B. canis spp*. Okinawa strain) with 99 % similarity. There were also significant differences in the prevalence of *B. canis* among the different geographical areas ($P < 0.05$).

In conclusion, the present study demonstrates a high prevalence of *B. canis* infection amid dogs in Aegean Region and indicates that the subspecies of the parasite is *B. canis vogeli*.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada en büyük desteği olan danışmanım Yrd. Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ'e, Parazitoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Hasan EREN'e ve bölüm arkadaşlarım Doktora Öğrencisi Vet. Hek. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ, Murat HOŞGÖR ve Hakkı ÜNLÜ'ye; kan örneklerinin alımında yardımları olan Dahiliye ABD.'dan Doç. Dr. Serdar PAŞA ve Araştırma Görevlisi Abidin ATASOY'a ve Yükseklisans Öğrencisi Barış SARUHAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi tüm desteklerini daima hissettiren aileme teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

BANETH, G., E.B. BREITSCHWERDT, B.C. HEGARTY, B. PAPPALARDO, J. RYAN, 1998. A Survey of Tick-Borne Bacteria and Protozoa in Naturally Exposed Dogs from Israel. Veterinary Parasitology. 74: 133-142.

BANETH, G., M.J. KENNY, S. TASKER, Y. ANUG, V. SHKAP, A. LEVY, S.E. SHAW, 2004. Infection with a Proposed New Subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis subsp. presentii*, in Domestic Cats. Journal of Clinical Microbiology. 42(1): 99-105.

BICALHO, K.A., M.F.B. RIBEIRO, O.A. MARTINS-FILHO, 2004. Molecular Fluorescent Approach to Assessing Intraerithrocytic Hemoprotozoan *Babesia canis* Infection in Dogs. Veterinary Parasitology. 125: 221-235.

BIRKENHEUER, A.J., M.G. LEVY, E.B. BREITSCHWERDT, 2003. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. Journal of Clinical Microbiology. 4172-4177.

BIRKENHEUER, A.J., J. NEEL, D. RUSLANDER, M.G. LEVY, E.B. BREITSCHWERDT, 2004. Detection and Molecular Characterization of a Novel Large *Babesia* Species in a Dog. Veterinary Parasitology. 124: 151-160.

BUNNAG, D., E. CURIO, J.F. DUBREMETZ, B. ENDERS, M. FRANZ, J.K. FRENKEL, J. GRÜNTZI, M. GUSTAFSSON, W. HAAS, K.T. HARINASUTA, H.G. HEIDRICH, E. HINZ, E.R. JAMES, P. KÖHLER, W. KUNZ, S. LLYOD, H. MEHLHORN, W. PETERS, W. RAETHER, E.J.L. SOULSBY, K.D. SPINDLER, H. TARASCHEWSKI, R.C.A. THOMPSON, J. VERCRUYSSE, W.P. VOIGT, D. WAKELIN, V. WALLDORF, G. WEILAND, W.H. WERNSDORFER, 1988. Parasitology in Focus, Springer-Verlag. 38-39, 514-515, 722-723, 764-765, 767-769, 880.

CACCIO, S.M., B. ANTUNOVİC, A. MORETTI, V. MANGILI, A. MARINCULIC, R.R. BARIC, S.B. SLEMENDA, N.J. PIENIAZEK, 2002. Molecular Characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from Naturally Infected European Dogs. Veterinary Parasitology. 106: 285-292.

CAMACHO, A.T., E. PALLAS, J.J. GESTAL, F.J. GUITIAN, A.S. OLMEDA, H.K. GOETHERT, S.R. TELFORD, 2001. Infection of Dogs in North-West Spain with a *Babesia microti*-like Agent. The Veterinary Record. 149: 552-555.

CARRET, C., F. WALLAS, B. CARCY, N. GRANDE, E. PRECIGOUT, K. MOUBRI, T. P. SCHETTERS, A. GORENFLOT, 1999. *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis canis Babesia canis rossi*: Differentiation of the Three Subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on Amplified Small Subunit Ribosomal RNA Genes. J. Eukaryot. Microbiol. 46(3):298-303.

CLEVELAND, C.W., D.S. PETERSON, K. LATIM, 2002. An Overview of Canine Babesiosis (http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/Cleveland/).

CONRAD, P., J. THOMFORD, I. YAMANE, J. WHITING, L. BOSMA, T. UNO, H.J. HOLSHUH, S. SHELLY, 1991. Hemolyic Anemia Caused by *Babesia gibsoni* İnfection in Dogs. Javma. Vol. 199, No:5, 601-605.

CONRAD, P.A., J.W. THOMFORD, A. MARSH, S.R. TELFORD, J.F. ANDERSON, A. SPIELMAN, E.A. SABIN, I. YAMANE, D.H. PERSING, 1992. Ribosomal DNA Probe for Differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* Isolates. Journal of Clinical Microbiology. 30(5): 1210-1215.

COŞKUNER, M.R., 1971. Yurdumuzda Görülen Bazı Kene Türlerinin Biyolojisi ve Naklettikleri Protozoon Hastalıklar Üzerinde Araştırmalar. Etlik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi. 3(11-12): 42-54

CRIADO-FORNELIO, A., A. MARTINEZ-MARCOS, A. BULING-SARANA, J.C. BARBA-CARRETERO, 2003. Molecular Studies on *Babesia*, *Theleria* and *Hepatozoon* in Southern Europe Part I. Epizootiological Aspects. Veterinary Parasitology. 113: 189-201.

CRIADO-FORNELIO, A., M.A.GONZALEZ-DEL-RIO, A. BULING-SARANA, J.C. BARBA-CARRETERO, 2003. Molecular Characterization of a *Babesia gibsoni* Isolate From a Spanish Dog. Veterinary Parasitology. 117: 123-129.

CRIADO-FORNELIO, A., A. MARTINEZ-MARCOS, A. BULING-SARANA, J.C. BARBA-CARRETERO, 2003. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma*

haemominutum and Piroplasmids in Cats from Southern Europe: a Molecular Study. Veterinary Microbiology. 93: 307-317.

CRIADO-FORNELIO, A., M.A.GONZALEZ-DEL-RIO, A. BULING-SARANA, J.C. BARBA-CARRETERO, 2004. The "Expanding Universe" of Piroplasms. Veterinary Parasitology. 119: 337-345.

DUH, D., N. TOZON, M. PETROVEC, K. STRASEK, T. AVSIC-ZUPANC, 2004. Canine Babesiosis in Slovenia: Molecular Evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli.* Vet. Res. 35: 363-368.

EWING, S.A., 1965. Method of Reproduction of *Babesia canis* in Erythrocytes. Am. J. Vet. Res. 26: 727-733.

FÖLDVARI, G., E. HELL, R. FARKAS, 2005. *Babesia canis canis* in Dogs from Hungary: Detection by PCR and Sequencing. Veterinary Parasitology. 127: 221-226.

FUKUMOTO, S., X. XUAN, Y. NISHIKAWA, N. INOUE, I. IGARASHI, H. NAGASAWA, K. FUJISAKI, T. MIKAMI, 2001a. Identification and Expression of a 50-Kilodalton Surface Antigen of *Babesia gibsoni* and Evaluation of Its Diagnostic Potential in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 39, No:7, 2603-2609.

FUKUMOTO, S., X. XUAN, S. SHIGENO, E. KIMBITA, I. IGARASHI, H. NAGASAWA, K. FUJISAKI, T. MIKAMI, 2001b. Development of a Polymerase Chain Reaction Method for Diagnosing *Babesia gibsoni* Infection in Dogs. J. Vet. Med. Sci. 63(9): 977-981.

GERRITSEN, J.G., J.C. VAN DER ZWAN, 1992. Acute Renal Failure in Severe Chloroquine Resistant Falciparum malaria. Intensive Care Medicine. 18: 177-179.

GUBBELS, J.M., A.P. VOS, M. WEIDE, J. VISERAS, J.M. SCHOULS, E. VRIES, F. JONGEJAN, 1999. Simultaneous Detection of Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 37, No:6, 1782-1789.

GUITIAN, F.J., A.T. CAMACHO, S.R. TELFORD III, 2003. Case-Control Study of Canine İnfection by a Newly Recognised *Babesia microti*-like Piroplasm. Preventive Veterinary Medicine. 61: 137-145.

HAUSCHILD, S., P. SHAYAN, E. SCHEIN, 1995. Characterization and Comparison of Merozoit Antigens of Different *Babesia canis* Isolates by Serological and Immunological Investigations. Parasitol. Res. 81: 638-642.

INOKUMA, H., Y. YOSHIZAKI, Y. SHIMADA, Y. SAKATA, M. OKUDA, T. ONISHI, 2003. Epidemiological Survey of Babesia Species in Japan Performed with Specimens from Ticks Collected from Dogs and Detection of New *Babesia* DNA Closely Related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. Journal of Clinical Microbiology. 3494-3498.

INOKUMA, H., Y. YOSHIZAKI, K. MATSUMOTO, M. OKUDA, T. ONISHI, K. NAKAGOME, R. KOSUGI, M. HIRAKAWA, 2004. Molecular Survey of *Babesia* Infection in Dogs in Okinawa, Japan. Veterinary Parasitology. 121: 341-346.

JACOBSON, L.S., I.A. CLARK, 1994. The Pathophysiology of Canine Babesiosis: New Approaches to an Old Puzzle. Journal of The South African Veterinary Association. 65(3): 134-145.

KJEMTRUP, A.M., A.A. KOCAN, L. WHITWORTH, J. MEINKOTH, A.J. BIRKENHEUER, J. CUMMINGS, M.K. BOUDREAUX, S.L. STOCKHAM, A. IRIZARRY-ROVIRA, P.A. CONRAD, 2000. There Are at Least Three Genetically Distinct Small Piroplasms From Dogs. International Journal for Parasitology. 30: 1501-1505.

KOCAN, A.A., A. KJEMTRUP, J. MEINKOTH, L.C. WHITWORTH, G.L. MURPHY, L. DECKER, M. LORENZ, 2001. A genotypically Unique *Babesia gibsoni*-like Parasite Recovered From a Dog in Oklahoma. J. Parasitol. 87(2): 437-438.

KONTOS, V.J., A.F. KOUTINAS, 1997. Clinical Observations in 15 Spontaneous Cases of Canine Babesiosis. Canine Practice. Vol. 22, No:5-6, 30-34.

KRAJE, A.C., 2001. Canine Haemobartonellosis and Babesiosis. Small Animal/Exotics. 23(4): 310-318.

LOBETTI, R., 2002. Canine and Feline Babesiosis. Braynston Veterinary Hospital, South Africa (http://www.vin.com).

MACWILLIAMS, P.S., 1987. Erythrocytic Rickettsia and Protozoa of The Dog and Cat. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Vol. 17, No:6, 1451-1456.

MARTINOD, S., N. LAURENT, Y. MOREAU, 1986. Resistance and Immunity of Dogs Against *Babesia canis* in an Endemic Area. Veterinary Parasitology. Vol. 19, No:3-4, 245-254.

MATJILA, P.T., B.L. PENZHORN, C.P.J. BEKKER, A.M. NIJHOF, F. JONGEJAN, 2004. Confirmation of Occurence of *Babesia canis vogeli* in Domestic Dogs in South Africa. Veterinary Parasitology. 122: 119-125.

MATJILA, P.T., M.A. NIJHOF, A. TAOUFIK, D. HOUWERS, E. TESKE, B.L. PENZHORN, T. LANGE, F. JONGEJAN, 2005. Autochthonous Canine Babesiosis in Netherlands. Veterinary Parasitology. 131: 23-29.

MIYAMA, T., Y. SAKATA, Y. SHIMADA, S. OGINO, M. WATANABE, K. ITAMOTO, M. OKUDA, R.A. VERDIDA, X. XUAN, H. NAGASAWA, H. INOKUMA, 2005. Epidemiological Survey of *Babesia gibsoni* Infection in Dogs in Eastern Japan. J. Vet. Med. Sci. 67(5): 467-471.

MİMİOĞLU, M., K. GÖKSU, F. SAYIN, 1969. Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II. Ankara Üniversitesi Basımevi. 880-959.

MUHLNICKEL, C.J., R. JEFFERIES, U.M. MORGAN-RYAN, P.J. IRWIN, 2002. *Babesia gibsoni* infection in three dogs in Victoria. Aust. Vet. J. 80 (10): 606-610.

NALBANTOĞLU, S., 2003-2004. Evcil Hayvanlarda Babesiosis ve Theileriosis. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı (http://193.255.230.2/~vatansev).

ÖZCAN, C.H., 1961. Ankara ve Civarında Evcil Hayvanlarda Görülen Piroplasmose Vak'aları ve Tedavileri Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Basımevi. 10-106.

PLOTNICK, A., 1999-2003. Babesiosis (http://PetPlace.com).

QUINN, P.J., W.J.C. DONNELLY, M.E. CARTER, B.K.J. MARKEY, P.R. TORGERSON, R.M.S. BREATHNACH, 1997. Microbial and Parasitic Diseases of The Dog and Cat. Saunders. 243-245.

RIPBERGER, K., 1999. Canine Babesiosis (http://www.addl.purdue.edu).

SCHETTERS, T.H.P.M., J.A.G.M. KLEUSKENS, N.C. SCHOLTES, J.W. PASMAN, D. GOOVAERTS, 1997. Vaccination of Dogs Against *Babesia canis* Infection. Veterinary Parasitology. 73: 35-41.

SCHETTERS, T.H.P.M., K. MOUBRI, E. PRECIGOUT, J. KLEUSKENS, N.C. SCHOLTES, A. GORENFLOT, 1997. Different *Babesia canis* Isolates Different Diseases. Parasitology, Cambridge University Pres. 115: 485-493.

SCHETTERS, T.H.P.M., J.A.G.M. KLEUSKENS, N.C. SCHOLTES, A. GORENFLOT, K. MOUBRİ, A.N. VERMEULEN, 2001. Vaccination of Dogs Against Heterologous *Babesia canis* Infection Using Antigens from Culture Supernatants. Vet. Parasitol. 100: 75-86.

SHAW, S.E., M.J. DAY, R.J. BIRTLES, E.B. BREITSCHWERDT, 2001. Tick-borne Infectious Diseases of Dogs. Trends in Parasitology. Vol.17, No:2, 74-80.

SOULSBY, E.J.L., 1982. Helminthes, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Saunders. Seventh Edition. 706-730.

TÜZER, E., M. TOPARLAK, 1999. Veteriner Protozooloji. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı. No:105.

UILENBERG, G., F.F.J. FRANSSEN, N.M. PERIE, A.A.M. SPANJER, 1989. Three Groups of *Babesia canis* Distinguished and a Proposal for Nomenculature. The Veterinary Quarterly. 11(1): 33-40.

ULUTAŞ, B., S. PAŞA, T. KARAGENÇ, G. BAYRAMLI, 2003. Atipik Babesiosisli İki Köpekte Klinik Görünüm. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi. 5. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi. Poster Bildirisi. 165.

ULUTAŞ, B., G. BAYRAMLI, P.A. ULUTAŞ, T. KARAGENÇ, 2005. Serum Concentration of Some Acute Phase Proteins in Naturally Occuring Canine Babesiosis: a Preliminary Study. Veterinary Clinical Pathology. Vol. 34, No:2, 144-147

VERCAMMEN, F., R. DE DEKEN, L. MAES, 1997. Duration of Protective Immunity in Experimental Canine Babesiosis After Homologous and Heterologous Challenge. Veterinary Parasitology. 68: 51-55.

YAMANE, I., J.W. THOMFORD, I.A. GARDNER, J.P. DUBEY, M. LEVY, P.A. CONRAD, 1993. Evaluation of The Indirect Fluorescent Antibody Test for Diagnosis of *Babesia gibsoni* Infections in Dogs. Am. J. Vet. Res. 54(10):1579-1584.

ZAHLER, M., E. SCHEIN, H. RINDER, R. GOTHE, 1998. Characteristic Genotypes Discriminate Between *Babesia canis* Isolates of Differing Vector Specificity and Pathogenicity to Dogs. Parasitol. Res. 84: 544-548.

ZAHLER, M., H. RINDER, E. SCHEIN, R. GOTHE, 2000a. Detection of a New Pathogenic *Babesia microti*-like Species in Dogs. Veterinary Parasitology. 89: 241-248.

ZAHLER, M., H. RINDER, E. ZWEYGARTH, T. FUKATA, Y. MAEDE, E. SCHEIN, R. GOTHE, 2000b. '*Babesia gibsoni*' of Dogs form North America and Asia Belong to Different Species. Parasitology. 120: 365-369.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Denizli'de doğdu. İlkokulu Denizli'de, orta ve lise öğrenimini Manisa'da tamamladı. 1995 yılında Manisa Lisesi'nden mezun oldu. 1997 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı. 2003 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji ABD.'da Yüksek Lisans'a başladı.