



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
VPR-DR-2013-001

***THEILERIA ANNULATA* SİTOKROM B GENİNDE
MUTASYONLARIN BELİRLENEREK BUPARVAQUONE
DİRENCİYLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI ve AYDIN
ÇEVRESİNDEKİ ENFEKTE SIĞIRLARDA DİRENCİN
YAYGINLIĞININ SAPTANMASI**

Arş. Gör. Selin HACILARLIOĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ

AYDIN-2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
VPR-DR-2013-001

***THEILERIA ANNULATA* SİTOKROM B GENİNDE
MUTASYONLARIN BELİRLENEREK
BUPARVAQUONE DİRENCİYLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI ve AYDIN ÇEVRESİNDEKİ ENFEKTE
SIĞIRLARDA DİRENCİN YAYGINLIĞININ
SAPTANMASI**

Arş. Gör. Selin HACILARLIOĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ

AYDIN - 2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Selin HACILARLIOĞLU tarafından hazırlanan ‘*Theileria annulata* sitokrom b geninde mutasyonların belirlenerek buparvaquone direnciyle ilişkisinin araştırılması ve Aydın çevresindeki enfekte sığırlarda direncin yaygınlığının saptanması’ başlıklı tez, 20.06.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

Prof. Dr. Hasan EREN

Adnan Menderes



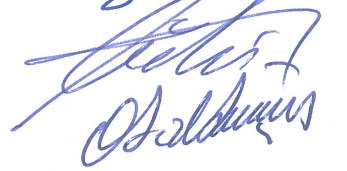
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Erciyes



Prof Dr. Tülin KARAGENÇ

Adnan Menderes



Doç. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR

Adnan Menderes



Yrd. Doç. Dr. Süleyman AYPAK

Adnan Menderes



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla/...../2013 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Türkiye'nin coğrafik olarak üzerinde bulunduğu alan ve sahip olduğu iklimsel koşullar, Ülkemizi hayvanlarda kenelerle bulaşan hastalıklar açısından bir risk bölgesi haline getirmektedir. Bu hastalıklar içerisinde yer alan Apikompleksa anaç altındaki protozoon bir parazit olan *Theileria annulata* tarafından oluşturulan; halk arasında zehirli sığır sıtması olarak bilinen, bilimsel olarak tropikal theileriosis ya da Akdeniz Sahil Humması olarak adlandırılan hastalık Türkiye'deki sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Hyalomma* soyuna bağlı Ixodid keneler tarafından kan emme esnasında omurgalı konak olan sığırlara nakledilen parazit; Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Hindistan ve Türkiye'yi de içine alan Orta Doğu ile Asya'da yaygın olarak görülmekte ve bölgedeki sığırlarda problemlere neden olmaktadır. Hastalık özellikle Avrupa kökenli kültür ırkı sığırları ve bunların melezlerini tehdit etmekte ve % 40-60 oranında mortaliteye neden olarak büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Buparvaquone *T. annulata*'ya karşı gösterdiği yüksek etkisi ve güvenilirliği sayesinde dünyada theileriosis tedavisinde yaygın kullanım alanı bulmuştur. İlacın etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte mitokondriyal elektron sistemini bozarak, mitokondriyal kollapsa neden olduğu düşünülmektedir. Buparvaquone'un theileriosise karşı tek etkili ilaç olması ve endemik bölgelerde ilacın yoğun kullanılması parazitin ilaça karşı gelme oranını arttırmakta ve direnç oluşumuna bir zemin hazırlamaktadır. Son yıllarda *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı geliştirdiği dirençle ilgili bildirimler yayınlanmaya başlanmıştır. Ayrıca Aydın ilinde çalışan veteriner hekimlerden buparvaquone'un tedavide etkinliğinin azaldığı yönündeki geri bildirimler alınmaktadır. İran ve Tunus gibi tropikal theileriosisin endemik olduğu ülkelerden yapılan bu bildirimler ile veteriner hekimlerden gelen şikayetler dikkate alındığında ilaca karşı parazitte direnç oluşmaya başlamış olabileceği ve ileride theileriosise bağlı daha büyük ekonomik problemlere neden olabileceği göz ardı edilmemelidir. *Theileria annulata*'nın buparvaquone karşı direnç geliştirmiş olabileceği hipotezi doğrultusunda bu tezde, *T. annulata*'nın ilacın etki bölgesi olduğu düşünülen sitokrom b geninin mutasyonların varlığı yönünden araştırılması, eğer bir direnç oluşumu tespit edilirse etkili markerlar oluşturularak sahada direnç oluşumunun varlığının ve yaygınlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Programı (BAP) ve Wellcome Trust (075820/A/04/A, ref. no: 332000R39181) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgi	1
1.1.1. Önemli <i>Theileria</i> Türleri	3
1.2. Theileriosis'in Epidemiyolojisi	9
1.2.1. Türkiye'de Tropikal Theileriosis'in Epidemiyolojisi	12
1.3. <i>Theileria annulata</i> Yaşam Döngüsü	15
1.3.1. Omurgalı Konaktaki Gelişme	16
1.3.2. Vektör Kenede Gelişme	17
1.4. <i>Theileria annulata</i> 'nın Genomu	19
1.5. Tropikal Theileriosis'te Klinik Bulgular ve Patogenez	19
1.6. Tropikal Theileriosis'te Bağışıklık	21
1.7. Tropikal Theileriosis'in Tanısı	22
1.7.1. Klinik ve Mikroskopik Tanı	22
1.7.2. Serolojik Tanı	24
1.7.3. Moleküler Tanı	25
1.8. Tedavi	27
1.9. Tropikal Theileriosis'te Korunma ve Kontrol Yöntemleri	29
1.9.1. Vektör Kenelerle Mücadele	29
1.9.2. Dirençli Irkların Kullanılması	30
1.9.3. Aşılama	31
1.10. Tropikal Theileriosis'de İlaç Direnci	32
1.10.1. Genel Bilgi	32
1.10.2. Buparvaquone'un Etki Mekanizması	34

1.10.3. Mitokondriyal DNA (mDNA)'nın Atovaquone Ve Buparvaquone Direncindeki Önemi	37
1.10.4. Atovaquone ve Buparvaquone Direnci	39
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali	44
2.1.1. <i>T. annulata</i> Makroşizontlarıyla infekte Lenfosit Hücre Kültürleri	45
2.1.2. Kan Örnekleri	51
2.2. Kan örneklerinden Periferik Mononükleer Hücrelerin (PBM) İzolasyonu	53
2.2.1. Hücre Kültürlerinin Üretilmesi ve Dondurulması	55
2.3. <i>T. annulata</i> İzolatlarının MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide] Kolorimetrik Yöntemi İle Buparvaquone'a Karşı Fenotiplerinin Belirlenmesi	56
2.3.1. Hücre Kültürlerinin Buparvaquone Baskısı İçin Hazırlanması	57
2.3.2. İlacın Hazırlanması	57
2.3.3. MTT Kolorimetrik Testinin Uygulanması	58
2.4. DNA Ekstraksiyonu	58
2.4.1. Kan Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	58
2.4.2. <i>Theileria annulata</i> Makroşizontlarıyla Enfekte Lenfosit Hücre Kültürlerinden DNA Ekstraksiyonu	59
2.5. <i>Theileria annulata</i> İzolatlarının Sitokrom b Geninin İncelenmesi	60
2.5.1. <i>Theileria annulata</i> Sitokrom b Geninde Muhtemel Buparvaquone Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi	60
2.5.2. <i>Theileria annulata</i> 'ya ait Sitokrom b Geninin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması	61
2.5.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi	62
2.6. <i>Theileria annulata</i> Makroşizont Hücre Kültürlerinin Klonlanması	63
2.6.1. Çalışmada Kullanılan Materyal	63
2.6.2. Klonal Hücre Kültürlerinin Elde Edilmesi	63
2.7. Klonal <i>T. annulata</i> İzolatlarının Ve Tekrarlayan Buparvaquone Tedavilerinden Sonra <i>T.annulata</i> İzolatlarının Populasyon Genetiğinin Belirlenmesi	64
2.7.1. Mini ve Mikrosatellit Belirteçler Kullanılarak <i>T. annulata</i> hücre Kültürlerinin Populasyon Genetiğinin Belirlenmesi	65
2.8. Klonal <i>T. annulata</i> Hücre Kültürlerinin Sitokrom b Gen Sekans Analizinin Yapılması	67

2.9. Sitokrom b Geninde Saptanan Mutasyonları Belirlemek İçin Allel Spesifik PCR Metodunun Geliştirilmesi	69
2.9.1. Allel Spesifik PCR İçin Mutasyonlara Özel Primerlerin Tasarlanması Ve Değerlendirilmesi	69
2.9.2. Allel Spesifik PCR Spesifite Ve Sensitivesinin Değerlendirilmesi	70
2.9.3. Allel Spesifik PCR İle Test Edilen Parazit Materyali	70
3. BULGULAR	
3.1. MTT Test Sonuçları	72
3.1.1. MTT İle Test Edilen Hücre Kùltürleri	72
3.1.2. <i>Theileria annulata</i> İzolatlarının Buparvaquone Baskısı Altında Gösterdikleri Fenoplerin Belirlenmesi	77
3.2. <i>Theileria annulata</i> İzolatlarında Tekrarlayan Buparvaquone Tedavilerinin Parazit Populasyonları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	80
3.2.1. Tekrarlayan Tedavilerden Sonra Elde Edilen İzolatların Fenotiplerinin Belirlenmesi	83
3.3. <i>Theileria annulata</i> İzolatlarının Sitokrom b Geninin Sekans Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	86
3.3.1. Sekans Analizinde Kullanılan <i>T. annulata</i> İzolatları	86
3.3.2. <i>Theileria annulata</i> Sitokrom b Geninde Muhtemel Buparvaquone Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi	88
3.3.3. Sekans Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	90
3.4. AS-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	99
3.4.1. AS-PCR Metodunun Spesifite Ve Sensitivitesinin Belirlenmesi	99
3.4.2. Klonal Hücre Kùltürlerinin AS-PCR İle Değerlendirilmesi	99
3.4.3. Aydın Ve Çevresinde Buparvaquone Direnciyle İlgili Olarak Saptanan Mutasyonların Yaygınlığının Araştırılması	102
3.4.3.1. Sahadan Toplanan Kan Örneklerinde <i>T. annulata</i> 'nın Saptanması	102
3.4.3.2. V135A ve P253S Mutasyonlarının Sahadaki Yaygınlığının Belirlenmesi	104
4. TARTIŞMA	109
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	117
ÖZET	118
SUMMARY	119
KAYNAKLAR	120

TEŞEKKÜR
ÖZGEÇMİŞ

156

157

SİMGELER VE KISALTMALAR

AS-PCR:	Allel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
AST:	Aspartat aminotransferaz
AT:	Tedavi sonrası (After treatment)
bp:	Baz çifti
BSA:	Sığır Serum Albümin
BT:	Tedavi öncesi (Before treatment)
CF:	Komplement Fiksasyon
CO ₂ :	Karbondioksit
Dk:	Dakika
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNA:	Deoksibonükleik asit
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA:	Enzim İşaretli İmmunosorbant Testi
ETS:	Elektron transport zinciri (Electron Transport System)
FADH ₂ :	Flavin adenin dinükleotid
HI:	Hemaglutinasyon-inhibisyon
IC ₅₀ :	Hücrelerin çoğalmasını %50 oranında baskılayan doz (The half maximal inhibitory concentration)
IFAT:	İndirekt Fluoresan Antikor Testi
IHA:	İndirekt Hemaglutinasyon
kb:	Kilo baz
KCl:	Potasyum klorid
Kompleks I:	NADH dehidrogenaz kompleksi
Kompleks II:	Süksinat dehidrogenaz kompleksi
Kompleks III:	Ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz veya Sitokrom bc ₁ kompleksi
Kompleks IV:	Sitokrom c oksidaz
LAMP:	Loop Aracılı İzotermal Çoğaltma (Loop-mediated isothermal Amplification)
mDNA:	Mitokondriyal DNA
mg:	Miligram
MgCl ₂ :	Magnezyum klorür
MgSO ₄ :	Magnezyum sülfat

mM:	Milimolar
mPCR:	Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu
MTS:	(5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthizoly)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium
MTT:	(3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
NaCl:	Sodyum klorür
NADH:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NCS:	Yeni doğmuş buzağı serumu (New Born Calf Serum)
ng:	Nanogram
nm:	Nanometre
NO:	Nitrik oksit
PBM:	Periferel kanda bulunan mononükleer hücreler
PBS:	(Phosphate buffered saline)
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
Qo bölgesi:	Ubiquinol oksitlenme (yükseltgenme) bölgesi
RFLP:	Restriksiyon enzimi ile kesilen bölgelerinin uzunluk farklılıkları
RLB:	Reverse Line Blotting
rRNA:	Ribozomal ribonükleik asit
Sn:	Saniye
SPAG-1:	<i>T.annulata</i> sporozoit yüzey antijeni
ssRNA:	Small subunit RNA
ssu rRNA:	Ribozomal RNA'nın küçük alt ünitesi
TaD:	<i>T. annulata</i> şizont yüzey antijeni
Tamr-1:	<i>T.annulata</i> merozoit rhoptri antijeni
Tams-1:	<i>T.annulata</i> meroziot ve piroplasm yüzey antijeni
TamTHSP70:	<i>Theileria annulata</i> mitokondriyal HSP70
TaSE:	<i>T. annulata</i> şizont proteini
TaSP:	<i>T. annulata</i> yüzey antijeni
tRNA:	Taşıyıcı RNA
UQ:	Ubiquinol
UV:	Ultraviole
WST-1:	((4-[3-4-iodophenyl]-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3,-benzene disulfonate)

XTT: (2,3- bis(2-metoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-carboxanilide-
2H-tetrazolium)

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µM: Mikromolar

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1. Evcil Hayvanlarda hastalık oluşturan <i>Theileria</i> türleri	5
Çizelge 2.1. Aydın ve çevresinden elde edilen <i>T. annulata</i> izolatlarının ve <i>T. annulata</i> pozitif kan örneklerinin dağılımı	45
Çizelge 2.2. 1998-2007 yılları arasında toplanan <i>T. annulata</i> izolatları.	47
Çizelge 2.3. 2010 yıllarında toplanan <i>T. annulata</i> izolatları	48
Çizelge 2.4. 2011 yılında toplanan <i>T. annulata</i> izolatları	49
Çizelge 2.5. 2012 yılında toplanan <i>T. annulata</i> izolatları	50
Çizelge 2.6. 1998-2001 yılları arasında elde edilen <i>T. annulata</i> pozitif kan örnekleri	52
Çizelge 2.7. 2006-2007 yılları arasında elde edilen <i>T. annulata</i> pozitif kan örnekleri	53
Çizelge 2.8. <i>T. annulata</i> populasyonlarını belirlemek için kullanılan moleküler mini ve mikrosatellit belirteçler ve primerlerin bağlanma ısıları	66
Çizelge 3.1. 2010 yılında elde edilen <i>T. annulata</i> izolatları ve IC ₅₀ değerleri	73
Çizelge 3.2. 2011 yılında elde edilen <i>T. annulata</i> izolatları ve IC ₅₀ değerleri	74
Çizelge 3.3. 2012 yılında elde edilen <i>T. annulata</i> izolatları ve IC ₅₀ değerleri	75
Çizelge 3.4. 1998-2007 yıllarında elde edilen <i>T. annulata</i> izolatları ve IC ₅₀ değerleri	76
Çizelge 3.5. Sekans analizi için belirlenen <i>T. annulata</i> izolatlarında parazit populasyon çeşitliliği	82

Çizelge 3.6.	A10 ve A21 kodlu hayvanlardan elde edilen izolatlarda tedavi öncesi ve sonrasında <i>T.annulata</i> parazit popülasyonundaki değişim	83
Çizelge 3.7.	Tekrarlayan buparvaquone tedavilerinden sonra <i>T.annulata</i> 'nın popülasyon sayısındaki değişim	83
Çizelge 3.8.	Tekrarlayan buparvaquone tedavilerinin <i>T. annulata</i> izolatları IC ₅₀ değerleri üzerine etkileri	84
Çizelge 3.9.	A9/BT, A10/AT3, A16/AT1, A21/AT4, G3/BT ve N3/BT kodlu izolatlara ait klonal hücre kültürlerinin IC ₅₀ değerleri	88
Çizelge 3.10.	Sekans analizi yapılan <i>T. annulata</i> izolatlarında saptanan mutasyonlar	96
Çizelge 3.11.	A10/BT izolatına ait klonların IC ₅₀ değerleri	100
Çizelge 3.12.	A21/AT1 izolatına ait klonların IC ₅₀ değerleri	101
Çizelge 3.13.	Akçaova Beldesinde 2012 yılında elde edilen <i>T. annulata</i> pozitif kan örnekleri	103
Çizelge 3.14.	AS-PCR ile V135A ve P253S kodon mutasyonlarının varlığı yönünden incelenen <i>T. annulata</i> pozitif kan örnekleri	104
Çizelge 3.15.	Akçaova bölgesinden elde edilen kan örneklerinden V135A ve P253S kodon mutasyonlarının saptandığı örnekler	105
Çizelge 3.16.	AS-PCR ile V135A ve P253S kodon mutasyonlarının varlığı yönünden incelenen <i>T. annulata</i> makroşizontlarıyla enfekte hücre kültürleri	106
Çizelge 3.17.	Akçaova bölgesinden elde edilen <i>T. annulata</i> izolatlarından V135A ve P253S kodon mutasyonlarının saptandığı örnekler	107
Çizelge 3.18.	Aydın Akçaova beldesinde V135A ve P253S mutasyonlarının görüme sıklığı	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Sığırlarda hastalık oluşturan önemli <i>Theileria</i> türlerinden <i>T. annulata</i> , <i>T. parva</i> ve <i>T. sergenti</i> 'nin dünya üzerindeki dağılımı	7
Şekil 1.2. <i>Theileria annulata</i> 'nın yaşam döngüsü	18
Şekil 1.3. Giemsa boyalı lenf yumrusu biyopsi sürme preparat görüntüsü	23
Şekil 1.4. Giemsa ile boyalı kan frotisi	23
Şekil 1.5. Antiprotozoer etkili hidroksinaftokinonlar	33
Şekil 1.6. Mitokondriyal iç membranda yer alan ETZ protein kompleksleri (Kompleks I, II, III ve IV) ve ATP sentetaz	35
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan parazit materyalinin elde edildiği beldelerin (Söke, Germencik, Koçarlı, İncirlioiva, Çine, Akçaova, Köşk, Nazilli) coğrafik dağılımı	44
Şekil 2.2. Ficoll® densite gradiyent santrifüj öncesi ve sonrasında örnekte görülen tabakalar	54
Şekil 2.3. <i>Theileria annulata</i> 'ya ait sitokrom b geninin nükleotid sekansı	62
Şekil 3.1. Aydın İli'nin farklı Belde'lerinden elde edilen <i>T. annulata</i> izolatlarının MTT canlılık grafikleri	77
Şekil 3.2. Akçaova Belde'sinden tedavisi öncesi elde edilen <i>T. annulata</i> izolatlarının MTT canlılık grafikleri	78
Şekil 3.3. Akçaova Belde'sinden tedavisi sonrasında elde edilen <i>T. annulata</i> izolatlarının MTT canlılık grafikleri	79

Şekil 3.4.	TS12 markeri kullanılarak yapılan genotiplendirme agaroz jel görüntüsü.	81
Şekil 3.5.	Genescan™ analiz grafik örneği	81
Şekil 3.6.	A10, A21 ve A104 kodlu hayvanlardan elde edilen izolatların IC ₅₀ grafikleri	85
Şekil 3.7.	Akçaova (A9/BT, A10/AT3, A16/AT1 ve A21/AT4) Beldesi, Nazilli (N3/BT) ve Germencik (G3/BT) ilçelerinden klonlama için seçilen <i>T. annulata</i> izolatlarının MTT grafiği	86
Şekil 3.8.	Sekans analizi için seçilen <i>T. annulata</i> izolatları ve klonlarının MTT grafikleri	87
Şekil 3.9.	<i>Theileria annulata</i> sitokrom b geni protein dizilimi üzerinde buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgeleri	89
Şekil 3.10.	Sitokrom b geninin nükleotid dizilim sonuçları	93
Şekil 3.11.	<i>Theileria annulata</i> sitokrom b geni amino asit dizilimi	95
Şekil 3.12.	Buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgelerine (Qo1 ve 2) ait amino asit dizilimi	97
Şekil 3.13.	<i>Theileria annulata</i> sitokrom b geni tarafından kodlanan proteinlerin transmembran helikal yapısı	98
Şekil 3.14.	P253S mutasyonu saptamak amacıyla yapılan AS-PCR sensitivitesinin belirlenmesi	99
Şekil 3.15.	A10/BT izolatına ait klonların MTT grafiği	101
Şekil 3.16.	A21/AT1 izolatına ait klonların MTT grafiği	102

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgi

Tropikal theileriosis *Theileria annulata*'nın neden olduğu, yüksek morbidite ve mortaliteye bağlı olarak büyük ekonomik kayıplara yol açan bir hastalıktır. Hastalık sığırlarda, özellikle verim oranı yüksek ırklarda görülmektedir (Dobbelaere 2004). Hayvanlarda parazitlerin hayat döngüsü, vektör olan *Hyalomma* soyuna bağlı *Ixodid* kenelerin nimf ve erişkin safhalarının kan emmeleri esnasında sporozoitleri vermesiyle başlar. Sporozoitler daha sonra henüz bilinmeyen bir mekanizma ile konağın immun sistem hücrelerine yerleşerek çok çekirdekli sinsitiyal makroşizont formuna dönüşmektedir. Şizontlar merozoitlere farklılaşarak konak hücrelerini parçalamak suretiyle serbest hale geçmekte ve eritrositlere girdikten sonra piroplasm olarak adlandırılan formları oluşturmaktadır. Vektör keneler ise enfekte konaktan kan emme esnasında piroplasm formlarını alarak enfekte olmaktadır (Heinz 1984, Shaw 2002).

Tropikal theileriosisin tedavisinde 1980'li yıllarda itibaren hidroksinaftokinon grubu olan ilaçlardan parvaquone ve buparvaquone kullanılmaktadır (Coombs ve ark 1997). Theileriosiste bu ilaçlar etkilerini lenfoid hücrelerdeki şizontlar veya eritrosit içindeki piroplasm formları üzerine göstermektedir. Bu ilaçların tam olarak etki mekanizması anlaşılamamış olmakla beraber; yapısal benzerlikleri nedeniyle, etkisini malarya ve toxoplasmosisin tedavisinde kullanılan atovaquone'a benzer şekilde gösterdiği düşünülmektedir (Mehlhom 2008). Yapılan çalışmalarda atovaquone'un mitokondriyal membran üzerinde yer alan ve sitokrom bc1 kompleksinin (Complex III) yapısına katılan sitokrom b üzerine etki ettiği gösterilmiştir. Bu durum, parazitin yaşamı için kritik olan mitokondriyal elektron transport zincirinin inhibe edilmesi ve mitokondriyal membranın kollabe olmasına neden olmaktadır (Sherman 1998, Gebru ve ark 2006).

Atovaquone'un malarya tedavisinde tek başına kullanılmaya başlanmasından kısa bir süre sonra ilaca karşı direnç şekillenmiş ve tedavi edilen hastaların %30'unda hastalıkta nüksler yaşanmıştır (Coombs ve ark 1997). *Plasmodium* türlerinde ve *Toxoplasma gondii* üzerinde yapılan çalışmalar atovaquone'un bağlanma bölgesini kodlayan sitokrom b geni üzerine yoğunlaşmıştır. Tedavi sonrası nükslerin yaşandığı hastalardan toplanılan örneklerden *in vitro* olarak *Plasmodium falciparum* hücre kültürleri elde edilmiş, değişik

konsantrasyonlarda ilaç dilüsyonlarına tabi tutulduktan sonra atovaquone etkisinden kurtulan parazitlerin sitokrom b geninin sekans analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak bu genin ilacın bağlanma bölgesini kodlayan kısmında çeşitli mutasyonlara rastlanmıştır ve bu mutasyonların ilaç direncine neden olduğu bildirilmiştir (Schwöbel ve ark 2003, Kessl ve ark 2006, Gebru ve ark 2006).

Buparvaquone, *T. annulata*'ya karşı gösterdiği yüksek etkisi ve güvenilirliği sayesinde tüm dünyada yaygın kullanım alanı bulmuştur. 1980'lerden bu yana yaygın olarak kullanılan buparvaquone ile ilgili, özellikle hastalığın endemik olarak görüldüğü ülkelerde yapılan tedavilere tam bir yanıt alınmadığı yönünde bildirimler gelmeye başlamıştır (Mhadhbi ve ark 2010, Sharifiyazdi ve ark 2012). 2010 yılında buparvaquone direnci ilk defa Tunus'ta *in vivo* olarak Mhadhbi ve ark (2010) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada rutin buparvaquone tedavi prosedürüne yanıt alınamamış tropikal theileriosis pozitif hayvanlardan birinden *T. annulata* izolatu elde edilmiş ve deneysel enfeksiyonlar oluşturulmuştur. Dirençli olduğu düşünülen bu izolatu yapılan deneysel enfeksiyon sonrasında tedaviye yine yanıt alınamaması bu parazit popülasyonunun ilaca karşı dirençli olabileceği görüşünü kuvvetlendirmiştir (Mhadhbi ve ark 2010). 2012 yılında Fars'ta yapılan farklı bir çalışmada (Sharifiyazdi ve ark 2012) ise tropikal theileriosis tedavisine yanıt alınamayan hasta hayvanlardan elde edilen *T. annulata* izolatları genetik açıdan incelenmiştir. Bu çalışmada buparvaquone'un parazitte etki bölgesini kodlayan mitokondriyal sitokrom b geni sekans analizleri incelenerek ilacın bağlanma bölgesinde iki farklı nokta mutasyonu saptanmış ve direnç ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

Tropikal theileriosisin Aydın İlinde endemik olarak görülmesi, hastalığa karşı tedavide kullanılan etkili tek etken madde olan buparvaquone'un yaygın kullanımını da beraberinde getirmektedir. Bu durum parazitlerin ilaç ile sıklıkla karşı karşıya gelmesi bu parazitlerin ilaç etkisinden kurtulması için alternatif yollar bularak dirençli hale gelmelerine zemin hazırlamaktadır (Sibley ve Hunt 2003). Son yıllarda bölgede çalışan serbest veteriner hekimler tarafından ilacın tedavideki etkinliğinin azaldığı yönündeki geri bildirimler ilaca karşı direnç oluşmaya başlamış olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotez doğrultusunda bu tezde, *T. annulata*'nın ilacın etki bölgesi olduğu düşünülen sitokrom b geninin mutasyonların varlığı yönünden araştırılması, eğer bir direnç oluşumu var ise etkili markerlar oluşturularak sahada direnç oluşumunun varlığının ve yaygınlığının belirlenebilmesi amaçlanmıştır.

1.1.1. Önemli *Theileria* Türleri

Theileriosis, *Theileria* türlerinin *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından sığır, koyun, keçi, manda gibi ruminantlara bulaştırılması ile oluşan akut veya subakut seyreden protozoer bir hastalıktır (Uilenbeng 1981a). Tropikal ve Türkiye'nin de içinde bulunduğu subtropikal ülkelerde yaygın olarak görülen bu hastalık özellikle sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Neitz 1957, Göksu 1959, Pipano 1965, Mimioglu ve ark 1972, Tüzer 1981, Uilenberg 1981a, Dumanlı ve ark 2005, Aktaş ve ark 2006, İnci ve ark 2008, Çiçek ve ark 2009).

Sığırlarda theileriosisin oluşumunda rol oynayan *Theileria* türlerinin sınıflandırılmasında, uzun süre şizont ve piroplazmaların morfolojik yapıları, vektör kenenin spesifikliğı, patojenitesi, biyolojik karakterleri ve serolojik tanımlamalar esas alınmıştır. Ancak *Theileria* türlerinin ayırımında, bu kriterlerin yeterli olmadığı, parazitteki moleküler ve genetik farklılıkları da ortaya koyan filogenetik analizlerin dikkate alınmasının gerekli olduğu rapor edilmiştir (Chae ve ark 1999, Gubbels ve ark 2000). Son zamanlarda *Theileria* türlerinin taksonomideki yerlerinin belirlenmesinde, çeşitli genlerin (small subunit ribosomal RNA; ssu rRNA, major piroplasm surface protein; MPSP ve internal transcribed spacers; ITS) filogenetik analizlerine dayalı çalışmalar ön plana çıkmıştır (Dumanlı 1987, Kawazu ve ark 1992, Kim ve ark 1998, Chae ve ark 1999, Kawazu ve ark 1999, Gubbels ve ark 2000, Liu ve ark 2013). Günümüzde hala *Theileria* türlerinin taksonomi ve sistematikteki yerleri tartışmalıdır. Levine (1988)'e göre *T. annulata*'nın sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir.

Alem: Animale

Alem altı: Protozoa

Anaç: Apicomplexa

Sınıf: Sporozoea

Sınıf altı: Piroplasmia

Dizi: Proplasmida

Aile: Theileriidae

Soy: *Theileria*

Tür: *T. annulata* (Dschunkowsky ve Lubs 1904),

T. parva (Theiler 1904) ve diğer türler

Theileria soyunda keneler tarafından nakledilen, evcil hayvanlar ve bazı memelilerde hastalık oluşturan pek çok tür bulunmaktadır (Çizelge 1.1.). Sığırlarda, *T. parva*, *T. annulata*, *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. sergenti/buffeli/orientalis grubu*, *T. velifera* ve yeni isimlendirilen *T. sinensis* olmak üzere yedi *Theileria* türü bulunmaktadır. Bu türler arasında patojenite, morfolojik, biyolojik ve genetik yönlerden önemli farklılıklar vardır. Bunlardan *T. parva* ve *T. annulata* en patojen iki tür olup, sığırlarda lenfoproliferatif karakterde, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden hastalıklara neden olurlar. Diğer *Theileria* türleri ise daha az patojen veya apatojen türler olarak kabul edilmektedir (Uilenberg 1981a).

- ***Theileria annulata*:**

Theileria annulata ilk kez 1904 yılında Kafkasya sığırlarında Dschunkowsky ve Luhs tarafından keşfedilmiş olup hastalığa tropikal piroplasmose, etkene ise *Piroplasma annulatum* adı verilmiştir (Dschunkowsky ve Luhs 1904). Bu öldürücü hastalık etkeninin daha sonra omurgalı konaktaki şizont döneminin tespit edilmesi ve eritrosit içerisindeki halka formlarının çoğunlukta olduğunun saptanması üzerine *Theileria annulata* olarak isimlendirilmiştir. *Theileria annulata*'nın neden olduğu hastalık Tropikal theileriosis, Akdeniz sahil humması, Tropikal piroplasmosis veya Mısır humması gibi çeşitli isimlerle anılmaktadır. Etken sığır, manda, bizon ve zebularda kan hücrelerini enfekte ederek hastalığa neden olmaktadır (Mimoğlu ve ark 1969).

Tropikal theileriosis etkeni olan *T. annulata*; Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu, Hindistan, Çin, Asya'nın bir bölümü ile Nil Vadisi'nden Sudan'a kadar uzanan geniş bir coğrafyada görülen bir türdür (Levine 1985, Soulsby 1986) (Şekil 1.1.). Hastalığın bu denli yaygın olarak görülmesinin nedeni bu bölgedeki çevre koşullarının hastalığa vektörlük yapan *Hyalomma* soyuna bağlı ixodid keneler için uygun olmasıdır (Purnell 1978). *Theileria annulata*, iki ya da üç konaklı özellik gösteren keneler tarafından trans-stadial olarak, başta *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. scupense* (= *H. detritum*) ve *H. marginatum* olmak üzere bu soya bağlı 15 kene türü tarafından nakledilir (Samish ve Pipano 1976, Uilenberg, 1981a, Karaer 1985, Soulsby 1986, Dumanlı 1987). *Theileria annulata* kaynaklı enfeksiyonların yaygınlığı ve görülme sıklığı *Hyalomma* soyuna bağlı kenelerin biyolojisi ve coğrafi dağılımıyla ilgilidir. Endemik bölgelerde genellikle kenelerin aktif olduğu Haziran-Eylül ayları arasında hastalık tablosu görülmekte fakat sporodik olarak yıl boyu vakalara rastlamak mümkündür (Sergent 1945, Pipano 1976, Flach ve Ouhelli 1992).

Çizelge 1.1. Evcil Hayvanlarda hastalık oluşturan *Theileria* türleri

Tür	Omurgalı Arakonak	Oluşturduğu Hastalık	Omurgasız ara konak(vektör)	Dünya üzerindeki dağılım
<i>Theileria annulata</i>	Sığır ve yak (<i>Bos grunniens</i>)	Tropikal Theileriosis	<i>Hyalomma</i> spp.	Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Ortadoğu, Orta Asya, Hindistan ve Kuzey Çin
<i>Theileria parva</i>	Sığır	Batı Sahil Humması, Koridor Hastalığı veya Zimbabve theileriosisi	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> ve diğer <i>Rhipicephalus</i> spp.	Batı ve Güney Afrika
<i>Theileria taurotragi</i>	Sığır (İlk kez Afrika geyiklerinde bulunmuştur)	<i>T. taurotragi</i> enfeksiyonu	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Batı ve Güney Afrika
<i>Theileria parva</i> ve/veya <i>Theileria taurotragi</i>	Sığır	Dönme hastalığı	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Batı ve Güney Afrika
<i>Theilaria mutans</i>	Sığır	<i>T.mutans</i> enfeksiyonu	<i>Amblyomma</i> spp.	Batı Afrika
<i>Theileria lestoquardi</i>	Koyun, keçi	Malignant ovine/ caprine theileriosis	<i>Hyalomma</i> spp.	Akdeniz bölgesi, Sudan, Batı ve Orta Asya ile Hindistan
<i>Theileria sergenti</i>	Sığır ve asya bizonu (<i>Bulbalus bubalis</i>)	<i>T.sergenti</i> enfeksiyonu	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Batı Asya ve Japonya
<i>Theileria sinensis</i>	Sığır ve yak	<i>T. sinensis</i> enfeksiyonu	<i>Haemaphysalis qinghaiensis</i>	Çin

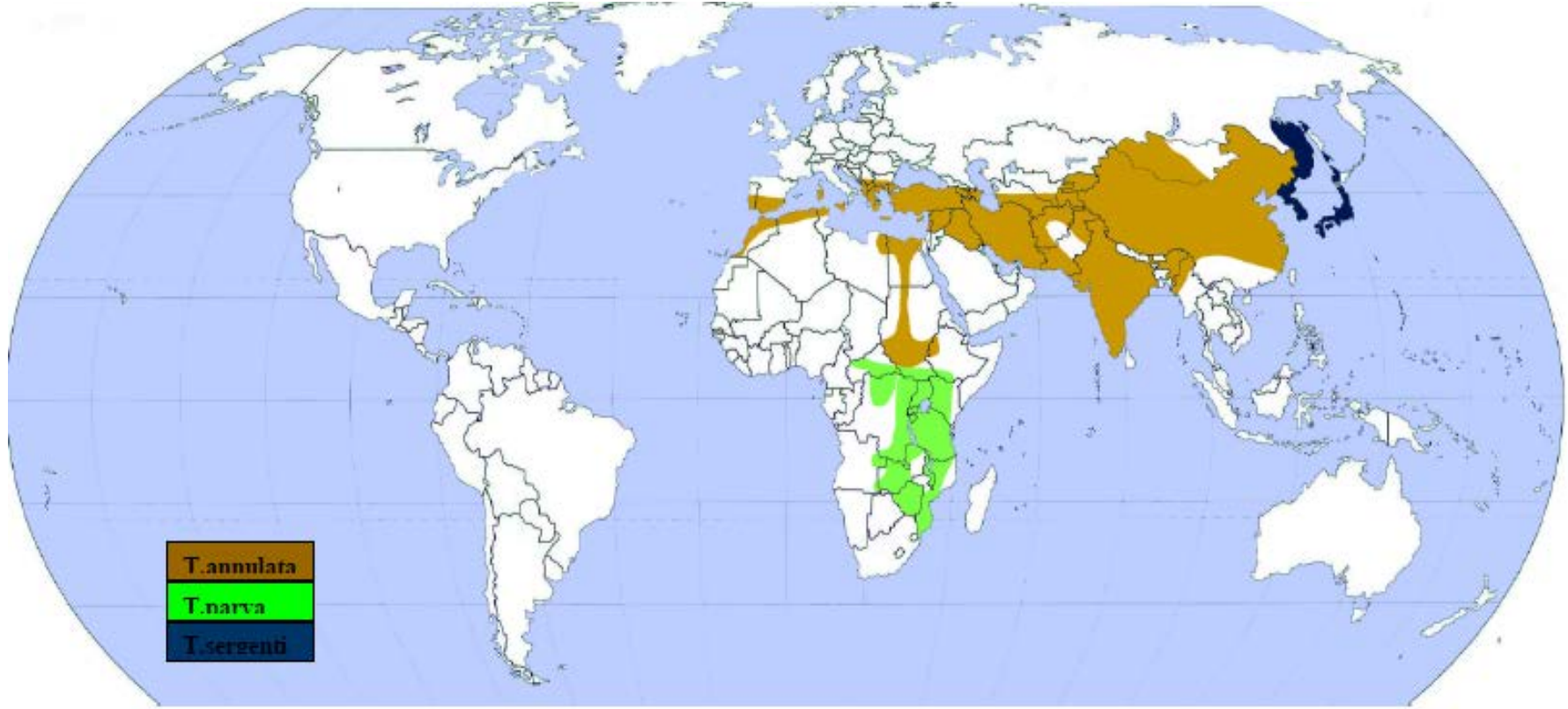
Theileria annulata'nın patogenezisinde, parazitin konağın immun sistem hücrelerinde bulunan şizontları ve eritrositlerde yer alan piroplazm formları etkilidir (Norvall ve ark 1992, Heussler 2002). Bu hastalığa özellikle kültür ırkı sığırlar duyarlıdır ve bu ırklarda % 40-60 oranında mortalite görülebilmektedir (Brown 1990).

- ***Theileria parva*:**

Batı Sahili Humması (East Cost Fever) etkeni olarak kabul edilen *T. parva*'nın Orta, Doğu ve Güney Afrika'da (Sudan, Zaire, Kenya, Victoria Gölü) sığır, zebu, manda ve antiloplarda bulunduğu rapor edilmiştir (Norvall ve ark 1992, Mckeever ve Morrison 2002) (Şekil 1.1.). *Theileria parva* asıl olarak kahverengi kulak kenesi olarak bilinen, *Rhipicephalus appendiculatus* tarafından nakledilmektedir. Bununla birlikte *R. zambesiensis*, *R. duttoni*, *R. simus* ve *R. evertsi* de vektörleri arasında yer almaktadır (Norvall ve ark 1992). *T. parva*'nın son konaktaki proliferasyon yeri lenfositlerdir. *Theileria parva* enfeksiyonlarında özellikle başlıca T-lenfositlerinin alt sınıflarını (BoT4+ ve BoT8+) ve B-lenfositleri enfekte olarak saptanmıştır (Norvall ve ark 1992, Heussler 2002). Eritrositler içindeki piroplazm formları çoğalmaması nedeniyle hastalığın patogenezinde şizontlar etkindir (Soulsby 1986). Bu türün, *T. parva parva*, *T. parva bovis* ve *T. parva lawrencei* olmak üzere üç alt tipinin bulunduğu, bu tipler arasında morfolojik ve serolojik farklılıklar olmadığı, ancak biyolojik ve epidemiyolojik farklılıkların bulunduğu ifade edilmektedir (Uilenberg 1981a). Yapılan moleküler çalışmalar bu alt tipler arasında genetik farklılıkların da bulunduğunu göstermektedir (Bishop ve ark 2002).

- ***Theileria sergenti/buffeli/orientalis* (Bening *Theileria*) Grup:**

Bu türler, Uzak Doğu, Amerika, Avustralya, Avrupa ve Afrika'nın hemen her bölgesinde bildirilmiştir (Stewart ve ark 1996, Sugimoto ve Fujisaki 2002) (Şekil 1.1.). Bu parazitlerin, Asya'da *Haemaphysalis* keneleri ile nakledildikleri, Texan ve Chine izolatlarının ise *Dermacentor* ve *Amblyomma* soylarına bağlı kene türleri ile nakledildiği belirtilmektedir (Fujisaki ve ark 1985, Higuchi ve ark 1987, Stewart ve ark 1987, 1988, 1989, Sugimoto ve Fujisaki 2002). İyi huylu *Theileria* (benign *Theileria*) etkenleri olarak bilinen bu türleri, patojen türlerden ayırt eden en belirgin özellik, şizontlarının lökosit transformasyonu ve öldürücü lenfoproliferasyon oluşturmamasıdır (Sugimoto ve Fujisaki 2002).



Şekil 1.1. Sığırlarda hastalık oluşturan önemli *Theileria* türlerinden *T. annulata*, *T. parva* ve *T. sergenti*'nin dünya üzerindeki dağılımı (www.theileria.org).

Chansiri ve ark (1999), altı bilinen ve on dört bilinmeyen *Theileria türü* ile ssRNA (small subunit RNA) temelinde yaptıkları moleküler filogenetik çalışmada, *T. parva*, *T. annulata* ve *T. taurotragi*'yi patojen *Theileria* türleri grubuna, *T. sergenti* ve *T. buffeli*'yi de patojen olmayan gruba dahil etmişlerdir. Bu çalışmalar doğrultusunda iyi huylu theileriosis etkeni olarak kabul edilen *T. sergenti/buffeli/orientalis* grubu parazitlerin patojenitesi, taksonomi ve nomenklatördeki yerleri konusunda tam bir birlik sağlanamamakla birlikte, non-transformik *Theileria* türleri olarak sınıflandırılmıştır (Dumanlı 1987, Fujisaki ve ark 1994, Kawazu ve ark 1999, Sugimoto ve Fujisaki 2002). Bu türler benzer özelliklere sahip olmalarına rağmen, buldukları ülkelere göre farklı isimlerle de ifade edilirler. Japonya'da *T. sergenti*, Avustralya'da *T. buffeli* ve Avrupa'da *T. orientalis* iyi huylu *Theileria* türleri olarak bilinmektedir (Uilenberg ve ark 1985). Bu ayırım, hastalığın patogenezisini oluşturan parazit formları ile ilişkilendirilmiştir. Bu gruptaki parazitlerin patogenezisinde eritrositlerdeki piroplazm formları etkin rol oynamakta ve hastalığın belirtisi olarak anemi öne çıkmaktadır (Mehlhorn 2001).

- ***Theileria sinensis***

Theileria sinensis ilk olarak Bai ve ark (2002a,b) tarafından Çin'de bir sığırdan izole edilmiş ve vektörünün *Haemaphysalis qinghaiensis* olduğu belirlenmiştir. Piroplazm formlarının morfolojik olarak *T. parva*, *T. annulata* ve *T. sergenti/buffeli/orientalis* türlerinden genel olarak farklı olması yanında parazite ait 18S rRNA sekans analizlerine dayanarak (Bai ve ark 2002a,b) ve farklı metotlar kullanılarak yapılan filogenetik çalışmalar *T. sinensis*'in bilinen *Theileria* türlerinden farklı olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur (Gubbles ve ark 2000, Yin ve ark 2004). Liu ve ark (2013)'ün üç farklı *T. sinensis* izolatının ITS1, ITS2 ve 5.8S rRNA genlerinin sekans analiz sonuçlarını bilinen *Theileria* türlerinin gen bankasında bulunan sekans analizleriyle karşılaştırmaları sonucunda *T. sinensis*'in yeni bir tür olduğu kesinlik kazanmıştır. *Theileria sinensis*, *T. sergenti* gibi bening karakter gösteren, tek başına hastalık tablosu oluşturabilen, sığır ve yalıklarda kronik anemiye neden olan bir theileriosis etkeni olarak tanımlanmaktadır (Jin ve ark 2007).

- **Diğer Patojenik *Theileria* Türleri**

Geyik ve antilopların bir paraziti olan *T. taurotragi* sığırlarda da enfeksiyon oluşturabilmektedir (Binta ve ark 1998). Sığırdaki genellikle hafif veya subklinik enfeksiyonlara neden olmakla birlikte, bazen ciddi hastalık tablosuna neden olmaktadır. *T. taurotragi* düşük patojenitesi yönünden *T. mutans* ile karıştırılmıştır. Ancak gerek morfoloji ve gerekse vektör kene yönünden *T. mutans*'tan farklıdır. Genelde *T. taurotragi*, *T.*

parva ile beraber Dönme Hastalığına neden olmaktadır (de Vos ve ark 1981). *T. mutans* *Theileria* etkenleri ile benzer bir yaşam döngüsüne sahip olmasına rağmen parazitin çoğalması şizont döneminde değil piroplasm döneminde gerçekleşir. Afrika Sahrasının alt kesimleri ile Karayip Adalarında yaygın olarak görülmektedir (Lawrence ve Williamson 2006). Bu türlere ek olarak Afrika’da mandaların bir paraziti olan *T. velifera*, sığırlar için non-patojen bir türdür ve *Amblyomma* soyuna bağlı keneler tarafından nakledilmektedir (Shah-Fischer ve Say 1989).

1.2. Theileriosis’in Epidemiyolojisi

Theileriosisin epidemiyolojisinde; bölgenin coğrafi konumu, hastalığın durumu, vektörlerin biyolojisi ve mevsimsel aktiviteleri, konak ile hastalık etkeni arasındaki ilişkileri ve hastalığın yayılma yollarının önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Sayın 1985, Brown 1990). Theileriosis, Akdeniz havzası (Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Anadolu yarımadası), Ortadoğu, Orta ve Güney Asya’da yaygın olarak görülmekte ve yaklaşık 250 milyon sığırı tehdit etmektedir (Tait ve Hall 1990).

Theileria annulata’nın hayat siklusu kene ile sığır arasında geçmektedir. Bunun yanında hastalığın oluşumunda mandaların rezervuar olarak da rol aldığı düşünülmektedir (Uilenberg 1981a, 1981b, Pipano 1994). Hastalık, vektör kenenin ekolojik özelliklerinden dolayı mevsimsel olarak seyretmekte, ancak yılın değişik mevsimlerinde de bazı sporadik vakaların olduğu gözlenmektedir (Neitz 1957, Uilenberg 1981a, 1981b, Flach ve Ouhellie 1992).

Theileria annulata’yı 15 *Hyalomma* türü doğal ve deneysel olarak nakletmekle birlikte *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. dromedarii* ve *H. scupense* (*H. detritum*) türleri en önemlileri olarak kabul edilmektedir (Robinson 1982, Pipano 1994). Kenelerle nakil biyolojik yolla olmakta ve transstadial olarak taşınmaktadır, yani keneler larva ya da nimf dönemlerinde enfekte hayvandan kan emerken aldıkları etkenleri, ancak kene gömlek değiştirip bir sonraki dönemine (nimf ya da olgun) geçtiğinde omurgalı konaklara nakledebilirler (Pipano 1977, Gautam ve Dhar 1983, Karaer 1985). Aç larvalar enfeksiyonu hiçbir zaman nakledemezler. Larva safhasından olgun safhaya nakil söz konusu değildir. Yani larva safhasında enfekte bir konaktan beslenen kene, nimf safhasında enfeksiyona duyarlı olsun olmasın kan emdiği son konağa etkenleri vererek erişkin safhada steril hale geçer (Bhattacharyulu ve ark 1975, Samish ve Pipano 1976, Uilenberg 1981b). Doğada hastalık iki

veya üç konaklı *Hyalomma* türü keneler ile taşınmaktadır. Üç konaklı keneler enfeksiyonu nimf veya olgun evrelerinde verebildikleri halde, iki konaklı keneler sadece olgun dönemlerinde nakledebilmektedir (Uilenberg 1981b). Birçok kene türünün aksine *Hyalomma* türleri hayvan barınaklarına adapte olabilmekte ve biyolojilerini burada tamamlayabilmektedir (Uilenberg 1981a, Liebisch ve ark 1988, Sayın ve ark 1992). Sayın ve ark (1992), Ankara bölgesinde kışı ahırdaki çatlak ve yarıklarda geçiren *H. anatolicum* ve *H. excavatum* türlerine rastlamışlar ve bunlarda değişik oranlarda *Theileria* etkeni tespit etmişlerdir. Bu nedenle hiç meraya çıkmayan hayvanlarda da enfeksiyonun görüldüğü rapor edilmiştir (Liebisch ve ark 1988, Sayın ve ark 2003).

Enfekte kene tarafından verilen sporozoit miktarı, *T. annulata*'nın virulansı ve hayvanın duyarlılığı *Theileria* enfeksiyonunun şiddetinin belirlenmesinde rol oynamaktadır (Sergent ve ark 1945, Pipano 1974, Gill ve ark 1977, Flach ve Ouhelli 1992, Flach ve ark 1995). Bir araştırmada, enfekte bir asinideki yalnız bir sporoblastta bulunan sporozoitlerin, *Theileria* enfeksiyonunu oluşturabilecek en düşük miktar olduğu kabul edilmiştir (Norval ve ark 1992). Ayrıca, *T. annulata* ile enfekte 1 veya 2 kenenin kan emmesi sonucu, hayvanlarda hafif bir enfeksiyonun şekillendiği ve hayvanların *Theileria* enfeksiyonuna karşı bağışık hale geldikleri bildirilmiştir (Gill ve ark 1977). Bunun yanında kene enfestasyonlarına karşı dirençli hayvanların, duyarlı hayvanlara nazaran, *Theileria* enfeksiyonlarının bulaşmasını sınırlandırdıkları bildirilmiştir (Rubaire-Akiiki 1990, Norval ve ark 1992).

Theileria türlerinin sığırlar için patojen olduğu kadar keneler için de patojen olduğu ve bu yüzden kenelerin de bu parazitlere karşı direnç kazandıkları rapor edilmiştir (Watt ve ark 2001). Kenelerin tükürük bezi hücreleri, fagositik hücrelerinin zararlı etkileri, bağırsaklarında bulunan katepsin enziminin parazitin yaşaması için uygun ortam oluşturmaması, kenelerin olumsuz çevre şartlarında canlı kalabilme ve uygun konak bulabilme ihtimalinin az olması, *T. annulata*'nın kenedeki gelişimi sırasında karşılaştığı engeller arasında sayılabilmektedir (Walker 1990).

Enfeksiyonun oluşumunda hayvanların ırk özellikleri de önemli rol oynamaktadır. Kültür sığır ırkları, yerli ve melez sığır ırklarına göre enfeksiyona daha duyarlıdır (Uilenberg 1981b, Brown 1990). Melez ve yerli sığır ırklarında hastalığın oluşup oluşmamasının verilen sporozoit miktarına bağlı olduğu, buna karşılık Holstein ırkı sığırların sporozoit dozuna bağlı olmaksızın şiddetli derecede hastalığa yakalandıkları belirlenmiştir (Preston ve ark 1992, Glass 2005, Glass 2012). Genç hayvanlar, aldıkları maternal

antikorlardan ve düşük düzeyde kene enfestasyonuna maruz kalmasından dolayı, yaşlılara oranla hastalığa daha az yakalanmaktadır (Flach ve Ouhelli 1992, Norval ve ark 1992, Flach ve ark 1995). Theileriosisin epidemiyolojisinde taşıyıcılık durumu en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Sergent ve ark 1945, Norval ve ark 1992). Enfeksiyonu atlattıktan sonra vektör keneleri enfekte edebilen hayvanlar taşıyıcı olarak tanımlanmaktadır (Sergent ve ark 1945). Bir hayvanın taşıyıcı olup olmadığı kan dolaşımında piroplazmik formların görülmesi ile tayin edilmektedir. Taşıyıcılığı devam ettirilebilmesi, lenfositlerde bulunan şizontların düşük düzeyde çoğalması ve piroplazmik formların düzenli olarak bölünmesi ile mümkündür (Norval ve ark 1992). Kesin bir süre belirtilmemiş olsa da portörlüğün yıllarca devam edebileceği (Young ve Leitch 1981), enfekte kenelerin bulunduğu endemik bölgelerdeki hayvanların ömür boyu taşıyıcı kalabileceği bildirilmektedir (Liebisch ve ark 1988, Norval ve ark 1992).

Theileriosisde gametlerin eritrositlerde bulunan piroplazmik formlardan oluştuğu ve bunların keneler için enfektif olduğu kabul edilmektedir (Mehlhorn ve Schein 1984). Ancak, piroplazmik formların kan dolaşımında en az 3 günü geçirdikten sonra gamet olabileceği ve bundan sonra parazitemi yüzdesine bağlı olmaksızın keneleri enfekte edebileceği rapor edilmektedir (Norval ve ark 1992). Flach ve Ouhelli (1992), Fas'ta yaptıkları bir çalışmada, taşıyıcı hayvanlardan kan emen *H. scupense* (*H. detritum*)'un larva ve nimflerinin enfekte olduklarını ve takip eden theileriosis mevsiminde duyarlı hayvanlara enfeksiyonu verdiklerini ortaya koymuşlardır. Bundan dolayı hastalığın naklinde en önemli faktörün portör hayvanlar olduğu ve ülkemizde de vektör kenelerin enfeksiyonu bu şekilde naklettiği ortaya konmuştur (Sayın ve ark 1992, Angın 1996).

Theileriosisin kontrolü için geliştirilecek mücadele programlarının hazırlanmasında coğrafik bölgelerin endemik stabiliteeleri de önemli rol oynamaktadır (Neitz 1957, Norval ve ark 1992). Endemik stabiliteelerin söz konusu olduğu durumlarda konak, etken ve vektör dengeli bir şekilde bir arada bulunmakta ve klinik enfeksiyonlar nadiren görülmektedir. Endemik instabilite durumunda ise, bu denge bozularak epidemik enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (Norval ve ark 1992). Endemik olarak stabil bölgelerdeki hayvanlarda yüksek düzeyde kene enfestasyonu vardır ve 6 aylıktan büyük hayvanlar taşıyıcı durumdadır. Klinik enfeksiyonlar 6 aylıktan küçüklerde ve bölgeye dışarıdan getirilen duyarlı hayvanlarda gözlenmektedir. Ancak, genç hayvanların maternal antikorlara sahip olmaları ve düşük düzeyde kene enfestasyonuna maruz kalmaları, bu hayvanların *Theileria* enfeksiyonlarını hafif düzeyde atlatmalarını sağlamaktadır (Neitz 1957, Norval ve ark 1992). Endemik olarak

instabil bölgelerde ise, klinik enfeksiyonlar her yaş grubundaki hayvanlarda gözlenebilmekte ve oldukça yüksek oranda ölümlere sebep olmaktadır (Norval ve ark 1992). Bu nedenle endemik stabilitenin olduğu bölgelerde kene mücadelesinin gereksiz hatta zararlı olduğu belirtilmektedir (Uilenberg 1981b, Norval ve ark 1992). Genellikle yerli hayvan popülasyonunun fazla bulunduğu ve yüksek düzeyde kene enfestasyonunun olduğu bölgeler, endemik olarak stabil kabul edilmekte ve bu gibi bölgelere ekzotik hayvanların sokulmasının, var olan endemik stabilitenin bozulmasına ve bölgenin instabil hale gelmesine sebep olacağı kabul edilmektedir (Liebisch ve ark 1988, Perry ve ark 1990). Enfeksiyonun prevalansının düşük, insidensinin düşük, orta veya yüksek düzeyde olması, enfeksiyondan bütün yaş gruplarındaki hayvanların etkilendiği durumlarda bölgenin instabil olduğu, prevalansın yüksek, insidensinin düşük ve sadece genç hayvanların enfeksiyondan etkilendiği bölgelerin stabil olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Norval ve ark 1992).

1.2.1. Türkiye’de Tropikal Theileriosis’in Epidemiyolojisi

Tropikal theileriosis ülkemiz sığırlarında bütün coğrafik bölgelerde görülmekte ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Sayın ve ark 2003). Kapadokya bölgesinde yapılan bir çalışmada tropikal theileriosisin bölgede iki yılda toplam 598,133 amerikan doları ekonomik kayıba yol açtığı saptanmıştır (İnci ve ark 2007).

Ülkemizde hastalığın iklim koşullarına ve vektör kenelerin aktivitelerine bağlı olarak, Nisan- Kasım ayları arasında gözleendiği ve bu kenelerin aktivitesinin arttığı Haziran-Temmuz aylarında en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir (Sayın ve ark 1991, 1992, 2003). Tropikal theileriosisin vektörleri olarak bilinen kene türlerinden *Hyalomma anatolicum*, *H. excavatum*, *H. scupense* (*H. detritum*), ve *H. marginatum*’unun Türkiye’nin bütün iklim bölgelerindeki sığırlarda bulunduğu rapor edilmiştir (Kurtpınar 1954, Mimioglu 1954, Merdivenci 1969, Hoffman ve ark 1971, Sayın ve ark 1991, Angın 1996, Aktaş 2004).

Türkiye’de theileriosis ile ilgili araştırmalar yapılmış ve yayımlanmıştır. Türkiye’nin farklı bölgelerindeki sığırlarda görülen theileriosisin en önemli protozoer hastalıklardan biri olduğu ve hastalığın diğer kan protozonlarına göre daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (Mimioglu ve ark 1971, 1972, Ünsüren 1976, Dumanlı ve Özer, 1987, Sayın ve ark 1990, 1992, 1997, Aktaş ve ark 2004, İnci ve ark 2008, Çiçek ve ark 2009). Erkut (1967), Ege bölgesinde yaptığı bir çalışmada sığırlarda yaz aylarında gözlenen ateşli hastalıklar içerisinde theileriosisin %43,2 oranında olduğunu belirlemiştir.

Türkiye’de sığırlarda theileriosisin yaygınlığı perifer kan ve lenf frotilerinin mikroskopik bakısı, serolojik testler ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Mikroskopik bakıya dayalı yapılan çalışmalarda, hastalığın yaygınlığı İç Anadolu’da %17,87 (Göksu 1959), %94,32 (Özcan 1961), %67 (Ünsüren 1976), Karadeniz bölgesinde %22,85 (Mimioglu 1955), %20 (Göksu 1970), %32,8 (Dinçer ve ark 1991), %17,44 (Açııcı 1995), Ege bölgesinde %43,2 (Erkut 1967), Marmara bölgesinde %23,18 (Tüzer 1981), Güneydoğu Anadolu bölgesinde %52,90 (Dumanlı ve ark 2004) oranlarında belirlenmiştir.

Eren ve ark, 1995 yılında yaptıkları çalışmada, Türkiye’nin beş farklı bölgesinde tropikal theileriosis’in seroprevalansını belirlemek amacı ile İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) yöntemini kullanmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre hastalığa en yoğun olarak Güneydoğu Anadolu bölgesinde rastlanmıştır (%91,4). Bunu Karadeniz bölgesi %46,8, Ege bölgesi %40, Marmara bölgesi %33,3 ve İç Anadolu bölgesi %29,0 takip etmiştir. Batı Karadeniz Bölgesinde ise %11,56’lık oranla en yaygın olarak *T. buffeli/orientalis* grubuna bağlı etkenlere rastlanırken, *T. annulata* %1,28’lik oranla çok düşük düzeyde tespit edilebilmiştir (Altay ve ark 2008).

Dumanlı ve ark (2005) Doğu Anadolu Bölgesinde yer alan Elazığ, Malatya, Bingöl, Muş, Van, Erzincan, Erzurum, Kars, Adıyaman, Diyarbakır, Şanlıurfa il ve ilçelerinde 1500 civarı sığırdan PCR tekniğini kullanarak *T. annulata*’nın prevalansını belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar hastalığın en yaygın olarak Diyarbakır (%74,6), Şanlıurfa (%60,3), Elazığ (%60,2), Bingöl (%61,7), Muş (%58,7), Adıyaman (%43,1) ve Van (%27,8) illerinde, en az oranda ise Erzurum, Kars ve Erzincan (%1,4–6) illerinde görüldüğünü ortaya koymuştur. Erzincan yöresindeki sığırlarda *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis*’ in yaygınlığı Reverse Line Blotting (RLB) tekniği ile araştırılmış %15,45 oranında *T. annulata*, %9,76 oranında ise *T. buffeli/orientalis*’e rastlanırken üç örnekte miks enfeksiyon tespit edilmiştir (Altay ve ark 2007). Şanlıurfa’da IFA testi kullanılarak 191 örnek test edilmiş ve %72,25 oranında tropikal theileriosis saptanmıştır (Sevgili ve ark 2010). Doğu Anadolu Bölgesi’nde yapılan farklı bir çalışmada ise *T. annulata* ve iyi huylu theileriosis etkenlerinin (*T. sergenti/buffeli/orientalis*) yaygınlığını belirlemek üzere 2004 yılında toplanan 252 kan örneği PCR ile incelemiştir. Bu örneklerde *T. annulata*’nın oranı %39 (99/252) ve iyi huylu theileriosis etkenlerinin oranı %7 (18/252) olarak tespit edilmiş ve aynı hayvanlar üzerinden *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *Rhipicephalus (=Boophilus) annulatus*, *R. bursa* ve *R. sanguineus* keneleri toplanmıştır (Aktas ve ark 2006).

Vatansever ve Nalbantoğlu (2002) Ankara ili Polatlı ilçesinde nested PCR, IFAT ve mikroskopik bakı yöntemleriyle *Theileria annulata* yaygınlığını belirlemek üzere yaptıkları çalışmalarında sırasıyla %61,2, %44,9 ve %31,3 oranlarında prevalans saptamışlardır. Türkiye’de sığırlarda *T. buffeli*’nin varlığı Vatansever ve ark (2003a) tarafından Ankara’da ve Inci ve ark (2003) tarafından Kayseri’de ortaya konmuştur. Vatansever ve ark (2003a)’nın yaptığı araştırmada Ankara’da 10 ilçede 250 sığırın 124’ü RLB ile *Babesia/Theileria* pozitif bulunmuştur. Söz konusu çalışmada RLB ile *T. annulata*, *T. buffeli*, *B. bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens*’in yaygınlığı sırasıyla %41,6, %13,6, %5,2, %3,6, %3,2 olarak saptanmışlardır. Inci ve ark (2003) ise Kayseri yöresinde 100 adet sığıra ait kan örneğini RLB metoduyla incelemişler ve 44 sığırdan *T. annulata*, 12 sığırdan ise *T. buffeli/orientalis* saptamışlardır.

Kayseri yöresi sığırlarında görülen *Theileria* ve *Babesia* türlerinin araştırılması amacıyla RLB ve mikroskopik bakı yöntemlerinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise (İça ve ark 2007a) mikroskopik bakıyla incelenen 337 sığır kan örneğinin %15,1’i *Theileria spp.* ve *Babesia spp.* yönünden pozitif bulunmuş, RLB yöntemiyle bu hayvanların %18,1’inin *T. annulata*, %0,9’unun *T. buffeli/orientalis* taşıyıcısı olduğu saptanmıştır. İça ve ark (2007b) Kayseri yöresinde sığırları enfeste eden kene türlerinin ve bu kenelerde bulunan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin saptanmasına yönelik olarak 300 sığırdan ve bu sığırların barınaklarından 1160 adet ixodid kene toplamışlardır. Kenelerin tür identifikasyonu yapılmış ve buna göre *Rhipicephalus (=Boophilus) annulatus* (%26,37), *Hyalomma marginatum* (%21,12), *Rhipicephalus turanicus* (%18,7) en yaygın türler bulunmuş, diğer türler yaygınlık sırasıyla *H. anatolicum*, *Haemaphysalis parva*, *H. scupense* (*H. detritum*), *H. excavatum*, *R. bursa*, *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis sulcata* ve *R. sanguineus* olarak saptanmıştır. Toplanan keneler türlerine göre ayrılarak 43 adet kene havuzu oluşturulmuş ve her bir havuz RLB testi ile *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı yönünden incelenmiştir. Kene havuzlarında enfeksiyon oranları *B. bigemina* % 14, *T. annulata* %9,3, %1,2 *Babesia sp.* olarak saptanırken, *T. annulata* ve *B. Bigemina*’nın birlikte seyrettiği miks enfeksiyon oranının %2.3 olduğu belirlenmiştir.

Ege bölgesinde IFA testi kullanılarak yapılan çalışmalarda hastalığın bölgede %40.0 ve %31.0 oranlarında görüldüğü belirlenmiştir (Eren ve ark 1995, Eren ve ark 1998) Aysul ve ark (2008)’nin yaptığı bir çalışmada Aydın ili sığırlarında *T. annulata*’nın yaygınlığı IFA testi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada tropikal theileriosis’e karşı aşılansız ve aşılansız iki farklı grup değerlendirilmiştir. Piroplasm antijeni kullanarak hastalık sezonunda aşılansız olan grupta 77/202 (%38,1), diğer grupta ise 24/205 (%11,7) hayvanda seropozitiflik tespit

edilmiştir. Bu çalışmada araştırma odaklarında ve hayvanlar üzerinden toplam 1248 adet kene toplanmıştır. Tür identifikasyonu sonucunda en sık görüldenen aza doğru *H. scupense* (*H. detritum*), *H. anaticum*, *H. marginatum*, *R. sanguineus* ve *R. annulatus* keneleri tespit edilmiştir. Sahadan toplanan *H. detritum* kenelerinde enfeksiyon oranlarına bakılmış ve %10 ila %50 arasında farklı oranlar tespit edilmiştir. Ege bölgesinde Aydın, İzmir ve Manisa illerinde yapılan bir başka çalışmada ise (Bakırcı ve ark 2012) *Hyalomma* soyuna bağlı *H. anaticum*, *H. excavatum*, *H. scupense*, *H. marginatum* ve *H. rufipes* türü kenelere rastlanmıştır. Aydın ve yöresinde ise sığırlardaki kenelerin yaygınlığı *H. marginatum* %48.28, *H. excavatum* %25.27, *H. scupense* (*H. detritum*), %17.72 ve *H. anaticum* %1.24 olarak saptanmıştır (Bakırcı 2009). Doğu Bölgelerine oranla Ege Bölgesindeki sığırlarda *H. marginatum* ve *H. excavatum*'un en yaygın kene türleri olduğu tespit edilmiş, barınak duvarlarından toplanan keneler incelendiğinde ise Aydın'da %91.43'lük oranla en yoğun olarak *H. scupense*'e rastlanmıştır (Bakırcı 2009, Bakırcı ve ark 2012).

Aydın ve yöresinde tropikal theileriosis etkenleri nakleden kenelerin yaşam döngüsü yaz döneminde dişi kenelerin yumurtlamasıyla başlar. Yumurtadan çıkan aç larvalar konaktan kan emdikten sonra gömlek değiştirerek aç nimfe dönüşürler ve aynı konakta kan emmeye devam ederler. Doyan nimfler konağı terk ederek kış dönemini geçirecekleri barınakların çatlak ve yarıklarının derin kısımlarına yerleşir. Mayıs-Haziran gibi havanın ısınmaya başladığı ilkbahar döneminde buldukları yerde gömlek değiştirerek aç olgun haline gelerek uygun konağı aramaya başlarlar. Konak üzerinde kan emme esnasında dişi ve erkek keneler çiftleşirler. Yaklaşık bir haftalık kan emme süresini tamamlayan dişi keneler toprağa düşerek yumurtlar ve yaşam döngüsünü tamamlar. Bu keneler larva ya da nimf safhasında etkeni olarak bir sonraki yaşam döneminde kan emme esnasında paraziti konağı naklederler.

1.3. *Theileria annulata* Yaşam Döngüsü

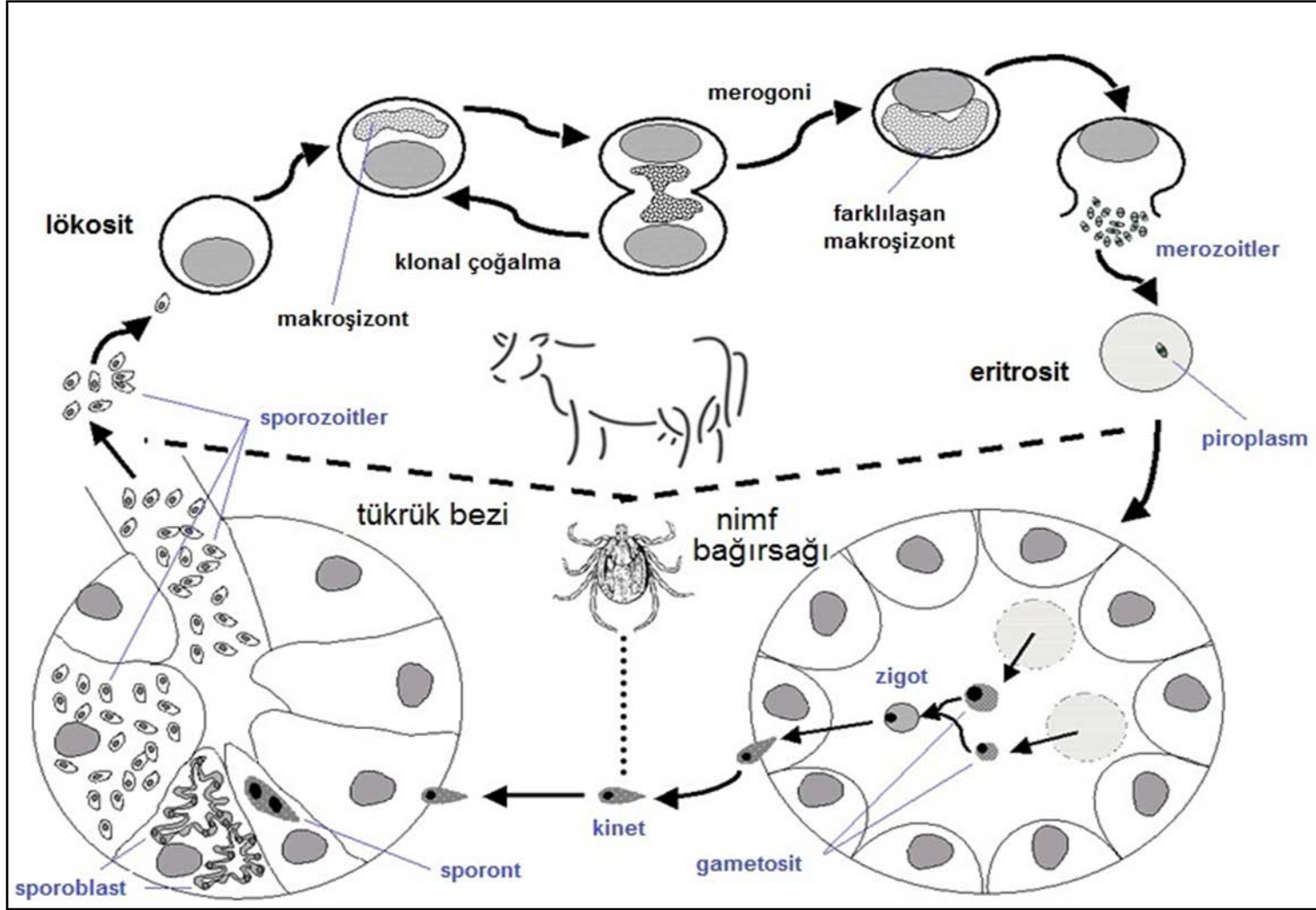
Theileria annulata, gelişimini omurgalı konak ile Ixodidae ailesine bağlı kenelerde sürdüren zorunlu hücre içi parazittir. *T. annulata*'nın vektör kenelerde ve omurgalı konakta birbirinden morfolojik olarak farklı gelişme basamaklarını içeren kompleks bir yaşam döngüsü bulunmaktadır (Şekil 1.2.). Parazitin yaşam çemberini omurgalı konaktaki şizogoni ve merogoni aşamaları ile vektör kenelerdeki gametogoni ve sporogoni aşamaları oluşturmaktadır (Uilenberg 1981a, Dinçer 1985).

1.3.1. Omurgalı Konaktaki Gelişme

Theileria türlerinin yaşam döngüsü larva veya nimf aşamasındaki enfekte kenelerin konak sığır üzerinde kan emmesiyle başlamaktadır (Samish ve Pipano 1978, Shaw ve ark 2002). Enfekte kene tarafından son konağa aktarılan *T. annulata* sporozoitleri kenenin tükürük bezi salgısıyla inokulasyonundan sonra, etkenler lokal lenf yumrularına geçer. Sporozoitler hareketsizdirler ve konak hücrelerine girişte aktin veya miyozinin rolü yoktur. Bu durum lenfoidlere penetre olan sporozoitler kadar eritrositlere giren merozoitler için de geçerlidir. Parazit her orientasyonda hücre içine girebilme yeteneğine sahiptir. Sporozitlerin ve merozoitlerin konak hücrelerine girmesi adeta fermuar dişlerinin birbirine uyumu gibi bağlanma göstermektedir. Sporozoitin sekretör organellerinin sekresyona başlaması yalnızca parazit hücre içine girdikten sonra gerçekleşmektedir (Fawcett ve ark 1984, Shaw ve ark 2002). *Theileria* türlerinin sporozoitleri çok kısa bir süre içinde (sığırlara nakledildikten 10-30 dakika sonra) lenfositler içine girerek trofozoit halini alırlar ve çekirdek bölünmesi geçirerek, çapları 10-15 μ 'nu bulan çok çekirdekli makroşizontları oluştururlar. Bunlar enfeksiyonu takip eden 5. günden itibaren lenf yumrusu biyopsilerinde görülebilir (Neitz 1957, Gautam ve Dhar 1983, Anon 1984, Mehlhorn ve Schein 1984, Levine 1985). *Theileria buffeli* enfeksiyonlarında şizontlar 6-20. günler arasında lenfositler içinde görülür ve hücrenin boyutunun büyümesine neden olmaktadır (50-200 μ m) (Uilenberg ve ark 1985). Buna karşılık diğer *Theileria* türlerinin makroşizontları konak hücrelerinin (lenfosit) transformasyonuna ve bölünmesine neden olmaktadır. Bunun sonucunda enfekte lenfositler mitotik yolla bölünerek bütün lenf dokusuna yayılırlar. Başlangıç safhasında şizontlar, oldukça büyük ve bazen de düzensiz şekilde ve 1,9 μ m büyüklüğüne varan kromatin granüllerine sahip olmaktadır. Bunu enfeksiyonun 8-10'uncu günlerinde çekirdeklerinin büyüklüğü yaklaşık 0,8 μ m kadar daha küçük olan merozoit safhası takip etmektedir. Oluşan merozoitler, hücreyi parçalar ve serbest kalan merozoitler eritrositleri istila eder. Merozoitler genellikle oval, yuvarlak ve virgül şeklindedirler. Bu şekillerin *T. annulata*'da %20-30'unu virgül, %70-80'nini oval veya yuvarlak formlar teşkil eder. Bunlar, eritrositler içinde, şizogonik bölünme ile gelişmelerine devam ederek eritrositlerin %90'nını enfekte edebilirler (Gautam ve Dhar 1983, Anon 1984, Mehlhorn ve Schein 1984, Levine 1985). *Theileria annulata* sığırlarda retikuloendotelial sistemde monosit ve B lenfositler içinde, kanda eritrositler içinde bulunur (Spooner ve ark 1989, Shaw 2002).

1.3.2. Vektör Kenede Gelişme

Kenelerle bulaşmada etkenin nakledilebilmesi için parazitin kenede gelişimini tamamlamış olması gerekmektedir (Karaer 1985). *Theileria* türlerinin kenelerle nakli transstadialdır (Pipano 1965, Uilenberg 1981a, Gautam ve Dhar 1983, Levine 1985). Kene yumurtadan sonraki gelişme dönemlerinden birinde (larva, nimf) aldığı etkeni, ancak diğer döneminde (nimf, olgun) nakledebilir (Pipano 1965, Bhattacharyulu ve ark 1975, Levine 1985). Doğal şartlarda, *T. annulata*'yı taşıyan keneler 2-3 konaklı olup, *H. scupence* (=detritum) 2 konaklı (Karaer 1985), *H. anatolicum*, *H. excavatum* ise 3 konaklıdır (Yukarı 1993). Keneler kan emerken eritrositlerle birlikte piroplazm formlarını alırlar. Bunlardan halka formları kene bağırsağında gelişir, iplik şeklinde 10-12µm uzunluğunda mikrogametler (*T.annulata*'da tek *T. parva*'da iki kuyruk görülür) ve 5- 6µm çapında yuvarlak makrogametler meydana gelmektedir. Altıncı günde makrogamet mikrogamet tarafından döllenmesi ile kenenin bağırsak epitel hücrelerinde zigotlar oluşmakta, 12. günde ise zigotlar hareketli kinetler haline dönüşmektedirler (Schein 1975, Gautam ve Dhar 1983, Mehlhorn ve Schein 1984). Kenenin enfekte olmasından 17 gün sonra kinetler hemolenf yoluyla, aktif hareketleri sayesinde, 2. ve 3. tip asini hücrelerine girerler. Bu hücrelerde kinetler yuvarlaklaşır, çekirdeği bölünerek sporontları oluştururlar. Keneler gömlek değiştirdikten sonra sporontlardan sporoblastlar gelişir, aç kenenin kan emmeye başlamasından 3 gün (2-4 gün) sonra *T. annulata*'nın enfeksiyon oluşturma kabiliyetine sahip sporozoitleri şekillenir ve kan emme esnasında omurgalı konağa nakledilir (Gautam ve Dhar 1983, Mehlhorn ve Schein 1984, Levine 1985).



Şekil 1.2. *Theileria annulata*'nın yaşam döngüsü (<http://www.theileria.org>'dan modifiye edilmiştir).

1.4. *Theileria annulata*'nın Genomu

Theileria annulata, 8.35Mb büyüklüğünde bir nükleer genoma sahiptir ve neredeyse tamamen aynı olan dört adet haploit kromozom içermektedir (Pain ve ark 2005). *Theileria annulata* ve *T. parva* kenelerdeki sporozoit dönemi hariç haploit genoma sahiptir. Nükleer genom dışında apikoplast ve mitokondriyal genom da bu parazitlerde bulunmaktadır. *Theileria annulata*'nın apikoplast genom dizilimi hala belirlenebilmiş değildir. Fakat mitokondriyal genom 6,3 kb (kilo baz) uzunluğunda olup lineer tiptedir (Feagin, 2000).

1.5. Tropikal Theileriosis'te Klinik Bulgular ve Patogenez

Theileriosiste klinik bulguların şiddeti, *Theileria* türlerinin virulansına, alınan sporozoit miktarına, konağın türlere karşı duyarlılığına, yaş, gebelik ve laktasyon gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Barnett 1968, Gill ve ark 1977, Flach ve ark 1995, Sayın ve ark 1999, 2000). *Theileria annulata* enfeksiyonlarında, mortalite oranının endemik bölgelerde kültür sığır ırkları için %90, yerli sığır ırkları için de %5 civarında seyrettiği bildirilmiştir. *Theileria annulata* enfeksiyonu, görülen klinik belirtilere göre hafif, perakut, akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır (Neitz 1957). Sığırlarda theileriosisin klinik bulguları enfekte kenenin kan emmesinden, ortalama 15 (8-25) gün sonra ortaya çıkmaktadır (Levine 1985). Perakut vakalarda, hastalığa duyarlı hayvanlarda enfeksiyonun alınmasından sonraki üç ila beş gün içerisinde ölüm görülür. Hastalığa karşı bağışık hayvanlarda (pasif ya da aşılama sonucu) ise klinik bulgular hafiftir veya hiç görülmez ve hayvanlarda kendiliğinden iyileşme görülmektedir (Pipano 2006).

Kenenin kan emmeye başlamasından ortalama iki hafta sonra (8-30 gün) yüksek ateş (40,0 - 42,0 °C) görülür. Ateşin görülmesinden bir ila iki gün öncesinde kenenin kan emdiği taraftaki yüzeysel lenf yumrularında büyüme şekillenir ve bu lenf yumrularından hazırlanan biyopsi örneklerinde hipertrofik lenfositler, monositik hücreler ve şizontlar tespit edilir. Yüksek ateş ve diğer lenf yumrularında büyüme 3 hafta boyunca devam eder. Kanda ilk piroplazmik formlar şizontların oluşmasından 5-8 gün sonra ortaya çıkmaktadır (Neitz 1957, Norval ve ark 1992).

Theileriosisli hayvanlarda en sık görülen klinik bulgular yüksek ateş (40,0 – 42,0°C), iştahsızlık, kilo kaybı, lenf yumrularında büyüme, mukoza ve konjunktivalarda başlangıçta hiperemi, sonraları solgunluk ve peteşiyel kanamalar, öksürük ve anemidir. Hastalığın

ilerleyen dönemlerinde beden sıcaklığının normalin altına düşmesi, mukozalarda ikterus, dehidratasyon, koyu siyah renkte, yapışkan kıvamda ve katran görünümünde dışkı ve gebe hayvanlarda abort görülür (Mimioglu ve ark 1971, Uilenberg 1981a, b, Dhar ve ark 1988, Norval ve ark 1992, Zhang 1991, Pipano 1994, Sayın ve ark 2000, Omer ve ark 2003, Dabak ve ark 2004). Ölümcül vakalarda parazitemi oranının %80'e yükseldiği, %10-15 oranındaki parazitemilerde ise iyileşmenin gözlemlendiği belirlenmiştir. Genellikle hayvanların 4-8 hafta sonra tam olarak iyileştikleri görülür. Tam olarak iyileşen hayvanların eritrositleri içinde az miktarda piroplazmik formlar görülmektedir ve bu hayvanlar parazite uzun süre taşıyıcılık yaparlar (Gill ve ark 1977).

Theileriosisli sığırlarda laboratuvar bulguları ise hastalığın seyri ve şiddetine göre değişiklik göstermektedir. Kanın pıhtılaşma yeteneğinde, total eritrosit sayısında, hemoglobin konsantrasyonu ve hematokrit düzeylerinde azalma ve tipik bir trombositopeni önemli hematolojik bulgulardır (Can ve Aslan 1984, Gül ve ark 1991, Dhar ve ark 1998, Gökçe ve ark 1998, Sayın ve ark 2000, Ömer ve ark 2002, Dabak ve ark 2004). Hastalığın başlangıcında lökopeni görüldüğü, hastalığın ilerlediği durumlarda ise lökositöz şekillendiği bildirilmektedir. Serum aspartat amino transferaz (AST) aktivitesi ile bilirubin, kolesterol ve total sialik asit konsantrasyonlarının arttığı, albumin, total protein, kalsiyum ve trigliserit konsantrasyonlarında azaldığı bildirilmiştir. Serum üre düzeyinin istisnalar dışında normal düzeylerde olduğu bildirilirken, serum kreatinin düzeyinin ise azaldığı bildirilmiştir (Laiblin 1978, Saundhu ve ark 1998, Ömer ve ark 2003, Karagenc ve ark 2005).

Theileriosisli hayvanlarda histolojik ve immuno-sitokimyasal metotlarla yapılan çalışmalarda, enfeksiyondan sonra miyeloid orijinli şizontla enfekte hücrelerin direkt olarak bölgeyi drene eden lenf yumrusuna göç ettiği ve bunu takiben lenf yumrusunun ödemli, büyümüş ve hemorajik bir hal aldığı görülmüştür (Forsyth ve ark 1999). Şizontlar ile enfekte olan konak hücrelerinin metastatik özelliğe sahip olduğu ve bu özelliğin matriks metalloproteinaz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak invazyon ve doku hasarı meydana geldiği belirlenmiş ve bu özelliği ile theileriosis kansere benzetilmiştir (İnci ve ark 2012). Bu metastaz özelliğine bağlı olarak enfeksiyondan iki hafta içerisinde şizontla enfekte hücreler tüm vücuda yayılır ve tüm organlarda büyümeler görülür. Özellikle karaciğer, adrenal bezler, timus, dalak ve peyer plaklarında lezyonlar meydana gelir. Hastalığın ilerleyen safhalarında abomasum mukozasında 1.5 cm çapında ülserler ile böbrek ve karaciğerde gri-beyaz odaklara rastlanır (Gill ve ark 1977, Uilenberg 1981b, Pipano 1994).

1.6. Tropikal Theileriosis'te Bağışıklık

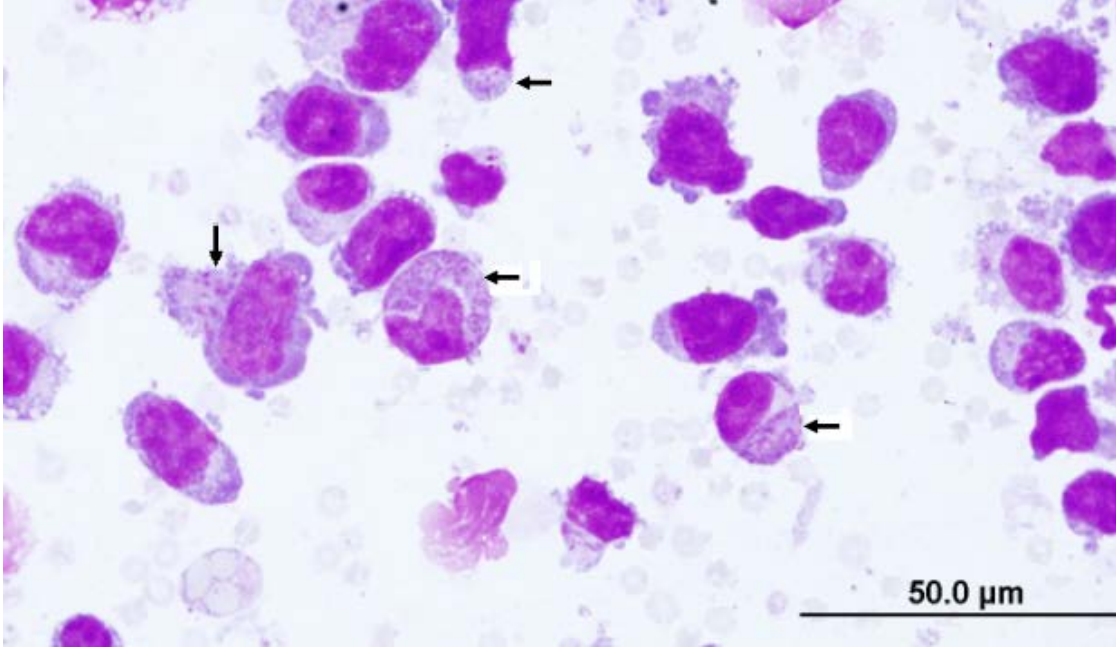
Theileria annulata'nın omurgalı konakta hem hücre içi (şizont, piroplazm) hem de hücre dışı (sporozoit, merozoit) formları görülür. Buna bağlı olarak konak bağışıklık sistemi parazitin yaşam döngüsündeki farklı dönemlerine ait antijenlerle karşılaşmakta ve bu da içerisinde hem humoral hem de hüresel komponentleri içeren heterojen bir yanıtı sebep olmaktadır (Boulter ve Hall 1999). Her iki durumda da enfeksiyondan kurtulan hayvanlarda homolog suşlara karşı tam, heterolog suşlar ile reenfeksiyonlara karşı ise kısmi bir bağışıklık gelişir (Hall 1988). *Theileria annulata* tarafından oluşturulan primer enfeksiyonu atlatan hayvanlarda daimi taşıyıcılık (carrier state) durumu şekillenir (Ilhan ve ark 1998). Taşıyıcılık klasik anlamıyla, enfekte olduktan sonra iyileşen bir hayvanın vektör keneler için rezervuarlık oluşturmasını ifade eder. Ilhan ve ark (1998) araştırma bulgularını, taşıyıcılığın parazitin yalnızca piroplazm formlarına değil; şizont formlarına da ilgili olduğuna delil saymıştır. *Theileria annulata* enfeksiyonlarında makrofajlara ve natural killer hücrelere bağlı doğal bağışıklık mekanizmalarının parazitin sporozoit, makroşizont ve merozoit gibi değişik yaşam devrelerinin proliferasyonuna doğrudan etki ettiği gösterilmiştir. Enfekte hücreler, enfekte olmamış sitostatik makrofajları aktive ederek bu hücreler tarafından reaktif oksijen ve nitrojen bileşikleri ile TNF- α gibi bazı faktörlerin salınmasına ve bu sayede enfekte hücrelerin baskılanmasına neden olmaktadır (Preston ve Brown 1988). Doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücreler de uyarılarak IFN- α salgılanması yoluyla makroşizontla enfekte hücreleri yok etmektedirler (Preston ve ark 1983). NK hücreleri aynı zamanda enfekte hücreler tarafından salgılanan sitokinler yardımı ile IFN- γ üretimi için uyarılarak, enfekte olmamış makrofajlarda nitrik oksit (NO) üretimini kuvvetlendirici bir etki yapabilmektedir (Preston ve ark 1999). NO'nin *in vitro* koşullarda makroşizontlar ile enfekte hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği, bu sayede merozoitlere farklılaşmayı engellediği gösterilmiştir (Richardson ve ark 1998). Aynı zamanda, NO *in vitro* ortamda hücrelerin sporozoitler ile invazyonunu engellediği gösterilmiş (Visser ve ark 1995). *Theileria annulata* enfeksiyonlarında makrofajlar ve natural killer hücreler doğal ve kazanılmış bağışıklığın sinerjik olarak şekillenmesinde rol oynamaktadır. Özellikle sitostatik ve sitotoksik etkiye sahip NO'ü üreten makrofajların bağışıklıktan sorumlu olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (Visser 1995, Richardson ve ark 1998, Ayerdem ve ark 2006).

1.7. Tropikal Theileriosis'in Tanısı

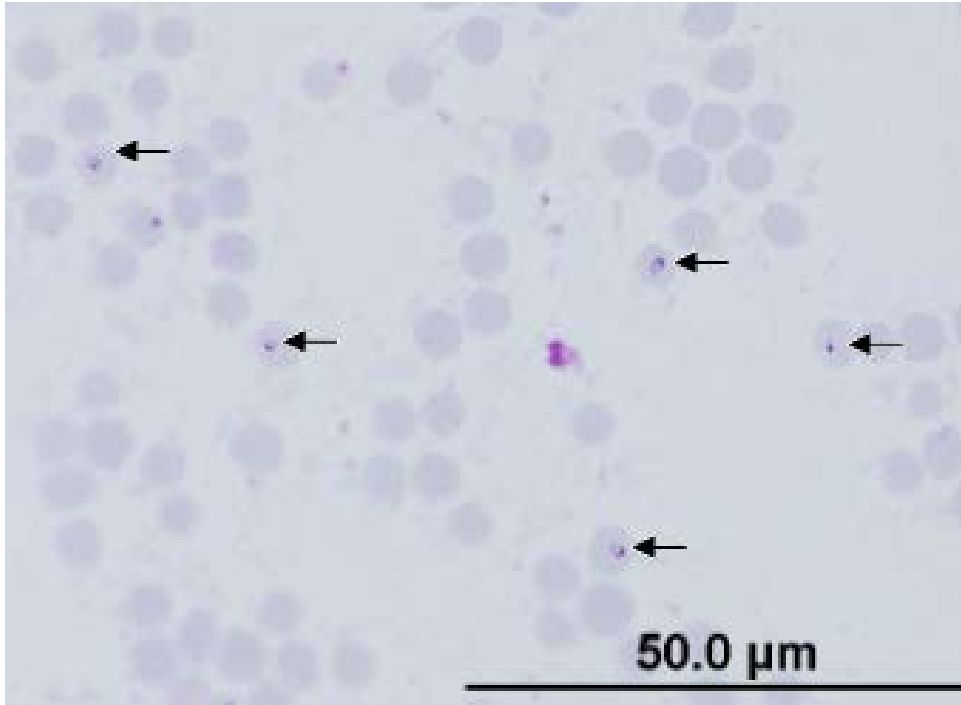
Sığırlarda theileriosisin tanısı; klinik bulgular, kan frotisinde ve lenf yumrusu biyopsisinde parazitin mikroskopik olarak görülmesi, parazite karşı oluşan antikorların ve antijenlerin serolojik yöntemlerle ortaya konması ve moleküler tekniklerle kullanılarak yapılmaktadır (Anon 1984, Stiller 1990).

1.7.1. Klinik ve Mikroskopik Tanı

Tropikal theileriosis'in endemik olarak görüldüğü bölgelerde tanı genellikle klinik bulgular ışığında makroskopik bulgular ve yaz aylarında hayvan üzerinde görülen kene varlığına dayanarak yapılmaktadır. Laboratuvar şartlarında ise Giemsa ile boyanmış lenf yumrusu ya da karaciğer biyopsilerinde şizontların (şekil 1.3.) görülmesi ve/veya kan frotilerinin mikroskopik bakısında eritrositler içerisinde etkenin piroplazmik formlarının (şekil 1.4.) görülmesi ile yapılmaktadır (Göksu 1985, Pipano 1994). Alınan biyopsilerden yapılan sürme preparatları değerlendirirken akut, kronik vakaları ve taşıyıcı hayvanları ayırt etmek kolay değildir. Ayrıca lenf biyopsilerinde makroşizontların azurofilik granüller gibi artefaktlarla karıştırılmaması gerekmektedir (Lawrence ve ark 1994). Yayma kan frotilerinin mikroskopik bakısında, genel olarak *T. annulata*'nın piroplazmik formları orta boyda yuvarlak, oval şekilde olması, *T. parva*'da küçük ve çomak, *T. mutans*'ta oval ve çubuk, *T. taurotragi*'de uzun, çubuk benzeri formların görülmesi dışında, *Theileria* türlerini birbirinden ayırmak zordur (Anon 1984). Ayrıca hastalık esnasında piroplazmların bu formları değişkenlik göstermekte ve etkenin ayırıcı tanısına olanak vermemektedir (Uilenberg 1981). Hastalığı atlatan hayvanlar taşıyıcı haline gelirler ve vektör keneler için önemli enfeksiyon kaynağı oluşturmaktadırlar. Ancak taşıyıcı hayvanların Giemsa ile boyanmış kan frotilerinde etkenin piroplazmik formlarının görülmesi zaman ve deneyim gerektirmektedir (Brown 1990).



Şekil 1.3. Giemsa boyalı lenf yumrusu biyopsi sürme preparat görüntüsü. *T. annulata* makroşizontları ok işaretleriyle gösterilmiştir (orijinal).



Şekil 1.4. Giemsa ile boyalı kan frotisi. *T. annulata* piroplasm formları ok ile gösterilmiştir (orijinal).

1.7.2. Serolojik Tanı

Theileria annulata enfeksiyonlarına karşı oluşan spesifik antikorların belirlenmesi için İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT), Komplement Fiksasyon (CF), Enzim Bağımlı İmmunosorbent Testi (ELISA), Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI), İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) gibi serolojik testler kullanılmaktadır (Pipano 1974, Dhar ve Gautam, 1977ab, Kachani ve ark 1994).

Günümüzde en yaygın ve güvenilir serolojik tanı yöntemleri IFAT ve ELISA'dır. Bu testler oldukça duyarlı, spesifitesi yüksek ve yapılabirliği genellikle kolaydır. Bu teknikler, epidemiyolojik çalışmalarda endemik instabilite ve stabilitenin belirlenmesinde kriterlerden biri olan antikor prevalansını ölçmede ve aşuya karşı oluşan antikor yanıtını belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır (Pipano 1974, Anon 1984, Çakmak 1987, Dinçer ve ark 1991, Sayın ve ark 1991, 1992, 1994 Dargout 2006). Ancak çeşitli *Theileria* türleri (*T. parva*, *T. annulata*, *T. mutans* ve *T. taurotragi*) arasında belli derecelerde çapraz reaksiyon görülmesi testin duyarlılığını olumsuz yönde etkilemektedir (Burrige ve ark 1974). Aynı zamanda, *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale* ve *A. centrale* gibi diğer bazı apikompleksa anacında yer alan parazitlerle çapraz reaksiyon verebilmektedir (Burrige ve ark 1974, Kocan ve ark 2000, Molad ve ark 2006). Bunun yanında uzun süreli taşıyıcılık durumlarında kanda piroplazmik formlar bulunmasına rağmen, antikorlar her zaman tespit edilememektedir (Pipano 1974).

ELISA, IFA testine kıyasla daha duyarlı oluşu, aynı anda çok sayıda örneğin incelenebilmesine olanak sağlaması ve daha ucuz bir yöntem olması nedeniyle daha avantajlı bir testtir (Kemeny ve Chantler 1988). Parazitin omurgalı konaktaki farklı yaşam dönemlerine (sporozoit, şizont, meroziot/piroplasm) özgü antijenler belirlenerek ELISA testinde kullanılmaktadır. Bu antijenler arasında, sporozoit yüzey antijeni; SPAG-1 (Hall ve ark 1992, Williamson ve ark 1989), merozoit rhoptri antijeni; Tamr-1 (Shiels ve ark 1994), 32 kilo dalton (kDa) meroziot ve piroplasm yüzey antijeni; Tams-1 (Shiels ve ark 1995), *T. annulata* yüzey antijeni; TaSP (Schnittger ve ark 2002, Renneker ve ark 2009, Mohamed ve ark 2012), şizont yüzey antijeni; TaD (Schneider ve ark 2004), şizont proteini; TaSE (Schneider ve ark 2007), mitokondriyal HSP70; TamtHSP70 (Schnittger ve ark 2000) yer almaktadır.

1.7.3. Moleküler Tanı

Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler enfeksiyona neden olan etkenlerin moleküler düzeyde belirlenmesine olanak sağlamıştır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesine paralel olarak, çeşitli yöntemlerle sığır ve kenede parazit DNA'sının ortaya konulmasına yönelik teknikler (DNA hibridizasyon, PCR) geliştirilmiş ve enfeksiyonun %100'e yakın doğrulukta ortaya konulmasını olanaklı kılmıştır (Norval ve ark 1992, Ilhan 1995). Günümüzde bu teknikler hastalık etkenlerinin tanısında vazgeçilmez birer araç olmuşlardır. Parazit DNA'sının ortaya konması ilkesine dayanan PCR testi, *Theileria* ve *Babesia* türlerinin duyarlı ve özgül biçimde tanısını sağlamaktadır (Kok ve ark 1993, d'Oliveira ve ark 1995, Calder ve ark 1996, d'Oliveira ve ark 1997, Martin-Sanchez ve ark 1999, Sparagano 1999, Sparagano ve ark 1999). Son yıllarda, *T. annulata*'nın teşhisinde birçok farklı PCR metodu kullanılarak hem vektör kenelerde (d'Oliveira ve ark 1997b, de Kok ve ark 1993) hem de omurgalı konakta (d'Oliveira ve ark 1995, Ilhan ve ark 1998, Shayan ve ark 1998, Gubbels ve ark 1999, Martin-Sanchez ve ark 1999) parazitin teşhisi yapılmaktadır. PCR tekniğinde kullanılan primerler 18S ssu rRNA (ribozomal RNA'nın küçük alt ünitesi) (de Kok ve ark 1993, Ilhan ve ark 1998, Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001), *T. annulata* major yüzey proteini (Tams-1) (d'Oliveira ve ark 1995, Martin-Sanchez ve ark 1999, Kirvar ve ark 2000), ısı şok protein 70 (HSP70; heat shock protein 70) (Shayan ve ark 1998), beta tubulin (β -tubulin) (Caccio ve ark 2000) ve mitokondriyal sitokrom genlerini (Criado ve ark 2006, Bilgic ve ark 2010) çoğaltarak parazitin teşhisine olanak sağlamıştır.

Aktas ve ark (2002) Türkiye'de ilk defa *T. annulata*'nın tanısında PCR yöntemini kullanmışlardır. *T. annulata* enfeksiyonlarının tanısında mikroskopik bakı, IFAT ve nested PCR yöntemlerinin karşılaştırılmasına yönelik yapılan bir çalışmada; bu tanı yöntemlerinden Nested PCR tekniğinin diğer iki tanı yöntemine göre daha duyarlı ve özgül olduğunu bildirilmiştir (Vatansever ve Nalbantoglu 2002).

Son yıllarda tek türün varlığını ortaya koyan klasik PCR tekniğinin modifikasyonlarından biri olan multiplex-PCR (mPCR) metodu kan parazitlerinin teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır (Harris ve ark 1998, Zarlenga ve ark 2001). Klasik PCR metoduna göre bu tekniğin avantajı birden fazla etkeni eş zamanlı olarak tespit edebilmesidir (Henegariu ve ark 1997, Markoulatos ve ark 2002). Kırşehir yöresi sığırlarında yapılan bir çalışmada mPCR tekniği kullanılarak eş zamanlı olarak *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* varlığına

bakılmıştır (Orkun ve ark 2012). Bilgiç ve ark (2013), aynı tekniği kullanılarak, *T. annulata*, *Babesia bovis* ve *Anaplasma marginale* yönünden 73 sığır kanı inceleyerek miks enfeksiyonları tespit etmişlerdir.

Son yıllarda PCR ile hibridizasyonun birlikte kullanıldığı Reverse Line Blotting (RLB) tekniği parazitolojide kullanım alanı bulmuştur. Bu metot farklı kan parazitlerinin aynı anda teşhis edilmesini mümkün kılmıştır (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001, İça ve ark 2004, Oura ve ark 2004). Bu yöntemde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S ssu rRNA geninin bu türler arasında farklılık gösteren V4 bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılıp, daha sonraki basamakta çoğaltılan örnekler bu değişken bölgeye bağlanan özel oligonükleotid problemlerin bulunduğu membran üzerine konularak tür ayırımı yapılmaktadır. Yapılan çalışmada, RLB hibridizasyonu ile belirlenen 18S ssu rRNA geninin duyarlılığının *T. annulata* için 3 parazit / µl kan (Gubbels ve ark 1999) olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem ile sığırlarda görülen yedi *Theileria* (*T. annulata*, *T. parva*, *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. velifera*, *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* grubu ve *T. sinensis*) ve üç *Babesia* (*B. bovis*, *B. divergens* ve *B. bigemina*) türünün teşhisi yapılabilmektedir.

Theileria annulata'nın teşhisinde kullanılan bir diğer yöntem ise restriksiyon enzimi ile kesilen bölgelerinin boy farklılıklarının (RFLP; restriction fragment length polymorphism) belirlenmesinde kullanılan DNA problemleridir (Ben Miled ve ark 1994). Caccio ve ark. (2000) β-tubulin geninin amplifikasyonuna dayalı PCR-RFLP analizi ile iki *Theileria* ve yedi *Babesia* türünün; Spitalska ve ark. (2004) ise 18S ssu rRNA geninin amplifikasyonuna dayalı RFLP testi ile vektör ve konaklarda *T. lestoquardi* ve *T. annulata* türlerinin ayırımını gerçekleştirmiştir. RFLP metodu teşhis dışında parazit popülasyon genetiği çalışmalarında da kullanılmaktadır. Bu metot kullanılarak Bahreyn, Hindistan, İtalya, Moritanya, Portekiz, İspanya, Sudan, Tunus ve Türkiye'den alınan *T. annulata* izolatlarının Tams1 geni DNA dizilimlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, aynı coğrafi bölge izolatları arasında da *T.annulata* Tams1 geninin belirgin bir polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir (Gubbels 2000).

Son yıllarda yapılan popülasyon genetiği çalışmalarında ise RFLP yönteminden daha ziyade genom üzerinde bulunan peşpeşe sıralı tekrarlı nükleotid bölgeler (tandem bölgeler) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak örnekler arasındaki farklı popülasyonlar daha etkili analiz yöntemleri ile belirlenebilmektedir (Weir ve ark 2007).

Yukarıdaki moleküler yöntemlere ek olarak LAMP tekniği *T.annulata*'nın teşhisinde kullanılmıştır (Salih ve ark 2008, Liu ve ark 2013). Bu yöntem kimi kaynaklara göre PCR metoduna göre daha duyarlı olarak bildirilmekte (Isaki ve ark 2007, Salih ve ark 2008, Liu ve ark 2013) iken yapılan bazı çalışmalarda eşit duyarlılıkta oldukları (Ikadai ve ark 2004, Alhassan ve ark 2007) bildirilmiştir.

1.8. Tedavi

1970'li yıllara kadar tropikal theileriosis tedavisinde etkili bir etken madde bulunamaması nedeniyle hastalık yüksek mortaliteyle seyretmekteydi. Theileriosise karşı ilk etkili bileşikler 8-aminoquinoline'lar olarak gösterilmiş, ancak hastalığın tedavisinde ilk önemli buluş *T. parva*'ya karşı chlortetracycline'lerin koruyucu aktivitesi olmuştur (Neitz,1953). *In vitro* kültür sistemlerinin gelişmesiyle, çok sayıda ilaç denenerek ilk defa bir hidroxynaphtoquinone bileşiği olan menoctone'un anti-theilerial etkisi tespit edilmiştir (McHardy ve ark 1976). Daha sonra yapılan çalışmalarda Schein ve Voigt (1979) anti-coccidial bir ilaç olan halofuginone hydrobromide'in *T. annulata* ve *T. parva*'ya karşı da etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmalar doğrultusunda *T. annulata* ile ilişkili sığır theileriosisine karşı 1,2 mg/kg dozda ve oral yolla verilen halofuginone hydrobromid'in sığırlardaki ilk klinik bulguları ortadan kaldırdığı ve lenf yumrularından hazırlanan sürme frotilerde şizontları tamamıyla yok ettiği belirlenmiş, ancak ilerlemiş olgularda nükslerin oluşabildiği gözlemlenmiştir (Mchardy 1984). Halofuginone'in hydrobromid tuzunun suda kolaylıkla erimemesi nedeni ile tedavide ideal bir ilaç kombinasyonu oluşturmadığı, ancak halofuginone'un kolay eriyen laktat tuzunun oral olarak 48 saat arayla 1.2 mg/kg dozda verilmesi etkenin şizont formuna etkili olduğu tespit edilmiştir. Halofuginone'un etki mekanizması bilinmemekle birlikte, theileriosisli sığırlarda enfekte lenfositlerin patlaması sonucu serbest kalan şizontların tamamen dejenerasyonuna neden olduğu, eritrositler içersindeki piroplazmik formlarına karşı etkisiz olduğu bildirilmektedir (Mchardy 1984, Güralp 1985). Ayrıca ilaç sıklıkla sindirim sistemi bozukluklarına neden olduğundan tercih edilmemektedir. (Mchardy 1985).

Bu gelişmeleri, menoctone analogları olan parvaquone (McHardy ve ark 1983) ve buparvaquone (McHardy ve ark 1985) izlemiştir. Tropikal theileriosis'in tedavisinde naphthoquinone'lar (parvaquone-buparvaquone) parazitin hem makroşizont, hem de piroplasm dönemlerine etki etmekte ancak parazitleri tamamen elimine edememektedir.

Ayrıca naphthoquinone'lar hastalığın başlangıç safhasında uygulandığında etkili olmakta, hastalığın ilerlemiş safhasında ise tedavi başarısı azalmaktadır. *Theileria annulata*'ya karşı 20 mg/kg dozda bir kez kas içi yolla uygulanan parvaquone'un etkili olduğu bildirilmektedir (Mchardy 1984, Güralp 1985). Parvaquone'un 48 saat arayla 10 mg/kg dozda kas içi yolla uygulanabildiği ve bu tedavi sonunda hasta hayvanların klinik olarak iyileşmediği durumlarda aynı ilacın belirtilen dozda tekrarı önerilmektedir (Hashemi-Fesharki 1991). Yapılan çalışmalarda, buparvaquone'un (2-trans (4-t-butylcyclohexyl-methyl)-3-hydroxy- 1,4-naphthoquinone) *T. annulata*'dan ileri gelen sığır theileriosisine karşı küratif ve profilaktik amaçla kullanılan en etkili anti-theilerial ilaç olduğu rapor edilmiştir (Dhar ve ark 1986, Gautam ve ark 1987, Ünsüren ve Kurtdede 1988, Dolan ve ark 1992, Gül ve ark 1992, Singh ve ark 1993, Saruhan ve ark 2008).

Hydroxynaphthoquinone grubunda bulunan buparvaquone'un parazitin elektron transport sistemine etki etmesi ve plazmada yarılanma süresinin uzun olması *T. annulata*'dan ileri gelen sığır theileriosisinin tedavisinde etkin olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Hudson ve ark 1985, Kinabo ve Bogan 1988). Hastalığa ait bulguların görüldüğü ilk günlerde 2,5 mg/kg dozda kas içi yolla uygulanan buparvaquone *T. annulata*'nın hem piroplazm hem de şizont formuna karşı etkili olmaktadır. (Morgan ve McHardy 1986, McHardy ve ark 1987). Hasta hayvanlarda iştah ve beden sıcaklığının normale dönmediği durumlarda 48 saat sonra aynı dozda ikinci bir uygulama gerekebilmektedir. (Dolan ve ark 1992, Mishra ve ark 1993). Alternatif olarak 5 mg/kg buparvaquone'un tek doz olarak uygulanabileceği de bildirilmektedir (Singh ve ark 1993). Dhar ve ark (1987a), 2,5 mg/kg dozda buparvaquone'un kas içi yolla uyguladığı, sığırların çoğunda beden sıcaklıklarının üç gün içinde normal değerlere ulaştığını, piroplazm ve şizont formlarının sayılarının azaldığını ve piknotik hal aldığını, 6 – 15 gün içinde hayvanların tamamen iyileştiklerini, piroplazm ve şizont formlarının ise tamamen ortadan kalktığını bildirmektedirler. Mchardy ve Hudson (1984), *T. annulata* ile deneysel enfekte hayvanlara denemenin onuncu gününde 2,5 mg/kg dozda buparvaquone uyguladıkları hayvanlarda iki gün sonra belirgin bir düzelmeye görüldüğünü ve çalışmanın sonunda hayvanların tümünün iyileştiğini rapor etmektedirler. Hastalığın ilerlemiş evrelerinde immun sistemde çok geniş bir yıkımlanma olması nedeniyle ilacı birkaç kez uygulamak gerekmektedir. Ayrıca, enfekte hayvanların tekrar eski verimlerine dönmeleri uzun süre alabilmektedir.

Buparvaquone'un parvaquone'a oranla daha etkili olduğunun saptanması, ilacın parazit etkenine karşı gösterdiği yüksek etkisi ve güvenilirliği nedeniyle son yıllarda en yaygın kullanılan anti-theilerial ilaç olmuştur. Günümüzde firmalar tarafından üretilen çeşitli ticari isimler altında buparvaquone etken maddeli çok sayıda ilaç bulunmaktadır (Butalex, Buparvon, Theilerol vb). İlacın bu kadar yaygın kullanımı, yanında bazı olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Hayvanlarda bulunan mevcut parazit populasyonlarının sürekli aynı ilaca maruz kalması zamanla bu parazit populasyonlarında ilacın etkisinden kurtulmak için alternatif yollar bularak direnç kazanmasına yol açabilmektedir (Sibley ve Hunt, 2003). Son yıllarda theileriosisin endemik olduğu bölgelerde saha veteriner hekimlerinden gelen bilgilere göre ilacın tedavide yetersiz kaldığı durumlar olmaktadır ve *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı direnç geliştirmiş olabileceği bildirilmektedir (Mhadhbi ve ark 2010, Sharifiyazdi ve ark 2012) .

1.9. Tropikal Theileriosis'te Korunma ve Kontrol Yöntemleri

Sığır theileriosisinin kontrolünün kenelerle taşınan diğer hastalıklarda olduğu gibi, hayvanların bakım koşullarının iyileştirilmesi, endemik olarak instabil bölgelerde hayvan hareketlerinin kontrol edilmesi, hastalıklara dirençli sığır ırklarının geliştirilmesi, vektör kenelerle mücadele ve aşılama ile sağlanabileceği bildirilmiştir (Brown 1990).

1.9.1. Vektör Kenelerle Mücadele

Sığır theileriosisinin kontrolünde en öncelikli amaçlardan biri duyarlı hayvanların vektör kenelerle karşılaşmasını engellemektir. Bu amaçla kenelerle yapılan mücadele zamanının seçimi, vektörün gelişme safhalarının sığır üzerinde bulunma zamanı ve süresinin belirlenmesi önem taşımaktadır (Pipano 1989a). *Hyalomma* soyuna bağlı türler aktif olarak konaklarını arayan ve/veya hayvan barınaklarında da yaşayan keneler oldukları için kene kontrolü, sığırların ve barınakların akarasidlerle ilaçlanmasıyla yapılır (Brown 1990). Ancak enfekte *Hyalomma* türlerinin *T. annulata* sporozoitlerini 48 saat gibi kısa bir süre içinde nakletmesi nedeniyle, akarasid uygulamasının hayvanlar ve çevreye zarar verebilecek sıklıkta tekrarlanmasını gerektirmektedir (Anon 1984, Pipano 1989a). Diğer taraftan yoğun akarasid kullanımı, kenelerde direnç şekillenmesine, endemik olarak stabil bölgelerde kene popülasyonunu azaltarak bölgenin instabil hale gelmesine sebep olmaktadır. Bundan dolayı, kene mücadelesinin sadece theileriosis yönünden instabil olduğu bilinen bölgelerde yapılması önerilmektedir (Norval ve ark 1992).

1.9.2. Dirençli Irkların Kullanılması

Kenelerle bulaşan hastalıkların kontrolünde geçerli olan metotlardan bir diğeri ise dirençli ırkların geliştirilmesidir. Hem theileriosis hem de vektör kene enfestasyonuna dirençli ırkların kullanılması hastalığın kontrolünde önemli rol almaktadır (Brown 1990). Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, Avrupa ülkelerinden ithal edilen sığır ırklarının yerli ırklara oranla tropikal theileriosis'e karşı daha duyarlı oldukları görülmüştür (Hashemi-Fesharki 1988, Darghouth ve ark 1999). Hindistan'da ithal hayvanların sayısı azaltarak tropikal theileriosis' in prevalansı düşürülmüştür (Glass ve ark 2005). *Bos taurus* ve *Bos indicus* / *Bos taurus* melezi (Sawihal) sığırlarda *T. annulata* sporozoitlerinin farklı dozları kullanılarak deneysel enfeksiyonlar oluşturulmuş, gelişen klinik belirtilerin *Bos taurus* ırkı buzağılara nazaran melez ırkta doza bağlı olduğu ve bununda Sawihal melezlerindeki ırk direncine bağlı olabileceği düşünülmüştür (Preston ve ark 1992). Sudan'da yapılan bir diğere deneysel çalışmada, *T. annulata*'nın letal dozları ile enfekte edilen yerli Kenana ırkı ve Friesian ırkı sığırlardan, Friesian ırkı sığırlarda %100 mortalite görülürken, Kenana ırkı sığırlarda bu oran %22 olarak saptanmıştır. Bunun da, Friesian ırkı sığırlara oranla Kenana ırkı sığırlarda enfeksiyon esnasında piroplasm parazitemisinin, %70 daha düşük şizont parazitozunun olması ve azalmış lökopeni ile ilişkili olarak meydana gelen düşük lenfoid doku hasarıyla ilgili olduğu söylenmiştir (Bakheit ve Latif 2002). Dirençli ırkların yetiştirilmesinde karşılaşılan en önemli problem hem dirençli hem de yüksek verime sahip olan hayvanların seleksiyonu ve yetiştirilmesinin zorluğudur. Bu bakımdan dirence sebep olan genler belirlenebilir ve bu gen bölgeleri yüksek verimli ırklara aktarılabilirse (Spooner ve Brown, 1991) hastalığa bağlı gelişen ekonomik problemlerin azaltılması sağlanabilecektir (Glass ve ark 2012).

Theileriosis'in mücadelesinde bir diğere önemli nokta ise hastalığın naklinde rol oynayan vektör kenelerdir. Kene enfestasyonlarına karşı yetiştiricilikte daha dirençli ırkların kullanılması hastalığın kontrolünde dolaylı yoldan önem taşımaktadır. Yapılan bir çalışmada *Bos indicus* melezi sığırların *Bos taurus* ırkı sığırlara nazaran %10 ila %40 oranında daha az kene taşıdıkları belirtilmiştir (Campbell, 1978). Başka bir çalışmada ise Burundi'de yüksek verimli kültür ırkı sığırlar ile yerli Ankole sığır ırkı arasında çaprazlama yapılarak melez bir ırk elde edilmiş ve kene (özellikle *Rhipicephalus appendiculatus* kenesi) enfestasyonlarına karşı Ankole/Sahiwal melezlerinin kayda değer oranda dirençli oldukları gösterilmiştir (Moran ve ark 1996).

1.9.3. Aşılama

Günümüzde, canlı atenüe *T. annulata* aşısı theileriosisin yaygın olduğu İsrail, İran, Irak, Çin, Hindistan, Rusya, İspanya, Türkiye ve Fas'ta ithal hayvan ve melezlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Brown 1990). Aşısı *T. annulata* şizontları ile enfekte sığırların lenfositlerinin uzun süre hücre kültüründe pasajlanarak patojenitelerinin ve merozoit oluşturma kabiliyetlerinin zayıflatılması esasına dayanmaktadır (Onar 1989, Pipano 1989a, 1989b, Brown 1990). Atenüasyon oranı yapılan pasaj sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Parazitin attenüasyonu için gerekli olan sürenin belirlenmesini sağlayan herhangi bir belirteç bulunmamaktadır. Bununla beraber farklı izolatlar arasında tam bir attenüasyon için gerekli olan zaman değişiklik göstermektedir (Hooshmand-Rad 1973, Pipano 1997). Türkiye'de uygulanmakta olan aşısı *T. annulata*'nın Ankara suşundan hazırlanmakta ve her hayvana 10^7 enfekte hücre dozunda verilmektedir (Özkoç ve Pipano 1981, Onar 1989). Atenüe *T. annulata* aşısı ile saha şartlarında oluşturulan bağışıklığın kesin süresi bilinmese de, reenfeksiyonun olmadığı durumlarda, bu sürenin 1 ile 3.5 yıl arasında değiştiği bildirilmektedir (Pipano 1989b, Zablotsky 1990). Buna rağmen bazı hayvanlarda aşılama sonrasındaki dönemlerde klinik theileriosis görülebilmekte (Pipano ve Shkap 2006) ve yine kullanılan doza bağlı olarak kimi aşılama sonrası yedi ay gibi bir dönem sonunda koruma olmamaktadır (Ouhelli ve ark 1994).

Atenüe *T. annulata* şizont aşısı ile aşılama sonrası hayvanlarda piroplazmik formların şekillenmediği; ancak bu hayvanların enfekte kenelere maruz kalmaları durumunda hayvanlar hastalanmasa da piroplazmik formların oluşabileceği ve bu nedenle enzootik bölgelerde uygulanan aşılamanın theileriosisin eradike edilmesi için yetersiz kalacağı bildirilmektedir (Pipano 1989a, Pipano ve ark 1991). Düşük pasajlı şizont aşısının hafif klinik reaksiyonlara ve merozoit oluşumuna neden olmasına rağmen, yüksek pasajlı aşılardan daha uzun süreli bir koruyucu bağışıklık sağladıkları bildirilmiştir (Ouhelli ve ark 1989, İlhan 1995).

Türkiye'de kullanılan attenüye *T. annulata* şizont aşısının sahadaki etkinliğinin araştırılmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Karatepe (2000) aşılama sonrası seropozitifliğin 6 aydan itibaren azalarak 12 ay devam ettiğini bildirmiş, başka bir çalışma (Yaman 1998) ise seropozitifliğin ortalama 3 ay sürdüğü, 4'üncü aydan itibaren azaldığı ortaya koymuştur. Yine aşılama sonrası antikor seviyesinin 2'inci aydan itibaren azaldığı ve bir yılın sonunda %20,6'ya düştüğü bildirilmiştir (Açııcı 2002). Nalbantoğlu (1996) ise

aşılama sonrası seropozitifliğin 1-2 yaş grubunda 12 ay devam ettiğini, 2 yaş üstü hayvanlarda ise 3'üncü aydan itibaren azalmaya başladığını ve 7'inci ayda sıfırlandığını belirlemiştir. 2008 yılında Aysul ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise aşılama sonrasında en fazla Nisan ayında %94,67 oranında seropozitiflik gözlenirken bu oranın azalarak Aralık ayında %15,52 seviyesine düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada aşı 10 hayvanda tropikal theileriosis belirlenmiş, bu hayvanlardan bir tanesi tedaviye rağmen ölmüştür. Yapılan bu çalışmalar tropikal theileriosise karşı uygulanan aşının %100 koruma sağlamadığını göstermektedir.

1.10. Tropikal Theileriosis'de İlaç Direnci

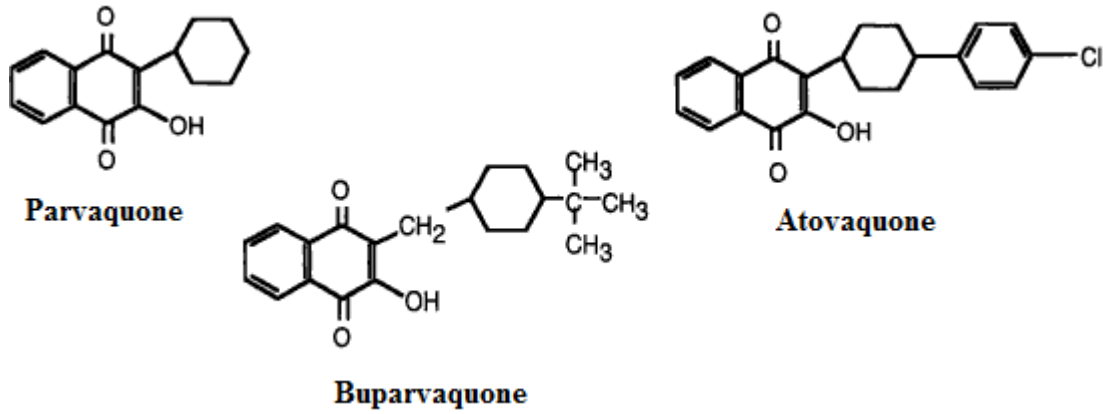
1.10.1. Genel Bilgi

Tüm dünyada, özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak paraziter enfeksiyon ve enfestasyonlar görülmektedir. İnsan ve hayvanlarda önemli sağlık sorunları oluşturan parazitlere karşı çeşitli koruma yöntemleri ve ilaçlar kullanılmaktadır. Koruma yöntemlerinin esasını aşılama oluşturmaktadır. Birçok bakteri ve virüse karşı başarılı aşı uygulamaları olmasına rağmen parazitlere karşı etkin aşılarda bulunmaması anti-paraziter ilaçların önemini artırmaktadır. Kullanılan ilacın etkili olabilmesi için konak hücre içerisinde yer alan parazite, oradan da parazit yapısındaki etki bölgesine ulaşması gerekmektedir. Bu şekilde ilaçlarla karşı karşıya gelen parazitlerde savunma mümkün olmazken zamanla ilaca maruz kalan parazitlerde direnç şekillenebilmekte ve tedavide önemli zorluklara neden olmaktadır.

Paraziter direnç; önerilen dozlarda uygulandığında konaktaki parazit popülasyonunun büyük bir kısmını elimine eden bir anti-paraziter ilaca karşı zamanla o parazit popülasyonunda duyarsızlığın şekillenmesi ve bunun kalıtsal olması hali olarak tanımlanmaktadır (Burgu ve Karaer 2005). Bir parazit doğal olarak ilaca karşı dirençli olabildiği gibi, sonradan ilaçlarla karşılaşarak kendine değişik metabolik yollar bulup, ilaç etkisinden kurtulabilmektedir (Burgu ve Karaer 2005).

Tropikal theileriosis tedavisinde hidrokinaftokinon grubu parvaquone ve buparvaquone 1980' li yıllardan itibaren yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Coombs ve ark 1997, Ünsüren ve ark 1988). Bu ilaçlar etkilerini lenfoid hücrelerdeki şizontlar veya eritrosit içindeki piroplasm formları üzerine göstermektedir. Bu ilaçların tam olarak etki mekanizması anlaşılamamış olsa da; yapısal benzerlikleri nedeniyle, etkisini Malarya ve

Toxoplasma gondii tedavisinde kullanılan atovaquone'a benzer şekilde gösterdiği düşünülmektedir (Mehlhom 2008) (Şekil 1.5.). Atovaquone'un etki mekanizması da tam olarak kesinlik kazanmamış olmakla birlikte parazitin mitokondriyal iç zar üzerinde yer alan sitokrom b üzerine etkiyerek, mitokondriyal elektron transportunu inhibe ettiği ve mitokondriyal membranın kollabe olmasına neden olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Sherman 1998, Gebru ve ark 2006).



Şekil 1.5. Antiprotozoer etkili hidroksinaftokinonlar (Mehlhom 2008).

Buparvaquone, *T. annulata*'ya karşı etkili ve güvenilir olması nedeniyle hastalığın tedavisinde Türkiye de dâhil theileriosisin endemik olduğu ülkelerde yaygın kullanım alanı bulmuştur (Coombs ve ark 1997). Fakat son yıllarda özellikle hastalığın endemik olarak görüldüğü bazı ülkelere *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı direnç kazanmış olabileceği ile ilgili çalışmalar bildirilmeye başlanmıştır. Bu çalışmalar 2010 ve 2012 yılında sırasıyla Tunus (Mhadhbi ve ark 2010) ve İran (Sharifiyazdi ve ark 2012)'da yapılmıştır. Her iki çalışma da sahada tropikal theileriosisli bazı hayvanların rutin buparvaquone tedavisine (2,5 ve 5 mg/kg) yanıtızsız kaldığını bildirmiştir. Tunus'ta yürütülen çalışmada tedavinin başarısız olduğu bir hayvandan parazit izolatu elde edilerek deneysel enfeksiyon oluşturmak için kullanılmış ve enfekte edilen hayvanlarda buparvaquone tedavisinin yetersiz kaldığı ve bir hayvanın aralıklarla üç buparvaquone enjeksiyonu sonrasında öldüğü bildirilmiştir (Mhadhbi ve ark 2010). İran'da Sharifiyazdi ve ark (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise tekrarlayan buparvaquone tedavilerine rağmen ölen hayvanlardan parazite ait DNA örnekleri elde edilerek, parazitte ilacın muhtemel bağlanma bölgelerini kodlayan mitokondriyal sitokrom b geni mutasyonlar yönünden incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda klinik olarak dirençli olduğu düşünülen parazit popülasyonlarında sitokrom b geni üzerinde iki farklı

mutasyon saptanmış ve buparvaquone direnci ile ilgili olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmalara ek olarak son yıllarda Aydın ve çevresinde çalışan veteriner hekimler tarafından, sahada buparvaquone'un tropikal theileriosis'e karşı tedavide yetersiz kaldığı ve tekrarlayan buparvaquone enjeksiyonlarına ihtiyaç duyulduğu şeklinde bildirimler gelmektedir (Tülin KARAGENÇ, kişisel bilgi). Yapılan bu çalışmalar ve veteriner hekimlerden gelen bildirimler *T. annulata*'da buparvaquone'a karşı bir direnç gelişmiş olabileceği görüşünü destekler niteliktedir.

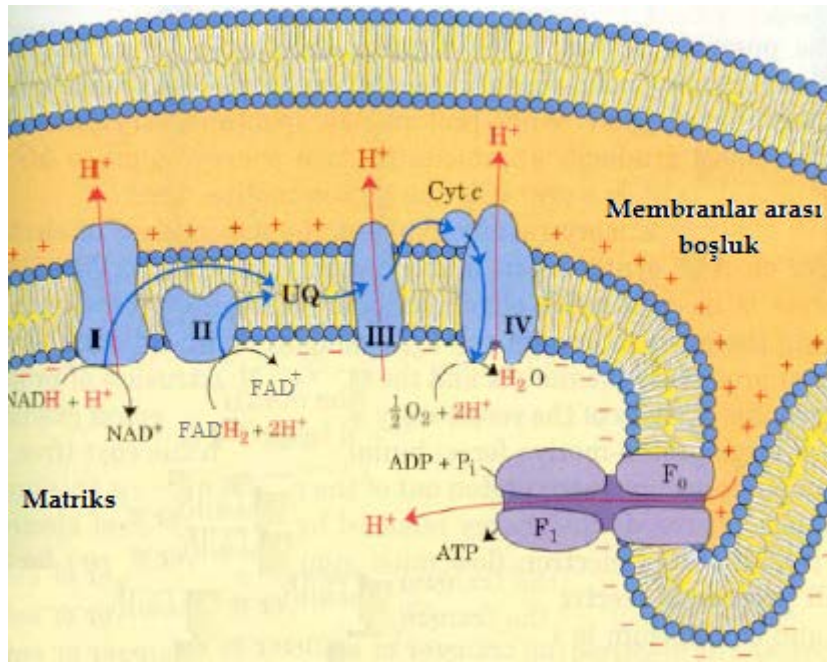
1.10.2. Buparvaquone'un Etki Mekanizması

Hidroksinaftokinon grubu içerisinde yer alan buparvaquone'un tropikal theileriosis tedavisinde parvaquone'a göre daha etkili olduğunun saptanmasıyla dünyada antitheilerial olarak kullanılan en yaygın ilaç haline gelmiştir (McHardy ve ark 1985). Buparvaquone etkisini, lenfoid hücrelerdeki şizontlar veya eritrosit içindeki piroplasm formları üzerine göstererek, şizont ile enfekte lenfositleri parçalayıp parazitin konak savunma sisteminden yararlanmasını engellemektedir. Ancak ilacın etki mekanizması tam olarak kesinlik kazanmış değildir. Bununla beraber buparvaquone'un aynı ilaç grubu içerisinde yer alan ve yaygın olarak malaria ve toxoplasmosis tedavisinde kullanılan atovaquone ile benzer etki mekanizmasına sahip olduğu düşünülmektedir. Aynı ilaç grubu içerisinde bulunmaları ve biyokimyasal olarak yapılarının benzer olması bu fikri desteklemektedir (Mehlhom 2008).

Hidroksinaftokinon grubu içerisinde yer alan bu ilaçlar 1940'lı yıllardan itibaren araştırılmaya başlanmış ve mitokondriyal solunumu inhibe ettiği öngörülmüştür. İlerleyen yıllarda yapılan biyokimyasal çalışmalar için mitokondrinin başarıyla izole edilmesi, ilaçların etkisinin inceleme fırsatı bulunmuş ve mitokondriyal elektron transport sisteminde yer alan bc₁ kompleksini seçici olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Sherman 1998).

Mitokondri, tüm çekirdekli memeli hücrelerinde bulunan maternal kalıtmı, çift zarlı kendine ait DNA'sı olan bir hücre içi organelidir. Hücre içi haberleşmede, planlanmış hücre ölümünde, Krebs ve trikarboksilik asit döngüsünde ve lipid, amino asit, kolesterol, steroid ve nükleotid metabolizmalarında rol alır. Mitokondri, ayrıca hücrenin enerji metabolizmasında da temel işlevi görür (Chinnery ve ark 2006). Enerji, mitokondride cereyan eden sitrik asit siklusu ve elektron transfer zinciri sonucunda üretilmektedir (Sağlam ve ark 2001). Sitrik asit döngüsünde ortaya çıkan yüksek enerjili moleküller (Nikotinamid adenin dinükleotid; NADH ve Flavin adenin dinükleotid; FADH₂) aynı zamanda hücre sitoplazmasında glikolizis yoluyla

da elde edilirler ve mitokondri matriksine elektron transport zincirine (Electron Transport System; ETS) katılmak üzere nakledilirler. ETS, NADH ve FADH₂ gibi elektron taşıyıcılarının verdikleri elektronları mitokondri iç membranında gömülü olarak bulunan ve ETS'de görev alan dört protein kompleksi (NADH dehidrogenaz kompleksi-kompleks I, Süksinat dehidrogenaz kompleksi-Kompleks II, Ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz-Sitokrom bc₁ kompleksi- kompleks III, Sitokrom c oksidaz- kompleks IV) tarafından redoks tepkimelerine sokularak ATP üretiminin sağlandığı sistemin adıdır. Aktarılan bu elektronlar, son elektron alıcısı oksijene varana kadar ETS elemanları boyunca taşınırlar ve enerji kaybederler. Elektronların verdiği enerji ETS elemanları tarafından protonların aktif taşınmasında kullanılır ve ETS elemanlarının üzerinde bulunduğu çift katlı fosfolipid zarının iki tarafında potansiyel bir fark oluşturulur. Bu potansiyel fark daha sonra ATP sentezi için kullanılır ki bu olay oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır (Güler 2006) (Şekil 1.6.).



Şekil 1.6. Mitokondriyal iç membranda yer alan ETZ protein kompleksleri (Kompleks I, II, III ve IV) ve ATP sentetaz (www.mustafaaltinisik.org.uk'den modifiye edilmiştir).

Yapılan çalışmalarda atovaquone'un mitokondri iç membranında bulunan elektron transfer proteinlerinden sitokrom bc₁ kompleks (Kompleks III)'ünün yapısına katılan sitokrom b üzerine etki ettiği gösterilmiştir. Sitokrom bc₁ kompleksi, ubikoinol'den kompleks III ve IV arasında hareketli çözünebilir bir protein olan sitokrom c'ye elektron transfer etmekte ve böylece mitokondri matriks ve membranlar arası boşluk arasında elektrokimyasal bir

potansiyel fark oluşmaktadır. Komplekslerin her birinden matrikse doğru elektron akışı sağlanırken mitokondri matriksinden membranlar arası boşluğa proton akışı gerçekleşerek ATP sentezinde önemli potansiyel fark oluşumu (proton gradiyenti, membran potansiyeli) sağlanır. Mitokondri bu etkileşimi ATP sentezi ve enerji gerektiren metabolik olaylarda kullanmaktadır (Trumpower 2004).

Apikompleksa köküne ait protozoonlarda memeli mitokondrilerinde bulunan, elektron transfer zincirinde görev alan NADH dehidrogenazın bulunmaması bu parazitlerde sitrik asit döngüsünün de bulunmadığını göstermiştir. Bu parazitlerde NADH dehidrogenaz görevini üstlenen 3 farklı dehidrogenaz bulunmaktadır (dihidroorotat dehidrogenaz, süksinat dehidrogenaz ve gliserol 3-fosfat dehidrogenaz). Elektron transferi için gerekli olan elektronlar bu dehidrogenazlardan sağlanmaktadır (Zimmer 2000). *P. falciparum*'un eritrositik formlarının gelişmesi esnasında primidin sentezi hayati öneme sahiptir. Parazit dışarıda sentezlenen hazır primidinleri kullanamamaktadır ve yaşamları için gerekli olan primidinleri kendisi bikarbonat ve glutaminden sentezlemek zorundadır. Parazit için gerekli olan primidinlerin sentezinde mitokondrial dehidrogenazlardan dihidroorotat dehidrogenaz rol oynamaktadır. Bu enzim ETS'de görev almakta ve elektron taşınmasında ubikuinol (UQ)'ün elektron alarak indirgenmesi gerekmektedir. (Painter 2007). Atovaquonun ubikuinol ile benzer bir yapıda olması, ilacın bağlanma yerinin sitokrom bc1 kompleksi üzerinde yer alan UQ'ün oksitlenme (yükseltgenme) yerinde (Qo bölgesi) olduğunu düşündürmüştür (Gebru ve ark 2006). *Saccharomyces cerevisiae*, bir çalışmada model olarak kullanılmış, Qo bölgesi inhibitörü olan stigmatellin ile atovaquone'un bölgeye bağlanmak için yarışma içerisine girmesi ilacın Qo bölgesine bağlandığı fikrini desteklemiştir (Kessl 2003). Bu durum, parazitin yaşamı için kritik olan mitokondrial elektron transport zincirinin inhibe edilmesi ve mitokondrial membranın kollabe olmasına neden olmaktadır (Sherman 1998, Gebru ve ark 2006). Ayrıca, memeli mitokondrisinde yer alan sitokrom b yapısı ile *Plasmodium* türlerinin kompleks III yapısında bulunan Qo bölgesinin farklı yapıda olması ilacın etkisini parazite spesifik kılmaktadır (Vaidya ve ark 2005).

1.10.3. Mitokondriyal DNA (mDNA)'nın Atovaquone ve Buparvaquone Direncindeki Önemi

Mitokondri nükleus dışında DNA'ya sahip tek organel olup, ilk kez 1963'de Nass ve arkadaşları, mitokondri içerisinde DNA karakteristiğinde fiberlerin varlığını göstermiş, 1981'de de Anderson ve arkadaşları tarafından genom dizisi tam olarak tanımlanmıştır. Hayvansal mitokondriyal DNA (mDNA), küçük, halkasal, çift sarmal yapıda çıplak bir DNA molekülüdür. Uzunluğu memelilerde yaklaşık olarak 16.6 kb çifti kadardır ve aerobik solunumla ilgili genleri taşımaktadır (Chinnery ve ark 2006). Omurgalılarda 22 tane tRNA, 2 tane rRNA, oksidatif fosforilasyon ve elektron taşıma sisteminde görev alan proteinleri kodlayan 13 tane mRNA olmak üzere toplam 37 tane gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlardan 13'ü solunum zincirindeki yapısal proteinleri (NAD dehidrogenaz, sitokrom c oksidoredüktaz, sitokrom c oksidaz, ATP sentetaz) kodlarken, ikisi RNA ve 22'si ise tRNA genlerini kodlamaktadır (Ruokonen ve ark 2001).

Memelilerde bulunan mDNA her biri kendi başına replike olabilen hafif (L) ve ağır (H) zincirden oluşmaktadır. Sadece bir tane 1.1 kilo baz çifti büyüklüğünde kodlama yapmayan, mDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun başlaması ve düzenlenmesinde görev alan D – loop adı verilen kontrol bölgesini taşımaktadır (Ruokonen ve ark 2001). Bu bölge ağır zincirin replikasyonunu kontrol eder ve iki zincir için de promotor bölge rolünü oynar. mDNA'nın çekirdek DNA'sından bağımsız replikasyon ve transkripsiyon sistemi olmasına rağmen mDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonu için gerekli enzimler, çekirdek DNA'sı tarafından sentezlendiğinden, mDNA tam bir otonomiye sahip değildir (Taanman 1999).

Apikompleksa köküne ait protozoonların sahip olduğu mDNA bugüne dek rapor edilmiş en küçük mitokondriyal genomdur (Weiss 2007). Bu parazitlerin içerdiği mDNA genelde insanlardaki gibi sirküler veya lineer yapıdadır. mDNA'nın gen içeriği, organeldeki kopyalarının sayısı ve organizasyonu organizmaya göre farklılık göstermektedir (Lau 2008). Bu parazitlerde organelin sahip olduğu genom yaklaşık olarak 6 kb kadardır ve elektron transfer zincirine ait sadece 3 proteini kodlamaktadır (Weiss 2007). Bu proteinler sitokrom c oksidaz'ın I ve III nolu alt birimi ile sitokrom bc1 kompleksinin sitokrom b alt birimidir (Krungrai 2004, Weiss 2007). Buna ek olarak mDNA'nın ribozomal RNA'yı kodladığı da saptanmıştır. *Plasmodium* ve *Theileria* türlerinde tRNA geni bulunmamaktadır. Bunlara

bakılarak mitokondrinin ihtiyacı olan proteinlerin sitoplazmada sentezlenip organelere gönderildiği düşüncesi şekillenmiştir (Zimmer 2000). *P. falciparum*, *P. vivax*, ve *Babesia bovis*'de 6 kb *T. parva* 7,1 ve *T. annulata* 6,3 kb lineer tip mDNA saptanmıştır. *Toxoplasma gondii* 6 kb (Feagin, 2000), *B. bigemina* 6.2 kb, *B. equi* 9 kb sirküler tip mDNA' ya sahiptir (Lau 2008).

Apikompleksa köküne ait protozoonlarda mitokondrinin yapısı, parazitte bulunan miktarı ve fonksiyonel özellikleri parazitin bulunduğu ortama yani bulunduğu konağa göre modifiye olmuştur. Bu protozoonlarda mitokondriler genellikle basit yapılı, çift membranlı ve tubuler yapıda kristaya sahip organellerdir (Weiss 2007).

Plasmodium falciparum'un aseksüel trofozoit (eritrosit dışı form) ve seksüel formundan (eritrosit içi form) elde edilen elektron mikrograf görüntüleri incelenmiş ve iki formda farklılıklar saptanmıştır. Aseksüel trofozoit formunda bir adet çift membranlı ve sadece bir veya iki kristaya sahip mitokondri saptanırken, seksüel formda tek bir parazit içerisinde birçok krista yapısı bulunduran çok sayıda (4-8 adet) mitokondri saptanmıştır (Learngaramkul ve ark 1999, Krungkrai 2004). Bu farklılıklara bakılarak parazitin sivrisinekteki yaşama adapte olmasında daha fazla enerjiye gereksinim duyduğu ve bu nedenle seksüel formda daha fazla mitokondri bulunuyor olabileceği düşünülmektedir (Krungkrai 2004).

Plasmodium falciparum'un aseksüel ve seksüel formlarında mitokondrinin aktivasyonu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada elektron transfer zincir kompleks proteinlerinin ölçümleri her iki parazit formu için de yapılmış ve aseksüel formda yaklaşık 8-10 kat daha az olduğu saptanmıştır. Çalışmanın devamı olarak sitokrom b geni aynı parazit formlarından amplifiye edilmiş ve yine aseksüel formda üç kat daha az olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar seksüel parazit formunun mitokondriyal aktivitesinin daha fazla olduğu görüşünü desteklemiştir (Learngaramkul ve ark 1999, Krungkrai 2004).

Theileria annulata mitokondriyal DNA'sında bulunan sitokrom b geni linear, 6.5 kb büyüklüğünde, kompleks III yapısında bulunan sitokrom b proteinini kodlayan, tek kopyalı bir gendir (Hall ve ark 1990, Megson ve ark 1991). Buna karşın her mitokondride 2–10 mitokondriyal DNA bulunabileceği bildirilmiştir (Wiesner 1992). *Theileria* türlerinin sporozoitlerinde bir tane ve krista içermeyen tipte mitokondri bulunduğu saptanmış (Jura ve ark 1983, Lau 2008), fakat bunun dışındaki şizont ve piroplasm dönemlerinde bulunan

mitokondri sayısı ya da her mitokondride bulunan mitokondriyal DNA sayısı belirlenmemiştir. Yapılan çalışmalar *T. parva*'nın eritrosit içi formunda iki adet, kristaya sahip olmayan mitokondri (Conrad 1986) ve *T. sergenti* piroplasmlarının çok sayıda mitokondri ihtiva ettiğini göstermiştir (Uchida ve ark 1985).

mDNA molekülünün evrim hızı nükleer DNA molekülüne göre 10-20 kat daha fazladır. Bunun sebebi mDNA molekülünün oksijen radikallerine daha fazla maruz kalması, nükleer DNA molekülünü koruyucu histon kılıfın ve tamir sistemlerinin yokluğudur. Bu yüzden mDNA mutasyonlara nükleer DNA'ya kıyasla daha açıktır (Alberts ve ark 1989).

Atovaquone'un sitokrom bc1 kompleksinde yer alan sitokrom b'yi etkilemesi ve mDNA'nın mutasyonlara açık olması ilaca karşı oluşan direnç ile ilgili yapılan çalışmalarda sitokrom b genine mercek tutulmasını sağlamıştır. Bu alanda yapılan birçok çalışmada sitokrom b geni üzerinde tekli veya çoklu nokta mutasyonları tespit edilmiş ve bazıları atovaquone direnciyle ilişkili bulunmuştur (Kessl ve ark 2006, Gebru ve ark 2006, Fisher ve ark 2012).

1.10.4. Atovaquone ve Buparvaquone Direnci

Apikompleksa köküne ait protozoonlara karşı tedavide kullanılan ilaç çeşidinin sınırlı olması, bu paraziter hastalıklarla sık karşılaşılması ve ilaçların dünya genelinde yaygın olarak kullanılması sonucunda direnç gelişimi kaçınılmaz olmuştur (Coombs ve ark 1997).

Atovaquone dünyanın en öldürücü hastalıkları arasında yer alan, yılda yaklaşık 1-3 milyonu ölümlerle sonuçlanan ve dünya genelinde 500 milyon klinik vakanın yaşandığı malarya etkenlerine karşı yoğun olarak kullanılmasının yanında (Krungkrai, 2004) apikompleksa köküne ait birçok protozoonun (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Babesia*) tedavisinde de kullanılmaktadır (McFadden ve ark 2000). Malarya tedavisinde özellikle tek başına kullanılmaya başlanmasıyla ilaca karşı parazitlerde hızla direnç gelişmiş ve tedavide başarısızlıklara neden olmuştur. Yapılan bir çalışmada tedavi edilen hastaların %30'unda hastalıkta nüksler yaşanmıştır (Coombs ve ark 1997).

Atovaquone'a karşı parazitlerde direnç oluşumunda ilacın yaygın kullanımının yanı sıra yavaş bağlanma kapasitesi ve yüksek lipofilik etkisi nedeniyle parazitin daha uzun süre ilaca maruz kalmasının etkili olabileceği düşünülmektedir (Gebru ve ark 2006). Ayrıca ilacın

sitokrom bc1 kompleksini inhibe etmesiyle reaktif bir oksijen olan semikuinon üretimi artmakta ve parazit mDNA'sında mutasyonlara neden olmaktadır. Bu olumsuz etkiyi ortadan kaldırmak için atovaquone-proguanil kombinasyonu (Malaron) kullanılmaya başlanmıştır. Proguanil ile kullanıldığında mitokondriyal membran kollapsı elektron transfer zincirinin inhibe edilmesinden daha çabuk şekillenmekte ve olası mutasyon riskini azaltacağı düşünülmektedir (Rosenthal 2001).

Plasmodium türlerinde ve *T. gondii* üzerinde yapılan çalışmalarda atovaquone'un bağlanma bölgesini kodlayan sitokrom b geni üzerine yoğunlaşmış ve hastalığın nüks ettiği hastalardan toplanılan örneklerde bu genin ilacın bağlanma bölgesini kodlayan kısmında çeşitli mutasyonlara rastlanmıştır (Kessl ve ark 2006, Gebru ve ark 2006, Fisher ve ark 2012). *Plasmodium falciparum* ve *T. gondii*'nin sitokrom b geni sekans analizleri yapılmış ve ilacın bağlanma bölgesi olan Q_O bölgesinin genetik açıdan *S. cerevisiae* ile benzerlikleri kıyaslanmış ve bu oranlar: *T. gondii* %70 (Kessl ve ark 2006), *P. falciparum*'da %68 olarak hesaplanmıştır (Kessl ve ark 2005). Bu benzerliğin bulunmasıyla atovaquone direnciyle ilgili yapılan birçok çalışmada *S. cerevisiae* model olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kessl ve ark 2006). Bir tür maya olan *S. cerevisiae*'nin basit yapılı bir ökaryot olması, hızlı üremesi, üretiminin ucuz olması ve genomunun çok iyi biliniyor olması modelleme çalışmalarında kolaylık sağlamıştır (Sherman 1998).

Farklı çalışmalarda mayalar model alınarak, çeşitli bilgisayar programları kullanılmış, üç boyutlu modelleme çalışmaları yapılmıştır ve atovaquone'un sitokrom b ile nasıl bağlandığı anlaşılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda ilacın sitokrom b geni üzerinde iki farklı bölgede bağlanma gösterdiği saptanmıştır (Kessl 2007). Bu bulgular doğrultusunda mutasyonların direnç ile olan ilişkisi bu bölgeler içinde yer alıp almamasına göre değerlendirilerek direnç ile ilgili incelenecek sitokrom b bölgesi daraltılmıştır.

Plasmodium falciparum çalışmalarına benzer şekilde yapılan çalışmalarda, *T. gondii*'nin sitokrom b geninde 129. ve 254. kodonlarda iki farklı mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonları ilaç ile olan ilgisini anlamak adına gen *S. cerevisiae*'ye nakledilmiş, laboratuvar şartlarında bu parazit suşlarının ilaç toleransının büyük oranlarda arttığı saptanarak, bu mutasyonlar dirençle ilişkili bulunmuştur (Kessl 2006).

Plasmodium falciparum ile enfekte hastalardan, atovaquone-proguanil kombinasyonunun kullanıldığı ve tedavide başarısızlıkla sonuçlanan olgulardan toplanılan

izolatlar farklı iki çalışmada alınarak, total DNA ve mDNA'nın sitokrom b geninin sekans analizleri yapılmıştır. İki çalışmada da 268. (Y268S, Y268N) kodon üzerinde iki farklı nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar dirençle bağlantılı bulunmuş ve marker olarak kullanılabilceği düşünülmüştür (Schwöbel 2003, Gebru 2006, Fisher ve ark 2012).

Konakta bulunan mevcut parazit populasyonlarının ilaç tedavisinden sonra doğal seleksiyona uğrayarak sayısında azalma olacağı ve muhtemel dirençli populasyonların geride kalacağı görüşünden yola çıkılarak yapılan bir çalışmada fareler *P. yoelii* ile enfekte edilmiş ve hastalık tablosunun şekillenmesiyle atovaquone tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrasında elde edilen sonuçlar hipotezi doğrulamış ve dirençli parazitler elde edilmiştir (Rosenthal 2001). *In vitro* olarak yapılan farklı araştırmalarda ise *P. falciparum* hücre kültürleri kullanılarak, değişik ilaç dilüsyonlarına tabi tutulduktan sonra atovaquone etkisinden kurtulan parazitlerin sitokrom b geninin sekans analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak farklı mutasyonlar belirlenmiştir (133, 272, 275 ve 280. kodonlarda). M133I ilaç etkisinden kurtulan tüm parazitlerde rastlanırken, diğer mutasyonların içerisinde birinin bu mutasyona eşlik ettiği gözlemlenmiştir. Çeşitli bilgisayar programları kullanılarak sitokrom bc₁ kompleks modeli oluşturulmuş ve bu mutasyonların ilaç bağlanma bölgesinde yarattıkları değişim saptanmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak 133. pozisyonda saptanan mutasyon direnç oluşumu ile ilişkili bulunmuştur. (Schwöbell 2003, Gebru 2006).

In vivo olarak direnç gösteren başka bir *P. falciparum* izolatında ise 268. kodonda hiçbir mutasyon görülmezken, başka mutasyonlar da saptanamamıştır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* araştırmalarda ilacın bağlanma bölgesi olduğu düşünülen bölgeyi kodlayan sitokrom b geninde farklı birçok mutasyonun bulunması ilacın bu bölgeyi etkilediğini desteklerken, marker olarak kullanılacak ortak bir mutasyonun bulunamaması ve verilerin çeşitlilik arz etmesi belki de ilacın etki mekanizmasında farklı yollar da kullanıyor olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Wichmann ve ark 2004). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda yeniden Malarone preparatına karşı direnç şekillendiği ve atovaquone direnciyle alakalı olarak T268S kodondaki aynı mutasyondan söz edilmiştir (Kuhn 2005, Fisher ve ark 2012). Aynı şekilde, *T. gondii*, *Pneumocystis jirovecii* (=carinii), *Babesia microti*, *B. gibsoni*'nin neden olduğu enfeksiyonların atovaquone ile tedavisinde başarısızlıklarla karşılaşılmış ve sitokrom b geni üzerinde yapılan analizler ile ilacın bağlanma bölgesinde dirençle ilgili olabilecek tek-nükleotid polimorfizimlerinin var olduğu görülmüştür (Korsinczky ve ark 2000, Kaneshiro 2002, Schwöbel ve ark 2003, Kessl ve ark 2006, Gebru ve ark 2006, Iguchi ve ark 2012).

Buparvaquone *T. annulata*'ya karşı etkili ve güvenilir olması nedeniyle hastalığın tedavisinde dünyada yaygın kullanım alanı bulmuştur (Coombs ve ark 1997). Ancak, 1980'lerden bu yana yaygın olarak kullanılan buparvaquone ile ilgili, özellikle hastalığın endemik olarak görüldüğü ülkelerde yapılan tedavilere tam bir yanıt alınmadığı yönündeki geri bildirimlerin olduğu görülmektedir (Mhadhbi ve ark 2010, Sharifiyazdi ve ark 2012). Tunus'ta küçük bir süt sığırcılığı işletmesinde yapılan bir çalışmada buparvaquone ile tedavi edilen (2,5 ve 5 mg/kg) yedi sığırdan dördünün öldüğü bildirilmiştir (Mhadhbi ve ark 2010). Tedaviye cevap vermeyen bir sığırdan enfeksiyon sırasında *T. annulata* makroşizont hücre kültürü elde edilmiş ve bu izolat kullanılarak deneysel enfeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Parazitin kenelere aktarılmasından sonra sporozoit stabilatı hazırlanmış ve yeniden deneysel enfeksiyon oluşturmak için kullanılmıştır. Enfeksiyon sonrasında kontrol grubundaki hayvanlarda kısa sürede iyileşme görülürken, dirençli olduğu düşünülen izolat ile enfekte edilen hayvanlarda buparvaquone ile tedavi sonrasında klinik ve parazitolojik olarak önemli bir iyileşme gözlenmemiştir. Ayrıca üç hayvandan biri, üç kez uygulanan buparvaquone tedavisine rağmen ölmüştür (Mhadhbi ve ark 2010).

Buparvaquone direnci ile ilgili ikinci bildiri ise İran'ın güneyinde Fars bölgesinde buparvaquone tedavisinin başarısız olduğu bir ahırda yapılan çalışmadır (Sharifiyazdi ve ark 2012). Bu çalışmada bir ahırda tropikal theileriosise karşı tedavi edilen sekiz hayvandan yedisinin öldüğünü bildirilmiştir. Bu sığırlardan elde edilen DNA örneklerinde *T. annulata*'nın sitokrom b geninin sekans analizleri yapılmış ve ölen altı hayvanda S109G mutasyonu, ölen bir hayvanda ise P233S mutasyonu olmak üzere iki nokta mutasyonu tespit edilmiştir (Sharifiyazdi ve ark 2012).

Son yıllarda *T. annulata*'ya karşı uygulanan buparvaquone tedavisindeki başarısızlıkların olduğu doğrultusundaki bildirimler ile Aydın ve çevresinde tropikal theileriosisli hayvanlara uygulanan buparvaquone tedavilerindeki başarısızlık oranlarında artış gözlenmesi, parazitin ilaca karşı muhtemel bir direnç geliştirdiğini akla getirmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda bu tezde araştırılması öngörülen hipotez: "*T. annulata*, buparvaquone'a karşı direnç geliştirmiş olabilir". Bu önermenin doğrulanabilmesi amacıyla bu tez çalışmasında, *T. annulata*'nın ilacın etki bölgesi olduğu düşünülen sitokrom b geninin mutasyonların varlığı yönünden araştırılması, eğer bir direnç oluşumu var ise etkili markerlar oluşturularak sahada direnç oluşumunun varlığının ve yaygınlığının belirlenebilmesi planlanmıştır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda:

1- Theileriosisli hastalardan tedavi öncesi ve/veya sonrası toplanan kan örneklerinden elde edilen *T. annulata* makroşizont ile enfekte hücre kültürü izolatlarının buparvaquone baskısı altında MTT testi ile fenotiplerinin belirlenmesi,

2- Fenotipik olarak dirençli olduğu saptanan *T. annulata* izolatlarında tekrarlayan buparvaquone tedavilerinden sonra mevcut parazit populasyonlarındaki değişimin saptanması,

3- Fenotipik olarak dirençli olduğu saptanan izolatların sitokrom b geninin mevcut mutasyonlar yönünden incelenmesi,

4- *Theileria annulata* izolatlarında sitokrom b geninde saptanan ve dirençle ilişkili bulunan mutasyonların allel-spesifik PCR yöntemi ile Aydın İlinde yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali

Bu çalışmada Aydın ve çevresindeki yörelerde akut theileriosisli hayvanlardan tedavi öncesi ve sonrası alınan kan örnekleri ve kan örneklerinden elde edilen *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte lenfosit hücre kültürleri kullanılmıştır. Ayrıca tropikal theileriosis hastalığı atlatmış sığırlardan (taşıyıcı) alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Kan örneklerinin toplandığı odaklar Şekil 2.1’ de ayrıca çalışmada kullanılan bütün hücre kültürü ve kan örneklerinin sayıları ve elde edildiği bölgelerin dağılımı Çizelge 2.1.’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan parazit materyalinin elde edildiği beldelerin (Söke, Germencik, Koçarlı, Incirliova, Çine, Akçaya, Köşk, Nazilli) coğrafik dağılımı.

Çizelge 2.1. Aydın ve çevresinden elde edilen *T. annulata* izolatlarının ve *T. annulata* pozitif kan örneklerinin dağılımı

Örnek alınan yerler	<i>T. annulata</i> İzolat sayısı	Kan örnek sayısı
Akçaova	102	148
Nazilli	5	9
İncirliova	2	6
Söke	2	-
Germencik	4	-
Köşk	3	-
Çine	1	-
Koçarlı	3	-
Aydın merkez	5	5
TOPLAM	127	168

2.1.1. *Theileria annulata* Makroşizontlarıyla Enfekte Lenfosit Hücre Kültürleri

Bu çalışmada toplam olarak 127 adet *T. annulata* makroşizontları ile enfekte hücre kültürü kullanılmıştır. Bu hücre kültürlerinin 102 adeti Akçaova Beldesi'nden elde edilmiş olup, 25 adedi Aydın ve çevre yörelerinden elde edilmiştir.

Bu çalışmada öncelikli olarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı tarafından akut hastalık semptomu gösteren hayvanlardan 1998-2007 yılları arasında elde edilen, 28 adedi Akçaova Beldesi'nden olmak üzere toplam 49 adet *T. annulata* makroşizontları ile enfekte lenfosit hücre kültürleri (Çizelge 2.2.) kullanılmıştır. Bu hücre kültürlerinin genotipik olarak incelenmesi ile Akçaova Beldesi'ndeki A10 kodlu hayvandan buparvaquone tedavisi öncesinde (A10/BT) ve üçüncü tedavi (A10/AT3) sonrasında elde edilen hücre kültüründe parazit in sitokrom b geni üzerinde, ilacın muhtemel 1. bağlanma bölgesinde dirençle ilgili olabilecek bir mutasyon saptanmıştır (Bakınız bulgular). Bunun üzerine buparvaquone direnciyle ilişkili olabilecek muhtemel mutasyonları saptayabilme ihtimalini kuvvetlendirmek amacı ile örneklerin alınması sırasında Akçaova Beldesi'ne ağırlık verilmiştir.

Çalışmada hastalık sezonunda, akut hastalık semptomu gösteren hayvanların *Vena jugularis*'inden heparinli tüplere 10 ml kan örnekleri alınmış ve *T. annulata* makroşizontları ile enfekte hücre kültürü elde edilmek üzere kullanılmıştır. Bu amaçla sahadan hastalık sezonunda toplanan kan örneklerinden 2010 yılında 5 adet (Çizelge 2.3.), 2011 yılında 45 adet (Çizelge 2.4.), 2012 yılında ise 28 adet hücre kültürü (Çizelge 2.5.) elde edilmiştir.

Yukarıda belirtilen hücre kültürlerine ek olarak, bu çalışmada *Theileria annulata*/Ankara izolatının klonal hücre kültürü olan D7 [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) kolorimetrik yönteminde kontrol hücre kültürü olarak kullanılmıştır. Bu klonal hücre kültürü Glasgow Üniversitesi Enfeksiyon ve İmmünite Anabilim Dalı'nın Parazitoloji Bölümün'den sağlanmıştır. Ayrıca yapılan sekans analizlerinin karşılaştırılmasında kullanılmak amacı ile Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ tarafından daha önceden sitokrom b sekans analizi yapılan toplam beş hücre kültürünün sekans analiz sonuçlarından yararlanılmıştır. Bunlar *T. annulata* Ankara/Pendik (Schein ve ark 1975), Diyarbakır, Akçaova, Dalama ve Aydın (Bilgiç 2010) izolatlarıdır.

Çizelge 2.2. 1998-2007 yılları arasında elde edilen *T. annulata* izolatları. İzolat kodu verilirken başlangıçta örneğin elde edildiği hayvan kodu verilmiş (A1, AC1, OE1 vb), sonrasında örneğin alındığı dönemdeki hayvanın tedavi durumu belirtilmiştir (BT: tedavi öncesi, AT: tedavi sonrası, AT ifadesinden sonra gelen rakam kaçınıcı tedavi sonrası alındığını belirtmektedir).

	İzolat Kodu	Köy/Belde	Tedavi		İzolat Kodu	Köy/Belde	Tedavi
1	A1/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	26	A32/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
2	A2/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	27	A33/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
3	A3/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	28	A34/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
4	A5/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	29	AC1/BT	Acarlar/İncirliova	Tedavi Öncesi
5	A6/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	30	C1/BT	Çiftlik	Tedavi Öncesi
6	A7/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	31	OE1/BT	Ovaeymir	Tedavi Öncesi
7	A8/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	32	G1/BT	Germencik	Tedavi Öncesi
8	A9/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	33	G2/BT	Germencik	Tedavi Öncesi
9	A10/BT,AT3	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi ve 3. Tedavi Sonrası	34	G3/BT	Germencik	Tedavi Öncesi
10	A11/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	35	K1/BT	Köşk	Tedavi Öncesi
11	A12/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	36	K2/BT	Köşk	Tedavi Öncesi
12	A13/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	37	TEP1/BT	Tepecik	Tedavi Öncesi
13	A14/AT2	Merkez/Akçaova	2. Tedavi Sonrası	38	M1/BT	Merkez/Aydın	Tedavi Öncesi
14	A15/AT3	Merkez/Akçaova	3. Tedavi Sonrası	39	CN1/BT	Cincin	Tedavi Öncesi
15	A16/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	40	CN2/BT	Cincin	Tedavi Öncesi
16	A17/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	41	CN3/BT	Cincin	Tedavi Öncesi
17	A18/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	42	NZ1/BT	Nazilli	Tedavi Öncesi
18	A24/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	43	NZ2/BT	Nazilli	Tedavi Öncesi
19	A25/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	44	NZ3/BT	Nazilli	Tedavi Öncesi
20	A26/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	45	NZ4/BT	Nazilli	Tedavi Öncesi
21	A27/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	46	NZ5/BT	Nazilli	Tedavi Öncesi
22	A28/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	47	MG1/AT1	Merkez/Aydın	1. Tedavi Sonrası
23	A29/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	48	S1/AT1	Söke	1. Tedavi Sonrası
24	A30/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	49	S2/AT1	Söke	1. Tedavi Sonrası
25	A31/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi				

Çizelge 2.3. 2010 yılında elde edilen *T. annulata* izolatları

	İzolat Kodu	Köy/Belde	Tedavi
1	A21/AT1, 3, 4	Merkez/Akçaova	1., 2. ve 3. Tedavi Sonrası
2	A100/BT, AT1	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi ve 1. Tedavi Sonrası
3	A101/BT, AT2	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi ve 2. Tedavi Sonrası
4	A102/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
5	A103/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası

Çizelge 2.4. 2011 yılında elde edilen *T. annulata* izolatları

	İzolat Kodu	Köy/Belde	Tedavi		İzolat Kodu	Köy/Belde	Tedavi
1	A104/AT1, 2, 3	Merkez/Akçaova	1., 2. ve 3. Tedavi Sonrası	24	A128/BT	Çiftlik/Köşk	Tedavi Öncesi
2	A106/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	25	A129/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
3	A107/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	26	A130/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
4	A108/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	27	A131/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
5	A109/BT, AT2	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi ve 2. Tedavi Sonrası	28	A132/AT2	Sarıköy/Akçaova	2. Tedavi Sonrası
6	A110/AT3	Merkez/Akçaova	3. Tedavi Sonrası	29	A133/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
7	A111/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	30	A134/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası
8	A112/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	31	A135/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
9	A113/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	32	A136/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
10	A114/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	33	A137/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
11	A115/AT1, 2	Merkez/Akçaova	1. ve 2. Tedavi Sonrası	34	A138/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
12	A116/AT2	Merkez/Akçaova	2. Tedavi Sonrası	35	A139/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
13	A117/AT1	Hacımemişler/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	36	A143/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası
14	A118/BT	Altınabat/Akçaova	Tedavi Öncesi	37	A144/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
15	A119/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	38	A145/AT2	Merkez/Akçaova	2. Tedavi Sonrası
16	A120/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	39	A148/AT4	Merkez/Akçaova	4. Tedavi Sonrası
17	A121/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	40	A149/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
18	A122/AT1,2	Merkez/Akçaova	1. ve 2. Tedavi Sonrası	41	A150/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası
19	A123/BT	Altınabat/Akçaova	Tedavi Öncesi	42	A151/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası
20	A124/AT1	Çöğürlük/Çine	1. Tedavi Sonrası	43	A152/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
21	A125/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	44	A153/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
22	A126/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	45	A154/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası
23	A127/BT	Sarıköy/Akçaova	Tedavi Öncesi				

Çizelge 2.5. 2012 yılında elde edilen *T. annulata* izolatları

	İzolat Kodu	Köy/Belde	Tedavi		İzolat Kodu	Köy/Belde	Tedavi
1	A155/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası	15	A170/AT1	Merkez/Akçaova	1. Tedavi Sonrası
2	A156/AT1, 2, 3	Sarıköy/Akçaova	1., 2. ve 3. Tedavi Sonrası	16	A171/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
3	A157/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	17	A172/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
4	A158/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	18	A173/BT	Sarıköy/Akçaova	Tedavi Öncesi
5	A159/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	19	A174/BT	Sarıköy/Akçaova	Tedavi Öncesi
6	A160/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	20	A175/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
7	A161/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	21	A176/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
8	A162/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	22	A177/AT1, 2	Merkez/Akçaova	1. ve 2. Tedavi Sonrası
9	A163/BT	Kabalar/Akçaova	Tedavi Öncesi	23	A178/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
10	A164/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	24	A179/BT, AT1	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi ve 1. Tedavi Sonrası
11	A166/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	25	A180/BT, AT2	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi ve 2. Tedavi Sonrası
12	A167/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	26	A181/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi
13	A168/AT1, 3	Kabalar/Akçaova	1. ve 3. Tedavi Sonrası	27	G4/BT	Germencik	Tedavi Öncesi
14	A169/BT	Merkez/Akçaova	Tedavi Öncesi	28	AC2/BT	Acarlar/İncirliova	Tedavi Öncesi

2.1.2. Kan Örnekleri

Buparvaquone direncinin yaygınlığını araştırmak amacı ile Akçaova Beldesi'nde hastalık sezonu dışında 200 farklı hayvanlardan EDTA'lı tüplere 5 ml kan örnekleri yukarıda belirtildiği gibi toplanmıştır. Daha sonra, bu örneklerde *T. annulata*'nın varlığı *T. annulata* sitokrom b geninin PCR metodu ile saptanmasıyla belirlenmiştir. Ek olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı tarafından 1998-2001 (Çizelge 2.6.) ve 2006-2007 (Çizelge 2.7.) yılları arasında toplanmış 119 adet *T. annulata* pozitif kan örneği de çalışmaya dahil edilmiştir. Toplamda çalışmada 168 adet kan örneği kullanılmış ve bu örneklerin 148 adedi Akçaova Beldesi'nden elde edilmiştir.

Çizelge 2.6. 1998-2001 yılları arasında elde edilen *T. annulata* pozitif kan örnekleri

Örnek kodu	Köy/Belde	İrk	Cinsiyet	Yaş	Örnek kodu	Köy/Belde	İrk	Cinsiyet	Yaş
t012	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Erkek	1.5 yaşlı	t175	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t014	Kabalar/Akçaova	Holştein	Dişi	1.5 yaşlı	t176	Merkez/Akçaova	Simental	Dişi	4 yaşlı
t015	Kabalar/Akçaova	Holştein	Dişi	10 aylık	t177	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı
t024	Kabalar/Akçaova	Holştein	Dişi	1.5 yaşlı	t178	Merkez/Akçaova	Montofon	Dişi	10 yaşlı
t025	Kabalar/Akçaova	Holştein	Dişi	6.5 yaşlı	t179	Merkez/Akçaova			
t043	Sarıköy/Akçaova	Yerli ırk	Erkek	2.5 yaşlı	t180	Merkez/Akçaova	Holştein melezi	Erkek	9 aylık
t044	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Erkek	2 yaşlı	t181	Merkez/Akçaova	Montofon	Dişi	4 yaşlı
t045	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Erkek	2.5 yaşlı	t182	Merkez/Akçaova	Montofon	Dişi	
t051	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	6 yaşlı	t183	Merkez/Akçaova	Montofon	Erkek	1.5 yaşlı
t053	Ocaklı/ Nazilli	Montofon	Dişi	6 yaşlı	t184	Merkez/Akçaova	Montofon	Dişi	1 yaşlı
t058	Kestel/ Nazilli	Holştein	Dişi	1 yaşlı	t185	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı
t070	Güzel Köy/ Nazilli	Montofon	Erkek	1 yaşlı	t186	Merkez/Akçaova	Montofon	Dişi	5 yaşlı
t073	Nazilli	Holştein	Dişi	1.5 yaşlı	t187	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t076	Nazilli	Montofon	Erkek	10 aylık	t188	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t077	Nazilli	Holştein	Dişi	6 yaşlı	t190	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t089	İncirliova	Yerli ırk	Dişi	10 yaşlı	t191	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	1 yaşlı
t090	İncirliova	Holştein	Dişi	1.5 yaşlı	t192	Merkez/Akçaova	Holştein	Erkek	1.5 yaşlı
t119	Merkez/Aydın	Holştein	Erkek	1.5 yaşlı	t193	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t120	Merkez/Aydın	Holştein	Dişi	2 yaşlı	t194	Merkez/Akçaova	Simental	Erkek	1.5 yaşlı
t132	Acarlar/İncirliova	Holştein	Dişi	4 yaşlı	t196	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t137	İncirliova	Holştein	Dişi	5 yaşlı	t197	Merkez/Akçaova	Montofon	Dişi	1 yaşlı
t140	Nazilli	Montofon	Erkek	9 aylık	t198	Merkez/Akçaova	Simental	Dişi	3 yaşlı
t141	Nazilli	Montofon	Erkek	8 aylık	t199	Merkez/Akçaova			
t142	Nazilli	Holştein	Dişi	9 aylık	t200	Merkez/Akçaova	Montofon	Erkek	1.5 yaşlı
t143	İncirliova	Montofon	Erkek	7 aylık	t201	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t144	İncirliova	Montofon	Erkek	10 aylık	t202	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	2 yaşlı
t145	Merkez/Aydın	Holştein	Dişi	5 aylık	t205	Merkez/Akçaova	Simental	Erkek	2 yaşlı
t146	Merkez/Aydın	Holştein	Dişi	10 aylık	t242	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	5 yaşlı
t149	Merkez/Aydın	Holştein	Erkek	8 aylık	t243	Merkez/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı
t174	Merkez/Akçaova	Holştein	Erkek	1.5 yaşlı	t244	Merkez/Akçaova	Montofon	Erkek	6 aylık

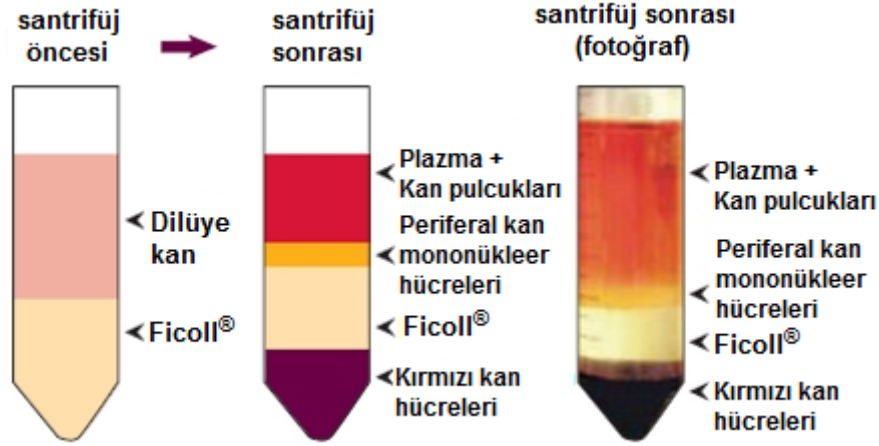
Çizelge 2.7. 2006-2007 yılları arasında elde edilen *T. annulata* pozitif kan örnekleri

Örnek kodu	Köy/Belde	İrk	Cinsiyet	Yaş	Örnek kodu	Köy/Belde	İrk	Cinsiyet	Yaş
t301	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	14 yaşlı	t333	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	7 yaşlı
t302	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	6 yaşlı	t334	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	3 aylık
t303	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	5 yaşlı	t335	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	5 aylık
t304	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı	t336	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	3 aylık
t305	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	9 yaşlı	t337	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	13 yaşlı
t306	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	13 yaşlı	t338	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	10 yaşlı
t307	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	10 yaşlı	t339	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	5 yaşlı
t308	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Erkek	4 aylık	t340	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	4 yaşlı
t309	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Erkek	7 aylık	t341	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	3 yaşlı
t310	Sarıköy/Akçaova				t342	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	8 yaşlı
t311	Sarıköy/Akçaova	Simental	Dişi	1 yaşlı	t343	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t312	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	2 yaşlı	t344	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	4 yaşlı
t313	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	5 yaşlı	t345	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	2 yaşlı
t316	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	7 aylık	t346	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	2 yaşlı
t317	Sarıköy/Akçaova				t347	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	2 yaşlı
t318	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı	t348	Sarıköy/Akçaova			
t319	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	1.5 aylık	t349	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	5 yaşlı
t320	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	8 yaşlı	t350	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	4 yaşlı
t321	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı	t351	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	5 yaşlı
t322	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı	t352	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	4 yaşlı
t323	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	8 aylık	t353	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	5 yaşlı
t324	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	9 aylık	t354	Sarıköy/Akçaova	Yerli kara	Dişi	9 yaşlı
t325	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi		t356	Sarıköy/Akçaova			
t326	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	2 yaşlı	t357	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	8 yaşlı
t327	Sarıköy/Akçaova	Montofon	Dişi	6 yaşlı	t358	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı
t328	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	5 yaşlı	t359	Sarıköy/Akçaova			
t329	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	8 yaşlı	t360	Sarıköy/Akçaova			
t330	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	5 yaşlı	t361	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	4 yaşlı
t331	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı	t364	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	3 yaşlı
t332	Sarıköy/Akçaova	Holştein	Dişi	1.5 yaşlı					

2.2. Kan Örneklerinden Periferik Mononükleer Hücrelerin (PBM) İzolasyonu:

Aydın ve çevresindeki *T. annulata* ile enfekte sığırlardan tedavi öncesi ve/veya sonrası toplanan kan örneklerinin her birinden steril şartlarda süspanse hücre kültürü yöntemiyle *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte lenfositler izole edilmiştir. Heparinli tüplere alınan kan örnekleri steril ortam sağlayan özel kabinlerde densite gradient metoduyla PBM daha önceden tarif edilen şekilde elde edilmiştir (Brown 1987). 10 ml kan örneği bire bir oranında phosphate buffered saline (PBS) ile sulandırılarak 8 ml ficoll (1,077 g/ml, Biocoll, Biochrom AG, Berlin) solüsyonu üzerine kan karışmayacak şekilde yavaşça ilave edilmiştir. 1000 x g, 30 dakika, 15°C de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonunda densite farkından

dolayı falkon tüpte en altta kırmızı kan hücreleri, üzerinde ayırıcı solüsyon ve en üst katmanda kan plazması olmak üzere toplam üç katman oluşmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Ficoll® densite gradiyent santrifüj öncesi ve sonrasında örnekte görülen tabakalar (www.biocompare.com'dan modifiye edilmiştir).

Kan plazması ile ayırıcı solüsyon arasında bulunan PBM dikkatlice alınarak 10 ml PBS içerisine konulmuş ve yıkama işlemi 350xg, 10 dakika, 15°C'de gerçekleştirilmiştir. Dipte toplanan beyaz kan hücrelerine aynı yıkama işlemi 3 defa uygulanmıştır. Yıkama işlemleri sonucunda elde edilen pelet içerisinde %20 yeni doğmuş buzağı serumu (New Born Calf Serum;NCS, Gibco, UK), 10U/ml Penisilin/streptomisin (Gibco, UK) ve 2 Mm L-glutamin (Gibco, UK) içeren komple RPMI-1640 (Gibco, UK) vasatına ekim yapılarak üremenin gerçekleşmesi için %5 CO₂'li etüvde, 37°C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen hücre kültürleri düzenli aralıklarla invert mikroskop altında üreme bakımından kontrol edilmiş ve parazite ait makroşizontların belirlenmesi amacı ile hücre santrifüj tekniğine başvurulmuştur. Bu amaçla hücre süspansiyonundan hücre yoğunluğuna göre 50-100µl alınarak 200 x g, 5 dk, 25°C'de sitosantrifüj yapılmış ve preparatlar absolut methanol (Sigma, Fransa) içerisinde 5 dk tespit edildikten sonra %5 Giemsa (Merck, Almanya) boyasında 45 dk boyanarak mikroskop altında makroşizont ile enfekte hücreler aranmıştır.

Kandan PBM'in izolasyonunu takiben, her iki veya üç günde bir medyum değiştirilmiştir. Bunun için 8 ml kültür alınıp 300 x g, 5 dk, 25°C'de santrifüj edilmiş, üstteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti üzerine taze medyum ilave edilerek tekrar orijinal flaska aktarılmıştır. Her uygulamada sitosantrifüj gerçekleştirilmiştir. Makroşizont ile enfekte hücre yoğunluğu %50'ye ulaştığında hücreler yeni bir flaska pasajlanmıştır. Üreyen hücreler

üç hafta sonra dondurulmuştur. Üç hafta içinde parazit üremesi saptanmayan örnekler atılmıştır.

2.2.1. Hücre Kültürlerinin Üretilmesi ve Dondurulması

Üreme saptanan ve hücre yoğunluğu artan kültürler günlük olarak besi yerinin rengi, morfolojisi ve hücre yoğunluğu açısından kontrol edilmiştir. Kültüre edilen hücrelerde; hücre tipine, ekilme yoğunluğuna, ortamın yoğunluğuna ve daha önceki işlemlere bağlı olarak önce sessiz (inaktif) ya da gecikme fazı denilen bir dönem bulunmaktadır. Bunu en yüksek metabolik aktivitenin gözlendiği logaritmik artış (üreme) dönemi izler. Bundan sonra da hücreler hücre sayısının sabit kaldığı bir durağan evreye girmektedirler. Bu dönem sonrasında hücrelerin yoğunluğunun ($1-2 \times 10^5$ canlı hücre/ml) üremeyi baskılamaya başladığı yaklaşık 48. saatte besi yerinden yeni bir flaska alınarak pasajlanmaktadır (harvesting) (Brown 1987). *T. annulata* makroözontları ile enfekte hücre kültürleri devamlılığı, log10 olarak çoğalan hücreleri her 48-72 saatte bir hücre sayılarının azaltılması ile gerçekleştirilmiştir (Brown, 1987). Devam etmekte olan kültürdeki hücre sayısı $1-2 \times 10^5$ /ml olacak şekilde yaklaşık 1:10 oranında dilüye edilerek %10 NCS içeren vasat ile tazelenmiştir (Bakınız bölüm 2.2).

Üremenin sorunsuz gerçekleştiği kültürler dondurularak daha sonra kullanılmak üzere sıvı azot içerisinde muhafaza edilmiştir. Logaritmik büyüme safhasında olan iki günlük ve yoğunluğu $1-2 \times 10^6$ hücre/ml olan hücreler %10 dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma, Fransa) ve %20 NCS içeren vasat içerisinde dondurulmuştur (Brown, 1987). Hücreler 350 x g, 10 dk, 15°C'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılarak 2×10^7 hücre/ml olacak şekilde %20 NCS'li RPMI 1640 ile alt üst edilmiş, daha sonra eşit oranda %20 DMSO içeren medyum hücrelerin DMSO'in toksik etkisinden zarar görmemesi için tüp sürekli çalkalanırken yavaşça ilave edilmiştir. Böylece son konsantrasyon %10 DMSO olacak şekilde ayarlanmıştır. Steril kriyo tüplere 1 ml olarak hücre süspansiyonu konulmuştur. Dondurma işlemini takiben kriyo tüpler -80°C'de 24 saat tutulduktan sonra sıvı azot tankına aktarılmıştır. Dondurma işleminin başarıyla gerçekleştiğini kontrol etmek amacıyla her bir hücre kültürü için dondurulan kriyo tüplerden bir tanesi azot tankına aktarılmasını takip eden en az bir gün sonrasında çözündürülerek hücrelerin canlılık durumu ve üremesi kontrol edilmiştir. Bu amaçla azot tankından çıkarılan hücre kültürü 37°C su banyosunda eritilmesini takiben 9 ml soğuk %20 NCS'li yukarıda belirtilen vasata konularak 350 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. İşlemi takiben üstte kalan DMSO'li medium dipteki hücreler gözetilerek uzaklaştırılmış ve hücreler 10ml belirtilen vasat ile alt üst edilerek 25cm² flaska aktarılmıştır. Bir hafta bakım

beslemesi yapılan ve normal olarak üreme gösteren hücre kültürlerinin daha önceden kontrol amaçlı bırakılan yedeği ve çözdürülen örneği atılmıştır.

2.3. *Theileria annulata* İzolatlarının MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] Kolorimetrik Yöntemi ile Buparvaquone'a Karşı Fenotiplerinin Belirlenmesi

Metabolizma redüktaz aktivitesi ile hücre canlılığının değerlendirilmesinin yapıldığı kolorimetrik yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılanları tetrazolium ve resazurin azalmasının değerlendirilmesidir. Tetrazolium tuzları ancak metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenebilmektedir (Butler 2004). MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ölçümü in vitro koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Holst-Hansen ve Brünner 1981). Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Çalışmada hedef Krebs döngüsü enzimlerinden biri olan ve mitokondrilerin matriksinde (mitokondriyal iç membranın içe bakan yüzeyinde) bulunan süksinat dehidrogenaz'dır. Bir tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT, süksinat dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkte kristaller oluşturmaktadır. DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünen formazan kristalleri, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında (490-650 nm) ölçülebilen bir absorbans vermektedir (Saravanan ve ark 2003). Absorbans değerlendirilerek, dolaylı yoldan hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmektedir ve ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Barile 1994, Butler 2004).

Bu yöntem, çalışma basamaklarının az olması açısından hızlı, kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren bir testtir. Apoptozisin erken dönemlerinde hücrelerin metabolik etkinliklerinde bir değişiklik olmadığı ve kimyasal tarafından arttırılmış olabilecek efektör hücrelerdeki metabolik etkinliğin, hedef hücrelerdeki sitotoksik etkiyi maskeleyebileceği dezavantajları bulunmakla birlikte, MTT yöntemi günümüzde birçok literatürde referans gösterilmekte ve diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında altın standart olarak değerlendirilmektedir (Fotakis ve Timbrell 2006).

Formazan kristalleri çözdürmek amacıyla eklenen organik çözücüler, yöntemin litik aşamasını tamamlamasına neden olmakta ve ilerleyen aşamalarda değişimleri ve deneyin optimizasyonunu yapmak için tekrar okunabilmesini imkânsız kılmaktadır; ancak yeni

geliştirilen test kitleri ile bu sorunun önüne geçilebilmiştir. Bu yöntemlerde çözünmeyen formazan ürünleri farklı özelliklere sahip alternatif tetrazoliumların geliştirilmesine neden olmaktadır. Bunlardan biri olan XTT (2,3- bis(2-metoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-carboxanilide-2H-tetrazolium) litik ve yapışkan karakterli formazan oluşumu yerine akışkan yapıda formazanın oluşmasını sağlamaktadır. Bu şekilde bir çözücü ile oluşan tuzun çözdürülmesine gerek kalmamaktadır. Ancak, XTT sulu-çözeltilerde çözünmesinin güçlüğü nedeniyle laboratuvarlarda yaygın kullanılmamaktadır. Diğer alternatif formazanların arasında MTS (5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthizoly)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium ve WST-1 ((4-[3-4-iodophenyl]-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3,-benzene disulfonate) bulunmaktadır (Butler 2004, Fotakis ve Timbrell 2006).

2.3.1. Hücre Kültürlerinin Buparvaquone Baskısı İçin Hazırlanması

Normal üremesi devam eden hücre kültürlerinde hemositometre metodu ile canlılık oranları hesaplanmıştır. Bu amaçla ölü ve canlı hücreleri belirleyebilmek için ile tripan mavisi kullanılmıştır. Hücre kültürlerinin vasat değiştirmesini takip eden 48. saatte 0,5 ml hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alınarak bire bir oranında %0,4 tripan mavisi ile seyreltilmiş ve thoma lamı ile hücre sayımları yapılmıştır. Mililitresinde $1,33 \times 10^5$ canlı hücre olarak dilüye edilmiş ve 12 farklı buparvaquone konsantrasyonu (1000-0,4 ng/ml) için 48 kuyucuklu plaklara aynı dozun üç kere tekrarı olacak şekilde toplam 36 kuyucuğa 750 µl miktarında uygulanmıştır. Aynı işlem 3 farklı kuyucuğa ilaç içermeyen kontrol grubu için de uygulanmıştır. Her bir izolata ilaç baskısı uygulanırken farklı bir plak da kontrol amacı ile buparvaquone'a duyarlı olduğu bilinen *T. annulata* Ankara D7 klonal hücre kültürüne de aynı protokol uygulanmıştır. Test edilen hücre kültürlerinden elde edilen MTT sonuçları, eğer kontrol D7 sonuçları kabul edilebilir değerler (IC_{50} ; 2-3 ng/ml) arasında ise test sonuçları kabul edilmiştir. D7'dan elde edilen değerlerde anormallik saptandığı durumlarda ise test tekrar edilmiştir.

2.3.2. İlacın Hazırlanması

İlaç baskısı amacı ile *T. annulata* tedavisinde kullanılan buparvaquone etken maddesi uygun şartlarda eritildikten sonra kullanılmıştır. Bu amaç ile 100 mg buparvaquone önce 1 ml absolut ethanol ile karıştırılarak 1ml 1M potasyum hidroksit ilavesi ile eritilmiştir. İlaç konsantrasyonu hazırlanan karışıma 100 ml steril distile su eklenerek 10.000 ng/ml buparvaquone ihtiva eden ilaç dilüsyonu elde edilmiştir. Bu dilüsyon 4000 ng/ml dozunda ayarlanarak bire bir sulandırma ile diğer 11 dilüsyon elde edilmiştir. Elde edilen ilaç

dilüsyonları 250 µl olarak daha önce 750 µl hücre konulan kuyucukların üzerine, kontrol grubu hariç, ilave edilmiş ve ilacın son konsantrasyonları 1000 ng/ml ile 0,4 ng/ml arasında olacak şekilde uygulanmıştır. İzolatların ilaca karşı verdiği tepkiyi belirlemek amacı ile plak 3 gün süresince %5 CO²'li etüvde, 37°C'de inkübe edilmiştir.

2.3.3. MTT Kolorimetrik Testinin Uygulanması

Hücre kültürlerinin ilaç baskısı altında replikasyon dereceleri ve metabolik aktivitelerinin karşılaştırılması ve buparvaquone direncine karşı fenotiplerinin belirlenmesi amacı ile MTT kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin daha önce belirtilen protokolü (Savaran ve ark 2003) bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Daha önceden belirtilen şekilde ilaç baskısı altında inkübe edilen hücre kültürlerinin inkübasyonu sonunda her bir gözden 900 µl hücre-ilaç karışımı farklı eppendorf tüplerine aktararak 1000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 20 µl MTT (5 mg/ml PBS, pH 7.2 içerisinde sulandırılmış) ile hücre peleti alt üst edilmek suretiyle karıştırılarak ve %5 CO²'li etüvde, 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında her bir örnek 150 µl dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma, USA) ile iyice alt üst edilerek oluşan formazan tuzlarının çözünmesi sağlanmış ve örnekler 96 well plaklara aktarılmıştır. Spektrofotometrik yöntemle optik densite test absorbansı olarak 490 nm, referans için 630 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçülmüştür (ELx808 ultra microplate reader, Bio-tek, USA). Elde edilen sonuçların her bir ilaç dilüsyonu için ortalaması alınarak Graph Prism5 istatistik programı ile IC₅₀ (The half maximal inhibitory concentration- Hücrelerin çoğalmasını %50 oranında baskılayan doz) değerleri hesaplanmıştır.

2.4. DNA Ekstraksiyonu

Hasta hayvanlardan elde edilen *T. annulata* hücre kültürlerinden ve taşıyıcı hayvanlardan toplanan kanlardan Promega Wizard Genomic DNA ekstraksiyon kiti (Promega Corporation, Madison, WI, USA) kullanılarak DNA örnekleri elde edilmiştir.

2.4.1. Kan Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

DNA, her bir EDTA'lı kan örneğinin 200 µl'sinden, kullanılan kit protokolüne uygun olacak şekilde hazırlanmıştır. Buna göre, steril eppendorf tüplere 200'er µl miktarında bölünmüş kan örnekleri oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra üzerlerine 600 µl hücreleri lize edici solüsyon (cell lysis solution) eklenip 10 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresince tüpler 2–3 kez alt-üst edilmiş ve süre sonunda örnekler 13000–16000 x

g'de 20 sn. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda dipteki pelete dokunulmadan süpernatant atılmıştır. Bu işlemler bir kez daha tekrar edildikten sonra dipte kalan beyaz kan hücreleri süspansiyon haline gelene kadar 10–15 sn. hafifçe vortekslenmiştir. Üzerine 200 µl hücre çekirdeğini lize edici solüsyon (Nuclei Lysis Solution) eklenerek beyaz kan hücrelerinin lize olması için 5-6 kez pipete edilmiştir. Daha sonra su banyosunda 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üzerlerine 1 µl RNase Solüsyonu eklenerek tüpler 2–5 kez alt-üst edilmiş ve su banyosunda 37 °C'de 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır. 15 dk. sonunda 70 µl protein çöktürme solüsyonu (Protein Presipitasyon Solüsyonu) eklenerek 10–20 sn. vortekslenmiştir. Daha sonra 13000–16000 x g'de 3 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda dipte kalan koyu kahverengi protein peletine dokunulmadan süpernatant alınmış ve içerisinde 200'er µl'lik isopropanol bulunan 1.5 ml'lik vida kapaklı steril tüplere aktarılmıştır. Tüplerde isopropanol içerisinde yüzen beyaz küçük DNA bulutu görülünceye kadar hafifçe sallanmış ve sonra 13000–16000 x g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda isopropanol, dipteki DNA rahatsız edilmeden dökülmüştür. DNA üzerine 200 µl % 70'lik ethanol konularak tüp hafifçe alt-üst edilmiş ve 13000–16000 x g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra üstteki ethanol dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve pelletin kuruması için 10–15 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir. Tüplere 50 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenerek 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda rehidrasyon solüsyonu içerisindeki DNA kullanım aşamasına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.2. *Theileria annulata* Makroşizontlarıyla Enfekte Lenfosit Hücre Kültürlerinden DNA Ekstraksiyonu

Her bir hücre kültürü için 5×10^6 canlı hücre 2.3.2.'de belirtildiği şekilde sayımı yapılarak DNA ekstraksiyonu için kit protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla belirlenen miktar hücre kültüründen steril falkon tüplere aktarılarak 350 x g'de 10 dk. santrifüj edilerek hücrelerin dipte toplanması sağlanmıştır. Santrifüj sonunda üstte kalan süpernatant kısmı atılarak hücreler 200 µl 1xPBS ile alt üst edilmiş ve steril eppendorf tüplere aktarılmıştır. İşlem sonunda örnekler 13000–16000 x g'de 10 sn. santrifüj edilerek üstte kalan PBS uzaklaştırılmış ve hücreler süspansiyon haline gelene kadar 10–15 sn. hafifçe vortekslenmiştir. Üzerine 600 µl hücre çekirdeğini lize edici solüsyon eklenerek hücrelerin lize olması için 5-6 kez pipete edilmiştir. 3 µl RNase solüsyonu eklenerek tüpler 2–5 kez alt-üst edilmiş ve su banyosunda 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonunda örnekler 5 dk. oda ısısında bekletilmiş, inkübasyon sonucunda 200 µl protein çöktürme

solüsyonu ilave edilerek, yüksek devirde 20 sn. vortekslenmiş ve 5 dk. buz üzerinde inkübe edilmiştir. Çözünen proteinleri çöktürmek amacı ile örnekler 13000–16000 x g'de 4dk santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda dipte kalan beyaz protein peletine dokunulmadan süpernatant alınmış ve içerisinde 600'er µl'lik isopropanol bulunan 1.5 ml'lik vida kapaklı steril tüplere aktarılmıştır. Tüpler DNA bulutu görülünceye kadar hafifçe sallanmış ve sonra 13000–16000 x g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. İsoopropanol DNA gözetilerek dökülmüş ve DNA üzerine 600 µl %70'lik ethanol konularak tüp hafifçe alt-üst edilmiş ve 13000–16000 x g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra üstteki ethanol dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve pelletin kuruması için 10–15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Tüplere 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenerek 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen örnekler kullanım aşamasına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.5. *Theileria annulata* İzolatlarının Sitokrom b Geninin İncelenmesi

2.5.1. *Theileria annulata* Sitokrom b Geninde Muhtemel Buparvaquone Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi

Plasmodium türlerinde atovaquone direnci ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda ilacın parazitin sitokrom b geni üzerinde yer alan muhtemel bağlanma bölgeleri (Ubiquinol oksitlenme bölgeleri; Qo1 ve 2 bölgesi) saptanmış ve direnç araştırmalarında bu kısımlarda saptanan mutasyonların üzerinde durulmuştur (Korsinczky ve ark 2000, Kessl ve ark 2007). Ayrıca atovaquone direnç çalışmalarında parazitte yer alan ilacın muhtemel bağlanma bölgeleri *S. cerevisiae* sitokrom b geni ile karşılaştırılmış ve bu genin parazitle yüksek oranda benzer olduğu saptanarak bu maya direnç çalışmalarında model olarak kullanılmıştır (Kessl 2003). Bu çalışmada ise yukarıda belirtilen çalışmalar model alınarak *T. annulata*'nın sitokrom b geni üzerinde buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgelerinin saptanması ve bu bölgenin direnç çalışmalarında kullanılan diğer organizmaların gen dizilimiyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda UniProtKB veri tabanı kullanılarak *T. annulata* (Q4UJ67) *Plasmodium falciparum* (Q02768), *P. yoelii* (Q7PDA7), *P. berghei* (O99253), *T. gondii* (O20672) ve *S. cerevisiae*'nin (P00163) sitokrom b geni protein dizilimleri elde edilmiştir. Belirtilen protein dizilimleri Clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılarak birbirlerine benzerlik oranları saptanmış ve *T. annulata* sitokrom b geni üzerinde muhtemel buparvaquone bağlanma bölgeleri belirlenmiştir. Buna ek olarak *T. annulata* sitokrom b geninde proteinlerin transmembran helikal yapısının tahmini olarak yerleşimi TMHMM v.2.0 sunucusu (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) kullanılarak belirlenmiş ve bu yapı

şekle dökülerek sitokrom b geni üzerinde saptanan mutasyonların buldukları noktalar daha açık bir şekilde belirlenmeye çalışılmıştır.

2.5.2. *Theileria annulata*'ya Ait Sitokrom b Geninin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması

Buparvaquone'un parazit üzerine etkidiği muhtemel bağlanma bölgesi olan sitokrom bc1 kompleksinin bir parçası olan sitokrom b proteinini kodlayan *T. annulata*'ya ait sitokrom b geninin tam nükleoid dizimi (Genbank no: XM949625) gen bankasından elde edilmiştir. Sitokrom b gen bölgesini çoğaltmada kullanılacak primerlerin tasarlanması için Clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılmıştır (Thompson ve ark 1997). Gen bankasında bildirilen 1092 bp uzunluğundaki *T. annulata* sitokrom b geninin 1089 bp'lik (Şekil 2.3.) bölümü 5'-ATG AAT TTG TTT AAC TCA CAT TTG C-3' ileri ve 5'-TGC ACG AAC TCT TGC AGA GTC-3' geri yönlü primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu amaçla uygulanan PCR'da 50µl'lik son hacimde, 45 mM Tris-HCl, pH 8.8, 11 mM (NH₄)₂SO₄, 4.5 mM MgCl₂, 0.113 mg/ml BSA, 4.4 µM EDTA, her bir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1 mM, 1 U Firepol *Taq* DNA polimeraz (Solis BioDyne, Estonia), 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 2 µl DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyon Techne TC-512 marka otomatik ısı döngüsü cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 94°C'de 3 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her siklus denatürasyon (95°C'de 1 dk), bağlanma (52°C'de 1dk) ve uzama (72°C'de 1 dakika 20 saniye) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde görüntülemesi yapılabildiği kadar 4°C'de saklanmıştır.

1	ATGAATTTGTTAACTCACATTTGCTTCGTATATGGTACCTAAAAATTTGAATTTGAATTGGAATTTGGGTTTATACT	80
81	TGGAATATTGTTAGTACTCCAAATTATATCCGGGTTGATGCTTTCTTTCTTTATGTGCCAGCAAAGGTATGGCTTTTG	160
161	AAAGTACTTTGGCCGTAATGTTAAACATTTGTTTCGGTTGGTTTGTCGTCCTTTATCACTCGTTTGGAGTTTCGTTTAT	240
241	TTCTCTTTATGTTTCTACATATCATGAAAGGTATGTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGTGT	320
321	TGTTATTTTCGTTTTAAGTATAGCAACTGCTTTTGTGGTTATGTATTACCAGATGGTCAAATGAGCTTCTGGGGAGCTA	400
401	CAGTCATAGTGGTTTATTGAAATTTTTCGGAAAAGCTAATGTTCTAATTTTGGAGGCCAAACAGTTGGTCCAGAGACA	480
481	TTAGAGAGATTCTTTTCTATACATGTTATATTGCCTGTGATTATATTGTTAGTTGTTATATTTTCATCTTTATGTTCTTCA	560
561	TAGAGATGGAAGTTCAAATCCATTGGCAGTTATAGACATGCTAGCTATATTTAGATTTTCATCCAGTGGTACTTTTCAGTG	640
641	ATATTAGATTTATAGTTATAGTAATTTTATAATTGGAGTGCAATCTGGTTATGGATTCATTTCTATTTTCAAGCAGAT	720
721	CCTGATAATTCGATATTATCTGATCCTTTAAACACTCCTGCACACATTATCCAGAATGGTATTTACTTTTGTTTTATGC	800
801	AACATTAAGTGTTCACAAAGTAGCTGGACTTTTGGCAATGGCAGGAATGTTAGAATTGTTAGTATTATTAGTTG	880
881	AATCTAGATACTTTAAACAGACTGTTTCAGCTATGAATTATCATAGAGTATGGACTACATCAAGTGTACCATTAGTACCA	960
961	GTTTTATTATGTTAGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGCTATTGGAAGTGTGTGTGTGTC	1040
1041	AGTTGTTCTATTTATTATAAATTATTGGACTCTGCAAGAGTTTCGTGCA	1089

Şekil 2.3. *Theileria annulata*'ya ait sitokrom b geninin nükleotid sekansı (Genbank no: XM949625).

2.5.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PCR ürünleri elektroforez tankında % 1,5'lük agaroz jelde yürütülmüştür. Bu amaçla 1,5 gr agaroz tartılarak 100 ml 1XTAE (50XTAE; 1 litreye, 242 g Tris, 0.5 M EDTA 100 ml, pH;8) solüsyonuna ilave edilmiştir. Elde edilen karışım agaroz tamamen çözünene kadar mikro dalgada ısıtılmış ve 5 µl Safe ViewTM Nucleic Acid Stain (Applied Biological Materials ICN) ilave edilmiştir. Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilerek agaroz tepsiye dökülmüş ve DNA'nın jelde yürütülmesi esnasında sorun yaşanmaması için oluşan baloncuklar giderilmiştir. Agaroz jelin tamamen donmasından sonra taraklar çıkartılarak elektroforez tepsi tanka yerleştirilmiştir. Tanka jelin üzerini kaplayacak kadar 1XTAE solüsyonu ilave edilmiştir. Her 9 µl PCR ürünü için 1 µl 6XLoading Dye (Ficoll-type 400 ve Bromophenol Blue) kullanılmıştır. PCR ürünleri ile 6XLoading Dye pipete edilerek karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara pipetlenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin boyutunu belirlemek amacıyla her jele 5 µl 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne, Estonia) konulmuştur. PCR ürünleri 100 volt doğrusal akımda yaklaşık 45-50 dakika yürütülerek süre sonunda jel görüntüleme cihazında (UV transluminatör, UVP EC3 ChemiHR 410 Imaging System) UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir.

2.6. *Theileria annulata* Makroşizont Hücre Kültürlerinin Klonlanması

2.6.1. Çalışmada Kullanılan Materyal

Aydın İlinin Akçaova Beldesi'nden toplanmış ve MTT testi ile fenotipik olarak buparvaquone'a karşı farklı oranlarda direnç gösteren üç *T.annulata* izolatı (A10, A16 ve A21) sitokrom b geninin mutasyonlar yönünden incelenmesi için seçilmiştir. Bu örneklerle ilave olarak tespit edilen buparvaquone direnciyle ilgili olabilecek mutasyonların gen üzerindeki diğer polimorfik değişikliklerden ayrılması amacıyla farklı bölgelerden izole edilmiş ve ilaca karşı duyarlı oldukları belirlenen Akçaova, Nazilli ve Germencik ilçelerinden elde edilen *T. annulata* izolatları (sırasıyla A9, N3 ve G3) da genotipik açıdan incelenmiştir.

2.6.2. Klonal Hücre Kültürlerinin Elde Edilmesi

MTT testi ile fenotipik olarak buparvaquone'un etkisine karşı farklı derecelerde direnç gösteren ve duyarlı olan izolatlarının barındırdığı dirençli ve duyarlı parazit populasyonlarının tespit edilebilmesi ve bu populasyonların arasındaki genotipik farklılıklarının ortaya konulabilmesi amacıyla seçilen bazı *T. annulata* izolatları dilüsyon yöntemiyle klonlanmıştır. Bu amaçla *T. annulata* makroşizont hücre kültürleri, 100 ml %20 NCS içeren RPMI 1640 vasatında 15×10^1 canlı hücre olacak şekilde dilüye edilerek 5 adet 96 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna 200µl olarak (0,3 canlı hücre/kuyu) dağıtılmıştır. 37°C %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir. Klonal hücre kültürlerinin çoğalma gösterip göstermedikleri düzenli aralıklarla invert mikroskop altında takip edilerek, hücrelerin kuyuların tabanını kaplayacak kadar çoğalmalarını takiben, hücreler 2 ml vasat içerisinde 24 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. Aktarılan hücrelerin üremeleri her gün kontrol edilerek kuyu tabanını dolduracak kadar üreyen klonal hücre kültürleri hücre sayısını arttırmak amacı yeni plaklara aktarılmıştır. Bu amaç ile her bir klonal hücre kültürü için üç farklı 24 kuyulu plate kullanılmış ve her bir plate'e üreyen hücrelerden 500 µl aktararak üzerleri 2 ml'ye yukarıda belirtilen vasat ile tamamlanmıştır. Bu işlem sonucunda her bir klonal hücre kültürü için 4 adet 24 kuyucuklu plate elde edilmiştir. Üremenin sorunsuz olarak gerçekleştiği hücre kültürlerinin 1 ml'si 2.4.2.'de belirtilen şekilde DNA ekstraksiyonu için kullanılmış, geri kalan 7 ml'si ise 2.2.1'de belirtildiği şekilde dondurularak daha sonra kullanılmak amacı ile sıvı azotta saklanmıştır.

2.7. Klonal *T. annulata* İzolatlarının ve Tekrarlayan Buparvaquone Tedavilerinden Sonra *T.annulata* İzolatlarının Populasyon Genetiğinin Belirlenmesi

Aynı izolata ait farklı klonlar arasında genotipik olarak farklılıklar görülebilmektedir. Bu farklılıklar klonlama esnasında parazitte meydana gelen adaptasyon ve gen ekspresyonundaki değişimlere bağlı olabileceği gibi aynı izolatta yer alan farklı genotiplerdeki parazit populasyonlarından da kaynaklanabilmektedir. Örneğin, *T. annulata* (Weir ve ark 2011) ve *T. parva* (Oura ve ark 2003, Pelle ve ark 2011)'nın saha şartlarında hayvanlarda enfeksiyon oluşturan parazit populasyonlarının farklı genotiplere sahip etkenler tarafından oluştuğu bildirilmiştir. Yapılan genetik analizler sonucunda *T. annulata*'nın saha izolatlarında bulunan populasyonlarda genetik rekombinasyon olduğu doğrulanmıştır (Weir ve ark 2007). Enfekte hayvanlardan izole edilen hücre kültürleri ve piroplasmalarda da yüksek düzeyde miks enfeksiyonlar bulunabilmektedir. Yapılan bir çalışmada mikro ve minisatellit işaretçiler *T. annulata* izolatlarının populasyon genetiğini belirlemede kullanılmış ve izole edilen bir izolatta TS8 markeri kullanılarak yapılan analizlerde 10 farklı allel belirlenerek, ana izolatta en az 10 farklı genotipte parazit populasyonunun yer alabileceği belirtilmiştir (Weir 2006).

Polimorfik mini ve mikrosatellit işaretçiler kullanılarak yapılan genotiplendirmeler bireyler arasındaki polimorfizmin ölçülmesi, populasyonun taşıdığı genetik bilginin değerlendirilmesinde önem taşımaktadır. Sıralı ve tekrarlı DNA motiflerinden oluşan, nötral DNA bölgeleri olarak bilinen ve satelit olarak adlandırılan bu bölgeler; 10-100 bp tekrarlı minisatellitler ve 2-6 bp tekrarlı mikrosatellitlerdir. Genetik çeşitliliğin nedeni bu bölgelerin DNA'nın diğer nötr bölgelerine oranla daha yüksek mutasyon oranına sahip olmaları olarak bilinmektedir (Schlotterer 2000). Mikrosatellitler; basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats, SSR) ya da kısa ard arda tekrarlar (Short Tandem Repeats, STR) olarak da adlandırılmaktadır (Charlesworth ve ark 1994, Schlotterer 2000). Mikrosatellit belirteçlerin belirli bir tür içerisinde polimorfik olmaları ve bireyden bireye farklılık göstermeleri moleküler genetik alanında belirteç olarak kullanılmasını uygun hale getirmiştir. Ayrıca; güvenilir olmaları ve kısa zamanda sonuç alınabilmesi bu belirteçlerin moleküler genetik çalışmalarında tercih edilme nedenleri arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada aynı hayvandan tekrarlayan buparvaquone tedavilerinden sonra elde edilen farklı *T. annulata* izolatlarında populasyon çeşitliliği açısından farklılık olup olmadığının saptanması ve klonal *T. annulata* hücre kültürlerinin genetik olarak tek bir

populasyona sahip olup olmadıklarının belirlenebilmesi amacıyla mini ve mikrosatellit markerler kullanılmıştır. *T. annulata* populasyon genetiğini araştırmak amacı ile daha önceden yayınlanmış bir çalışmadaki polimorfik mini ve mikrosatellit belirteçler kullanılmıştır (Weir ve ark 2007).

2.7.1. Mini ve Mikrosatellit Belirteçler Kullanılarak *T. annulata* Hücre Kültürlerinin Populasyon Genetiğinin Belirlenmesi

Bu çalışmada daha önceden yayınlanmış toplam 9 adet moleküler mini ve mikrosatellit belirteç kullanılmıştır (Çizelge 2.8.) (Weir 2006, Weir ve ark 2007). PCR reaksiyonu 20 µl son hacimde; 13,6 µl çifte distile su, 2 µl custom PCR mix (45 mM Tris-HCl, pH 8.8; 11 mM (NH₄)SO₄; 4,5mM MgCl₂; 0,113mg/ml BSA; 4.4Mm EDTA; her bir dATP, dCTP, dGTP, dTTP'dan 1,0 mM) (Thermo, UK), 0,2 µl 1 U Ampli *Taq* DNA polimeraz (Applied Biosystems, USA), 100 µM floresan işaretli ileri yönlü primerden 0.2 µl, 10 µM geri yönlü primerlerden ve hedef DNA örneğinden ikişer µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR Techne TC-512 marka thermal sikluslu makinada; 94°C'de 2dk. başlangıç denatürasyon aşaması ve bunu takip eden 30 siklus (94°C'de 50 saniye denatürasyon, 55-60°C'de 50 saniye bağlanma, 65°C'de 1 dakika uzatma aşamaları) çoğaltma dönemi ile 65°C'de 5 dakikalık final uzatma aşamasından oluşmaktadır. Primer çiftlerinin farklı olan bağlanma ısıları çizelge 2.7.'de belirtilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri 10 µg/ml etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jelde bir saat boyunca 100 voltluk sabit akımda elektroforeze tabi tutulmuştur. Bunu takiben jel ultraviyole ışık altında (UV transluminatör) incelenmiştir. PCR sırasında floresan işaretli ileri yönlü primer kullanılarak izolatlardan elde edilen PCR ürünlerinden ikişer µl alınarak 96 kuyucuklu plaklara konulmuş, plakların üzeri özel silikon kapaklarla kapatılmıştır. Örneklerin yüksek çözünürlüklü genotiplendirmesi kapillar esaslı sekans analizi (ABI 3100 Genetic Analyser) ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örnekler Dundee Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, DNA sekans analizi servisine gönderilmiştir (DNA Sequencing and Services College of Life Sciences, University of Dundee, Scotland). DNA parça büyüklüklerini belirlemede 1 bp değişikliğine izin veren ROX-işaretli uzunluk belirleyici standart (ROX-labelled size standards) kullanılmış ve sonuçlar Genescan™ bilgisayar programı ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.8. *T. annulata* populasyonlarını belirlemek için kullanılan moleküler mini ve mikrosatellit belirteçler ve primerlerin bağlanma dereceleri

Marker kodu	Tekrarlayan sekans bölgesi	<i>T. annulata</i> size range (bp)	PCR primerleri 5'-3'	Bağlanma ısısı (°C)
TS5	GGTTCA	240 - 318	F ctggaacatgaattactgttctcc R ggacaccaatgagtgacgtgacag	60
TS6	TAATTATAGG	301 - 466	F catccttgacctactgattgtac R cggtagtaccagttaactgtc	60
TS8	TATTATTTAATG	195 - 356	F taaacgattaaaatcaagt R attggaaatggtgaaataatgag	55
TS9	ATT	338 - 386	F aatgtgtggtacaacatcac R gatatggaatcatactagaagttg	58
TS12	AATACT	237 - 376	F gatgatagaggaattgatatgac R ggaaatcacacaattaagattc	55
TS15	AAGATACTAATGGAAGATTAAGTA	164 - 404	F gtacgtaacttggaaatggtag R gatacaacgttacggagtcagttgg	60
TS16	TAA	345 - 439	F ccaatgtcaacagtatgatg R gagtaagaagtaccactactg	56
TS20	ATTATTACTA	187 - 310	F ccttcattgatctacatctgatgc R ggctgaatgggtacctgttc	60
TS25	ATTATACTATACTATT	209 - 296	F cgccatcagtagtcatctcag R gacgaccataactgggaagtcaac	60

2.8. Klonal *T. annulata* Hücre Kültürlerinin Sitokrom b Gen Sekans Analizinin Yapılması

MTT sonuçlarına göre buparvaquone'a karşı farklı fenotipik karakter gösteren, farklı bölgelerden toplanmış altı *T. annulata* izolatı (A9/BT, A10/AT3, A16/AT1 ve A21/AT4, G3/BT ve N3/BT) seçilerek sitokrom b geninin sekans analizi yapılmış ve nokta mutasyonları açısından değerlendirilmiştir.

Theileria annulata sitokrom b genine spesifik primer çifti kullanılarak çoğaltılan PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde 2.5.1.'de belirtildiği şekilde elektroforeze tabi tutularak, ultraviyole ışık altında görüntülenmiş ve 1089 bp'lık ürünler jelden kesilerek Qiagen Gel purifikasyon kiti (QIAGEN, Almanya) ile purifiye edilmişlerdir. Bu amaçla jelden kesilen bantlar tartılarak, belirlenen ağırlığın üç katı kadar QG solüsyonu eklenmiş ve 50°C'de 10 dk. boyunca inkübe edilerek jelin erimesi sağlanmıştır. Daha sonra erimiş jeli içeren sıvı pipetle alınarak içinde jelden ayrılan DNA'nın bağlanmasını sağlayan kolonlar (QIAquick spin column) bulunan 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konularak bir dakika boyunca 13000 rpm'de (yaklaşık 17.900 x g) santrifüj edilmiştir. Kit kullanımı sırasında yapılan bütün santrifüj işlemlerinde aynı devir kullanılmıştır. Uygulanan santrifüj işlemi ile jelden ayrılan DNA'nın koluma bağlanması sağlanmıştır. Bunu takiben koluma bağlı olan DNA, 500 µl QG solüsyonu eklenerek santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra 750 µl PE solüsyonu eklenerek bir dakika santrifüj edilmiş, bunu takiben bir dakikalık ikinci santrifüj işlemi uygulanarak kolona bağlı kalabilme ihtimali olan solüsyon artıklarından arındırılmıştır. Son aşamada kolona bağlı DNA'nın elde edilebilmesi için 50 µl Elüsyon solüsyonu (TE; Tris-EDTA, pH 7) eklenerek bir dakika boyunca oda ısısında bekletilmiş ve kolon temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne konularak bir dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra bir dakika santrifüj edilerek DNA'nın mikrosantrifüjde toplanması sağlanmıştır.

Jelden kesilerek ayrılan ve purifiye edilen PCR ürünleri sekans analizi için TOPO TA Klonlama Kiti (Invitrogen™) kullanılarak PCR4-TOPO plasmid vektörü (Invitrogen™) içine klonlanmıştır. Bu amaçla, temiz bir mikrosantrifüj tüpü içine 4 µl purifiye edilmiş PCR ürünü, 1 µl tuz solüsyonu ve 1 µl PCR4-TOPO plasmid vektör eklenerek oda ısısında (22-23°C'de) 5 dk. inkübe edilmiştir. Vektöre klonlanan ürün Transforming One Shot® TOP10 kimyasal olarak yeterli hale getirilmiş *E. coli* hücreleri (Invitrogen™) içine transforme edilmiştir. Bu amaçla, *E. coli* hücreleri -80°C'den buz üstüne alınarak eritilmiş ve üzerine 2 µl klonlama reaksiyonundan elde edilen ürün eklenmiştir. Daha sonra 30 dakika boyunca buz üzerinde

inkübe edilen ürünlere 42°C'lik su banyosu içinde 30 saniye boyunca sıcak şoku uygulanarak *E. coli* hücrelerinin yüzey geçirgenliği artırılmış ve vektörün hücre içine girişi sağlanmıştır. Sıcak şokunu takiben hücrelerin üzerine 250 µl S.O.C medyumumu (%2 Tripton, %0.5 Maya Ekstarktı, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoz) eklenerek 37°C'lik çalkalamalı inkübatör içinde 200 rpm'de, bir saat boyunca tüpler yatay konumda olacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, önceden petrilere hazırlanan ve içerisinde 100 µg/ml ampisilin bulunan LB agar (LB agar; 1 litresinde 100 mg NaCl, %10 Triptone, %5 Maya ekstraktı, %10 agar bulunan solüsyon) üzerine 20 ve 50 µl olacak şekilde ekilerek gece boyu kolonilerin üremesi için 37°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün üreyen kolonilerden bazıları seçilerek içerisinde 100 µg/ml ampisilin bulunan LB medyum (LB medyum; 1 litresinde 100 mg NaCl, %10 Triptone, %5 Maya ekstraktı bulunan solüsyon) içinde 37°C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece çoğalmaya bırakılmıştır. Çoğaltılan kolonilerden QIAGEN Plazmid DNA Ekstraksiyon Kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak içinde PCR ile çoğaltılan gen bölgesi bulunan plazmidlerin pürifikasyonu yapılmıştır. Kısaca, 10 ml medyum +4°C'de, 8000 rpm'de (yaklaşık 10.000 x g) 3 dk. boyunca santrifüj edilerek *E. coli* hücreleri dipte toplanmıştır. Bu hücreler 250 µl P1 solüsyonu ile tekrar sulandırılarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, daha sonra bu sulandırmanın üstüne 250 µl P2 solüsyonu eklenerek iyice karıştırılmıştır. Bu karışımın üstüne 350 µl N3 solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve 13000 rpm'de (yaklaşık 17.500 x g) 10 dk boyunca santrifüj edilmişlerdir. Kit protokolünde bu aşamadan sonra uygulanan bütün santrifüj işlemlerinde aynı devir kullanılmıştır. Santrifüj işleminden sonra supernatant alınarak DNA'nın bağlanmasını sağlayan kolonlara (QIAprep spin column) konulmuştur. Kolon 30–60 sn. boyunca santrifüj edilmiş ve dipte toplanan sıvı döküldükten sonra 0.5 ml PB solüsyonu eklenerek, santrifüj işlemi tekrar edilmiştir. Daha sonra 0.75 ml PE solüsyonu ilave edilip, 30–60 sn. santrifüj edilmiştir. Dipte toplanan sıvı döküldükten sonra kolonda kalmış olan tüm yıkama solüsyonunun giderilmesi için bir dk. daha santrifüj işlemi yapılmıştır. Son aşamada kolona bağlı DNA'nın elde edilebilmesi için 50 µl Elüsyon solüsyonu eklenerek bir dk. boyunca oda ısısında bekletilmiş ve takiben kolon temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne konularak, santrifüj ile purifiye edilen DNA'nın tüpe geçmesi sağlanmıştır. Plasmid DNA'nın bir µg'ı EcoR1 restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve kesilen ürünlerin boylarına bakılarak klonlama işlemi test edilmiştir. Elde edilen plazmid DNA örnekleri (1–2 µg) 37°C'de bir gece boyunca kapakları açık olarak bekletilerek DNA'nın kuruması

sağlanmış ve bu örnekler sekans analizlerinin yapılması için ticari bir şirkete gönderilmiştir (Eurofins MWG Operon, Londra).

2.9. Sitokrom b Geninde Saptanan Mutasyonları Belirlemek İçin Allel Spesifik PCR Metodunun Geliştirilmesi

Bilinen nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılan AS-PCR metodunda klasik PCR'dan farklı olarak mutasyona özgü amplifikasyon yapılarak mutant alleller saptanmaktadır. Bu amaçla allel spesifik belirteçler kullanılmaktadır. AS-PCR iki farklı tepkimeden oluşmaktadır. Birinci tepkime, normal DNA dizisine özgül primeri içerirerek yalnızca normal DNA dizilimini amplifiye ederken, ikinci tepkime mutanta özgül primer içerir ve normal DNA'yı amplifiye edemezken mutant DNA'nın amplifiye edilmesine olanak vermektedir. Homozigot normal bir bireyde yalnızca normal tepkimede PCR ürünü oluştururken heterozigot her iki tepkimede, homozigot mutant birey ise yalnızca mutant tepkimede PCR ürünü oluşturmaktadır (Koizumi ve ark 2005).

2.9.1. Allel Spesifik PCR İçin Mutasyonlara Özel Primerlerin Tasarlanması ve Değerlendirilmesi

Yapılan sekans analizlerinde bazı *T. annulata* izolatlarında parazitin sitokrom b geni üzerinde yer alan ilacın muhtemel bağlanma bölgesinde iki farklı mutasyon saptanmış ve bu mutasyonları allel spesifik PCR (AS-PCR) ile tespit edebilmek amacı ile bu mutasyonlara özel primerler Clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılarak tasarlanmıştır. Primerler tasarlanırken nokta mutasyon daha önce belirtildiği şekilde (Papp ve ark 2003, Koizumi ve ark 2005, Hoti 2009, Wang 2010) ileri yönlü primerlerin 3' ucuna gelecek şekilde ayarlanmıştır. Bu doğrultuda ilacın birinci muhtemel bağlanma bölgesinde saptanan V135A mutasyonu için iki ileri F1R 5'-GCT TCT GGG GAG CTA CAG C-3', F1S 5'-GCT TCT GGG GAG CTA CAG T-3' ve bir geri yönlü primer R1 5'-CCA TAA CCA GAT TGC ACT CCA-3' dizayn edilmiştir. İlacın muhtemel ikinci bağlanma bölgesinde saptanan P253S mutasyonu için de iki ileri yönlü F2R 5'-CGA TAT TAT CTG ATC CTT TAA ACA CTT-3', F2S 5'-CGA TAT TAT CTG ATC CTT TAA ACA CTC-3' ve R2 5'-CAA CAT GAA CAA CCA TCT TTC C-3' bir geri yönlü primer tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler PCR'da 20 µl'lik son hacimde; 11,8 µl çifte distile su, 2 µl custom PCR mix (45 mM Tris-HCl, pH 8.8; 11 mM (NH₄)SO₄; 4,5mM MgCl₂; 0,113mg/ml BSA; 4.4Mm EDTA; her bir dATP, dCTP, dGTP,dTTP'dan 1,0 mM) (Thermo, UK), 0,2 µl 1 U Ampli Taq DNA polimeraz (Applied

Biosystems, USA), 10 µM ileri ve geri yönlü primerden 2 µl ve hedef DNA (20ng/µl) örneğinden ikişer µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon Techne TC-512 marka otomatik termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Seçilen primer çiftlerine en uygun bağlanma ısılarının belirlenmesi amacıyla derece derece değişen (gradient) PCR'u uygulanmıştır. Dereceli PCR'u her siklusun bağlanma ısısında 55°C'de 10°C'lik derecelendirme yapılmak kaydıyla reaksiyon 94°C'de 3 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her siklus denatürasyon (95°C'de 1 dk.), bağlanma (55-65°C'de 1 dk.) ve uzama (72°C'de 1 dk. 20 sn.) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri 4°C'de tutulmuştur. Daha sonra her PCR ürününden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid bulunan %1,5'lik agaroz jelde 100 voltluk akımda 45 dakika elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenerek birinci primer grubu için 62,5°C ikinci grup içinse 61°C'lik bağlanma ısıları en uygun olarak belirlenmiştir.

2.9.2. Allel Spesifik PCR Spesifite ve Sensitivitesinin Değerlendirilmesi

Testin sensitivitesi farklı DNA dilüsyonları kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla 20 ng/µl derişimindeki mutant olan sitokrom b genomu (R), normal sitokrom b genomu (S) ile R/S; 1/10, 1/20, 1/50 ve 1/100 oranında dilüye edilerek nokta mutasyonun hangi derişime kadar AS-PCR ile tespit edilebileceği belirlenmiştir.

AS-PCR spesifite ölçümü sensitivite ölçümüne benzer olarak DNA dilüsyonları kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla farklı mutasyonları ihtiva eden iki farklı mutant sitokrom b genomu (R1 ve R2) 20ng/ µl derişiminde ayarlanarak birbiri içerisinde dilüye edilmiştir. Spesifite ölçümü yapılacak olan primerlerin saptadığı mutant DNA azalan diğer mutant DNA örneğinin içerisinde, R1/R2; 1/10, 1/20, 1/50 ve 1/100 oranında dilüye edilerek AS-PCR metoduyla mutasyonun hangi derişime kadar tespit edilebileceği belirlenmiştir. AS-PCR sensitivite ve spesifite ölçümleri yukarıda belirtilen şekilde her mutasyonu saptamak için dizayn edilen primerler için yapılmıştır.

2.9.3. Allel Spesifik PCR ile test edilen parazit materyali

Buparvaquone direnciyle ilişkili olarak saptanan mutasyonların sahadaki yaygınlığı AS-PCR yöntemiyle test edilmiştir. Bu amaçla, çalışmada toplam 168 adet *T. annulata* pozitif kan örneği ve 127 adet *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte hücre kültürü kullanılmıştır.

Mutasyonların yaygınlığı ile ilgili istatistik değerlendirme, çapraz tablolar oluşturulup Ki-Kare ve Fisher exact test analizi ile yapılmıştır. İstatistik önemlilik eşik düzeyi olarak 0,05 değeri kullanılmış ve hesaplamalarda IBM-SPSS 20.0 paket programından yararlanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. MTT test sonuçları

3.1.1. MTT ile test edilen hücre kültürleri

Bu çalışmada toplam 127 adet *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte lenfosit hücre kültürü izolatu kullanılmıştır. Bu izolatlar hastalık sezonunda akut hastalık semptomu gösteren hayvanlardan buparvaquone tedavisi öncesinde ve/veya sonrasında izole edilmiştir. Tedavi süresince takip edilebilen hasta hayvanlardan tekrarlayan buparvaquone tedavileri sonrasında da kan örnekleri alınarak *T. annulata* izolatları elde edilmeye çalışılmıştır. Test edilen 127 hücre kültürü izolatının 78 adeti 2010-2012 yılları arasında (Çizelge 3.1., 3.2. ve 3.3.) hastalık sezonunda toplanan kan örneklerinden izole edilmiştir. 49 adet *T. annulata* makroşizontları ile enfekte lenfosit hücre kültürü ise 1998-2007 yılları arasında Parazitoloji Anabilim Dalında yürütülen diğer çalışmalar sırasında elde edilmiştir. 49 adet *T. annulata* makroşizontları ile enfekte lenfosit hücre kültürü de çalışmada (Çizelge 3.4.) kullanılmıştır. Toplamda 84 adet izolat buparvaquone tedavisi öncesinde elde edilirken 30 adet izolat buparvaquone enjeksiyonları sonrasında izole edilmiştir. Farklı 13 hasta hayvandan elde edilen *T. annulata* izolatları ise aynı hayvanlardan tekrarlayan buparvaquone enjeksiyonları sonrasında ve/veya tedavi öncesinde elde edilmiştir. Belirtilen izolatların toplam 102 adedi Akçaova Beldesi'nden elde edilirken, 25 adet izolat Aydın'ın diğer beldelerinden izole edilmiştir (Çizelge 2.6). Çalışmada kullanılan tüm izolatlar MTT yöntemiyle test edilerek IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve bu değerler izolata ait bilgilerle beraber çizelge 3.1., 3.2., 3.3. ve 3.4.' de verilmiştir.

Theileria annulata izolatlarının kodlaması yapılırken öncelikle izole edildiği hayvana ait kod kullanılmış sonrasında izolatın tedavi öncesinde veya kaçınıcı buparvaquone tedavisi sonrasında alındığına dair kodlama yapılmıştır. Tedavi öncesi alınan örnekleri belirtmek amacı ile BT (Before Treatment), tedavi sonrasında belirtmek amacı ile de AT (After Treatment) ibaresi kullanılmıştır. İzolatın kaçınıcı buparvaquone enjeksiyonu sonrasında alındığı AT kodlamasını takiben rakam ile belirtilmiştir. Örneğin; A10/BT kodu izolatın A10 kodlu hayvandan tedavi öncesinde alındığını gösterirken, A10/AT3 kodu izolatın A10 kodlu hayvandan 3'üncü buparvaquone enjeksiyonu sonrasında alındığını ifade etmektedir.

Çizelge 3.1. 2010 yılında elde edilen *T. annulata* izolatları ve IC₅₀ değerleri. İzolat kodu verilirken başlangıçta örneğin elde edildiği hayvan kodu verilmiş (A21, A100 vb), sonrasında örneğin alındığı dönemdeki hayvanın tedavi durumu belirtilmiştir (BT: tedavi öncesi, AT: tedavi sonrası, AT ifadesinden sonra gelen rakam örneğin kaçınıcı tedavi sonrasında alındığını belirtmektedir).

	İzolat Kodu	Tedavi	IC ₅₀ (ng/ml)
1	A21/AT1	1. Tedavi Sonrası	16.75
	A21/AT3	3. Tedavi Sonrası	25.53
	A21/AT4	4. Tedavi Sonrası	73.79
2	A100/BT	Tedavi Öncesi	2.16
	A100/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.51
3	A101/BT	Tedavi Öncesi	2.07
	A101/AT2	2. Tedavi Sonrası	1.50
4	A102/BT	Tedavi Öncesi	3.52
5	A103/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.57

Çizelge 3.2. 2011 yılında elde edilen *T. annulata* izolatları ve IC₅₀ değerleri

	İzolat Kodu	Tedavi	IC ₅₀ (ng/ml)		İzolat Kodu	Tedavi	IC ₅₀ (ng/ml)		İzolat Kodu	Tedavi	IC ₅₀ (ng/ml)
1	A104/BT	Tedavi Öncesi	7.18	16	A120/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.18	31	135/BT	Tedavi Öncesi	0.85
	A104/AT1	1. Tedavi Sonrası	11.21								
	A104/AT2	2. Tedavi Sonrası	13.10								
	A104/AT3	3. Tedavi Sonrası	20.23								
2	A106/BT	Tedavi Öncesi	2.58	17	A121/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.05	32	A136/BT	Tedavi Öncesi	2.02
3	A107/BT	Tedavi Öncesi	1.15	18	A122/AT1	1. Tedavi Sonrası	9.66	33	A137/BT	Tedavi Öncesi	0.52
					A122/AT2	2. Tedavi Sonrası	10.70				
4	A108/BT	Tedavi Öncesi	1.34	19	A123/BT	Tedavi Öncesi	3.87	34	A138/BT	Tedavi Öncesi	0.73
5	A109/BT	Tedavi Öncesi	5.56	20	A124/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.34	35	A139/BT	Tedavi Öncesi	1.02
	A109/AT2	2. Tedavi Sonrası	1.55								
6	A110/AT3	3. Tedavi Sonrası	5.56	21	A125/BT	Tedavi Öncesi	2.91	36	A143/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.31
7	A111/BT	Tedavi Öncesi	1.83	22	A126/BT	Tedavi Öncesi	1.34	37	A144/BT	Tedavi Öncesi	0.85
8	A112/BT	Tedavi Öncesi	1.28	23	A127/BT	Tedavi Öncesi	1.15	38	A145/AT2	2. Tedavi Sonrası	1.67
9	A113/BT	Tedavi Öncesi	3.19	24	A128/BT	Tedavi Öncesi	0.69	39	A148/AT4	4. Tedavi Sonrası	6.20
10	A114/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.34	25	A129/BT	Tedavi Öncesi	1.67	40	A149/BT	Tedavi Öncesi	1.50
11	A115/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.17	26	A130/BT	Tedavi Öncesi	1.54	41	A150/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.97
	A115/AT2	2. Tedavi Sonrası	6.36								
12	A116/AT2	2. Tedavi Sonrası	5.02	27	A131/BT	Tedavi Öncesi	0.34	42	A151/AT1	1. Tedavi Sonrası	6.36
13	A117/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.16	28	A132/AT2	2. Tedavi Sonrası	3.21	43	A152/BT	Tedavi Öncesi	1.69
					A133/BT	Tedavi Öncesi	1.86				
14	A118/BT	Tedavi Öncesi	5.02	29	A134/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.28	44	A153/BT	Tedavi Öncesi	0.92
15	A119/BT	Tedavi Öncesi	2.27	30				45	A154/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.15

Çizelge 3.3. 2012 yılında elde edilen *T. annulata* izolatları ve IC₅₀ değerleri

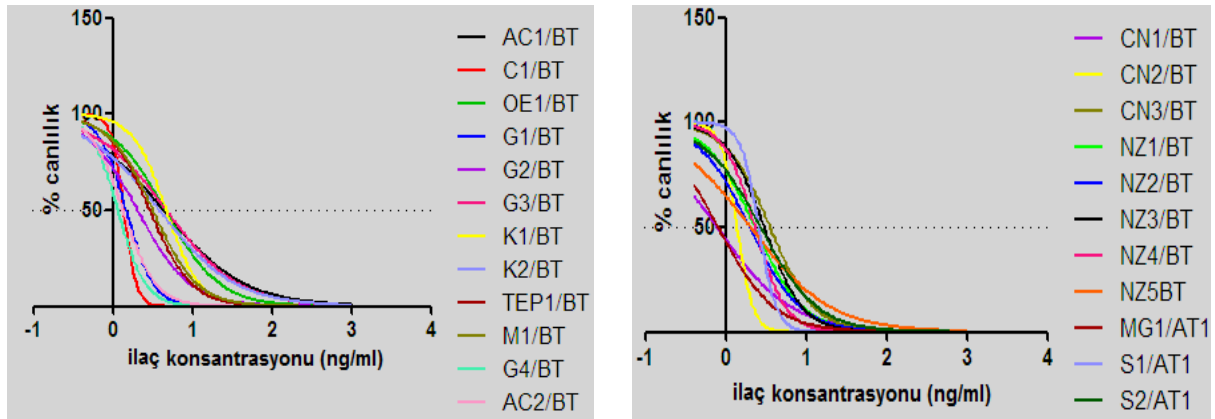
	İzolat Kodu	Tedavi	IC50 değerleri		İzolat Kodu	Tedavi	IC50 değerleri
1	A155/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.11	15	A170/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.21
2	A156/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.16	16	A171/BT	Tedavi Öncesi	0.76
	A156/AT2	2. Tedavi Sonrası	3.52				
	A156/AT3	3. Tedavi Sonrası	4.73				
3	A157/BT	Tedavi Öncesi	1.55	17	A172/BT	Tedavi Öncesi	0.79
4	A158/BT	Tedavi Öncesi	0.89	18	A173/BT	Tedavi Öncesi	0.24
5	A159/BT	Tedavi Öncesi	0.69	19	A174/BT	Tedavi Öncesi	2.27
6	A160/BT	Tedavi Öncesi	1.67	20	A175/BT	Tedavi Öncesi	2.0
7	A161/BT	Tedavi Öncesi	1.57	21	A176/BT	Tedavi Öncesi	3.21
8	A162/BT	Tedavi Öncesi	1.34	22	A177/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.97
					A177/AT1	2. Tedavi Sonrası	6.36
9	A163/BT	Tedavi Öncesi	1.96	23	A178/BT	Tedavi Öncesi	2.63
10	A164/BT	Tedavi Öncesi	0.88	24	A179/BT	Tedavi Öncesi	2.16
					A179/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.97
11	A166/BT	Tedavi Öncesi	2.57	25	A180/BT,	Tedavi Öncesi	1.47
					A180/AT2	2. Tedavi Sonrası	7.48
12	A167/BT	Tedavi Öncesi	2.09	26	A181/BT	Tedavi Öncesi	1.95
13	A168/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.27	27	G4/BT	Tedavi Öncesi	1.57
	A168/AT3	3. Tedavi Sonrası	4.59				
14	A169/BT	Tedavi Öncesi	0.68	28	AC2/BT	Tedavi Öncesi	1.34

Çizelge 3.4. 1998-2007 yıllarında elde edilen *T. annulata* izolatları ve IC₅₀ değerleri

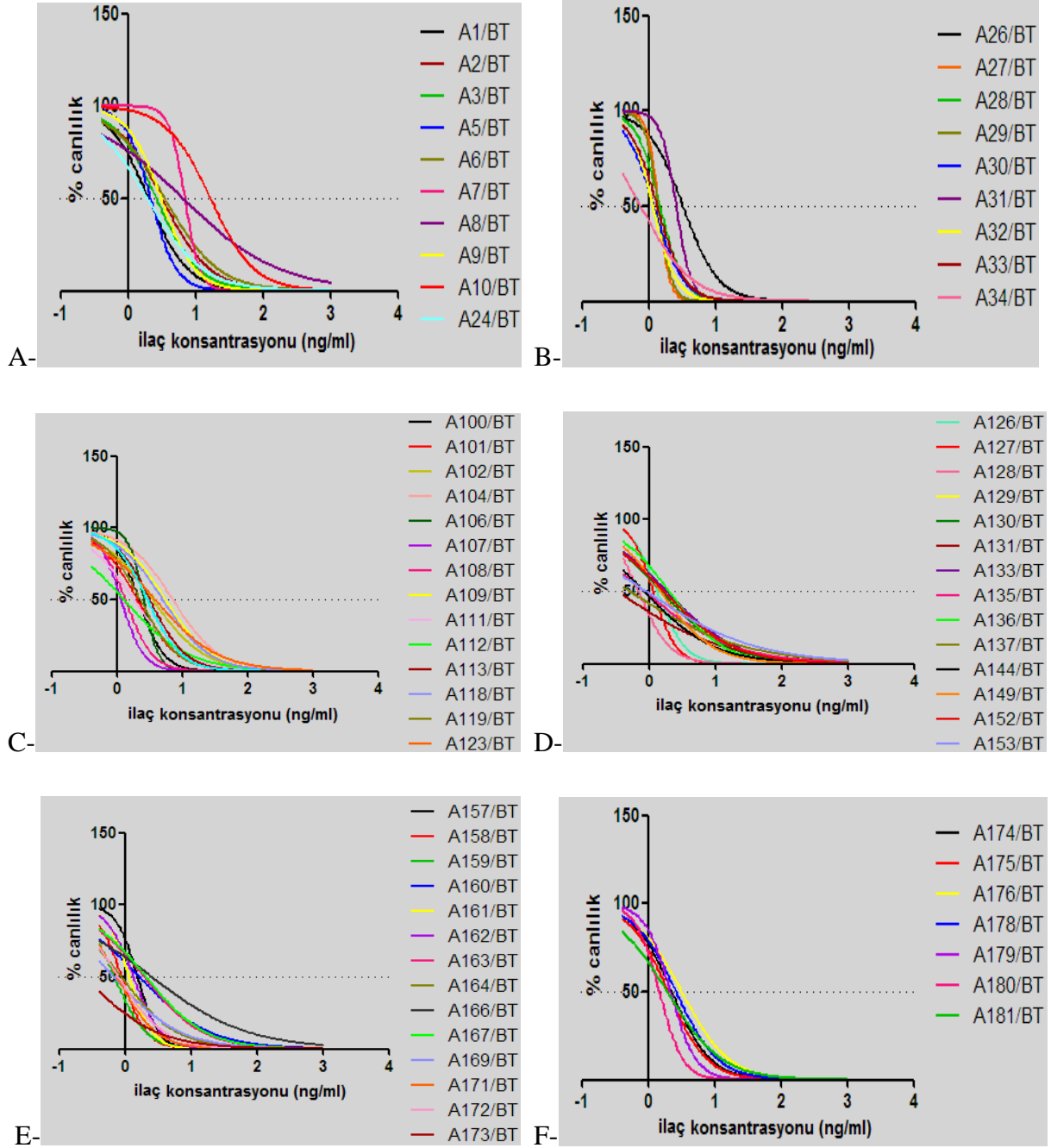
	İzolat Kodu	Tedavi	IC ₅₀ değerleri		İzolat Kodu	Tedavi	IC ₅₀ değerleri
1	A1/BT	Tedavi Öncesi	2.0	26	A32/BT	Tedavi Öncesi	1.15
2	A2/BT	Tedavi Öncesi	3.20	27	A33/BT	Tedavi Öncesi	1.34
3	A3/BT	Tedavi Öncesi	2.63	28	A34/BT	Tedavi Öncesi	0.76
4	A5/BT	Tedavi Öncesi	2.16	29	AC1/BT	Tedavi Öncesi	4.36
5	A6/BT	Tedavi Öncesi	3.52	30	C1/BT	Tedavi Öncesi	1.37
6	A7/BT	Tedavi Öncesi	6.95	31	OE1/BT	Tedavi Öncesi	4.59
7	A8/BT	Tedavi Öncesi	6.59	32	G1/BT	Tedavi Öncesi	1.46
8	A9/BT	Tedavi Öncesi	3.11	33	G2/BT	Tedavi Öncesi	2.05
9	A10/BT	Tedavi Öncesi	16.75	34	G3/BT	Tedavi Öncesi	4.73
	A10/AT3	3. Tedavi Sonrası	135.0				
10	A11/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.83	35	K1/BT	Tedavi Öncesi	4.69
11	A12/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.96	36	K2/BT	Tedavi Öncesi	3.87
12	A13/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.83	37	TEP1/BT	Tedavi Öncesi	2.91
13	A14/AT2	2. Tedavi Sonrası	2.62	38	M1/BT	Tedavi Öncesi	3.19
14	A15/AT3	3. Tedavi Sonrası	0.63	39	CN1/BT	Tedavi Öncesi	0.78
15	A16/AT1	1. Tedavi Sonrası	5.56	40	CN2/BT	Tedavi Öncesi	1.39
16	A17/AT1	1. Tedavi Sonrası	5.0	41	CN3/BT	Tedavi Öncesi	3.56
17	A18/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.63	42	NZ1/BT	Tedavi Öncesi	2.31
18	A24/BT	Tedavi Öncesi	1.95	43	NZ2/BT	Tedavi Öncesi	1.98
19	A25/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.46	44	NZ3/BT	Tedavi Öncesi	3.01
20	A26/BT	Tedavi Öncesi	3.27	45	NZ4/BT	Tedavi Öncesi	2.31
21	A27/BT	Tedavi Öncesi	1.40	46	NZ5/BT	Tedavi Öncesi	2.04
22	A28/BT	Tedavi Öncesi	1.47	47	MG1/AT1	1. Tedavi Sonrası	0.80
23	A29/BT	Tedavi Öncesi	1.39	48	S1/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.57
24	A30/BT	Tedavi Öncesi	1.19	49	S2/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.71
25	A31/BT	Tedavi Öncesi	2.58				

3.1.2. *Theileria annulata* İzolatlarının Buparvaquone Baskısı Altında Gösterdikleri Fenotiplerin Belirlenmesi

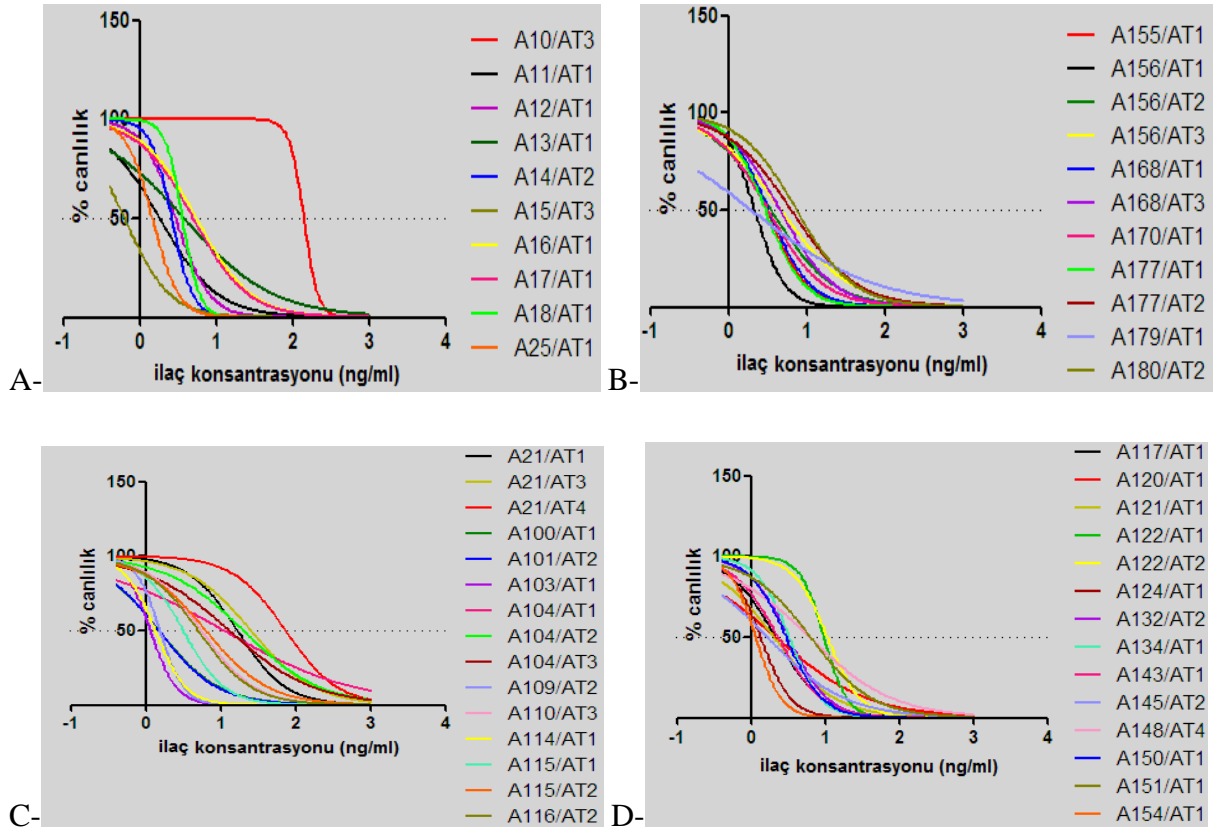
MTT kolorimetrik test sonuçlarına göre *T. annulata* izolatlarının buparvaquone baskısı altında farklı fenotipik karakterler gösterdiği belirlenmiştir. Bazı izolatların çok düşük ilaç konsantrasyonlarında ($0,8\text{ng/ml}>$) parazit popülasyonlarındaki canlılığı yitirdiği ve buparvaquone'a karşı fenotipik olarak duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu duruma karşın farklı bazı *T. annulata* izolatlarının ise yüksek ilaç konsantrasyonlarına ($7\text{ng/ml}<$) rağmen mevcut parazit canlılığını korumaya devam ettiği belirlenmiştir. Bu durum bu izolatların fenotipik olarak buparvaquone baskısı altında farklı karakterlere sahip olduğunun bir göstergesi olmuştur. MTT ile belirlenen farklı ilaç dilüsyonlarındaki parazit canlılık oranları grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 3.1.-3.3.) Test edilen *T. annulata* izolatları Akçaova Beldesi'nden ve diğer beldelerden (Şekil 3.1.) toplananlar olarak ikiye ayrılmış, Akçaova Beldesi'nden olan örnekler ise tedavi öncesi (Şekil 3.2.) ve tedavi sonrasında alınanlar (Şekil 3.3.) olarak gruplandırılmıştır.



Şekil 3.1. Aydın İli'nin farklı Belde'lerinden elde edilen *T. annulata* izolatlarının MTT canlılık grafikleri. İlaç konsantrasyonu (ng/ml) (X eksen) → 1-0 arası; 0-0,8 ng/ml, 0-1 arası; 0,8-7 ng/ml, 1-2 arası; 7-125 ng/ml, 2-3 arası; 125-1000 ng/ml.



Şekil 3.2. Akçaova Belde'sinden tedavisi öncesi elde edilen *T. annulata* izolatlarının MTT canlılık grafikleri. A ve B-1998-2007, C ve D- 2010-2011, E ve F- 2012 yıllarında izole edilen hücre kültürleri. İlaç konsantrasyonu (ng/ml) (X eksen) → 1-0 arası; 0-0,8 ng/ml, 0-1arası; 0,8-7 ng/ml, 1-2arası; 7-125 ng/ml, 2-3 arası; 125-1000 ng/ml.



Şekil 3.3. Akçaova Belde'sinden tedavisi sonrasında elde edilen *T. annulata* izolatlarının MTT canlılık grafikleri. A-1998-2007, B- 2012, C ve D- 2010-2011 yıllarında izole edilen hücre kültürleri. İlaç konsantrasyonu (ng/ml) (X eksen) → 1-0 arası; 0-0,8 ng/ml, 0-1arası; 0,8-7 ng/ml, 1-2arası; 7-125 ng/ml, 2-3 arası; 125-1000 ng/ml.

Theileria annulata izolatlarının hangi buparvaquone konsantrasyonunda ilacın etkisinden kurtularak canlılığını devam ettirebildiğinin belirlenmesi ve izolatlar arasında ilaca karşı direncin daha net ortaya konulabilmesi amacıyla izolatların IC₅₀ (maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu) değerleri hesaplanmış ve izolatlarla ilgili IC₅₀ değerleri çizelge 3.1., 3.2., 3.3. ve 3.4.'te sunulmuştur.

Genel olarak *T. annulata* izolatlarının yaklaşık 1 ng/ml dozunda ilacın etkisinden kurtuldukları belirlenmiş IC₅₀ değerleri 2-3 ng/ml olarak saptanmıştır. Buna karşın Akçaova'daki hasta bir hayvandan üçüncü buparvaquone enjeksiyonu sonrasında elde edilen A10/AT3 kodlu izolatın 135 ng/ml gibi çok yüksek buparvaquone konsantrasyonlarında dahi üremeye devam ederek canlılığını koruduğu tespit edilmiş ve belirtilen izolatın IC₅₀ değeri 135 ng/ml olarak hesaplanmıştır. Bu izolata benzer olarak yine Akçaova'dan buparvaquone

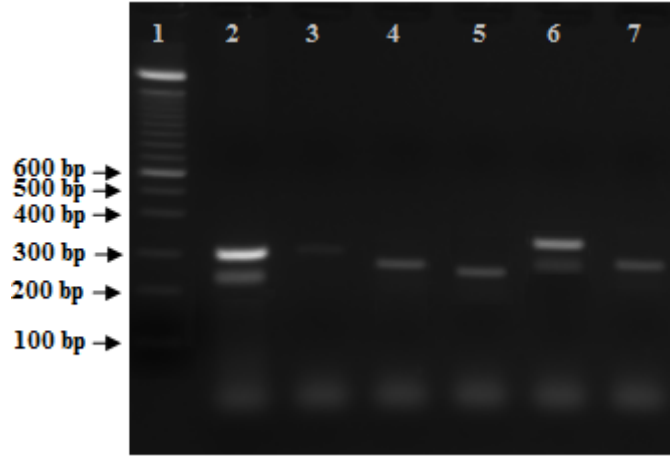
tedavisi sonrasında elde edilmiş iki izolatın IC₅₀ değerlerinin (A21/AT4-IC₅₀;73.79 ve A104/AT3-IC₅₀; 20.23) diğer izotlara oranla çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuçların doğruluğu onaylamak amacıyla MTT testi bölüm 2.3.'de ayrıntılı olarak belirtildiği şekilde üç kez tekrar edilmiş ve tüm test sonuçlarının ortalaması alınarak izolatların IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değerlerindeki bu farklılık bazı parazit populasyonlarının buparvaquone etkisine karşı daha dayanıklı olduğunu veya ilaç etkisinden şu anda bilinmeyen her hangi bir mekanizma nedeniyle kurtulduğunu göstermektedir.

3.2. *Theileria annulata* izolatlarında tekrarlayan buparvaquone tedavilerinin parazit populasyonları üzerine etkisinin belirlenmesi

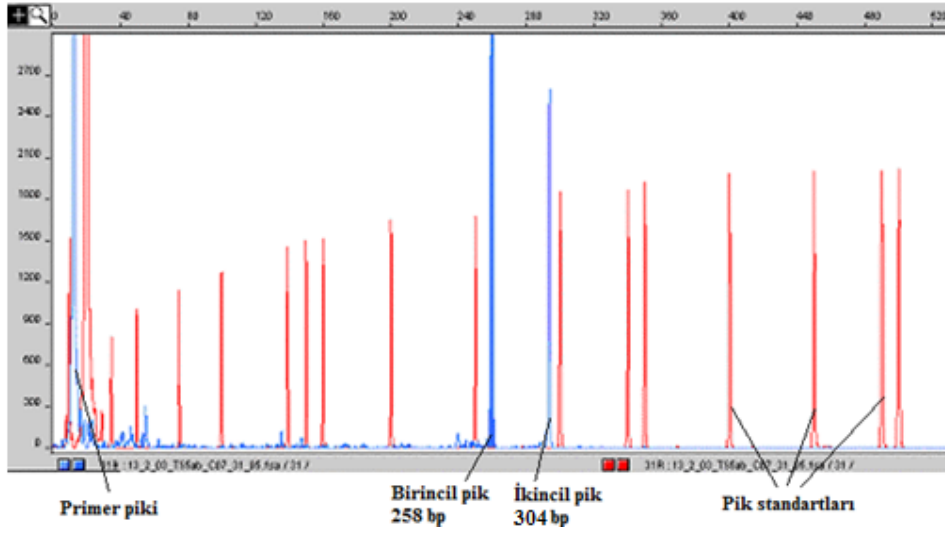
Sekans analizi için seçilen *T. annulata* izolatlarının miks parazit populasyonlarına sahip olup olmadığının belirlenmesi ve hasta hayvanlara uygulanan buparvaquone tedavilerinin parazit populasyonunda bir değişime neden olup olmadığını belirlemek amacı ile daha önceden *T. annulata*'ya spesifik olduğu tespit edilmiş toplam dokuz mikro ve mini satellit işaretleyiciler kullanılmıştır (Weir 2006).

Sahadaki hayvanlardan elde edilen *T. annulata* izolatlarında farklı genotip özelliklere sahip farklı parazit populasyonları bir arada bulunabilmekte ve bu durum yapılan gen sekans analizlerinde farklı sonuçların gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle sekans analizine gönderilecek olan izolatların miks populasyon ihtiva etmesi halinde 2.6.'da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte lenfosit hücre kültürleri klonlanmıştır. Daha sonrasında seçilen klonal hücre kültürlerinin populasyon genetiğine bakılarak gerçek klon (tek parazit populasyonundan üreyen) olup olmadıkları tespit edilmiştir ve tek populasyona sahip klonal hücre kültürlerinden bazıları sekans analizine gönderilmek için belirlenmiştir.

Populasyon genetiği çalışmalarından örnek bir agaroz jel görüntüsü şekil 3.4.'de ve GenescanTM analizi grafik örneği şekil 3.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. TS12 markeri kullanılarak yapılan genotiplendirme agaroz jel görüntüsü. 1. 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Invitrogen), 2. A21/AT1, 3. A21/AT4, 4. A16/AT1, 5. A9/BT, 6. A10/BT ve 7. A10/AT3.



Şekil 3.5. Genescan™ analiz grafik örneği. *T. annulata* A21/AT1 izolatın TS12 markeri ile yapılan analiz sonucu.

Mini ve makro satellit markerler kullanılarak yapılan popülasyon genetik analiz sonuçlarına göre sekans analizi için seçilen ana hücre kültürlerinden sadece bir tanesinin (A10/AT3) klonal hücre kültürü gibi genetik açıdan tek bir parazit popülasyonu ihtiva ettiği saptanmış, diğer izolatların ise miks popülasyonlara sahip oldukları belirlenmiştir. Belirtilen izolatların ihtiva ettiği parazit popülasyonları çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Sekans analizi için belirlenen *T. annulata* izolatlarında parazit populasyon çeşitliliği.

İzolat Kodu	TS5						TS 6						TS 8						TS9					
	248	255	261	266	271	332	355	360	383	396	419	430	228	237	259	271	285	300	309	357	359	363	368	384
A9/BT		83%		17%						85%	15%						34%		66%			100%		
A10/AT3					100%				100%								100%				100%			
A16/AT1	10%			90%				100%								100%						100%		
A21/AT4				81%	19%					100%					100%								100%	
G3/BT				100%				66%					34%		63%					37%		100%		
N3/BT		100%				100%							100%									10%	90%	

İzolat Kodu	TS 12					TS15					Ts16					TS20			TS25								
	264	281	290	304	323	188	213	238	285	333	345	349	352	356	366	220	223	223	228	231	237	218	222	230	233	240	243
A9/BT	10%							60%		40%	78%		22%							100%							100%
A10/AT3					100%	100%						100%											100%				
A16/AT1			100%							100%				100%	100%												100%
A21/AT4				100%			100%						100%			100%							17%		83%		
G3/BT							100%						100%								83%	13%		4%	54%		39%
N3/BT		100%								100%			100%								100%						100%

Buparvaquone'un hasta hayvandaki mevcut parazit populasyonları üzerine olan etkisi A10/BT ve AT3 ve A21/AT1, AT3 ve AT4 kodlu izolatların populasyon genetik analizleriyle belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına (Çizelge 3.6.) göre A10/BT miks populasyona sahipken aynı hayvandan üçüncü tedavi sonrasında izole edilen A10/AT3 izolatının tek bir parazit populasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Farklı bir hayvandan (A21 kodlu) tedavi süresince tekrarlayan buparvaquone enjeksiyonları sonrasında elde edilen izolatlarda ilerleyen buparvaquone tedavileri ile parazit populasyonunda azalma olduğu saptanmıştır. Örneğin TS8 makeri kullanılarak yapılan analizde 1. buparvaquone enjeksiyonu sonrasında altı, üçüncü enjeksiyon sonrasında iki ve dördüncü tedavi sonrasında bir tane parazit populasyonunun canlılığını koruduğu belirlenmiş ve parazit populasyon sayısındaki azalma Çizelge 3.7.'da gösterilmiştir. Elde edilen bu bulgular artan buparvaquone tedavileriyle ters orantılı olarak parazit populasyon çeşitliliğinde azalma görüldüğünü göstermiştir.

Çizelge 3.6. A10 ve A21 kodlu hayvanlardan elde edilen izolatlarda tedavi öncesi ve sonrasında *T.annulata* parazit popülasyonundaki değişim

İzolot Kodu	TS5						TS6					TS8						TS9				
	243	248	255	261	266	271	377	383	396	430	454	259	273	276	279	285	300	321	359	367	368	384
A10/BT.		43%				57%		45%		55%						100%			68%		32%	
A10/AT3.					100%		100%									100%			100%			
A21/AT1.	12%	9%	26%	20%	15%	18%	31%	12%	37%	20%		26%	13%	13%	9%	19%		20%		45%	55%	
A21/AT3.					63%	37%			100%			88%					12%			15%	85%	
A21/AT4.					81%	19%			100%			100%										100%

İzolot Kodu	TS12				TS15			TS16	TS20		TS25							
	258	278	304	323	188	213	238	262	349	352	223	231	244	215	218	222	230	233
A10/BT.		29%		71%	47%			53%	100%			79%	21%		31%		69%	
A10/AT3.				100%	100%				100%			100%					100%	
A21/AT1.	55%		45%			43%	57%			100%	100%			19%	33%	33%		15%
A21/AT3.	39%		61%			100%				100%	100%					21%		79%
A21/AT4.			100%			100%				100%	100%					17%		83%

Çizelge 3.7. Tekrarlayan buparvaquone tedavilerinden sonra *T.annulata*'nın popülasyon sayısındaki değişim

İzolot Kodu	TS5	TS6	TS8	TS9	TS12	TS15	TS16	TS20	TS25
A10/BT	2	2	1	2	2	2	1	2	2
A10/AT3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A21/AT1	6	4	6	2	2	2	1	1	4
A21/AT3	2	1	2	2	2	1	1	1	2
A21/AT4	2	1	1	1	1	1	1	1	2

3.2.1. Tekrarlayan Tedavilerden Sonra Elde Edilen İzolatların Fenotiplerinin Belirlenmesi

MTT testi kullanılarak saha şartlarında theileriosis pozitif hasta hayvanlara uygulanan rutin buparvaquone tedavisinin hasta hayvanlarda bulunan, mevcut *T. annulata* popülasyonlarının üzerine etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla hastalık döneminde yakalanan bazı theileriosis pozitif hayvanlardan tedavi öncesinde ve/veya tedavi sırasında takip eden buparvaquone enjeksiyonları sonrasında toplanan kan örneklerinden elde edilen

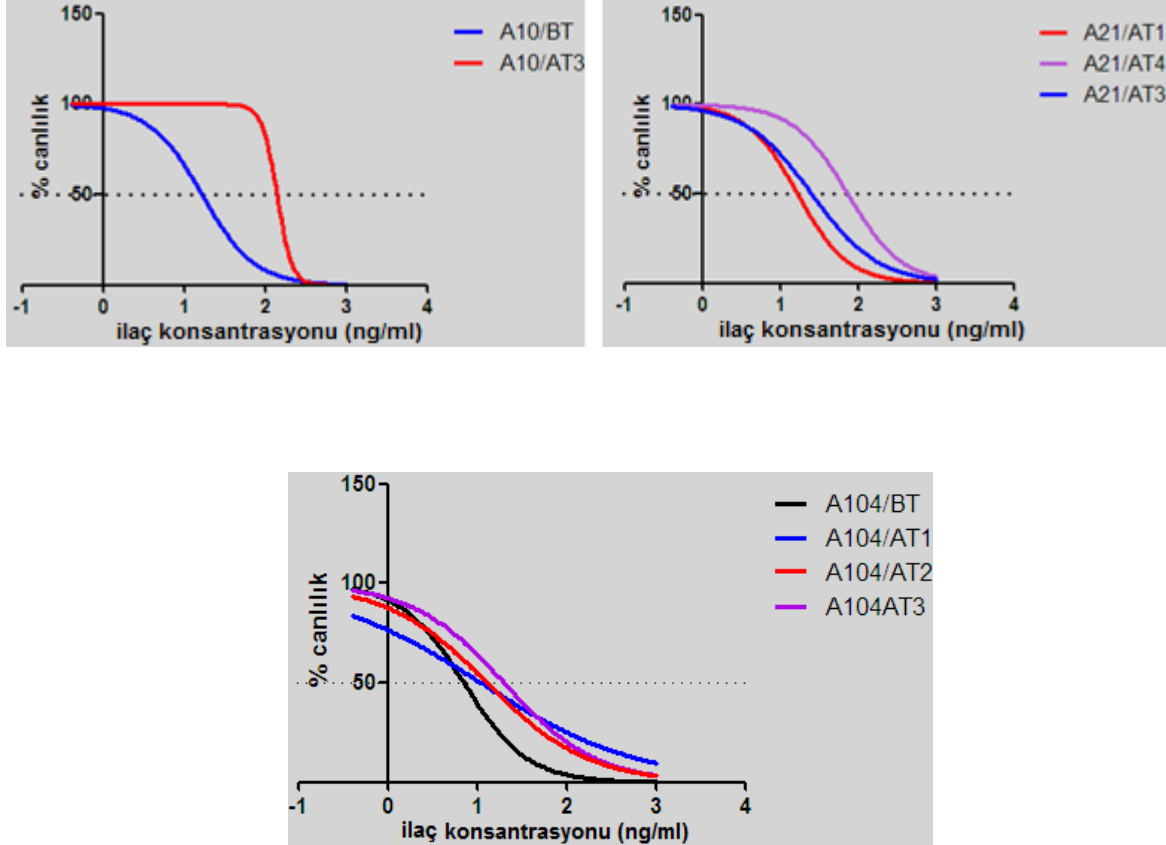
T.annulata izolatları MTT kolorimetrik yöntemiyle test edilmiş ve izolatların IC₅₀ değerleri hesaplanarak fenotipik karakter açısından buparvaquone etkisine karşı gösterdikleri farklılıkları değerlendirilmiştir. (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.8. Tekrarlayan buparvaquone tedavilerinin *T. annulata* izolatları IC₅₀ değerleri üzerine etkileri

	İzolat Kodu	Tedavi	IC ₅₀ değerleri		İzolat Kodu	Tedavi	IC ₅₀ değerleri
1	A10/BT	Tedavi Öncesi	16.75	8	A122/AT1	1. Tedavi Sonrası	9.66
	A10/AT3	3. Tedavi Sonrası	135.0		A122/AT2	2. Tedavi Sonrası	10.70
2	A21/AT1	1. Tedavi Sonrası	16.75	9	A156/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.16
	A21/AT3	3. Tedavi Sonrası	25.53		A156/AT2	2. Tedavi Sonrası	3.52
	A21/AT4	4. Tedavi Sonrası	73.79		A156/AT3	3. Tedavi Sonrası	4.73
3	A100/BT	Tedavi Öncesi	2.16	10	A168/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.27
	A100/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.51		A168/AT3	3. Tedavi Sonrası	4.59
4	A101/BT	Tedavi Öncesi	2.07	11	A177/AT1	1. Tedavi Sonrası	2.97
	A101/AT2	2. Tedavi Sonrası	1.50		A177/AT1	2. Tedavi Sonrası	6.36
5	A104/BT	Tedavi Öncesi	7.18	12			
	A104/AT1	1. Tedavi Sonrası	11.21		A179/BT	Tedavi Öncesi	2.16
	A104/AT2	2. Tedavi Sonrası	20.23		A179/AT1	1. Tedavi Sonrası	1.97
	A104/AT3	3. Tedavi Sonrası	13.10				
6	A109/BT	Tedavi Öncesi	5.56	13	A180/BT,	Tedavi Öncesi	1.47
	A109/AT2	2. Tedavi Sonrası	1.55		A180/AT2	2. Tedavi Sonrası	7.48
7	A115/AT1	1. Tedavi Sonrası	3.17				
	A115/AT2	2. Tedavi Sonrası	6.36				

Tekrarlayan tedavilerden sonra elde edilen izolatlar arasında A10, A21 ve A104 kodlu hayvanlardan theileriosis tedavisi sırasında elde edilen üç izolatın diğer izolatlarla karşılaştırıldığında yüksek IC₅₀ değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu izolatların diğerlerinden farklı olarak tekrar eden buparvaquone tedavileriyle birlikte ilaca karşı fenotipik karakterlerinde önemli değişiklikler meydana geldiği görülmüştür. A10 kodlu hayvandan tedavi öncesi (A10/BT) ve üçüncü buparvaquone enjeksiyonu sonrasında (A10/AT3) elde edilen iki izolatın IC₅₀ değerleri sırasıyla 16,75 ng/ml ve 135 ng/ml olarak hesaplanmıştır. A21 kodlu hayvandan ise birinci, üçüncü ve dördüncü buparvaquone tedavilerinden sonra *T. annulata* izolatları elde edilmiş IC₅₀ değerlerinin birinci tedavi sonrası 16.75 ng/ml, ikinci tedavi sonrası 25.53 ng/ml, üçüncü tedavi sonrası 73.79 ng/ml olduğu saptanmıştır. Yukarıda belirtilen bulgulara ek olarak A104 kodlu hayvandan tedavi öncesi, birinci, ikinci ve üçüncü

buparvaquone enjeksiyonları sonrasında kan örnekleri alınarak *T. annulata* izolatları hazırlanmış ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 7.18, 11.21, 20.23 ve 13.10 ng/ml olarak belirlenmiştir. Belirtilen izolatların MTT test sonuçları Şekil 3.6.'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda yukarıda belirtilen hayvanlardan izole edilen örneklerde tekrarlayan tedavilerle doğru orantılı olarak IC₅₀ değerlerinde fark edilebilir düzeyde bir artış olduğu belirlenmiştir.

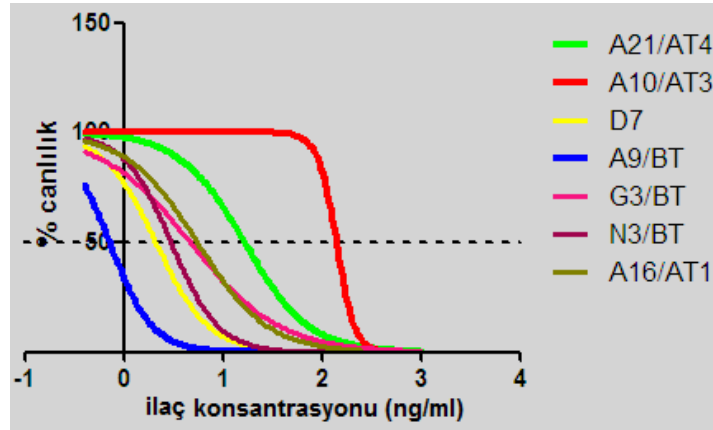


Şekil 3.6. A10, A21 ve A104 kodlu hayvanlardan elde edilen izolatların IC₅₀ grafikleri. (BT: buparvaquone ile tedaviden önce elde edilen hücre kültürü; AT: buparvaquone ile tedaviden sonra elde edilen hücre kültürü). İlaç konsantrasyonu (ng/ml) (X eksen) → 1-0 arası; 0-0,8 ng/ml, 0-1 arası; 0,8-7 ng/ml, 1-2 arası; 7-125 ng/ml, 2-3 arası; 125-1000 ng/ml.

3.3. *Theileria annulata* izolatlarının sitokrom b geninin sekans analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

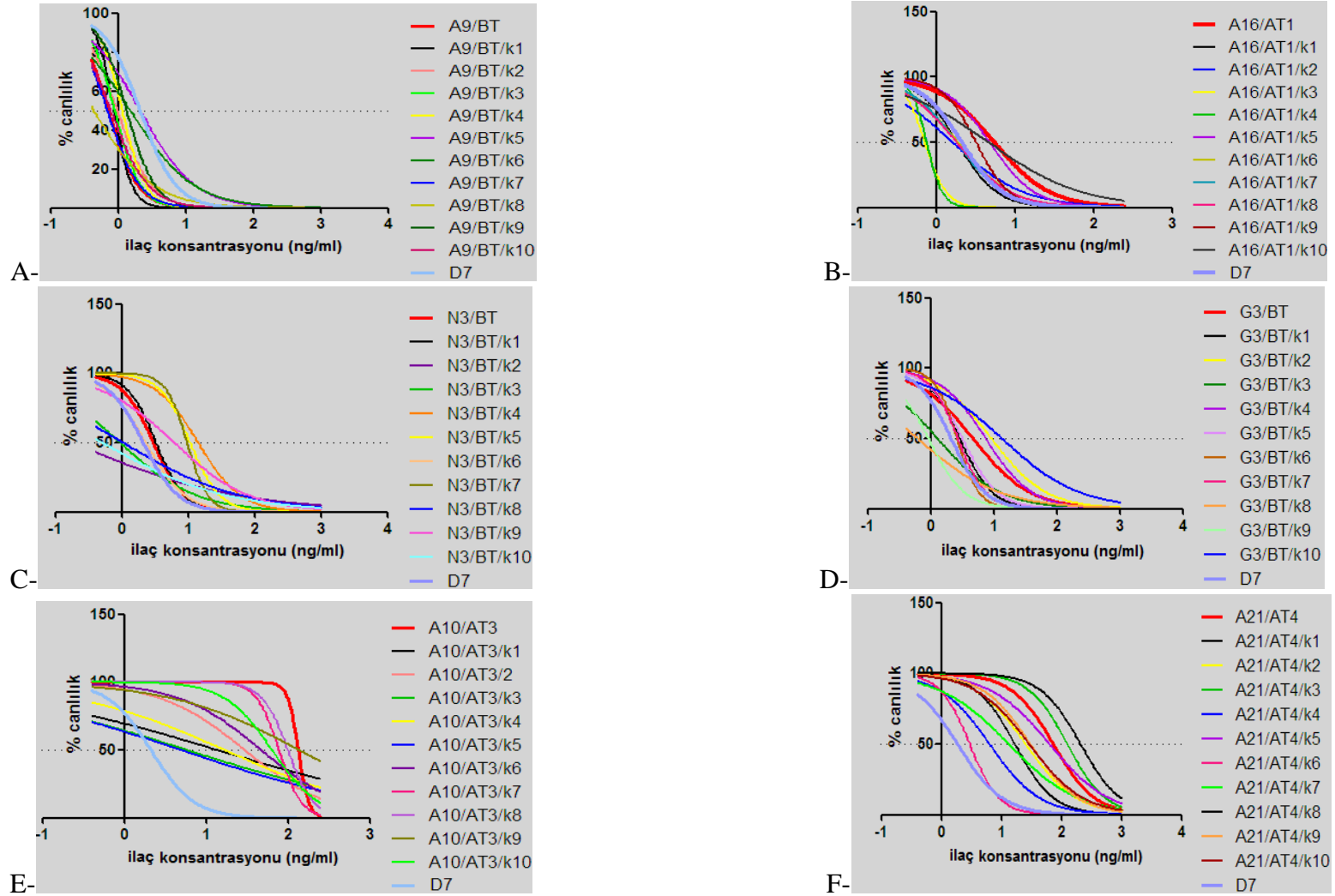
3.3.1. Sekans analizinde kullanılan *T. annulata* izolatları

Saha şartlarındaki hasta hayvanlardan elde edilen *T.annulata* izolatları farklı *T. annulata* popülasyonlarını barındırmaktadır. Bu farklı parazit popülasyonlarının fenotipik ve genotipik açıdan incelenebilmesi amacıyla farklı bölgelerden farklı MTT test sonuçlarına göre buparvaquone'a karşı değişik düzeyde direnç gösteren altı izolat 2.6.2.'de belirtildiği şekilde klonlanmıştır. Bu amaçla Akçaova bölgesinden toplanmış ve buparvaquone baskısı altında farklı oranlarda direnç gösteren dört *T.annulata* izolatı (A9/BT, A10/AT3, A16/AT1 ve A21/AT4) kullanılmıştır. Ek olarak MTT testi ile buparvaquone etkisine karşı duyarlı olduğu saptanan Germencik ve Nazilli ilçelerinden toplanmış farklı iki izolat (sırasıyla G3/BT ve N3/BT) da sitokrom b geninin mutasyonlar yönünden incelenmesi için seçilmiştir. Belirtilen hücre kültürlerinin MTT sonuçları Şekil 3.7.'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Akçaova (A9/BT, A10/AT3, A16/AT1 ve A21/AT4) Beldesi, Nazilli (N3/BT) ve Germencik (G3/BT) ilçelerinden klonlama için seçilen *T. annulata* izolatlarının MTT grafiği. İlaç konsantrasyonu (ng/ml) (X eksen) → 1-0 arası; 0-0,8 ng/ml, 0-1 arası; 0,8-7 ng/ml, 1-2 arası; 7-125 ng/ml, 2-3 arası; 125-1000 ng/ml.

Yukarıda belirtilen altı izolatın her birine ait 10 adet klonal hücre kültürleri seçilerek MTT testleri yapılmış ve buparvaquone baskısı altında gösterdikleri fenotipik farklılıkları belirlenerek (Şekil 3.8) IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.9.). Sekans analizinde buparvaquone direnciyle ilgili olabilecek olası mutasyonları saptayabilme ihtimalini arttırabilmek amacıyla yukarıda belirtilen izolatların klonlarından en yüksek IC₅₀ değerini veren ikişer klonları seçilerek sekans analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.8. Sekans analizi için seçilen *T. annulata* izolatları ve klonlarının MTT grafikleri. A-A9/BT, B-A16/AT1, C-N3/BT, D-G3/BT, E-A10/AT3 ve F- A21/AT4. İlaç konsantrasyonu (ng/ml) (X eksenini) → 1-0 arası; 0-0,8 ng/ml, 0-1arası; 0,8-7 ng/ml, 1-2arası; 7-125 ng/ml, 2-3 arası; 125-1000 ng/ml.

Çizelge 3.9. A9/BT, A10/AT3, A16/AT1, A21/AT4, G3/BT ve N3/BT kodlu izolatlara ait klonal hücre kültürlerinin IC₅₀ değerleri. Yıldız (*) ile işaretlenmiş olan klonal hücre kültürleri sekans analizi için seçilmiştir.

Klon no	IC ₅₀ Değerleri (ng/ml)					
	A9/BT (0.72 ng/ml)	A10/AT3 (135 ng/ml)	A16/AT1 (5.56 ng/ml)	A21/AT4 (73.79 ng/ml)	G3/BT (4.73 ng/ml)	N3/BT (3.15 ng/ml)
1	0.86	13.89	1.85	16.75	2.89	3.28
2	0.91	29.78	1.61	25.53	9.21 *	0.18
3	0.89	25.94	0.71	125.70 *	1.28	0.95
4	1.15	16.99	0.75	6.36	7.48	14.19 *
5	2.12 *	4.97	4.76	63.72	3.19	10.70 *
6	1.67 *	47.37	1.90	2.97	2.61	2.31
7	0.69	77.74	1.80	13.33	2.69	9.66
8	0.50	99.85 *	1.81	209.1 *	0.62	1.05
9	1.34	137.7 *	3.21 *	30.66	0.92	6.20
10	0.78	63.95	4.66 *	29.14	13,61 *	0.51

3.3.2. *Theileria annulata* sitokrom b geninde muhtemel buparvaquone bağlanma bölgelerinin belirlenmesi

Bu çalışmada *T. annulata*'nın sitokrom b geni üzerinde buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgelerinin saptanması amacıyla UniProtKB veri tabanı kullanılarak; *T. annulata* (Q4UJ67), *Plasmodium falciparum* (Q02768), *P. yoelii* (Q7PDA7), *P. berghei* (O99253), *T. gondii* (O20672) ve *S. cerevisiae*'nin (P00163) sitokrom b geni protein dizilimleri elde edilmiştir. Belirtilen protein dizilimleri Clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılarak ilaç direnci çalışmalarında model olarak kullanılan *S. cerevisiae* mayasının sitokrom b geni üzerinde yer alan atovaquone bağlanma bölgeleri protein dizilimleriyle karşılaştırılmış ve *T. annulata* sitokrom b geni üzerinde muhtemel buparvaquone bağlanma bölgeleri belirlenmiştir (Şekil 3.9.).

<i>S.cerevisiae</i>	127	TAF	LG	YCC	VY	GQ	MS	H	WG	AT	V	I	T	N	L	F	S	A	I	P	155	251	L	G	H	P	D	N	Y	I	P	G	N	P	L	V	T	P	A	S	I	V	P	E	W	Y	L	L	P	F	Y	A	I	L	R	S	I	P	286																	
<i>P.falciparum</i>	121	TAF	V	G	Y	V	L	P	W	G	Q	M	S	Y	W	G	A	T	V	I	T	N	L	L	S	S	I	P	149	240	L	S	H	P	D	N	A	I	V	V	N	T	Y	V	T	P	S	Q	I	V	P	E	W	Y	F	L	P	F	Y	A	M	L	K	T	V	P	S	K	P	A	G	L	V	I	V	284
<i>P.yoelii</i>	121	TAF	I	G	Y	V	L	P	W	G	Q	M	S	Y	W	G	A	T	V	I	T	N	L	L	S	G	I	P	149	240	L	S	H	P	D	N	A	I	V	N	T	Y	V	T	P	L	Q	I	V	P	E	W	Y	F	L	P	F	Y	A	M	L	K	T	I	P	275										
<i>P.berghei</i>	121	TAF	I	G	Y	V	L	P	W	G	Q	M	S	Y	W	G	A	T	V	I	T	N	L	L	S	G	I	P	149	240	L	S	H	P	D	N	A	I	V	N	T	Y	V	T	P	L	Q	I	V	P	E	W	Y	F	L	P	F	Y	A	M	L	K	T	I	P	S	K	N	A	G	L	V	I	V	284	
<i>T.gondii</i>	126	TAF	L	G	Y	V	L	P	W	G	Q	M	S	F	W	G	A	T	V	I	T	N	L	L	S	P	I	P	154	245	L	S	H	P	D	N	S	I	P	V	N	R	F	V	T	P	L	H	I	V	P	E	W	Y	F	L	A	Y	A	V	L	K	V	I	P	280										
<i>T.annulata</i>	116	TAF	V	G	Y	V	L	P	D	G	Q	M	S	F	W	G	A	T	V	I	G	L	L	K	F	F	G	144	238	Q	A	D	P	N	S	I	L	S	D	P	L	N	T	P	A	H	I	I	P	E	W	Y	L	L	L	F	Y	A	T	L	K	V	F	P	T	K	V	A	G	L	L	A	M	282		

Şekil 3.9. *T. annulata* sitokrom b geni protein dizilimi üzerinde buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgeleri *S. cerevisiae* protein dizilimiyle *P. falciparum*, *P. yoelii*, *P. berghei*, *T. gondii* ve *T. annulata*'nın protein dizilimlerinin ortak noktaları sarı renk ile işaretlenmiştir.

3.3.3. Sekans Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

MTT test sonuçlarına göre (bkz. 3.3.1.) seçilen klonal hücre kültürleri sitokrom b genindeki mutasyonlar yönünden sekans analizi ile incelenmiştir. *T. annulata* sitokrom b geni (Genbank no; XM949625) PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmış, hedef DNA bölgesinin dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla PCR ürünleri ticari bir şirkete (Eurofins MWG Operon, Londra) gönderilmiştir. Daha sonra dizilim analiz sonuçları Clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılarak NCBI veri tabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kayıtlı olan *T. annulata* sitokrom b gen dizilimiyle karşılaştırılmış ve izolatlar arasındaki polimorfik bölgeler tespit edilmiştir. Ayrıca saptanan mutasyonların amino asit diziliminde bir değişikliğe neden olup olmadığı da yukarıda belirtilen bilgisayar programı kullanılarak belirlenmiştir.

Elde edilen sekans sonuçlarına göre parazit sitokrom b geni üzerinde saptanan mutasyonların yaygınlığı hakkında fikir edinebilmek amacı ile sekans analizi yapılan örneklerle ek olarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı tarafından daha önceden üçü Aydın (Aydın merkez, Akçaova ve Dalama) olmak üzere ikisi farklı bölgelerden (*T. annulata* Ankara/Pendik ve Diyarbakır) toplanarak sitokrom b gen sekans analizi yapılan beş *T. annulata* izolatu da çalışmaya dahil edilmiştir.

Yapılan sekans analizleri sonucunda sitokrom b geni üzerinde toplam 12 adet nokta mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonlardan 6 tanesinin sinonim (amino asit diziliminde değişikliğe neden olmayan kodon nükleotid değişimi) olduğu saptanırken diğerlerinin non-sinonim (amino asit diziliminde değişikliğe neden olan kodon nükleotid değişimi) mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Dizilim analizi yapılan klonların ve çalışmaya dahil edilen beş farklı izolatu sitokrom b nükleotid ve amino asit dizilimleri saptanan mutasyonlar ile birlikte sırasıyla Şekil 3.10. ve 3.11.'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

	943	960	980	1000	1020	1040	1060	1089
<i>T. annulata</i>	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
G3/BT/k2	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
G3/BT/k10	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
N3/BT/k4	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
A9/BT/k5	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
A9/BT/k6	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
A10/AT3	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
A10/BT/k1	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
A10/BT/k7	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
A16/AT1/k9	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
A21/AT4/k3	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
Dalama	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
Diyarbakır	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
A. ova	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
Aydın	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						
Pendik	AGTGTACCATTAGTACCAGTTTTATTTATGTTAGGTTCTATAGGAAAGATGGTTGTTTCATGTTGATCTCATAGC	TATTGGAACCTTGTGTTGTTGTCAGTTGTTCTATTTATTTATAAAATTTATTGGACTCTGCAAGAGTTCGTGCA						

Şekil 3.10. Sitokrom b geninin nükleotid dizilim sonuçları. İzolatlar arasında belirlenen sinonim mutasyonlar yeşil, nonsinonim mutasyonlar kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

	Qo2 domain												
	238	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	363
<i>T. annulata</i>	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
G3/BT/k16	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
G3/BT/k4	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
N3/BT/k4	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
N3/BT/k5	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A9/BT/k5	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A9/BT/k6	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A10/AT3/k8	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A10/AT3/k9	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A10/BT/k1	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A10/BT/k7	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A16/AT1/k9	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A16/AT1/k10	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A21/AT4/k3	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A21/AT4/k8	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
Dalama	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
Diyarbakır	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
A. ova	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
Aydın	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						
Pendik	QADPDNSILSDPLNT	AHIIPEWYLLLFYATLKVFP	TKVAGLLAMAGMLELLVLL	VESRYFKQTVSAMNYHRV	WTTSSVPLVPVLFMLGS	IGKMVVHVDLI	IGTCVVLSVVLFIYKLLDSARVRA						

Şekil 3.11. *T. annulata* sitokrom b geni amino asit dizilimi sekans analizi yapılan örneklerle karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Non- sinonim altı mutasyon kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

Sekans analizinde kullanılan toplam 11 izolatin (G3, N3, A9, A10, A16, A21, Akçaova, Dalama, Pendik, Diyarbakır ve Aydın) sitokrom b geninde nükleotid dizilimine göre 234'üncü, 348'inci, 417'inci, 429'uncu, 576'ıncı ve 870'inci pozisyonlarda sinonim mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlardan farklı olarak 151'inci, 404'üncü, 436'ıncı, 679'uncu, 757'inci ve 1016'ıncı pozisyonlarda nonsinonim mutasyonlar belirlenmiştir. Amino asit diziliminde değişime neden olan non sinonim mutasyonlar amino asit diziliminde yukarıda belirtilen pozisyonlarda sırasıyla Metiyonin'in Lösin'e (M151L), Valin'in Alanin'e (V234A), Alanin'in Treonin'e (A436T), Valin'in Treonin'e (V679T), Prolin'in Serin'e (P757S) ve Alanin'in Valin'e (A1016V) değişimine neden olmuştur. Sekans analizleri sonucunda saptanan tüm mutasyonlar ve kaç farklı izolatta belirlendikleri Çizelge 3.10.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.10. Sekans analizi yapılan *T. annulata* izolatlarında saptanan mutasyonlar

Mutasyonun saptandığı pozisyon (Nükleotid dizilimi)	Baz değişimi	Amino asit değişimi	Mutasyonun saptandığı izolat sayısı (11 izolatta)
151	A→T	Non sinonim (M→L)	2
234	G→A	Sinonim	9
348	T→C	Sinonim	8
404	T→C	Non sinonim (V→A)	1
417	A→C	Sinonim	10
429	C→T	Sinonim	9
436	G→A	Non sinonim (A→T)	8
576	A→G	Sinonim	2
679	G→A	Non sinonim (V→T)	2
757	C→T	Non sinonim (P→S)	1
870	A→G	Sinonim	10
1016	C→T	Non sinonim (A→V)	2

A10/AT3 ve A21/AT4 kodlu iki izolatin klonlarında saptanan iki farklı non-sinonim mutasyonun buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgesinde olduğu görülmüştür. Bu mutasyonların sırasıyla, 135. kodondaki Valin'in Alanin olarak (V135A) ve 253. kodondaki Prolin'in Serin olarak (P253S) değişimine neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.12.).

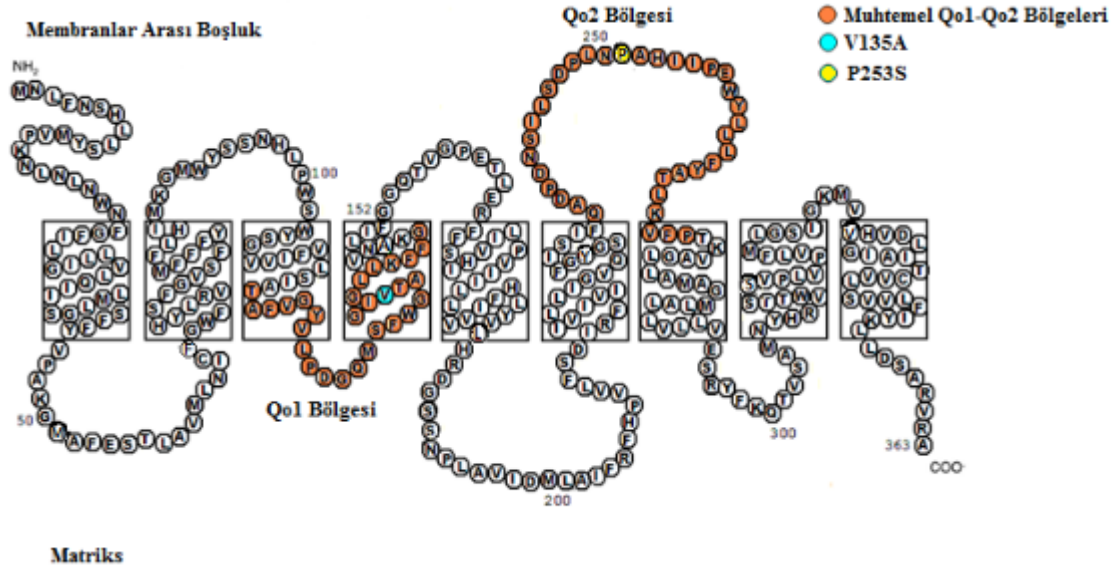
Belirlenen bu mutasyonların protein sentezini etkilemesi, muhtemel ilaç bağlanma bölgesinde yer alması ve bu izolatların MTT testiyle de fenotipik olarak dirençli olduklarının saptanması bu iki mutasyonun buparvaquone direnciyle ilgili olabileceği hipotezini desteklemektedir. Ayrıca söz konusu mutasyonlardan P253S İran’da Sharifiyazdi ve ark (2012) tarafından yapılan bir çalışmada bildirilen P233S mutasyonu ile aynı olduğu görülmüştür (Şekil 3.12.). Mutasyonların saptandığı kodon sayısındaki farklılık iki çalışmada kullanılan dizileme uzunluğunun farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

	--- Olası Qo1 bölgesi ----	----- Olası Qo2 bölgesi -----
	116 120 130 140	238 250 260 270
<i>T. annulata</i>	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
G3/BT/k2	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
G3/BT/k10	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
N3/BT/k4	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
N3/BT/k5	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
A9/BT/k5	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
A9/BT/k6	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
A10/AT3/k8	TAFVGYVLPDGMQSFWGATAIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
A10/AT3/k9	TAFVGYVLPDGMQSFWGATAIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
A16/AT1/k9	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
A16/AT1/k10	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
A21/AT4/k3	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP
A21/AT4/k8	TAFVGYVLPDGMQSFWGATVIGLLKFFG	QADPDNSILSDPLNTEAHIPEWYLLLFYATLKVFP

*

Şekil 3.12. Buparvaquone’un muhtemel bağlanma bölgelerine (Qo1 ve 2) ait amino asit dizilimi. İki non-sinonim mutasyona bağlı oluşan amino asit değişiklikleri kırmızı ile belirtilmiş ve Sharifiyazdi ve ark (2012) tarafından bildirilen mutasyon ‘*’ ile işaretlenmiştir.

Theileria annulata sitokrom b geni üzerinde yer alan Qo1 ve Qo2 bölgeleri ve bu bölgelerde saptanan V135A ve P253S mutasyonlarının parazit mitokondriyal iç membranındaki yerleşimini belirleyebilmek amacıyla TMHMM v.2.0 sunucusu (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) kullanılmıştır. Belirtilen program ile *T. annulata* sitokrom b geni tarafından kodlanan proteinlerin transmembran helikal yapısının tahmini olarak yerleşimi belirlenmiştir. Belirlenen bu yapı şekle dökülerek Qo1 ve Qo2 bölgeleri ve sekans analizi sonuçlarına göre bu bölgelerde belirlenen mutasyonlar işaretlenmiştir (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. *T. annulata* sitokrom b geni tarafından kodlanan proteinlerin transmembran helikal yapısı (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> bağlantısı kullanılarak transmembran helikal yapısı belirlenmiştir. Çizim orijinaldir). Qo1 ve Qo2 bölgeleri turuncu, V135A mutasyonu yeşil ve P253S mutasyonu sarı renk ile işaretlenmiştir.

Belirlenen altı sinonim mutasyonun protein sentezinde her hangi bir değişikliğe yol açmaması ve bu mutasyonların görülme sıklığının fazla olması bu mutasyonların polimorfik değişiklikler olabileceği görüşünü kuvvetlendirmiş, parazitte ilaca karşı oluşan dirençte birincil dereceden etkili olamayacağını düşündürmüştür.

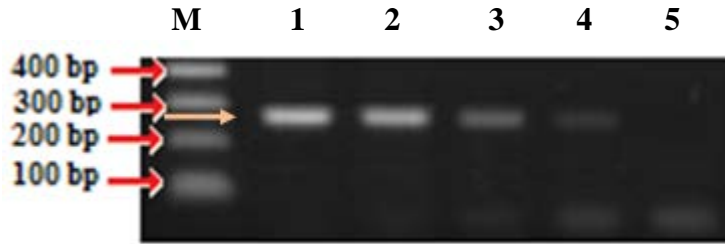
Yukarıda belirtilen iki non sinonim mutasyonun (V135A ve P253S) parazitin sitokrom b geninde ilacın bağlanma bölgesinde saptanmış olması bu mutasyonların yüksek bir oranla buparvaquone direnciyle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu mutasyonların sahada ne oranda bulunduğunu belirlemek amacıyla *T. annulata* pozitif kan örneklerinde ve *T. annulata* makroşizont hücre kültürü izolatlarında bu mutasyonların yaygınlığı AS-PCR ile araştırılmıştır (Bknz 3.4.3.2.). Geriye kalan dört non-sinonim mutasyondan nükleotid dizilimine göre 436. pozisyonda yer alan mutasyon ilacın muhtemel bağlanma bölgesinin yakınında tespit edilmiş ve dirençle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Fakat farklı bölgelerden toplanmış ve ilaç baskısı altında düşükten yükseğe farklı değerlerde IC₅₀ gösteren sekiz farklı izolata (A9/BT, A21/AT4, G3/BT, N3/BT, Akçaova, Dalama, Diyarbakır, Aydın) ait klonlarda bu mutasyonun saptanması bunun polimorfik bir değişiklik olabileceği görüşünü desteklemiştir. Nükleotid dizilimine göre 151., 679. ve 1016. Pozisyonlarda saptanan diğer non sinonim mutasyonlara; ilacın bağlanma bölgelerinin uzak kısımlarında yer aldıklarından

direnç oluşumunda birincil dereceden rol oynama oranlarının düşük olması nedeniyle bu çalışmada yer verilmemiştir.

3.4. AS-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

3.4.1. AS-PCR metodunun spesifite ve sensitivitesinin belirlenmesi

Theileria annulata sitokrom b geninde buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgesinde tespit edilen iki mutasyonun (V135A ve P253S) sahadan elde edilen kan ve hücre kültürü örneklerinde de olup olmadığını saptayabilmek amacı ile bu mutasyonlara özel primerler dizayn edilmiştir. Testin spesifite ve sensitivitesi bölüm 2.9.2.'de belirtildiği gibi ilgili klonal hücre kültürlerinden elde edilen DNA'nın sulandırılması yapılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki primerin de spesifite ve sensitivitesinin 1/50 (20 ng/50 µl = 0.4 ng/µl) DNA dilüsyonu oranında olduğu saptanmıştır. Örnek bir agaroz jel görüntüsü şekil 3.14'de verilmiştir.



Şekil 3.14. P253S mutasyonu saptamak amacıyla yapılan AS-PCR sensitivitesinin belirlenmesi. **M.** 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 1. 1/10'lük dilüsyon (20 ng/10µl); 2. 1/20'lik dilüsyon (20 ng/20 µl); 3. 1/50'lik dilüsyon (20 ng/50µl); 4. 1/100'lük dilüsyon (20 ng/100µl). 5. Negatif kontrol F2 primer çifti kullanılarak spesifik olarak çoğaltılan 276 bp'lik bölge ok işareti ile gösterilmiştir.

3.4.2. Klonal hücre kültürlerinin AS-PCR ile değerlendirilmesi

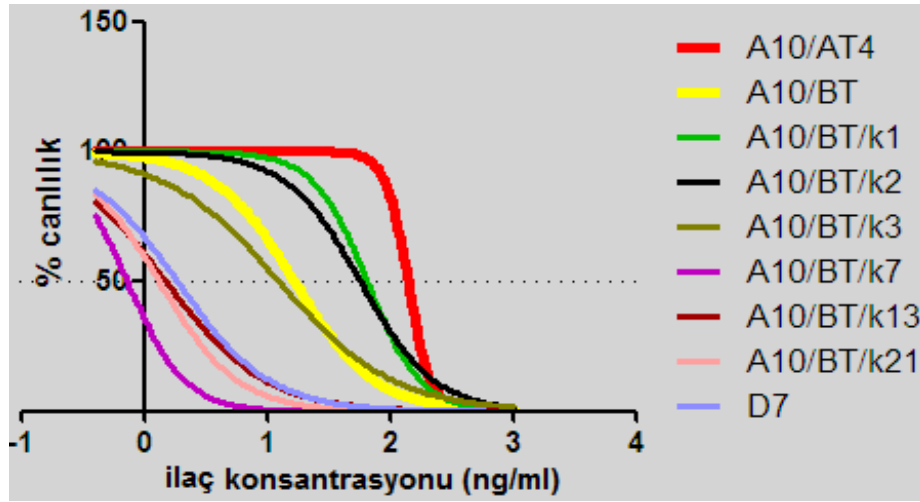
Bölüm 3.3.1.'de belirtildiği gibi sekans analizi için klonlaması yapılan altı izolatın (A9/BT, A10/AT3, A16/AT1 ve A21/AT4, G3/BT ve N3/BT) MTT testi uygulanan 10'ar klonu AS-PCR ile sekans sonuçlarında saptanan iki mutasyon (V135A ve P253S) yönünden test edilmiştir. Klonlara ait MTT grafikleri ve IC₅₀ değerleri 3.3.1.'de verilmektedir. V135A mutasyonu sadece A10/AT3, P253S mutasyonu ise A21/AT4 izolatına ait bütün klonal hücre kültürlerinde saptanırken diğer izolatlarda her iki mutasyona da rastlanamamıştır. Mutasyonların buparvaquone direnciyle ilgisini anlayabilmek ve belirtilen izolatlarda varsa mutant olmayan parazit populasyonlarını belirlemek amacı ile A10/AT3 ve A21/AT4 izolatlarına ait bütün klonlar (sırasıyla 45 ve 48 adet klon) AS-PCR ile incelenmiştir. Elde

edilen sonuçlar A10/AT3 ve A21/AT4 izolatlarına ait klonal hücre kültürlerinin tamamının ana hücre kültüründe saptanan mutasyonu ihtiva ettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar belirtilen mutasyonların tekrarlayan buparvaquone tedavileri sonrasında mı parazit popülasyonunda ortaya çıktığı, yoksa bu mutasyonların direnç oluşumundan bağımsız polimorfik bir bölge mi sorusunu gündeme getirmiştir. Bu sorulara cevap alınabilmesi amacıyla belirtilen izolatların elde edildiği hayvanlardan daha erken tedavi dönemlerinden elde edilen izolatlar kullanılmıştır. A10 kodlu hayvandan buparvaquone tedavisi öncesi (A10/BT), A21 kodlu hayvandan ise 1. buparvaquone tedavisi sonrasında (A21/AT1) elde edilen makroşizont ile enfekte hücre kültürleri 2.6.2’de belirtildiği şekilde klonlanmıştır.

V135A mutasyonunun varlığının buparvaquone direnci ile olan ilişkisinin incelenmesi amacıyla klonlanan A10/BT izolatına ait toplam 41 adet klonal hücre kültürü elde edilmiştir. Bu klonlarda sitokrom b geni AS-PCR metodu kullanılarak V135A mutasyonu yönünden incelenmiş ve 38 klonda bu mutasyon saptanırken. Üç klonal hücre kültürünün mutasyon ihtiva etmediği belirlenmiştir (A10/BT/ k7, k13 ve k21). Mutasyon bulunan ve bulunmayan klonal hücre kültürlerinin buparvaquone’a olan dirençlerinin belirlenmesi ve mutasyonların buparvaquone direnci ile ilişkilerinin ortaya konulabilmesi amacıyla V135A kodunu mutasyonunu taşıyan (A10/BT/ k1, k2 ve k3) ve taşımayan (A10/BT/ k7, k13 ve k21) üçer adet klonal hücre kültürleri MTT kolorimetrik yöntemiyle fenotipik karakterleri açısından incelenmiştir. Test sonuçları mutasyona sahip klonlar ile mutasyon taşımayan klonların buparvaquone baskısı altında çok farklı fenotipik karakterlere sahip olduklarını göstermiştir (Şekil 3.15). Mutant klonların ortalama 45.28 ng/ml buparvaquone dozunda popülasyon canlılığının yarısını koruyabilirken, mutasyona sahip olmayan klonların ise ortalama 1.19 ng/ml dozunda popülasyonun % 50’sini kaybettiği saptanmıştır (Çizelge 3.11.). Elde edilen bu sonuçlar V135A mutasyonunun direnç ile ilişkili olabileceği görüşünü kuvvetlendirmiştir.

Çizelge 3.11. A10/BT izolatına ait klonların IC₅₀ değerleri (ng/ml)

V135A mutasyonuna sahip klonlar		V135A mutasyonuna sahip olmayan klonlar	
Klon no	IC ₅₀ değeri (ng/ml)	Klon no	IC ₅₀ değeri (ng/ml)
A10/BT/k1	65.34	A10/BT/k7	0.73
A10/BT/k2	57.90	A10/BT/k13	1.51
A10/BT/k3	12.62	A10/BT/k21	1.33

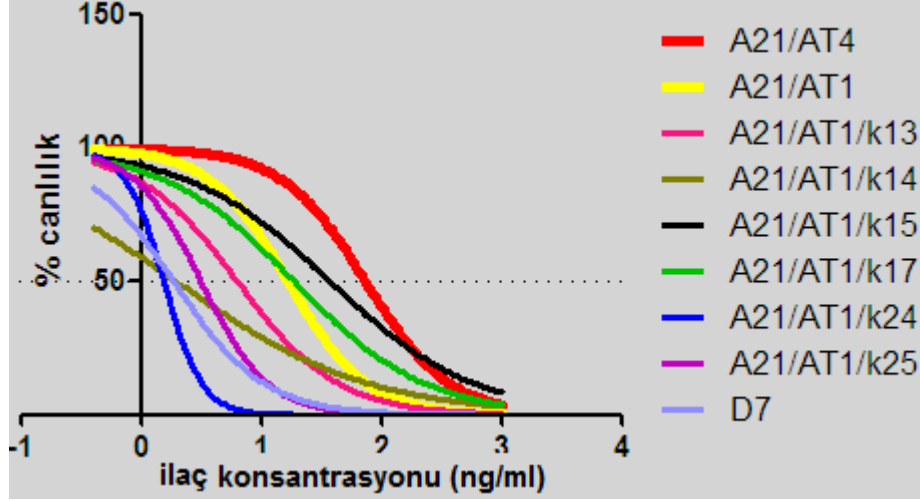


Şekil 3.15. A10/BT izolatına ait klonların MTT grafiği. İlaç konsantrasyonu (ng/ml) (X eksen) → 1-0 arası; 0-0,8 ng/ml, 0-1arası; 0,8-7 ng/ml, 1-2arası; 7-125 ng/ml, 2-3 arası; 125-1000 ng/ml.

Yine benzer şekilde P253S mutasyonunun dirençle ilişkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla A21/AT1 izolatı klonarak MTT testi uygulanmıştır. Klonlama sonucunda elde edilen toplam 49 klonun sekizinde mutant parazit populasyonları tespit edilirken diğer klonlarda mutasyon saptanamamıştır. Sitokrom b geninde belirtilen mutasyonun saptandığı klonlardan (A21/AT1/k13, 15 ve 17) ve doğal parazit populasyonuna sahip klonlardan (A21/AT1/k14, 24 ve 25) üçer adet seçilerek MTT yöntemiyle analiz edilmiştir (Şekil 3.16.). A10/BT izolatının V135A mutasyonu saptanan klonlarına benzer olarak A21/AT1 izolatından elde edilen mutant klonal hücre kültürlerinin (Ortalama IC₅₀; 21.0 ng/ml) mutasyon taşımayan klonlara (Ortalama IC₅₀; 2.23 ng/ml) oranla daha yüksek ilaç konsantrasyonlarında canlılıklarını korudukları belirlenmiştir (Çizelge 3.12.). Mutant klonların ve doğal parazit populasyonuna sahip klonların fenotipik olarak gösterdikleri farklılık P253S mutasyonunun parazitin buparvaquone'a karşı oluşan direnç mekanizmasında rol oynuyor olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmiştir.

Çizelge 3.12. A21/AT1 izolatına ait klonların IC₅₀ değerleri (ng/ml)

P253S mutasyonuna sahip klonlar		P253S mutasyonuna sahip olmayan klonlar	
Klon no	IC ₅₀ değeri (ng/ml)	Klon no	IC ₅₀ değeri (ng/ml)
A21/AT1/k13	6.36	A21/AT1/k14	1.97
A21/AT1/k15	37.70	A21/AT1/k24	1.55
A21/AT1/k17	18.95	A21/AT1/k25	3.17



Şekil 3.16. A21/AT1 izolatına ait klonların MTT grafiği. İlaç konsantrasyonu (ng/ml) (X eksen) → 1-0 arası; 0-0,8 ng/ml, 0-1arası; 0,8-7 ng/ml, 1-2arası; 7-125 ng/ml, 2-3 arası; 125-1000 ng/ml.

3.4.3. Aydın ve çevresinde buparvaquone direnciyle ilgili olarak saptanan mutasyonların yaygınlığının araştırılması

3.4.3.1. Sahadan toplanan kan örneklerinde *T. annulata*'nın saptanması

Sekans analizi yapılan *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte hücrelerinin sitokrom b geni sekans analiz sonuçlarının incelenmesiyle Akçaova Beldesin'den iki farklı örnekte buparvaquone'un bağlanma bölgelerinde yer alan iki farklı mutasyon (V135A ve P253S) saptanmıştır (Bknz 3.3.2.). Bu bölgede bu mutasyonların yaygınlığını belirleyebilmek amacı ile Akçaova Beldesin'den 2012 yılında theileriosis sezonu dışında 200 hayvandan kan örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerden *T. annulata* pozitif olanlar parazitin sitokrom b genini saptayan özel primerler kullanılarak PCR yöntemiyle saptanmıştır (Bknz 2.5.2.). Yapılan PCR sonuçlarına göre sahadan toplanan 200 adet kan örneğinden 49'unda *T. annulata* saptanmış olup bu örnekler bilgileriyle beraber çizelge 3.13.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.13. Akçaova Beldesinde 2012 yılında elde edilen *Theileria annulata* pozitif kan örnekleri.

Örnek Kodu	Kulak küpesi	İrk	Yaş	Cinsiyet	Köy/Belde
AK111	4620	Holştein	3 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK119	7422	Montofon	10 aylık	Dişi	Merkez/Akçaova
AK125	3277	Holştein	6 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK131	1316	Holştein	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK132	0678	Holştein	1 yaşlı	Dişi	Seferler/Akçaova
AK134	4417	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK138	8862	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK139	593100	Holştein	10 yaşlı	Dişi	Sarıköy/Akçaova
AK141	6409	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK143	4621	Simental	3 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK145	6547	Holştein	2 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK150	1020	Holştein	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK152	866772	Holştein	4 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK181	2116	Montofon	4.5 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK186	09459F	Holştein	4 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK191	8163	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK195	0739A	Holştein	3 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK199	8325	Holştein	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK202	2177	Holştein	7 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK203	8512	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK205	7454	Holştein	3 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK207	6549	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Sarıköy/Akçaova
AK208	2239	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK209	2555	Simental	4 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK210	3164	Montofon	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK217	4053	Simental	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK222	3009	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK225	609851	Holştein	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK226	6530	holştein	2 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK227	Küpesiz	Melez	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK232	6565	Holştein	1 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK237	1914	Holştein	8 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK239	5823	Holştein	2 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK247	59308	Holştein	13 yaşlı	Dişi	Sarıköy/Akçaova
AK248	3083	Holştein	3 yaşlı	Dişi	Sarıköy/Akçaova
AK250	0450	Holştein	6 yaşlı	Dişi	Sağlık/Akçaova
AK252	9896m	Montofon	15 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK255	6301R	Holştein	7 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK257	7388	Holştein	5 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK259	6559	Holştein	8 yaşlı	Dişi	Seferler/Akçaova
AK261	1508	Simental	1.5 yaşlı	Dişi	Kabalar/Akçaova
AK263	7642	Holştein	1.5 yaşlı	Dişi	Seferler/Akçaova
AK288	477628	Montofon	5 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK289	3109	Holştein	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK291	923179	Holştein	7 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK292	Kaplan desenli	Montofon	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK297	7038	Montofon	6 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK299	652047	Holştein	4 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova
AK304	6350	Holştein	2 yaşlı	Dişi	Merkez/Akçaova

3.4.3.2. V135A ve P253S mutasyonlarının sahadaki yaygınlığının belirlenmesi

Theileria annulata sitokrom b geninde buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgelerinde saptanan V135A ve P 253S mutasyonlarının sahadaki yaygınlığının belirlenebilmesi amacı ile AS-PCR metodu kullanılmıştır. Bu amaçla çalışmada toplam 168 adet *T. annulata* pozitif kan örneği ve 127 adet *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte hücre kültürü kullanılmıştır.

Analiz edilen kan örneklerinde, A10 kodlu hayvanın *T. annulata* izolatında saptanan V135A kodunu mutasyonu toplam 10 örnekte saptanırken, A21 kodlu hayvanın izolatında saptanan P253S kodunu mutasyonu sadece bir kan örneğinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilmiştir. P253S mutasyonun görülme sıklığında yıllar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark belirlenemezken V135A mutasyonunun 2011-2012 yıllarındaki görülme sıklığının istatistiki açıdan diğer yıllara oranla önemli oranda yüksek olduğu saptanmış ve P değeri 0.001 olarak belirlenmiştir. İncelenen kan örneklerinin yıllara göre dağılımı ve belirlenen mutasyonlar çizelge 3.14'de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.14. AS-PCR ile V135A ve P253S kodon mutasyonlarının varlığı yönünden incelenen *T. annulata* pozitif kan örnekleri

Materyalin toplandığı yıl	Örnek sayısı	V135A	P253S
1998-2001	60	2 (%3,33)	0 (%0,0)
2006-2007	59	0 (%0,0)	0 (%0,0)
2011-2012	49	8 (%16,33)	1 (%2,0)
TOPLAM	168	10 (%5,95)	1 (%0,60)
P Değeri		0.001	0.295

V135A kodunu mutasyonu; 1998-2007 yılları arasında toplanan örneklerden iki tanesinde (t177 ve t187 kodlu) ve 2012 yılında; AK119, AK199, AK202, AK257, AK261, AK263 ve AK304 kodlu hayvanlardan toplanan yedi örnekte saptanmıştır. Mutasyonun saptandığı tüm kan örneklerinde mutant ve doğal parazit populasyonları birlikte (miks populasyon) belirlenmiştir. P253S kodunu mutasyonu ise sadece 2012 yılında toplanan A104 kodlu hayvandan 3. tedavi sonrasında elde edilen kan örneğinde saptanmıştır. Belirtilen iki

mutasyonun da saptandığı kan örnekleri Akçaova Beldesi'ndeki hayvanlardan elde edilmiştir. ve bu örneklerle ilgili bilgiler Çizelge 3.15.'de verilmiştir. Bu belde dışından toplanan diğer 20 kan örneğinde her iki mutasyon da saptanamamıştır.

Çizelge 3.15. Akçaova bölgesinden elde edilen kan örneklerinden V135A ve P253S kodon mutasyonlarının saptandığı örnekler.

Materyal Kodu	Bölge	Hayvanın Irkı	Yaş (yıl)	Cinsiyet	V135A	P253S
AK119	Akçaova/Kabalar	Holştein	4	Dişi	Miks	(-)
AK199	Akçaova/Merkez	Holştein	6	Dişi	Miks	(-)
AK202	Akçaova/Kabalar	Holştein	7	Dişi	Miks	(-)
AK257	Akçaova/Kabalar	Holştein	5	Dişi	Miks	(-)
AK261	Akçaova/Kabalar	Simental	1,5	Dişi	Miks	(-)
AK263	Akçaova/Seferler	Holştein	1,5	Dişi	Miks	(-)
AK304	Akçaova/Kabalar	Holştein	2	Dişi	Miks	(-)
t177	Merkez/Akçaova	Holştein	3	Dişi	Miks	(-)
t187	Merkez/Akçaova	Holştein	4	Dişi	Miks	(-)
A104/AT3 kan örneği	Merkez/Akçaova	Holştein	4	Dişi	Miks	Miks

Çalışmada analiz edilen *T.annulata* izolatlarında ise; V135A kodonu mutasyonu sadece iki hücre kültüründe saptanırken, P253S kodonu mutasyonu toplam sekiz izolatta belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilmiştir. V135A mutasyonun görülme sıklığında yıllar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark belirlenemezken P253S mutasyonunun 2010-2011 yıllarındaki görülme sıklığının istatistiki açıdan diğer yıllara oranla önemli oranda yüksek olduğu saptanmış ve P değeri 0.001 olarak belirlenmiştir. Bu izolatların yıllara göre dağılımı ve örneklerde belirtilen mutasyonlardan hangilerinin saptandığı Çizelge 3.16.'de verilmiştir.

Çizelge 3.16. AS-PCR ile V135A ve P253S kodon mutasyonlarının varlığı yönünden incelenen *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte hücre kültürleri

Materyalin toplandığı yıl	Örnek sayısı	V135A	P253S
1998- 2007	49	1 (%2.0)	0 (%0.0)
2010-2011	50	1 (%2.0)	8 (%16)
2012	28	0 (%0.0)	0 (%0.0)
TOPLAM	127	2	8
P Değeri		0.750	0.001

Bu çalışmada test edilen *T. annulata* izolatlarında V135A mutasyonu A10 ve A104 kodlu hayvanlardan elde edilen izolatlarda saptanırken, P253S mutasyonu A21, A104, A115, A124, A126, A127, A129 ve A130 kodlu hayvanlardan elde edilen izolatlarda belirlenmiştir. Her iki mutasyonun da belirlendiği izolatlarda doğal ve mutant parazit popülasyonları birarada tespit edilmiştir. Yukarıda belirtilen iki mutasyonun belirlendiği izolatlardan A124 kodlu örnek Çine Merkez bölgesinden elde edilirken, diğer izolatlar Çine'nin Akçaova Beldesi'nden elde edilmiştir.

Test edilen *T. annulata* izolatlarında varlığı araştırılan iki mutasyondan yalnız bir tanesi saptanırken, sadece A104 kodlu hayvandan tedavi süresince elde edilen hücre kültürlerinde her iki mutasyonun bulunduğu parazit popülasyonu da tespit edilmiştir. P253S kodon mutasyonu yukarıda belirtilen hayvandan elde edilen tedavi öncesi, birinci, ikinci ve üçüncü tedaviler sonrasında alınan izolatlarda (sırasıyla A104/BT, AT1, AT2 ve AT3) tespit edilmiştir. Bu izolatların hem mutant hem de doğal parazit popülasyonlarına sahip olduğu belirlenmiştir. V135A kodonu mutasyonu ise A104/BT ve AT1 izolatında belirlenemezken, A104/AT2 ve AT3' de hem mutant hem de doğal parazit popülasyonları tespit edilmiştir (Çizelge 3.17.). Bu durum mutant parazit popülasyonlarının tedavi öncesinde az miktarda bulunması nedeniyle izolattan elde edilen DNA örneğinde mutant parazite ait DNA miktarının AS-PCR'un belirlenen sensitivitesinden daha az olabileceği fakat artan tedavilerle duyarlı popülasyonların elimine olması ile dirençli parazit popülasyonun daha baskın hale gelerek tespit edilebilir hale gelmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Çizelge 3.17. Akçaova bölgesinden elde edilen *T. annulata* izolatlarından V135A ve P253S kodon mutasyonlarının saptandığı örnekler

Hücre kültürü izolatları	Bölge	V135A	P253S
A10/BT A10/AT3	Akçaova/Merkez	Miks Mutant parazit popülasyonu	(-)
A21/AT1,2 ve 3	Akçaova/Merkez	(-)	Miks
A104/BT,AT1 A104/AT2,AT3	Akçaova/Sarıköy	(-) Miks	Miks Miks
A104/BT,AT1 A104/AT2,AT3	Akçaova/Sarıköy	(-) Miks	Miks Miks
A115/AT1,AT2	Akçaova/Sarıköy	(-)	Miks
A124/BT	Çine/Çöğürlük	(-)	Miks
A126/BT	Akçaova/Merkez	(-)	Miks
A127/BT	Akçaova/Sarıköy	(-)	Miks
A129/BT	Akçaova/Merkez	(-)	Miks
A130/BT	Akçaova/Merkez	(-)	Miks

Bu çalışmada test edilen toplam 168 kan örneğinin 148'i ve toplam 127 *T. annulata* izolatlarının 102'si Akçaova Bölgesi'nden toplanmıştır. Akçaova dışında kalan bölgelerden elde edilen toplam 45 adet kan ve izolat örneklerinden sadece bir izolatta (A124/BT) P253S mutasyonu saptanmış olup, V135A mutasyonu hiç bir örnekte belirlenememiştir. Akçaova Beldesi'nden toplanan kan örneklerinde V135A kodonu mutasyonunun görülme sıklığı % 6.75, *T. annulata* makroşizont ile enfekte hücre kültürü izolatlarında ise % 1.96 olarak belirlenmiştir. P253S kodonu mutasyonunun yaygınlığı kan örneklerinde % 0.67, hücre kültürü izolatlarında %7.84 oranında tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilmiştir. V135A mutasyonun görülme sıklığında istatistiksel açıdan önemli bir fark belirlenemezken P253S mutasyonunun görülme sıklığının istatistiki açıdan önemli oranda olduğu saptanmış ve P değeri 0.004 olarak belirlenmiştir. Genel olarak her iki mutasyonun

Akçaova Beldesi'nde görülme oranı kan örneklerinde % 7.43, *T. annulata* izolatlarında ise % 9.80 oranında belirlenmiş ve bu değerler detaylı olarak çizelge 3.18.'de verilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda Akçaova Beldesi'nde direncin göreceli olarak yaygın olduğunu belirlenmiştir.

Çizelge 3.18. Aydın Akçaova beldesinde V135A ve P253S mutasyonlarının görüme sıklığı

	Örnek sayısı	V135A	P253S	Görülme sıklığı (%)
Kan örnekleri	148	10 (% 6.75)	1 (% 0.67)	7.43
<i>T.annulata</i> izolatları	102	2 (% 1.96)	8 (% 7.84)	9.80
Toplam	250	12 (% 4.8)	9 (% 3.6)	8.4
P Değeri		0.130	0.004	

4. TARTIŞMA

Tropikal theileriosis, *Theileria annulata*'nın neden olduğu, yüksek morbidite ve mortaliteye bağılı olarak büyük ekonomik kayıplara neden olan protozoer bir hastalıktır. 1980'lerden sonra Türkiye de dahil theileriosisin endemik olduğu ülkelerde parvaquone (Clexon, Wellcome Trust, UK) ve buparvaquone (Butalex, Mallinckrodt, USA) yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Ünsüren ve ark 1988). Buparvaquone etken maddesinin 2000'li yılların ortalarında patent süresinin dolmasını takiben Türkiye'de aynı etken maddeli çok sayıda preparat (Butalex, Theilerol, Parvakuvil, Buparvon vb. gibi) kullanıma girmiştir. Ancak, 1980'lerden bu yana yaygın olarak kullanılan buparvaquone ile ilgili, özellikle hastalığın endemik olarak görüldüğü ülkelerde yapılan tedavilere tam bir yanıt alınmadığı yönündeki bildirimler (Mhadhbi ve ark 2010, Sharifiyazdi ve ark 2012) ile son yıllarda Aydın İli ve çevresinde theileriosisin başarısız tedavi olgularının sayısında artış gözlenmesi, ilaca karşı direncin geliştiği hipotezini ortaya koymaktadır. Bu hipotezin doğruluğunu test etmek amacıyla yapılan bu doktora tez projesi kapsamında, konuyla ilgili çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışmalarda, Aydın ve çevresinde tropikal theileriosise yakalanmış veya hastalığı atlatmış sığırlardan tedavi öncesi ve/veya sonrası enfekte kan örnekleri alınarak *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte lenfosit hücre kültürleri elde edilmiştir. Kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi (Saravanan ve ark 2003) kullanılarak izolatların ilaç baskısı altında üreme hızları ve metabolik aktiviteleri karşılaştırılmış, izolatlar dirençli ve duyarlı olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır. İlacın bağlanma yeri olduğu düşünülen, sitokrom b genine özgü primerler kullanarak yapılan PCR ve sonrasında gerçekleştirilen sekans analizleri ile *T.annulata* izolatları genotipik açıdan değerlendirilmiştir. İlaça karşı yüksek IC₅₀ (maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu) değerlerine sahip olduğu belirlenen hücre kültürleri klonlanarak tek bir parazit popülasyonu elde edilerek gelişen direncin, oluşan mutasyonlarla ilişkisi olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ayrıca dirençle ilişkili olduğu düşünülen mutasyonlu parazit popülasyonların sahadaki yaygınlığı AS-PCR ile araştırılmıştır.

Önerilen dozlarda uygulandığında konaktaki parazit popülasyonunun büyük bir kısmını elimine eden bir antiparaziter ilaca karşı zamanla o parazit popülasyonunda duyarsızlığın şekillenmesi ve bunun kalıtsal olması hali olarak tanımlanan (Burgu ve Karaer 2005) ilaç direncinin gelişmesinde ilaca, parazite ve konağa bağılı değişik faktörler rol oynayabilmektedir (Biedler 1992). İlaçların yarılanma ömrü direnç üzerine etkili bir kriterdir. Yarılanma ömrü uzun olan ilaçlarda etkili doza ulaşma süresi, kısa yarılanma ömrüne sahip

ilaçlara göre daha uzundur. Bu nedenle parazitin suboptimal dozda ilaca maruz kalma süresi artarak, direnç gelişim riski artmaktadır (Sibley ve Hunt 2003). Benzer olarak sahada uygulanan tedavilerde içeriği belli olamayan ve kullanma izni bulunmayan preparatların kullanılması, ilacın antogonist etkili farklı bir preparatla birlikte kullanımı, ilaç kullanımı sırasında gözden kaçan ilaç absorpsiyonundaki bozukluklar ve ilacın uygulanması esnasında yapılan uygulama hataları gibi faktörler ilacın optimal dozlarda alınamamasına neden olarak direnç gelişiminde etkili olabilmektedir (Simpson ve ark 2000, Sibley ve Hunt 2003). İlacın yoğun olarak kullanımı, duyarlı parazit popülasyonlarının yok edilmesine ve geride dirençli popülasyonların kalmasına yol açmaktadır. Ayrıca ilaca sürekli olarak maruz kalan parazitlerin ilaç etkisinden kurtulmak için alternatif yollar geliştirmesine de olanak sağlamaktadır (Sibley ve Hunt 2003).

Parazitlerde ilacın farmokinetik yapısına bağlı olarak farklı direnç mekanizmaları bulunmaktadır. İlaç direnci konusunda yapılan çalışmalar, direnç oluşumunda rol oynayan genlerin kopya sayısı ile direnç oluşumu ve dirençlilik düzeyi arasında pozitif bir ilişki bulunduğunu ve bu ilişkinin, direnç oluşumunda rol oynayan mekanizmaların en önemli parametrelerinden birisi olduğu belirtilmektedir (Anderson ve ark 2009, Fröberg ve ark 2013). Ayrıca, konuyla ilgili yapılan pek çok çalışmadan elde edilen veriler direnç oluşumunda rol oynayan mekanizmalar ile gen mutasyonları arasında doğrudan bir ilişkinin var olduğunu göstermektedir (McFadden ve ark 2000, Siregar ve ark 2008, Rungsihirunrat ve ark 2009, Downing ve ark 2011, Kiwuwa ve ark 2013).

Theileriosis’de parvaquone ve buparvaquone etkilerini, lenfoid hücrelerdeki şizontlar veya eritrositler içerisindeki piroplasm formları üzerine göstermektedir. Bu ilaçların etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber, yapısal benzerlikleri nedeniyle, etki mekanizmalarının malarya ve toxoplasmosisin tedavisinde kullanılan atovaquone'a benzer şekilde olduğu düşünülmektedir (Mehlhorn 2008). Atovaquone'un 1990'larda malarya tedavisinde tek başına kullanıldığında, belirli bir süre sonra ilaca karşı direnç gelişimi şekillenmiş ve tedavi edilen hastaların %30'unda hastalığın tekrar ettiği bildirilmiştir (Coombs ve ark 1997). Atovaquone, daha sonra proguanil hydrochloride ile birleştirilmiş ve “Malarone” ticari adıyla piyasaya sürülmüştür. Yan etkisinin az, anti-malarial etkisinin yüksek olmasına rağmen üretim maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle, Malarone'nun kullanımı çocuklar, bağışıklık kazanmamış olgun kişiler, endemik bölgelere giden turistler ve bazı gelişmiş ülkelerin askeri personeli ile sınırlı kalmıştır (Kessl ve ark 2007). Son yıllarda, Malarone'a karşı da direnç geliştiği ve gelişen bu direncin sitokrom b geni üzerinde 268'inci

amino asit mutasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Fisher ve ark 2012). Benzer şekilde, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jirovecii* (=carinii), *Babesia microti* ve *B. gibsoni*'nin neden olduğu enfeksiyonların atovaquone ile tedavisinde başarısızlıklarla karşılaşmış ve sitokrom b geni üzerinde yapılan analizler ile ilacın bağlanma bölgesinde dirençle ilgili olabilecek tek-nükleotid (single nucleotide) polimorfizimlerinin var olduğu görülmüştür (Korsinczky ve ark 2000, Kaneshiro 2002, Schwöbel ve ark 2003, Kessl ve ark 2006, Gebru ve ark 2006, Iguchi ve ark 2012). Sitokrom b geni üzerinde gelişen bu ve benzeri mutasyonların ortaya çıkmasında, mitokondriyal sitokrom b geninin kopya sayısının birden fazla olması (multi-copy), gen bölgesinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) göreceli olarak yüksek konsantrasyonda bulunması ve mitokondriyal DNA polimeraz enziminin *proofreading* özelliğinin zayıf olması gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (Kessl ve ark 2007).

Proje kapsamında *T. annulata* parazit popülasyonlarının ilaç baskısından kurtulma kapasiteleri MTT kolorimetrik yöntemi kullanılarak *in vitro* olarak test edilmiştir. MTT kolorimetrik yöntemi, çalışma basamaklarının az olması açısından hızlı, kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren bir testtir. Apoptozisin erken dönemlerinde hücrelerin metabolik etkinliklerinde bir değişiklik olmadığı ve kimyasal tarafından artırılmış olabilecek efektör hücrelerdeki metabolik etkinliğin, hedef hücrelerdeki sitotoksik etkiyi maskeleyebileceği dezavantajları bulunmakla birlikte, MTT yöntemi günümüzde birçok literatürde referans gösterilmekte ve diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında altın standart olarak değerlendirilmektedir (Fotakis ve Timbrell 2006). MTT testi daha çok memeli hücrelerindeki hücre aktivasyonunun (Gerlier ve Thomasset 1986), üremesinin ve canlılığının belirlenmesinde (Ficken ve ark 1991, Mosmann 1983), makrofajların bakterisidal etkisinin (Peck 1985), hücre kültürlerinin kemosenitivitesinin (Riley 1988) ve mantarların canlılığının belirlenmesi (Levitz ve Diamond 1985) gibi konularda kullanım alanı bulmuştur. Yapılan bir çalışmada iki farklı *T. annulata* Hindistan izolatının (Izatnagar ve Parbhani) üreme indekslerinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmış ve *T. annulata* hücre kültürlerinin canlılık indekslerinin saptanması için uygun olduğu gösterilmiştir (Saravanan ve ark 2003).

Bu tez çalışmasında toplam 127 adet *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte lenfosit hücre kültürü izolatı MTT yöntemiyle test edilmiştir. MTT kolorimetrik test sonuçlarına göre *T. annulata* izolatlarının buparvaquone baskısı altında farklı fenotipik karakterler gösterdiği belirlenmiştir. Bazı izolatların çok düşük ilaç konsantrasyonlarında (<0,8ng/ml) parazit popülasyonlarındaki canlılığı yitirdiği ve buparvaquone'a karşı fenotipik olarak duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu duruma karşın farklı bazı *T. annulata* izolatlarının ise yüksek ilaç

konsantrasyonlarına (>7ng/ml) rağmen mevcut parazit canlılığını korumaya devam ettiği belirlenmiştir. Genel olarak 1 ng/ml dozunun altındaki buparvaquone dilüsyonlarının *T.annulata* izolatları üzerine etkisiz olduğu belirlenmiş ve izolatların IC₅₀ değerleri ortalama 2-3 ng/ml olarak saptanmıştır.

MTT test sonuçları, bazı theileriosisli sığırlardan tekrar eden farklı buparvaquone tedavileri sonrasında elde *T. annulata* izolatlarında (A10, A21 ve A104) tedavileri takiben elde edilen izolatlarda IC₅₀ değerinin giderek yükseldiği saptanmıştır. Tekrarlayan tedavilerin mevcut *T. annulata* populasyon çeşitliği üzerine etkisinin belirlenebilmesi amacıyla mini ve mikro satellit belirteçler kullanılmıştır. Tekrarlayan buparvaquone tedavileriyle birlikte izolatlarda IC₅₀ değerlerinin artarken, mevcut parazit populasyon çeşitliliğinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular artan buparvaquone tedavileriyle ters orantılı olarak parazit populasyon çeşitliliğinde azalma olduğunu ve IC₅₀ değerlerinde yükselme şekillendiğini göstermiştir. Bu sonuçlar ilacın etkisiyle beraber duyarlı olan parazit populasyonların canlılığını yitirerek, geride ilacın etkisine karşı daha dirençli parazit populasyonlarının kalarak enfeksiyonu devam ettirdiğini düşündürmüştür. Son yıllarda, fare modelinin kullanıldığı, pyrimethamine dirençli ve duyarlı parazit populasyonlarının vektörel kapasitelerini belirlemek amacıyla *P. chabaudi* ile yapılan bir çalışmada ise, ilaç baskısının olmadığı durumlarda tedaviden önce dirençli parazit populasyonuna dolaşımında ve sivrisineklerde (*Anopheles spp.*) çok az oranda rastlanırken, tedaviden sonra parazit populasyonlarının sayısı dirençli populasyonlar lehine artış göstermiş, dirençli populasyon hem dolaşımında, hem de vektör sinekte yoğun olarak tespit edilmiştir (Bell ve ark 2012). Yapılan çalışmalarda elde edilen bu bulgular konakta bulunan mevcut parazit populasyonlarının ilaç tedavisinden sonra seleksiyona uğrayarak duyarlı parazit populasyonlarının sayısında azalma olduğu ve geriye muhtemel dirençli populasyonların kaldığını göstermektedir.

MTT test sonuçlarına göre fenotipik olarak dirençli ve duyarlı olarak saptanan *T.annulata* izolatları (A9/BT, A10/AT3, A16/AT1, A21/AT4, G3/BT ve N3/BT) sitokrom b geninin sekans analizi yapılması ve buparvaquone direnciyle ilişkili olabilecek mutasyonlar yönünden incelenmesi için seçilmiştir. Yapılan sekans analiz sonuçlarında altı sinonim ve iki tanesi ilacın muhtemel bağlanma bölgelerinde yer alan toplam altı non-sinonim mutasyon tespit edilmiştir. Sekans analiz sonuçlarına göre test edilen A10/AT3 ve A21/AT4 kodlu iki hücre kültüründe saptanan iki farklı non-sinonim mutasyonun ilacın muhtemel bağlanma bölgelerinde olduğu saptanmıştır. Bu mutasyonların, 135. kodondaki Valin'in Alanin olarak

(V135A) ve 253. kodundaki Prolin'in Serin olarak (P253S) değişimine neden olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu mutasyonlardan P253S mutasyonunun Sharifiyazdi ve arkadaşları tarafından 2012 yılında bildirilen P233S mutasyonu ile aynı olduğu saptanmıştır. Bu tezde *T.annulata*'ya ait gen bankasında yer alan 1092 bp'lik total sitokrom b geninin (Genbank no; XM949625) 1089 bp'lik kısmı çoğaltılırken, belirtilen çalışmada sitokrom b geninin gen bankasında verilen sitokrom b'nin (Genbank no; JQ308838 ve JQ308839) 651 bp'lik parçası kullanılmış ve bu kısım PCR ile 714 bp ve 1012 bp uzunluğunda olacak şekilde çoğaltılmıştır. İki çalışmada saptanan aynı mutasyonun kodon sayısındaki farklılık çalışmalarda kullanılan dizileme uzunluğunun farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmaya ek olarak; Walker ve ark (1998) tarafından *P. carinii*'nin atovaquone'a karşı gösterdiği dirençle ilgili olarak yapılan farklı bir çalışmada ise *P. carinii* sitokrom b geni mutasyonlar açısından incelenmiş ve aynı mutasyon atovaquone direnciyle ilişkili bulunmuştur. Bu veriler bu tezde saptanan P253S mutasyonun buparvaquone direnciyle ilişkili olabileceği görüşünü destekler niteliktedir.

Theileria annulata A10/BT ve A21/AT1 izolatlarında saptanan, sırasıyla V135A ve P253S mutasyonlarının buparvaquone direnci ile ilişkili olabileceğinin belirlenebilmesi amacıyla tedavi öncesi ve erken tedavi dönemlerinden elde edilen hücre kültürleri klonlanarak mutasyon taşıyan ve taşımayan klonları MTT ile test edilerek buparvaquone baskısı altındaki fenotipik karakterleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar A10/BT izolatına ait mutant klonların ortalama 45.28 ng/ml buparvaquone dozunda populasyon canlılığının yarısını koruyabilirken, mutasyona sahip olamayan klonların ortalama 1.19 ng/ml dozunda populasyonun %50'sini kaybettiğini göstermiştir. Benzer olarak A21/AT1 izolatına ait mutant klonal hücre kültürlerinin ortalama IC₅₀ değerinin 21.0 ng/ml olarak belirlenirken, mutasyon taşımayan klonların ortalama IC₅₀ değerleri 2.23 ng/ml olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar parazitin buparvaquone'a karşı fenotipik ve genotipik özelliklerinin korrelasyon içerisinde olduğunu ve belirtilen iki mutasyonun yüksek ihtimalle buparvaquone direncinden sorumlu olabileceğinin bir göstergesi olmuştur.

Atovaquone direnciyle ilgili yapılan çalışmalar, atovaquone'a karşı gelişen direncin seviyesinde sitokrom bc1 kompleksi içerisinde oluşan mutasyonların konum, bu mutasyonların türü ve birden fazla mutasyonun var olup olmaması gibi faktörlerin önemli olduğunu ortaya koymuştur (Schwöbel ve ark 2003, Kessl ve ark 2006). Örneğin *Plasmodium falciparum* kullanılarak yapılan bir çalışmada *in vitro* olarak parazit hücre kültürlerinde ilaç baskısı uygulanmış ve atovaquone'a karşı direnç gelişen parazit

populasyonlarında mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan 133. kodondaki mutasyonun tek başına atovaquone'a karşı hafif bir dirence neden olduğu saptanırken, bu mutasyonun kodon 272 ile kodon 280 arasında oluşan mutasyonlarla beraber görülmesi oluşan direncin artmasında neden olduğu saptanmıştır (Korsinczky ve ark 2000). Benzer olarak *Plasmodium berghei* hücre kültürlerinde 133. ve 144. kodonlarındaki mutasyonlara ek olarak 284. kodonda da mutasyon oluşması direnç düzeyinin artması ile sonuçlanmaktadır (Schwöbel ve ark 2003). Bu bilgiler doğrultusunda *T. annulata* sitokrom b geni üzerinde buparvaquone'un muhtemel bağlanma bölgelerinde saptanan mutasyonların da direnç düzeyinin belirlenmesinde etkili olabileceği görüşü ortaya çıkmıştır. Ancak çalışmada belirlenen altı sinonim mutasyonun protein sentezinde her hangi bir değişikliğe yol açmaması ve bu mutasyonların dirençli parazit populasyonlarının yanı sıra duyarlı populasyonlarda da görülme sıklığının fazla olması bu mutasyonların polimorfik değişiklikler olabileceği görüşünü kuvvetlendirmiştir. Bu nedenle bu mutasyonların parazitte ilaca karşı oluşan dirençte birincil dereceden etkili olamayacağı düşünülerek bu mutasyonlar daha fazla incelenmemiştir. Bu çalışmada ilacın bağlanma bölgesi dışında saptanan diğer dört mutasyonun dirençle ilişkili olabilecek iki mutasyonla arasında bir bağlantı görülememiştir. Fakat bütün mutasyonların birbirleriyle kombinasyonlarının direnç oluşum düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi için daha fazla örnek ile daha detaylı çalışmaları gerektirmektedir.

Yukarıda sözü edilen V135A ve P253S mutasyonlarını tespit etmek amacı ile bu çalışmada allel spesifik-PCR (AS-PCR) metodu geliştirilmiştir. Tekli nokta mutasyonlarının saptanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism), AS-PCR, mikroarray, DNA sekans analizi sayılabilir. Bu yöntemler arasında RFLP yönteminde her nokta mutasyonu için uygun restriksiyon enziminin bulunamayışı ve metodun enzim ile kesme, PCR ve gel elektroforez gibi çok basamaktan oluşması avantajlarının yanı sıra bir dezavantaj oluşturmaktadır (Papp ve ark 2003). Mikroarray yöntemlerin kesin ve güvenilir olmasının yanı sıra pahalı bir yöntem oluşu en büyük dezavantajıdır. AS-PCR'in çok örnekte aynı anda kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntem olması nedeniyle tekli nokta mutasyonlarının tespitinde (Koizumi ve ark 2005) sıklıkla kullanılmaktadır. *Plasmodium spp.* ve diğer parazit türlerinde yapılan ilaç direnci çalışmalarında da bu yöntem kullanım alanı bulmuştur (Wang ve ark 1995, Grobusch ve ark 1997, Himmelstjerna ve ark 2001, Silvestre ve Humbert 2002, Tan ve ark 2012).

A10 ve A21 kodlu hayvanlardan, tekrarlayan buparvaquone tedavileri sonrası elde edilen *T. annulata* izolatları, sitokrom b geninde yer alan muhtemel bağlanma bölgelerinde saptanan iki mutasyon (V135A ve P253S) AS-PCR metodu kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar her iki hayvandan tedavi öncesinde veya erken tedavi döneminde elde edilen izolatlarda mutasyon açısından miks parazit populasyonlarının bulunduğunu, üçüncü ve dördüncü tedavilerden sonra elde edilen izolatlarda ise geriye sadece mutasyon içeren parazit populasyonlarının enfeksiyonu sürdürdüğü veya duyarlı parazit populasyonlarının AS-PCR ile tespit edilemeyecek kadar azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular yine V135A ve P253S mutasyonlarının dirençten sorumlu olabileceği düşüncesini güçlendirmektedir.

Saptanan V135A ve P253S mutasyonlarının Aydın İli ve çevresindeki yaygınlığının belirlenebilmesi amacıyla bu çalışmada toplam 127 adet *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte hücre kültürü ve 168 adet *T. annulata* pozitif kan örneği kullanılmıştır. Örnekler toplanırken tropikal theileriosis olgularının sık olarak karşılaşıldığı ve buparvaquone'un çok yoğun olarak kullanıldığı Akçaova Beldesi'ne ağırlık verilmiştir. Toplam 45 örnek farklı beldelerden toplanmıştır. Bu örneklerden sadece bir kan örneğinde (A124/BT) P253S mutasyonuna rastlanmış V135A mutasyonu ise saptanamamıştır. Akçaova Beldesi'nden toplanan kan örneklerinde V135A kodunu mutasyonunun görülme sıklığı %6.75, *T. annulata* izolatlarında ise %1.96 olarak belirlenmiştir. P253S kodunu mutasyonunun yaygınlığı kan örneklerinde %0.72, izolatlarda %7.84 oranında tespit edilmiştir. Genel olarak her iki mutasyonun Akçaova Beldesi'nde görülme oranı kan örneklerinde %8.02, *T. annulata* izolatlarında ise %9.80 oranında belirlenmiştir. Bu bulgular Akçaova Beldesi'nde direncin göreceli olarak yaygın olduğunu göstermektedir. Aydın ili genelinde dikkat çeken bir diğer önemli nokta ise 1991-2007 yılları arasında elde edilen kan örneklerde V135A mutasyonu yalnızca %3,33 iken 2011-2012 yıllarında toplana örneklerde %16,33 oranında tespit edilmiş olmasıdır. Her ne kadar örnekleme uygun bir şekilde yapılmış olmasa da bu sonuçlar "muhtemel" dirençli parazit populasyonunun sahada varlığını artarak koruduğunu göstermektedir.

Belirli bir ilaca karşı direnç gelişmesi, parazit populasyonlarının biyolojilerini de etkileyebilmektedir. Belirli bir parazit populasyonunun ilaca karşı kazanmış olduğu dayanma gücü, diğer normal parazit populasyonları arasında "fitness" özelliğini kaybetmesine neden olabilmektedir. İlaç baskısının ortadan kalkması durumunda, duyarlı parazit populasyonlarının daha etkin ve hızla çoğalabilmeleri ve duyarlı populasyonların tekrar kendini yenileyebilmeleri mümkün olabilmektedir. Yapılan epidemiyolojik ve laboratuvar

çalışmaları ilaç kullanımı olmayan alanlarda dirençli parazit populasyonları yerine duyarlı parazit populasyonlarının ağırlıkta olduğu gösterilmektedir (Abdel-Muhsin ve ark 2004, Wargo ve ark 2007, Huijben ve ark 2011). Bu faktör göz önüne alınarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2010) tarafından, malarya etkenlerinin bir ilaca karşı %10'dan fazla oranda tedavi başarısızlığı tespit edildiğinde, bu ilacın kullanımdan çekilmesi önerilmektedir. Bizim çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz yüzde oranları bazı bölgelerde bu sınırları zorlandığı görülmektedir. Ancak, WHO'nun önerdiği bu stratejinin başarılı olabilmesi için üç önemli ön koşulun oluşması gerektiği belirtilmektedir: i) Parazit populasyonu içerisinde hâlâ ilaca duyarlı parazitlerin bulunması, ii) dirençli parazit populasyonunun, duyarlı parazit populasyonuna oranla daha az "fit" olması, ve iii) aktarım (transmission) düzeyinin, mix enfeksiyonların oluşabilmesine olanak sağlayacak kadar yüksek olması (Peters ve ark 2002, Bell ve ark 2012). Bütün bunların *T. annulata* için de geçerli olup olmadığını anlamak için buparvaquone'a karşı gelişen direncin biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve sahadaki yaygınlığının daha detaylı epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konması gerekmektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında elde edilen bulgular; *T.annulata* populasyonlarında buparvaquone'a karşı direnç gelişmeye başladığı ihtimalini doğrular niteliktedir. Elde edilen bulguların ışığında buparvaquone'a karşı gelişen dirençle ilgili araştırmaların devam ettirilmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir. Öncelikli olarak sahadan izole edilen dirençli parazit populasyonlarının sayısı artırılarak dirençli suşlardaki mutasyonların belirlenmesi ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılacak en uygun belirtecin (marker) saptanarak duyarlı ve özgün tanı metotlarının (AS-PCR, qRT-PCR gibi) geliştirilmesi, dirençli parazit populasyonlarının sahadaki yaygınlığını belirlemek amacıyla daha detaylı epidemiyolojik bir çalışma gerçekleştirilmesi hedeflenmelidir. Ayrıca, direncin biyolojisini anlamak amacıyla ilaç baskısı altında ve ilaç baskısı olmadan dirençli ve duyarlı parazit populasyonlarının çoğalma indeksleri, apoptozise dirençleri, dirençli parazit populasyonlarının "fitness"ları belirlenmesi ileride alınacak önlemlerin belirlenmesi açısından önemlidir. Bütün bu çalışmalardan elde edilecek olan veriler, buparvaquone'un tropikal theileriosis'in tedavisinde sahada ne kadar süre ile efektif bir şekilde kullanılabileceğinin belirlenmesine katkıda bulunacak, tropikal theileriosis'e karşı uygulanacak olan koruma ve kontrol stratejilerinin (buparvaquone'a alternatif ilaçların geliştirilmesi, bu işlemin ne kadar ivedilikle yapılması gerektiğinin saptanması, direncin yaygın olması durumunda buparvaquone'un sahadan çekilerek tropikal theileriosis'e karşı mücadelede aşılama çalışmalarının ve akarisit uygulama programlarının gözden geçirilmesi) belirlenmesine ışık tutacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı gösterdiği direnç incelenmiştir. Bu doğrultuda çalışmada toplam 127 adet *T. annulata* izolatu ve 168 adet *T. annulata* pozitif kan örneği kullanılmıştır.

Elde edilen parazit izolatlarının ilaca karşı gösterdiği direnç fenotipik açıdan MTT kolorimetrik yöntemiyle incelenmiş ve bazı izolatların buparvaquone etkisine karşı fenotipik olarak dirençli oldukları belirlenmiştir. Ayrıca yapılan testler sonucunda hayvanlara uygulanan tekrarlı tedaviler sonrasında ilaca karşı daha dirençli parazit populasyonlarının kalarak enfeksiyonu devam ettirdiği belirlenmiştir. Fenotipik açıdan dirençli olarak belirlenen izolatların sitokrom b geni sekans analizleri yapılmış ve ilacın muhtemel bağlanma bölgelerinde iki farklı mutasyon (V135A ve P253S) saptanmıştır. Dirençli izolatlarının mutasyona sahip olan ve olmayan klonlarının buparvaquone'a karşı fenotipleri belirlenmiş ve mutasyona sahip olan klonal hücre kültürlerinin dirençli oldukları saptanarak bu iki mutasyonun *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı oluşturduğu dirençle büyük olasılıkla ilişkili olabileceği saptanmıştır.

Buparvaquone direnci ile ilişkili bulunan mutasyonların Aydın ve çevresindeki yaygınlığı AS-PCR ile araştırılmış ve genel olarak her iki mutasyonun görülme oranı kan örneklerinde %6.54, *T. annulata* izolatlarında ise % 7.87 oranında olduğu belirlenmiştir. Bu oranlar göreceli olarak bu bölgede direncin gelişmekte olduğunu göstermektedir.

Tropikal theileriosisin tedavisinde buparvaquone'un kullanılan tek etkili etken madde olması, etkenin taşınmasında rol alan vektör kenelerin dirençli parazit populasyonlarını konaklar arasında nakletme ihtimalinin bulunması ve bu çalışmada elde edilen bulgulara göre dirençle ilişkili mutasyonların belli bir oranda bölgedeki parazit populasyonunda yaygın olduğunun belirlenmesi konunun önemini göstermektedir. Bu alanda yapılacak çalışmaların artırılması ileride sahada theileriosis ile mücadelede alınacak önlemlerin belirlenebilmesi, tropikal theileriosis tedavisi için alternatif bir ilaç bulunması ve alternatif koruma kontrol metotlarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

ÖZET

Selin Hacılarlıoğlu

***Theileria annulata* Sitokrom b Geninde Mutasyonların Belirlenerek Buparvaquone Direnciyle İlişkinin Araştırılması ve Aydın Çevresindeki Enfekte Sığırlarda Direncin Yaygınlığının Saptanması.**

Tropikal theileriosis, *Theileria annulata*'nın neden olduğu, yüksek morbidite ve mortaliteye bağlı olarak büyük ekonomik kayıplara neden olan protozoer bir hastalıktır. Günümüzde sahada tropikal theileriosis sağaltımında kullanılan tek etkili ilaç buparvaquone'dur. Ancak, son yıllarda tropikal theileriosisin başarısız tedavi olgularının sayısında bir artış gözlenmiştir. Bu durum, buparvaquon'a karşı direnç gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. *Theileria annulata*'nın buparvaquone'a karşı direnç gelişmiş olabileceği hipotezi doğrultusunda bu tezde, *Theileria annulata* sitokrom b geninde mutasyonların belirlenerek buparvaquone direnciyle ilişkisinin araştırılması ve Aydın ve çevresindeki enfekte sığırlarda direncin yaygınlığının saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla; kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi ile akut theileriosisili vakalardan tedavi öncesi ve sonrası elde edilen izolatların replikasyon dereceleri ve metabolik aktiviteleri karşılaştırılmış ve ilaç baskısı altında izolatlar, gösterdikleri direnç açısından kıyaslanarak fenotipik olarak dirençli ve duyarlı olanlar belirlenmiştir. Duyarlı ve dirençli olarak belirlenen izolatlar satellit belirteçler kullanılarak ve *T. annulata* sitokrom b geni sekans analizleri yapılarak genotipik açıdan değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre altı sinonim ve altı non sinonim mutasyon saptanmış olup, non sinonim mutasyonlardan ikisinin buparvaquone'un sitokrom b geni üzerindeki muhtemel bağlanma bölgelerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu mutasyonların sitokrom b geni amino asit diziliminde 135. kodondaki Valin'in Alanin olarak (V135A) ve 253. kodondaki Prolin'in Serin olarak (P253S) değişimine neden olduğu tespit edilmiştir. Mutasyonların saptandığı hücre kültürleri klonlanarak MTT yöntemi ile test edilmiş ve elde edilen sonuçlar her iki mutasyonun da buparvaquone direnciyle ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu mutasyonların sahadaki yaygınlığının test edilebilmesi amacıyla allel-spesifik PCR metodu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre V135A mutasyonu toplam 168 *T. annulata* pozitif kan örneğinden 10 adedinde ve 127 hücre kültüründen ikisinde saptanırken, P253S mutasyonu 168 *T. annulata* pozitif kan örneğinden bir adedinde ve 127 hücre kültüründen sekiz örnekte saptanmıştır. Bu bulgular bu iki mutasyonun *T. annulata*'nın buparvaquone karşı geliştirdiği dirençte etkili olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *T. annulata*, buparvaquone, ilaç direnci, sitokrom b.

SUMMARY

Selin Hacilarlıoğlu

Characterization of Mutations in *Theileria annulata* Cytochrome b Gene in Association with Buparvaquone Resistance and the Detection of Prevalence of Buparvaquone Resistance in Infected Cattle in Aydın Region

Tropical theileriosis is a protozoal disease caused by *Theileria annulata* leading to serious economic losses due to high morbidity and mortality. Buparvaquone is the only drug currently used to treat cases of tropical theileriosis in the field. However, an increase in the rate of treatment failure cases of tropical theileriosis has been observed in recent years, raising the possibility of resistance developed against buparvaquone. according to this hypothesis, the present study aim to investigate the mutations in *Theileria annulata* cytochrome b gene in association with buparvaquone resistance and the detection of prevalence of buparvaquone resistance in infected cattle in Aydın region. To this end, susceptibility to buparvaquone was examined by comparing the proliferative index of infected cells, which were obtained from cattle with theileriosis before and/or after treatment, under titration of buparvaquone dose using the MTT assay. Cell lines identified as resistant or susceptible were then genotyped using satellite markers and the DNA sequence of the *T. annulata* cytochrome b gene determined. The results identified six nonsynonymous and six synonymous mutations. Two out of six nonsynonymous mutations were found to be located at putative buparvaquone binding regions of cytochrome b. These mutations result in amino acid substitutions from valine 135 to alanine or proline 253 to serine. Isolates possessing an identified mutation were cloned and tested with the MTT assay which indicated that the clones with either of the two mutations located in the binding regions are resistant to buparvaquone. To test for the frequency of these mutations in the field, an allele specific PCR was developed. The results demonstrated that the mutation V135A in 10 out of 168 *T. annulata* positive blood samples and two out of 127 *T. annulata* macroschizont infected cell lines, while the P253S mutation was detected in one out of 168 *T. annulata* positive blood samples and eight out of 127 cell lines. These data suggest that the two point mutations are candidates for generation of genetic resistance of *T. annulata* against buparvaquone.

Keywords: *T. annulata*, buparvaquone, resistance, cytochrome b gene.

KAYNAKLAR

Abdel-Muhsin A, Abdel Muhsin M, Mackinnon J, Eltayeb A , El-Khansaa AN, Suad S, Salah A, David W, Babiker HA. Evolution of Drug-Resistance Genes in *Plasmodium falciparum* in an Area of Seasonal Malaria Transmission in Eastern Sudan. Oxford Journals Medicine The Journal of Infectious Diseases 2004; 189 (7): 1239-1244.

Açııcı M. Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 1995; 8 (1-2): 271-277.

Açııcı M. Samsun yöresinde tropikal theileriosis'e karşılaşılan sığırlarda saha çalışmaları. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2002; 26 (3): 257-265.

Aktas M, Dumanlı N, Çetinkaya B, Çakmak A. Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infection in cattle in the east of Turkey. Veterinary Record 2002; 150: 548-549.

Aktas M, Dumanli N, Angin M. Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma* species in the east of Turkey. Veterinary Parasitology 2004; 119: 1-8.

Aktas, M, Altay K, Dumanlı N. A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. Veterinary Parasitology 2006; 138: 179-185.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell. 2nd Ed. Inc. New York and London: Garland Press; 1989.

Alhassan A, Govind Y, Tam NT, Thekisoie OM, Yokoyama N, Inoue N, Igarashi I Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis. Parasitology Research 2007; 100: 1165-1168.

Altay K, Aktaş M, Dumanlı N. *Theileria annulata* Tams1 geninin PCR-RFLP analizi. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2007; 31 (3): 173- 175.

Altay K, Aydın MF, Uluisik U, Aktas M, Dumanli N. Use of multiplex PCR for the diagnosis of *Theileria annulata* and *Theileria buffeli*. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32: 1-3.

Anderson JB. Evolution of antifungal-drug resistance. Mechanisms and pathogen fitness. Nature Reviews Microbiology 2005; 3: 547–556.

Angın M. Elazığ yöresi sığırlarında *Theileria annulata*'nın vektörleri, Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, Türkiye 1996.

Anon A. Tick and Tick-borne Disease Control. A practical field manual, FAO, Rome 1984; Vol:2, p: 300-621.

Ayerdem B, İnci A, Uyanık F, İça A, Çakmak A, Yıldırım A. Sığırlarda doğal *Theileria annulata* enfeksiyonlarında monosit nitrik oksit düzeyleri. Sağlık Bilimleri Dergisi 2006; 15 (2): 116-121.

Aysul N, Karagenc T, Eren H, Aypak S, Bakirci S. Prevalence of Tropical Theileriosis in Cattle in the Aydın Region and Determination of Efficacy of Attenuated *Theileria annulata* Vaccine. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32(4): 322-7.

Bai Q, Liu GY, Yin H, Zhao QZ, Liu DK, Ren JX, Li X. *Theileria sinensis* study on classical taxonomy. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica 2002a; 33:73–77.

Bai Q, Liu GY, Yin H, Zhao QZ, Liu DK, Ren JX, Li X. *Theileria sinensis* a new species of Bovine *Theileria* molecular taxonomic studies. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica 2002b; 33: 185–190.

Bakheit MA ve Latif AA. The innate resistance of Kenana cattle to tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Sudan. Annuals of New York Academy of Science 2002; 969, 159-163.

Bakırcı S. Batı Anadolu sığırlarında görülen kene türleri ve yaygınlığı. Doktora tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2009.

Bakırcı S, Sarali H, Aydın L, Eren H, Karagenc T. Distribution and seasonal activity of tick species on cattle in the West Aegean region of Turkey. *Experimental and Applied Acarology* 2012; 56:165–178.

Barile FA. Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods. New York: CRC Press; 1994. p. 33-43.

Barnett SF, Ed, Weinman D, Ristic M. Theileriosis. *Infectious Blood Diseases of Man and Animal Diseases Caused by Protista*. New York: Academic Press; 1968 p: 269-325.

Biedler JL Genetic aspects of multidrug resistance. *Cancer* 1992; 15; 70 (6 Suppl):1799-809.

Bell AS, Huijben S, Paaijmans KP, Sim DG, Chan BH, Nelson WA, Read AF. Enhanced transmission of drug-resistant parasites to mosquitoes following drug treatment in rodent malaria. *Plos one* 2012; 7:6, e37172.

Ben Miled L. Population in diversity in *Theileria annulata* in Tunisia. Doktora tezi. University of Edinburgh: Edinburgh 1993.

Bhattacharyulu Y, Chaudhri RP, Gill BS. Studies on the development of *Theileria annulata* in the Tick-*Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Parasitology* 1975; 50: 397-408.

Bilgiç HB. *Theileria annulata*'nın tanısında serolojik (İndirekt ELISA) ve moleküler (PZR, Çoklu PZR ve LAMP) yöntemlerin geliştirilmesi, Doktora tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Turkey 2010.

Bilgiç HB, Karagenc T, Simuunza M, Shiels B, Tait A, Eren H, William W. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Experimental Parasitology* 2013; 133 (2): 222–229.

Binta MG, Losho T, Allsopp BA, Mushi EZ. Isolation of *Theileria taurotragi* and *Theileria mutans* from cattle in Botswana. *Veterinary Parasitology* 1998; 77: 83- 91.

Bishop R, Geysen D, Skilton R, Odongo D, Nene V, Allsopp B, Mbogo S, Spooner P, Morzaria S, Dobbelaere DAE, McKeever DJ (Eds), Genomic polymorphism, sexual recombination and molecular epidemiology of *Theileria parva*. *Theileria*, London: Kluwer Academic Publishers; . *Word Class Parasites* 2002; Vol: 3 p: 23-40.

Boulter N, Hall R. Immunity and vaccine development in the bovine theilerioses. *Advances in Parasitology* 1999; 44: 41-97.

Brown CGD. In: Taylor AER., Baker JR (Eds), *Theileriidae: In vitro* Methods of Parasite Cultivation. London: Academic Press; 1987. p. 230-251.

Brown CGD. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of *cattle*. *Parassitologia* 1990; 32: 23-31.

Burgu A, Karaer Z (Editörler) Veteriner hekimliğinde parazit hastalıklarında tedavi, Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, 2005;Yayın no:19.

Burridge MJ, Brown CG, Kimber CD. *Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. *Experimental Parasitology* 1974; 35 (3): 374-380.

Butler M. Animal cell culture and technology. New York: Taylor & Francis group 2004; p. 32-33.

Chinnery PF. Mitochondrial DNA in Homo Sapiens. In: **Bandelt HY, Macaulay V, Richards M.** (Eds), Human mitochondrial DNA and the evolution of Homo Sapiens. Berlin: Springer Berlin Heidelberg pres; 2006; 3-15.

Caccio S, Camma C, Onuma M, Severini C. The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *International Journal of Parasitology* 2000; 30: 1181-1185.

Calder JA, Reddy GR, Chieves L, Courtney CH, Littell R, Livengood JR, Norval RA, Smith C, Dame JB. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34 (11): 2748-55.

Campbell RSF. The use of resistant cattle in the control of ticks and vector-borne diseases. In: Wilde JKH. (Eds), *Tick-borne Diseases and Their Vectors*. Lewis Reprints Ltd: University of Edinburgh, CTVM 1978; p. 251-257.

Can R, Aslan V. *Theileria annulata*'dan ileri gelen theileriosis'te, pıhtılaşma mekanizmasında görülen bozukluklar ve Tranexamic Asid'in (Transamin) sağaltıma etkisi üzerine araştırmalar. *Elazığ Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Dergisi* 1984; 1 (1): 20-30.

Chae JS, Allsopp BA, Waghela SD, Park JH, Kukuda T, Sugimoto C, Allsopp MTEP, Wagner GG, Holman PJ. A study of the systematics of *Theileria spp.* Based upon small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research* 1999; 85: 877- 883.

Chansiri K, Kawazu S, Kamio T, Terada Y, Fujisaki K, Philippe H, Sarataphan N. Molecular phylogenetic studies on *Theileria* parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Veterinary Parasitology* 1999; 83: 99-105.

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. The evolutionary Dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994; 371: 215-220.

Conrad PA, Denham D, Brown CGD. Intraerythrocytic multiplication of *Theileria parva* in vitro: ultrastructural study. *International Journal for Parasitology* 1986; 16 (3): 223-229.

Cicek H, Cicek H, Eser M, Tandogan M. Current Status of Ruminant Theileriosis and Its Economical Impact in Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2009; 33 (4): 273 – 279.

Coombs GH, Croft SL. Parasitology, molecular basis of drug design and resistance. Cambridge: Cambridge University press; 1997; 114: 38-39.

Criado A, Martinez J, Buling A, Barba JC, Merino S, Jefferies R, Irwin PJ. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology* 2006; 142: 238-247.

Çakmak A. Untersuchungen zur Inzidenz von Hamoparasiten in einer Rinderherde in der Provinz Ankara. *Tieraerztl Hochsch, Diss. Hannover* 1987; p: 133.

Dabak M, Dabak DO, Aktas M. Cerebral theileriosis in a Holstein calf. *Veterinary Record* 2004; 154 (17): 533-534.

Darghouth MA, Bouattour A, Kilan M. Tropical theileriosis in Tunisia: epidemiology and control. *Parassitologia* 1999; 1: 33-36.

de Kok JB, d'Oliveira C, Jongejan F. Detection of the protozoan parasite *Theileria annulata* in *Hyalomma* ticks by the polymerase chain reaction. *Experimental and Applied Acarology* 1993; 17: 839-846.

De Vos AJ, Bessenger R, Banting LF. *Theileria taurotragi*: a probable agent of bovine cerebral theileriosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1981; 48: 177-178.

Dhar S, Gautam OP. *Theileria annulata* infection of cattle. I. Complement fixation and coagulation-complement-adsorption test for serodiagnosis. *The Indian Journal of Animal Sciences* 1977a; 47: 389-394.

Dhar S, Gautam OP. *Theileria annulata* infection of cattle, 2. Capillarytube agglutination test for serodiagnosis. *The Indian Journal of Animal Science* 1977b; 47: 458- 462.

Dhar S, Malhotra DV, Bhushan C, Gautam OP. Chemotherapy of *Theileria annulata* infection with buparvaquone, *Veterinary Record* 1986; 119 (25-26): 635-636.

Dhar S, Malhotra DV, Bhushan C, Gautam OP. Chemoimmunoprophylaxis with buparvaquone against theileriosis in calves Veterinary Record 1987; 120 (15): 375.

Dhar S, Malhotra DV, Bhushan C, Gautam OP. Treatment of experimentally induced *Theileria annulata* infection in cross-bred calves with buparvaquone. Veterinary Parasitology 1988; 27 (3-4): 267-275.

Dinçer S, Sayın F. Theileriosis etkenlerinin toksonomisi ve morfolojisi, theileriosis. 4. Ulusal Parazitoloji Kongresi 1985; p: 5-28.

Dinçer S, Sayın F, Karaer Z, Cakmak A, Friedhoff KT, Muller I, Inci A, Yukari BA, Eren H. Serological studies on the prevalence of blood parasites in cattle in the Black Sea region of Turkey. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1991; 38: 206-226.

Dobbelaere DA, Küenzi P. The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host-pathogen interactions, Current Opinion in Immunology 2004; 16, 524-530.

Dolan TT, Injairu R, Gisemba F, Maina JN, Mbadi G, Mbwiria SK, Mulela GHM, Othieno DAO. A clinical trial of buparvaquone in the treatment of East Coast fever. Veterinary Record 1992; 130: 536-538.

Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, Hilley JD, de Doncker S, Maes I, Mottram JC, Quail MA, Rijal S, Sanders M, Schönian G, Stark O, Sundar S, Vanaerschot M, Hertz-Fowler C, Dujardin JC, Berriman M. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. Genome Research 2011; 21: 2143-2156.

d'Oliveira C, van der WM, Habela MA, Jacquiet P, Jongejan F. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33: 2665-2669.

d'Oliveira C, van der WM, Jacquet P, Jongejan F. Detection of *Theileria annulata* by the PCR in ticks (Acari:Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. *Experimental and Applied Acarology* 1997; 21: 279-291.

Dschunkowsky E and Luhs J. Die piroplasmosen der rinder, zentralblatt fur bacteriology. *Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I. originale* 1904; 35, 486-492.

Dumanlı N. *Theileria annulata*'nın sebep olduğu sığır theileriosisinin *Hyalomma excavatum* ile nakli üzerine deneysel araştırmalar. *Türkiye Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi* 1987; 11 (1): 14-26.

Dumanlı N, Özer E. Elazığ Yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1987; 3 (1): 159- 166.

Dumanlı N, Aktas M, Cetinkaya B, Cakmak A, Koroglu E, Saki CE, Erdogmus Z, Nalbantoglu S, Ongor H, Simsek S, Karahan M, Altay K. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Veterinary Parasitology* 2004; 5: 1-7.

Dumanli N, Aktas M, Cetinkaya B, Cakmak A, Koroglu E, Saki CE, Erdogmus Z, Nalbantoglu S, Ongor H, Simsek S, Karahan M, Altay K. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Veterinary Parasitology* 2005; 127: 9-15.

Eren H, Çakmak A, Yukarı BA. Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde *Theileria annulata*'nın seroprevalansı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1995; 42: 57-60.

Eren H, Özlem MB, Sert H, Kaplan A. Aydın yöresi sığırlarında *Theileria annulata*'nın prevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1998; 22 (2): 177-179.

Erkut HM. Ege Bölgesinde sığırlarında piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. *Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü Dergisi* 1967; 8 (16): 120-130.

Fawcett D, Musoke A, Voigt W. Interaction of sporozoites of *Theileria parva* with bovine lymphocytes in vitro I. Early events after invasion, *Tissue Cell* 1984; 16: 873-884.

Feagin JE. Mitochondrial genome diversity in parasites. *International Journal for Parasitology* 2000; 30,4, 371-390.

Ficken MD, Barnes HJ, Qureshi M.A. Acute airsacculitis in turkeys inoculated with cell-free culture filtrate of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Pathology* 1991; 28: 46–54.

Fisher N, Abd Majid R, Antoine T, Al-Helal M, Warman AJ, Johnson DJ, Lawrenson AS, Ranson H, O'Neill PM, Ward SA, Biagini GA. Cytochrome b mutation Y268S conferring atovaquone resistance phenotype in malaria parasite results in reduced parasite bc1 catalytic turnover and protein expression. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287, 9731-9741.

Flach EJ, Ouhelli H. The epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection in cattle) in an endemic area of Morocco. *Veterinary Parasitology* 1992; 44 (1-2): 51-65.

Flach EJ, Ouhelli H, Waddington D, Oudich M, Spooner RL. Factors influencing the transmission and incidence of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in Morocco. *Veterinary Parasitology* 1995; 59 (3-4): 177-188.

Forsyth LM, Minns FC, Kirvar E, Adamson RE, Hall FR, McOrist S, Brown CG, Preston PM. Tissue damage in cattle infected with *Theileria annulata* accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. *Journal of Comparative Pathology* 1999; 120: 39-57.

Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 2006; 160: 171–177.

Fröberg G, Ferreira PE, Mårtensson A, Ali A, Björkman A, Gil JP. Assessing the cost-benefit effect of a *Plasmodium falciparum* drug resistance mutation on parasite growth *In vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; 57: 887-892.

Fujisaki K, Ito Y, Kamio T, Kitaoko S. The presence of *Theileria sergenti* in *Haemaphysalis longicornis* overwintering in pasture in Japan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1985; 79 (5): 519-524.

Fujisaki K, Kawazu S, Kamio T. The taxonomy of the bovine *Theileria spp.* *Parasitology Today* 1994; 10: 31- 33.

Gautam OP, Dhar S. Bovine tropical theileriosis, a review. 1. Prevalence, transmission and symptom. *Tropical Veterinary Animal Science Research* 1983; 1: 1–18.

Gautam OP, Dhar S, Malhotra DV, Bhushan C. Role of buparvaquone (BF 720C) in the therapy of *Theileria annulata* infection. XXIII World Veterinary Congress. 1987, p: 240, Canada.

Gebru T, Hailu A, Kremsner PG, Kun JFJ, Grobusch MP. Molecular surveillance of mutations in the cytochrome b gene of *Plasmodium falciparum* in Gabon and Ethiopia. *Malaria Journal* 2006; 5:112.

Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, Sparagano O. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology* 2001, 99: 273-286.

Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods* 1986; 94: 57–63.

Gill BS, Bhattacharyulu Y, Kaur D ve Singh A. Immunization of cattle against tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) by “infection-treatment” method. *Annals of Veterinary Research* 1977; 8: 279–286.

Glass EJ, Preston PM, Springbett A, Craigmile S, Kirvar E, Wilkie G, Brown CG. *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. *International Journal of Parasitology* 2005; 35: 337-347.

Glass EJ, Crutchley S, Jensen K. Living with the enemy or uninvited guests: functional genomics approaches to investigating host resistance or tolerance traits to a protozoan parasite, *Theileria annulata*, in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012;148 (1-2): 178-89.

Göksu K. Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Yeni Matbaa, Ankara, 1959; p: 73.

Göksu K. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda *Piroplasmida* enfeksiyonları (*Piroplasmosis*, *Babesiosis*, *Theileriosis*) ve *Anaplasmosis*'in yayılışı durumları. *Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 1970; 40 (4): 24-29.

Göksu K. Theileriosisin klinik sendromlarıyla ilgili gelişmeler. Sayın F (Eds), "Theileriosis" , İzmir: Bilgehan Basımevi; 1985; p: 97-109.

Grobusch M.P, Adagu IS, Kremsner PG, Warhurst DC. Plasmodium falciparum: in vitro chloroquine susceptibility and allele-specific PCR detection of Pfmdr1 Asn86Tyr polymorphism in Lambarene. Gabon: Cambridge University Press 1998; 116 (03): 211-217.

Gubbels JM, De Vos AP, van der WM, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 1782-1789.

Gubbels MJ, Hong Y, Van der Weide M, Nijman IJ, Guangyuan L, Jongejan F. Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 943-952.

Gül Y, Aksoy G, Özdemir H. Elazığ ve Çevresinde *Theileria annulata* ile enfekte Sığırların Buparvaquone (Butalex)'la tedavisi üzerine araştırmalar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1992; 1: 77-86.

Güler DA. Tıbbi biyoloji ve genetik. 1. baskı, Anadolu Üniversitesi 2006; yayın no: 1683.

Güralp N. Theileriosisli sağaltımında yeni ilaçlar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1985; 32 (1): 231-235.

Hall R. Antigens and immunity in *Theileria annulata*. Parasitology Today 1988; 4: 257-261.

Hall R, Coggins L, McKellar S, Shiels B, Tait A. Characterisation of an extrachromosomal DNA element from *Theileria annulata*. Molecular and Biochemical Parasitology 1990; 38: 253-260.

Hall R, Hunt PD, Carrington M, Simmons D, Williamson S, Mecham RP, Tait A. Mimicry of elastin repetitive motifs by *Theileria annulata* sporozoite surface antigen. Molecular and Biochemical Parasitology 1992; 53: 105-112.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N Single step multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes. Journal of Clinical Microbiology 1998; 36: 1989–1995.

Hashemi-Fesharki R. Control of *Theileria annulata* in Iran. Parasitology Today 1988; 4: 36-40.

Hashemi-Fesharki R. Chemotherapeutic value of parvaquone and buparvaquone against *Theileria annulata* infection of cattle. Research in Veterinary Science 1991; 50 (2): 204-207.

Heinz M. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. Advances in Parasitology 1984; V:23.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH and Vogt PH. Mutiplex PCR: Critical Parameters and Step-by Step Protocol. Biotechniques. 1997; 23: 504-511.

Heussler VT. *Theileria* survival strategies and host cell transformation. Dobbelaere DAE, McKeever DJ (Eds), Word Class Parasites Volume: 3 Theileria, Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 2002; p: 69-84.

Higuchi S, Kawamura S, Yasuda Y. Development of *Theileria sergenti* in the haemolymph of the tick *Haemaphysalis longicornis*. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene 1987; 264 (3-4): 521-526.

Himmelstjerna GVS, Pape M, Witzendorff CV, Schnieder T. Allele-specific pcr for the beta-tubulin codon 200 ttc/tac polymorphism using single adult and larval small strongyle (cyathostominae) stages. International Journal for Parasitology 2001; 88(2): 254-7.

Huijben S, Nelson WA, Wargo R, Sim DG, Drew DR, Read AF. Chemotherapy, within-host ecology and the fitness of drug-resistant malaria parasites. The Society for the Study of Evolution 2010; 64(10): 2952–2968.

Hoffmann G, Harchner F, Schein E, Gerber H. Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in den asiatischen provinzen der Tüekei, Berl. Münch. Tierarztl 1971; 84: 152-156.

Holst-hansen C ve Brüner N. MTT cell proliferation assay, Cell Biology. A Laboratory Handbook. San Diego: Academic Press; 1998. p.16-18.

Hooshmand-Rad P. Some studies on *Theileria annulata* with special reference to an attenuated vaccine. Doktora tezi, University of Edinburgh: Edinburgh, Scotland 1973.

Hoti SL, Dharmodharan R, Subramaniyan K, Das PK. An allele specific PCR assay for screening for drug resistance among *Wuchereria bancrofti* populations in India. Indian Council of Medical Research 2009; 130: 193–199.

Hudson AT, Randall AW, Fry M, Ginger CD, Hill B, Latter VS, McHardy N, Williams RB. Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity, Parasitology 1985; 90 (1): 45-55.

Ica A. Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin Reverse Line Blotting ve Indirek Floresan Antikor Testi ile karşılaştırmalı tanısı. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2004; 1(2): 77-85.

Ica A, Inci A, Yıldırım A. Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2007a; 31 (1): 33-38.

Ica A, Vatansever Z, Yıldırım A, Düzlü Ö, Inci A. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. Veterinary Parasitolog. 2007b; 148: 156-160.

Iguchi A, Matsuu A, Ikadai H, Talukder MH, Hikasa Y. Development of *in vitro* atovaquone-resistant *Babesia gibsoni* with a single-nucleotide polymorphism in *cytb*. Vet. Parasitol 2012; 185, 145-150.

Ikadai H, Tanaka H, Shibahara N, Matsuu A, Uechi M, Itoh N, Oshiro S, Kudo N, Igarashi I, Oyamada T. Molecular evidence of infections with *Babesia gibsoni* parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42: 2465-2469.

Ilhan T. *Theileria annulata*, Immunity and Carrier State, Msc thesis by research, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland 1995; p: 220.

Ilhan T, Williamson S, Kirvar E, Shiels B, Brown CG. *Theileria annulata*: carrier state and immunity. Annals of New York Academy of Science 1998; 849: 109-125.

Inci A, Karaer Z, Çakmak A, Günay O, Atasever A, Nalbantoglu S. Kayseri yöresinde sığırlarda Tropikal Theileriosis'in epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. DPT 98-K12139 numaralı proje final raporu 2003.

Inci A, Ica A, Yıldırım A, Vatansever Z, Çakmak A, Albasan H, Cam Y, Atasever A, Sarıozkan S, Duzlu Ö. Economical impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey. Parasitol Research 2007; 101 (2): 171-174.

Inci A, Yavuz A, Yıldırım A, Düzlü Ö, Bişkin Z. Sığır Theileriosis'inde metastaz. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2012; 9 (2): 113-112.

Isaki H, Alhassan A, Ohta N, Thekiso OM, Yokoyama N, Inoue N, Nambota A, Yasuda J, Igarashi I Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites. Journal of Microbiologic Methods 2007; 71: 281-287.

Jin C, Xu YT Zhang SF, Lu C, Yu LZ. Cloning and sequence analysis of the cattle *Theileria sergenti* P33 surface protein gene. Chin. J. Prev. Vet. Med. 2007; 29: 112–119.

Jura WG, Brown CG, Kelly B. Fine structure and invasive behaviour of the early developmental stages of *Theileria annulata* in vitro. Veterinary Parasitology 1983; 12: 31-44.

Kachani M, Flach H, Williamson S, Mcdonald F, Shiels B, Spooner RL, Ouhelli H. The use of ELISA in theileriosis studies in Morocco. European Union Third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey, 1994.

Kaneshiro ES. Are cytochrome b gene mutations the only cause of atovaquone resistance in Pneumocystis. Drug Resistance Updates 2001; 4, 322-329.

Karaer Z, Theileriosis'in bulaşması ile ilgili gelişmeler. In: Sayın F (Eds), Theileriosis. İzmir: Bilgehan Basımevi; 1985; p: 47-76.

Karatepe B. Niğde yöresinde tropikal theileriosis'in aşılama sonrası epidemiyolojisi. Doktora Tezi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Programı, Ankara, Türkiye 2000.

Karagenç TI, Kıralk FK, Seyrek K, Bildik A, Eren H. Detection of Serum Total Sialic Acid in Cattle with Natural Tropical Theileriosis. Revue de Médecine Vétérinaire 2005; 156: (11) 578-582.

Kawazu S, Sugimoto C, Kamio T, Fujisaki K. Antigenic differences between Japanese *Theileria sergenti* and other benign *Theileria* species of cattle from Australia (*T. buffeli*) and Britain (*T. orientalis*). Parasitology Research 1992; 78: 130-135.

Kawazu S, Kamio T, Kakuda T, Terada Y, Sugimoto C, Fujisaki K. Phylogenetic relationships of the benign *Theileria* species in cattle and Asian buffalo based on the major piroplasm surface protein. *International Journal for Parasitology* 1999; 29: 613- 618.

Kemeny DM and Chantler S. An introduction to ELISA. In *ELISA and other solid Phase Immunoassays*. In: Kemeny DM, Challacombe SJ (Eds), *Theoretical and Practical Aspects*. John Wiley and Son Ltd: Chichester; 1988; 1-30.

Kessl JJ, Lange BB, Merbitz-Zahradnik T, Zwicker K, Hill P, Meunier B, Pálsdóttir H, Hunte C, Meshnick S, Trumpower BL. Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc₁ complex. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 31312-13128.

Kessl JJ, Ha KH, Merritt AK, Lange BB, Hill P, Meunier B, Meshnick SR, Trumpower BL. Cytochrome *b* Mutations that modify the Ubiquinol-binding pocket of the cytochrome bc₁ complex and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2005; 280,17: 17142-17148.

Kessl JJ, Ha KH, Merritt AK, Meshnick SR, Trumpower BL. Molecular basis of *Toxoplasma gondii* atovaquone resistance modeled in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2006; 146:255-258.

Kessl JJ, Meshnick, SR, Trumpower, BL. Modeling the molecular basis of atovaquone resistance in parasites and pathogenic fungi. *Trends in Parasitology* 2007; 23: 494-501.

Kinabo LD, Bogan JA. Parvaquone and buparvaquone: HPLC analysis and comparative pharmacokinetics in cattle. *Acta Tropica* 1988; 45 (1): 87-94.

Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Hooshmand-Rad P, Zweygarth E, Gerstenberg C, Phipps P, Brown CG. Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitology* 2000; 120 (Pt 3): 245-254.

Kiwuwa MS, Byarugaba J, Wahlgren M, Kironde F. Detection of copy number variation and single nucleotide polymorphisms in genes involved in drug resistance and other

phenotypic traits in *P. falciparum* clinical isolates collected from Uganda. *Acta Tropica* 2013; 125: 269-275.

Kocan KM, Edmour F Blouin EF and Barbet AF. Anaplasmosis Control Past, Present, and Future. *Annals of New York Academy of Sciences* 2000; 916:501-9.

Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob. Agents. Chemother* 2000; 44:2100-2108.

Koizumi M, Morita K, Takagi M, Yasumo H, Kasuya A. Improvement of single nucleotide polymorphism genotyping by allele-specific PCR using primers modified with an ENA residue. *Analytical Biochemistry* 2005; 340: 287–294.

Krungskrai J. The multiple roles of the mitochondrion of malarial parasite. United Kingdom: Cambridge University Press, *Parasitology* 2004; 129, 511-524.

Kuhn S, Gill MJ, Kain KC. Emergence of atovaquone-proguanil resistance during treatment of *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a non-immune north American traveller to west Africa. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 72 (4) :407-9.

Kurtpınar H. Türkiye Keneleri. Güven Matbaası, Ankara 1954; 1125.

Laiblin CH. Klinische Untersuchungen zur *Theileria annulata* Infektion des Rindes. II. Haematologische Untersuchungen, Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift. 1978; 91: 48-50.

Lau AOT. An overview of the *Babesia*, *Plasmodium* and *Theileria* genomes: A comparative perspective. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2008; 164, 1-8.

Lawrence JA, De Vos AJ, Irvin AD. Theileriosis. In: Coetzer JAW, Thomson GR Tustin RC (Eds), *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Oxford University: Cape Town; 1994; Chapter 26.

Lawrence JA, Williamson SM. *Theileria mutans* infection. In: Coetzer JAW Tustin RC (Eds), infectious diseases of livestock. Oxford: Oxford University Press; 2006; 480-482.

Learngaramkul P, Petmitr S, Krungkrai SR, Prapunwattana P, Krungkrai J. Molecular characterisation of mitochondria in asexual and blood stages of *Plasmodium falciparum*. Molecular Cell Biology Research Communications 1999; 2, 15-20.

Leibisch A, Rahman MS, Hoogstraal H. Tick fauna of Egypt with special reference to studies on *Hyalomma anatolicum anatolicum* the natural vector of cattle theileriosis. In: Channabasovanna GP, Viraktamath CA (Eds) Progress in Acarology. Oxford and IBH Publishing CO, PVI LTD, Acarological Society of India 1988; Vol I, p: 52-59.

Levine ND. Veterinary Protozoology. Iowa State University Veterinarian 1985; 313-328.

Levine NO. The protozoan phylum Apicomplexa. CRC pres; Boca Raton, Florida, USA 1988 Vol. I and II.

Levitz SM, Diamond RD. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. Journal of Infectious Diseases 1985;152: 938-944.

Liu J, Guan G, Liu Z, Liu A, Ma M, Bai Q, Yin H, Luo J. Additional data for a new *Theileria sp.* from China based on the sequences of ribosomal RNA internal transcribed spacers. Experimental Parasitology 2013a; 133: 217-221.

Liu A, Guan G, Du P, Gou H, Zhang J, Liu Z, Ma M, Ren Q, Liu J, Yang J, Li Y, Niu Q, Bai Q, Yin H, Luo J. Rapid identification and differentiation of *Theileria sergenti* and *Theileria sinensis* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Veterinary Parasitology 2013b;191(1-2):15-22.

Markoulatus P, Siafakas N and Moncany M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. Journal of Clinical Analysis 2002; 16: 47-51.

Martin-Sanchez J, Viseras J, Adroher FJ, Garcia-Fernandez P. Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. *Parasitology Research* 1999; 85: 243-245.

Mcfadden DC, Tomavo S, Berry EA, Boothroyd JC. Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q(o) domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2000; 108:1-12.

McHardy N, Haigh AJ ve Dolan TT. Chemotherapy of *Theileria parva* infection. *Nature* 1976; 261: 698-699.

Mchardy N, Hudson AT, Morgan DW, Rae DG, Dolan TT. Activity of 10 naphthoquinones, including parvaquone (993C) and menoctone, in cattle artificially infected with *Theileria parva*. *Research in Veterinary Science* 1983; 35(3):347-352.

Mchardy N, Hudson AT. Therapy of *Theileria* nfektions of caule with the hydroxynaphthoquinanes Parvaquone (BW 993) and BW 720 C. *Parasitology* 1984; 89, (2), 39-40.

McHardy N. Recent advences in the chemotherapy of theileriosis. *Preventive veterinary medicine* 1984; 2: 179-192.

McHardy N, Wekesa LS, Hudson AT, Randall AW. Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. *Research in Veterinary Science* 1985; 39 (1): 29-33.

McHardy N, Wekesa LS, Hudson AT, Randall AW. Buparvaquone (BW 720C) a patent new anti-theilerial compound. *Proceedings of the inaugural symposium of the Indian association for the advancement of Veterinary parasitology, 12-13 February, p: 29, Izatnagar, Indian, 1987.*

McKeever DJ, Morrison WI, Dobbelaere DAE, McKeever DJ (Eds), Epidemiological significance of strain-specific immunity to *Theileria parva*, Word Class Parasites *Theileria*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer pres; 2002;Volume: 3.

Megson A, Inman GJ, Hunt PD, Baylis HA, Hall R. The gene for apocytochrome B of *Theileria annulata* resides on a small linear extrachromosomal element. Molecular and Biochemical Parasitology 1991; 48: 113-115.

Mehlhorn H, Shein E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. Advances in Parasitology 1984; 23: 37-103.

Mehlhorn H. Encyclopedic reference of parasitology, Disease Treatment, Therapy, 2nd Edition. Newyork: Springer-Verlag Berlin Heidelberg Berlin; 2001; 567.

Mehlhorn H. Encyclopedia of Parasitology, 3rd Edition. Newyork: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2008; 389-392.

Merdivenci A. Türkiye Keneleri üzerine Araştırmalar, Kurtulmuş Matbaası, İstanbul 1969; 420.

Mhadhbi M, Naouach, A, Boumiza A, Chaobani MF, BenAbderazzak, S, Darghouth, MA. *In vivo* evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone. Vet. Parasitol. 2010; 169: 241-247.

Mimioglu M. Die schildzecken (Ixoiden) der haustiere in der Türke. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1954; 1-2, 20-53.

Mimioglu M. Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde “*Haematuria vesicalis bovis*” li sığırlarda parazitolojik araştırmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1955; 2: 183-192.

Mimioglu M, Ulutas M, Güler S. Yurdumuz Sığırlarında Theileriosis Etkenleri ve Diğer Kan Parazitleri. Ankara: Ajans-Türk Matbaacılık Sanayii; 1971.

Mimioglu M, Özcan C, Keskinetepe H, Ulutas M, Güler S. Sığır Theileriosisinin yayılışı ve tedavisi üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1972; 19: 471-487.

Mishra AK, Sharma NN, Viswanathan CB. Efficacy of Butalex in field cases of bovine theileriosis--short communication. Acta Veterinaria 1993; 41 (3-4): 361-363.

Molad T, Mazuz ML, Fleiderovitz L, Fish L, Savitsky I, Krigel Y, Leibovitz B, Mollay J, Jongehan J, Shkap V. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. Veterinay Microbiology 2006; 113; 55- 62.

Mohamed AM, Abdel-Rady A, Ahmed LS, El-Hosary A. Evaluation of indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of tropical theileriosis in cattle (*Bos indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. Veterinary Parasitology 2012;186 (3-4): 486-9.

Moran MC, Nigarura G, Pegram RG. An assessment of host resistance to ticks on cross-bred cattle in Burundi. Medical Veterinary Entomology 1996; 10: 12-18.

Morgan DWT, McHardy N. The therapy and prophylaxis of theileriosis with a naphthoquinone buparvaquone (BW 720C), Proceedings of 14th Congress on disease of cattle, Dublin 1986; p: 1271-1276.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 1983; 65: 55–63.

Nalbantoğlu S. Çukurova yöresinde tropikal theileriosis'e karşı aşılanan sığırlar üzerinde saha çalışmaları. Doktora tezi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Programı, Ankara, Türkiye 1996.

Neitz WO. Theileriosis, gonderioses and cytauxzoonoses, a review, onderstepoort. Journal of Veterinary Science 1957; 27: 275-381.

Norvall RAI, Perry BD, Young AS. The Epidemiology of Theileriosis in Africa. London: Academic Press; 1992; 481.

Omer OH, El-Malik KH, Mahmoud OM, Haroun EM, Hawas A, Sweeney D, Magzoub M. Haematological profiles in pure bred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. Veterinary Parasitology 2002; 107 (1-2): 161-168.

Omer OH, El-Malik KH, Magzoub M, Mahmoud OM, Haroun EM, Hawas A, Omar HM. Biochemical profiles in Friesian cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia, Veterinary. Research Communications 2003; 27 (1): 15-25.

Onar E. Türkiye'de Tropical Theileriosis'e (*Theileria annulata*) karşı aşı hazırlama ve uygulama çalışmaları. Demirözü K, Uysal Y, Nadas ÜG, Türkaslan J, Altınel C, Alp H (Eds), Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. Pendik Hayvan Hastalıkları Merkezi Araştırma Enstitüsü Yayınları 1989; 10: 47-52.

Orkun Ö, Deniz A, Güven E. Survey of *Theileria annulata* and *Theileria buffeli/orientalis* complex in cattle in the Kırşehir region using multiplex-PCR. Türkiye Parazitolojisi Dergisi 2012; 36 (1): 9-11.

Ouhelli H, Innes EA, Brown CG, Walker AR, Simpson SP, Spooner RL. The effect of dose and line on immunisation of cattle with lymphoblastoid cells infected with *Theileria annulata*. Veterinary Parasitology 1989; 31 (3-4): 217-228.

Ouhelli H, Spooner R, El Hasnaoui M, Kachani M, Williamson S and Flach E. Review of immunisation against theileriosis in Morocco. In: Spooner R, Campbell J (Eds), Third European Union Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey, 1994.

Oura CA, Odongo DO, Lubega GW, Spooner PR, Tait A, Bishop RP. A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. International Journal of Parasitology 2003; 33: 1641-1653.

Oura CA, Bishop R, Wampande EM, Lubega GW, Tait A. The persistence of component *Theileria parva* stocks in cattle immunized with the 'Muguga cocktail' live vaccine against East Coast fever in Uganda. *Parasitology* 2004; 129: 27-42.

Özcan Ü. Ankara civarında evcil hayvanlarda piroplazmose vakaları ve tedavileri üzerine araştırmalar. Doçentlik Tezi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara 1961; p: 143-183.

Ozkoc U, Pipano E. Advances in the control of Theileriosis. Trials With Cell Culture Vaccine Against Theileriosis in Turkey. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science* 1981; 14: 256-258.

Pain A, Renauld H, Berriman M, Murphy L, Yeats CA, Weir W, Kerhornou A, Aslett M, Bishop R, Bouchier C, Cochet M, Coulson RM, Cronin A, de Villiers EP, Fraser A, Fosker N, Gardner M, Goble A, Griffiths-Jones S, Harris DE, Katzer F, Larke N, Lord A, Maser P, McKellar S, Mooney P, Morton F, Nene V, O'Neil S, Price C, Quail MA, Rabinowitsch E, Rawlings ND, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Shah T, Squares R, Squares S, Tivey A, Walker AR, Woodward J, Dobbelaere DA, Langsley G, Rajandream MA, McKeever D, Shiels B, Tait A, Barrell B, Hall N. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science* 2005; 309: 131- 133.

Painter HJ. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2007; 446: 88–91.

Papp AC, Pinsonneault JK, Cooke G, Sadée W. Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves. *Biotechniques*. 2003; 34(5): 1068-72.

Peck R. A one-plate assay for macrophage bactericidal activity. *Journal of Immunological Methods* 1985; 82: 131–140.

Pelle R, Graham SP, Njahira MN, Osaso J, Saya RM, Odongo DO, Toye PG, Spooner PR, Musoke AJ, Mwangi DM, Taracha EL, Morrison WI, Weir W, Silva JC, Bishop RP. Two *Theileria parva* CD8 T Cell Antigen Genes Are More Variable in Buffalo than Cattle Parasites, but Differ in Pattern of Sequence Diversity. *PLoS One* 2011; 6(4): e19015.

Perry BD, Mukhebi AW, Norval RAI and Barrett JC. A preliminary assessment of current and alternative tick and tick-borne disease control strategies in Zimbabwe, Report to the Director of Veterinary Services, Zimbabwe 1990; p: 41.

Peters JM, Chen N, Gatton M, Korsinczky M, Fowler EV, Manzetti S, Saul A, Cheng Q. Mutations in cytochrome b resulting in atovaquone resistance are associated with loss of fitness in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46: 2435-41.

Pipano E. Piroplasmosis, A review, *Harefuah* 1965; 22: 181-175.

Pipano E. Immunological aspects of *Theileria annulata* infection. *Bulletin - Office International des épizooties* 1974; 81: 139–159.

Pipano E. Control of bovine theileriosis and anaplasmosis in Israel. *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 1976; 86: 55-59.

Pipano E. Basic principles of *Theileria annulata* control. In: Henson JB, Campbell M (Eds), *Theileriosis*. Ottawa, Canada: International Development Research Centre; 1977; p: 55-65.

Pipano E. Bovine theileriosis in Israel, *Bulletin - Office International des épizooties* 1989a; 8: 79-87.

Pipano E. Vaccination against *Theileria annulata* theileriosis. In: Wright IG (Eds), *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 1989b; p: 203-234.

Pipano E, Frank M, Shkap V. Current methods for the control of tick fevers in cattle. *Isreal Journal of Veterinary Medicine* 1991; 46: 79-85.

Pipano E *Theileria annulata* theileriosis. Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC, Kriek PJ (Eds), Infectious Diseases of Livestock With Special Reference to South Africa. Oxford University Press; 1994; p: 341-348.

Pipano E. Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. Tropical Animal Health and Production 1997; 29: 86-90.

Pipano E, Shkap V, Coetzer JAW, Tustin RC. *Theileria annulata* infection, in Infectious Diseases of Livestock. Oxford University Press; 2006; 486-497.

Preston PM, Brown CG, Spooner RL. Cell-mediated cytotoxicity in *Theileria annulata* infection of cattle with evidence for BoLA restriction. Clinical Experimental Immunology 1983; 53: 88-100.

Preston PM, Brown CG, Bell-Sakyi L, Richardson W, Sanderson A. Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. Research in Veterinary Science 1992;53 (2): 230-243.

Preston PM, Brown CG. Macrophage-mediated cytostasis and lymphocyte cytotoxicity in cattle immunized with *Theileria annulata* sporozoites or macroschizont-infected cell lines. Parasite Immunology 1998; 10: 631-647.

Preston PM and Jongejan F. Protective Immune Mechanisms to Ticks and Tick-borne Diseases of Ruminants. Parasitology Today 1999; 15(7).

Purnell RE. *Theileria annulata* as a hazard to cattle in countries in the northern Mediterranean littoral. Veterinary Sciences Communications 1978; 2: 3-10.

Renneker S, Abdo J, Ahmed JS, Seitzer U. Field validation of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection. Parasitol Research 2009; 106 (1): 47-53.

Richardson JO, Forsyth LM, Brown CG, Preston PM. Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. *Veterinary Research Communications* 1998; 22: 31-45.

Riley MC, Scudiero DA, Monks A. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro-procedure tetrazolium assay. *Cancer Research* 1988; 48: 589–601.

Robinson PM. *Theileria annulata and Its Transmission. A Review*, *Tropical Animal Health and Production* 1982; 14: 3-12.

Rosenthal PJ. Antimalarial chemotherapy, mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery. United States of America: Humana press; 2001.

Ruokonen M. Phylogeography and Conservation Genetics of the Lesser White- Fronted Goose (*Anser erythropus*). Department of Biology, University of Oulu, 2001.

Rubaire-Akiiki CM. The effects of bovine tick resistance on the susceptibility of *Hyalomma anatolicum anatolicum* to infection with *Theileria annulata* (Ankara). *Veterinary Parasitology* 1990; 34 (4): 273-88.

Rungsihirunrat K, Chaijareonkul W, Seugorn A, Na-Bangchang K, Thaithong S. Association between chloroquine resistance phenotypes and point mutations in *pfcr* and *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Acta Tropica* 2009; 109:37-40.

Sağlam M, Aştı RN, Özer A. Genel Histoloji, genişletilmiş 6. baskı, Yorum Matbaacılık, Ankara 2001.

Salih DA, Liu Z, Bakheit MA, Ali AM, El Hussein AM, Unger H, Viljoen G, Seitzer U, Ahmed JS. Development and evolution of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis. *Transboundries of Emerging Diseases* 2008; 55: 238-243.

Saruhan B, Paşa S. Theileriosisli Sığırlarda Buparvaquone (Buparvon)'un Terapotik Etkinliği. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32 (4):317-321.

Samish M, Pipano E. Transmission of *Theileria annulata* by two and three host ticks of genus *Hyalomma* (Ixodidae). Proc. Int. Conf. Tick-Born Diseases and Their Vectors. Edinburg 1976; 371-372.

Samish M, Pipano E. Development of infectivity in *Hyalomma detritum* (Schulze, 1919) ticks infected with *Theileria annulata* (Dchunkowsky and Luhs, 1904). Parasitology 1978; 77 (3): 375-379.

Saravanan BC, Sreekumar C, Bansal GC, Ray D, Rao JR, Mishra AK. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. Vet. Parasitol. 2003; 113: 211–216.

Sayın F. *Theileria* türlerinin patolojisi, (Ed), Sayın F, “Theileriosis”, Bilgehan Basımevi, İzmir 1985; 111-113

Sayın F, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Eren H, Yukarı BA, Kıvrar E. Studies on Tropical Theileriosis in Turkey. In: Dolan TT (Eds), "Proceedings of a Workshop held The International Laboratory for Research on Animal Diseases", Nairobi, Kenya, 1990; p: 23-28.

Sayın F, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H. Epidemiological Study on Tropical Theileriasis Around Ankara. Singh DK, Varshney BC (Eds), Proceedings of The Second EEC Workshop on Orientation and Coordination of Research on *Tropical Theileriosis*. March 18-22, National Dairy Development Board Anand, India. 1991; p: 51-54.

Sayın F, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H and Brown CGD. Epidemiological Study on Tropical Theileriosis around Ankara. 150 Years of Veterinary Education 1992; 24-31.

Sayın F, Dinçer S, Dumanlı N, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Beyazit A, Spooner RL, Brown CGD. Epidemiology of Tropical Theileriosis in Turkey.

European Union Third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey, 1994.

Sayın F, Dincer S, Cakmak A, Inci A, Yukarı BA, Vatanserver Z, Nalbantoglu S, Deniz A. Tick-borne diseases in Turkey. *Tropical animal health and production* 1997; 29: 53-57.

Sayın F, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, Inci A, Yukarı BA, Eren H. Ankara Yöresinden Elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky ve Luhs, 1904) İzolatları Üzerinde Araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1999;46 (2-3): 207-218.

Sayın F, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, Inci A, Yukarı BA, Eren H, Nalbantoglu S, Vatanserver Z. Türkiye'de Tropikal theileriosis Üzerine Araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2000; 47 (1): 1- 11.

Sayın F, Karaer Z, Dincer S, Cakmak A, Inci A, Yukarı BA, Eren H, Vatanserver Z, Nalbantoglu S, Melrose TR. A comparison of susceptibilities to infection of four species of Hyalomma ticks with *Theileria annulata*. *Veterinary Parasitology* 2003; 113: 115–121.

Schein E, Büscher G ve Friedhoff KT. Lichtmikroskopische untersuchungen uber die entwicklung von *Theileria annulata* (Dshunkowsky und Luhs, 1904) in *Hyalomma anatolicum exavatum* (Koch,1844). I. Die Entwicklung im Darm Volge Sogener Nymphen *Zeitschrift für Parasitenkunde* 1975; 48: 123-136.

Schein E and Voigt WP. Chemotherapy of bovine theileriosis with halofuginone. *Acta Tropica* 1979; 36: 391-394.

Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 2000; 109: 365-371.

Schnittger L, Shayan P, Biermann R, Mehlhorn H, Gerdes J, Ahmed JS. Molecular genetic characterization and subcellular localization of *Theileria annulata* mitochondrial heat-shock protein 70. *Parasitology Research* 2000; 86: 444–452.

Schnittger L, Katzer F, Biermann R, Shayan P, Boguslawski K, McKellar S, Beyer D, Shiels BR, Ahmed JS. Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2002; 120: 247-256.

Schneider I, Haller D, Seitzer U, Beyer D and Ahmed JS. Molecular genetic characterization and subcellular localization of a putative *Theileria annulata* membrane protein. *Parasitology Research* 2004, 94: 405–415.

Schneider I, Haller D, Kullmann B, Beyer D, Ahmed JS, Seitzer U. Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitology Research* 2007; 101: 1471-1482.

Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T. Different mutation patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *in vivo*: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential *in vivo* resistance marker. *Institute of Tropical Medicine, Malaria Journal* 2003; 2:5.

Sergent, E, Donatien AL, Parrot LM, Lestoquard F. Etudes sur les pirolasmoses bovines. *Institute Pasteur d'Algeria: Alger* 1945.

Sevgili M, Cakmak A, Gokcen A, Altas MG, Ergun G. Prevalence of *Theileria annulata* and *Babesia bigemina* in Cattle in the Vicinity of Sanliurfa. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2010; 9 (2): 292-296.

Sharifiyazdi H, Namazi F, Oryan A, Shahriari R, Razavi M. Point mutations in the *Theileria annulata* cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure. *Vet. Parasitol.* 2012; 187: 431-435.

Shaw M.K. *Theileria* development and host cell invasion. In: Dobbelaere, DAE, McKeever, DJ (Eds), *World Class Parasites (3), Theileria*. London: Kluwer Academic Publishers; 2002; 1-23.

Shayan P, Biermann R, Schein E, Gerdes J, Ahmed JS Detection and differentiation of *Theileria annulata* and *Theileria parva* using macroschizont-derived DNA probes. Annals of New York Academy of Science USA 1998; 849: 88-95.

Sherman IW. Malaria, Parasite Biology, Pathogenesis and Protection. In: United States, America: American Society for Microbiology 1998.

Shiels B, Symth A, Dickson J, McKellar S, Tetley L, Fujisaki K, Hutchinson B and Kinnaird JH. A stoichiometric model of stage differentiation in the protozoan parasite *Theileria annulata*. Molecular and Cellular Differentiation 1994; 2: 101-125.

Shiels BR, d'Oliveira C, McKellar S, Ben Miled L, Kawazu S, Hide G. Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of *Theileria* parasites. Molecular and Biochemical Parasitology 1995; 72: 149-162.

Shah-Fischer M, Say RR. Manual of tropical veterinary parasitology. Wallingford, United Kingdom; CAB International: 1989.

Sibley CH, Hunt SY. Drug resistance in parasites: can we stay ahead of the evolutionary curve. Trends in Parasitology 2003; 19: 11.

Silvestrea A, Humbert JF. Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. International Journal for Parasitology 2002; 32: 921-928.

Singh DK, Thakur M, Raghav PRS, Varshney BC. Chemotherapeutic trials with four drugs in crossbred calves experimentally infected with *Theileria annulata*. Research in Veterinary Science 1993; 54: 68-71.

Siregar JE, Syafruddin D, Matsuoka H, Kita K, Marzuki S. Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo(2)) of the cytochrome b gene. Parasitology International 2008; 57:229-32.

Soulsby JL. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Bailliere Tindal, London: 7th Edition; 1986.

Sparagano O. Molecular Diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. Journal of veterinary Parasitology 1999; 13(2): 83-92.

Sparagano O, Jongejan F. Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens. Parasitologia 1999; 1: 101-105.

Spitalska E, Torina A, Cannella V, Caracappa S, Sparagano O. Discrimination between *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in their vectors and hosts by RFLP based on the 18S rRNA gene. Parasitology Research 2004; 94: 318- 320.

Spooner RL, Innes EA, Glass EJ, Brown CG. *Theileria annulata* and *T. parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. Immunology 1989; 66: 284-288.

Spooner RL and Brown CGD. Theileriosis and evidence for genetic resistance. In: Owen JB Axford RFE (Eds), Breeding for Disease Resistance in Farm Animals. Wallingford, UK: CAB International; 1991; 235- 243.

Stewart NP, De Vos AJ, Shiels IA, McGregor W. The experimental transmission of *Theileria buffeli* of cattle in Australia a by *Haemaphysalis humerosa*. Australian Veterinary Journal 1987; 6 (3): 81-83.

Stewart NP, De Vos AJ, McGregor W, Shiels IA. Observation on the development of tick-transmitted *Theileria buffeli* (*syn. T. orientalis?*) in cattle. Research in Veterinary Science 1988; 44 (3): 338-342.

Stewart NP, De Vos AJ, Shiels IA, Jorgensen WK. Transmission of *Theileria buffeli* to cattle by *Haemaphysalis bancrofti* fed on artificially infected mice. Veterinary Parasitology 1989; 34 (1-2): 123-127.

Stewart NP, Vilenberg G, De Vos AJ. Review of Australian species of *Theileria*, with special reference to *Theileria buffeli* of cattle. *Tropical Animal Health and Production* 1996; 28: 81-90.

Stiller D. Application of biotechnology for the diagnosis and control of tick and tick-borne disease. *Parassitologia* 1990; 32: 87-111.

Sugimoto C, Fujisaki K. Dirk AE, Dobbelaere and Declan J McKeever (Eds) Non-transforming *Theileria* parasites of ruminants, Boston, Dordrecht, London: *Theileria*, Kluwer Academic Publishers, Word Class Parasites 2002; Vol: 3 p: 93-106.

Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410: 103-23.

Tait A, Hall FR. *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. *Revue Scientifique et Technique* 1990; 9: 387-403.

Theiler A. Rhodesian tick fever. *Transvaal Agricultural Journal* 1904; 2: 421-438.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997; 25: 4876-4882.

Trumpower B. The cytochrome bc₁ complex. *Encyclopedia of Biochemistry* 2004; 528-534.

Tüzer E. İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılımı üzerine araştırma. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1981; 8 (1): 97-100.

Uchida TA, Yanagawa H, Mori T, Shiraishi S. Ultrastructural observations of the intra-erythrocytic merozoite in *Theileria sergenti*. *Tropical Medicine and Parasitology* 1985; 36: 35-38.

Uilenberg G. Theilerial species of domestic livestock, in *Advances in the Control of Theileriosis*. Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (Eds). Martinus Nijhoff Publisher, The Hague 1981a; p 4-37.

Uilenberg G. Theileria infection other than East Coast Fever. In: Ristic M, Intyr IM (Eds), *Disease of cattle in the tropics*. Martinus Nijhoff Publisher, The Hague 1981b; p: 411-427.

Uilenberg G, Perie NM, Spanjer AAM, Franssen FFJ. *Theileria orientalis*, a cosmopolitan blood parasite of cattle; demonstration of schizont stage. *Revue scientifique et technique* 1985; 38: 352-357.

Ünsüren H. *Theileria annulata*'dan ileri gelen Theileriosisli bazı semoterapötiklerle tedavisi üzerine araştırmalar. Doçentlik Tezi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara 1976.

Ünsüren H, Kurtdede A. Ankara yöresinde görülen sığır theileriosisi'nin buparvaquone ile sağıltımı üzerine araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1988; 35 (1): 47-54.

Vaidya AB, Mather MW. A Post-genomik view of the mitochondrion in malaria parasites. *CTMI* 2005; 295:233-250.

Vatansever Z, Nalbantoglu S. Detection of cattle infected with *Theileria annulata* in fields by nested PCR, IFAT and microscopic examination of blood smears. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2002; 26: 1465-1469.

Vatansever, Z, Iça A, Deniz A, Nalbantoglu S, Karaer Z, Çakmak A ve Sparagano O. Ankara Yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon infeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB) ve indirekt floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13.Ulusal Parazitoloji Kongresi, 8-12 Eylül 2003, Konya. Program ve Özet Kitabı 2003; 194.

Visser AE, Abraham A, Sakyi LJ, Brown CG, Preston PM. Nitric oxide inhibits establishment of macroschizont-infected cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine tropical theileriosis or East Coast fever. *Parasite Immunology* 1995; 17: 91- 102.

Walker AR. Parasitic adaptation in the transmission of *Theileria* by ticks. A review, *Tropical Animal Health and Production* 1990; 22: 23-33.

Walker DJ, Wakefield AE, Dohn MN, Miller RF, Baughman RP, Hossler PA, Bartlett MS, Smith JW, Kazanjian P, Meshnick SR. Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *Journal of Infectious Diseases* 1998;178: 1767–1775.

Wang P, Brooks DR, Sims PFG, Hyde JE. A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1995; 71: 1, 115–125.

Wang Y, Rollin JA, Zhang YHP. Enhancing allele-specific PCR for specifically detecting short deletion and insertion DNA mutations. *Molecular and Cellular Probes* 2010; 24: 15–19.

Wargo AR, Huijben S, Roode JC, Shepherd J, Read A. Competitive release and facilitation of drug-resistant parasites after therapeutic chemotherapy in a rodent malaria model. 2007;104:50, 19914–19919.

Watt DM, Walker AR, Lamza KA, Ambrose NC. Tick-*Theileria* interactions in response to immune activation of the vector. *Experimental Parasitology* 2001; 97 (2): 89-94.

Weir W. Genomic and population genetic studies on *Theileria annulata*. Doktora tezi. University of Glasgow, Scotland 2006.

Weir W, Ben Miled L, Karagenc T, Katzer F, Darghouth M, Shiels B, Tait A. Genetic exchange and sub-structuring in *Theileria annulata* populations. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2007; 154: 170-180.

Weir W, Karagenc T, Gharbi M, Simuunza M, Aypak S, Aysul N, Darghouth MA, Shiels B, Tait A. Population diversity and multiplicity of infection in *Theileria annulata*. *International Journal for Parasitology* 2011; 41: 193–203.

Weiss LM, Ki K. *Toxoplasma gondii* the model apicomplexan perspectives and methods. Printed in Great Britain: 1st edition, Elsevier Ltd. 2007.

Wichmann O, Muehlberger N, Jelinek T, Alifrangis M, Peyerl-Hoffmann G, Muhlen M, Grobusch MP, Gascon J, Matteelli A, Laferl H, Bisoffi Z, Ehrhardt S, Cuadros J, Hatz C, Gjorup I, McWhinney P, Beran J, da Cunha S, Schulze M, Kollaritsch H, Kern P, Fry G, Richter J. Screening for mutations related to atovaquone/proguanil resistance in treatment failures and other imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 190 (9):1541-6.

Wiesner RJ, Ruegg JC, Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992; 183: 553-559.

Williamson S, Tait A, Brown D, Walker A, Beck P, Shiels B, Fletcher J, Hall R. *Theileria annulata* sporozoite surface antigen expressed in *Escherichia coli* elicits neutralizing antibody. *Proceedings of National Academy of Science USA* 1989; 86: 4639-4643.

Yaman N. Ankara Çubuk yöresinde Tropikal Theileriosis'e karşı aşılanan sığırlarda aşılama sonrası seroepidemiolojik çalışmalar. Doktora Tezi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Programı. Ankara, Türkiye 1998.

Yin H, Luo JX, Schnittger L, Lu BY, Beyer D, Ma ML, Guan GQ, Bai Q, Lu CP, Ahmed J. Phylogenetic analysis of *Theileria* species transmitted by *Haemaphysalis qinghaiensis*. *Parasitology Research* 2004; 92: 36–42.

Young AS, Leitch BL. Epidemiology of East Coast fever: some effects of temperature on the development of *Theileria parva* in the tick vector, *Rhipicephalus appendiculatus*. *Parasitology* 1981; 83 (1): 199-211.

Yukarı BA. Laboratuvarıda *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch,1844) Kolonisinin Elde Edilmesi ve Muhafazası. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1993; 40 (1): 99-114.

Zablosky VT. Specific prevention of bovine theileriosis in the USSR. In: TT Dolan (Ed), Recent Development in the Research and Control of *T. annulata*. Proceedings of Workshop Held at ILRAD Nairobi, Kenya, 17-18 Sept, 1990; 29-31.

Zarlenga DS, Chute MB, Gasbarre LC, Boyd PC. A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. Veterinary Parasitology 2001; 97: 199–209.

Zhang ZH. *Theileria annulata* and its control in China. Ed, Singh DK, Varshney BC, Orientation and Coordination of research on Theileriosis. Proceeding of the second EEC Workshop 18-22 March 1991, National Dairy Development, Anand, India 1991; 11-14.

Zimmer G. Membrane structure in disease and drug therapy. Published by Marcel Dekker, Inc. 2000.

TEŞEKKÜR

Bana her türlü desteği sağlayan başta eşim ve ailem olmak üzere, doktora tezimin çalışmalarında ve hazırlanmasında bana her türlü imkanı veren Danışman Hocam Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ ile Anabilim Dalı başkanı olan hocam Prof. Dr. Hasan EREN'e ve yetişmemde emeği geçen tüm anabilim dalımız öğretim üyelerine teşekkür ederim. Bunun yanında doktora çalışmalarım esnasında bana her türlü yardımı esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Serkan BAKIRCI, Araş. Gör. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ, Uzman Biyolog Hakan ÜNLÜ, Biyolog Ayça AKSULU, Dr. Zeeshan Durranni ile diğer tüm iş arkadaşlarıma desteklerinden ve gösterdikleri hoşgörüden ötürü teşekkür ederim. Ayrıca tezimin yapılışında bana kendi laboratuvarlarında çalışma imkanı verip, her türlü materyalin sağlanmasında yardımcı olan ve yaptığım çalışmalarda bana yol gösteren Prof. Dr. Andrew Tait, Prof. Dr. Brian Shiels ve Dr. William Weir'e ayrıca teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İzmir İli'nin Bornova İlçesi'nde doğdu. İlkokulu Özel İzmir Lisesi'nde, ortaokulu Yahya Kemal Beyadlı Ortaokulu'nda, liseyi Atakent Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2000 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne kayıt oldu. 2007 yılında mezun olduktan sonra Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı ve 2012 yılında aynı bölüme Araştırma Görevlisi olarak atandı. Evli olup, yabancı dili İngilizce'dir.