



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
VPR-DR-2014-001

**AYDIN, İZMİR, MANİSA İLLERİNDEKİ SIĞIRLARDA
Theileria ve *Babesia* TÜRLERİNİN REVERSE LİNE BLOT
HİBRİDİZASYON TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ**

Uzman Veteriner Hekim Gülcan PEKEL

DANIŞMAN: Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ

AYDIN- 2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
VPR-DR-2014-001**

**AYDIN, İZMİR, MANİSA İLLERİNDEKİ SIĞIRLARDA
Theileria ve *Babesia* TÜRLERİNİN REVERSE LİNE BLOT
HİBRİDİZASYON TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ**

Uzman Veteriner Hekim Gülcan PEKEL

DANIŞMAN: Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ

AYDIN- 2014

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

Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Gülcan PEKEL (KIRLI) tarafından hazırlanan tarafından hazırlanan “**Aydın, İzmir, Manisa İllerindeki Sığırlarda *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Reverse Line Blot Hibridizasyon Tekniği ile Belirlenmesi**” başlıklı tez, 14/03/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

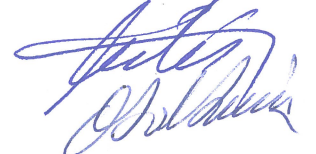
1- Prof. Dr. Hasan EREN

Adnan Menderes



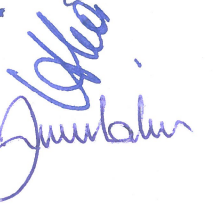
2- Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ

Adnan Menderes



3- Doç. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR

Adnan Menderes



4- Doç. Dr. Anıl İÇA

Dumlupınar

5- Yrd. Doç. Dr. Serkan BAKIRCI

Adnan Menderes

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr.Sacide KARAKAŞ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Kan parazitlerinin yol açtığı theileriosis ve babesiosis, dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde yaygın olarak görülen, özellikle kültür ırkı sığırlarda ciddi sağlık problemlerine neden olan önemli hastalıkların başında gelmektedir. Tropikal theileriosis etkeni olan *Theileria annulata*, *Hyalomma* soyuna bağlı 15 kene türü tarafından doğal ya da deneysel olarak nakledilebilmektedir. Babesiosis etkenlerinden özellikle *Babesia bovis* ve *B. bigemina* türleri ise Ixodidae ailesine bağlı farklı kene türleri tarafından nakledilmektedir. Türkiye'nin coğrafik konumu ve iklim kuşağı dikkate alındığında ülkemizde sığırlarda bu iki hastalık yaygın olarak görülmektedir. Aynı zamanda bu hastalıkların aynı saha şartları altında bulunabilmesi ve hatta bir hayvanda aynı anda görülebilmesi önemli bir husustur. Aydın, İzmir, Manisa gibi kültür ırklarının gerek suni tohumlama gerekse canlı hayvan ithalleri ile yetiştirilmeye çalışıldığı ve teşvik edildiği illerde bu hastalıklar büyük ekonomik zararlara yol açmaktadır. Ayrıca Türkiye'de *Theileria buffeli* gibi apatojen organizmaların varlığı da patojen etkenlerin teşhisini zorlaştırmaktadır. Bu sebeplerle yaygın olarak görülen bu hastalıklara karşı gerekli kontrol programlarının gerektiği şekilde uygulanabilmesi için doğru epidemiyolojik verilere ihtiyaç duyulmaktadır. Gerçek epidemiyolojik çalışmaların yapılabilmesi ise tanı metodlarının ne kadar duyarlı ve güvenilir olduğuna bağlıdır.

Keneler tarafından bulaştırılan kan parazitlerinin meydana getirdiği miks enfeksiyonlara sıklıkla rastlanılmaktadır. Böyle durumların teşhisinde, reverse line blot hibridizasyon tekniği gibi aynı anda pek çok enfeksiyonun varlığını gösterebilen moleküler teknikden yararlanılmaktadır. Hem vektör kenede hem de sığır kan örneklerinde *Babesia*, *Theileria* türlerinin ve diğer kan parazitlerinin varlığının eş zamanlı teşhisinde, Reverse Line Blot tekniğinin başarısı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Ayrıca bu teknikte hazırlanan bir blot, PCR ürünü uzaklaştırılarak defalarca kullanılabilen bu da testin kullanımında büyük avantajlar sağlamaktadır.

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Programı (BAP) tarafından desteklenen bu çalışmada, sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin Reverse Line Blot hibridizasyon tekniği ile Aydın, İzmir ve Manisa illerinde bulunan sığırlarda saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla Aydın, İzmir ve Manisa illerine bağlı çeşitli odaklardan (Aydın- Merkez, Yenipazar, Çine, Söke; İzmir- Tire, Aliağa, Kınık; Manisa- Alaşehir, Gölarmara,) Haziran 2006 - Eylül 2008 tarihleri arasında Dr. Serkan Bakırcı'nın "Batı Anadolu Bölgesi sığırlarında görülen kene türleri ve yaygınlığı" isimli doktora çalışması sırasında toplamış olduğu sığır kan örnekleri (ayda bir kez aynı sığırlardan olmak üzere) kullanılarak bölgedeki bu parazitlerin yoğunluğu hakkında veriler elde edilecektir.

Bu çalışma ile *Theileria* spp. ve *Babesia* spp. gibi sığırlarda yaygın olarak görülen kan parazitlerinin ayırıcı tanımlarını ortaya koymak amacıyla reverse line blot hibridizasyon tekniği geliştirilmiş olup; adı geçen parazitlerin epidemiyolojisinin aynı anda belirlenmesi olanağını sağlayacaktır. Böylece pek çok parazitin ayrı ayrı epidemiyolojik araştırmalarını yapmak için harcanılan zaman ve maddi harcamaları azaltarak ekonomiye büyük katkıda bulunulacaktır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
RESİMLER DİZİNİ	xviii
GİRİŞ	1
1. THEİLERİA	3
1.1. Tarihçe	3
1.2. Sistematikteki Yeri	4
1.3. Sığırlarda Önemli <i>Theileria</i> Türleri	5
1.3.1. <i>Theileria annulata</i>	5
1.3.2. <i>Theileria parva</i>	6
1.3.3. <i>T. sergenti/buffeli/orientalis</i>	7
1.3.4. <i>Theileria sinensis</i>	9
1.3.5. Diğer <i>Theileria</i> Türleri	10
1.4. Türkiye’de Theileriosis	14
1.5. <i>Theileria</i> Yaşam Döngüsü	19
1.5.1. <i>Theileria</i> sporozoitlerinin yapısı	21
1.5.2. <i>Theileria</i> sporozoitlerinin lenfositlere girişi	21
1.5.3. Sporozoit yüzey katmanının atılması	24

1.5.4. Memeli konak lenfositlerinde gelişim	24
1.5.5. <i>Theileria</i> merozoitlerinin sığır eritrositlerine girişi	26
1.5.6. Kenede gelişim	27
1.6. Klinik Bulgular ve Patogenez	29
1.7. Nekropsi Bulguları	31
1.8. Bağışıklık	31
1.9. Tropikal Theileriosisde Tanı	35
1.9.1. Klinik Bulgular ve Mikroskopik Tanı	35
1.9.2. Serolojik Tanı	36
1.9.2.1. İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ve Enzim Bağımlı İmmunosorbent Testi (ELISA)	36
1.9.2.2. Lateral Flow İmmunokromatografik Test	39
1.9.3. Moleküler Tanı	40
1.10. Tedavi	42
1.11. Korunma ve Kontrol	43
1.11.1. Vektör Kenelerle Mücadele	43
1.11.2. Aşılama	44
1.11.3. Dirençli Irkların Kullanılması	46
2. BABESİA	47
2.1. Tarihçe	47
2.2. Sistematikdeki Yeri	48
2.3. Sığırlarda Önemli <i>Babesia</i> Türleri	50
2.3.1. <i>Babesia bovis</i>	50
2.3.2. <i>Babesia bigemina</i>	51
2.3.3. <i>Babesia divergens</i>	51
2.3.4. <i>Babesia major</i>	52
2.3.5. <i>Babesia jakimovi</i>	52
2.4. Türkiye’de Sığırlarda Babesiosis	55
2.5. Türkiye’de İnsanlarda Babesiosis	58
2.6. <i>Babesia</i> Yaşam Döngüsü	60
2.6.1. Omurgasız Arakonaktaki Dönem	62
2.6.2. Omurgalı Konaktaki Dönem	64

	Sayfa
2.7. Bağışıklık	65
2.7.1. Doğuştan Gelen Bağışıklık Mekanizması	65
2.7.2. Kazanılmış Bağışıklık	67
2.8. Klinik Bulgular ve Patogenez	68
2.9. Babesiosisde Tanı	71
2.9.1. Mikroskopik Tanı Metotları	71
2.9.1.1. Kalın ve İnce Yayma Kan Frotisi	71
2.9.1.2. Beyin Yayma Preparatları	73
2.9.1.3. Hemolenf Yayma Preparatları	73
2.9.2. Serolojik Tanı	76
2.9.2.1. İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ve Enzim Bağımlı İmmunosorbent Testi	76
2.9.2.2. İmmunokromatografi Testi (ICT)	79
2.9.3. Moleküler Tanı	80
2.10. Tedavi, Korunma ve Kontrol	84
3. GEREÇ VE YÖNTEM	86
3.1. Çalışmada Kullanılan Materyal	86
3.2. Kan Örneklerinin Alınması	88
3.3. DNA Örneklerinin Hazırlanması	91
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	92
3.5. Reverse Line Blot Hibridizasyon Testi (RLB)	94
4. BULGULAR	99
4.1. RLB Sonuçlarının Görüntülenmesi	99
4.2. RLB Tekniği Sonuçlarının Değerlendirilmesi	100
5. TARTIşMA ve SONUÇ	131
ÖZET	139
SUMMARY	140
KAYNAKLAR	141
TEşEKKÜR	177
ÖZGEÇMİş	178

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMA-1:	Apikal membran antijen-1
BbMSA-2c:	Merozoit yüzey antijeni-2c
BbRAP-1:	Rhoptri ilişkili protein-1
BbSBP-1:	Yuvarlak vücut protein-1
BbSBP-4:	Yuvarlak vücut protein-4
BbTRAP:	Trombospondin-ilişkili anonim protein
BiICT:	<i>B. bigemina</i> immunokromatografi testi
BoICT:	<i>B. bovis</i> immunokromatografi testi
bp:	Baz çifti
β-tubulin:	Beta tubulin geni
CELISA:	Yarışmalı ELISA
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dNTP :	Deoksiribonükleosid-trifosfatların
ECF:	East Coast Fever
ELISA:	Enzim İşaretli İmmunosorbant Testi
fg:	Femtogram
For:	İleri yönlü (forward) primer
HSP70:	Isı şok proteini 70
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
ICT:	İmmunokromatografi testi
IFAT:	İndirekt Floresan Antikor Testi
IFN:	İnterferon
IL:	İnterleukin
kb:	Kilobaz

kDa:	Kilo Dalton
LAMP:	Loop Aracılı İzotermal Çoğaltma
LFD:	Lateral Flow immunokromatografik test
mg:	Miligram
MgCl ₂ :	Magnezyum klorür
mL:	Mililitre
mM:	Milimolar
µl:	Mikrolitre
µg:	Mikrogram
MHC sınıf I:	Doku uyuşum kompleksi sınıf I
MHC sınıf II:	Doku uyuşum kompleksi sınıf II
MMP:	Matriks metalloproteaz
MPSP:	Major piroplasm yüzey proteini
mLAMP:	Multipleks Loop Aracılı İzotermal Çoğaltma
mPCR:	Multipleks (çoklu) PCR
nPCR:	nested-PCR
<i>m</i> sp:	Major yüzey proteini
mtDNA:	Mitokondriyal DNA
ng:	Nanogram
NK:	Doğal öldürücü hücreler
NO:	Nitrik Oksit
OD:	Cut off değerleri
UV:	Ultraviyole
PBM:	Periferel kan mononükleer hücreleri
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAP-1:	Rhoptri ilişkili-protein-1
RLB:	Reverse line blot
rRNA:	Ribozomal RNA
RAPD:	Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA
RNI:	Reaktif nitrojen araçları
ROI:	Reaktif oksijen araçları (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri)
SBPs:	Yuvarlak vücut proteinleri
SPAG-1:	<i>Theileria annulata</i> sporozoit yüzey antijeni

ssu rRNA:	Ribozomal RNA küçük alt ünitesi
Tamr-1:	<i>Theileria annulata</i> merozoit rhoptri antijeni
Tams-1:	<i>Theileria annulata</i> merozoit / piroplasm yüzey antijeni
TaSP:	<i>Theileria annulata</i> yüzey proteini
TaD :	<i>Theileria annulata</i> şizont yüzey antijeni
TaSE:	<i>Theileria annulata</i> şizont proteini
TamTHSP70:	<i>Theileria annulata</i> mitokondriyal ısı şok proteini
Taq:	<i>Thermus aquaticus</i>
TG-ROC:	İki grafik alıcı-çalışma özelliği
TNF:	Tümör Nekrozis Faktör
TRAP:	Trombospondin-ilişkili anonim protein
VESA:	Değişken eritrosit yüzey antijeni
VMSAs:	<i>Babesia</i> merozoit yüzey antijenleri

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1. Sığırlarda görülen <i>Theileria</i> türlerinin karakteristik özellikleri	10
Çizelge 3.1. 2006 yılında aylara göre odaklardan toplanan kan örneklerinin sayısı	89
Çizelge 3.2. 2007 yılında aylara göre odaklardan toplanan kan örneklerinin sayısı	89
Çizelge 3.3. 2008 yılında aylara göre odaklardan toplanan kan örneklerinin sayısı	90
Çizelge 3.4. PCR şartları	93
Çizelge 3.5. RLB hibridizasyon tekniğinde kullanılan oligonükleotidler, sulandırma konsantrasyonları ve dizilimleri	95
Çizelge 4.1. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Aydın İlindeki odaklarda <i>Theileria annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	102
Çizelge 4.2. Reverse line blot tekniği sonucuna göre İzmir İlindeki odaklarda <i>Theileria annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	110
Çizelge 4.3. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Manisa İlindeki odaklarda <i>Theileria annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	116
Çizelge 4.4. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Aydın, İzmir ve Manisa İlleri genelinde <i>Theileria annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	121
Çizelge 4.5. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Aydın İlindeki odaklarda <i>Babesia bovis</i> 'in aylara göre dağılımı	126

Çizelge 4.6.	Reverse line blot tekniği sonucuna göre İzmir İlindeki odaklarda <i>Babesia bovis</i> 'in aylara göre dağılımlı	126
Çizelge 4.7.	Reverse line blot tekniği sonucuna göre Manisa İlindeki odaklarda <i>Babesia bovis</i> 'in aylara göre dağılımlı	127
Çizelge 4.8.	Reverse line blot tekniği sonucuna göre Aydın İlindeki odaklarda <i>Babesia bigemina</i> 'nın aylara göre dağılımlı	129
Çizelge 4.9.	Reverse line blot tekniği sonucuna göre İzmir İlindeki odaklarda <i>Babesia bigemina</i> 'nın aylara göre dağılımlı	129
Çizelge 4.10.	Reverse line blot tekniği sonucuna göre Manisa İlindeki odaklarda <i>Babesia bigemina</i> 'nın aylara göre dağılımlı	130

GRAFİKLER

	Sayfa
Grafik 4.1. Aydın İli Yenipazar ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	103
Grafik 4.2. Aydın İli Çine ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	104
Grafik 4.3. Aydın İli Söke ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	105
Grafik 4.4. Aydın İli merkez ilçesi Osmanbükü'nde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	106
Grafik 4.5. Aydın İli genelinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	107
Grafik 4.6. İzmir İli Tire ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	111
Grafik 4.7. İzmir İli Aliağa ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	112
Grafik 4.8. İzmir İli Kınık ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	113
Grafik 4.9. İzmir İli genelinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	114
Grafik 4.10. Manisa İli Alaşehir ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	117
Grafik 4.11. Manisa İli Gölarmara ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	118

Grafik 4.12.	Manisa İli genelinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımı	119
Grafik 4.13.	Aydın, İzmir ve Manisa İlleri genelinde 2006 yılı <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımının karşılaştırılması	122
Grafik 4.14.	Aydın, İzmir ve Manisa İlleri genelinde 2007 yılı <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımının karşılaştırılması	123
Grafik 4.15.	Aydın, İzmir ve Manisa İlleri genelinde 2008 yılı <i>T. annulata</i> 'nın aylara göre dağılımının karşılaştırılması	124

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. <i>T. annulata</i> piroplasm safhası	11
Şekil 1.2. <i>T. annulata</i> lenfosit proliferasyonu	11
Şekil 1.3. <i>T. parva</i> piroplasm safhası	12
Şekil 1.4. <i>T. parva</i> lenfosit proliferasyonu	12
Şekil 1.5. Sığırlarda enfeksiyon oluşturan önemli <i>Theileria</i> türlerinden <i>T. annulata</i> , <i>T. parva</i> , <i>T. sergenti</i> 'nin Dünya'da dağılımı	13
Şekil 1.6. <i>Theileria parva</i> 'nın yaşam döngüsü	20
Şekil 1.7. <i>Theileria</i> sporozoitlerinin sığır lenfositlerine giriş basamakları	23
Şekil 2.1. <i>B. bovis</i> 'in beyin kapillar damarlarında yerleşimi	53
Şekil 2.2. <i>B. bovis</i> piroplasm safhası	53
Şekil 2.3. <i>B. bigemina</i> piroplasm safhası	54
Şekil 2.4. <i>Babesia bigemina</i> yaşam döngüsü	61
Şekil 2.5. Doymuş <i>Rhiphicephalus microplus</i> 'un hemolenfinden elde edilen <i>B. bigemina</i> 'nın kinet safhası	75
Şekil 3.1. RLB tekniğinde hibridizasyon prensibi	96
Şekil 3.2. Membrana spesifik oligonükleotidlerin, PCR ürünlerinin uygulanma şekli ve hibridizasyon gerçekleştiğinde oluşan pozitif sinyaller	98

RESİMLER

	Sayfa
Resim 3.1. Çalışmada belirlenen odakların (Aydın ili Merkez-Osmanbükü, Yenipazar, Çine, Söke; İzmir ili Tire, Aliğa, Kınık; Manisa ili Gölarmara, Alaşehir ilçeleri) coğrafik yerleşim haritası	87
Resim 3.2. Biodine-C membranın MN45 miniblottera yerleştirilmesi	94
Resim 4.1. <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> türleri ile enfekte sığır kanlarından elde edilen DNA'ların hibridizasyon sonuçları. Problar; (A) <i>Theileria/Babesia</i> catch all (B) <i>T. annulata</i> (C) <i>T. buffeli</i> (D) <i>B. bigemina</i> (E) <i>B. bovis</i> (F) <i>B. divergens</i> Kontrol DNA örnekleri; (1) <i>T. annulata</i> (2) <i>T. buffeli</i> (3) <i>B. bovis</i> (4) <i>B. bigemina</i> (5) <i>B. divergens</i>	100

GİRİŞ

Sığırlarda *Theileria* ve *Babesia* türleri kenelerle nakledilen özellikle sığır ve küçük ruminantları etkileyen haemoprotozoon parazitlerdir. Özellikle tropikal ve sıcak iklime sahip ülkelerde yaygın olarak görülen bu parazitler, hayvan sağlığında ve hayvancılıkta ciddi ekonomik problemlere yol açmaktadır (Altay ve ark 2008). Türkiye de bulunduğu coğrafik konumu itibari ile iklim şartları bakımından viral, bakteriyel, riketsiyal ve paraziter hastalıklara açık bir bölgede yer almaktadır.

Türkiye’de hayvancılık tarım ekonomisinin önemli bir bölümünü kapsamakta olup, 2012 yılı itibari ile 13.914.912 sığır varlığı bulunmaktadır (<http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi>). Fakat hayvan sayısının fazla olmasına rağmen elde edilen hayvansal ürün miktarı yeterli olmamaktadır. Bu nedenle ülkemizde kültür ırkı sığır üretiminin teşvik edilmesi, yüksek verimli sığır ırklarının ithali ve bunların düşük verimli ırklarla melezlenmesi çalışmaları arttırılmaktadır. Ancak kültür ırkı sığırlar yerli ırklara göre viral, bakteriyel ve paraziter hastalıklara daha duyarlı olması hayvancılığı olumsuz etkileyen diğer sebepler arasında yer almaktadır.

Türkiye’de yaygın olarak sığır yetiştiriciliğini etkileyen en önemli protozoer hastalıkların başında theileriosis ve babesiosis gelmektedir. Sığırlarda *Theileria annulata*, *Theileria parva*, *Theileria sergenti/buffeli/orientalis*, *Theileria mutans*, *Theileria taurotragi* ve *Theileria velifera* türleri enfeksiyon oluşturmaktadır. Ancak Türkiye’de *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türleri görülmektedir (Aktaş ve ark 2006, Altay ve ark 2007). *Theileria annulata* sığırlarda yüksek morbidite ve mortaliteye sahip lenfoproliferatif seyirli hastalığa neden olurken, *Theileria buffeli/orientalis* ılımlı ve

asemptomatik seyirli bir hastalık tablosu göstermektedir. Sığırlarda babesiosis'e neden olan *Babesia* türleri ise *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Babesia divergens* ve *Babesia major*'dur. *Babesia* türleri vektör kenelerinin dağılımı ile orantılı olarak geniş bir bölgede dağılım göstermektedir. Türkiye'de *Babesia* türlerinden *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* ve *B. major* türleri görülmektedir (Altay ve ark 2008). Ancak ülkemizde *B. bovis* ve *B. bigemina*'dan kaynaklanan ekonomik kayıplar daha fazladır. Türkiye'nin birçok bölgesinde her iki *Babesia* türünün vektörü olan *Rhipicephalus annulatus* kene türü hastalığı taşımaktadır. Bu nedenle hayvan sağlığında ve yetiştiriciliğinde göz önünde bulundurulması gereken iki önemli *Babesia* türü vardır (Altay ve ark 2008, Sevgili ve ark 2010). Ayrıca *Babesia*'nın bazı türlerinin *B. microti* (WA-1, MO-1 suşları), *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. duncani*, *B. venatorum* ve *Babesia* KO-1 olarak adlandırılan (koyun *Babesia* türlerine benzer) yeni bir türün zoonoz olduğu bildirilmiştir (Hunfeld ve ark 2008, Vannier ve Krause 2009, Colwell ve ark 2011). Bu nedenle insan sağlığı açısından da *Babesia* türlerinin önemi göz önünde bulundurulmalıdır.

Theileria ve *Babesia* türleri sığırlarda akut hastalık tablosu oluşturmaktadır. Hastalık esnasında hayvanlarda verim kayıpları oluşmakta, hastalığı atlatan hayvanlar hastalık etkenlerini uzun süre eritrositler içerisinde taşıyarak rezervuar rolü oynamakta ve vektör kenelerin enfeksiyon kaynağı olmaktadır. Bu nedenle saha şartlarında hastalıkların kontrolünde kullanılacak koruma programlarının oluşturulmasında hayvanlardaki *Theileria* ve *Babesia* türlerinin yaygınlığının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Theileria ve *Babesia* türlerinin tespiti amacıyla enfekte hayvanların kanından hazırlanan frotilerin Giemsa ile boyanması sonucu mikroskop altında incelenmesi geleneksel bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem her enfekte hayvan için ayrı ayrı uygulanmaktadır ve genellikle akut enfeksiyonların tespitinde yeterli değildir. Taşıyıcı hayvanların tespitinde ya da paraziteminin çok düşük olduğu durumlarda yeterli değildir. Ayrıca tespit edilen türlerin patojen veya apatojen bir tür olup olmadığı kesin olarak ayırt edilememektedir. Serolojik testler epidemiyolojik çalışmalarda subklinik enfeksiyonların tanısında kullanılmaktadır. Bununla beraber kross-reaksiyonlar veya zayıf spesifik immun cevaplardan kaynaklanan yanlış negatif ya da yanlış pozitif sonuçların görülmesi de serolojik testlerin sensitivitesi ve spesifitesinin tartışılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle piroplazmaların tanısında sensitivitesi ve spesifitesi yüksek

metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde oldukça hızlı gelişme gösteren moleküler testlerden, türlere spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve PCR'a dayalı reverse line blot hibridizasyon testi (RLB) *Theileria* ve *Babesia* türlerinin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. RLB hibridizasyon testi etkin ve pratik bir yöntemdir. Düşük parazitemi seviyelerini bile tespit ederken, spesifik oligonükleotid problemleri kullanılarak *Theileria* ve *Babesia* türlerinin eş zamanlı tespitine de imkan sağlamaktadır (Almeria ve ark 2002, Dumanlı ve ark 2005, Garcia-Sanmartin ve ark 2006, Altay ve ark 2008).

Bu çalışma Türkiye'de özellikle kültür ırkı sığır yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı ve Türkiye hayvan varlığının % 7.9'unun bulunduğu Aydın, İzmir ve Manisa illerinde yapılmıştır. Sığır yetiştiriciliğinin önemli olduğu ve konumu itibari ile Ege Bölgesi'nde yer alan bu çalışma bölgesi, protozoer hastalıkların da yoğun olarak görüldüğü bölgelerdir. Bu çalışma Aydın, İzmir, Manisa illerinde sığırlarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin yaygınlığının belirlenmesi ve parazitemi oranlarının tespiti amacıyla RLB hibridizasyon tekniği kullanılarak yapılmıştır.

1. THEILERIA

1.1.Tarihçe

Koch 1897 yılında sığırlarda "Redwater" hastalığını araştırırken hasta sığırların eritrositlerinde *B. bigemina*'nın genç formları olduğunu düşündüğü *B. bigemina*'dan daha ufak, çomak, oval ve yuvarlak yapıları organizmalara rastlamıştır. Koch ve Theiler bu organizmaları araştırmış ve 'Koch cisimcikleri' olarak bilinen plazma cisimciklerini tanımlamıştır. Theiler bu plazma cisimciklerine *Theileria parva* adını vermiştir. Bu cisimciklerin daha sonra Gonder tarafından *Theileria parva*'nın şizogoni dönemine ait olduğu bildirilmiştir (Neitz 1957). 1904 yılında Dschunkowsky ve Luhs ilk kez Kafkasya sığırlarında Doğu Sahil Humması etkeni *Theileria parva*'nın eritrosit içerisindeki çubuk formuna benzerlik gösteren *Theileria annulata*'yı tespit etmiş; fakat eritrosit içindeki halka formlarının çoğunlukta olması nedeniyle *Theileria annulata*'yı *Piroplasma annulatum*

olarak adlandırmışlardır. 1907 yılında Bettencourt, Franca ve Borges *Theileria* cins adını önererek *Theileria annulata* olarak değiştirmişlerdir (Neitz 1957, Mimioğlu 1985). Sergent ve arkadaşları 1924 yılında Kuzey Afrika'da görülen hastalığı oluşturan organizmanın farklı bir hastalığın etkeni olduğunu düşünerek *Theileria dispar* adını vermişlerdir. Aynı yıllarda Türkistan'da da başka bir tür olduğu düşünülen parazite *Theileria turkestanica* ismi verilmiştir (Levine 1985). 1948-1949 yıllarında Dschunkowsky ve Delpy'nin önerileriyle bu parazitlerin ayrı ayrı isimlerle ifade edilmesi yerine *Theileria annulata* olarak tek isimde toplanmasına karar verilmiştir (Mimioğlu 1985).

1.2.Sistematikdeki Yeri

Theileria türlerinin sistematikdeki yeri aşağıda verilmiştir (Uilenberg 1981, Levine 1988, Soulsby 1982).

Alem: Animale

Alem altı: Protozoa

Anaç: Apikompleksa

Sınıf: Sporozoea

Sınıf altı: Piroplasmia

Dizi: Piroplasmida

Aile: Theileriidae

Soy: *Theileria*

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

Sığırlarda *Theileria* soyuna ait türlerin sınıflandırılmasında uzun yıllar piroplasmaların ve şizontların morfolojik yapıları, patojeniteleri, kene türüne spesifikliği, biyolojik karakterleri ve serolojik tanımlamaları dikkate alınmıştır. Ancak piroplasm morfolojisinin enfeksiyonun seyri sırasında değişebilmesi, bazı türlerde şizontların tanımlanamaması, serolojide türler arasında çapraz reaksiyonların görülmesi sınıflandırmada yeterli kriterler olmadıklarını göstermektedir. Son yıllarda parazitlerin

moleküler ve genetik farklılıkları üzerine yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkan filogenetik sınıflandırmalar *Theileria* soyunda bulunan türlerin sistematikteki yerinin tam anlamıyla tanımlanmadığını göstermektedir. Ancak Apikompleksa kökünde yer alan çoğu türün genom dizilimlerinin belirlenmesi ve bu konuda çeşitli genlerin (small subunit ribosomal RNA ve major piroplasm surface protein) filogenetik analizlerine dayalı çalışmalar bu köke ait türlerin sistematikteki yeri hakkında yeni bilgiler sunmaktadır (Kawazu ve ark 1999, Gubbels ve ark 2000, Kjemtrup ve ark 2000, Altay ve ark 2004).

1.3.Sığırlarda Önemli *Theileria* Türleri

Sığırlarda *T. parva*, *T. annulata*, *T. sergenti/buffeli/orientalis*, *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. sinensis* türleri görülmektedir. Bu türler arasında patojenite, morfoloji, biyoloji ve genetik yapı açısından önemli farklılıklar bulunmaktadır. *Theileria* türlerinin morfolojik olarak heterojen bir yapı göstermeleri nedeni ile tanımlanmaları zordur; fakat ağırlıklı olarak görüldüğü karakteristik özellikleri Tablo 1.1.'de verilmektedir. *T. parva* ve *T. annulata* en patojen iki tür olup, sığırlarda lenfoproliferatif karakterde, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden hastalıklara neden olmaktadır. Diğer *Theileria* türleri ise daha az patojen veya apatojen türler olarak kabul edilmektedir (Seifert 1996, Altay ve ark 2008). Türkiye'de sığırlarda *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türleri bulunmakta olup, bunlardan *T. annulata*'nın sebep olduğu tropikal theileriosis sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Altay ve ark 2007).

1.3.1. *Theileria annulata*

Theileria annulata, 'Tropikal theileriosis', 'Mısır Humması', 'Akdeniz sahil humması' veya 'Tropikal piroplasmosis' gibi isimlerle bilinen hastalığın etkenidir. Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu, Hindistan, Çin, Asya'nın bir bölümü ile Nil Vadisi'nden Sudan'a kadar uzanan geniş bir coğrafyada görülmektedir (Soulsby 1982, Robinson 1982, Levine 1985). Sığır, manda, zebu ve bizonlarda hastalığa neden olur.

T. annulata, *Hyalomma* soyuna bağlı 15 kene t¼r¼ tarafından doğal ya da deneysel olarak nakledilmektedir (Samish ve Pipano 1976, Robinson 1982, Dumanlı 1987). Hastalığı nakleden keneler arasında en ¼nemli olanları ¼ç konaklı *Hyalomma anatolicum* ve iki konaklı *Hyalomma detritum* (=H. *scupence*) t¼rleridir (Uilenberg 1981, Robinson 1982, Soulsby 1982). Hastalığın oldukça geniş bir coğrafyaya dağılması ve hayvanlarda sık olarak g¼r¼lmesi, evre koşulları ve iklimin hastalığı nakleden *Hyalomma* soyuna ait t¼rler için uygun şartlar oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Endemik b¼lgelerde enfeksiyonların çoğu Haziran-Eyl¼l ayları arasında g¼r¼lmesine karşın hastalığa yıl boyu sporadik olarak rastlamak m¼mk¼nd¼r (Pipano 1976, Purnell 1978, Flach ve Ouhelli 1992).

Morfolojik olarak *T. annulata* piroplasm formlarının % 80'ni yuvarlak ya da oval şekilde g¼r¼lmektedir (şekil 1.1.). Virg¼l, uzun ya da anaplasma benzeri nokta şeklindeki formları da g¼r¼lmektedir. Eritrositlerdeki piroplasm enfeksiyon oranı % 95'e kadar ulaşabilmektedir. şizontların lenfositleri enfekte etme oranı y¼ksek olup, şizont çapı genellikle 8 µm'dir (şekil 1.2.). Enfeksiyonda mortalite % 10- 90 arasında değişmektedir (Seifert 1996).

1.3.2. *Theileria parva*

Theileria t¼rleri arasında en patojen t¼r olan *Theileria parva*, G¼ney Afrika'da Batı Sahili Humması (ECF; East Cost Fever) adı ile bilinen hastalığa neden olmaktadır. *Rhipicephalus appendiculatus* (kahverengi kulak kenesi) tarafından nakledilmektedir. Yirminci y¼zyılın başlarında Avrupalıların kolonizasyonu ile birlikte duyarlı hayvanların kıtaya getirilmesi sonucu Batı Afrika'da da geniş bir dağılım alanı bulmuştur. Kontrol altına alınamadığı durumlarda ateş, lenfadenopati, pulmoner ¼dem ve ¼l¼mle seyreden hastalık, % 90'lara varan mortaliteye ulaşabilmektedir (Norval ve ark 1992, Lawrence ve ark 2006).

Theileria parva'nın East Cost Fever'a (ECF) neden olan *T. parva parva*, Koridor hastalığı'na neden olan *T. parva lawrencei* ve Zimbabwe theileriosisi'ne neden olan *T. parva bovis* olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır (Uilenberg ve ark 1982, Brown ve ark 1990, Bazarusanga 2008). Koridor hastalığı, bizonlarda bulunan *T. parva* türlerinin keneler tarafından nakledilmesi ile oluşan ve ECF'ye benzerlik gösteren bir hastalık tablosu oluşturur. Zimbabwe theileriosisi (Dönme hastalığı) ise *T. parva* kökenli enfeksiyonların anormal bir formundan kaynaklanan, enfekte lenfosit hücrelerinin beyin damarlarında çökelti oluşturması sonucu şekillenen ateşsiz, sinirsel bir hastalıktır (Lawrence ve ark 2006).

T. parva parva'da *T. parva lawrencei*'ne nazaran eritrositlerdeki görülme oranı yaklaşık % 50-80 arasında oldukça yüksek görülmektedir. *T. parva lawrencei*'de ise % 5 gibi çok düşük oranda piroplasm ile enfekte eritrositlere rastlanır. *T. parva parva*'da şizontların lenfositleri enfekte etme oranı yüksek olup, % 60- % 70'lere ulaşmaktadır. Şizont çapı ise 8 µm civarındadır (Şekil 1.4.). *T. parva lawrencei*'de anemi çoğunlukla görülmemekle birlikte, şizontların lenfositleri enfekte etme oranı oldukça düşüktür. *T. parva parva* piroplasm formlarına genellikle uzun yumurta şeklinde elipsoidal, *T. parva lawrencei* piroplasmına ise genellikle yuvarlak ya da oval formlarda rastlanmaktadır (Şekil 1.3.) (Seifert 1996).

1.3.3. *T. sergenti/buffeli/orientalis*

İyi huylu theileriosis etkeni olarak kabul edilen *T. sergenti/buffeli/orientalis* grubu parazitlerin patojenitesi ve sınıflandırmadaki yerleri konusunda tam olarak bir birlik sağlanamamakla birlikte, non-transformik *Theileria* türleri olarak adlandırılmaktadırlar (Fujisaki ve ark 1994, Kawazu ve ark 1999, Sugimoto ve Fujisaki 2002). Bu türlerin sınıflandırılması genellikle coğrafik orijinlerine dayandırılarak yapılmıştır. İzolatlar arasında makroşizontların oluşumu, tipik olmayan piroplasm morfolojisi ve vektör kene tercihleri gibi birçok biyolojik farklılıklar gözlenmektedir (Gubbels 2000). Transformasyon göstermeyen bu türleri patojen *Theileria* türlerinden ayırt eden en önemli özellik ise şizontlarının lökosit transformasyonu ve öldürücü lenfoproliferasyon

oluşturmamasıdır. Dolayısı ile hastalığın patogenezisinde şizontların hiç bir rolü yoktur. Bu nedenle patogenezisinde eritrositlerdeki piroplasm formları etkin rol oynamakta ve hastalığın belirtisi olarak anemi ön plana çıkmaktadır. Şizontlara sadece geçici bir süre lenf nodülleri, dalak ve karaciğerde rastlanmaktadır (Mehlhorn 2001, Sugimoto ve Fujisaki 2002).

Non-transformik *Theileria* türlerinin makroşizontları, enfektif sporozoitler tarafından konak hücrelere invazyonu takiben dalak ya da lenf nodülleri içerisindeki hücrelerde sadece geçici olarak bulunmaktadır. *In vivo* ya da *in vitro* çalışmalarda enfekte hücrelerin proliferasyonu hakkında kanıt bildirilmemiştir (Uilenberg ve ark. 1985, Sato 1993). *In vivo* çalışmalarda konak hücre yıkımı ile çok sayıda merozoitin serbest kalmasından önce, 4-8 günlük bir süreçte devamlı büyümeye maruz kalan şizont dikkati çekmektedir. Konak hücre çoğalması görülmeksizin, konak hücre büyüklüğünde önemli bir artış dikkati çekmektedir. Fakat moleküler seviyede hücreyi parazitin etkileyip etkilemediği ya da enfeksiyona karşı apoptotik cevabı engelleyip engellemediği bilinmemektedir (Hayashida ve ark 2012).

Serolojik ve morfolojik kanıtlara ve bulaşmalarına dair deneyimlere dayanarak bu parazitlerin bir türe ait olduğu, gerçekte Japonya, Kore ve Rusya'da bulunan *T. sergenti* olarak bilinen *Theileria* türünün *T. orientalis* olduğu ileri sürülmektedir. Avusturalya'da bulunan *Theileria* türleri ise *T. buffeli* olarak adlandırılmaktadır. Major piroplasm yüzey proteini ve 18S rDNA dizilimleri üzerine yapılan çalışmalarda *Theileria sergenti*/*T. buffeli*/*T. orientalis* parazitleri benign *Theileria* grubu olarak adlandırılmaktadır. Ancak günümüzde *T. sergenti* adı taksonomik olarak kullanılmamaktadır. Genellikle *T. orientalis/buffeli* olarak anılan bu parazitlerin açık taksonomik ayrımları çok iyi saptanamamıştır. Ancak bu parazitlerin MPSP dizilimlerinin karşılaştırılması sonucu 1-8 tip içerisinde sınıflandırılacakları gösterilmiştir. Bununla birlikte MPSP dizilimine dayanarak Avustralya, Brisbane'da bir benign *Theileria* türü (*T. buffeli*, Warwick) herhangi bir grup içerisinde sınıflandırılmamıştır (Kamau ve ark 2011).

Theileria orientalis enfeksiyonları genellikle anemi ve sarılık ile karakterizedir. Nadiren ölümcül enfeksiyona yol açmaktadır. Parazit sıklıkla *T. sergenti* olarak adlandırılmaktadır; fakat daha önce koyunların paraziti olarak da tanımlanan *T. sergenti*

ismi taksonomik olarak geçersiz kabul edilmiştir (Kamau ve ark 2011, Hayashida ve ark 2012). *T. orientalis*'in MPSP (Major piroplasm surface protein) ve p23 proteini parazitin eritrosit içerisindeki piroplasm safhası boyunca yüzeyinden salınan büyük immunodominant proteinlerdir. Aynı zamanda *T. orientalis*'in izolatları arasındaki önemli dizilim farklılıklarını gösteren proteinlerdir. Bu nedenle MPSP geninin dizilim analizi parazitin moleküler olarak doğrulanmasını sağlamaktadır (Kawazu ve ark 1992, Ota ve ark 2009). *T. orientalis*, ssrRNA ve major piroplasm surface protein (MPSP) gen dizilimindeki farklılıklara dayanılarak iki büyük genotip içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu iki genotip Chitose tip ve Ikeda tip olarak adlandırılmaktadır (Kubota ve ark 1996). Bu iki büyük genotip içerisinde belirlenen alt tipleri ile birlikte *T. orientalis* populasyonu Dünya çapında şimdiye kadar bilinen 8 genotipten oluşmaktadır. Bu genotipler Ikeda tip 2 ve 7; Chitose tip 1, 3, 4, 5, 8 ve N3 olarak bildirilmektedir (Zakimi ve ark 2006, Kim ve ark 2004, Khukhuu ve ark 2011). *T. orientalis* Ikeda tipi Japonya, Güney Kore, Çin'in kuzeydoğusu ve Avustralya'yı içeren doğu Asya ülkelerinde sınırlı bir yerleşim göstermektedir. Bu bölgelerde çiftlik hayvanlarında theileriosisin şiddetli klinik semptomları ve ciddi üretim kayıpları görülmektedir. Aksine *T. orientalis* Chitose tipi Dünya'da yaygın olup, benign enfeksiyon tablosu göstermektedir. Transformasyon gösteren *Theileria* türleri ile karşılaştırıldığında *T. orientalis*'in göreceli olarak ılımlı bir enfeksiyon oluşturduğuna inanılsa bile, kendi sınıflandırması içerisinde önemli bir patojen olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Hayashida ve ark 2012). Ayrıca yapılan çalışmalarda *T. orientalis*'in bazı suşlarının Doğu Sahil Humması'na benzer klinik semptomlar gösterebildiği bildirilmiştir (Levine 1985). Bununla birlikte *T. orientalis*'den kaynaklanan salgınların da son yıllarda Avustralya ve Yeni Zelanda'da bildirilmesi dikkatleri *T. orientalis* üzerine çekmiştir (Kamau ve ark 2011, Mc Fadden ve ark 2011).

1.3.4. *Theileria sinensis*

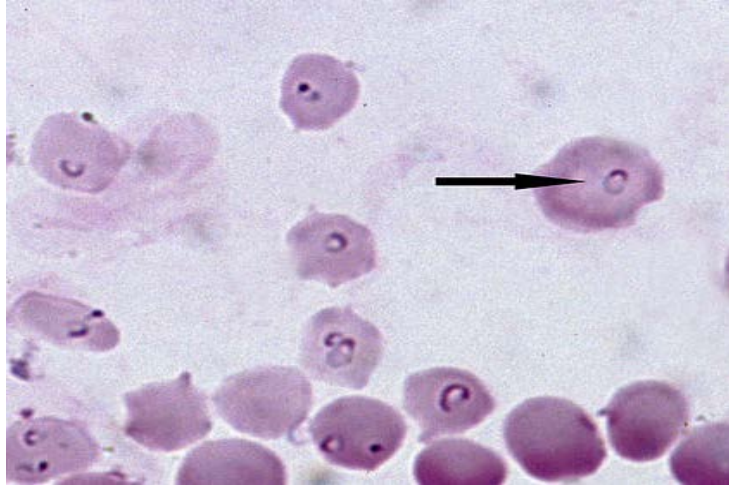
Son yıllarda yeni bir benign *Theileria* türü Çin'in Gansu bölgesinde keşfedilmiştir. *Theileria sinensis* adı verilen bu tür, *Haemaphysalis ginghaiensis* tarafından nakledilmektedir. Çin'in Gansu bölgesi merkezinde sığır ve yaklarda yaygın olarak görüldüğü bildirilmektedir (Bai ve ark 2002). Morfolojik olarak *T. sergenti*'den ayırt edilemeyen *T. sinensis*, ilerleyen kronik anemiye sebep olmaktadır. Mortalite, *T. sinensis* enfeksiyonunda nadir olarak görülmektedir (Liu ve ark 2012).

1.3.5. Diğer *Theileria* Türleri

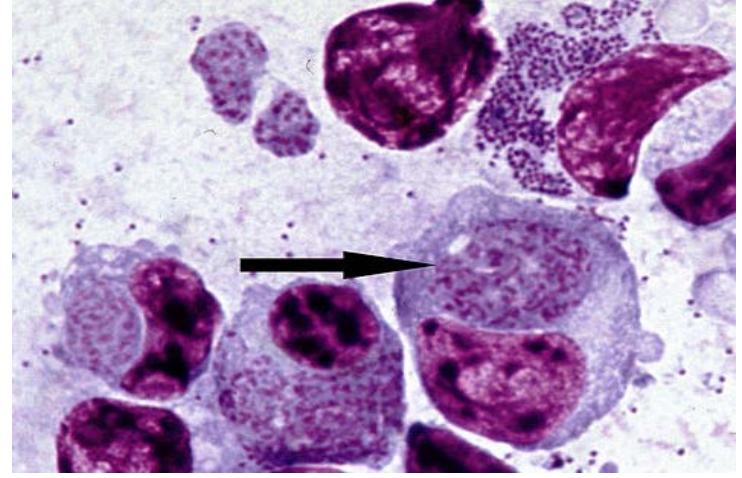
Theileria taurotragi, geyik ve antilopların paraziti olmakla birlikte sığırlarda da enfeksiyona neden olabilmektedir. Genelde *T. parva* ile beraber Dönme Hastalığı'na neden olan bu tür *Rhiphicephalus* türü keneler tarafından nakledilmektedir (de Vos ve ark 1981, Binta ve ark 1998). *T. velifera*, mandalarda görülmektedir. Sığırlarda patojeniteye sebep olmamaktadır. *Amblyomma* soyuna bağlı keneler tarafından nakledilmektedir (Shah-Fischer ve Say 1989). Afrika'da görülen *Theileria mutans*, Batı Afrika'da ciddi veya ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktadır. Yaşam döngüsü diğer *Theileria* türlerine benzer ancak parazitin asıl proliferasyonu piroplasm döneminde gerçekleşir (Lawrence ve ark 2006).

Çizelge 1.1. Sığırlarda görülen *Theileria* türlerinin karakteristik özellikleri

Türler	<i>T. parva parva</i>	<i>T. parva lawrencei</i>	<i>T. annulata</i>	<i>T. mutans</i>
Piroplasm formları	% 80 uzun	% 55 yuvarlak, oval	% 80 yuvarlak, oval	% 55 yuvarlak, oval
Eritrosit enfestasyon oranı	% 50-80 şiddetli	% 5 hafif	% 95 şiddetli	% 10
Şizont çapı	8 µm	5 µm	8 µm	8 µm
Lenfosit enfestasyon oranı	%60'dan fazlası	% 5	% 90	% 5
Anemi	Var	Çoğunlukla yok	Var	Hafif anemi
Mortalite	% 90-100	% 80	% 10-90	% 1



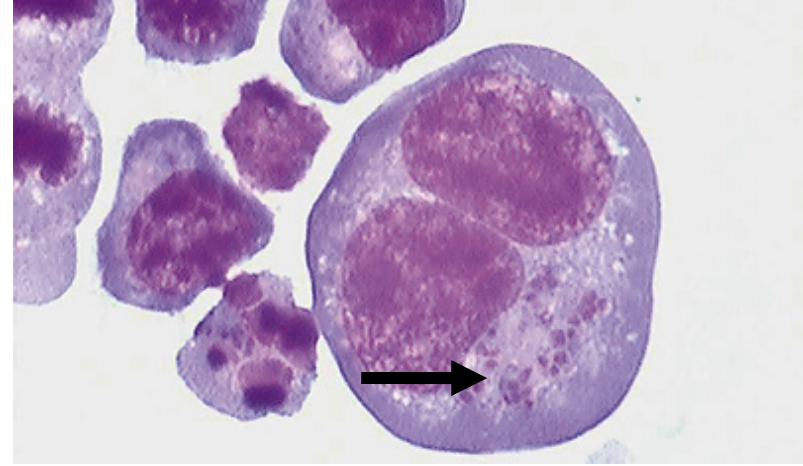
Şekil 1.1. *T. annulata* piroplasm safhası
(www.commonswikimedia.org)



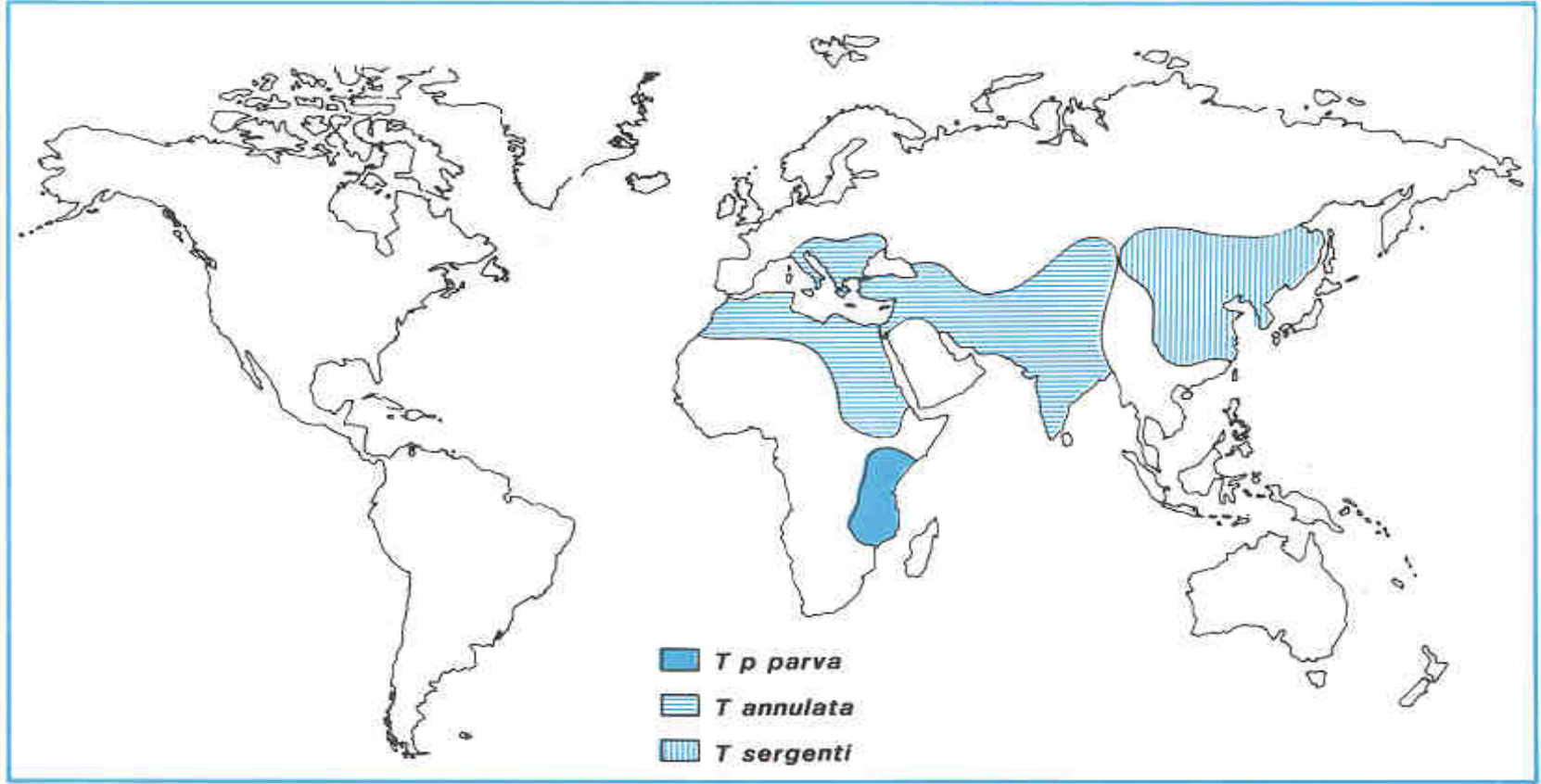
Şekil 1.2. *T. annulata* lenfosit proliferasyonu
(www.commonswikimedia.org)



Şekil 1.3. *T. parva* piroplasm safhası (www.itg.be)



Şekil 1.4. *T. parva* lenfosit proliferasyonu (www.itg.be)



Şekil 1.5. Sığırlarda enfeksiyon oluşturan önemli *Theileria* türlerinden *T. annulata*, *T. parva*, *T. sergenti*'nin Dünya'da dağılımı
(www.ilri.org)

1.4. Türkiye’de Theileriosis

Türkiye coğrafik konumu itibari ile Kuzey Yarım Küre’de, 36° - 42° Kuzey enlemleri, 26°-45° Doğu boylamları arasında Asya ve Avrupa kıtalarının kesişme noktasında yer alır. Dört mevsimin belirgin olarak yaşandığı ılıman kuşakta olup, birbirinden farklı iklimsel ve coğrafik yapıya sahip yedi bölgeye sahiptir. Türkiye bulunduğu bu coğrafik konumu nedeniyle paraziter hastalıklar ve vektör kenelerin yaşam alanı açısından uygun bir bölgede yer almaktadır. Türkiye’de sığırlarda özellikle *T. annulata*’nın sebep olduğu tropikal theileriosis sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Tropikal theileriosis Türkiye’nin bütün coğrafik bölgelerinde görülmektedir. Hastalık özellikle kenelerin çıkış zamanına bağlı olarak Mayıs ve Eylül aylarında yoğun görülmekte, yaz ortasında enfekte erişkin kene sayısındaki artışla birlikte pik yapmaktadır (Sayın ve ark 2003). *Theileria* türlerinden ılımlı ve asemptomatik seyirli *T. buffeli/orientalis* türü Türkiye’de görülen diğer bir *Theileria* türüdür. Türkiye’de *T. buffeli/orientalis* üzerine az sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, *T. annulata* üzerine yapılan çok sayıda epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır.

Türkiye’nin beş farklı bölgesinde *T. annulata*’nın sero-prevalansını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, en yüksek prevalans Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde % 91.4 oranında, en düşük prevalans ise İç Anadolu Bölgesi’nde % 29 oranında tespit edilmiştir. Takiben Karadeniz Bölgesi’nde % 46.8, Ege Bölgesi’nde % 40 ve Marmara Bölgesi’nde ise % 33.3 prevalans oranı tespit edilmiştir (Eren ve ark 1995). Mayıs 1997 – Mart 1998 tarihleri arasında Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde tropikal theileriosis’e karşı aşı yapılmamış sığırlarda IFA testi ile *T. annulata*’nın seroprevalansı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda sığırlarda *T. annulata* seropozitifliği Elazığ ilinde % 42.8, Malatya ilinde % 17.1, Tunceli ilinde % 34.8 olarak saptanmıştır (Aktaş ve ark 2001). Malatya yöresinde theileriosis’in epidemiyolojisini belirlemek üzere yapılan çalışmada ise meraya çıkan aşı sığırlarda % 46.15, meraya çıkan aşısız sığırlarda % 31.48, meraya çıkmayan aşısız sığırlarda % 12.19 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (Aktaş ve Çakmak 2001). Ankara ilinin Polatlı ilçesine bağlı 4 yerleşim bölgesindeki 147 sığırın serum örneğinin IFA testi ile incelenmesi sonucu *T. annulata*’nın yaygınlığı % 44.9 olarak tespit edilmiştir (Vatansever ve Nalbantoğlu, 2002). Eylül 2000-2002 tarihleri arasında Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi’ni kapsayan (Elazığ, Malatya, Bingöl, Muş, Van, Erzincan,

Erzurum, Kars, Adıyaman, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerine bağlı ilçe ve köyler) geniş bir alanda yürütülen çalışmada *T. annulata*'nın yaygınlığının tespiti amaçlanmıştır. IFAT ile en yüksek seropozitiflik % 81.2 oranı ile Şanlıurfa'da görülürken; bunu % 64.3, % 63.8, % 52.14, % 35.9, % 31.6 ve % 22.5 oranları ile Bingöl, Diyarbakır, Adıyaman, Elazığ, Muş, Malatya izlemiştir. En düşük seropozitiflik ise Erzurum (% 2.7), Erzincan (% 10.0) ve Van'da (%12.6) görülmüştür. Kars'ta 125 sığırın hiçbirinde *T. annulata*'ya karşı antikor tespit edilememiştir (Dumanlı ve ark. 2002). Ankara ve yöresinde Nisan 1990 – Ocak 1993 yılları arasında *T. annulata* enfeksiyonu üzerine epidemiyolojik bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada üç farklı ırka ait sığırlardan alınan örneklerde % 11.1 oranında piroplasmosis prevalansı belirlenirken, % 10.6 oranında ise seropozitiflik saptanmıştır (Sayın ve ark 2003). Kapadokya bölgesinde tropikal theileriosisin epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmada IFA testi ile *T. annulata* prevalansı % 67.5 oranında bulunmuştur (İnci ve ark 2008). Şanlıurfa ili ve çevresinde 191 sığırdan toplanan kan örneklerinden elde edilen serumlar IFA testi ile bakılarak, *T. annulata* % 72.25 ve *B. bigemina* % 43.97 seropozitif tespit edilmiştir (Sevgili ve ark 2010).

Türkiye'de *Theileria* türlerinin yaygınlığının moleküler olarak belirlendiği birçok çalışma mevcuttur. Ankara ilinin Polatlı ilçesine bağlı 4 yerleşim bölgesinde 147 adet sığır kan örneğinin nested-PCR ile incelenmesi sonucunda *Theileria* oranı % 61.2 olarak bildirilmiştir (Vatansever ve Nalbantoğlu 2002). Ankara bölgesinde *Theileria*, *Babesia* türlerinin RLB tekniği ile eş zamanlı tanısı ve bu parazitlerin epidemiyolojisi üzerine araştırma yapılmıştır. Türkiye'de ilk defa RLB tekniğinin kullanıldığı bu çalışmada % 36.6 *T. annulata*, % 11.8 *T. buffeli/orientalis* ve % 8.4 miks enfeksiyon tespit edilmiştir. Aynı zamanda Türkiye'de ilk defa *T. buffeli/orientalis*'in varlığı bu çalışma ile ortaya konmuştur (Vatansever ve ark 2002). Türkiye'nin doğusundaki 11 ilde moleküler yöntemlerden biri olan PCR testi kullanılarak yapılan çalışmada *T. annulata* en yaygın olarak Diyarbakır (% 74.6) ilinde tespit edilmiştir. Diğer illerdeki *T. annulata* oranı ise Şanlıurfa % 60.3, Elazığ % 60.2, Bingöl % 61.7, Muş % 58.7, Adıyaman % 43.1, Van % 27.8'dir. Daha az oranlarda Erzurum, Kars ve Erzincan'da % 1.4-6 olarak tespit edilmiştir (Dumanlı ve ark 2005). Doğu Anadolu Bölgesi'nde, 2004 yılında Haziran ve Temmuz ayları arasında, klinik olarak sağlıklı sığırlardan toplanan kan örnekleri PCR yöntemi ile incelenerek, bu sığırların *Theileria* türlerini taşıyıcılık oranının belirlenmesini amaçlayan çalışma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, sığırlarda *T. annulata* açısından

pozitiflik % 39 oranında belirlenirken, *Theileria buffeli/orientalis* türü ise % 7 oranında tespit edilmiştir (Aktaş ve ark 2006). Kayseri ve yöresinde kene enfestasyonu görülen sığırlarda *Theileria* ve *Babesia* türlerini taşıyıcılık durumu ile enfekte kenelerde görülen *Theileria* ve *Babesia* türlerinin tespitine yönelik bir araştırma yapılmıştır. RLB testi kullanılan araştırmada % 9.3 oranında *T. annulata* ve % 2.3 oranında *T. annulata* ve *Babesia bigemina* miks enfeksiyonu tespit edilmiştir. *T. buffeli/orientalis* türüne ise rastlanmamıştır (İça ve ark 2007). Erzincan yöresinde farklı odaklardan toplanan 123 sığırdan *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türleri RLB tekniği ile araştırılmış ve 19 sığırdan *T. annulata* (% 15.45), 12 sığırdan *T. buffeli/orientalis* (% 9.76) türü belirlenmiştir (Altay ve ark 2007). Doğu Karadeniz bölgesinde RLB tekniği kullanılarak *Theileria* ve *Babesia* türlerinin yayılımı ve varlığı araştırılmıştır. Çalışmada % 1.28 oranında *T. annulata* tespit edilirken; *T. buffeli/orientalis* % 11.56 ile Doğu Karadeniz bölgesinde yüksek bir oranda görülmüştür (Altay ve ark. 2008). Kırşehir yöresinde 9 farklı bölgeden seçilen 172 sığırdan kan örneğinde multipleks PCR yöntemi kullanılarak, *T. annulata*'nın merozoit yüzey antijeni (Tams 1) ve *T. buffeli/orientalis*'in ise major piroplasm yüzey protein (MPSP) gen bölgeleri amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucunda 172 kan örneğinin 4'ünde (% 2.32) *T. annulata* tespit edilmiş; fakat *T. buffeli/orientalis* tespit edilememiştir (Orkun ve ark 2011). Multipleks PCR yöntemi kullanılan bir diğer çalışma da Diyarbakır yöresinde sağlıklı görünümlü sığırlar üzerinde yapılmıştır. Multipleks PCR ile *T. annulata* ve *T. buffeli* varlığının eş zamanlı tespiti amaçlanan çalışma sonucunda 100 sığırdan 23'ünde *T. annulata*, 1'inde *T. annulata* ve *T. buffeli* miks olarak tespit edilmiştir (Deniz ve ark 2012).

Dünya'da bilinen 30 *Hyalomma* türü bulunmaktadır. Bu soya bağlı 15 *Hyalomma* türünün doğal ya da deneysel olarak *T. annulata*'yı naklettiği bildirilmektedir (Robinson 1982, Horak ve ark 2002, Jongejan ve Uilenberg 2004). Bu türler arasında yalnızca 7 tür; *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. detritum*, *H. marginatum*, *H. dromedarii*, *H. aegyptium*, *H. rufipes* Türkiye'de tespit edilmiştir (Aydın ve Bakırcı 2007, Bakırcı ve ark 2011). Türkiye'de *Hyalomma* türlerinin belirlenmesi ve bu kene türlerinde doğal *T. annulata* enfeksiyon oranları üzerine yapılan çalışmalarda bölgelere göre farklılıklar tespit edilmiştir. Türkiye'nin doğusunda *Hyalomma* kenelerinin tespit edilmesi ve aynı zamanda *Theileria*'nın prevalansı üzerine yapılan çalışmada Malatya ve Elazığ yöresi içerisinde bulunan ahır duvarlarından toplanan kenelerin tamamının *H. anatolicum* (% 46.9) türüne

ait olduğu belirlenmiştir. Sığırlar üzerinden toplanan kene türlerinin oranları ise *H. anatolicum* (% 63.1), *H. excavatum* (% 23.8), *H. detritum* (% 11.7), *H. marginatum* (% 0.6)'dır. Metilen yeşili ve pironin yöntemi ile boyanan kene tükrük bezlerinin incelenmesi sonucu ahır duvarlarından toplanan *H. anatolicum*'ların % 46.9'u *Theileria* pozitif, sığırlardan toplanan *H. anatolicum*'ların % 19.1'i *Theileria* pozitif bulunmuştur. Diğer türlerden *H. excavatum*'un % 2.4'ü, *H. detritum*'un % 4.6'sı *Theileria* pozitif tespit edilmiştir (Aktaş ve ark 2004). Malatya yöresinde yapılan bir başka çalışmada sığırlar ve barınaklarında *Hyalomma* soyuna bağlı kene türleri ve bu türlerde doğal *T. annulata* enfeksiyonları araştırılmıştır. Sığırlar üzerinden toplanan 1633 keneden 990'nı *H. anatolicum* (% 60.6), 485'i *H. excavatum* (% 29.6), 155'i *H. detritum* (% 9.4), 3'ü *H. marginatum* (% 0.1) olarak tespit edilmiştir. Bu türlerden 720 *H. anatolicum*, 258 *H. excavatum*, 87 *H. detritum* diseke edilmiştir. *T. annulata* enfeksiyon oranları ise sırası ile % 12.4, % 7.8, % 4.6 olarak saptanmıştır. Hayvan barınaklarında ise yalnızca *H. anatolicum* türüne rastlanmış olup, diseke edilen 443 *H. anatolicum*'un % 18.7'sinde enfeksiyon tespit edilmiştir (Aktaş ve Dumanlı 2001). Türkiye'nin doğusunda sığırlar üzerinden toplanan kene türleri incelenmiş ve kene türleri içerisinde en yoğun olarak *H. anatolicum*'a (% 32) rastlanmıştır. *H. excavatum* % 25, *Rhiphicephalus (=Boophilus) annulatus* % 19, *Rhiphicephalus bursa* % 15 oranında görülmüştür. Çok az oranda ise *R. sanguineus* türüne (% 8) rastlanmıştır (Aktaş ve ark 2006). İç Anadolu Bölgesi'nde Ankara ve yöresinde yapılan çalışmada sığırlar üzerinden toplanan kenelerin tür tayini sonucunda *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. detritum* ve *H. marginatum* türleri tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada en çok kene enfestasyonunun yaşlı sığırlarda görüldüğü, genç sığırlarda ve buzağılarda ise kene enfestasyonu oranının oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (Sayın ve ark 2003). Mart 1996-Nisan 1999 tarihleri arasında İç Anadolu Bölgesi'nde tropikal theileriosisin aşılama sonrası epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmada sığırlar üzerinden toplanan *Hyalomma* soyuna bağlı kenelerden *H. anatolicum*, *H. excavatum*'un tükrük bezlerinde *T. annulata*'nın sporoblastları tespit edilmiştir (Sayın ve ark 2005). Kayseri ve yöresinde kene enfestasyonu gösteren 300 sığır üzerinden 1160 adet kene toplanmış ve yapılan tür tayininde kenelerin % 26.37'sinin *R. annulatus*, % 21.12'sinin *H. marginatum*, % 18.7'sinin *R. turanicus* olduğu bildirilmiştir. Bu kenelerde *T. annulata* enfeksiyon oranı % 9.3 olarak bildirilmiştir (İça ve ark 2007). Batı Ege Bölgesi'nde Haziran 2006-Mayıs 2008 yılları arasında 9 köyde yürütülen çalışmada 443 sığırdan 19.679 erişkin kene toplanmıştır. Erişkin kenelerden 13'ü *H. rufipes* teşhis edilmiş ve Batı Ege Bölgesi'nde *H. rufipes*'in varlığı ilk kez ortaya konmuştur (Bakırcı ve ark

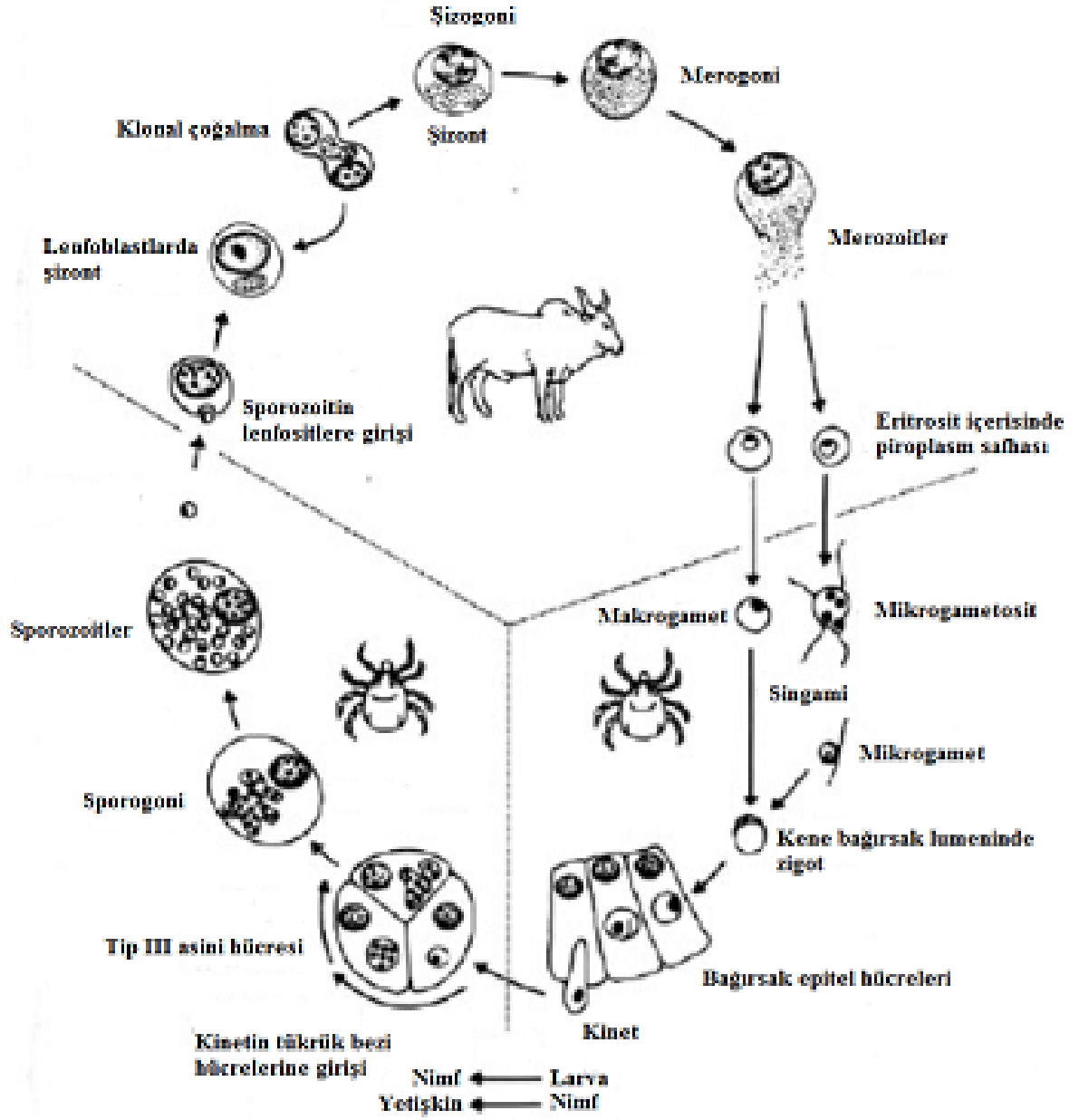
2011). Fakat Türkiye’de *H. rufipes* türlerinde *Theileria* enfeksiyon oranlarını tespit etmek için yapılan bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Yine Batı Ege Bölgesi’nde sığırlarda görülen kene türlerinin belirlenmesi amacı ile Aydın, İzmir, Manisa illerine bağlı ilçelerde yapılan çalışmada *Hyalomma* soyuna bağlı *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. detritum*, *H. marginatum* ve *H. rupifex* türlerine rastlanmıştır. Aydın ve ilçelerinde sığırlarda *H. marginatum* (% 47.71) yaygın olarak tespit edilmiş ve bunu *H. excavatum* (% 24.97), *H. detritum* (% 17.51) ve *H. anatolicum* (%1.22) türleri izlemiştir (Bakırcı ve ark 2012). Aynı zamanda tropikal theileriosisin vektör kene türlerinin de bu bölgede varlığının belirlendiği çalışmada, Doğu bölgelerinde sığırlarda tespit edilen kene türlerine nazaran Ege Bölgesi’nde *H. marginatum* ve *H. excavatum* türlerinin daha yaygın olarak görüldüğü; *H. anatolicum* türünün ise oldukça düşük oranlarda bulunduğu bildirilmiştir (Bakırcı ve ark 2012). Doğu bölgelerinde ise *H. anatolicum* türü daha yaygın olarak görülmekle birlikte, bu yaygınlığa bağlı olarak *H. anatolicum* türlerinde *T. annulata* enfeksiyon oranı daha yüksek olmaktadır. Aydın’da hayvanlar üzerinden ve ahır duvarlarından toplanan kene türlerinde yoğun olarak *H. detritum*’a rastlanmıştır (Aysul ve ark 2008). Aydın’ın Çine ilçesindeki 4 farklı ahırdan toplanan kenelerde *T. annulata* enfeksiyonu yüzdeleri ise sırası ile % 10, % 15, % 20 ve % 50 bulunmuştur. Nazilli ilçesinde 1 ahırdan toplanan kenelerde yapılan incelemede ise % 40 oranında *T. annulata* enfeksiyonu tespit edilmiştir (Aysul ve ark. 2008). Bu çalışmalar ışığında Türkiye’de varlığı bildirilen *Hyalomma* kene türleri içerisinde *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. detritum*, *H. marginatum* türlerinin tropikal theileriosisin potansiyel taşıyıcıları olduğu anlaşılmaktadır.

Türkiye’de yapılan bu epidemiyolojik çalışmalarla bölgelerde theileriosisin varlığı ve yaygınlığının ortaya konması, enfekte vektör kene türlerinin belirlenerek türlerin mevsimsel aktivitelerine bağlı olarak hastalığın çıkış aylarının tespiti ve bölgelerin endemik stabilite ve instabilitelerinin ortaya konması hastalığa karşı oluşturulacak kontrol programlarının geliştirilmesi ve gerçekleştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca bölgelerde hastalığın farklı izolatlarının virulensleri üzerine yapılan çalışmalar farklı izolatlara bağlı olarak oluşabilecek yeni hastalık çıkışlarının önüne geçilmesi açısından önemli bir diğer husustur.

1.5.*Theileria* Yaşam Döngüsü

Theileria, keneler tarafından nakledilen, zorunlu hücreiçi parazittir. Bütün hücre içi organizmalar gibi konakçı hücreye invazyon *Theileria* biyolojisinin kritik noktasıdır. Çeşitli invazyon safhaları (memeli konakçılarında sporozoit ve merozoit, vektör kenede zigot ve kinet safhası) hem omurgalılarda hem de kenedeki spesifik konak hücrelerinde yaşamsal ve çoğalma açısından çok iyi adapte olduklarını göstermektedir (McKeever ve Dobbela 2002).

Theileria, kenede ve memeli konak hücrelerinde morfolojik olarak farklı gelişim safhaları içeren kompleks bir yaşam siklusuna sahiptir (Şekil 1.6.).



Şekil 1.6. *Theileria parva*'nın yaşam döngüsü (Bazasuranga 2008)

1.5.1. *Theileria* sporozoitlerinin yapısı

Theileria'nın diğer apikompleksan parazitlerle arasındaki ilk fark sporozoit yapısıdır. Genellikle birçok apikompleksan parazitlerin invaziv safhası, yani sporozoitleri hareketlidir ve yüksek polarize hücrelerdir. Genellikle sporozoitlerin boyutları 5-10 µm olup, iyi tanımlanmış bir apikal komplekse sahiptir. Özelleşmiş sekresyon organelleri (rhoptri ve mikronemler) ile iç membran kompleksi ve bağlantılı mikrotübülleri içeren ayrıntılı bir subpellicular iskelete sahiptir (Shaw 2002). Diğer apikompleksan parazitlerin sporozoitlerinin aksine *Theileria* sporozoitleri küçük ve küresel hücrelerdir ve çapları yaklaşık 0.75-1.5µm'dir. Her bir sporozoit oldukça azalmış apikal komplekse sahiptir ve bazı cins apikompleksaların karakteristik özelliği olan konoid yapısı yoktur. Birçok hareketli apikompleksan sporozoitlerde bulunan kapsamlı mikrotübül çemberi ve ayrıntılı subpellicular iç membran kompleksi *Theileria* sporozoitlerinde bulunmamaktadır. İlginç olan kenede hareketli kinet safhasında bulunan mikronemlerin sporozoit ya da merozoitlerde mevcut olmamasıdır (Shaw 1997). Diğer apikompleksanlarda parazitin apikal ucundan salgılanan proteinleri içeren mikronemler, parazitin hareketliliğinde ve konak hücreye invazyonunda önemlidir (Tomley ve Soldati 2001). Bu sebeple *Theileria* sporozoitleri ve merozoitlerinde mikronemlerin yokluğu, hareketsiz olarak gelişen invazyon safhası ile bağlantılıdır (Shaw 2002).

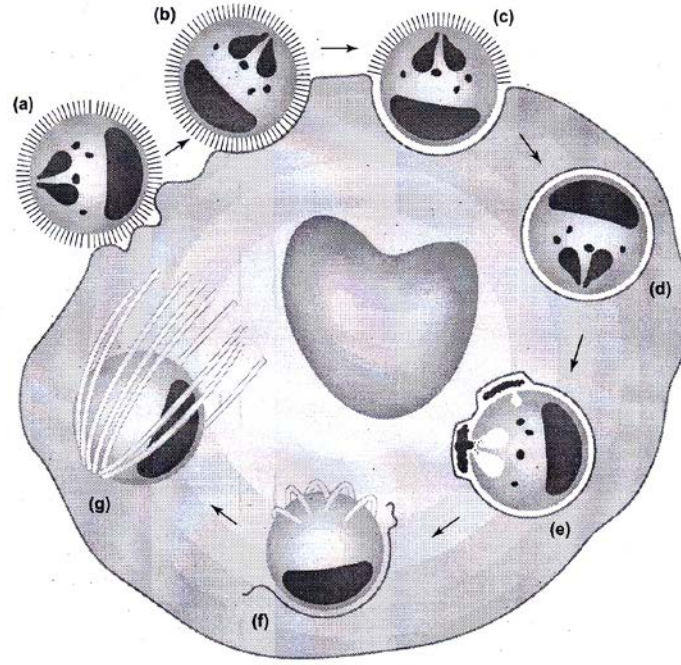
1.5.2. *Theileria* sporozoitlerinin lenfositlere girişi

Theileria sporozoitleri hareketsizdir. Bu nedenle başlangıçta gelişen konak hücre-sporozoit etkileşimi sıcaklığa bağımlı olmadan, pasif bir şekilde oluşur. Bu ilk etkileşimle birlikte, konak hücre yüzeyi ve sporozoit arasında geri dönüşümsüz nispeten güçlü bir bağ şekillenmektedir. *Theileria* sporozoitlerinin hücreye giriş basamakları Şekil 1.7'de gösterilmiştir. Sporozoitlerin konak hücreye girişi herhangi bir oryantasyonda gerçekleşmektedir. İnvazyon sırasında konak hücre membranı ile sporozoitin apikal uç noktasının yakın temasa getirilmesi için, parazitin tekrar oryantasyonuna gerek yoktur (Shaw ve ark 1991, Bishop ve ark 2009). Muhtemelen *Theileria* sporozoitlerinin tekrar

oryante olmaması sporozoitlerin hareketsiz olmasından kaynaklanmamaktadır. *Theileria*'nın aksine diğer apikompleksan parazitlerde konak hücreye tutunma gerçekleştiğinde, apikal uç hücreye giriş için tekrar oryante olmaktadır. Örneğin *Plasmodium* ve *Toxoplasma* hücreye tutunur ve konak membranı ile temasta apikal ucunu getirmek için, sıkıca bağlanarak ve aktin bağımsız olarak rhoptri proteinlerini boşaltarak tekrar oryante olur (Shaw 2003).

Sporozoit konak yüzeyine birkez tutunduğunda, sporozoitin girişi parazit ve konak membranların ilerleyen çevresel bir fermuar yapısı ile kusursuz bir şekilde gelişmektedir. Bu fermuar yapısı, parazitin aktin hücre iskeletine bağımlı değildir. Hareketli bağlantı oluşumu ve konak hücre yüzeyinin önemli ölçüde yeniden modellenmesi gerekmemektedir. Aktin filamentlerin birikmesi ya da giriş yerinde pseudopod oluşumu görülmemektedir. Şaşırtıcı bir şekilde konak aktin hücre iskeletinin bütünlüğü, sporozoitin bağlanması için gereklidir; fakat sporozoitin içselleştirilmesi konak hücre iskeletine bağlı değildir (Shaw 1999). Fermuar yapısı, ne konak aktin hücre iskeletinin aktif değişiminin gerektiği birçok intrasellüler patojenlerin hücreye girişine ne de profesyonel fagositler tarafından gerçekleştirilen fagositozise benzemektedir.

Morfolojik kanıtlara dayanarak, sporozoit yüzey örtüsü konak hücre ile etkileşimde başlıca rol oynar ve parazitin içselleştirilmesini kolaylaştırır. Diğer apikompleksan parazitlerde başarılı invazyon için sekretor organellerin boşaltılması gereklidir. Bu da *Theileria* sporozoitlerinin hücreye girişinde rhoptri ve mikrosferlerin rolünün ne olduğu konusunda soruların artmasına neden olmaktadır. *Theileria* sporozoitlerinin hücreye işgalinde rhoptri ve mikrosferlerden çok fazla miktarda salgı salgılanmaz. Konak membranı sporozoiti çevreler ve tamamen içselleştirilmiş parazit yalnızca konak orijinli membranla hücre içine alınır (Shaw ve ark 1991, Shaw 1997).



Şekil 1.7. *Theileria* sporozoitlerinin sığır lenfositlerine giriş basamakları. (a,b) sporozoitin ilk olarak konak hücre yüzeyini tanınması ve yüzeye bağlanması, sporozoit ile konak hücre membranı arasında devam eden bağlantı oluşumu (c) sporozoitin yüzey katmanının kaybı ile birlikte iki yapışan membran ilerleyen çevresel bir fermuar yapısı ile çevrenir ve parazitin konak hücre içerisine hareketi gerçekleşir (d) konak hücre içerisine içselleştirilmeye başlanan parazit hala konak yüzey membranı ile çevrili durumdadır (e) konak ve hücre membranları, parazit yüzeyindeki yoğun materyalin görülmesi ve rhoptri-mikronemlerin boşaltılması ile eş zamanlı olarak ayrılmaya başlar (f) konak hücre membranının çözünmesi ile parazit konak hücre stoplazması içerisine salınır (g) parazitin çevresinde konak hücre orjinli mikrotübüllerin düzenli bir dizilim oluşumu gözlenir (Shaw 2003).

1.5.3. Sporozoit yüzey katmanının atılması

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda apikompleksan parazitlerin invazyon sürecinde ortak bir özellik parazitin yüzey katmanının atılmasıdır. Parazit ve konak hücre membranlarının fermuar oluşumu süreci içerisinde sporozoit yüzey katmanının (özellikle sporozoit yüzeyinde üniform dağılım gösteren p67 major yüzey proteini) bir kısmını kaybeder (Webster 1985). Aslında proteaz inhibitörleri girişi bloke edebilir. Bu durum parazit ve/veya konak yüzey moleküllerinin proteolitik sürecinin invazyon sırasında gerçekleştiğini gösterir. Aynı zamanda parazitin başarılı bir şekilde hücreye alınmasında önemlidir. Diğer apikompleksan sporozoitlerde yüzey proteinleri ilk olarak mikronemler ve rhoptrilerden ayrılır, parazit bağlanır ve sonra yüzey kayarak tekrar yerini değiştirir. Sekresyon süresince bu yüzey proteinlerinin bazıları ya otoproteolitik parçalanmaya maruz kalır ya da sekretör organellerden salgılanan proteazlar tarafından parçalanır. Proteolitik süreç, yüzey moleküllerinin daha sonraki ayrılmaları ve fonksiyonel yüzey moleküllerinin sekresyonu için gereklidir (Fawcett ve ark 1984, Shayan ve Ahmed 1997). Bununla birlikte hareketsiz *Theileria* sporozoitlerinde yüzey proteinlerinin sekresyonu ya da hücre içine alınma sürecinde rhoptri ya da mikrosferlerin rolü hakkında herhangi bir kanıt mevcut değildir. Böylece p67 kalıntılarının ayrılması ile ilgili proteazların kaynağı ve kimliği bilinmemektedir (Shaw 2003).

1.5.4. Memeli konak lenfositlerinde gelişim

Sporozoitin bağlanma süreci ve hücre içine alınması 37 °C'de 3 dk'dan kısa bir süre içerisinde gelişmektedir. Bu süreç muhtemelen pasif olarak gelişen fermuar oluşumu nedeniyle, 15-20 sn'de aktif olarak hücreye giren *Toxoplasma* takizoitlerinden çok daha yavaş bir şekilde oluşmaktadır. Tüm sporozoitler konak hücre içerisine yeni alındığında tamamen konak hücre membranı ile çevrelenmektedir. Bununla birlikte *Theileria* sporozoitleri birçok apikompleksan parazitlerden farklı olarak konak membranından kurtularak, konak sitoplazmasında serbestçe yer alır. Eğer sporozoit hücre girişini takiben 15-30 dk. içerisinde konak hücre membranından başarılı bir şekilde kurtulamazsa parazit

ölür (Shaw ve ark 1991, Shaw 1997). *Theileria*'nın bütün intrasellüler safhaları (lenfoblastta şizont, intraeritrositik piroplasm, kene bağırsak hücrelerinde zigot-kinet, kene tükrük bezinde sporoblast) konak sitoplazmasında serbesttir ve parazitofor vakuol içerisinde gelişmez (Mehlhorn 1984, Shaw 2003). Bununla birlikte *Theileria* sporozoitleri ve merozoitlerinin bazı apikompleksanlarda tanımlandığı gibi fiziksel olarak konak membranının bozulması sonucu konak hücrelere aktif olarak invazyonun gerçekleştiği hakkında herhangi bir kanıt yoktur.

Konak sitoplazması içerisine kaçış sporozoit yüzeyini çevreleyen konak membranının ayrılmasından önce olmaktadır. Bu süreç ve takip eden konak membranının bozulması rhoptri ve mikrosferlerden proteinlerin salınması ile aynı zamanda gerçekleşmektedir. Parazit yüzeyindeki mikrosferlerden salınan proteinler ile konak mikrotubulleri birleşerek sporozoit yüzeyini kuşatır. Bu süreç *Theileria* sporozoitlerinde sekretör organellerin giriş sürecinden çok, konak hücre sitoplazması içerisine kaçma ve yerleşmede rol oynadığını göstermektedir. Fakat rhoptri ve mikrosferlerden protein salınımını kontrol eden mekanizma hakkında bir bilgi bulunmamaktadır (Fawcett ve ark 1984, Shaw ve ark 1991).

Theileria sporozoitlerinin, konak hücreye giriş yeri kesin olarak bilinmemektedir. Fakat sporozoitlerin inokule edildiği yer ya da drene edilen en yakın lenf nodüllerinden alındığı düşünülmektedir. Kenenin tutunduğu bölgede lökositten zengin yangısal bir reaksiyon gelişmektedir. Birçok sporozoitin bu bölgede konak hücreye giriş yaptığı muhtemeldir. Sporozoitler enjekte edildiği dakikalar içerisinde en yakın drene edilen lenf yumrularına ulaşabilmektedir (Shaw ve Tilney 1992, Shaw 2003).

Theileria yüksek konak spesifitesi göstermektedir. Sporozoitleri de aynı şekilde yüksek konak hücre spesifitesi gösterir. Yapılan çalışmalarda *T. annulata*'nın makrofaj / monosit kökenli MHC sınıf II pozitif hücreleri enfekte ettiği gözlenirken, T hücrelerinde oluşturduğu enfeksiyon oranının oldukça az olduğu tespit edilmiştir. *T. parva* sporozoitlerinin ise *T. annulata*'nın aksine T hücrelerini enfekte ettiği bildirilmiştir (Glass ve ark 1989).

Sporozoitlerin girişi aynı zamanda hem parazitte hem de konak hücrede birçok değişikliği de başlatmaktadır. Parazit konak hücre sitoplazmasına yerleştiğinde çok çekirdekli şizontlara farklılaşarak, aynı zamanda enfekte hücrelerdeki klonal büyüme yol açan konak hücre transformasyonunu uyarmaktadır. *Theileria* ve genellikle apikompleksan parazitlerde DNA replikasyonu ve mitoz bölünme hücre bölünmesinden ayrı bir şekilde gerçekleştirilebilir. *Theileria*'nın yaşam siklusundaki önemli husus; şizont oluşumunda, piroplasm safhasında ve kene tükrük bezinde gelişen sporogoni dönemi süresince hücre içindeki parazit, hücre bölünmesi olmaksızın birçok kez DNA replikasyonu ve çekirdek bölünmesine maruz kalmaktadır. Bu bölünmelerin sonucunda konak hücre sitoplazmasında makroşizont adı verilen çok çekirdekli sinsitiyal yapılar oluşmaktadır (Shaw 2003). Makroşizontların çekirdekleri sitoplazma içerisinde dağınık şekilde ve her biri porlu nükleer zar ile çevrili olarak bulunur. Parazit bu dönemde konak hücresinin bölünüp çoğalmasına sebep olurken, parazitin kendisi de bu dönemde bölünerek çoğalmaktadır. Parazit konak hücrenin oluşturduğu mitotik çıkıntılara bağlanarak konak hücre ile eş zamanlı olarak bölünerek yeni hücrelere dağılmaktadır. İlk olarak enfekte lenf yumrularında başlayan çoğalma sonrasında enfekte hücrelerde kanser hücrelerine benzer kontrolsüz metastazik çoğalma görülür. Bu şekilde parazit kana ve diğer doku, organlara yayılır (Mehlhorn 1984, Shaw 2003).

1.5.5. *Theileria* merozoitlerinin sığır eritrositlerine girişi

Yaşam döngüsünün devamında şizontlar farklılaşım ve hücreleşim sürecinden geçerek tek çekirdekli merozoitleri oluşturur. Merozoitlerin sığır eritrositlerine invazyonu in vivo olarak *T. parva*'da tanımlanmıştır (Shaw ve Tilney 1995). Olgun merozoitlerin yapısı hemen hemen sporozoitlere benzerdir. Her bir merozoit apikal kutbunda rhoptrileri içerir; fakat membrana bağlı sekretör organelleri (mikronem ve yoğun granüler vb.) içermez. Merozoitlerin eritrositlere invazyonu, sporozoitlerin giriş mekanizmasına benzer bir şekilde herhangi bir oryantasyonda oluşmaktadır. Parazit ve eritrosit membranlarının ilerleyen kusursuz bir fermuar oluşturması ile merozoitler eritrosit içersine alınır. Hücre içine yeni alınan merozoit tamamen konak membranı ile çevrilidir. Merozoit hücre içine alındıktan sonra, rhoptrilerden salgılanan proteinler aracılığı ile konak hücre

membranından kurtulur. Parazit eritrosit sitoplazmasında serbest kalır; fakat sporozoitlerin lenfositlere girişindeki gibi parazitin yüzeyi, konak mikrotubulleri ile ilişkili değildir (Shaw 2003). Yapılan in vitro çalışmalarda metalloproteaz inhibitörlerinin *T. sergenti* merozoitlerinin eritrositlere girişini bloke edebildiği görülmüştür (Hagiwara ve ark 1996). Bu da parazitin girişinde enzimatik sürecin gerekli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca merozoit yüzeyinde bulunan sülfat glikokonjugatları nedeni ile, merozoitin bağlanması ve girişi heparin kullanılarak bloke edilmiştir (Hagiwara ve ark 1997). Merozoitler eritrositlere girdiğinde, farklılaşarak piroplasm olarak adlandırılan formları oluştururlar. Piroplasmalar enfeksiyonun alınmasından itibaren 8-10 gün içerisinde kanda görülebilmektedir. Oval, virgül ya da küre şeklinde görülebilen piroplasm formları yeni eritrositlere girerek enfeksiyonu sürdürürler. Sığırlar parazitin bu formunu uzun yıllar taşıyabilmektedir (Mehlhorn 1984, Pipano ve Shkap 2006).

1.5.6. Kenede gelişim

Kenenin enfeksiyonu, kan emmesi esnasında piroplasm ile enfekte eritrositleri sindirmesi ile başlamaktadır. *T. parva*'nın bulaşmasında deneysel analizlerden elde edilen veriler sonucu, yetişkin kenelerde enfeksiyon seviyesini etkileyen birkaç faktör tespit edilmiştir. Sığırlardaki piroplasm parazitemisi, nimf dönemindeki kenenin beslenme doygunluğuna ulaşarak konaktan ayrılması önemli faktörlerdendir (Young ve ark 1996). Enfekte eritrositlerin büyük çoğunluğu kenenin beslenme süresince hızla yıkıma uğramaktadır. Sadece kene doymaya başladığı dönemde alınan eritrositler canlı kalmaktadır. Larva ve nimf dönemindeki keneler çok daha kısa sürede beslenmektedir. Dolayısıyla sindirilen kan hacmi larva ve nimfde, yetişkin kenelerden daha düşüktür. Buna göre alınan enfekte eritrositlerin toplam sayısı az olmaktadır. Dolayısıyla bağırsakta bulunan parazitlerin gelişim ve hayatta kalma oranı düşmektedir. Ayrıca bağırsak epitelinin yapısı, bağırsak lumeni içerisindeki şartların kene türlerine göre farklılık göstermesi parazitin gelişimini ve hayatta kalmasını etkilemektedir (Shaw 1997, Shaw 2003).

Gametosit gelişimi, bağırsak lumeni içerisinde eritrositlerin lize olması sırasında enfekte eritrositlerdeki parazitlerin serbest kalması ile başlamaktadır. *Theileria*'da serbest kalan parazitlerin ne kadarının gametlere farklılaştığı ve gametogenezisi kontrol eden faktörlerin ne olduğu hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Işık mikroskopuyla elde edilen gözlemlerde ray-body (gamet) olarak bilinen yapıların katıldığı gametogenezis safhası bütün *Theileria* türlerinde benzerdir. Ancak ray-bodylerin bağırsak lumeninde görülmesi ile birlikte başlayan gelişim zamanı *Theileria* türleri arasında farklılık göstermektedir (Shaw ve Young, 1994). Başlangıçta ray-bodylerin gelişimi oldukça hızlı olmaktadır. Bağırsak lumeni içerisinde serbest kalan yüzük yapıda (ring-form) parazitlerden farklılaşan makrogamontlardan, 4-5 µm çapında küresel makrogametler oluşmaktadır. Yine bağırsak lumeni içerisinde flagella benzeri çıkıntılar ve bu çıkıntılarda sayıları dörde varabilen çekirdekçikler oluşan mikrogamontlardan ise mikrogametler oluşmaktadır. Sadece elektron yoğunlukları farklı olan makro ve mikrogametlerin birleşmesi sonucu zigot oluşmaktadır. Zigotlar, bağırsak epitel hücrelerine invaze olur ve burada mayotik bölünmeye maruz kalarak kinetlere farklılaşır. Her bir zigottan tek bir kinet oluşur. Çoğunlukla kinetler tek çekirdeklidir. Sadece *T. parva*'da çekirdek bölünmesi erken başladığı için, hücre içindeki kinetler sıklıkla dört çekirdekli görülebilmektedir (Mehlhorn ve ark 1994, Shaw 2003). Kinetler parazitin hareketli safhası olup, herbir kinet apikal polar ringe sahiptir; fakat konoid içermemektedir. Diğer apikompleksan zoitlere benzer olarak kinetler çok sayıda mikronem içerir. Mikrotubullerle bağlantılı, iç membran kompleksi içeren ayrıntılı subpellikular hücre iskeletine sahiptir. *Theileria* kinetleri yalnızca kenenin bağırsak epitel hücrelerinde gelişir ve sonra hemolenfine geçerek tükrük bezi hücrelerine invaze olur. Kinet tükrük bezine ulaştığında birkaç fiziksel bariyerden geçmektedir. Bağırsak hücresinin bazal membranı ve altında bulunan bazal lamina; tükrük bezini çevreleyen bazal lamina ve sporogoni safhasının olduğu asinar hücrenin membranı bu fiziksel bariyerlerdir. Kinetin bağırsaktan çıkışı ve tükrük bezine girişi muhtemelen fiziksel ve enzimatik süreçlerden geçerek oluşmaktadır. Kene yeni bir konağa tutunmadan önce, hareketli kinetler tip II ve tip III asini hücrelerinde farklılaşarak sporoblastları oluşturur. Sporoblastların oluşumuyla birlikte çekirdek bölünmesi başlamaktadır. Çekirdek bölünmesi sonucunda oluşan çok çekirdekli sinsitial yapı ise tip II ve tip III asini hücrelerinde genişleme meydana getirir. Sporogoni safhası, kenenin yeni bir konaktan kan emmesi ile başlamaktadır. Tükrük bezi asini hücrelerinde sporoblast aşamasında beklemekte olan parazitler sporogoni safhasının başlaması ile birlikte sporozoitlere aktive olur. Sporogoni beslenme ile başlar; fakat sporozoitlerin inokulasyonu birkaç gün sonra

başlamaktadır. Sporozoitlerin inokulasyon zamanı kenenin nimf veya yetişkin döneminde olmasına, dişi ya da erkek olmasına göre farklılık göstermektedir. Tükürük bezi asınar kapağının fiziksel tabiatı gereği sporozoitler, tükürük içerisine tek bir püskürme şeklinde değil kademeli olarak salınmaktadır (Shaw 2002).

1.6.Klinik Bulgular ve Patogenez

Sığırlarda *Theileria* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonun şiddeti, türlerin patojenitesine göre farklılıklar göstermektedir. Bazı türler oldukça patojen ve yüksek mortaliteye sebep olurken, bazı türler düşük patojen, bazıları da non-patojendir. Hastalığın patogenezi parazitin lenf hücreleri ile eritrositlerde yaptığı tahribat sonucu ortaya çıkar. Bu tahribatın oluşmasında *T. parva*'da şizontlar; *T. annulata*'da şizont ve piroplazmlar etkin rol oynar. *T. mutans* ve bazı non-transformik türlerde (*T. sergenti/buffeli/orientalis*) lenf yumruları, dalak ve karaciğerde şizontların geçici olarak görülmesi nedeni ile şizontların daha az, piroplazmların daha etkin rol oynadığı düşünülmektedir (Mehlhorn 2001a, Mehlhorn 2001b, Sugimoto ve Fujisaki 2002). Şizontlarla enfekte hücrelerin proliferasyonu ve sitokin üretimi de theileriosisin patogenezisinde önemli rol oynamaktadır (Preston ve ark 1993). Parazitin şizogoni döneminde enfekte konak hücrelerinde meydana getirdiği klonal çoğalmaya bağlı olarak lenfatik dolaşım ile tüm vücuda yayılan enfekte lenfositlerin metastazik özellikleri ve bunlara karşı gelişen yangısal cevap da patogeneze etkilidir. Akut durumlarda, şizontlarla enfekte hücreler enfeksiyonun verildiği taraftaki lenf yumrularından hızlı bir şekilde diğer lenf yumruları (mezenterik, mediastinal vb.) ile dalak ve timusa yayılırlar. Yine akut durumlarda, parazitle enfekte hücreler dokuzuncu günde karaciğer, böbrek, akciğer, abomasum, adrenal ve hipofiz bezlerinde, on ikinci günde beyine ve on dördüncü günde kalp dokusuna yayılırlar (Forsyth ve ark 1999).

Theileriosisin patogenezisinde oto immün mekanizmaların da rol oynayabileceği düşünülmektedir (Hooshmand-Rad 1976). Duyarlı sığırlarda mortalite oranı parazitin virulensine bağlı olarak %40–60 arasında değiştiği bildirilmektedir. Egzotik ırklar, Holştayn gibi Avrupa sığırları (*Bos taurus*) endemik bölgelerdeki yerli ırklara göre çok

daha duyarlıdırlar. Ölüm genelde klinik bulguların görülmesinden sonraki bir-iki hafta içinde görülmektedir (Uilenberg 1981, Preston ve ark 1992, Glass ve ark 2005). Ölümcül vakalarda parazitemi oranının %80'lere ulaştığı, %10-15 oranındaki parazitemilerde ise iyileşmenin gözlemlendiği belirlenmiştir. Genellikle hayvanların 4-8 hafta sonra tam olarak iyileştikleri görülür. Tam olarak iyileşen hayvanların eritrositleri içinde düşük oranlarda piroplazmik formlar görülmekte ve uzun süre bu hayvanlar parazite taşıyıcılık yapmaktadırlar (Sergent 1945, Gill ve ark 1977).

Theileria annulata enfeksiyonu klinik belirtilere bağlı olarak perakut, akut, subakut ve kronik seyir gösterebilir. Ancak bu klinik belirtilerin şiddeti *Theileria* türlerinin virulansına, kene tarafından verilen sporozoit miktarına, konağın türlere karşı duyarlılığına, ırk, yaş, gebelik ve laktasyon gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Neitz 1957, Barnett 1968, Flach ve ark 1995, Sayın ve ark 1999, 2000). Hastalığın perakut seyrinde enfeksiyonun alınmasından sonraki üç ile beş gün içerisinde ölüm görülür. Endemik bölgelerde *T. annulata* ile enfekte kültür ırkı sığırlarda % 90 ölüm oranı görülürken, yerli ırk sığırlarda % 5 oranında ölüm görüldüğü bildirilmiştir (Neitz 1957). Sığırlarda enfekte kenenin kan emmesini takiben 8-25 gün içinde theileriosisin klinik bulguları ortaya çıkmaktadır. Genelde hastalığın başlangıcında sığırdaki değişken bir iştahsızlık vardır. Mukoza ve konjunktivalarda hiperemi, daha sonra solgunluk ve peteşiyel kanamalar gözlenir. İnkubasyon süresinin sonunda merozoitlerin eritrositleri enfekte etmesini takip eden bir-iki gün içinde ateş 42 °C'lere kadar ulaşır. Ateşin görülmesinden bir-iki gün önce kenenin kan emdiği taraftaki yüzeysel lenf yumrusunda büyüme vardır. Lenfosit ve nötrofil sayısındaki azalmaya bağlı şiddetli lökopeni ve eritrosit yıkımına bağlı olarak belirgin anemi şekillenir. Göz ve burun akıntısı, göz kapaklarında şişkinlik, ağızda salya akıntısı, rumen hareketlerinin durması, nabız artışı, geviş getirmenin durması ve süt veriminin azalması görülen diğer klinik belirtilerdir (d'Oliveira 1995, Mehlhorn 2004). Enfekte eritrositlerin hem parazit tarafından parçalanarak lize olması hem de enfekte eritrositlerin dalak ve karaciğerde yıkımlanması sonucu aneminin şiddeti giderek artmaktadır. İlerleyen anemiye bağlı olarak da hayvanlarda solunum güçlüğü gelişir (Hooshmand-Rad 1976, Barnett 1977, Uilenberg 1981). Hastalığın ilk dönemlerinde dışkı normaldir; ancak hastalığın ilerleyen dönemlerinde dışkı koyu siyah renkte, yapışkan kıvamda ve katran görünümündedir. Dışkıda kan ve mukus vardır (Barnett 1977, Uilenberg 1981, Pipano 1994, Sayın ve ark 2000).

1.7. Nekropsi Bulguları

Theileriosis'e bağlı oluşan nekropsi bulgularının çoğu lenfatik ve vasküler sistemler ile ilişkilidir. Akciğerlerde ödem, yüzeysel lenf yumruları ve derin lenf yumrularında hiperplazi, subkutan doku ve seröz zarlarda peteşial kanamalar, karaciğer ve özellikle dalakta büyüme, karaciğerde sarımsı renk oluşumu ve böbrek korteksinde gri beyaz odaklar nekropside görülen bulgulardır. Abomasum mukozasında 1,5 cm çapında ortası nekrotik, çevre kısmı hemorajik alanla çevrili, sigara yanığına benzeyen ülserler ise hastalıkta nekropsi sonucu görülen karakteristik bir bulgudur (Gill ve ark 1977, Uilenberg 1981, Soulsby, 1982, Pipano 1994).

1.8. Bağışıklık

Theileria türleri ile oluşan enfeksiyona karşı oluşan immün yanıtta parazitin dozu ve virulensi etkilidir. Duyarlı hayvanlarda yüksek dozdaki sporozoit enfeksiyonu akut ve ölümcül bir hastalık tablosu oluşurmaktadır. Subletal dozlarda sporozoit enfeksiyonunda iyileşme döneminde hayvanlarda sporozoitler ile oluşabilecek olan reenfeksiyonlara karşı kalıcı ve uzun süren bir bağışıklık gelişmektedir (Preston ve ark 1999). Enfeksiyona yakalanan hayvanlar parazitin farklı yaşam dönemlerine ait farklı antijenlerle karşılaşmakta ve bağışıklığın oluşmasında hem humoral hem de hücre sel immün sistem etkili olmaktadır (Tait ve Hall 1990, Boulter ve Hall 1999). *Theileria annulata*'ya karşı gelişen koruyucu bağışıklık hem doğal (T-hücre bağımsız) hem de kazanılmış (T-hücre bağımlı) immün yanıtın birlikte gelişmesiyle oluşmaktadır, aynı zamanda sitotoksik T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreleri, makrofajlar ve yardımcı T hücreleri de bu yanıtta rol oynamaktadır (Preston ve ark 1999)

Theileria annulata ile oluşan doğal enfeksiyonlarda ya da makroşizontlar ile enfekte hücre kültürleri veya sporozoitler ile inokulasyonları takiben oluşan bağışıklıkta hayvanlarda, homolog suşlarla oluşabilecek reenfeksiyonlara karşı kalıcı bir bağışıklık gelişmekte, heterolog suşlara karşı da iyi bir bağışıklık oluşmaktadır (Barnett 1963, Hall

1988). Hastalığa karşı koruyucu bir bağışıklığın oluşmasında, *Theileria*'ya karşı gelişen kompleks bir immün yanıt rol oynamaktadır.

Parazitin farklı dönemleri ile konağın immün sistemi arasındaki etkileşme, primer enfeksiyondan iyileşmede ve ikincil enfeksiyonlara karşı direncin gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Primer enfeksiyon sonrası iyileşme sürecinde doğal öldürücü hücreler (NK hücreler) ve makrofajlarla birlikte sitokinler, nitrik oksit (NO) ve NK hücrelerinin litik aktiviteleri aracılığıyla enfekte hücrelerin üzerine etki ederler. Makrofajların antijenle uyarılmış $CD4^+$ hücreleri tarafında uyarılması sonucunda artan NO üretimi hücre içerisindeki şizontların öldürülmesinde rol oynadığı gibi konakçı hücrelerin apoptosisine neden olur. Ayrıca NO merozoitlerle enfekte olan mononükleer hücrelerin ölümüne de neden olmaktadır. Sitotoksik $CD8^+$ T hücreleri şizontlarla enfekte hücreleri lize eder. Antikorlar merozoitlerin yıkımını sağlayabildiği gibi eritrositler içerisindeki piroplazmaların gelişimini önler. NO, ya serbest merozoitler ya da eritrosit içinde bulunan piroplazmalar üzerine etki edebilmektedir. Aktive olmuş makrofajlar enfekte olmuş olan eritrositleri fagosite ederek yıkımlanmalara neden olmaktadır. Doğal bağışıklık yanıtı enfekte hücrelerden salgılanan IFN gama ve IL12 tarafından tetiklenmekte; enfekte hücrelerin varlığı devam ettikçe makrofaj ve NK hücrelerince salgılanan sitokinlerin otokrin etkisi ile muhafaza edilmektedir. Şizontlarla enfekte hücrelerin antijen sunumu yine aynı hücreler tarafından üretilen IL-1 ve IL-12 tarafında güçlendirilmektedir. Doğal yanıtı başlatan parazitik faktörler ya da $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerini uyaran antijenler henüz tam olarak bilinmemektedir (Preston ve ark 1999).

İkincil enfeksiyonlara dirençde ise sporozoitlere karşı oluşan antikorlar, konakçı hücrenin parazit tarafından invazyonunu engelleyebilmektedir. Fakat önemli olan doğal bağışıklık yanıtının ne kadar hızlı geliştiği ve $CD4^+$ bellek T hücrelerinin ne kadar hızlı devreye girdiğidir. $CD4^+$ hücrelerinin uyarılması enfekte olmayan makrofajların aktivitelerinde bir artışa neden olur. $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerince üretilen IFN gama direkt olarak trofozoitlerle enfekte hücreler üzerinde etkili olmaktadır. Sitotoksik $CD8^+$ T hücreleriyle NK hücreleri erken immün yanıtta kurtulan parazitlerin ortadan kaldırılmasına yardım ederken; oluşan merozoitler antikorlar ya da aktive olmuş makrofajlar tarafından yok edilmektedirler (Preston ve Brown 1985, Preston ve Jongejan 1999).

Parazitin hücre dışı dönemlerinden biri olan sporozoitlere karşı humoral yanıt oluştuğu ve bu yanıtın özellikle nötralizasyon fonksiyonuyla olduğu düşünülmektedir (Boulter ve Hall, 1999). Tekrarlanmış sporozoit enfeksiyonlarına maruz bırakılmış hayvanlardan elde edilen serumların *in vitro* ortamda trofozoitlerin makroşizontlara dönüşümünde azalmalara yol açtığı gösterilmiştir (Preston ve Brown 1985). Ayrıca, tekrarlanmış sporozoit enfeksiyonlarına tabi tutulan hayvanlarda sporozoitlerin konak hücresine invazyonunda azaltıcı etki gözle görülebilir düzeylerde oluşmaktadır (Preston ve Brown 1985, Williamson ve ark 1989).

Sporozoitlerin konak hücresine invazyonu çok kısa bir zaman diliminde gerçekleştiği için korumanın oluşması için yüksek oranlarda antikor titresine ihtiyaç duyulmaktadır. Saha şartlarında oluşan doğal enfeksiyonlarda bu titreler ancak tekrarlanan enfekte kene enfestasyonları ile şekillenebilmektedir. Hiperimmün sığırlardan elde edilmiş serum örneklerinin *in vitro* ortamda sporozoitlerin enfektivitesini nötralize etmesinden yola çıkarak hedef antijenleri belirleyebilmek için çalışmalar yapılmıştır. Purifiye sporozoitlere karşı bir seri monoklonal antikor elde edilmiş ve bu antikorlardan bazılarının *T. annulata* sporozoitlerinin enfektivitesini, *in vitro* ortamda etkili bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür (Williamson ve ark 1989).

Theileria trofozoitlerinin, bağışık hayvanlardan elde edilen serumlardaki bazı etkilere karşı duyarlı olduğu söylenmektedir (Preston ve Brown 1985). Kültürlerde, parazitin hücre içine girdikten sonra, *T. annulata*'ya bağışık olan serum örnekleri ile muamele edildiğinde, trofozoitler ile enfekte hücrelerin şizontlara dönüşümü baskılanmıştır. Önceleri bu etkinin antikor kökenli olduğu ve sporozoitlerin lenfositlere invazyonu sırasında lenfosit hücrelerin yüzeyinde kalan sporozoit antijenlerine karşı geliştiği düşünülmekteydi, ancak sonraki çalışmalarda bu etkinin serumda bulunan sitokinler vasıtasıyla oluştuğu gösterilmiştir (Preston ve ark 1992). *Theileria annulata* ve *Theileria parva* trofozoitleri ile enfekte hücreler üzerinde *in vitro* ortamda rekombinant sitokinlerin etkisi üzerine yapılan karşılaştırılmalı denemelerde tümör nekrozis faktörü (TNF) - α , interferon (IFN) - α , IFN- γ , interleukin (IL)-1 ve IL-6'nın inhibitorik etkileri olduğu görülmüştür (Preston ve ark 1992). Bununla birlikte, bu sitokinlerin hangi yolla inhibisyona yol açtığı tam anlaşılamamış, bunların nitrik oksit (NO) üretimini indükledikleri düşünülmüştür (Visser ve ark 1995).

Theileria annulata enfeksiyonlarında parazitin ekstrasellüler dönemleri olan sporozoitler ve merozoitlere karşı humoral yanıt önemliyken, şizontlar ile enfekte hücrelere karşı da hücresele yanıt önem kazanmaktadır. *Theileria annulata*'ya karşı gelişen hücresele bağışıklık ilk kez Preston ve Brown (1981) tarafından gösterilmiştir. Bu çalışma da irradiye edilmiş *T. annulata* ile enfekte hücreler, otolog periferel kan hücrelerinde (PBM) immun bir hayvandan alınıp alınmadığına bakılmaksızın, üremeyi indüklemiştir. Daha sonraki dönemlerde Preston ve Brown (1988), başka bir çalışmada primer *T. annulata* enfeksiyonundan kurtulan hayvanlarda iyileşme döneminde, ölümcül olarak hastalığa yakalanan hayvanlarda olmayan, sitotoksik hücreleri tespit etmişlerdir.

Theileria annulata ile enfekte olan sığırlarda immun yanıtın oluşmasında sitotoksik T-hücrelerinin yanında, sitokinler ve enfekte hücrelerin aktivasyonu ile oluşan sitostatik makrofajlar rol oynamaktadır (Preston ve Brown 1988, Preston ve ark 1993). Makroşizont ile enfekte hücrelerden salınan sitokinler enfekte olmamış makrofajlardan salınan sitokinlere benzerlik gösterirler. Enfekte dokulardaki şizont ile enfekte hücreler IFN- α_1 ve TNF- α üretirken, *in vitro* ve *ex vivo* hücre kültürlerinde mRNA düzeyinde IL-1 α , IL-1 β , IL6, IL10, IL12, TNF- α eksprese edilmekte ve intrasellüler olarak TNF- α üretilmektedir. Bunun yanında enfekte hücrelerden salınan matriks metalloproteazlar (MMP9) da salınmaktadır ki bunun TNF- α 'nın oluşumu ve aktivasyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir (Preston ve ark 1999). Sitostatik makrofajlar *T. annulata*'ya karşı gelişen immunitede önemli bir yer tutmaktadır (Preston ve ark 1999, Boulter ve Hall 1999). Yapılan çalışmalar, sporozoitlerle veya şizont enfekte hücrelerle enfekte edilen buzağuların periferel kanından izole edilen makrofajların şizont ile enfekte hücrelere karşı güçlü bir sitostatik etkilerinin olduğunu göstermiştir (Preston ve Brown 1988, Preston ve ark 1993). Enfekte hücrelerden salınan TNF- α , enfekte olmayan makrofajlarda TNF- α sentezini uyarmaktadır (Preston ve ark 1993). Aynı zamanda makrofajlar ile lenfositlerden NO salınımı oluşmaktadır (Visser ve ark 1995). Makrofajlardan NO salınımı, antijen spesifik yardımcı CD4⁺ hücrelerinden üretilen IFN- γ ile sitüme edilmektedir (Campbell ve ark 1997). *Theileria annulata*'da oluşan sitostasisin NO tarafından yönlendirildiği düşünülmektedir (Preston ve ark 1992). NO, makrofajların *Theileria*'ya karşı olan aktivitelerini arttırmaktadır. Visser ve ark (1995) tarafından yapılan çalışmada NO'nun *T. annulata* sporozoitlerinin periferel kan mononükleer hücrelerine invaze olmasını ve ayrıca trofozoitler ile enfekte hücrelerin makroşizontlara dönüşümünü engellediği

gösterilmiştir. Bunlara ek olarak artan NO sentezi *in vitro* ortamda şizontlar ile enfekte hücrelerin proliferasyonunu inhibe edip, makroşizontları yok eder ve konak hücresi apoptotik bir hal alır ve farklılaşmakta olan merozoitleri ihtiva eden hücreleri öldürür (Richardson ve ark 1998). Eritrositler içindeki piroplasmların hücrel mekanizma ile nasıl kontrol edildiği bilinmemektedir, ancak NO'nin merozoitlerin eritrositlere invazyonun engellenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (Preston ve ark 1999).

Theileria annulata enfeksiyonlarına karşı gelişen doğal immunitede NK hücrelerinin önemli bir yeri vardır. *Theileria annulata* enfeksiyonu sırasında aktive olan makrofaj ve NK hücrelerinden salgılanan ürünler kazanılmış T yardımcı tip 1 (Th1) yanıtın artmasına neden olabilir (Preston ve ark 1999). NK hücreleri, şizont ile enfekte hücreleri lize edip, IFN- γ 'ı salgınlm yaparlar ve bu IFN- γ 'da enfekte olmamış makrofajlardan TNF- α ile NO salgınlmına sebep olur. NK hücreleri, sporozoitler ile oluşturulan enfeksiyonlarda iyileşme döneminde görölmekte ve bu NK hücreleri, macroşizontlar ile enfekte hücreler tarafından üretilen IFN- γ , IL-12 ve TNF- α sitokinleri tarafından aktive edilirler. IL12'nin üretimi Th0 hücrelerin CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri olarak gelişimine de neden olmaktadır (Preston ve ark 1983, Preston ve ark 1999).

1.9.Tropikal Theileriosisde Tanı

1.9.1. Klinik Bulgular ve Mikroskopik Tanı

Tropikal theileriosisin tanısında, hastalığın bölgedeki epidemiyolojik durumu, bölgenin bulunduğu iklim kuşağı, mevsim ve bölgede bulunan kene populasyonlarının bilinmesi destekleyici olmaktadır. Yaz aylarında sığırlarda görölen kene enfestasyonları ile birlikte 42 °C'ye varan ateş, yüzeysel lenf yumrularının şişkinliğı, mukozalarda solgunluk (anemi), ikterus, göz ve burun akıntısı, göz kapaklarında şişkinlik, ağızda salya akıntısı, rumen hareketlerinin durması, iştahsızlık, hafif öksürük, nabız artışı, geviş getirmenin durması, süt veriminin azalması gibi klinik belirtilerin görölmesi theileriosisden şüphelendirmektedir. Klinik bulgularla desteklenen kesin tanı, laboratuvar şartlarında mikroskop altında, Giemsa boyama yöntemi ile boyanan ince yayma kan frotilerinde, lenf

ya da karaciğer biyopsilerinde piroplasm ya da şizont formlarının görülmesi ile konur (Mimioğlu 1969, Soulsby 1982, Pipano 1994, Mehlhorn 2004, d'Oliveira 1995). Lenf biyopsisinin mikroskopik bakışında şizontların görülmesi, enfeksiyonun başlangıcından itibaren kenenin sporozoitleri inokule ettiği en yakın lenf yumrusunda beşinci günde gerçekleşir (Shaw 2003). İnce yayma kan frotilerinde eritrositler içerisinde *Theileria*'nın piroplasm formları ateşin yükselmeye başlamasıyla birlikte enfeksiyonun başlangıcından itibaren 8-10 gün içinde görülür. Hastalığın başlangıç döneminde enfekte eritrositler içerisindeki piroplasmalar çok az sayıda görülebilir ya da hiç görülmeyebilir. Bu durum taşıyıcı hayvanlar ile akut enfeksiyon başlangıcındaki hayvanlar arasında ayırım yapılamamasına neden olabilmektedir. *Theileria*'nın eritrosit içerisindeki piroplasm formları genel olarak yuvarlak, çomak, oval, haç, virgül, anaplasmod şekillerde görülebilir. Ancak parazit türlerine göre bu morfolojik görünümüleri farklılık göstermektedir. Örneğin; *T. parva*'nın piroplasm formları genelde küçük ve çomak şeklinde iken, *T. annulata*'nın piroplasm formları genellikle yuvarlak ve oval şekillerde görülmektedir. *T. buffeli* piroplasmaları ise çomak şeklinde, genelde uzun ve eritrositler içindeki yapılarla çizgiler oluşturan bir yapıda görülür. Hastalık sırasında *Theileria* türlerinin piroplasm formlarının değişkenlik göstermesi mikroskopik bakıda tür tayininde yanılgılara sebep olabilmektedir. Hastalıktan iyileşen hayvanlarda piroplasmalar uzun süre çok düşük oranlarda dolaşımda kalır. Ancak mikroskopta bu piroplasmaların tespit edilmesi oldukça zordur (Mimioğlu ve ark 1969, Pipano ve ark 1974, Uilenberg 1981, Norval ve ark 1992).

1.9.2. Serolojik Tanı

1.9.2.1. İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ve Enzim Bağımlı Immunosorbent Testi (ELISA)

Theileriosise karşı kontrol programlarının etkili olabilmesi için doğru epidemiyolojik verilerin elde edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Gerçek epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesi ise etkili tanı metotlarının varlığı ile mümkün olabilmektedir. Tanı metotlarının geliştirilmesi amacıyla *Theileria*'nın kompleks yaşam döngüsü içerisinde

yer alan omurgalı konakdaki farklı gelişim safhaları incelenmiştir. Farklı hücre ve dokularda gelişen bu aşamalar, farklı konak tanıma sistemleri ve immun cevap mekanizmaları oluşturmaktadır. *Theileria*'nın sporozoit, şizont, merozoit ve piroplasm safhaları konak hücre tarafından tanınmaktadır. Fakat yalnızca sporozoit ve merozoitler ekstrasellüler koruyucu humoral yanıtta etkilenmektedir. Sporozoitler enfekte kenelerin inokulasyon sayısı ile sınırlı olarak konağa aktarılmakta ve kısa bir süre içerisinde dolaşımda kalmaktadır. Bu nedenle sporozoit aşamasında immun cevabın ve koruyucu bağışıklığın gelişimi neredeyse mümkün olmamaktadır. Bu da bağışıklığın parazitin yaşam döngüsünün diğer aşamalarında oluştuğunu düşündürmektedir. Sporozoit ve merozoitin aksine lenfositlerdeki makroşizont ve eritrositlerdeki piroplasm safhaları hücre içinde gelişmektedir. Dolayısıyla bu safhalara karşı humoral yanıtın tespiti ve tanınması onların antijenleri ile mümkün olmaktadır. Parazitin gelişim safhalarındaki antijenlerine karşı humoral yanıtın tanınması ve algılanması ise tanı testinde kullanılan antijene ve saflığına bağlı olarak oluşmaktadır (Brown ve ark 1994).

IFA testi şimdiye kadar sığırlarda *Theileria* enfeksiyonlarına karşı oluşan antikorları tespit etmekte başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Burrige ve Kimber 1973). Ayrıca IFA testinin, Giemsa boyama yöntemi ile piroplasmaların mikroskopik olarak tespit edilmesine oranla çok daha duyarlı bir yöntem olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (Dhar ve Guatam 1977, Darghouth ve ark 1996). Ancak IFA testinde sonuçların subjektif olarak değerlendirilmesi ve *Theileria* türleri arasında çapraz reaksiyonların gözlenmesi test için önemli bir problem teşkil etmektedir. Ayrıca geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalarda akıcı ve kolay uygulanabilir olmaması dezavantajlarıdır (Kiltz ve ark. 1986, Burrige ve ark. 1974). IFA testine nazaran ELISA'nın pek çok avantajı bulunmaktadır. Standardize edilebilir, ucuz ve kolay uygulanabilen bir testtir. Sonuçların objektif olarak değerlendirilmesi ve çok sayıda örneğin incelenebilmesi nedeniyle epidemiyolojik araştırmaların gereksinimlerini karşılayan bir testtir.

Bugüne kadar *Theileria annulata*'ya karşı gelişen antikorların belirlenebilmesi amacıyla ELISA testleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu testlerde saflaştırılmış piroplasm ya da makroşizontlardan direkt olarak hazırlanan antijenler kullanılmıştır. Fakat şimdiye kadar, geliştirilen bu testlerin sensitivitesi ve spesifitesi tam olarak incelenememiştir (Manuja ve ark 2000). Ayrıca parazit ham materyalinden saflaştırılan antijenlerin

standardizasyonu zor olmakla birlikte parazitin çoğaltılabilmesi için deneysel hayvanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda bu problemler çeşitli rekombinant parazit antijenlerinin tespit edilmesi ile aşılmaya çalışılmıştır. Parazitin yaşam döngüsü içerisinde çeşitli doku ve hücrelerde geçen, farklı gelişim safhalarına karşı oluşan antijenler tespit edilerek, ELISA’da kullanım alanı bulmuştur. Şimdiye kadar tespit edilen rekombinant antijenler; sporozoit yüzey antijeni SPAG-1, merozoit rhoptri antijeni Tamr-1, merozoit ve piroplasm yüzey antijeni Tams-1, TamtHSP70, *T. annulata* yüzey antijeni TaSP, şizont yüzey antijeni TaD, şizont proteini TaSE, mitokondriyal HSP70’dir (Williamson 1989, Hall ve ark 1992, Shiels ve ark 1994, Shiels ve ark 1995, Schnittger ve ark 2000, Schnittger ve ark 2002, Schneider ve ark 2004, Schneider ve ark 2007). Tams-1’in duyarlılığı ve özgüllüğü yapılan bir çalışmada iki grafik alıcı-çalışma özelliği (TG-ROC) kullanılarak araştırılmıştır. TG-ROC analizi, ELISA için optimal ‘cutoff’ değerini tespit etmek için yapılmıştır. TG-ROC analizinde ELISA’nın doğruluğunu belirleyebilmek ve maksimum duyarlılık, özgüllük elde edebilmek için referans olarak IFA testi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda enfeksiyon sonrası 3 aya kadar IFA testinin daha duyarlı ve spesifik olduğu; 3 aydan sonraki dönemde ise IFAT’ın yanı sıra ELISA testinin de duyarlı ve spesifik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Tams 1 ELISA testinin, tropikal theileriosisin epidemiyolojisinin belirlenmesinde potansiyel bir test olduğu bildirilmiştir (Gubbels 2000). SPAG-1 rekombinant antijeninin indirekt ELISA’da kullanıldığı çalışmada doğal enfekte hayvanlarda bu antijene karşı oluşan antikor miktarının tanı için yeterli düzeyde olmadığı görülmüştür. Ancak re-enfeksiyon sonrası ya da tekrar eden kene enfestasyonu sonucu hayvanlarda yeterli düzeyde antikor oluştuğu bildirilmiştir (Williamson 1994). *T. annulata* yüzey proteini TaSP geni, sporozoit ve şizont safhalarında parazit genomu ve transkripsiyonu içinde tek bir kopyası bulunmaktadır. Muhtemelen 36 kDa moleküler ağırlığa sahip TaSP, yaklaşık 315 amino asit proteini kodlamaktadır (Bakheit ve ark 2004). Saha şartlarında sığırlarda *T. annulata* enfeksiyonunun tanısında indirekt TaSP ELISA’nın kullanışlı bir tanı testi olduğu bildirilmiştir (Salih ve ark 2005).

Bu tanı testlerinin yanı sıra, daha önce enfekte olmuş ya da enfekte olduğundan şüphelenilen hayvanların taşıyıcılık durumunu belirlemede geleneksel olarak kullanılan iki farklı tanı yöntemi bulunmaktadır. İlk yöntemde periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBM) izolasyonu ile makroşizontla enfekte hücre kültürlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Doku kültüründe *Theileria* makroşizontları ile enfekte lökositlerin *in*

vitro ortamda çoğalması sağlanarak enfeksiyonun varlığı belirlenmektedir (Sharma ve Brown 1981). Xenodiagnoz adı verilen ikinci yöntem ise duyarlı bir hayvanda deneysel kene enfeksiyonu oluşturularak yapılmaktadır. Enfekte olduğu şüphelenilen hayvan üzerinden beslenen keneler doyup, düştükten sonra gömlek değiştirerek sporozoit aşamasında tükürük bezlerinde paraziti barındırmaktadır. Bu keneler tekrar duyarlı bir hayvan üzerinde beslendiğinde, enfeksiyonu duyarlı hayvana nakledip nakletmediği belirlenerek tanı konmaktadır (Sergent 1945, Brown ve ark 1994). Bu iki yöntem zaman alması, zahmetli olması ve duyarlılıklarının olmaması nedeni ile pratikte kullanılmamaktadır.

1.9.2.2. Lateral Flow İmmunokromatografik Test

Lateral flow immunoassay, veteriner, tıbbi, gıda, tarım, çevre ve endüstriyel alanda kullanılan önemli bir tanı yöntemidir. Malaria (Mills ve ark 1999), cryptosporidiosis (Chan ve ark. 2000), leishmaniasis (Reithinger ve ark 2002), toxoplasmosis (Huang ve ark. 2004a), coccidiosis (Liao ve ark 2005), babesiosis (Huang ve ark 2004b, Kim ve ark 2007, Kim ve ark 2008) ve trypanosomiasis (Houghton ve ark. 2009) gibi birçok protozoan hastalıklarının serolojik tanısında immunokromatografik testler geliştirilmiştir. Günümüze kadar tropikal theileriosisin tanısında IFAT, indirekt ELISA ve cELISA'nın kullanıldığı çok sayıda çalışma bildirilmiştir (Burrige ve Kimber 1973, Dhar ve Guatam 1977, Darghouth ve ark 1996, Gubbels ve ark 2000, Bakheit ve ark 2004, Renneker ve ark 2008). Kompleks bir prosedüre sahip IFA testinde, çapraz reaksiyon problemlerinin görülmesinin yanı sıra pahalı laboratuvar ekipmanları ve deneyimli elemana ihtiyaç duyulmaktadır (Burrige ve ark 1974). ELISA, laboratuvar ortamında geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalar için hem spesifik hem de kullanışlı bir testtir (Bakheit ve ark 2004, Renneker ve ark 2008). Fakat sahada hızlı tanı elde edilmesi açısından uygun değildir. Son yıllarda *T. annulata* enfeksiyonlarının serolojik tanısında hızlı bir immunokromatografik strip testi geliştirilmiştir. cELISA testi ile *T. annulata* spesifik antikorlarının tespitinde immunodominant antijen olarak geçerliliği kabul edilen TaSP proteinin kullanıldığı, *T. annulata*- Lateral Flow Device (Ta-LFD) oldukça basit ve kullanışlı bir testtir (Renneker ve ark 2008, Renneker ve ark 2009; Abdo ve ark 2010). Diğer serolojik testlerle

karşılaştırıldığında hızlı sonuç alınması, deneyimli eleman ve ekipman gerektirmemesi ve sahada pratik olarak kullanılması açısından avantajlıdır. Ta-LFD ile yapılan bir çalışmada *T. annulata* ile deneysel enfekte hayvanların serumunda tespit edilen antikorlarla diğer bovine patojenler (*T. parva*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale* ve *Trypanosoma brucei*) arasında çapraz reaksiyon gözlenmemiştir. Aynı çalışmada Ta-LFD'nin duyarlılığı ve özgüllüğü referans test olarak IFAT ile karşılaştırıldığında % 96.3 ve % 87.5; indirekt ELISA ile karşılaştırıldığında % 98.7 ve % 81.8; competitive ELISA ile karşılaştırıldığında % 100 ve % 47.6 olarak tespit edilmiştir (Abdo ve ark 2010).

1.9.3. Moleküler Tanı

1971 yıllarında temelleri atılan rekombinant DNA teknolojisinde yaşanan gelişmeler, birçok parazit türünün tanısına önemli bir katkı sağlamaktadır (Dana ve Nathans 1971, Caskey 1987, Wilson 1991). Günümüzde bu teknoloji ile birlikte parazite özgü monoklonal antikorlar, antijeni tanımlayan rekombinant DNA teknikleri, tekrarlayan DNA bölgeleri, özgül DNA problemleri, oligonükleotid problemleri ve rRNA problemleri moleküler biyolojik yöntemler içerisinde kullanılmaktadır (Uilenberg ve ark 1993). *Theileria* türlerine özgü tanı yöntemleri geliştirebilmek amacıyla yapılan bir çalışmada ssuRNA geninin parazit türlerine özgü bölgelerine ait spesifik oligonükleotid problemleri dizayn edilmiştir (Allsopp ve ark 1993). Bu problemler aracılığıyla altı farklı *Theileria* türünün tanısı, hem direkt olarak parazit ssurRNA gen bölgesinin tespiti ile hem de parazit ssurRNA gen bölgesinin çoğaltılarak (PCR) hibridizasyonu sonucu ortaya konmuştur (Allsopp ve ark 1993). *T. annulata* Tunus izolatları arasındaki polimorfizmin araştırıldığı başka bir çalışmada DNA problemleri kullanılarak RFLP yöntemi ile kesilen gen bölgelerinin boy farklılıkları tespit edilmiştir (Ben Miled ve ark 1994). Afrika'da yapılan bir çalışmada restriksiyon enzimleri ile kesilen *T. parva* şizontları ile enfekte lenfosit hücre kültürleri ve farklı bölgelerden alınan izolatları DNA problemleri aracılığıyla incelenmiş. İnceleme sonucunda *T. parva*'nın farklı alt hücre klonları ve farklı bölgelerden elde edilen suşları arasında antijenik olarak belirgin farklılıklar tespit edilmiştir (Bishop ve ark 1994). Son yıllarda populasyon genetiği çalışmalarında, parazit populasyonlarının genetik varyasyonlarının belirlenmesi amacıyla genom üzerinde tekrarlayan DNA bölgeleri PCR

ile çoğaltılarak suşlar arasındaki polimorfizmin karakterizasyonu yapılmaktadır (Weir ve ark 2007).

Günümüzde *Theileria* türlerinin moleküler düzeyde, duyarlı ve özgül olarak teşhisinde birçok farklı PCR yöntemi kullanılmaktadır (de Kok ve ark 1993, d'Oliveira ve ark 1995, İlhan ve ark 1998, Gubbels ve ark 1999, Martin-Sanchez ve ark 1999, Sparagano ve ark 2002). Bu yöntemlerde PCR'ın etkinliğinin artırılması açısından, seçilen genomik hedef ve primerler değişkenlik göstermektedir. *T. annulata*'nın PCR ile tanısında yaygın olarak kullanılan genomik hedef major merozoit/piroplasm yüzey proteini (Tams-1)'dir. d'Oliveira ve ark tarafından 1995 yılında geliştirilen, Tams-1 genini hedefleyen N516/N517 primerleri, *T. annulata* enfeksiyonlarının PCR'a dayalı değerlendirilmesinde oldukça geniş bir kullanım alanı bulmuştur (d'Oliveira ve ark 1997, Leemans ve ark 1999, Martin-Sanchez ve ark 1999, Kirvar ve ark 2000, Almeria ve ark 2001, Sparagano ve ark 2002, Dumanlı ve ark 2005, Aktaş ve ark 2006, Altay ve ark 2008, Durrani ve Kamal 2008, Bilgiç ve ark 2010, Mahmmud ve ark 2010, Shahnawaz ve ark 2011). 30 kDa major merozoit yüzey proteini (Tams-1)'nin duyarlılığı N516/N517 primerleri ile 2-3 parazit/µl kan, Tams1-T3/Tams1-T5 ve Tams1F/Tspms1R primerleri ile 1 parazit/µl kan olarak belirlenmiştir (d'Oliveira ve ark 1995, Kirvar ve ark 2000). Farklı çalışmalarda PCR tekniği ile *Theileria* türlerinin tanısında 18S ssu rRNA geni (de Kok ve ark 1993, İlhan ve ark 1998, Gubbels ve ark 1999, Georges 2001, Sibeko ve ark 2008, Papli ve ark 2011, Ros-Garcia ve ark 2012), ısı şok proteini HSP70 (Shayan ve ark 1998, Shayan ve Rahbari 2005), beta tubulin geni (Caccio ve ark 2000) ve sitokrom b geni (Criado ve ark 2006, Huseyin ve ark 2010) genomik hedef olarak kullanılmıştır.

Taşıyıcı hayvanlarda *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının tanısında etkili olduğu kanıtlanmış moleküler tanı testlerinden biri olan reverse line blot hibridizasyon testi (RLB) ile aynı anda birden fazla parazit türü tespit edilebilmektedir (Gubbels ve ark 1999). Bu yöntemle *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S ssu rRNA geninde ortak bulunan bölgelerine bağlanan primerler aracılığıyla bu türler arasında farklılık gösteren V4 değişken bölgesi PCR tekniği ile çoğaltılmaktadır. Çoğaltılan bu örneklerle türe spesifik V4 değişken bölgesine spesifik oligonükleotid problemlerin bağlandığı membran üzerinde meydana gelen hibridizasyon sonucu tür tayini duyarlı olarak yapılmaktadır (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark. 2001). *T. annulata*'nın tanısı amacıyla RLB-F2/RLB-R2 primerleri

kullanılarak yapılan RLB testinde 18S ssuRNA geninin duyarlılığı 3 parazit/μl kan olarak bildirilmiştir (Gubbels ve ark 1999).

Son yıllarda DNA'nın izotermal şartlar altında yüksek spesifite, yüksek etkinlik ve hız ile amplifiye edildiği yeni bir yöntem olan LAMP (Loop-mediated izotermal amplifikasyon) tekniği geliştirilmiştir (Notomi ve ark 2000, Nagamine ve ark 2002). LAMP tekniği ile bir saatten daha kısa bir sürede çok az bir DNA kopyasından 10⁹ kopyaya kadar DNA çoğaltılabilmektedir. DNA ekstraksiyonu gerektirmeden, denaturasyon oluşturmeyen bir sıcaklıkta, sadece bir damla kan emdirilmiş filtre kağıdı ile reaksiyon başlatılmaktadır (Nagamine ve ark 2001). LAMP'ın analitik duyarlılığı, *T. annulata* ile enfekte hücre kültürlerinden izole edilen genomik DNA'nın 10 kat seri dilüsyonlarının incelendiği bir çalışmada 10 pg/μl olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışma ile geleneksel PCR yöntemlerine nazaran LAMP tekniğinin 10 kat daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu ve *Theileria* enfeksiyonlarının tanısında PCR'a alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Salih ve ark 2008).

1.10. Tedavi

Theileriosisin tedavisinde buparvaquone (2-trans (4-t-butylcyclohexyl-methyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone) en etkili anti-theilerial ilaç olarak bildirilmektedir (Dhar ve ark 1986, Dolan ve ark 1992, Singh ve ark 1993). Buparvaquone'nun parazitin elektron transport sistemine etki etmesi ve plazma yarılanma ömrünün uzun olması etkinliğini artırmaktadır (Hudson ve ark 1985). Klinik bulguların görüldüğü erken dönemde 2,5 mg/kg kas içi uygulanan buparvaquone *T. annulata*'nın hem şizont hem de piroplasm formuna etkili olmaktadır. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde iyileşme belirtileri görülmediği takdirde ikinci bir doz uygulaması da gerekebilmektedir (McHardy ve ark 1987, Dolan ve ark 1992, Singh ve ark 1993). Theileriosisin endemik olarak görüldüğü bölgelerde tedavide buparvaquoneun yaygın olarak kullanımı, beraberinde ilaca karşı tam bir yanıt alınamaması sonucunu da getirmektedir. Yapılan çalışmalarla bildirilen bu durum parazitin ilaca karşı geliştirmiş olabileceği muhtemel bir direnç oluşumunu düşündürmektedir (Mhadhbi ve ark 2010, Sharifiyazdi ve ark 2012).

1.11. Korunma ve Kontrol

Sığırlarda theileriosisin kontrol altına alınmasında vektör kene mücadelesi, dirençli ırkların kullanılması ve aşılama önemli kontrol stratejileridir. Theileriosisin zararlarını en aza indirebilmek amacıyla hayvanların barınma ve bakım şartlarının iyileştirilmesi de diğer önemli bir husustur. Bakım şartları içerisinde sürü ile hastalık arasındaki ilişki sınırlandırılmalı dolayısıyla hayvan hareketleri kontrol altına alınmalıdır. Böylece enzootik denge de korunmuş olmaktadır.

1.11.1. Vektör Kenelerle Mücadele

Theileriosisin endemik olarak görüldüğü bölgelerde vektör kenelerle mücadele, hastalığın etkilerini azaltmada ilk başvuru olan yöntemdir. Amaç hastalığın naklinin önlenmesi, vektör kenelerle duyarlı hayvanların temasının kesilmesini sağlamaktır. Ayrıca endemik stabil bölgelerde hayvanların kasıtlı olarak kene enfestasyonuna maruz bırakılması stabilitenin korunması açısından hastalığın kontrolünde kullanılmaktadır (Brown 1990).

Vektör kenelerle mücadele, hayvanların ve hayvan barınaklarının Avermektinler, Piretroidler, Organofosfatlar, Formamidinler gibi periyodik akarisit uygulamaları ile yapılmaktadır. Başarılı bir uygulama için mücadele zamanı ve programının iyi planlanması gerekmektedir (Ghosh ve ark 2006). Vektör kene türlerinin gelişme safhaları ve sığır üzerinde kan emme sürelerinin bilinmesi uygulama açısından önemlidir. Kenelerin 24-72 saat gibi kısa sürelerde kan emme zorunluluğu göz önüne alındığında kenelere karşı kullanılacak akarisit uygulamalarının da sıklığı artmaktadır (Pipano 1989). Akarisit uygulamasının artması hastalığın endemik stabil olduğu bölgelerde stabilitenin bozulmasına ve yaşanacak herhangi bir akarisit uygulama aksaklığı halinde hayvanlarda ciddi bir hastalık tablosu oluşumuna sebep olmaktadır. Aynı zamanda ette ve sütte kalıntı problemlerinin yaşanmasına ve çevre kirliliğine yol açmaktadır. Uzun süreli aynı tür akarisit uygulanması sonucunda ise kenelerde direnç gelişmesi muhtemel bir sonuçtur (Tait ve Hall 1990, Norval ve ark 1992). Akarisit uygulamalarının yanı sıra ahır ve barınaklarda

kenelerin saklanabileceği yarık, çatlak vb. yerlerin tamamen sıvanarak kapatılması da mücadelede önemli bir hususdur.

1.11.2. Aşılama

İlk kez 1924 yılında Cezayir’de tropikal theileriosise karşı yapılan aşılama çalışmalarında, enfekte hayvanlardan alınan kan örneği enfekte olmayan hayvanlara aktararak hastalığın kontrolü amaçlanmıştır. Bu aşılama yönteminde enfekte edilen hayvandan alınan kan sığırdan sığıra transfüzyon yolu ile nakledilerek *Theileria*’nın merozoit formuna dönüşme yeteneği kaybolmakta ve hastalığa karşı korunma sağlanmaktadır. Fakat aynı zamanda kan yolu ile bulaşan diğer hastalıkların da bu aşılama yöntemi ile sağlıklı hayvanlara nakledilme ihtimali önemli bir risk olarak görülmektedir (Sergent 1945).

Theileria annulata’nın şizont formlarının in vitro kültürü çalışmalarında kaydedilen ilerlemelerle birlikte, aşı olarak kullanılan enfekte kandan çok daha güvenli olan canlı-attenüe hücre kültürü aşıları üretilmiştir. İlk kez İsrail’de Pipano tarafından geliştirilen *T. annulata* hücre kültürü aşılarında, şizont ile enfekte sığır lenfositleri in vitro ortamda sürekli pasajlanarak parazitin virulensi ve merozoit oluşturma yetenekleri zayıflatılmaktadır. 1981 yılında yapılan bir çalışmada *Theileria*’nın Ankara suşundan izole edilen şizontlar her 20-30 pasajda bir duyarlı buzağuları inokule edilerek virulensleri kontrol edilmiş ve tam attenüasyonun yaklaşık 250. pasajlarda elde edildiği bildirilmiştir (Özkoç ve Pipano 1981). Attenüasyon oranı yapılan pasajlama sayısı ile doğru orantılı olarak artmakla birlikte, parazitin attenüasyonu için gerekli pasaj sayısı için herhangi bir belirteç bulunmamaktadır. Aynı zamanda farklı izolatlar arasında attenüasyon zamanı değişkenlik göstermektedir (Hooshmand-Rad 1973, Pipano 1997).

Canlı attenüe aşılar Türkiye dahil pek çok ülkede kullanılmaktadır (Pipano 1989, Singh 1990, Zhang 1990, Zabrosky 1990, Sayın ve ark 2004). Türkiye’de attenüe *T. annulata* şizont aşısı 1982 yılından itibaren Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü tarafından üretilmektedir. *T. annulata*

Ankara suşundan hazırlanan aşının dondurularak muhafaza edilmesi, sahaya ulaştırılması ve çözdürülmesi sırasında oluşabilecek kayıplar göz önünde bulundurularak bir dozu 10^7 hücre olacak şekilde hazırlanmaktadır (Özkoç ve Pipano 1981, Onar 1989, Sayın ve ark 2005). Türkiye’de şizont aşısının etkinliğinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Çukurova’da yapılan bir çalışmada tropikal theileriosise karşı attenüe 10^7 *T. annulata* şizont aşısı ile aşılanan farklı yaş gruplarındaki 58 adet hayvanın aşılamadan sonraki seropozitiflikleri IFA testi ile araştırılmıştır (Nalbantoğlu 1998). Araştırma sonucunda 0-1 yaş grubunda aşılamadan sonra 4. aydan itibaren azalan seropozitiflik 12 ay boyunca devam etmiştir. 1-2 yaş grubunda 3. aydan itibaren düşmeye başlayan seropozitiflik 7. ayda sıfır olarak tespit edilmiştir. 2 yaş ve üzeri hayvanlarda 3. ayda seropozitiflik azalmış ve 4. ayda tamamen sıfırlanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak aşının genç hayvanları daha fazla ve daha uzun süre koruduğu bildirilmiştir. Aynı hayvanların antikor titreleri incelendiğinde 0-1 yaş grubu hayvanları boyunca hiç *T. annulata* ile karşılaşmamış, ilk kez aşılanan hayvanlarda hem piroplasm hem de şizont antikor düzeyinin yüksek olduğu ve uzun süre düşük düzeylerde devam ettiği tespit edilmiştir. 1-2 yaş grubu hayvanlarda antikor düzeyi piroplasmda 6 ay, şizontta 4 ay devam etmiştir. 2 yaş ve üzerindeki hayvanlarda ise hem piroplasm hem de şizont antikorlarının yaklaşık 3 ay düşük düzeyde sürdüğü bildirilmiştir (Nalbantoğlu 1998). Farklı sayıda aşı hücresi içeren dozların incelendiği başka bir çalışmada, aşı ve aşısız bütün buzağılarda çelincadan sonra enfeksiyon meydana gelmiş. Şizont, piroplasm ve ateş görülmüş; fakat aşı ve aşısız buzağılara göre aşısız buzağılarda parazitemi-şizont yüzdeleri oldukça yüksek ve klinik semptomları daha şiddetli olarak tespit edilmiştir. Uygulanan aşı dozları ise 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 ve 10^7 hücre oranlarında olup, aşı dozları arasında belirgin bir farklılık tespit edilememiştir. Yalnızca 10^6 hücrelik aşı dozunun, kene çelincinin yüksek olduğu durumlarda hastalıktan korumaya yeterli olmadığı anlaşılmıştır (Sayın ve ark 2004). 2008 yılında yapılan bir diğer çalışmada aşı ve aşısız gruptaki hayvanlardan 10’unda klinik theileriosis gelişmiş ve 10’undan 9’u uygulanan tedaviye cevap vermiştir. Ancak 1 hayvan tedaviye rağmen ölmüştür. Bu çalışmada tropikal theileriosise karşı uygulanan aşının % 100 koruma sağlayamadığı görülmüştür (Aysul ve ark 2008). Aşıların tam koruma sağlayamaması konusunda çok çeşitli görüşler öne sürülmektedir. Genellikle attenüe makroşizontlarla homolog virulent suşlara karşı elde edilen bağışıklık yüksek düzeydeyken, heterolog virulent suşlara karşı elde edilen bağışıklık çok daha az olmaktadır (Barnett 1977, Gill ve ark 1981, Darghouth ve ark 1996). Aşının hazırlandığı hücre kültürlerinde bulunan parazit popülasyonlarının varlığı da aşının koruyuculuğunu etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda düşük pasaj attenüe

hücre kültürlerinde genellikle birden fazla parazit popülasyonunun bulunduğu buna karşılık yüksek pasaj hücre kültürlerinde tek bir parazit popülasyonunun olduğu bildirilmiştir (Ilhan 1995). Bu durumda hayvanların birden fazla parazit popülasyonu ile karşılaşmasının daha iyi bir koruma sağlayacağını düşündürmektedir. Pasajlamının çok uzun sürdürülmesi ve hücrelerin fazla attenüe olması sonucunda hücrelerin patojeniteleri ile birlikte aşının koruyuculuğu da azalmaktadır (Pipano 1989, Wenshun ve Hong 1994).

1.11.3. Dirençli Irkların Kullanılması

Tropikal theileriosis'e karşı mevcut kontrol stratejilerinden akarisit ve ilaçların kullanımı maliyetli olup, düzenli uygulama programları gerektirmektedir. Ayrıca parazit ve kenede direnç oluşumu da gözlenebilmektedir. Attenüe hücre aşıları theileriosis'in kontrol altına alınmasında etkili bir yöntemdir. Fakat organize ve koordineli aşılama programları düzenlenmesi önemlidir (Tait ve Hall 1990, Hashemi-Fesharki 1991, Minjauw ve de Castro 2000). Bu kontrol programlarına alternatif olarak theileriosis'e karşı genetik dirençli yüksek sığır ırklarının kullanılması ekonomik ve çevresel açıdan sürdürülebilir ideal bir stratejik yöntemdir (Glass ve Jensen 2007). Hem konak hem de parazit açısından gelişmekte olan genomik kaynaklar, hastalığın kontrolünde etkili, seçilebilir direnç genlerinin tanımlanmasında önemli bir yol açmıştır. Ancak dirence sebep olan genlerin belirlenmesinden önce ırkların ve bireylerin ayırt edilebilir fenotiplerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Glass ve ark 2005). Tropikal theileriosis üzerine yapılan farklı çalışmalarda, özellikle verimliliğin geliştirilmesi açısından teşvik edilen Holştayn-Avrupa sığır ırklarında hastalığın yerli ırklara nazaran yüksek mortalite ve morbidite ile seyrettiği bildirilmiştir (Purnell 1978, Hashemi-Fesharki 1988, Brown 1990, Oudich ve ark 1993). Hindistan'ın yerli ırkı Sahiwal (*Bos indicus*) ile Sudan orjinli Kenana ırklarının (*Bos taurus*) theileriosis'e karşı genetik dirençleri deneysel çalışmalarla doğrulanmıştır (Preston ve ark 1992, Preston ve ark 2002, Glass ve ark 2005). Ayrıca Holstein-Friesian ırkının theileriosis'e karşı diğer Avrupa ırklarından çok daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Preston ve ark 1992).

2. BABESIA

Babesiosis tropik ve subtropik iklim kuşağında evcil ve yabani hayvanlarda çok yaygın olarak rastlanan, *Ixodidae* ailesine bağlı keneler tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilen bir protozoon hastalığıdır (Ristic ve Lewis 1977). Özellikle kenelerin aktif olduğu Nisan-Ekim ayları arasında yaygın olarak görülen bu hastalık, bu dönemde ithal sığırlarda yüksek oranlarda ölüme neden olabilmektedir. Hastalık hayvanlarda genellikle yüksek ateş, ikterus, hemoglobüri ve anemi semptomları ile seyretmektedir (Mimioğlu ve ark 1973, Sayın ve ark 1997).

2.1. Tarihçe

Babes, ilk kez 1888 yılında Romanya’da sığır eritrositleri içerisinde, sığırlarda hemoglobüriye neden olan (Red Water Fever adıyla tanımladığı) mikroorganizmaları keşfetmiştir. Koyun eritrositlerinde de benzer mikroorganizmalara rastlayan Babes, bakteri olduğunu düşündüğü bu mikroorganizmalara ‘*Haematococcus bovis*’ ismini vermiştir. *Babesia* parazitlerinin ilk kez bu isimle tanımlanmasına rağmen; Smith ve Kilborne 1893’de *Babesia* parazitlerinin neden olduğu ‘Texas Fever’ı (Amerika’nın güney kısmında sığırlarda akut ateşli durumu) gösterene kadar, Smith ve Kilborne *Babesia*’ı bu hastalıkla ilişkilendirmemiştir. Hastalığa ‘*Pyrosoma bigeminum*’ ismini öneren Smith ve Kilborne, aynı zamanda *Babesia*’nın keneler tarafından nakledildiğini ilk kez keşfetmiştir. Bu keşifle hastalığın taşınmasında arthropod ara konağın gerekliliği epidemiyolojide çok önemli bir gelişme olup, hem insan hem de hayvanlar açısından birçok hastalığın kontrolünde yeni bir yol açmıştır (Mimioğlu ve ark 1969, Mahoney ve ark 1977, Kuttler 1988, Bock ve ark 2004, Uilenberg 2006). 1893 yılında Starcovici, Babes’in ‘*Haematococcus bovis*’ ismini verdiği etkeni ‘*Babesia bovis*’ ismi ile yeniden adlandırmıştır (Kuttler 1988). 1899 yılında Smith ve Kilborne Amerika’da sığırların eritrositlerinde yuvarlak ve armut şekillerinde gördükleri etkenlere ‘*Piroplasma bigeminum*’ adını vermişlerdir. Daha sonra bu isim ‘*Babesia bigemina*’ olarak değiştirilmiştir (Mimioğlu ve ark 1969, Kuttler 1988). 1903 yılında Arjantin’de Lignieres daha sonra *Babesia bigemina* ve *Babesia argentina* olarak adlandırılan *Babesia*’nın iki formunu tanımlamıştır. Morfolojik ve serolojik özellikleri

bakımından *Babesia argentina*'nın ilerleyen dönemde *Babesia bovis* olduğu anlaşılmıştır (Kuttler 1988). M'fadyean ve Stockman 1911 yılında *Babesia divergens* olarak adlandırdıkları eritrosit içi organizmalara rastlamışlar ve bu organizmaların alyuvarların çevresinde yer aldıklarını aynı zamanda aralarındaki açılardan geniş olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *Babesia bigemina*'ya benzer başka bir tür daha tespit etmişler. Ancak bu türün *Babesia bigemina* olmadığını muhtemelen *Babesia major* olabileceğini bildirmişlerdir. Mimioğlu ve arkadaşları (1969), Sergent ve arkadaşlarının 1926'da buldukları *Babesia* türünün *B. major* olduğunu ifade etmişlerdir. Brocklesby 1976 yılında sığırlarda sadece dört *Babesia* türünün bulunduğunu ve bunların *B. bigemina*, *B. major*, *B. bovis* ve *B. divergens* olduğunu belirtmiştir. Starcovici, Smith ve Kilborne sığır eritrositlerinde gördükleri etkenlerin birbirleri ile yakın ilişkili fakat birbirinden farklı iki tür oldukları konusunda fikir birliğinde bulunmuşlar ve bu türlerin sinonim olduğu kabul edilmiştir (Mahoney ve ark 1977, Purnell 1981, Higuchi ve ark 1989). Şimdiye kadar *Babesia* için *Piroplasma*, *Achromaticus*, *Nicolliia*, *Nuttallia*, *Smithia*, *Rossiella*, *Rangelia*, *Microbabesia*, *Babesiella*, *Francaiella*, *Luhsia*, *Sogdianmella* ve *Pattonella* gibi birçok isim önerilmiştir. Bu isimler arasında en iyi bilinen isim *Piroplasma*'dır ve günümüzde de geçerliliğini sürdürmektedir. Genellikle babesiosis ve theileriosis hastalıkları için piroplasmosis terimi kullanılmaktadır (Uilenberg 2006).

2.2. Sistematikteki Yeri

Babesia türlerinin taksonomik sınıflandırması günümüzde de kullanılan ve geçerliliğini koruyan sistematige göre Apikompleksa anacında, Sporozoea sınıfında ve Piroplasmida alt sınıfında yer almaktadır (Soulsby 1982).

Alem: Animale

Alem altı: Protozoa

Anaç: Apikomplexa

Sınıf: Sporozoea

Sınıf altı: Piroplasmia

Dizi: Piroplasmida

Aile: Babesiidae

Soy: *Babesia*

Babesia türleri, uzun bir dönem enfekte hayvanların kan frotilerindeki morfolojik parametrelere dayanılarak tespit edilmiştir. Bu parametreler konak spesifitesi ile birlikte birçok türün sınıflandırılmasını sağlamıştır. Ancak zamanla 100'den fazla *Babesia* türünün varlığının tanımlanması, aynı zamanda çok çeşitli omurgalı konakları enfekte etmesi konak spesifitesinin objektif olmadığını düşündürmektedir. Bu nedenle geleneksel metodlarla morfolojik olarak benzer ya da hemen hemen aynı birçok *Babesia* türünün birbirlerinden ayırt edilerek farklılıklarının ortaya konması oldukça zorlaşmıştır (Persing ve ark 1995). Bu metodlar *Babesia* türlerinin klasifikasyonunda yerini kademeli olarak çok daha subjektif karakteristik özelliklere dayanan, benzer organizmaların doğrulanmış farklılıklarını ayırt edebilen moleküler biyolojik yöntemlere bırakmıştır. Moleküler analizlere dayalı sınıflandırmanın morfolojik parametrelere ya da konak spesifitesine tercih edilmesinin *Babesia* türleri açısından birkaç sebebi vardır. Örneğin; aynı konağa ve benzer morfolojik özelliklere sahip farklı parazitlerin olması (*Plasmodium* ve bazı *Babesia* türlerinde olduğu gibi), aynı parazitin farklı konaklarda farklı mikroskobik görünüme sahip olabilmesi ki bunun sebebi muhtemelen immunolojik predispozisyonlar ve dalak fonksiyonları gibi konağa spesifik faktörlerdir (*Babesia divergens*'in sığır eritrositlerinde karakteristik görünümünde olması fakat insanlarda çoğunlukla pleomorfik yapı göstermesi). *Babesia microti* gibi geniş konak spesifitesine sahip parazit üzerine yapılan çalışmalar da gösteriyor ki *Babesia* türlerinin konak spesifitesine dayanan sınıflandırması güvenilir olmadığı düşünülmektedir (Etkind ve ark 1980). Yeni moleküler teknikler, görülebilir karakteristik gözlemlerden çok daha objektifdir. Aynı zamanda *B. microti* gibi birden fazla konak organizmasını enfekte eden ve önceden farklı parazit olduğu düşünülen ancak sinonimi olan birçok *Babesia* türlerinin nükleik asit sekanslarının karşılaştırılmasına

dayanarak yapılan filogenetik sınıflandırmalar çok daha belirleyici ve anlamlıdır (Homer ve ark 2000).

Babesia türleri morfolojik olarak küçük *Babesia* (trofozoitleri 1.0-2.5 µm'dir. *B. bovis*, *B. gibsoni*, *B. divergens*, *B. microti*, *B. rodhaini* vb) ve büyük *Babesia* (trofozoitleri 2.5-5.0 µm'dir. *B. bigemina*, *B. major*, *B. canis* vb) olarak gruplandırılır. Küçük ve büyük *Babesia* türleri iki filogenetik sınıf içerisinde yer almaktadır. Genellikle *Babesia*'nın bu morfolojik sınıflandırması ile nükleer small subunit ribozomal DNA (nss-rDNA) sekanslarına dayanan filogenetik karakterizasyonları arasında bir tutarlılık vardır. *Theileria* türleri küçük *Babesia* türleri ile çok daha yakın ilişkilidir. Ancak küçük *Babesia* türü olan insanların da patojeni *B. divergens* genetik olarak büyük *Babesia* türleri ile yakından ilişkilidir (Persing ve ark 1992, Hunfeld ve ark 2008).

2.3. Sığırlarda Önemli *Babesia* Türleri

2.3.1. *Babesia bovis*

Babesia bovis, *B. bigemina* ile birlikte Türkiye'de ve Dünya'da sığırlarda yaygın olarak görülen önemli bir *Babesia* türüdür. Kuzey Avrupa, Afrika, Amerika, Asya ve Avustralya'da yayılım göstermektedir. *Rhipicephalus* (= *Boophilus*) *annulatus*, *R. microplus*, *R. bursa* ve *Ixodes ricinus* türleri tarafından nakledilmektedir (Morisod ve ark 1972, Purnell 1981, Kuttler 1984). Vektör kenenin nimf ve yetişkin döneminden çok, larva döneminde *B. bovis* nakledilmektedir. İnkubasyon periyodu 6-12 gündür ve *B. bigemina*'ya nazaran daha uzun sürmektedir (Callow ve Hoyte 1961, Callow 1979, Callow 1984). *B. bovis* sığır, su buffaloları ve vahşi ruminantlarda hastalığa yol açmaktadır (Purnell 1981). Aynı zamanda *B. bovis*'den kaynaklanan insan vakaları da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Brockleby 1979). *B. bovis* hayvanlarda hemoglobinemi, hemoglobinüri ve anemi ile seyretmektedir. Sığırlarda aneminin seviyesi genellikle daha az şiddetli görülmekle birlikte, merkezi sinir sistemi ile ilgili semptomlar *B. bovis*'de daha yaygın olarak gözlenmektedir. Bu semptomlar *B. bovis* ile enfekte eritrositlerin beyin kapıllarlarında birikmesi ve kapıllar damarları tıkanması sonucu oluşmaktadır (Mahoney

1977) (Şekil 2.1.). *B. bovis* morfolojik olarak eritrosit içerisinde 1 µm X 2,5 µm boyutlarında, genellikle ortasında büyük bir vakuol ve kenarında çekirdek içeren yuvarlak formlar şeklinde gözlenmektedir (Şekil 2.2.) (Riek 1968, Mahoney 1977).

2.3.2. Babesia bigemina

Büyük *Babesia* türüdür. Eritrosit içerisinde 4-5 µm X 2 µm boyutunda, plemorfik (oval, yuvarlak, ameboid) şekillerde görülür. Ancak sıklıkla rastlanan karakteristik formu çift armut formudur ve aralarındaki açığı dardır (Gonzales ve ark 1971) (Şekil 2.3). *B. bigemina* sığırlarda Teksas sığır humması, kızılısu humması veya kene humması olarak bilinen hastalığa neden olur. Başlıca vektörü olan *R. microplus*'un coğrafik dağılımı ile paralel olarak Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa, Afrika, Asya ve Avustralya'da yayılım gösterir (McCosker 1981). Diğer vektörleri *R. annulatus*, *R. bursa*, *R. evertsi* ve *Haemaphysalis punctata*'dır. *B. bigemina* eritrositlerde şiddetli sürekli ilerleyen bir yıkıma yol açar. Bu nedenle sığırlarda şiddetli anemi ve hemoglobüri görülür ve mortalite oranı yüksektir (Mimioğlu ve ark 1973, Mahoney 1977).

2.3.3. Babesia divergens

Babesia divergens Kuzey Avrupa, Avusturya, Belçika, Britanya, Fransa, Almanya, İrlanda, Kuzey İrlanda, Hollanda, İskandinavya, İsviçre, Tunus ve Kuzey Afrika gibi oldukça geniş bir alanda yayılım göstermektedir. Vektörü *I. ricinus*'dur (Zintl ve ark 2003, Bock ve ark 2004). *B. divergens* farklı konak eritrositlerinde farklı morfolojik parametreler göstermektedir. Sığırlarda *B. divergens* eritrositin periferinde piriform ya da yüzük formunda yerleşim gösterir. Piriform şekli ortalama 1.5-1.91 µm uzunluğunda, ortalama 0.4-1.07 µm genişliğindedir. Yüzük formunun ortalama çapı ise 1.48-1.8 µm'dir. İnsanlarda ise *B. divergens* eritrositin merkezinde ya da merkezin hemen altında piriform şekilde görülür. Ortalama uzunluğu 1.9 µm, genişliği ise 0.8 µm'dir. Gerbil, rat, hamster ve şempanzede eritrosit içerisinde merkezi ya da merkezin hemen altında yerleşim gösterir.

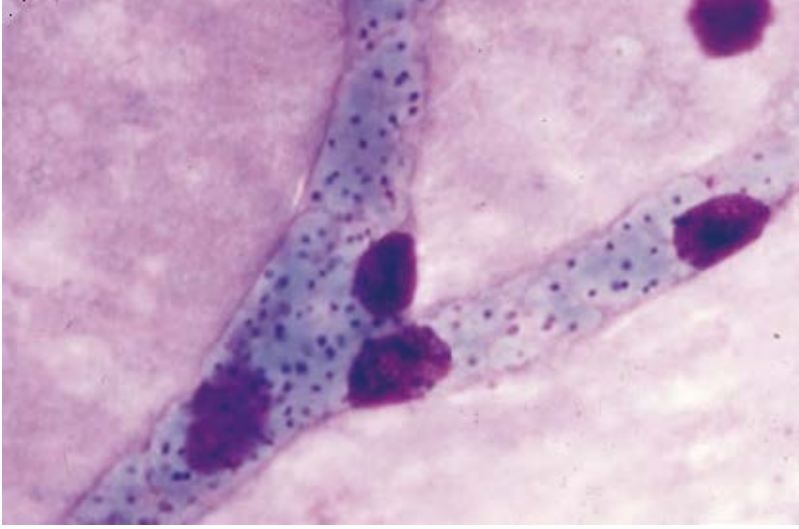
Gerbil ve ratta eritrositlerde piriform formu görülürken, şempanzede yüzük formu görülmektedir (Zintl ve ark 2003). Sığırlarda *B. divergens* enfeksiyonları konağın immunité durumuna ve enfekte suşun virulensine bağılı olarak ılımlı, şiddetli ya da ölümcül bir seyir gösterebilir. Ancak hayvanlarda ateş, anemi ve hemoglobinüri gibi ciddi hastalık semptomları nadiren görülmektedir. Sıklıkla semptom göstermeyen, subklinik seyirle birlikte hayvanlar, uzun süre taşıyıcılık görevi yapmaktadır (Malandrin ve ark 2009). *B. divergens*, Avrupa'da yapılan çalışmalarla doğrulanmış zoonoz *Babesia* türüdür ve insanlarda medikal önemi bulunmaktadır. İnsanlarda görülen enfeksiyonları sıklıkla görülmemekle birlikte, hemen tedaviye geçilmedikçe çok çeşitli fatal sonuçlara yol açmaktadır. Son yıllarda sığır babesiosisinin endemik olarak görüldüğü bölgelerde insan babesiosis vakalarında da artış olmaktadır.

2.3.4. *Babesia major*

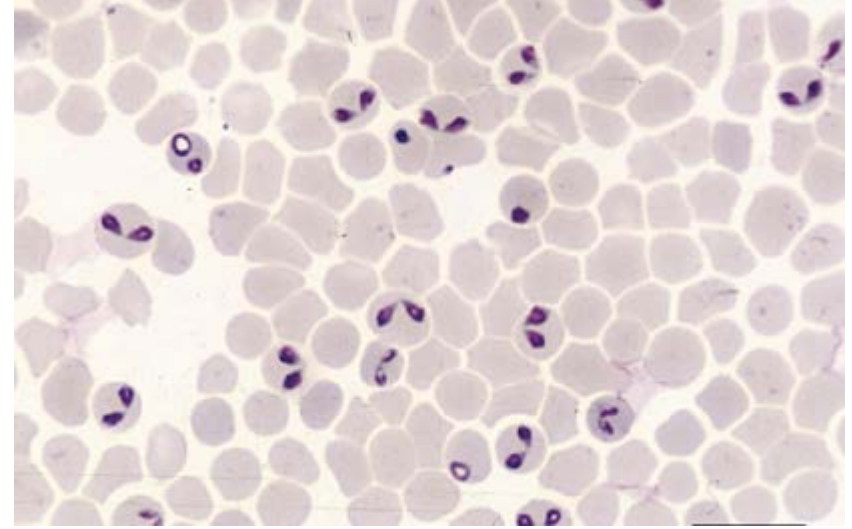
Eritrositlerin merkezinde yerleşim gösteren *B. major*, morfolojik olarak *B. bovis*'e benzemektedir. Halka formları 1.8 µm, uzunlamasına armut formları ise 2.6-3.7 µm boyutundadır. *B. major*, *Haemaphysalis punctata* türleri tarafından nakledilmektedir. Kuzey Avrupa'da sığırlarda hastalığa sebep olmaktadır. *B. divergens*'e oranla biraz daha az patojeniteye sahiptir (Zintl ve ark 2003, Cassini ve ark 2011). Türkiye'de ise *B. major* ilk defa Altay ve ark tarafından Karadeniz Bölgesi'nde bildirilmiştir (Altay ve ark 2008).

2.3.5. *Babesia jakimovi*

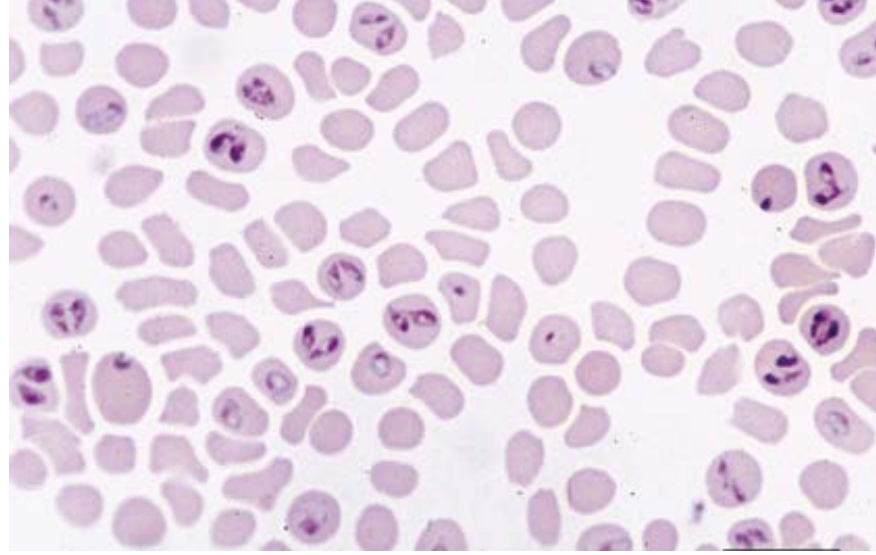
Babesia jakimovi büyük *Babesia* türüdür. Morfolojik olarak halka, armut formları *B. major*'a benzemektedir. *I. ricinus* tarafından nakledilen *B. jakimovi*, Sibirya ve Rusya'da sığırlarda hastalığa neden olmaktadır. Klinik bulguları ve tedavisi *B. bigemina*'ya benzemektedir (Purnell 1981).



Şekil 2.1. *B. bovis*'in beyin kapillar damarlarında yerleşimi (Shkap ve ark 2007)



Şekil 2.2. *B. bovis* piroplasm safhası (Shkap ve ark 2007)



Şekil 2.3. *B. bigemina* piroplasm safhası (Shkap ve ark 2007)

2.4. Türkiye’de Sığırlarda Babesiosis

Halk arasında sarılık, ağrıma, ağrık, kan işeme olarak bilinen babesiosis, Türkiye’de sığırlarda yaygın olarak görülmektedir. Hastalıkla birlikte hayvanlarda verim düşüklükleri ve mortalite görülmesi sebebi ile çiftliklerde büyük ekonomik kayıplar gözlenmektedir. Ayrıca bazı *Babesia* türlerinin zoonoz karakterli olması insan sağlığı açısından da önemini artırmaktadır (Colwell 2011). Türkiye’de sığırlarda dört *Babesia* türü; *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* ve *B. major* görülmektedir. Ancak *B. bigemina* ve *B. bovis* türlerinin neden olduğu ekonomik kayıplar daha fazladır. Bunun sebebi bu iki türün ülkemizin hemen hemen her bölgesinde yaygın olarak görülmesidir. *Babesia* türlerinin naklinde rol oynayan keneler, Türkiye’nin bütün coğrafik bölgelerinde bulunmaktadır (Karaer ve ark 1997, Aydın ve Bakırcı 2007). Bu nedenle kenelerin aktif oldukları mevsimlerde genellikle her yıl bu hastalıkla karşılaşılmaktadır (Düzgün ve ark 1992, Altay ve ark 2008).

Şimdiye kadar Türkiye’de babesiosis üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. İlk olarak *B. bigemina* 1890 yılında Adil Bey ve Nicolle tarafından İstanbul’da mikroskop altında morfolojik olarak tespit edilmiştir (Mimioğlu ve ark 1969).

Türkiye’de sığır babesiosisi üzerine yapılan ilk serolojik çalışmada Ankara’nın Beytepe Köyü’nde 185 sığır *B. bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens*’e spesifik antikor varlığı yönünden incelenmiş ve seropozitiflik oranları sırasıyla % 4.7, % 9.7, % 0 olarak tespit edilmiştir (Çakmak 1987). Ankara yöresinde yapılan diğer bir sero-epidemiolojik çalışmada *B. bigemina* % 70.96, *B. bovis* % 32.25 oranında bulunmuştur (Sayın ve ark 1989). Karadeniz Bölgesi’nde 76 sığıra ait serum örnekleri IFA testi ile incelenmiş ve bu serum örneklerinde *B. bigemina* % 61, *B. bovis* % 46 ve *B. divergens* ise % 75 oranında tespit edilmiştir (Dinçer ve ark 1991). Türkiye’nin altı farklı coğrafik bölgesinden, 1986-1989 yılları arasında toplanan 1428 adet sığır serumu ELISA testi ile *B. bovis*’e spesifik antikorlar yönünden incelenmiş ve *B. bovis* prevalansı % 51.2 olarak saptanmıştır (Düzgün ve ark 1992). Ankara’nın Çubuk İlçesi’nde bazı sığır sürülerinde IFAT ile yapılan sero-prevalans çalışması sonucu *B. bigemina* % 100, *B. bovis* % 59 oranında tespit edilmiştir (İnci 1992). Ankara ve yöresinde yapılan çalışmada IFA testi ile *B. bovis* ve *B. bigemina*

sırası ile % 10.4 ve % 49.2 oranında seropozitiflik göstermiştir (Eren 1993). Adana ve yöresinde sığırlarda *Babesia* türlerinden *B. bovis*'e % 43.8 oranında, *B. bigemina*'ya ise % 55 oranında rastlanmıştır (Çakmak ve Öz 1993). Sığırlarda *B. bigemina* ve *B. bovis*'in yaygınlığının araştırıldığı çalışmada Orta Anadolu'da sırası ile % 80, % 41.6, Elazığ'da % 42.9, % 5.6; Adana yöresinde % 50.8, % 31.6; Bursa'da % 48.9, % 41.8; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde % 48.8, % 6.4; Akdeniz Bölgesinde % 51.4, % 68.5 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (Sayın ve ark 1996). Mayıs 1997-Mart 1998 tarihleri arasında Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansını belirlemek amacıyla 741 sığırdan kan örnekleri alınmış. Çalışmada IFAT ile Elazığ'da 285 sığırın 91'inde (% 31.9) *B. bigemina*, 4'ünde (% 1.4) *B. bovis*, 10'unda (% 3.5) *B. divergens* saptanmıştır. Malatya'da 292 sığırın 21'inde (% 7.1) *B. bigemina*, 2'ünde (% 0.6) *B. divergens* saptanmış; fakat *B. bovis* görülmemiştir. Tunceli'de incelenen 164 sığırın 12'sinde (% 7.3) *B. bigemina*, 1'inde (% 0.6) *B. bovis* ve 2'sinde (% 1.2) *B. divergens*'e karşı antikor saptanmıştır (Aktaş ve ark 2001). 1999 yılı Nisan-Ekim ayları arasında, Konya'nın merkez köylerinde serolojik ve mikroskopik yöntemler kullanılarak sığırlarda *B. bigemina*'nın yaygınlığı incelenmiştir. Çalışmada 157 sığırın ince yayma kan frotsininin 18'inde (% 11.46) *Babesia* sp. tespit edilmiştir. IFA testi ile yapılan serolojik incelemede ise 277 sığır serumundan 147'sinde *B. bigemina*'ya karşı antikor geliştiği saptanmıştır (Sevinç ve ark 2001). Kayseri yöresinde IFAT ile sığırların % 23.03'ünde *B. bigemina*'ya karşı, % 1.04'ünde *B. bovis*'e karşı antikor bulunmuştur (İnci ve ark 2002). Niğde ve yöresinde sığırlarda babesiosisin prevalansı incelenmiş ve *B. bigemina* % 30 oranında tespit edilirken, *B. bovis*'e rastlanmamıştır (Karatepe ve ark 2003). Ankara iline bağlı köylerde meraya çıkarılan bir yaşın üzerinde rastgele seçilen 300 sığırdan kan örneği alınmıştır. Kan örneklerinin IFA testi ile incelenmesi sonucu 22'sinde *B. bigemina*'ya, 4'ünde *B. bovis*'e, 1'inde *B. bigemina*-*B. bovis* miks enfeksiyona rastlanmıştır (İça 2004). Antakya yöresinde rastgele seçilen 214 sığırdan elde edilen serumlarda *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* IFA testi ile incelenmiş ve sadece 2 serumda *B. bigemina*'ya karşı antikor tespit edilmiştir. Ancak *B. bovis* ve *B. divergens* tespit edilememiştir (Kaya ve ark 2006). Konya'da *B. bigemina*'nın seroepidemiolojisini belirlemek amacıyla Nisan 2006-Mart 2007 tarihleri arasında Kadınhanı, Çumra, Beyşehir ilçeleri ve merkezden, farklı yaş gruplarına ait 770 sığırdan örnek toplanmış. Örneklerin % 42.9'unda *B. bigemina* seropozitif bulunmuştur (Ekici ve Sevinç 2009). Mart-Haziran 2008 tarihleri arasında Sivas'ta 25 farklı köyde yetiştirilen sığırlarda babesiosis seroprevalansı incelenmiş. İncelenen 240 sığır serumunun 32'sinde (% 13.3) *B. bovis*, 120 serumun 45'inde

B. bigemina'ya karşı antikor pozitifliği saptanmıştır (Kalkan ve ark 2010). Şanlıurfa ve çevresinde *B. bigemina* ve *T. annulata*'nın sığırlardaki taşıyıcılığı araştırılmış ve IFA testi sonuçlarına göre *B. bigemina* % 43.97 oranında tespit edilmiştir (Sevgili ve ark 2010). Türkiye'de sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın seroprevalansını tespit etmek amacıyla 2007-2008 yılları arasında 81 ilde geniş kapsamlı bir çalışma yürütülmüştür. Türkiye genelinde toplam sekiz enstitüye bağlı 81 ilden 3773 adet sığırdan kan serumu toplanmıştır. Her bir il ve bağlı olduğu Tarım Bakanlığı Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde IFA testi kullanılarak muayene edilen sığır serumlarında % 24.5 *B. bovis*, % 16.9 *B. bigemina*, % 9.46 hem *B. bovis* hem *B. bigemina* antikorları açısından pozitif bulunmuştur (Öncel ve ark 2010).

Eylül 1998 - Mart 2000 tarihleri arasında, Türkiye'nin farklı bölgelerinden farklı zamanlarda 464 adet sığırdan alınan kan örneğinin moleküler olarak incelendiği çalışmada sığır babesiosisinin epidemiyolojisi araştırılmıştır. Aynı zamanda kene ısırığı hikayesi olan ve sığırlarla yakın teması olan 28 insandan kan örnekleri alınarak babesiosisin zoonotik önemi araştırılmıştır. Türkiye'de sığır ve insan babesiosisinin epidemiyolojisinde ilk kez spesifik tanı testi PCR'in kullanıldığı çalışma sonucunda sığırlarda *Babesia sp.* Ankara'da % 21.12, Burdur'da % 8, Kayseri'de % 23.80 ve Samsun'da % 7.21 olarak saptanmıştır. İnsanlarda ise *Babesia spp* tespit edilememiştir (Tanyüksel ve ark 2002). Ankara bölgesinde RLB tekniği ile sığırlarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin eş zamanlı tanısı ve epidemiyolojilerinin ortaya konduğu çalışma yapılmıştır. Türkiye'de ilk defa RLB tekniğinin kullanıldığı çalışmada *B. bovis* % 2.8, *B. bigemina* % 3.6, *B. divergens* % 1.1, *B. major* % 0.2 oranında tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışma ile daha önce sadece mikroskopik olarak bildirilmiş olan *B. major*, moleküler olarak Türkiye'de ilk defa bildirilmiştir (Vatansever ve ark 2002). Ankara iline bağlı köylerde meraya çıkarılan bir yaştın üzerindeki sığırlarda *B. bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens* türleri RLB tekniği ile araştırılmıştır. Çalışmada alınan 300 adet sığır kan örneğinin 12'sinde *B. bigemina*, 7'sinde *B. bovis*, 5'inde *B. divergens*, 3'ünde *B. bigemina*-*B. divergens* miks, 3'ünde *B. bigemina*-*B. bovis* miks enfeksiyon tespit edilmiştir (İça 2004). Kayseri ve yöresinde *Babesia* ve *Theileria* türlerinin kenelerdeki varlığı araştırılmıştır. Kene enfestasyonu yönünden incelenen 300 sığırın 117'si (% 39) enfekte bulunmuş ve bu hayvanlardan *Ixodidae* ailesine ait 1160 adet kene toplanmıştır. Toplanan keneler içerisinde en sık görülen *R. annulatus*, *H. marginatum*, *R. turanicus* türleridir. *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünden

incelenen kenelerde RLB yöntemi ile *B. bigemina* % 14, *Babesia* sp. % 2.3, *B. bigemina-T. annulata* miks enfeksiyon % 2.3 olarak tespit edilmiştir (İça ve ark 2007). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde klinik olarak sağlıklı görünen sığırlarda kenelerle nakledilen kan protozoonlarının yayılımı ve varlığının tespit edilmesi amacı ile bölgedeki altı farklı odakta bulunan çeşitli yaşlarda sığırdan 389 adet kan örneği alınmıştır. RLB testi ile yapılan çalışmanın sonucunda *B. bigemina* % 0.77, *B. major* % 0.51, *Babesia* sp. % 1.28 oranında oldukça düşük rakamlarla tespit edilmiştir (Altay ve ark 2008). Doğu Karadeniz bölgesinin Tokat, Amasya, Gümüşhane, Giresun, Rize ve Trabzon illerinde sığırlarda ve sığırlardan toplanan kenelerde babesiosis, theileriosis ve anaplasmosisin varlığı ve yaygınlığı araştırılmıştır. Araştırma sonucu *Babesia* enfeksiyonlarının oranı, RLB tekniği ile % 0.77 (3/389)'si *B. bigemina*, % 0.51 (2/389)'i *B. major*, % 1.28 (5/389)'si *Babesia* sp. olarak tespit edilmiştir. Bölgedeki sığırlardan toplanan keneler içerisinde en yaygın tespit edilen tür *H. marginatum* % 50.65 oranında; takip eden türler % 17.81 *R. bursa*, % 13.44 *I. ricinus*, % 8.04 *R. annulatus* olduğu görülmüştür. Daha sonra toplanan 1062 keneden 224 adet kene havuzu oluşturularak RLB tekniği ile incelenmiştir. % 4.46 oranında kenelerde *Babesia spp.* tespit edilmiştir (Aktaş ve ark 2012).

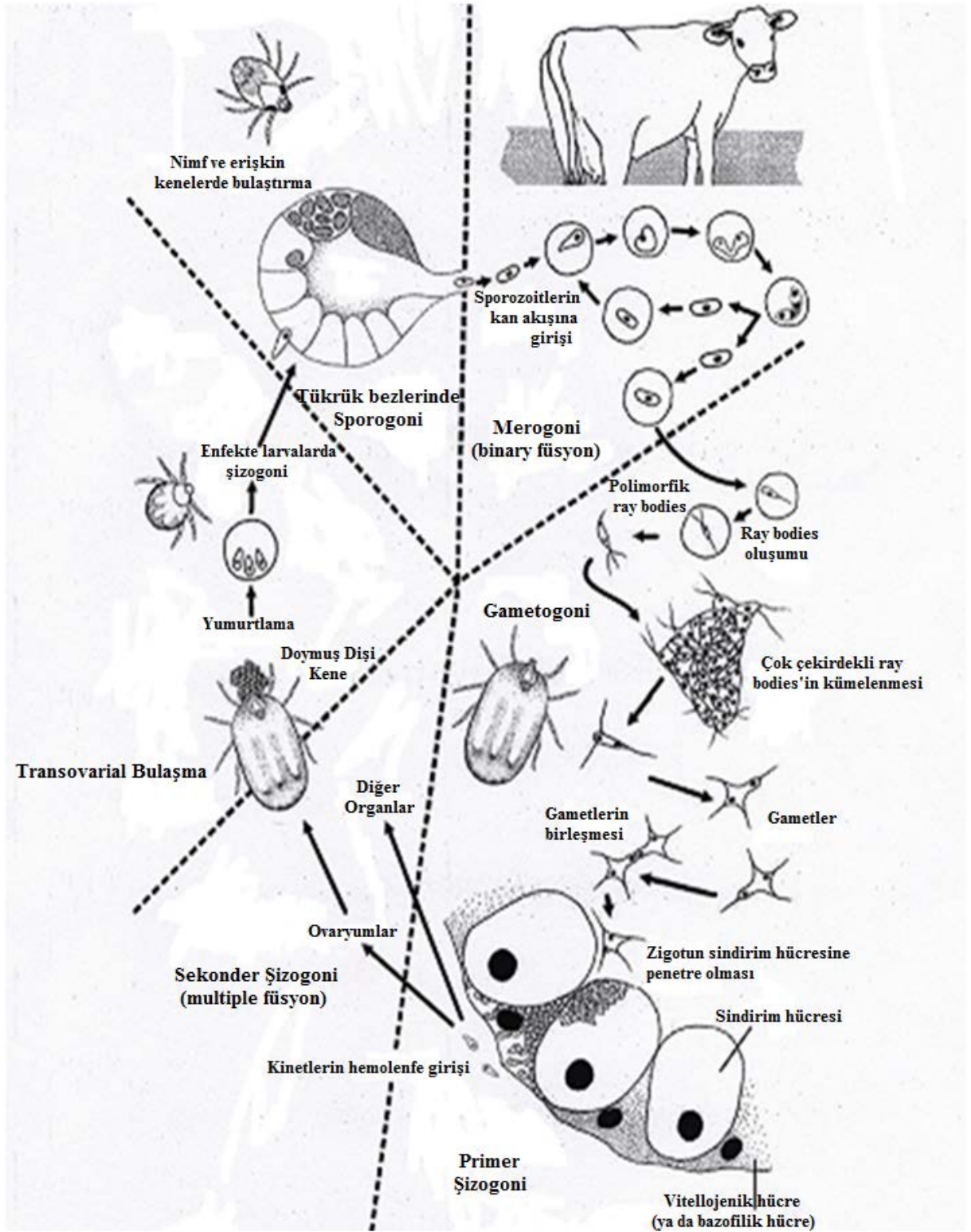
2.5. Türkiye'de İnsanlarda Babesiosis

Son 30 yıldır *Babesia* türlerinin insanlar için de önemli bir patojen olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Dünya'da şimdiye kadar insan babesiosisine neden olan yedi farklı *Babesia* türü tespit edilmiştir. *B. microti* (WA-1, MO-1 suşları), *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. duncani*, *B. venatorum* (EU-1) ve KO-1 olarak adlandırılan koyun *Babesia* türlerine benzer yeni bir tür insan vakalarında bildirilmiştir (Hildebrandt ve ark 2007, Hunfeld ve ark 2008, Gray ve Weiss, 2008, Vannier ve Krause 2009, Colwell ve ark 2011). Önceki çalışmalarda sığırlarda babesiosisine neden olan *B. bovis* ve *B. divergens*'in insanlarda da enfeksiyon oluşturduğu; *B. microti*'nin de özellikle kemiriciler başta olmak üzere insan dahil, irili ufaklı birçok hayvanı konak olarak kullandığı bilinmektedir. Son yıllarda ise Amerika'da yeni tanımlanan *B. duncani* türü insanlarda medikal önemi olan patojenlere dahil edilmiştir (Herwaldt ve ark 1996, Conrad ve ark 2006). Yeni Avrupa *B. divergens* benzeri organizma (EU-1) olarak keşfedilen, *B. venatorum* türü de İtalya,

Avusturya ve Almanya’da insan babesiosis vakalarında bildirilmiştir (Herwaldt ve ark 2003, Telford ve Goethert 2004, Bonnet ve ark 2007). İnsan babesiosis vakalarında, *B. divergens*’in en sık Avrupa’da, *B. microti*’nin ise Amerika’da daha yaygın olduğu bildirilmektedir (Ruebush ve ark 1977, Gorenflot ve ark 1998, Gelfand ve Callahan 1998). Amerika kıtasında sık görülen *Ixodes scapularis* türü keneler *B. microti*’nin temel vektörü olmakla birlikte, birçok Avrupa ve Asya ülkesinde *I. ricinus* ve *I. persulcatus* türü kenelerden *B. microti* izole edilmiştir (Foppa ve ark 2002, Rudolf ve ark 2005). Yapılan deneysel inokulasyon çalışmalarında da *I. ricinus*’un *B. microti* için önemli bir vektör olabileceği ortaya konmuştur (Gray ve ark 2002). Türkiye’de 1996 yılında Ankara’nın Kızılcahamam bölgesinde kene ısırma öyküsü olan 50 kişinin serumunda IFA testi ile *B. divergens* ve *B. bovis* antikorları araştırılmıştır. 4 kişide (% 8) *B. divergens*’e karşı, 1 kişide (% 2) *B. bovis*’e karşı seropozitiflik saptanmıştır. Bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez insanlarda *B. divergens* ve *B. bovis*’e karşı antikor pozitif bulunmuştur (Gün ve ark 1996). Sivas yöresindeki insanlarda babesiosisin yaygınlığının tespit edilmesi amacıyla hayvancılıkla ilgisi olan ve kene tutma hikayesi bulunan 150 kişiden elde edilen serumlar IFAT yöntemi ile bakılmıştır. Anti-*B. bovis* IgG antikorları yönünden incelenen test sonucunda 8 kişide (% 5.33) seropozitiflik saptanmıştır. Erkeklerde yalnızca 1 kişide (% 1.9) pozitiflik saptanırken, kadınlarda 7 kişide (% 7.4) pozitiflik saptanmıştır. Yaşlara göre *B. bovis* pozitiflik oranı 20-40 yaş arası % 7.5, 40-60 yaş arası % 3.4, 60 yaş üzeri % 13.0 olarak tespit edilmiştir (Kalkan 2008). 2006-2007 yıllarının Mayıs ve Haziran aylarında, *I. ricinus*’un yaygın olarak görüldüğü Sinop’ta insanların *B. microti* ile karşılaşp karşılaşmadığının serolojik olarak belirlenmesi amacı ile bir çalışma yapılmıştır (Poyraz ve Güneş 2010). Sinop’un merkez ilçesine bağlı köylerinde yaşayan 273 kişiden kan örnekleri alınarak serum örnekleri çıkarılmış. IFA testi ile serum örneklerinde *B. microti* IgG antikorları araştırılmıştır. Türkiye’de insanlarda *B. microti*’nin antikor pozitifliğini ortaya koyan ilk araştırma olan bu çalışmada, serum örneklerinin % 6.23’ünde *B. microti* seropozitifliği saptanmıştır (Poyraz ve Güneş 2010). Türkiye’nin özellikle sahil kesimleri başta olmak üzere birçok bölgesinde *I. ricinus*’un varlığının tespit edilmesi (Karaer ve ark 1997, Güneş ve ark 2007, Aktaş ve ark 2010, Bakırcı 2012) ülkemizde de insanlarda *B. microti* varlığını araştırarak epidemiyolojik çalışmaların gerekliliğini göstermektedir. Aynı zamanda pek çok çalışmada bildirildiği gibi *B. bovis* ve *B. divergens* türlerinin Türkiye’de sığırlarda yaygın olması nedeniyle insanlarda da bu türlerin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca yeni zoonoz *Babesia* türlerinin keşfedilmesi ile birlikte insan babesiosisi üzerine daha geniş çalışmalara ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

2.6. *Babesia* Yaşam Döngüsü

Apikompleksan parazitler içerisinde yer alan *Babesia* soyundaki parazitler üç üreme safhası geçirmektedir. Bu safhalar gametogoni (kene bağırsağı içerisinde gametlerin kaynaşması), sporogoni (kene tükürük bezlerinde aseksüel üreme) ve merogoni (omurgalı konakta aseksüel üreme)'dir (Şekil 2.4.) (Homer ve ark 2000).



Şekil 2.4. *Babesia bigemina* yaşam döngüsü (Bock ve ark 2004)

2.6.1. Omurgasız Arakonaktaki Dönem

Babesia türlerinin kenede geçen yaşam döngüsü hakkında bilgiler genellikle *B. microti* üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Telford ve ark 1993). Kene kan emerken sporozoit (merozoit) içeren eritrositleri alarak enfekte olur. Kene bağırsağında sporozoitlerin ilk tespiti kenenin enfekte omurgalıdan kan emmeye başlamasından yaklaşık 10 saat sonra gerçekleşir. *B. bigemina*'da diploid DNA'ya sahip diğer piroplazmlara benzemeyen gamont prekürsörü olarak isimlendirilen ovoid tip merozoit tanımlanmıştır. Bu gamont prekürsörleri kene tarafından alınıncaya kadar gelişmez. Kenede bu gamont prekürsörlerinden gametositler gelişecek şekilde yeni organeller oluşmaya başlar. Gametositlerin ön kısmının sonunda ok ucuna benzer 'ray bodies' (ok ucu şeklinde) olarak isimlendirilen bir organel gelişmiştir. Gametler olduğu düşünülen 'ray bodies'ler eritrositler içinde çoğalarak, çok çekirdekli büyük kümeler oluşturmaktadır (Gough ve ark 1998). Her bir 'ray bodies' tek çekirdekli, haploiddir; büyüklük ve şekil olarak birbirlerine benzemektedir. Fakat bir kısmı diğerlerine göre daha yoğun olması sebebi ile dişi gamet ve erkek gamet olarak ayrılmaktadırlar. Dişi gamet ve erkek gamet birleşerek zigotu oluşturmaktadır. Zigot seçici olarak kenenin bağırsağındaki sindirim hücrelerini ve bazofilik hücreleri enfekte etmektedir (Agbede ve ark 1986). Kene kan emmeye başladıktan sonra oluşan zigot, ok ucuna benzer yapıyı kullanarak, kenenin bağırsak epitelyal hücrelerine girmektedir. Bu hücrelerde çoğalmaya devam eden zigot hacim olarak da büyür ve çekirdek materyali sitoplazma boyunca küçük noktacıklar şeklinde dağılır. Daha sonra her çekirdek parçasının etrafı zarla çevrilir ve kendiliğinden hareket edebilen çubuk şeklinde sporokinetler (vermikül, kinet) oluşur. Sporokinetler 11-15 µm uzunluğundadır. Geniş ve küt ucunda bir kep bulunmaktadır. Kenenin tüm vücuduna yayılan kinetler şizogoni yolu ile çoğalmaya devam eder. Bir süre sonra mekik şeklini alan kinetler hemolenf aracılığı ile epitelyal hücrelerden kenenin tükrük bezi asini hücrelerine ve ovaryumlar dahil kenenin birçok organlarına geçer (Yerleştikleri organlarda tekrar şizogoni yolu ile çoğalan kinetler ikincil kinetleri oluşturur). Bu şekilde enfeksiyon 'transovarial nakil' adı verilen nakil şekli ile ovaryumlardan yumurtalara ve gelecek yeni nesil kene jenerasyonlarına taşınır. Genellikle dişi kene enfekte olur ve gelecek jenerasyonun larva, nimf ve/veya yetişkin kenelerin tükrük bezinde sporogoni safhası gelişmektedir. Kene yeni bir konağa tutunduğu zaman ise sporozoitler olgunlaşır ve konak, kenenin tükrüğü aracılığı ile enfekte olur. *Babesia* türlerinde yeni bir enfeksiyon olmasa

bile birkaç yeni nesil kene jenerasyonuna kadar enfeksiyon aktarılabilir (Kakoma ve Mehlhorn 1993, Homer ve ark 2000, Bock ve ark 2004, Uilenberg 2006).

Babesia'nın kinetleri (vermikülleri) *Theileria*'nın zigotlarına göre çok sayıda fakat yapı olarak küçüktür. Vektör kenenin bir sonraki safhasında yeni bir konağa tutunduğu zaman sporogoni aşaması ve sporozoitlerin olgunlaşması gerçekleşir. Enfekte tükürük salgısının enjeksiyonu ile birlikte bulaştırma meydana gelir. Bu şekilde oluşan enfeksiyonun taşınması 'transstadial nakil' olarak bilinmektedir. Larva döneminde enfeksiyonu alan kene nimf aşamasında enfektiftir. Nimf aşamasında enfeksiyonu alan kene ise yetişkin döneminde enfektiftir. Yeni yumurtadan çıkan larva ise asla enfekte değildir ve enfeksiyonu nakledemez. Hem *Babesia* türlerinde hem de *Theileria* türlerinde önemli olan bir husus ise hastalığı nakleden kene tutunmadan hemen sonra enfektif değildir. Sporozoitler enfektif olmadan önce olgunlaşmak zorundadır ve gerçek nakil kene tutunduktan birkaç gün içinde meydana gelmektedir (Uilenberg 2006).

Tükürük bezi içerisinde sporozoit gelişimi üç safhaya ayrılabilir. İlk olarak parazit büyür, genişler ve hipertrofik konak hücrelerini doldurur. Daha sonra sporozoit tomurcukları oluşturacak, nispeten farklılaşmamış, üç boyutlu, dallanmış ağ örgüsü içinde çok çekirdekli sporoblastları oluşturur. İkinci safha ise kene tekrar kan emmeye başladığında gelişir. Ağ örgüsü içerisinde oluşacak sporozoitlere ait özel organeller (mikronemler, rhoptriler ve plazma membranı altında çift membran segmentleri) gelişir. Üçüncü ve son safhada ise tomurcuklanma süreci ile birlikte olgun sporozoitler oluşur. Olgun sporozoitler yaklaşık 2.2 x 0.8 µm boyutlarında, piriform şeklindedir. Serbest ribozomlar, düzgün bir endoplazmik retikulum, mitokondrion benzeri organeller, tek bir anterior rhoptri ve birkaç mikronem içerir. Yaklaşık 5000 ile 10000 sporozoit tek bir sporoblast içerisinde üretilebilir (Kakoma ve Mehlhorn 1993, Homer ve ark 2000).

Kenenin tutunması ve beslenmesi sırasında kene ağız organeli çevresinde dermis tabakasında birkaç bin sporozoitin depolandığı tahmin edilmektedir. Kenenin bulaştırmasındaki etkisinde kenenin tükürüğündeki muhtemelen enfeksiyonu kolaylaştıran anti-inflamatorik ve immunsupresif farmakolojik aktivitenin de desteği olduğu düşünülmektedir (Homer ve ark 2000).

2.6.2. Omurgalı Konaktaki Dönem

Preeritrositik dönem olarak ifade edilen, sporozoitlerin ilk olarak lenfositlere yerleştiği *Theileria*'da görülen prelenfositik dönem *Babesia* türlerinin yaşam siklusunda görülmemektedir (Mehlhorn ve ark 1993).

Kenenin omurgalı konağa tutunduğu zaman geçen süre ne kadar uzun olursa omurgalı konağa aktarılan sporozoit sayısı da o kadar artmaktadır. Hatta enfeksiyon oranı % 100'e yaklaşabilmektedir. Kene omurgalı konaktan kan emerken sporozoitler olgunlaşarak enfektif hale geçer (Mackenstedt ve ark 1995). *Babesia* türlerinde sporozoitin olgunlaşması ve enfektif hale geçmesi arasındaki süreler farklıdır. *B. bovis*'de enfektif sporozoitlerin oluşumu genellikle larval kenenin konağa tutunmasından 2-3 gün içerisinde gerçekleşir (Riek 1966). Fakat *B. bigemina* enfeksiyonunda enfektif sporozoitlerin oluşumu için yaklaşık 9 gün geçmektedir. Bu nedenle enfeksiyon *B. bigemina*'da kenenin yalnızca nimf ve erişkin döneminde nakledilmektedir (Hoyte 1961). Omurgalı konağa verilen her bir sporozoit özelleşmiş apikal kompleks organelinin yardımı ile eritrositin hücre membranına penetre olur. Sporozoit, invaginasyon süreci ile birlikte konak eritrositinde oluşan parazitifer vakuol aracılığı ile hücreye alınır. Vakuol membran kademeli olarak parçalanır. Benzer bir mekanizmaya sahip fakat konak membranına ek olarak kendi membranını kaybetmeyen *Plasmodium* türlerinin aksine, parazit tek membran ile merozoit olarak ayrılır. Konak eritrositleri içerisinde çoğu sporozoit trofozoite dönüşür ve ikiye bölünme (binary füzyon) ile çoğalmaya başlar. Eritrositleri patlatan sporozoitler daha sonra diğer konak eritrositlerini enfekte eder. Bu çoğalma konak hücreleri ölene kadar ya da daha çok konak immun sisteminin sporozoitlerin çoğalmasını durdurana kadar devam eder. Eritrosit içerisinde bazen aynı anda dört sporozoit birden oluşabilir. Bu şekilde görülen parazit formuna 'Maltese cross' formu adı verilir. Eritrosit içerisinde gelişen hızlı üreme konak hücrelerine zarar vererek, konakta hemoglobiniye yol açar. Bazı trofozoitler potansiyel gametositlerdir. Bu trofozoitler bu noktada üremez; fakat üreme yerine şekli büyür. Daha sonra kene bağırsağına gelen gametositler eritrositleri terk etmeden önce gametlere gelişir (Homer ve ark 2000).

Babesia türleri, *Plasmodium* ve *Haemoproteus* türlerinden farklı olarak sporozoit içeren eritrositlerde pigment oluşturmamaktadır. *Babesia* parazitleri hücrede kalıntı

bırakmayacak şekilde hemoglobini sindirmektedir. *Theileria* türlerinin ise pigment oluşturduğu kesin olarak açık değildir. *Theileria* türleri hemoglobini tamamen sindirir; fakat *T. velifera*, *T. seperata* ve *T. buffeli*'de olduğu gibi konak hemoglobini kısmen sindirerek eritrositlerin stoplazmasında hemoglobin benzeri yapıların kristalleşmesi ile pigment oluşturduğu arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir (Uilenberg 2006).

2.7. Bağışıklık

Babesia enfeksiyonlarında sığırlarda gelişen immun cevap, hem sıvısal hem de hücrel faktörlerin rol oynadığı doğal ve kazanılmış immun mekanizmaları içermektedir (Homer ve ark 2000, Bock ve ark 2004).

2.7.1. Doğuştan Gelen Bağışıklık Mekanizması

Doğuştan gelen bağışıklık mekanizması non-spesifiktir ve konak hücrelerinin (mononükleer fagosit sistem ve polimorf nükleer lökositler) cevabı, konağın yaşı, genetik faktörler, konak-parazit arasındaki özgüllük gibi faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (Bock ve ark 2004).

Çoğu *Babesia* türleri yüksek konak spesifitesi göstermekte; fakat splenektomi sonucu doğal konağı dışında bir konakta da görülebilmektedir. Uzun süreli *Babesia* enfeksiyonlarında sığırlarda eğer splenektomi de yapılmışsa enfeksiyon sürekli nüks edebilmektedir (Mahoney 1972, Callow 1977). Splenektomi yapılan duyarlı sığırlarda gelişen primer *Babesia* enfeksiyonlarında oldukça yüksek parazitemi gelişebilir. Bu gözlemler *Babesia* türlerine karşı oluşan immun cevapta dalağın önemli rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca farklı sığır ırklarının *B. bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarına karşı farklı duyarlılıklarının olduğu bilinmektedir. *Bos indicus* türü sığırlar *B. bigemina* enfeksiyonlarına karşı *Bos taurus* sığırlarına göre daha fazla direnç göstermektedir. Primer *B. bovis* enfeksiyonlarında *Bos taurus* sığır türlerine nazaran *Bos indicus* sığır türleri daha

ılımlı klinik semptomlar göstermektedir (Parker ve ark 1985, Bock ve ark 1997, Bock ve ark 1999).

Sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina* ile primer enfeksiyonlarda yaşa bağlı bağışıklık sözkonusudur. Genç buzağular yetişkin sığırlara göre daha güçlü doğal bağışıklık sergilemektedir. Başlangıçta bu doğal bağışıklığın kolostrumdaki koruyucu antikörlerin buzağıya pasif transferinden kaynaklandığı düşünülmekteydi. Ancak bağışık olmayan anneden doğan buzağular da *B. bovis* ve *B. bigemina*'ya karşı direnç göstermektedir. Genç buzağuların *B. bovis* ile enfeksiyonu sonucu gelişen doğal immun cevapda interleukin (IL)-12, interferon (IFN)- γ ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) varlığında mRNA sentezi erken dönemde uyarılmaktadır. Aksine yetişkin sığırlarda IL-12, IFN- γ ve mRNA enfeksiyon sonrası geç uyarılmakta ve iNOS uyarımı gerçekleşmemektedir (Goff ve ark 2001).

Aktive olan monositler, makrofajlar ve nötrofiller *Babesia* türleri enfeksiyon sırasında ilk savunma hattını oluştururlar. Bu savunma hattında anti-mikrobiyal ajanlar, reaktif nitrojen aracıları (RNI), reaktif oksijen aracıları (ROI) ve fagositosis kullanılır. Ayrıca bu hücreler yangısal cevabı düzenleyen sitokinleri sekrete eder. *B. bovis* tarafından uyarılan makrofajlar IL-1 β , IL-12, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve nitrik oksit (NO) üretir (Shoda ve ark. 2000). Makrofajların artan fagositik aktiviteleri sığırlarda *B. bovis*'in eliminasyonu için bir mekanizma olarak öne sürülmüştür. Opsoninler gibi spesifik antikörler da bu mekanizmada önemli rol oynamaktadır. Sığırlarda *B. bovis*'in primer enfeksiyonu boyunca, periferik kandaki monositlerin fagositik yeteneği baskılanmış görünür ve nötrofillerin paraziteminin pik yaptığı noktada fagositik yeteneğinin arttığı görülür (Mahoney 1972, Jacobson ve ark 1993, Court ve ark 2001).

Nitrik oksit, akut enfeksiyon boyunca makrofajlar, monositler, nötrofiller ve endotelial hücrelerde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından üretilen reaktif nitrojen aracıları (RNI)'dir. *In vitro* deneylerde NO'in *B. bovis*'in yaşayabilirliğini azalttığını ve *B. bovis* merozoitlerinin IFN- γ ve TNF- α varlığında monosit/makrofajlar tarafından NO üretimini uyardığı ileri sürülmektedir (Goff ve ark 2002). *In vivo* deneylerin dolaylı olarak gösterdiği gibi *B. bovis*'in neden olduğu patolojide NO'in önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Amino guanidin ve iNOS inhibitörünün, *B. bovis*

enfeksiyonu sırasında sığırdan anemi ve ateş belirtilerinde iyileşmeye, parazitemide de azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Gale ve ark 1998).

Fagositoz, fagosit hücre içerisinde ROI (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri) salınımı ve oksidatif yanma ile yakından ilişkilidir. Oksidatif yanma reaksiyonu fagosit hücre yüzeyinde reseptörlerin (örneğin IgG için Fc reseptörlerinin) çapraz bağlanmaları aracılığı ile stimüle edilebilir. Oksidatif yanma ile birlikte hem ekstrasellüler ortamda hem de fagosom içerisinde ROI salınır. *In vitro* deneyler ROI (süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri dahil; fakat hidrojen peroksit hariç) babesiasidal makrofajları aktive ederek üretimini sağladığını göstermiştir. Primer *B. bovis* enfeksiyonu boyunca oksidatif aktivite devam ederken monositlerde artış gözlenirken, nötrofillerde azalma görülmektedir (Court ve ark 2001).

2.7.2. Kazanılmış Bağışıklık

Sığırların *B. bovis* ile birçok kez enfekte edilerek elde edilen hiperimmün serum ya da sığırın hiperimmün serumundan hazırlanan IgG1 ve IgG2'nin karışımı, enfeksiyona açık duyarlı buzağuları *B. bovis* enfeksiyonuna karşı pasif olarak bağışık kılabilenmektedir (Mahoney ve ark 1979). Bu koruma suşa spesifik gelişen bir bağışıklıktır. Dalağı alınan buzağılara verilen hiperimmün serum ve *B. bovis* ile yapılan enfeksiyon sonucu, hiç enfekte olmamış buzağı gibi iyileşme sağlanabilmiştir. Primer enfeksiyon sonrası toplanan serumla duyarlı, hiç enfekte olmamış buzağılara transfer edilen bağışıklık, hiperimmün serum verilmesi ile oluşan bağışıklıktan daha az etkilidir. Bunun sebebinin serumda mevcut olan antikor izotipi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *B. bovis* enfeksiyonunu takiben direkt olarak parazit antijenleri ve konak antijenlerine karşı koruyucu ve koruyucu olmayan antikorlar üretilir. Antikorlar doğrudan parazitin canlılığı üzerine etki etmektense, artan fagositozis ile birlikte opsoninler olarak hareket etmektedir. Sonrasında gelişen ikincil enfeksiyon boyunca antikorların önemli etkileri olduğu düşünülmektedir. Babesial antijenlerin immün kompleksleri, bovine immünglobülin ve *B. bovis* enfeksiyonunu takip eden C3 formudur (Goodger ve ark 1981). Bu immün komplekslerde büyük (major) immünglobulin IgM'dir; fakat bazen IgG1 ve IgG2 düşük konsantrasyonlarda mevcuttur.

Hem bovine IgG1 hem de IgG2 komplemant fikzasyon yeteneğine sahiptir; bovine IgG2 ise üstün opsonize edilmiş antikor alt sınıfındadır. *B. bovis* enfeksiyonunu takiben IgG2 hariç IgG1 ve IgM komplemant fikzasyon antikorları tespit edilir. Antikor-bağımlı hücre-aracılı sitotoksosite sığırlarda *B. bovis* enfeksiyonunun çözümü ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Goff ve ark 1982, Goff ve ark 1984).

Babesia bovis ve *B. bigemina*'ya karşı sığırlarda gelişen immün cevapda T hücrelerinin belirleyici rolü henüz netlik kazanmamıştır. Bununla birlikte immün sığırdan elde edilen T hücre hattı ve klonları ile yapılan in vitro deneylerde T hücrelerinin rolü ortaya konmuştur. Periferal kandaki mononükleer lökositler ve yardımcı T hücre klonları *B. bovis* antijenlerine karşı gelişen cevapda sayıca çoğalırlar. CD4+ yardımcı T hücre klonları aracılığıyla gelişen sitokin cevapda Th1 ya da Th0 cevabı tespit edilir; fakat Th2 klonları tespit edilememektedir. Rhoptri-associated-protein-1 (RAP-1) ile immunize sığırlardan bol miktarda yardımcı T hücre klonları izole edilmiştir ve in vitro bu klonlar çok sayıda IFN- γ ile Th1 sitokin profili üretmektedir. Bu Th-1 klonları antijen varlığında otolog B hücreleri tarafından IgG2 üretimini teşvik eder. Yardımcı T hücreleri hattından alınan süpernatant, NO üreten makrofajları uyarıcı IFN- γ ve TNF- α içerir (Brown ve ark 1991, Brown ve ark 1993, Rodrigez ve ark 1996).

Babesia bovis ve *B. bigemina*'da kazanılmış bağışıklık sonucu gelişen immün cevapda CD4+ yardımcı T hücrelerinin önemli rolü vardır. Bu yardımcı T hücreleri, fagositik hücreleri aktive eden, B hücreleri tarafından antikor üretimini artıran, oldukça büyük önemi olduğu düşünülen IFN- γ 'yı ve sitokinleri üretir (Brown ve ark 2001).

2.8. Klinik Bulgular ve Patogenez

Babesiosisin klinik bulguları oldukça geniş çeşitlilik göstermektedir. Bunun sebebi *Babesia* soyundaki üyelerinin tek bir patogenez göstermemesi, türler içerisinde bile suş farklılıklarının görülmesi bu çeşitliliği oluşturmaktadır. Örneğin *B. bigemina*'nın Avusturalya suşu nadiren hastalığa neden olurken, Afrika suşu ise oldukça patojen bir suştur. *B. bovis*'in beyin ve böbrek dokusundaki kapillar damarları öncelikli olarak tercih

etmesi seçici olarak bu organlarda oluşan zarara yönelik klinik tablo gelişmesine neden olmaktadır. *B. bigemina* ise kan akışı boyunca yayılır ve komplike olmayan hemolitik anemiye yol açar. Ayrıca konağın yaşı, ırkı, çevresel faktörler, kolostrum ile alınan pasif antikorlar konağın duyarlılığını değiştiren faktörlerdir. Buzağılarda görülen *Babesia* enfeksiyonları ılımlı bir seyir gösterir. Mortalite oranı oldukça düşük olup, ciddi durumlarda % 25'lere kadar ulaşır. Yetişkin sığırlarda ise *Babesia* enfeksiyonları daha şiddetli bir seyir gösterir. Akut enfeksiyonlarda mortalite oranı % 50 ve daha üstünde görülür. Hastalığın görüldüğü sıcak yaz aylarında, geç sonbahar ve erken ilkbahar döneminde mortalite oranı daha da artmaktadır. Daha önce babesiosise neden olan etkenlerle hiç karşılaşmamış yetişkin bir sığırdaki akut enfeksiyon oldukça şiddetli olmakta ve mortalite oranı % 90'lara çıkmaktadır (Christensen 1956, Mahoney ve ark 1977).

Klinik bulgular şiddetli, hiperakut ya da subklinik seyir göstermektedir. Parazit periferik kanda tespit edilebilir düzeye ulaştığında ilk belirtiler görülmeye başlamaktadır. Bu da genellikle vektör kenenin beslenmeye başlamasından itibaren 8-16 günleri arasındadır. İnkübasyon periyodu, konağa enjekte edilen parazit sayısı ve parazitin tercih ettiği dokulara göre değişiklik göstermektedir. Paraziteminin kanda yükselmesi ile birlikte rektal ateş 2 ya da 3 gün sonra 41 – 41.5 °C'ye kadar yükselir. Hayvanlarda ateş bulgusuna halsizlik, depresyon, iştah kaybı, kıllarda kabarıklık, rumen atonisi, konstipasyon, solunum ve nabız artışı eşlik eder. Süt sığırlarında süt verimi hızla düşer. Gebe hayvanlarda düşük görülebilir. Erken safhada görülebilir mukoz membranlar kırmızımsı ve idrar normal rengindedir. İlerleyen safhalarda eritrositlerdeki yıkıma bağlı olarak mukoz membranlar soluk ve ikterikdir. Hayvanlarda zayıflama görülür. İdrar rengi kırmızı, kanlıdır. Hayvan genellikle idrar yaparken ağrı hisseder. Konstipasyonu takiben sıklıkla mukus ve kan pıhtıları ile birlikte ishal görülür. Çok şiddetli etkilenen hayvanlarda 2-3 günden 1 haftaya kadar aşırı zayıflama ve düşkünlük, ağrı, kas titremeleri, gözyaşı akıntısı, salivasyon ve hızla düşen ateşle birlikte ölüm görülebilir. Hafif şiddette enfeksiyonda hayvanda ateş kademeli olarak normal seviyelere düşer. Birkaç hafta veya ay içerisinde hayvanın kondüsyonu tekrar düzelir. İlimli enfeksiyonlarda 1-3 haftalık periyotta parazitemi geçicidir. Rektal ateş 39-40 °C'ye yükselir, anoreksi ve depresyon görülür. Hemoglobüri genellikle yoktur; fakat hafif sarılık gözlemlenebilir (Christensen 1956, Zintl ve ark 2003, Bock ve ark 2004). Akut hastalığı takiben gelişen kronik enfeksiyonlarda ya da enfeksiyonun başlangıcından itibaren kronik seyreden durumlarda semptomlar akut

hastalığıdaki gibidir; ancak semptomlar daha ılımlıdır ve daha uzun süre içerisinde yayılmıştır. Hastalığın seyri uzun ve düzensizdir. Ateş periyodik olarak yükselir. İştah ve ruminasyon azalır. Kademeli olarak gelişen anemi ve zayıflama görülür. Ancak genellikle hemoglobüri görülmez. Mortalite oldukça düşüktür, iyileşme haftalar hatta aylar alır. Sıklıkla da enfeksiyon tamamen ortadan kalkmaz (Christensen 1956). Buzağılarda karakteristik olarak hafif bir ateş, iştahsızlık ve kısa bir süre devam eden depresyon görülür. Eritrosit yıkımı oldukça azdır ve hemoglobüri görülmez. Babesiosisin enzootik olduğu bölgelerde buzağılarda bu enfeksiyonların çoğu farkedilmemektedir. İyileşen buzağılar enfeksiyonun taşıyıcısı olarak kalmaktadır (Mahoney ve ark 1977).

Babesia bovis'in kenenin larval döneminde inokulasyonunu takiben gelişen prepatent süresi genellikle 6-12 gün arasındadır. Paraziteminin pik yaptığı ve klinik belirtilerin gözlemlendiği dönem ise 3-5 gün sonra ortaya çıkmaktadır (Bock ve ark 2004). *B. bovis* ile akut enfekte sığırlarda parazitemi oldukça düşük kalmaktadır. Bunun sebebi muhtemelen parazitin kapillar damarlarda yıkıma yol açmasıdır. Hastalık yetişkin ve yaşlı sığırlarda aniden gelişmekte ve yüksek oranlarda ölüme neden olabilmektedir. Ancak bir yaşından daha küçük sığırlar hastalığa karşı dirençlidir. Akut hastalıktan hayatta kalan sığırlarda gelişen güçlü bir immun cevap karşısında hem *B. bovis* hem de *B. bigemina*'da dirençli, kalıcı bir enfeksiyon gelişmektedir. Ancak her iki *Babesia* türünde gelişen direnç mekanizmaları farklıdır. *B. bovis* merozoitleri, özellikle beyin ve böbrek dokusundaki kapillar damarlarda eritrositler içerisinde birikim gösterir. *B. bigemina*'da kapillar damarlara yerleşim görülmez. *B. bovis* ile enfekte eritrositler kanda sirkulasyonda değildir ve dalak makrofajları tarafından gelişen fagositozisten kaçınmış olur (Allred ve ark 2000, Allred 2001, Hutchings ve ark 2007) . Bu şekilde dirençli enfeksiyon gelişimi söz konusu olur. *B. bovis* parazitlerinin avantajı, mekanik ve adheziv özelliklerinin değişikliğinde eritrosit yüzey şekillerinin değişebilmesidir (Gohil ve ark 2010). Enfekte eritrositlerin yüzeyinde oluşan çıkıntılar, *B. bovis* değişken eritrosit yüzey antijeni (VESA) gen ailesi tarafından kodlanmış proteinler içermektedir (O'Connor ve ark 1999, O'Connor ve Allred 2000). Bu çıkıntılar epitelyal kapillar hücrelere parazit içeren eritrositlerin sitoadhezyonunda anahtar rol oynamaktadır. VESA proteinleri hızla antijenik varyasyonlar geçirebilmektedir. Büyük olasılıkla vesa multigen ailesinin dönüşümü segmental gen aracılığıyla oluşur (Brayton ve ark 2007). Bu nedenle vesa proteinlerin salınımı, konakların immun baskısı karşısında parazitin yaşamasını kolaylaştırmaya yol açan immun cevap ve

adhezyonda çift yönlü rol oynaması *B. bovis*'in direnç merkezi olabilir. Sığırlarda *B. bigemina* enfeksiyonlarının dirençliliği ile ilgili mekanizması daha az araştırılmıştır. İlginç olan *B. bigemina*'da eritrositlerin yüzeyinde sadece konağın IgM moleküllerinin görülmesidir. Yüzeyde tespit edilen IgM moleküllerinin adhezyonda rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir (Suarez ve Noh 2011). Bununla beraber *B. bigemina*'nın doku tutulumundan yoksun olması, dolaşımdaki kalıcılığı için *B. bovis*'ten farklı mekanizmalar kullanabileceğini düşündürmektedir.

Makrofajlar tarafından temizlenmesine ve parazite karşı gelişen güçlü antikor yanıtına rağmen, bulaşmanın devam etmesi için patojen taşıyıcılığı sağlama bağlayan, sirkulasyonda çok az enfekte eritrositin kalmasıdır (Howell ve ark 2007).

2.9. Babesiosisde Tanı

Sığırlarda babesiosisin tanısı, hastalığın yayılmasının önlenmesi ve kontrol altına alınması açısından önemli bir araçtır.

2.9.1. Mikroskopik Tanı Metodları

Babesia parazitleri kompleks bir yaşam siklusuna sahiptir. Memeli ya da artropod konak dokuları içinde parazitin farklı safhalarının tanımlanması için direkt tanı amaçlı mikroskopik tanı yöntemleri kullanılır.

2.9.1.1. Kalın ve İnce Yayma Kan Frotisi

İnce yayma kan frotisi, *Babesia* parazitlerini klinik olarak gelen örneklerde etkeni tespit etmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem günümüzde hala çoğu tanı

laboratuvarlarında etkili olarak kullanılmaktadır. Pratik, kolay ve ucuz bir yöntem olan ince yayma froti yöntemi deneyimli bir göz tarafından incelenmelidir. Genellikle hastalığın akut safhası süresince kanda tespit edilebilir sayıda parazit bulunması nedeni ile akut safhada ince yayma kan frotisi daha güvenilir sonuç vermektedir. Ancak hastalığın subklinik seyrettiği kronik enfekte hayvanlarda parazit tespiti mikroskopik bakı ile mümkün olmamaktadır. İnce yayma kan frotilerinde alınan kanın kaynağı da sonucu etkileyebilmektedir. Örneğin; vasküler endotelyuma tutunmayan *B. bigemina*, *B. divergens* ya da *B. gibsoni* gibi türler için yalnızca periferel kandan alınan örneklerin incelenmesi tanıda yeterli olmaktadır. *B. canis* ya da *B. bovis* gibi endotelyal hücrelere tutunan *Babesia* türlerinde ise kulak ya da kuyruk ucu kapillar damarlarından alınan kan örneği incelendiğinde bu türlerle enfekte eritrositlere yüksek oranda rastlanmaktadır (Aikawa ve ark 1985, Morzaria 1992, Jacobson 2006).

Bir başka teknik ise özellikle kanda düşük parazitemi ile seyreden *B. bovis* gibi etkenlerin tespiti amacı ile kalın yayma kan frotisi yöntemi kullanılmaktadır. Daha iyi sonuç elde etmek için lamın ortasına küçük bir damla kan damlatılması ile yapılan bu metot, *B. bovis*'den şüphelenildiğinde ya da subklinik seyir gösteren *Babesia* enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (Morzaria 1992, Bose ve ark 1995).

Morfolojik olarak mikroskop altında *Babesia* türlerinin eritrositler içerisinde yüzük, halka ya da armut biçimli (piriform) trofozoitleri gözlenmektedir. Trofozoitleri armut formunda tek ya da çift olarak, ipliksi ya da amorf yapılarda görülebilmektedir. İpliksi ya da amorf trofozoitler genellikle paraziteminin yüksek olduğu hayvanlarda tespit edilmektedir. *Babesia* türleri armut formlarının arasındaki açılara göre morfolojik olarak değerlendirilmektedir. *B. bigemina* eritrosit içerisinde plemorfik (oval, yuvarlak, ameboid) şekillerde görülmektedir. Sıklıkla rastlanan karakteristik formu çift armut formudur ve aralarındaki açı dardır. *B. bovis* genellikle ortasında büyük bir vakuol ve kenarında çekirdek içeren yuvarlak formlar şeklinde gözlenmektedir. Sığırlarda *B. divergens* eritrositin periferinde piriform ya da yüzük formunda yerleşim gösterir. Armut formlarındaki açı geniştir (Zintl ve ark 2003, Bock ve ark 2004, Silva ve ark 2009).

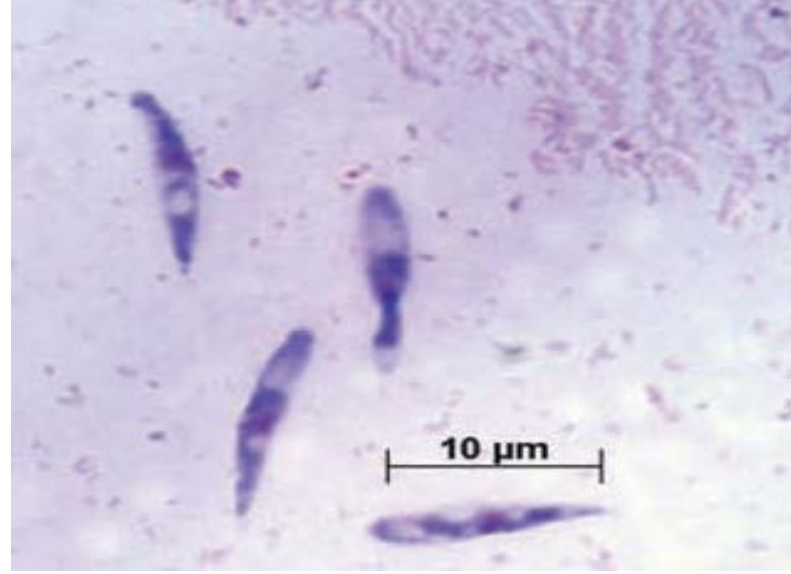
2.9.1.2. Beyin Yayma Preparatları

Babesia bovis ile enfekte eritrositler beyin kapillarlarında birikim göstererek kapillar damarları tıkamaktadır. Merkezi sinir sistemine bağı klinik belirtilere yol açan bu patogenezis sonucu ölen bir sığırdan *B. bovis*'den şüphelenilmektedir. Tanı amacıyla beyinin serebral korteksinin gri maddesinden hazırlanan doku yayma preparatları incelenmektedir (Ristic 1981). Beyin kapillarlarındaki mevcut eritrositlerin hemen hemen % 100'ünün enfekte olduğu görülmektedir. Böbrek ya da karaciğer gibi diğer organların smearlarında da enfekte eritrositlere rastlanabilmektedir (Uilenberg 1972).

2.9.1.3. Hemolenf Yayma Preparatları

Kene tarafından taşınan diğer patojenler gibi, *Babesia* türleri de yaşam döngüsünde kene dokularını enfekte etmektedir. Kene konaktan kan ile beslenip doyduktan hemen sonra bağırsağında kısa bir süre eritrositlerden kurtulan intrasellüler parazitleri içermektedir. Kenenin konağa tutunmasından 72 saat sonra seksüel üreme ile birlikte enfektif diploid hücreler kene bağırsak hücrelerine penetre olur ve kinet adı verilen hareketli aşamaya geçilir (Riek 1964). Parazitin hareketli formu olan kinetler, kenenin hemolenfine ulaşır ve çiftleşen kenenin ovaryumları dahil diğer organlarını enfekte eder. *Babesia* ile enfekte yetişkin dişi keneleri tespit etmek için en iyi yaklaşım hemolenf testi ile hemolenfde mevcut olan kinetlerin tanımlanmasıdır. Bu teknik, kenenin bacağına küçük bir makasla kesilerek alınan hemolenf damlasının yayma preparatının hazırlanması ile yapılmaktadır. Tanı kinetlerin (vermiküllerin), *Babesia* türüne bağı olarak 14.3-16.9 uzunluğu ve 2.8-3.4 genişliğinde gözlemlenmesine dayanmaktadır (Şekil 2.5.) (Friedhoff ve Scholtyseck 1968, Friedhoff ve Scholtyseck 1969). Hemolenf testinde etkenlerin tür ayrımını yapmak oldukça zordur. Biyolojik siklusa dayanarak kinetler hemolenfte ilk olarak kene doyduktan 72 saat sonra tespit edilir. Kenenin arakonağa tutunmasından itibaren 5.-6. günlerde ise maksimum kinet varlığı görülmektedir (Riek 1964). Kinetler dişi kene ölene kadar hemolenfde bulunmaktadır. *Rhipicephalus (=Boophilus)* kene türleri, kinetler ovaryumlara ulaşmadan önce, yumurta yumurtlamaya başlar ve daha sonra gelişen embriyoda kinetler yayılır. İlk yumurtalar kenenin arakonağa tutunmasından itibaren 72

saatte yumurtlanır ve ilk enfekte yumurtalar tutunma sonrası 92 saatte görülür. Parazit tarafından enfekte olmadan önce yumurtaların bazılarının yumurtlanması, dişi kenelerin *Babesia* ile enfekte olmayan nesil oranının artmasını sağlamaktadır (Mahoney ve Mirre 1977). Bu nedenle kinet miktarının oldukça düşük olduğu endemik bölgelerdeki sığırlardan toplanan dişi kenelerden hazırlanan hemolenf yayma preparatları deneyimli bir göz tarafından incelenmelidir.



Şekil 2.5. Doymuş *Rhipicephalus microplus*'un hemolenfinden elde edilen *B. bigemina*'nın kinet safhası (Mosqueda ve ark 2012)

2.9.2. Serolojik Tanı

Babesia bovis ve *B. bigemina* türleri *Rhipicephalus (=Boophilus) microplus* tarafından nakledilmesi ve filogenetik olarak yakın türler olmalarına rağmen; sığırlarda farklı hastalıklara neden olmaktadır. Böbrek, akciğer ve beyin mikropillerlerinde enfekte eritrositlerin parçalanmasından kaynaklanan organ yetersizlikleri, sistemik şok ve ölümlere yol açan *B. bovis* enfeksiyonları *B. bigemina*'nın oluşturduğu enfeksiyonlara nazaran daha şiddetli seyir göstermektedir. *B. bovis* enfeksiyonu genellikle sığırlarda canlı kalmakta ve diğer hayvanlara bulaştırmak için taşıyıcı olarak hizmet etmektedir (Bock ve ark 2004). Gerek taşıyıcı hayvanların tespiti gerekse de filogenetik olarak birbiri ile yakın ilişkili *Babesia* türlerini ayırtedebilmek için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek tanı testlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu testler protozoonların epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılması ve hastalığın kontrol stratejilerinin belirlenmesi için yarar sağlamaktadır (de Vos ve Potgieter 1994).

2.9.2.1. Indirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ve Enzim Bağlı Immunosorbent Testi (ELISA)

Taşıyıcı hayvanların tespit edilmesi yanısıra epidemiyolojik çalışmalarda sığır *Babesia* parazitlerine karşı spesifik antikorların belirlenmesi için çok sayıda serolojik testler geliştirilmiştir (Weiland ve Reiter 1988, Bose ve ark 1990, Araujo ve ark 1998). Bu testler arasında IFAT oldukça duyarlı bir test olmasına rağmen; subjektif değerlendirilmesi ve diğer *Babesia* türleri ile çapraz reaksiyon göstermesi kullanım alanını sınırlandırmaktadır (Bose ve ark 1995). IFA testinin aksine ELISA, oldukça pratik ve ekonomik, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir testtir. Objektif olarak çok sayıda örneğin değerlendirilebilmesi ve hızlı adaptasyon kapasitesi göstermesi nedeni ile ELISA epidemiyolojik çalışmalarda rutin tanı testi olarak kullanılmaktadır. Tanı için çok sayıda ELISA geliştirilmesine rağmen; çoğunlukla antijenlerin hazırlanması, duyarlılık ve özgüllük ile ilişkili bazı problemler gözlenmektedir. Örneğin; saf antijenler *Babesia* parazitlerine karşı gelişen antikorları tespit etmek için kullanılmıştır. Fakat antijenin saflaştırma kalitesinin düşük olması ve diğer protozoon parazitlerle çapraz reaksiyonların

görülmesi uygulamada sıkıntılara neden olmaktadır. Bu saf antijenler sıklıkla testin doğruluğunu etkileyen, arka planda spesifik olmayan bağlanmalara yol açan, konak hücre bileşenlerini içermektedir (Waltisbuhl ve ark 1987, Bose ve ark. 1990, de Echaide ve ark 1995, Machado ve ark 1997). Öte yandan parazitten elde edilen rekombinant proteinler yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip testlerin daha iyi standardize edilebilmesine izin veren, alternatif antijen kaynakları olmaktadır (Bose ve ark 1990, Bose ve ark 1995). Serolojik testlerde rekombinant antijenlerin kullanımının potansiyel avantajları olmasına rağmen; onların duyarlılığının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle yeni antijen belirleyicilerinin tanımlanması için daha fazla çalışmanın yapılması arzu edilmektedir.

Babesia parazitlerinin mikronemler, rhoptriler ve yuvarlak vücut organellerini içeren apikal kompleksinin karakteristik yapıları çoğunlukla tanımlanmıştır. Parazitin yaşamsal ve büyümeye dair kritik fonksiyonlarına sahip olduğuna inanılan parazitin membran bileşeni ile birlikte yukarıda bahsedilen bu organeller proteinlerden oluşmaktadır (Yokoyama ve ark 2006). Bu proteinler parazitin invazyon sürecinde merozoit ve sporozoitlerin tutunmasının başlangıç aşamasında anahtar rol oynadığına inanılan (Yokoyama ve ark 2006), çeşitli merozoit yüzey antijenleri (VMSAs) (Bono ve ark 2008); apikal membran antijen 1 (AMA-1) trombospondin-ilişkili anonim protein (TRAP) ve merozoitler ve eritrositler arasındaki 'tight junction' oluşumu ile ilgili rhoptri-ilişkili protein 1 (RAP-1) mikronem ve rhoptri proteinleri (Gaffar ve ark 2004); parazitin büyümesinde yardımcı ve invazyon sonrası ortam stabilizasyonunu sağlamakta rol oynayan yuvarlak vücut proteinleri (SBPs)'dir (Goo ve ark 2008, Terkawi ve ark 2009). Bu proteinlerin belirlenmesi subunit aşular ya da tanısal antijenler geliştirilmesi açısından umut vericidir.

Merozoit yüzey antijeni 2c (BbMSA-2c) (Kim ve ark 2008), C-terminal rhoptri-ilişkili protein 1 (BbRAP-1/CT) (Boonchit ve ark 2004), trombospondin-related anonim protein (BbTRAP) (Gaffar ve ark 2004), yuvarlak vücut protein 1 (BbSBP-1) (Hines ve ark 1995) ve yuvarlak vücut protein 4 (BbSBP-4)'ü (Terkawi ve ark 2011) içeren farklı rekombinant proteinlerle yapılan beş ELISA testi geçerli olarak kabul edilmiştir. *B. bovis* enfeksiyonlarının tespit edilebilmesi için global tanısal belirleyici olarak rBbSBP-4 ile ELISA'nın kullanımı dikkat çekmektedir. ELISA ile rBbSBP-4, standart IFAT'dan çok

daha pratik ve duyarlı bir tanı sağlamaktadır. Bu nedenle epidemiyolojik çalışmalar ve hastalığın kontrolünde uygulanabilir bir testtir.

Büyük membran protein BbMSA-2c kompleks VMSA geninin üyesidir ve umut verici tanı antijeni olarak bilinmektedir (Kim ve ark 2008). Bu ailenin üyelerinin coğrafik olarak farklı suşları arasında dizilim çeşitliliği görülmektedir (Palmer ve ark 1991). *Babesia* enfeksiyonlarının tespiti için rBbMSA-2c muhtemelen bu dizilim çeşitliliği nedeni ile düşük antijeniteye sahiptir ve tanı amaçlı kullanımı sınırlıdır. Rhoptri-ilişkili protein 1 (RAP-1) bütün *Babesia* türlerinde bulunmaktadır. Diğer apikal kompleks proteinlerle homolog dizilim göstermektedir. B-hücre ve T-hücre epitopları nötralizasyon-duyarlılığı içermektedir (Suarez ve ark 1991). BbRAP-1 enfeksiyonun erken safhasında enfekte kırmızı kan hücrelerinin (RBC) sitoplazması içerisinde tespit edilen exoantigen olarak bilinmektedir ve yüzük safhası görülmeden önce kısa bir süre kalmaktadır (Tetzlaff ve ark 1992, Yokoyama ve ark 2002, Terkawi ve ark 2009). Bu proteinin, diğer *Babesia* türleri ile çapraz reaksiyona neden olan, N-terminal bölgesinde 300 aminoasit arasında yüksek koruma nedeni ile tanı için uygun olmadığı bildirilmiştir. Aksine C-terminal diğer *Babesia* RAP-1'lerle düşük identities ile farklı dizilimler mevcuttur ve türe spesifik tanısal antijen olarak hizmet edebilir (Boonchit ve ark 2002, Boonchit ve ark 2004, Terkawi ve ark 2009). Bu yüzden C-terminal BbRAP-1 serodiagnozis ve epidemiyolojik çalışmalar için yüksek güvenilirliği ile antijen olarak geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Boonchit ve ark 2004, Iseki ve ark 2010). Bununla birlikte yapılan bir çalışmada bu antijen Asya'dan alınan örneklerle iyi bir performans gösterirken; Ghana ve Brezilya'dan alınan örneklerle gösterememiştir (Boonchit ve ark 2002). Performanslardaki tutarsızlıklar, türlerdeki genler arasında düşük tespit edilen homolojinin yanısıra immun cevap ve konaktaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Babesia enfeksiyonlarının serolojik tanısı genellikle aseksüel kan-safhasındaki parazitlere karşı oluşan antikörlerin tespitine dayanmaktadır. IFAT son on yılda güvenilir bir serolojik test olarak bilinmesine rağmen; uzun zaman almakta ve subjektif olarak değerlendirilmektedir. Otomatize edilememekte ve sonuçları değerlendiren teknisyenin tecrübesi ile orantılı olarak sonuçlar etkilenmektedir. Son yıllarda C-terminal rhoptri-ilişkili protein 1 ile yarışmalı ELISA (cELISA) OIE standartları altında laboratuvarlar arasında geçerli kabul edilmiştir (Goff ve ark 2003, Goff ve ark 2006). Farklı coğrafik

bölgelerden elde edilen *B. bovis* ile enfekte serumlarla cELISA'nın yüksek duyarlılığı ve özgüllüğüne rağmen; test enfeksiyonun erken safhasında tespit etmekte sınırlılık göstermektedir. Oysa ki IFAT, cELISA'nın tespit edemediği enfeksiyon aşamasından yaklaşık 2 gün önce *B. bovis* ile oluşturulan deneysel enfeksiyonda spesifik antikorları tespit edebilmektedir (Goff ve ark 2003). Üstelik cELISA'da örneklerin düşük OD değerleri göstermesi (cut off değerlerine yakın olan noktalarda) sonucu doğrulamak için testi tekrar etmek gerekmektedir. Bu durum özellikle düşük antikor titresini gösteren taşıyıcı hayvanlarla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda tanının doğruluğunu etkilemektedir. Bu nedenle daha etkili tanı testlerinin geliştirilmesi için araştırmaların devam edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Goff ve ark 2006). Ayrıca ELISA ile daha önce geçerli kabul edilmiş cELISA'nın karşılaştırmasının yapılması gelecekte *Babesia*'nin daha iyi tanı konması açısından gereklidir.

2.9.2.2. İmmunokromatografi Testi (ICT)

İmmunokromatografi testi (ICT), nitrosellüloz esaslı test stripleri aracılığıyla çok küçük miktarlardaki serumda (<200 µl) spesifik antijenlere karşı gelişen antikorların tespitine dayanan bir tanı yöntemidir (Kim ve ark. 2008). Son yıllarda sığırların babesiosisinin tanısında ELISA ve IFAT gibi laboratuvar malzemeleri, ekipman ve deneyimli personel gerektiren kompleks prosedürlere sahip serolojik testlere alternatif olarak ICT geliştirilmiştir. Bu yöntemle 15 dk'dan daha kısa bir sürede, tek bir reaksiyon şeridi kullanılarak *B. bovis* ve *B. bigemina* spesifik antikorları seçici ve eş zamanlı olarak tespit edilebilmektedir. Bu özellikleri ile ICT sahada kolay ve pratik uygulanabilen, hızlı ve basit serolojik tanısal bir testtir (Shiff ve ark 1993, Chandler ve ark 2000, Huang ve ark 2006). Sığırların babesiosisi üzerine yapılan bir çalışmada *B. bigemina* için rekombinant rhoptri ilişkili protein-1 (RAP-1)'in C-terminal kısmının kullanıldığı BoICT, *B. bovis* için ise rekombinant rhoptri ilişkili protein-1 (RAP-1)'in kullanıldığı BiICT geliştirilmiştir (Kim ve ark 2007). Çalışma sonucunda BoICT ve ELISA ile enfeksiyon sonrası 93. günden 14. güne kadar serumda antikor tespit edilmiş; BiICT ve ELISA ile enfeksiyon sonrası 274. günden 13. güne kadar serumda antikor saptanmıştır. Çalışmada BoICT ve BiICT'nin yapısal uyumluluğu klasik serodiagnostik metotlardan ELISA ve IFAT ile

karşılaştırıldığında; BoICT sırası ile % 92.5, % 90.3; BiICT sırası ile % 96.8, % 92.5 bulunmuştur (Kim ve ark 2007). Benzer bir çalışma olan; fakat *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın eş zamanlı olarak tespit edildiği bir başka çalışmada her iki tür için BoICT geliştirilmiştir. *B. bovis* rekombinant merozoit yüzey antijen-2c (rMSA-2c) ve *B. bigemina* rekombinant rhoptri ilişkili protein-1'in kullanıldığı çalışmada, BoICT ile *B. bovis* ve *B. bigemina* spesifik antikoları seçici olarak tespit edilmiştir (Kim ve ark 2008). Çalışma sonucunda BoICT'nin *B. bovis* için duyarlılığı ve spesifikliğı sırası ile % 96.7 ve % 91.3; *B. bigemina* için ise sırası ile % 96.7 ve % 92.5 olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında BoICT, herhangi bir laboratuvar ekipmanı gerektirmeksizin sığır babesiosisinin sahada hızlı tanısall değerlendirilmesinde oldukça kullanışlı bir test olarak bildirilmektedir (Kim ve ark 2008).

2.9.3. Moleküler Tanı

Genellikle epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilen ve bir bölgedeki durumu yansıtmada yeterli olan serolojik yöntemler, etkenlerin kanda tespit edilemediğı subklinik enfeksiyonların tanısında tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Aşı uygulanan hayvanlarda ya da tedavi sonucu iyileşen hayvanlarda parazit bulunmadığı halde antikor varlığının uzun süre devam etmesi, akut dönemde Ig G'lerin henüz oluşmaması ve *Babesia* türleri arasında çapraz reaksiyonların görülmesi elde edilen sonuçları etkilemektedir (Wagner ve ark 1992, Passos ve ark 1998). Serolojik testler bu bağlamda antikorların varlığını göstermektedir; fakat hastalığın durumunu ortaya koymada yetersiz kalmaktadır.

Son yıllarda rekombinant DNA teknikleri ile birlikte moleküler yöntemlerde kaydedilen ilerlemeler *Babesia* türlerinin tanısında önemli gelişmeler sağlamıştır. Polimorfik DNA problemleri aracılığıyla yapılan çalışmalarda *B. bovis*'in doğal izolatları arasındaki heterojenite tespit edilmiştir (Cowman ve ark 1984, Dalrymple 1990, Jasmer ve ark 1990). RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) tekniğı ile türe spesifik ya da suşla spesifik, prob olarak da kullanılabilen fragmentler tespit edilerek, genetik varyasyonların değerlendirilmesinde ve filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hardrys ve ark 1992). RAPD tekniğı PCR ile birlikte çalışmalarda, türe

spesifik tanısal problemlerin geliştirilmesinde hızlı bir method olarak da kullanılmıştır (Basagoudanavar ve ark 1998, Reddy ve ark 1998, Omanwar ve ark 2001). 2006 yılında Ravindran ve ark tarafından RAPD-PCR'ın monomorfik fragmentinden elde edilen yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip nonradyoaktif prob geliştirilmiştir (Ravindran ve ark 2006). Çalışmada yaklaşık 873 bp'lık monomorfik RAPD fragmentinden elde edilen *B. bigemina*'ya spesifik digoksinin işaretli probun, hedef *B. bigemina* genomik DNA'sını minimum 100 ng'a kadar tespit ettiği bildirilmiştir (Ravindran ve ark. 2006). *B. bigemina*'nın spesifik olarak tanımlanmasında çeşitli nükleik asit problemleri kullanılmıştır. Nükleik asit problemleri epidemiyolojik çalışmalarda özellikle paraziteminin düşük seyrettiği taşıyıcı hayvanların belirlenmesinde tercih edilmektedir (Buening ve Figueroa 1992, Figueroa ve Buening 1995). Reddy ve ark. tarafından sığır kanında ve in vitro hücre kültürlerinde yapılan iki ayrı çalışmada *B. bigemina*'ya spesifik ribosomal RNA problemleri kullanılmıştır (Reddy ve ark 1991, Reddy ve Dame 1992). Çalışmalarda rRNA problemleri ile yapılan yöntemin son derece spesifik ve duyarlı olduğu bildirilmiştir (Reddy ve ark 1991, Reddy ve Dame 1992). Buening ve ark. tarafından 1990 yılında *B. bigemina*'nın spesifik tekrarlayan DNA problemlerinin karakterizasyonu ve yapısı ortaya konmuştur (Buening ve ark 1990). Çalışmada orijinal radio-işaretli prob (^{32}P)'un *B. bigemina*'ya spesifik olduğu aynı zamanda farklı ülkelerden elde edilen *Babesia* izolatları ile hibridize olduğu görülmüştür. Bu DNA probunun (^{32}P), *B. bigemina* DNA'sını 10 pg gibi küçük bir miktarda dahi tespit edebildiği bildirilmiştir (Buening ve ark 1990).

Babesia türlerinin moleküler teşhisinde PCR, yüksek duyarlılık ve özgüllükle birlikte hızlı sonuç almayı sağlamaktadır (Fahrimal ve ark 1992, Smeenk ve ark 2000, Almeria ve ark 2001, Gayo ve ark 2003, Oliveira-Sequeira ve ark 2005, Costa-Junior ve ark 2006, Martins ve ark 2008). Çok sayıda aday genlerle yeni PCR metodlarının dizayn edilmesi *B. bovis* genom diziliminin tamamlanmasında rol oynamıştır (Brayton ve ark 2007). Aynı zamanda yeni genlerin araştırılması hem *B. bovis* hem de *B. bigemina* enfeksiyonlarının tanısı için gereklidir. Bu amaçla şimdiye kadar PCR tekniğinde *B. bovis* için sitokrom b (Fahrimal ve ark 1992, Salem ve ark 1999), DNA prob (Figueroa ve ark 1993, Figueroa ve ark 1998), ssurRNA (Calder ve ark 1996, Criado-Fornelio ve ark 2003a,b, Thammasirirak ve ark 2003, Costa-Junior ve ark 2006, Guerrero ve ark 2006), BvVA1 ve Bv80 (Lew ve ark 1997, Bock ve ark 2000), beta tubulin (Caccio ve ark 2000) geni genomik hedef olarak kullanılmıştır. *B. bigemina* için DNA prob (Figueroa ve ark

1992, Figueroa ve ark 1993, Figueroa ve ark 1998), sitokrom b (Salem ve ark 1999), beta tubulin (Caccio ve ark 2000), ssurRNA (Costa-Junior ve ark 2006, Guerrero ve ark 2006) geni genomik hedef olarak kullanılmıştır. Son yıllarda nested PCR kullanılarak *B. bovis* genom diziliminden BV5650 ve BV8970 adlı iki membran protein genleri seçilerek bir çalışma yapılmıştır (Aboulaila ve ark 2010a). Bu iki gen *B. bovis* için tek olmakla birlikte, *B. bigemina* genom dizilimi verileri ve diğer apikompleksan parazitlerde homolog bir yapıya sahip değildir (Brayton ve ark 2007). Diğer apikal kompleks proteinlerinden farklı ve *Babesia* türleri arasında korunmuş BV5650 ve BV8970 gen kodları *B. bigemina* genom diziliminde tespit edilememiştir. Bu nedenle *B. bovis* enfeksiyonlarının tanısında bu genlerin kullanımı PCR'in duyarlılığı ve özgüllüğünü arttırabileceği düşünülmektedir. Bu iki membran gen proteinleri kullanılarak iki nested PCR testinin geliştirilmesi amaçlanan çalışmada geliştirilen testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü *B. bovis* RAP-1 (rhoptri-ilişkili protein-1) geni ile karşılaştırılmıştır (Aboulaila ve ark 2010a). Çalışma sonucunda *B. bovis* in vitro hücre kültürü ile yapılan nested PCR'in duyarlılığı BV650, BV8970 ve RAP-1 sırası ile % 10^{-8} , % 10^{-6} ve % 10^{-7} parazitemiye kadar düşmüştür. BV650 geni ile test başına 1 fg genomik DNA'ya kadar tespit edilirken; BV8970 ve RAP-1 geni ile 100 fg genomik DNA tespit edilmiştir. Çalışmada alınan sonuçlar, saha örneklerinde *B. bovis*'in tanısı amacıyla BV650 geninin nested PCR testi ile oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir. Dünya çapında sığırlarda *B. bovis* enfeksiyonlarının tanısız değerlendirilmesinde BV650 nPCR'in iyi bir araç olduğu bildirilmektedir (Aboulaila ve ark 2010a). Yine son yıllarda *B. bigemina*'nın tespitine yönelik parazite spesifik apikal membran antijen-1 (AMA-1) gen dizilimine dayanan yeni bir nested PCR geliştirilmiştir. Çalışmada *B. bigemina*'nın spesifik olarak tespit edilmesinde AMA-1 nPCR yönteminin yararlı bir tanısız araç olabileceği bildirilmiştir (Sivakumar ve ark 2012).

Hem ekonomik hem de eş zamanlı olarak çok sayıda parazit türünün tespitinde rol oynayan RLB testi, epidemiyolojik çalışmalarda pratik olarak kullanılan bir başka moleküler testtir. Dünya'da ve Türkiye'de sığırlarda *Babesia* türlerinin tanısında RLB testine dayanan çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Sparagano ve ark 2000, Almeria ve ark 2002, Brigido ve ark 2004, Oura ve ark 2004, İça 2004, Garcia-Sanmartin ve ark 2006, Salih ve ark 2007, Silva ve ark 2010, Yıldırım ve ark 2013). Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan daha önce farklı projelerde kullanılmak üzere toplanan ve laboratuvarında muhafaza edilen 400 adet sığır kan örneğinin kullanıldığı bir çalışmada RLB tekniğinin

Real Time PCR ile karşılaştırılması sonucu, RLB tekniğinin % 88.8 duyarlılık ve % 100 özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir (Yıldırım ve ark 2013).

Babesia bovis ve *B. bigemina* enfeksiyonlarının moleküler tanısında farklı tanı metotlarının kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Farklı moleküler tanı metotları olarak nested PCR (Figueroa ve ark 1993, Oliveira ve ark 2005, Costa-Junior ve ark 2006, Goff ve ark 2006, Cao ve ark 2012, Yu ve ark 2013, Yıldırım ve ark 2013); PCR (Calder ve ark 1996, Smeenk ve ark 2000, Gayo ve ark 2003, Almeria ve ark 2001, Chaudhry ve ark 2010, Yıldırım ve ark 2013); real time PCR (Yıldırım ve ark 2013); RLB (Gubbels ve ark 1999, Brigido ve ark 2004, Oura ve ark 2004, İça 2004, Salih ve ark 2007, Yıldırım ve ark 2013); mLAMP tekniği (Iseki ve ark 2007); LAMP yöntemi (Liu ve ark 2012); seminested hot-start PCR (Martins ve ark 2008) kullanılmıştır. *B. bigemina* enfeksiyonlarının moleküler tanısında ise şimdiye kadar nested PCR (Cao ve ark 2012, Sivakumar ve ark 2012, Yu ve ark 2013, Yıldırım ve ark 2013); PCR (Smeenk ve ark 2000, Almeria ve ark 2001, Oliveira ve ark 2008, Petrigh ve ark 2008, Chaudhry ve ark 2010); Real Time PCR (Yıldırım ve ark 2013); duplex PCR (Sharma ve ark 2013); mLAMP tekniği (Iseki ve ark 2007); LAMP yöntemi (Liu ve ark 2012) ve RLB (Garcia-Sanmartin 2006, Salih ve ark 2007, Yıldırım ve ark 2013) tekniği kullanılmıştır.

Yeni bir nükleik asit tespit yöntemi olarak son yıllarda kullanımı artan LAMP tekniği ile izotermal şartlar altında yüksek duyarlılık ve özgüllükde hedef DNA çoğaltılabilmektedir (Notomi ve ark 2000, Iseki ve ark 2007, Liu ve ark 2012). LAMP tekniğine dayanan multipleks LAMP (mLAMP) yönteminde ise sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina* türleri eş zamanlı olarak tespit edilebilmektedir (Iseki ve ark 2007). mLAMP tekniği kullanılarak *B. bovis* ve *B. bigemina* rhoptri-ilişkili protein-1 genleri için LAMP primerleri dizayn edilen bir çalışmada, restriksiyon enzim analizini takiben etkenlerin tanısı eş zamanlı olarak ortaya konmuştur. mLAMP yönteminin duyarlılığı klasik PCR metodları ile karşılaştırıldığında *B. bovis* için 10^3 , *B. bigemina* için 10^5 kez daha yüksek olduğu görülmüştür (Iseki ve ark 2007). LAMP tekniği ile *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin hızlı bir şekilde tespit edilerek ayırt edilmesi amaçlanan başka bir çalışmada internal transcribed spacer (ITS) genlerinin spesifik dizilimleri hedef olarak kullanılmıştır. Çalışmada LAMP yönteminin duyarlılığı klasik PCR yöntemlerine nazaran *B. bigemina* ve *B. bovis* için 0.1 pg DNA olarak bildirilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen bulgularla,

Babesia tür-spesifik LAMP testinin özellikle babesiosisin endemik olarak görüldüğü ülkelerde, *Babesia* türlerinin hem ayırt edilmesi hem de tespit edilmesinde potansiyel bir klinikal uygulama olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (Liu ve ark 2012).

2.10. Tedavi, Korunma ve Kontrol

Sığır babesiosisinin kontrolünde aşılama, anti-babesial ilaçlar, kene kontrolü ya da bütün bunların birarada kullanıldığı yaklaşımlar yer almaktadır (Suarez ve Noh 2011). Geçmişde sığır babesiosisinin tedavisi hastalığın eradikasyonundan daha az önem arz etmekteydi. Birinci amaç vektör kenenin eradikasyonunun sağlanmasıydı. Fakat günümüzde dünyada sığır babesiosisinin görüldüğü ülkelerde babesiosisin kontrolü ve önlenmesi oldukça önemlidir. Endemik bölgelerde hasta hayvanlar mümkün olan en kısa zamanda anti-parazitik ilaçlarla tedavi edilmelidir. Erken tanı ve hemen etkin ilaçların kullanımına bağlı olarak tedavide başarı sağlanabilmektedir. Çok sayıda kimyasal bileşiklerin *Babesia* parazitlerine karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Vial ve Gorenflot 2006). Bu bileşiklerden bazıları oldukça spesifik ve etkili olmakla birlikte, birçoğu da birkaç sebepten dolayı kullanımdan kaldırılmıştır. Şiddetli gelişen babesiosis vakalarında kan transfüzyonu uygulanması, anti-inflamatorik ilaçların kullanımı, kenelerin uzaklaştırılması, demir preparatları, dekstroz, vitaminler (özellikle B kompleks), purgatifler uygulanması, sıvı değişimi gibi destek tedavi gerekli olabilmektedir (Kuttler 1981, Zintl ve ark 2003). Trypan blue, sığır babesiosisine karşı kullanılan ilk spesifik ilaçtır. *B. bigemina* enfeksiyonlarına karşı oldukça etkili bir bileşik olup, *B. bovis* üzerine herhangi bir etkisi yoktur. Trypan blue'nun hayvanların rengini değiştirmesi sebebi ile de kullanımı ortadan kalkmıştır. Uzun yıllar Avrupa'nın çoğu yerinde sığır babesiosisine karşı quinuronium sulfate, amicarbalide, diminazene aceturate ve imidocarb dipropionate kullanılmıştır. Ancak quinuronium sulfate, amicarbalide üretim güvenliği nedeni ile piyasadan kaldırılmıştır. Diminazene aceturate ise babesiacide ve trypanocide olarak tropik bölgelerde geniş kullanım alanı bulmuştur; fakat pazarlama nedenlerinden dolayı Avrupa'da piyasadan geri çekilmiştir (Zintl ve ark 2003, Vial ve Gorenflot 2006). *Babesia* türlerine karşı koruyucu ajanların gelişigüzel kullanımı parazitlerin ilaçlara karşı direnç geliştirmesine yol açar (Yeruham ve ark 1985). Bu nedenle esas problem yeni ilaçların

geliştirilmesidir. Babesiosis'e karşı kemoterapotik etkili yeni ilaçlar konakta istenen hastalık kontrolünü sağlayacak ve konakta düşük toksisiteye neden olacak şekilde parazite karşı spesifik etkili ilaçlar olmalıdır. Bu amaçla babesiosis'in tedavisinde yeni antibabesial ilaçlar olarak triklosan (Bork ve ark 2003), nerolidol (Aboulaila ve ark 2010b, artesunat (Goo ve ark 2010), epoxomisin (Meng ve ark 1999), gossipol (Bork ve ark 2004) ve atovaquon (Hughes ve Oz 1995) gösterilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Materyal

Bu çalışma Haziran 2006 - Eylül 2008 tarihleri arasında Aydın, İzmir, Manisa illerinde belirlenen odaklarda yapılmıştır. Bu amaçla Aydın merkez (Osmanbükü), Aydın iline bağlı Yenipazar (Dalama), Çine (Akçaova beldesi), Söke (Akçakaya); İzmir iline bağlı Tire (Başköy), Aliğa (Çıtak), Kınık (Karadere); Manisa iline bağlı Alaşehir (Gürsu), Gölarmara (Sazköy) ilçelerindeki odaklardaki sığırlardan kan örnekleri alınmıştır. Çalışmada belirlenen odakların Aydın, İzmir ve Manisa illeri içerisindeki yerleşimi Resim 3.1'de gösterilmiştir.



Resim 3.1. Çalışmada belirlenen odakların (Aydın ili Merkez-Osmanbükü, Yenipazar, Çine, Söke; İzmir ili Tire, Aliğa, Kınık; Manisa ili Göl marmara, Alaşehir ilçeleri) coğrafik yerleşim haritası.

Çalışmada Haziran 2006 - Eylül 2008 tarihleri arasında belirlenen odalarda bulunan sığırlardan her ay düzenli kan alınmıştır. 2006 yılı Haziran ayında 224 adet sığır kan örneği ile çalışmaya başlanmış, 2008 yılı Eylül ayında alınan 241 adet sığır kan örneği ile çalışma bitirilmiştir. Toplamda Aydın merkez (Osmanbükü), Aydın iline bağlı Yenipazar (Dalama), Çine (Akçaova beldesi), Söke (Akçakaya); İzmir iline bağlı Tire (Başköy), Aliğa (Çıtak), Kınık (Karadere); Manisa iline bağlı Alaşehir (Gürsu), Göl marmara (Sazköy) ilçelerine ait odaklardaki sığırlardan alınan kan örneklerinin yıl ve aylara göre dağılımı Çizelge 3.1., Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir. Çalışma süresince her gidişte mümkün olduğunca aynı hayvanlardan kan alınmıştır. Ancak odaklardan kan örnekleri her ay alındığı için ölen, kesilen ya da satılan hayvanlar nedeniyle her seferinde aynı sayıda hayvandan kan alımı mümkün olmamıştır. Ayrıca her

ay odaklara yeni katılan hayvanlardan da kan alınarak, bu örnekler çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Kan örnekleri Haziran 2006 tarihinden itibaren Eylül 2008 tarihine kadar her ay düzenli olarak toplam 9 odadaki sığırlardan alınmıştır. Sığır kan örnekleri 10 ml'lik EDTA (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate)'lı tüplere alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirilmiştir. Daha sonra alınan kan örnekleri 1'er ml eppendorf tüplere bölünerek kullanım aşamasına kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. 2006 yılında aylara göre odaklardan toplanan kan örneklerinin sayısı

2006 YILI							
	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
Aydın-Merkez	46	49	49	48	49	42	54
Yenipazar	40	48	50	49	43	36	23
Çine	46	33	25	52	45	41	X
Söke	X	X	50	61	34	24	30
Tire	43	47	47	50	44	31	42
Aliğa	X	X	X	31	32	32	28
Kınık	X	X	X	24	26	28	37
Alaşehir	49	50	52	50	46	46	47
Gölmarmara	X	48	51	51	50	44	28
TOPLAM	224	275	324	416	369	324	289

X: Kan örneği alınamamıştır.

Çizelge 3.2. 2007 yılında aylara göre odaklardan toplanan kan örneklerinin sayısı

2007 YILI												
	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
Aydın-Merkez	41	39	30	38	39	39	39	39	39	37	42	38
Yenipazar	25	34	25	17	27	42	45	48	45	43	46	45
Çine	41	39	34	25	29	16	X	31	4	40	30	25
Söke	29	45	37	51	54	57	59	61	51	51	58	49
Tire	42	56	48	42	49	53	46	47	45	45	44	49
Aliğa	32	30	30	31	34	40	37	35	37	37	43	46
Kınık	38	40	37	25	16	19	13	11	10	17	29	34
Alaşehir	48	38	38	45	43	40	41	41	41	50	50	49
Gölmarmara	47	52	53	46	37	54	52	31	37	35	35	35
TOPLAM	343	373	332	320	328	360	332	344	309	355	377	370

X: Kan örneği alınamamıştır.

Çizelge 3.3. 2008 yılında aylara göre odaklardan toplanan kan örneklerinin sayısı

2008 YILI									
	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül
Aydın-Merkez	37	37	29	29	35	34	29	X	28
Yenipazar	33	34	27	30	29	30	34	X	34
Çine	38	32	33	22	31	31	X	X	30
Söke	29	33	36	30	25	41	37	37	39
Tire	44	40	30	29	28	34	32	X	26
Aliğa	39	39	29	22	25	23	23	30	19
Kınık	36	33	26	15	17	16	11	6	8
Alaşehir	47	46	42	37	29	31	32	31	26
Gölmarmara	34	33	33	31	31	32	32	32	31
TOPLAM	337	327	285	245	250	272	230	136	241

X: Kan örneği alınamamıştır.

3.3. DNA Örneklerinin Hazırlanması

DNA örnekleri, her bir sığır kan örneğinin 200 µl'sinden Wizard® Genomic DNA Purifikasyon Kiti kullanılarak, protokole uygun olarak hazırlanmıştır (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Kan örnekleri -80 °C'den çıkartılarak, oda sıcaklığında çözümleri sağlanmıştır. Çözünme gerçekleşikten sonra tüpler alt üst edilip kan örneklerinin homojen karışması sağlanmıştır. Her bir kan örneğinden 200'er µl. alınarak, steril 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 600 µl. Cell Lysis solüsyonu eklenmiştir. Tüpler alt üst edilerek kan ve Cell Lysis solüsyonunun homojen olarak karışması sağlanmış ve 10 dk. oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresince tüpler 2–3 kez alt-üst edilmiştir. İnkubasyon sonunda örnekler 13,000–16,000 x G'de 20 sn. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda dipteki pelete dokunulmadan süpernatant atılmıştır. Kan örnekleri -80 °C'de dondurulduğu için yukarıda anlatılan basamaklar ikişer kez tekrarlanmıştır. Dipte kalan beyaz kan hücreleri süspansiyon haline gelene kadar 10–15 sn. hafifçe vortekslenmiştir. Üzerlerine 200 µl. Nuclei Lysis solüsyonu eklenerek beyaz kan hücrelerinin lize olması için 5-6 kez pipete edilmiştir. Daha sonra 37 °C 'de 1 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonunda üzerlerine 1 µl. RNase solüsyonu eklenerek tüpler 2–5 kez alt-üst edilmiştir ve 37 °C'de 15 dk. inkubasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 70 µl. Protein Presipitasyon solüsyonu eklenmiş ve 10–20 sn. vortekslenmiştir. Daha sonra 13,000–16,000 x G'de 3 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda dipte kalan koyu kahverengi protein peletine dokunulmadan süpernatant alınmıştır. Süpernatant 1.5 ml'lik vida kapaklı tüpler içerisinde bulunan 200'er µl. İsoopropanol üzerine eklenmiştir. Tüplerde İsoopropanol içerisinde yüzen beyaz küçük DNA bulutu görülünceye kadar hafifçe sallanmış ve sonra 13,000–16,000 x G'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda İsoopropanol, dipteki DNA rahatsız edilmeden dökülmüştür. DNA üzerine 200 µl. % 70'lik ethanol konularak tüp hafifçe alt-üst edilmiştir. DNA peletinin ethanolde yıkanması sağlandıktan sonra 13,000–16,000 x G'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra ethanol dikkatli bir şekilde dipteki DNA peletine dokunulmadan pipetle çekilerek atılmıştır. Tüpler temiz kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kapatılmış ve 10–15 dk. kuruması beklenmiştir. 10–15 dk. sonunda tüplere 70 µl. DNA Rehidrasyon solüsyonu eklenerek 65 °C'de 1 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonunda

rehidrasyon solüsyonu içerisindeki DNA kullanım aşamasına kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR için *Babesia* ve *Theileria* soylarına ait parazitlerin 18S ssu rRNA geninin V4 değişken bölgesi içinde 460-540 bp'lık parçayı amplifiye eden RLB-F2 (5'- GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G -3'), RLB-R2 (5' biotin- CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT -3') genel primerleri kullanılmıştır (Gubbels ve ark. 1999). Primerler Thermo electron, GmbH, Germany firması tarafından sentezlenerek, liyofilize olarak teslim edilmiştir. Daha sonra steril bi-distile su (DNase-RNase free) ile primerlerin konsantrasyonları 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırılmıştır. Her PCR reaksiyon karışımı hazırlanırken primerlerin tekrarlı dondurup çözdümlerden etkilenmemeleri için, primerler önce vortekslenip kısa bir santrifüj sonrasında steril eppendorf tüplere bölünmüştür. Bu stok primerler kullanım aşamasına kadar - 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

PCR reaksiyon karışımı toplam 25 µl konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Bu amaçla PCR karışımı DNase-RNase free eppendorf tüpler (Axygen, USA) içerisinde 18.05 µl Milli Q (double distile su), 2.5 µl 10 x PCR buffer (100 mM Tris-HCL, pH 9.0 (25 °C); 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 0.1% gelatin; 1% Triton X-100) (Promega, Madison, WI, USA), 1.25 U TaqDNA Polimeraz, 1.06 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, USA), 200 µM dNTP/dUTP (200 mM herbir dATP, dCTP, dGTP ile 100 mM dTTP ve dUTP), 25 pmol forward-reverse primerleri (100pmol/µl) (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Germany) ve 2 µl hedef DNA kullanılarak hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı hazırlanan eppendorf tüpler reaksiyonun erken başlamasını önlemek amacıyla hemen buz üzerine alınmıştır.

Tüm PCR aşamaları (stok primer solüsyonlarının sulandırılması, dNTP/dUTP'nin hazırlanması ve PCR reaksiyon karışımının hazırlanması) kontaminasyonu önlemek amacıyla UV ile sterilize edilen laminar kabin içerisinde, yalnızca PCR için kullanılan sterilize pipet, pipet ucu ve eppendorflarla yapılmıştır.

PCR reaksiyonu ‘Techne TC-512’ marka otomatik thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon karışımının bulunduğu eppendorf tüpler buz üzerinden alınarak thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir. PCR şartları cihaz üzerinde 3. siklustan itibaren her iki siklus sonunda bağlanma sıcaklığı 57 °C 'ye inene kadar 2 °C düşecek şekilde (Touchdown PCR) programlanmıştır. PCR şartları Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri RLB hibridizasyon tekniğinde kullanılmak üzere + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR şartları

1 siklus	37 °C	3 dk
1 siklus	94 °C	10 dk
2 siklus	94 °C	20 sn
	67 °C	30 sn
2 siklus	72 °C	30 sn
	94 °C	20 sn
	65 °C	30 sn
2 siklus	72 °C	30 sn
	94 °C	20 sn
	63 °C	30 sn
2 siklus	72 °C	30 sn
	94 °C	20 sn
	61 °C	30 sn
2 siklus	72 °C	30 sn
	94 °C	20 sn
	59 °C	30 sn
40 siklus	72 °C	30 sn
	94 °C	20 sn
	57 °C	30 sn
1 siklus	72 °C	10 dk

3.5. Reverse Line Blot Hibridizasyon Testi (RLB)

RLB hibridizasyon tekniği daha önce yapılan çalışmalarda bildirilen protokol doğrultusunda yapılmıştır. (Gubbels ve ark. 1999, Matjila ve ark. 2004). Reverse line blot için Biodin-C membran ve N-terminal N-triflorasetamidoheksil-siyanoetil,N,N-diisopropil fosforamid TFA-C6 amino linker ile muamele edilmiş spesifik oligonükleotidler (problar) kullanılmıştır. Biodin-C membran (PALL Gelman Laboratory, USA) laboratuvar ortamında 14,5 x 15 cm boyutlarında hazırlanarak, 10 ml %16 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) karbodimid (EDAC) (Sigma, St. Louis, Mo.) ile 10 dk. oda sıcaklığında aktive edilmiştir. Membran 2 dk. steril distile su ile yıkanarak MN45 miniblottera (Immunetics, Cambridge, Mass.) yerleştirilmiştir. Miniblottera yerleştirilip sabitlenen membranın üzerinde kalan fazla distile su miniblotter kuyucuklarından pipet yardımı ile çekilmiştir (Resim 3.2.).



Resim 3.2. Biodine-C membranının MN45 miniblottera yerleştirilmesi.

Oligonükleotidlerin negatif yüklü Biodine-C membrana kovalent olarak bağlanabilmeleri amacıyla 5' ucunda amino grubu (N-terminal N-triflorasetamidoheksil-siyanoetil,N,N-diisopropil fosforamid TFA-C6 amino linker) içecek şekilde oligonükleotidler Thermo Electron GmbH (Germany) firmasına sentezlettirilmiştir. Oligonükleotidler 50–3200 pmol/150 l konsantrasyonlarında 500 mM steril NaHCO₃ (pH 8.4) ile sulandırılmıştır. Çalışmada kullanılan *Theileria/Babesia* soyuna ait catch-all, *B. divergens*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. major*, *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis* spesifik

oligonükleotidlerinin dizilimleri ve sulandırma oranları Çizelge 3.5.'de gösterilmiştir. Sulandırılan her bir oligonükleotid MN45 miniblotterdaki kuyucuklara sırayla 150 µl oranında yüklenerek 1 dk. oda sıcaklığında inkube edilmiştir. Bu süre içerisinde oligonükleotidler aminolinkerler aracılığıyla membrana kovalent olarak bağlanmıştır. 1 dk. sonunda oligonükleotid solüsyonları miniblotterdaki kuyucuklardan pipetle aspire edilmiştir. Membran oligonükleotid solüsyonlarından tamamen arındırıldıktan sonra miniblotterdan çıkartılarak, 100 ml 100 mM steril NaOH ile 10 dk. oda sıcaklığında inaktive edilmiştir. Daha sonra 100 ml steril 2x SSPE (20x SSPE: 360 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄ ve 2 mM EDTA pH 7.4) - %0.1 SDS (Sodyumdodesilsülfat) ile membran 60 °C'de 5 dk. yıkanmıştır. 2x SSPE - %0.1 SDS membran üzerinden dikkatlice dökülerek, membran üzerine 20 mM EDTA eklenmiş ve 15 dk. oda sıcaklığında yıkanmıştır. 15 dk. sonunda EDTA dökülerek tekrar membran üzerine bir miktar EDTA konulmuş ve membran kullanım aşamasına kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

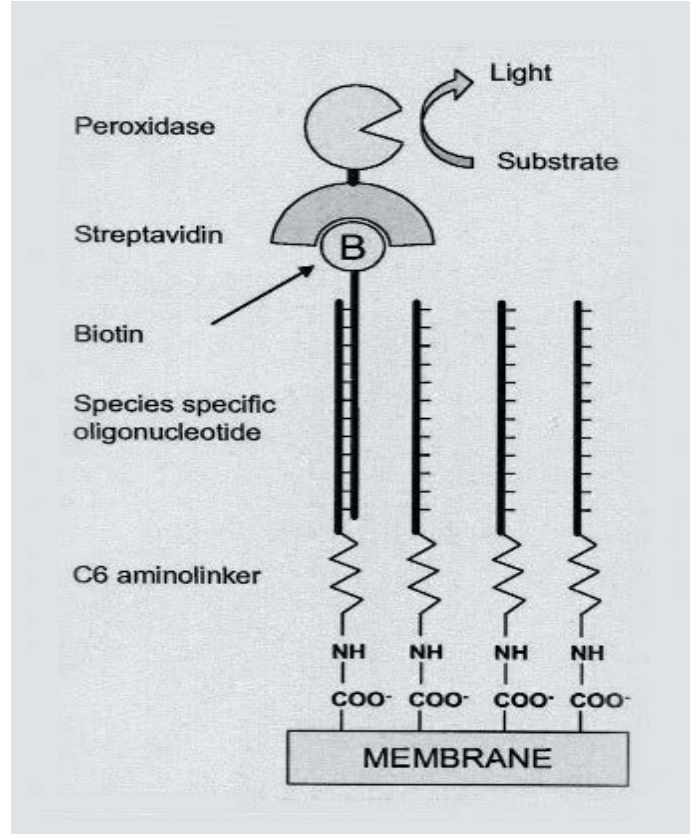
Çizelge 3.5. RLB hibridizasyon tekniğinde kullanılan oligonükleotidler, sulandırma konsantrasyonları ve dizilimleri

Oligonükleotidler	Sulandırma konsantrasyonu (pmol)	Tür-spesifik oligonükleotid sekansı (5'→3')
<i>T/B catch all</i>	50	TAA TGG TTA ATA GGA (AG)C (AG) GTT G
<i>B. divergens</i>	200	GTAAATATTGACTAATGTCGAG
<i>B. bigemina</i>	200	CGTTTTTCCCTTTTGTGG
<i>B. bovis</i>	100	CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG
<i>B. major</i>	200	TCCGACTTTGGTTGGTGT
<i>T. annulata</i>	100	CCT CTG GGG TCT GTG CA
<i>T. buffeli</i>	100	GGC TTA TTT CGG WTT GAT TTT

5' ucu N-terminal N-triflorasetamidoheksil-siyanoetil,N,N-diisopropil fosforamid TFA-C6 amino linkerli

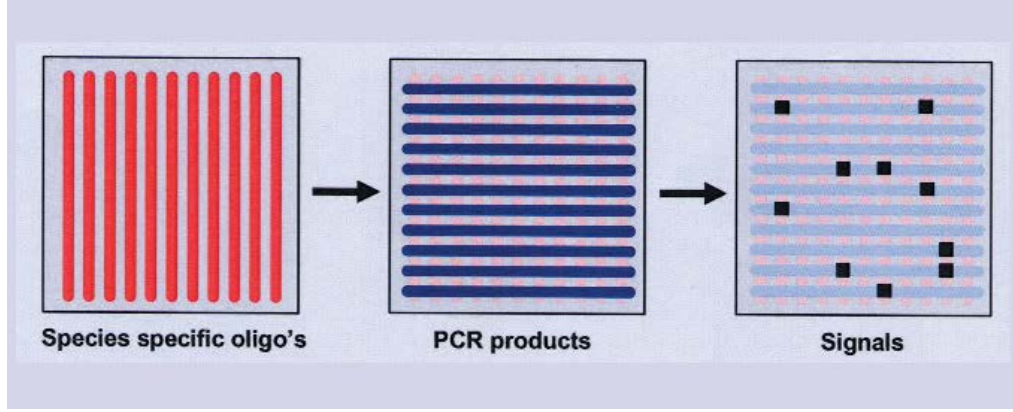
Daha önce RLB-R2 ve RLB-F2 primerleri kullanılarak yapılan *Theileria/Babesia* soy PCR'ı sonucu elde edilen PCR ürünleri steril eppendorflara 10'ar µl alınarak, 150 µl 2x SSPE-% 0.1 SDS ile sulandırılmıştır. Sulandırılan PCR ürünleri 100 °C'de 10 dk.

thermal cyclers'da denatüre edilmiştir. Denatüre edilen PCR ürünleri hiç vakit kaybetmeden buz üzerine alınmıştır. Bu arada +4 °C'de bekletilen membran çıkartılarak, 100 ml 2x SSPE - % 0.1 SDS ile oda sıcaklığında 5 dk. yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra membran daha önce uygulanan oligonükleotidlerin tersi yönünde 90° çevrilerek miniblotta yerleştirilmiştir. Membran üzerinde kalan sıvılar pipetle aspire edilmiştir. Bu arada denatüre PCR ürünleri buzdan alınarak birkaç saniye santrifüj edilmiş ve tekrar buz üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra miniblottadaki kuyucuklara sırayla PCR ürünleri yüklenmiştir. PCR ürünleri ile oligonükleotidlerin hibridizasyonu amacıyla miniblottar 42 °C'deki etüvde 1 saat inkubasyona bırakılmıştır. Oligonükleotidlerle PCR ürünlerinin hibridizasyon prensibi Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. RLB tekniğinde hibridizasyon prensibi (Türe spesifik oligonükleotidlerin C6 aminolinker ile membrana, biotinle işaretli PCR ürünlerinin türe spesifik oligonükleotidlere, peroksidaz ile işaretli streptavidinin biotine bağlanması sonucunda ECL ilavesi ile oluşan ışığın röntgen filmine aktarılması).

İnkubasyon sonunda 1 saat membran üzerindeki PCR ürünleri pipetle aspire edilmiş ve membran miniblotterdan alınarak 100 ml 2x SSPE - %0.5 SDS ile 10 dk. 50 °C’de iki kez yıkanmıştır. Daha sonra 10 ml 2x SSPE - %0.5 SDS içerisinde 2.5 µl peroksidaz ile işaretli streptavidin konjugat (Boehringer, Mannheim, Germany) konularak hazırlanan dilüsyonla membran 42 °C’de 30 dk. inkube edilmiştir. İnkubasyon sonunda konjugat dökülerek 100 ml 2x SSPE - %0.5 SDS solüsyonu ile 42 °C’de 10 dk. membran iki kez yıkanmıştır. 20 dk. sonunda membran oda sıcaklığında 100 ml 2x SSPE ile 5’er dk. iki kez yıkanmıştır. Süre sonunda 2x SSPE dökülerek membran 10 ml ECL (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) tespit sıvısında (tespit sıvısı tamamen membranın üzerini kaplayacak şekilde) 1 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda ECL tespit sıvısı membrana dikkat ederek dökülmüştür. Daha sonra membran iki asetat kağıdı arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde konarak 24x12’lik kapağı açık film kasetinin kapak kısmına yerleştirilmiştir. Röntgen odasında tamamen karanlık ortamda 1 adet Kodak Biomax Light Film (USA) paketinden çıkartılmış ve açık olan film kasetinin iç kısmına elimizin rehberliğinde yerleştirilmiştir. Sonra hem film hem de kapaktaki membran kaydırılmadan dikkatlice kaset kapatılmıştır. Sinyal yoğunluğuna göre membran filmle birlikte kaset içerisinde 30 sn. ile 10 dk. arasında bekletilmiştir. Genellikle 1 dk. süre yeterli olmakla birlikte filmde birinci banyo sonucunda sinyal zayıfsa membran yeni bir filmle birlikte tekrar kaset içerisinde bekletilerek, ikinci banyoda bekleme süresi arttırılmıştır. Röntgen banyosu sonucu film üzerinde streptavidin-biotin kompleksinin görüldüğü, oligonükleotidler ile PCR ürünlerinin hibridizasyonunun gerçekleştiği noktalarda siyah sinyaller görülmüştür. Siyah nokta şeklindeki sinyaller o parazit türü için pozitif kabul edilmiştir. Miniblotterdaki kuyucuklar aracılığı ile membrana türe spesifik oligonükleotidlerin, PCR ürünlerinin uygulanışı ve oluşan hibridizasyon sonucunda görülen pozitif sinyaller Şekil 3.2.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Membrana spesifik oligonükleotidlerin, PCR ürünlerinin uygulanma şekli ve hibridizasyon gerçekleştiğinde oluşan pozitif sinyaller

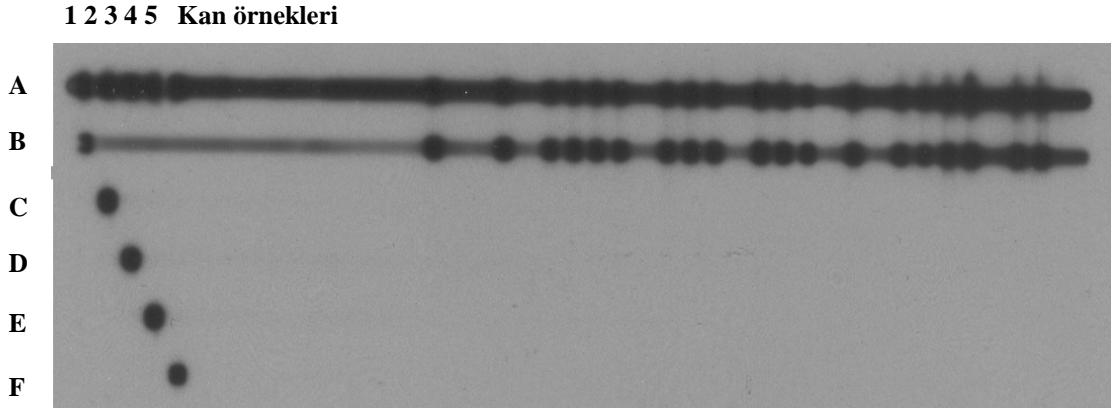
Daha sonra membranın tekrar kullanıma hazır hale getirilmesi için, membran 80 °C'de 100 ml %1 SDS ile 30 dk. 2 kez yıkanmıştır. 60 dk. sonunda membran üzerindeki oligonükleotidlere bağlanan PCR ürünleri yıkanarak, membran üzerinden arındırılmıştır. Membran oda sıcaklığında 20 mM EDTA ile 15 dk. bir kez daha yıkanmıştır. Son olarak membranın üzerini kaplayacak şekilde 20 mM EDTA eklenmiş ve membran +4 °C'de tekrar kullanım aşamasına kadar saklanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada RLB tekniği ile Aydın merkez (Osmanbükü), Aydın İline bağlı Yenipazar (Dalama), Çine (Akçaova beldesi), Söke (Akçakaya); İzmir İli'ne bağlı Tire (Başköy), Aliağa (Çıtak), Kınık (Karadere); Manisa İli'ne bağlı Alaşehir (Gürsu), Gölarmara (Sazköy) ilçelerindeki odaklarda bulunan sığırlardan alınan kan örneklerinde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı incelenmiştir. Çalışmada bu türlerin neden olduğu theileriosis ve babesiosisin yoğun olarak görüldüğu Mayıs ve Eylül ayları öncelikli olarak incelenmiştir. Bu çalışma ile *Theileria* ve *Babesia* türlerinin Aydın, İzmir ve Manisa İllerindeki mevsimsel yoğunluğu hakkında da bilgi edinilmiştir.

4.1. RLB Sonuçlarının Görüntülenmesi

RLB-F2/RLB-R2 (*Theileria/Babesia*) primerleri kullanılarak tüm kanın genomik DNA'larından elde edilen PCR ürünleri, *Theileria* ve *Babesia* türlerine spesifik problemlerin bağlandığı membranda hibridizasyona tabi tutulduğunda, prob karşılıkları ile sinyal oluşturmuşlardır (Resim 4.1.).



Resim 4.1. *Theileria* ve *Babesia* türleri ile enfekte sığır kanlarından elde edilen DNA'ların hibridizasyon sonuçları. Problar; (A) *Theileria* / *Babesia* catch all, (B) *T. annulata*, (C) *T. buffeli*, (D) *B. bigemina*, (E) *B. bovis*, (F) *B. divergens*. Kontrol DNA örnekleri (1) *T. annulata*, (2) *T. buffeli*, (3) *B. bovis*, (4) *B. bigemina*, (5) *B. divergens*.

4.2. RLB Tekniği Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Reverse line blot hibridizasyon tekniğine göre Aydın İlindeki odaklarda tespit edilen *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı Çizelge 4.1. 'de verilmiştir.

Aydın İli ve ilçelerinden toplanan toplam 3918 sığır kan örneğinin RLB tekniği ile incelenmesi sonucunda 2152 (% 54.92) sığır kan örneği *T. annulata* pozitif belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Çizelge 4.1. ve Grafik 4.5.'de görüldüğü gibi; Aydın İlinde enfeksiyonun aylara göre genel dağılımı dikkate alındığında, *T. annulata* varlığı Eylül ayında en yüksek düzeyde % 64.12 oranında gözlenmiştir. Eylül ayını Ekim (% 63.15), Kasım (% 62.9), Ocak (% 62.5) ve Haziran (% 61.02) ayları takip etmiştir. En düşük oran ise Temmuz ayında % 40.76 olarak tespit edilmiştir.

Aydın İli Yenipazar ilçesinde *T. annulata*'nın genel dağılımına bakıldığında; ilçeden alınan toplam 982 örneğin 197'si (% 20.06) pozitif olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Çizelge 4.1. ve Grafik 4.1.'de görüldüğü gibi; Yenipazar ilçesinde *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı incelendiğinde, % 42.22 oranında en yüksek Eylül ayında *T. annulata* tespit edilmiştir. Bu oranı Mayıs (% 37.93), (Ekim % 37.21), Nisan ve Haziran (% 36.66), Ocak (% 36.36), Mart (% 33.33), Şubat ve Temmuz (% 32.35) ayları takip etmiştir. Ağustos ayında ise en düşük % 2 oranında görülmüştür.

Aydın İli Çine ilçesi Akçaova beldesinde çalışma süresince toplam 774 sığır kan örneği alınmış ve 692'si (% 89.40) *T. annulata* pozitif saptanmıştır (Çizelge 4.1). Çine ilçesi % 89.40 oranı ile *T. annulata* enfeksiyonunun en yaygın görüldüğü ilçe olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.1. ve Grafik 4.2.'de görüldüğü gibi; Aydın İli Çine ilçesinde Mayıs, Haziran ve Eylül aylarında alınan örneklerin tamamında (% 100) *T. annulata* tespit edilmiştir. Diğer aylardaki *T. annulata* oranlarına bakıldığında; % 96.87 Şubat, % 96 Aralık, % 95.65 Nisan, % 93.93 Mart ve % 92.5 Ekim ayında görülmüştür.

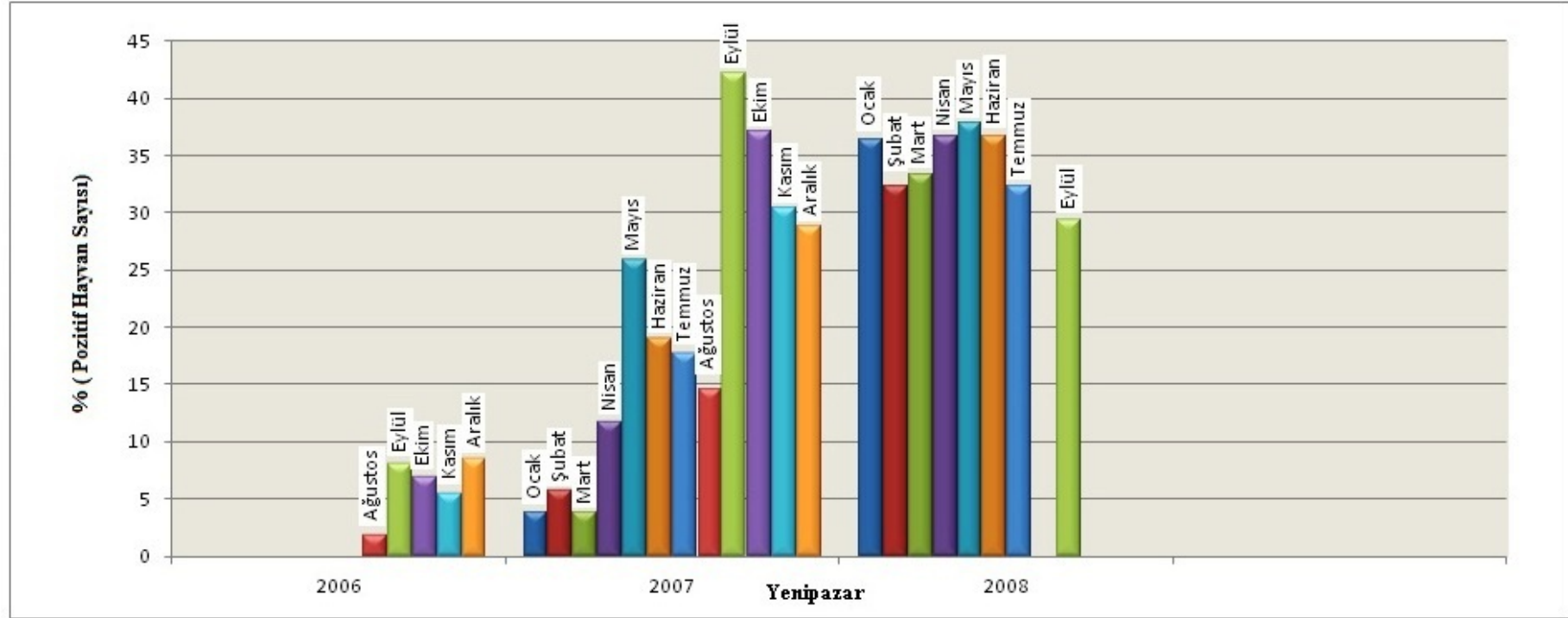
Aydın İli Söke ilçesinde toplamda 1071 sığır kan örneği alınmış ve bu örneklerin 652'si (% 60.87) *T. annulata* pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.1) Çizelge 4.1. ve Grafik 4.3.'de görüldüğü gibi; Aydın İli Söke ilçesinde *T. annulata* en yüksek % 93.10 oranı ile Ocak ayında tespit edilmiştir. Bu oranı Kasım % 91.66, Aralık % 90, Ekim % 88.23, Şubat % 68.88, Ağustos % 68 ve Mart % 67.56 takip etmiştir.

Aydın'ın merkez ilçesi Osmanbükü'nde toplam 1055 sığır kan örneğinden 611'inde (% 57.91) *T. annulata* enfeksiyonu saptanmıştır (Çizelge 4.1). Çizelge 4.1. ve Grafik 4.4.'de görüldüğü gibi; *T. annulata*'nın aylara göre dağılımına bakıldığında, Osmanbükü'nde Eylül ayında % 85.71 ile en yüksek *T. annulata* oranı görülmüştür. Bu oranı % 75.86 Temmuz, % 71.42 Kasım, % 69.38 Ekim, % 65.30 Ağustos ve % 64.70 Haziran ayı takip etmiştir.

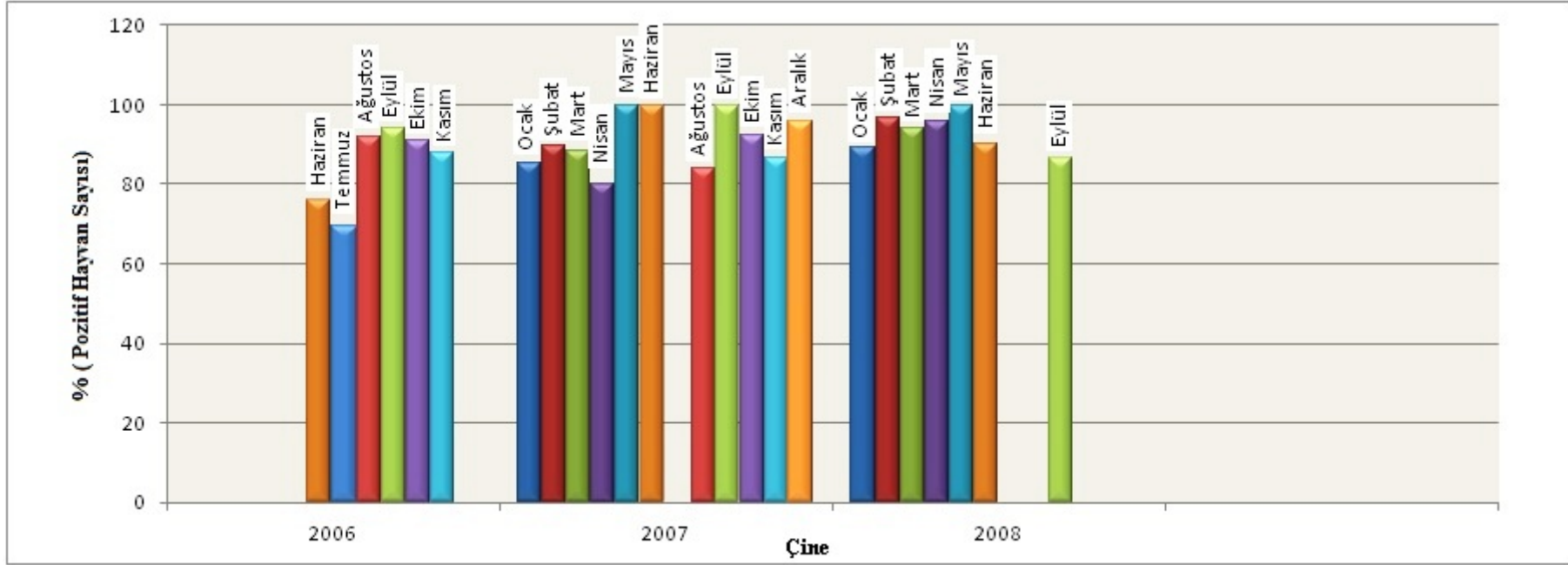
Çizelge 4.1. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Aydın İlindeki odaklarda *Theileria annulata*'nın aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Yenipazar			Çine			Söke			Osmanbükü			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	b	%
2006	Haziran	40	0	0	46	35	76,08	x	x	x	46	22	47,82	132	57	43,18
	Temmuz	48	0	0	33	23	69,69	x	x	x	49	30	61,22	130	53	40,76
	Ağustos	50	1	2	25	23	92	50	34	68	49	32	65,30	174	90	51,72
	Eylül	49	4	8,16	52	49	94,23	61	35	57,37	48	31	64,58	210	119	56,66
	Ekim	43	3	6,98	45	41	91,11	34	30	88,23	49	34	69,38	171	108	63,15
	Kasım	36	2	5,56	41	36	87,80	24	22	91,66	42	30	71,42	143	90	62,93
	Aralık	23	2	8,69	x	x	x	30	27	90	54	34	62,96	107	63	58,87
2007	Ocak	25	1	4	41	35	85,36	29	27	93,10	41	22	53,65	136	85	62,5
	Şubat	34	2	5,88	39	35	89,74	45	31	68,88	39	20	51,28	157	88	56,05
	Mart	25	2	4	34	30	88,23	37	25	67,56	30	16	53,33	126	73	57,93
	Nisan	17	2	11,77	25	20	80	51	27	52,94	38	20	52,63	131	69	52,67
	Mayıs	27	7	25,93	29	29	100	54	29	53,70	39	21	53,84	149	86	57,71
	Haziran	42	8	19,05	16	16	100	57	33	57,89	39	21	53,84	154	78	50,64
	Temmuz	45	8	17,78	x	x	x	59	36	61,01	39	22	56,41	143	66	46,15
	Ağustos	48	7	14,58	31	26	83,87	61	38	62,29	39	22	56,41	179	93	51,95
	Eylül	45	19	42,22	4	4	100	51	33	64,70	39	22	56,41	139	78	56,11
	Ekim	43	16	37,21	40	37	92,5	51	33	64,70	37	22	59,45	171	108	63,15
	Kasım	46	14	30,43	30	26	86,66	58	31	53,44	42	22	52,38	176	93	52,84
	Aralık	45	13	28,89	25	24	96	49	27	55,10	38	20	52,63	157	84	53,50
2008	Ocak	33	12	36,36	38	34	89,47	29	9	31,03	37	18	48,64	137	73	53,28
	Şubat	34	11	32,35	32	31	96,87	33	21	63,63	37	18	48,64	136	81	59,55
	Mart	27	9	33,33	33	31	93,93	36	15	41,66	29	13	44,82	125	68	54,4
	Nisan	30	11	36,66	23	22	95,65	30	11	36,66	29	13	44,82	111	57	51,35
	Mayıs	29	11	37,93	31	31	100	25	10	40	35	18	51,42	120	70	58,33
	Haziran	30	11	36,66	31	28	90,32	41	22	53,65	34	22	64,70	136	83	61,02
	Temmuz	34	11	32,35	x	x	x	37	22	59,45	29	22	75,86	100	55	55
	Ağustos	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Eylül	34	10	29,41	30	26	86,66	39	24	61,53	28	24	85,71	131	84	64,12
	Toplam	982	197	20,06	774	692	89,40	1071	652	60,87	1055	611	57,91	3918	2152	54,92

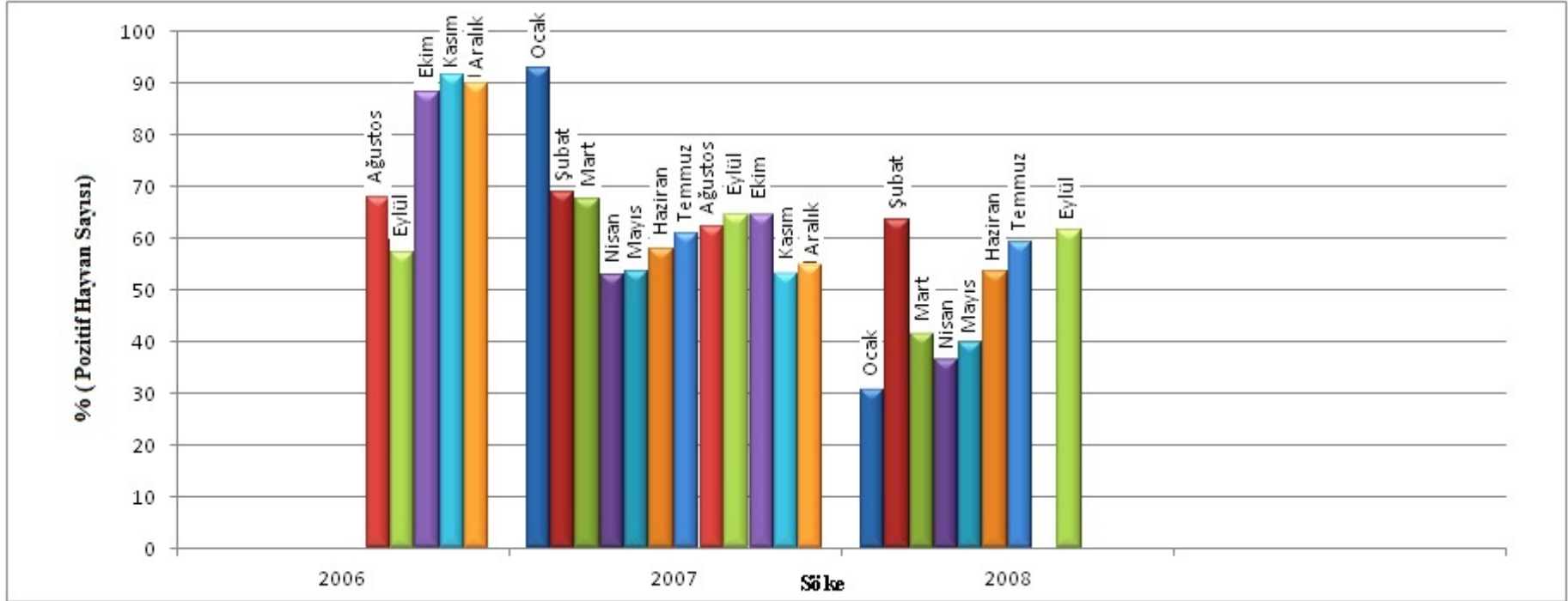
a: Odaklardan toplanan örnek sayısı b: RLB tekniği sonucu belirlenen enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınamamıştır



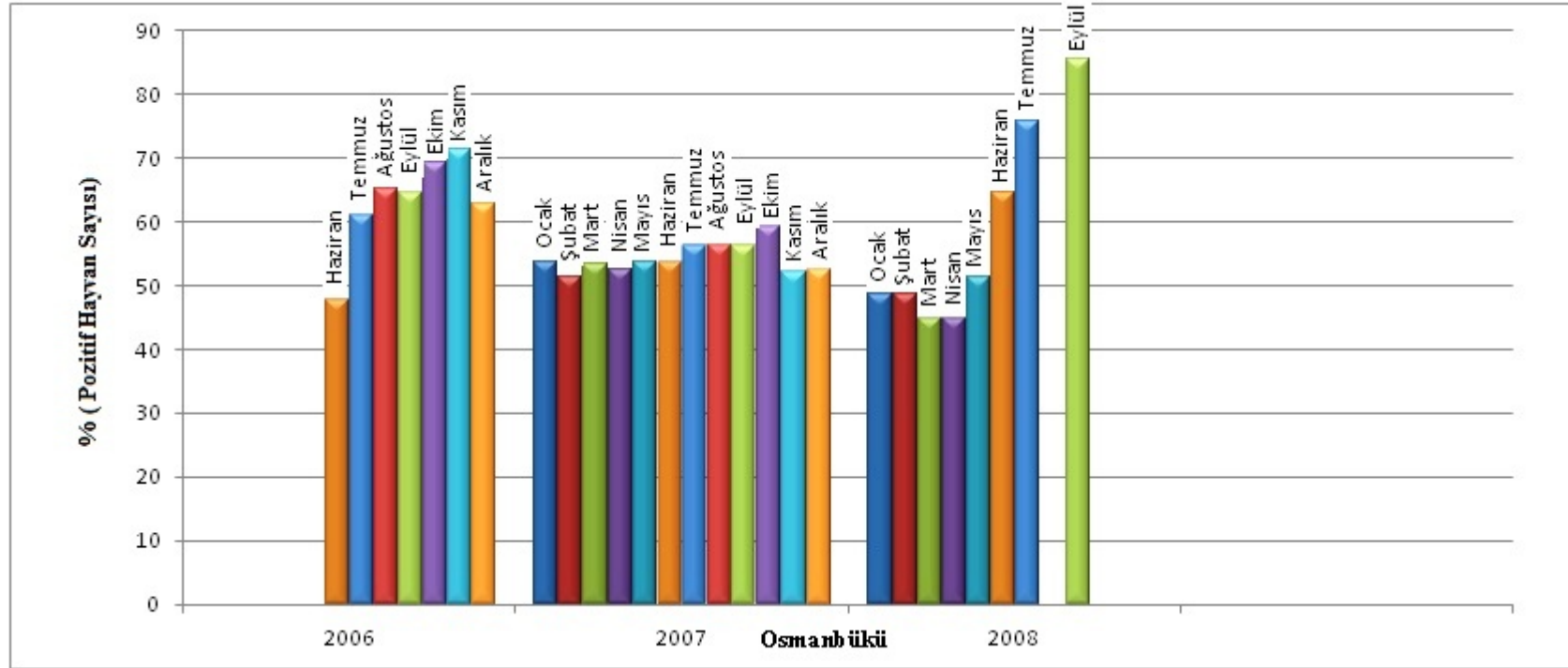
Grafik 4.1. Aydın İli Yenipazar ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



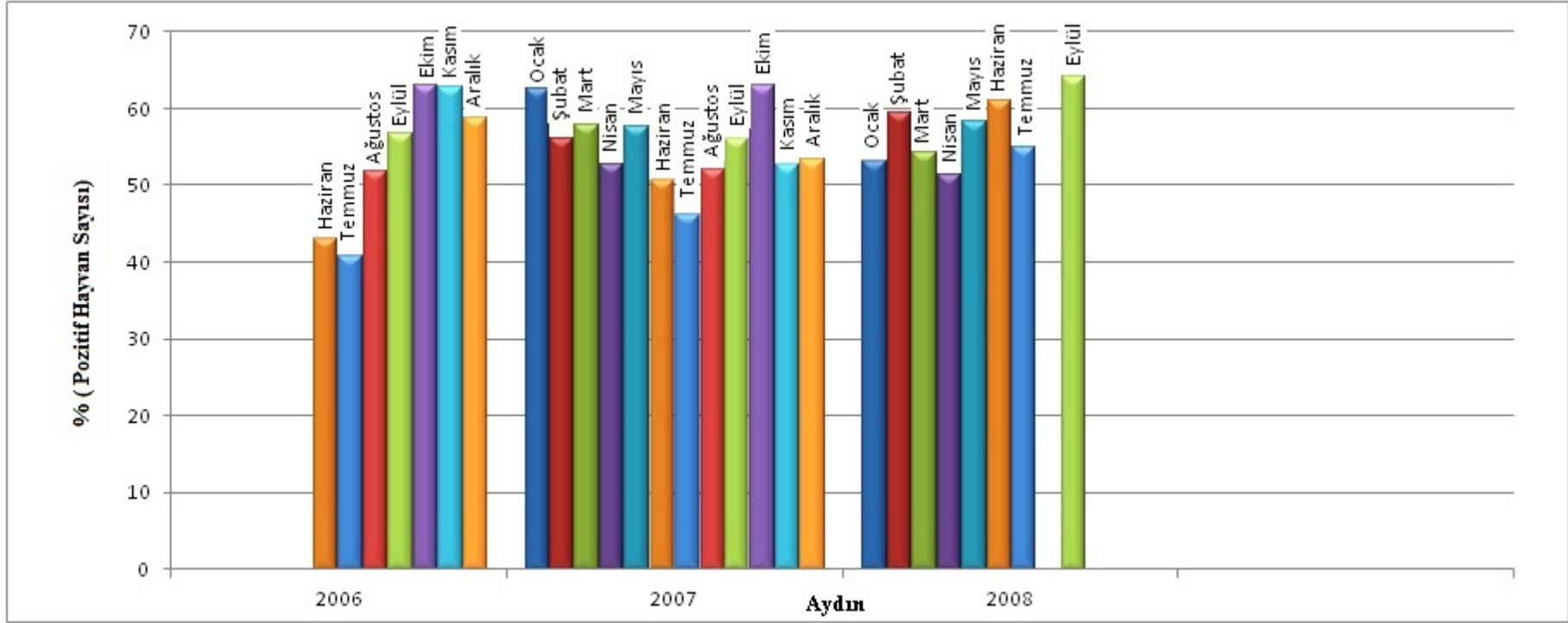
Grafik 4.2. Aydın İli Çine ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



Grafik 4.3. Aydın İli Söke ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



Grafik 4.4. Aydın İli merkez ilçesi Osmanbükü'nde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



Grafik 4.5. Aydın İli genelinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı

İzmir İlindeki odaklardan alınan örneklerin RLB tekniği ile incelenmesi sonucunda belirlenen *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

İzmir İli ve ilçelerinde *T. annulata*'nın toplam dağılımı incelendiğinde 2644 adet sığır kan örneğinden 619'u (% 23.41) RLB tekniği ile *T. annulata* pozitif olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.) Çizelge 4.2. ve Grafik 4.9.'da görüldüğü gibi; İzmir İlinde enfeksiyonun aylara göre genel dağılımı dikkate alındığında, *T. annulata* enfeksiyonunun oranı Eylül ayında en yüksek düzeyde (% 36.95) saptanmıştır. Temmuz ve Nisan aylarında % 34.84, Ekim'de % 34.34, Mart'ta % 34.11, Aralık'da % 32.55 oranında tespit edilmiştir. En düşük oran Haziran ayı'nda (% 3.26) görülmüştür.

İzmir İli Tire ilçesinde theileriosisin genel dağılımına bakıldığında, toplam 1133 sığır kan örneğinin 253'ü (% 22.33) *T. annulata* pozitif görülmüştür (Çizelge 4.2). Çizelge 4.2. ve Grafik 4.6.'da görüldüğü gibi; Tire ilçesinde *T. annulata* en yüksek Eylül ayında (% 55.55) tespit edilmiştir. Diğer aylardaki *T. annulata* oranı sırası ile; % 46.93 Aralık, % 46.66 Ekim ve Mart, % 43.75 Temmuz, % 43.18 Ocak, % 42.30 Eylül, % 41.37 Nisan ve % 41.17 Haziran ayında görülmüştür.

İzmir İli Aliğa ilçesinde çalışma süresince alınan toplam 939 sığır kan örneğinden 149'unda (% 15.86) *T. annulata* enfeksiyonu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Çizelge 4.2. ve Grafik 4.7.'de görüldüğü gibi; Aliğa ilçesinde *T. annulata* % 39.35 oranı ile Eylül ayında en yüksek oranda görülmüştür. Bu oranı % 35.29 Mayıs, % 30 Haziran, % 24.32 Temmuz, % 22.72 Nisan, % 20 Mart, % 19.35 Nisan, % 18.75 Ekim, Kasım ve Ocak ayları takip etmiştir.

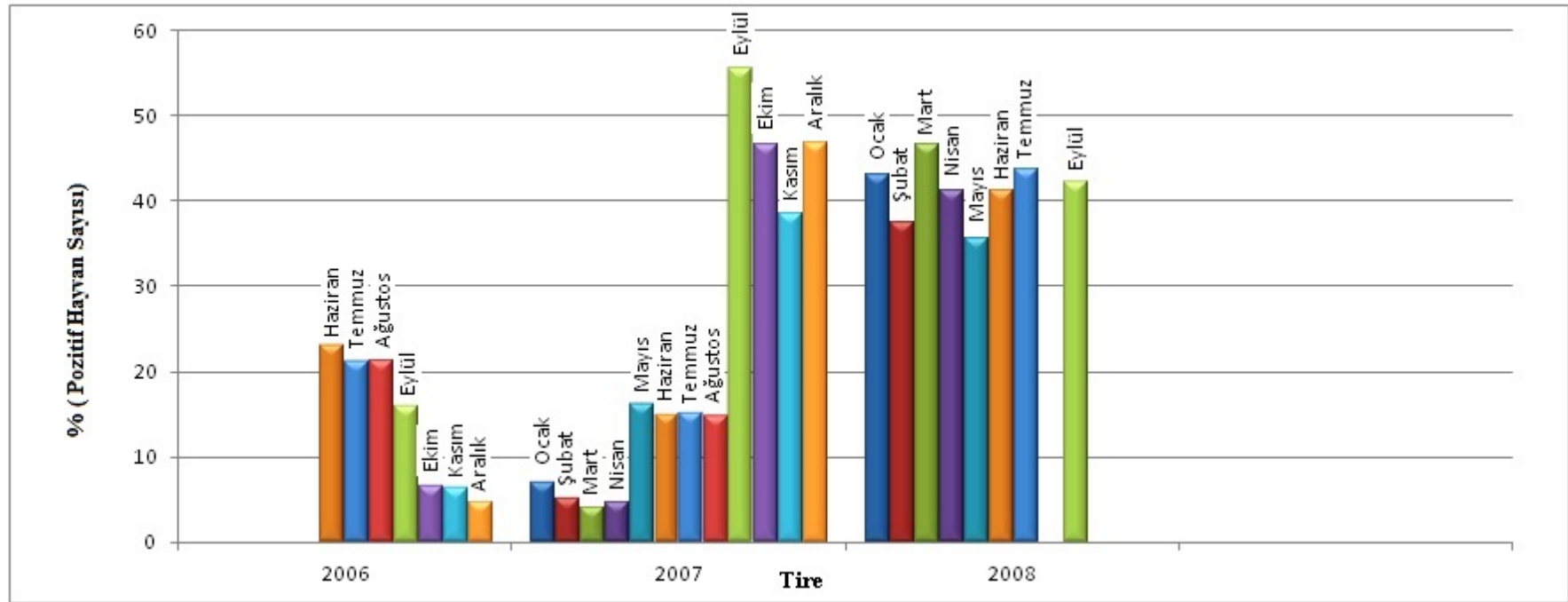
İzmir İli Kınık ilçesinde enfeksiyonun genel dağılımına bakıldığında 572 sığır kan örneğinden, 217'si (% 37.93) *T. annulata* pozitif saptanmıştır (Çizelge 4.2). Çizelge 4.2. ve Grafik 4.8.'de görüldüğü gibi; Kınık ilçesinde diğer aylara göre en yüksek Mayıs ayında (% 56.25) *T. annulata* görülmüştür. Takiben % 53.84 Mart, % 50 Ağustos, % 45.45 Temmuz, % 42.42 Şubat, % 42.10 Haziran, % 41.17 Ekim, % 40 Nisan ve % 38.88 Ocak ayında tespit edilmiştir.

Ayrıca İzmir İli Tire ilçesinde 2006 yılı Eylül ayında 1 örnekte *T. annulata* enfeksiyonu ile birlikte *B. bovis* enfeksiyonu miks olarak tespit edilmiştir. 2007 yılı Eylül ayında ise aynı ilçede 1 örnekte *T. annulata* ile *T. buffeli* miks enfeksiyonu görülmüştür.

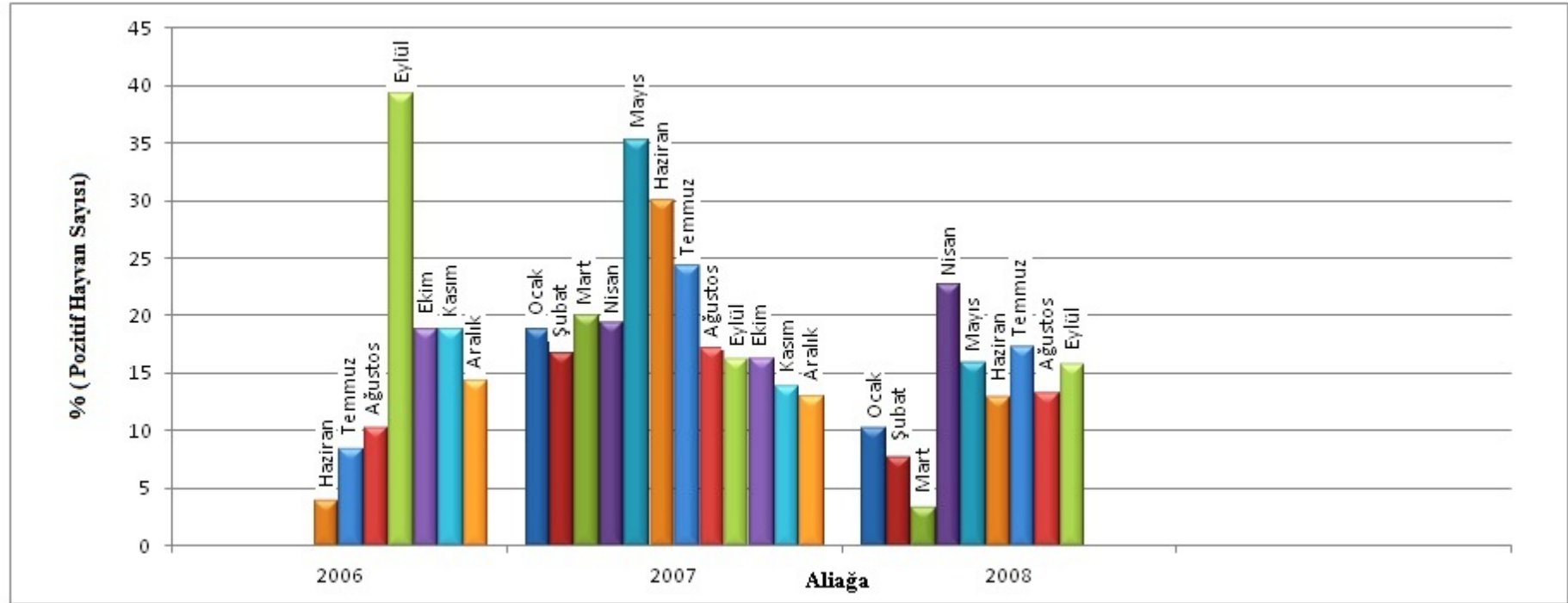
Çizelge 4.2. Reverse line blot tekniği sonucuna göre İzmir İlindeki odaklarda *Theileria annulata*'nın aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Tire			Aliğa			Kımk			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	b	%
2006	Haziran	43	1	23,25	49	2	4,08	x	x	x	92	3	3,26
	Temmuz	47	1	21,27	47	4	8,51	x	x	x	94	5	5,3
	Ağustos	47	1	21,27	39	4	10,25	x	x	x	86	5	5,8
	Eylül	50	8	16	31	6	39,35	24	8	33,33	105	22	20,95
	Ekim	44	3	6,81	32	6	18,75	26	9	34,61	102	18	17,64
	Kasım	31	2	6,45	32	6	18,75	28	10	35,71	91	18	19,78
	Aralık	42	2	4,76	28	4	14,28	37	14	37,83	107	20	18,69
2007	Ocak	42	3	7,14	32	6	18,75	38	14	36,84	112	23	20,53
	Şubat	56	3	5,35	30	5	16,66	40	13	32,5	126	21	16,66
	Mart	48	2	4,16	30	6	20	37	12	32,43	115	20	17,39
	Nisan	42	2	4,76	31	6	19,35	25	9	36	98	17	17,34
	Mayıs	49	8	16,32	34	12	35,29	16	9	56,25	99	29	29,29
	Haziran	53	8	15,09	40	12	30	19	8	42,10	112	28	25
	Temmuz	46	7	15,21	37	9	24,32	13	2	15,38	96	18	18,75
	Ağustos	47	7	14,89	35	6	17,14	11	4	36,36	93	17	18,27
	Eylül	45	25	55,55	37	6	16,21	10	3	30	92	34	36,95
	Ekim	45	21	46,66	37	6	16,21	17	7	41,17	99	34	34,34
Kasım	44	17	38,63	43	6	13,95	29	10	34,48	116	33	28,44	
Aralık	49	23	46,93	46	6	13,04	34	13	38,23	129	42	32,55	
2008	Ocak	44	19	43,18	39	4	10,25	36	14	38,88	119	37	31,09
	Şubat	40	15	37,5	39	3	7,69	33	14	42,42	112	32	28,57
	Mart	30	14	46,66	29	1	3,44	26	14	53,84	85	29	34,11
	Nisan	29	12	41,37	22	5	22,72	15	6	40	66	23	34,84
	Mayıs	28	10	35,71	25	4	16	17	7	41,17	70	21	30
	Haziran	34	14	41,17	23	3	13,04	16	6	37,5	73	23	31,50
	Temmuz	32	14	43,75	23	4	17,39	11	5	45,45	66	23	34,84
	Ağustos	x	x	x	30	4	13,33	6	3	50	36	7	19,44
Eylül	26	11	42,30	19	3	15,78	8	3	37,5	53	17	32,07	
	Toplam	1133	253	22,33	939	149	15,86	572	217	37,93	2644	619	23,41

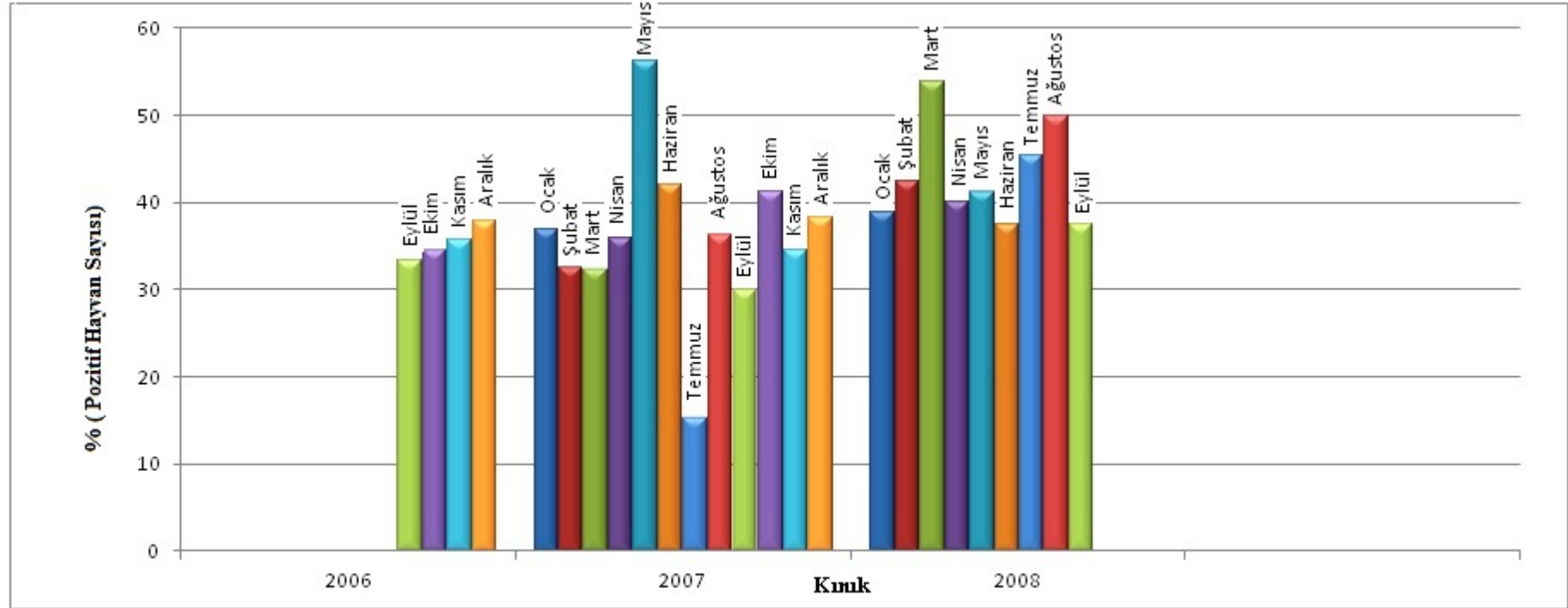
a: Odaklardan toplanan örnek sayısı b: RLB tekniği sonucu belirlenen enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alın



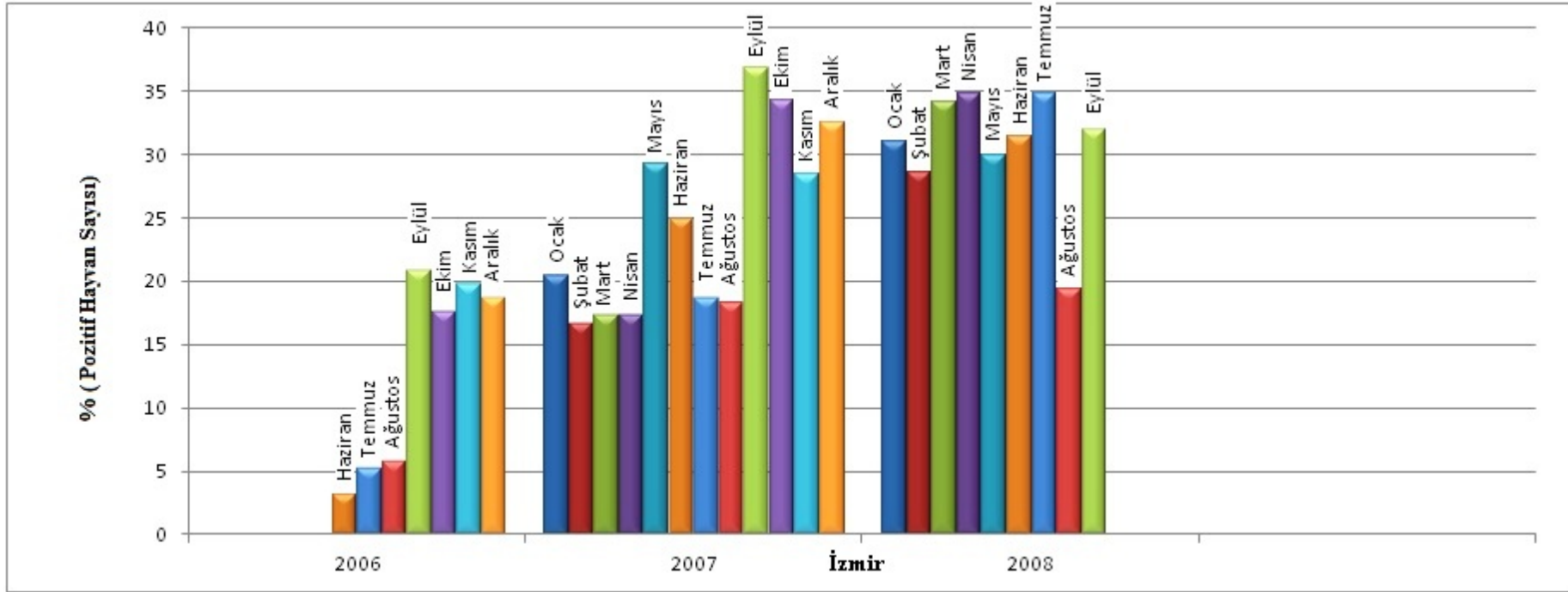
Grafik 4.6. İzmir İli Tire ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



Grafik 4.7. İzmir İli Aliğa ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



Grafik 4.8. İzmir İli Kınık ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



Grafik 4.9. İzmir İli genelinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı

Reverse line blot tekniği sonucuna göre, Manisa İlindeki odaklarda tespit edilen *T. annulata*'nın aylara göre dağılımları Çizelge 4.3. 'de verilmiştir.

Manisa İli ve ilçelerinde toplam *T. annulata* dağılımları incelendiğinde, RLB tekniği ile 2260 sığır kan örneğinden 1088'i (% 48.14) *T. annulata* pozitif olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Çizelge 4.3. ve Grafik 4.12.'de görüldüğü gibi; Manisa İli genelinde enfeksiyonun aylara göre genel dağılımlarına bakıldığında *T. annulata* en yüksek % 68.75 Mayıs ayında görülmüştür. Bu oranı % 58.41 ile Eylül ayı takip etmiştir. Diğer aylarda *T. annulata* varlığı % 58.06 Temmuz, % 57.77 Şubat, % 57.28 Ağustos, % 57,14 Mart, Nisan, % 55.78 Ocak, % 55.20 Ekim, % 54.44 Kasım olarak saptanmıştır En düşük oran ise Haziran ayında (% 28.57) tespit edilmiştir.

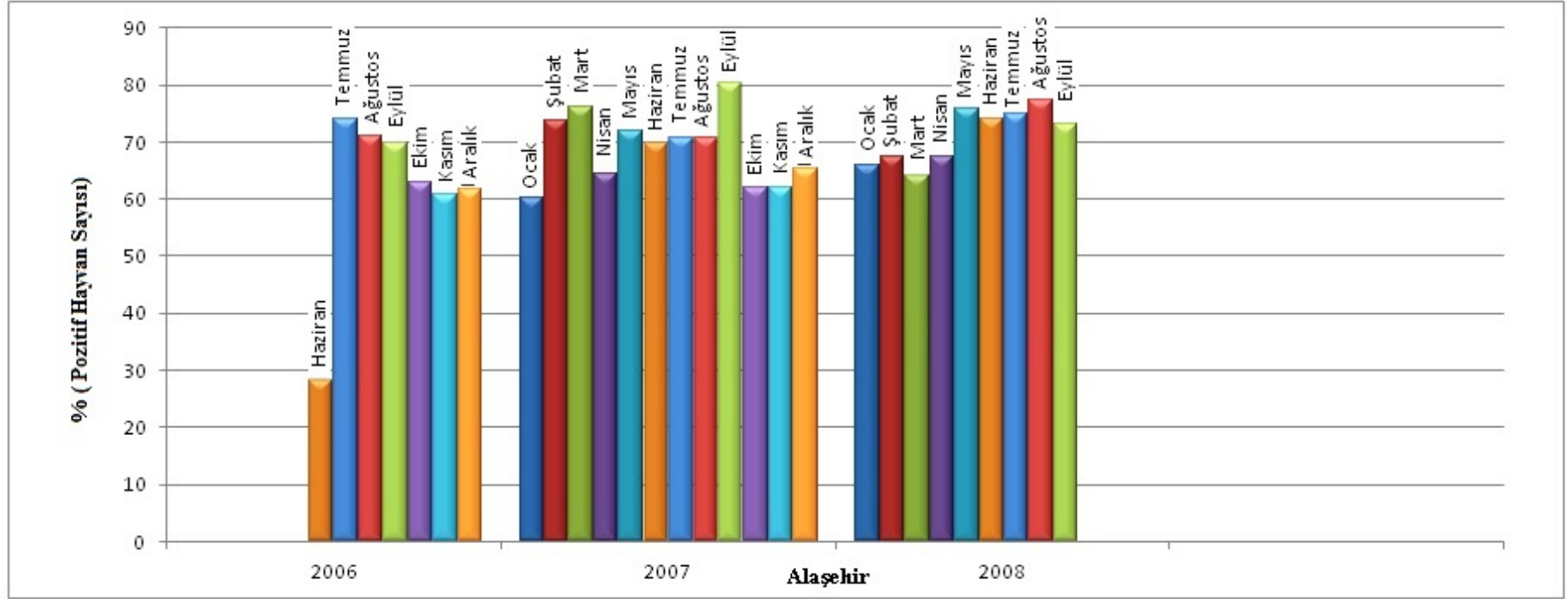
Manisa İli Alaşehir ilçesinde theileriosisin genel dağılımlarına bakıldığında; toplam alınan 1185 sığır kan örneğinden 794'ünde (% 67) *T. annulata* enfeksiyonu saptanmıştır (Çizelge 4.3). Çizelge 4.3. ve Grafik 4.10.'da görüldüğü gibi; Manisa İli Alaşehir ilçesinde *T. annulata* diğer aylara göre en yüksek (% 80.48) Eylül ayında görülmüştür. Diğer aylara bakıldığında % 77.41 Ağustos, % 76.31 Mart, % 75.86 Mayıs, % 75 Temmuz, % 74.19 Haziran, % 73.68 Şubat aylarında tespit edilmiştir.

Manisa İli Gölmarmara ilçesinden alınan toplam 1075 adet sığır kan örneğinden 294' (% 27.34) RLB tekniği sonucu *T. annulata* pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.3). Çizelge 4.3. ve Grafik 4.11.'de görüldüğü gibi; Manisa İli Gölmarmara ilçesinde ise *T. annulata* Mayıs ayında % 64.86 oranında saptanmıştır. Takiben Ocak ayında % 51.06, Nisan ayında % 50, Temmuz ayında % 48.07, Ekim ayında % 48, Kasım ayında % 47.72, Eylül ayında % 47.05, Şubat ayında % 46.15, Haziran ayında % 44.44, Mart ayında % 43.39 ve Ağustos ayında % 43.13 *T. annulata* tespit edilmiştir.

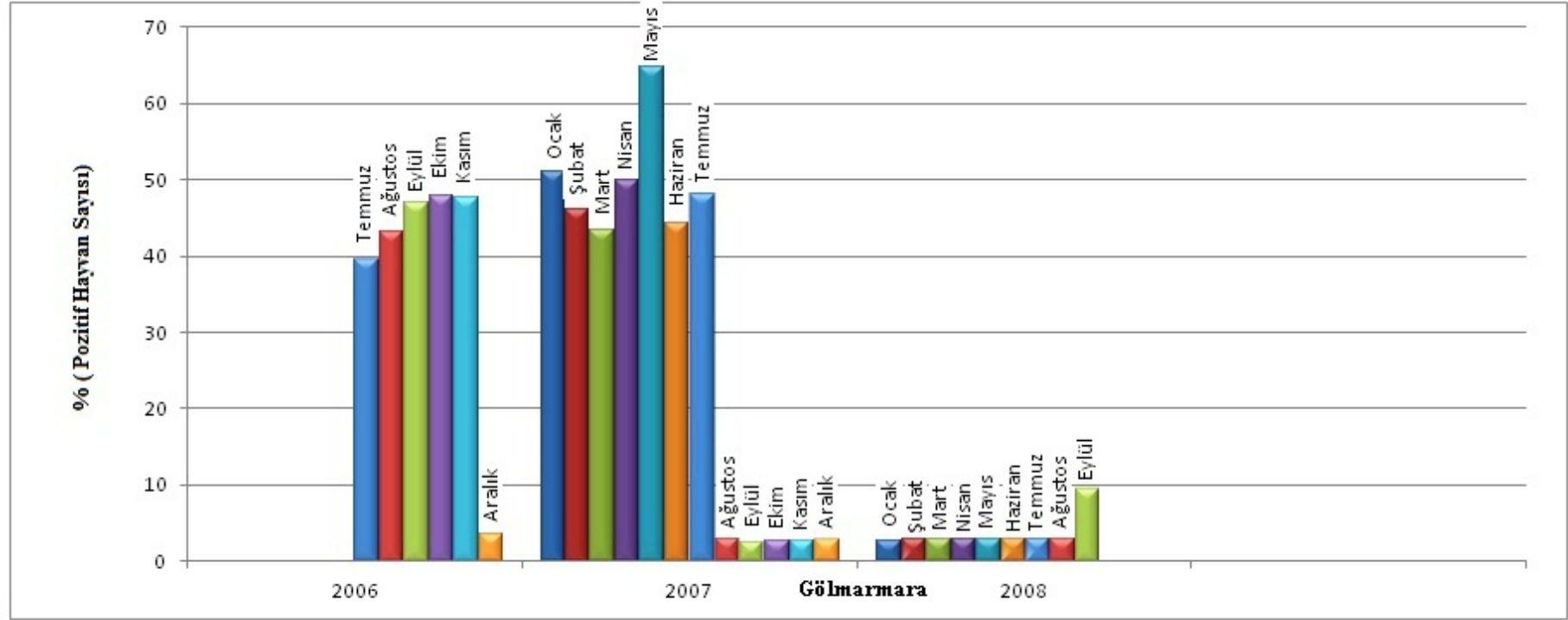
Çizelge 4.3. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Manisa İlindeki odaklarda *Theileria annulata*'nın aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Alaşehir			Gölmarmara			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%
2006	Haziran	49	14	28,57	x	x	x	49	14	28,57
	Temmuz	50	37	74	48	19	39,58	98	56	57,14
	Ağustos	52	37	71,15	51	22	43,13	103	59	57,28
	Eylül	50	35	70	51	24	47,05	101	59	58,41
	Ekim	46	29	63,04	50	24	48	96	53	55,20
	Kasım	46	28	60,86	44	21	47,72	90	49	54,44
	Aralık	47	29	61,70	28	1	3,57	75	30	40
2007	Ocak	48	29	60,41	47	24	51,06	95	53	55,78
	Şubat	38	28	73,68	52	24	46,15	90	52	57,77
	Mart	38	29	76,31	53	23	43,39	91	52	57,14
	Nisan	45	29	64,44	46	23	50	91	52	57,14
	Mayıs	43	31	72,09	37	24	64,86	80	55	68,75
	Haziran	40	28	70	54	24	44,44	94	52	55,31
	Temmuz	41	29	70,73	52	25	48,07	93	54	58,06
	Ağustos	41	29	70,73	31	1	3,22	72	30	41,66
	Eylül	41	33	80,48	37	1	2,70	78	34	43,58
	Ekim	50	31	62	35	1	2,85	85	32	37,64
	Kasım	50	31	62	35	1	2,85	85	32	37,64
Aralık	49	32	65,30	35	1	2,85	84	33	39,28	
2008	Ocak	47	31	65,95	34	1	2,94	81	32	39,50
	Şubat	46	31	67,39	33	1	3,03	79	32	40,50
	Mart	42	27	64,28	33	1	3,03	75	28	37,33
	Nisan	37	25	67,56	31	1	3,22	68	26	38,23
	Mayıs	29	22	75,86	31	1	3,22	60	23	38,33
	Haziran	31	23	74,19	32	1	3,12	63	24	38,09
	Temmuz	32	24	75	32	1	3,12	64	25	39,06
	Ağustos	31	24	77,41	32	1	3,12	63	25	39,68
	Eylül	26	19	73,07	31	3	9,67	57	22	38,59
	Toplam	1185	794	67,00	1075	294	27,34	2260	1088	48,14

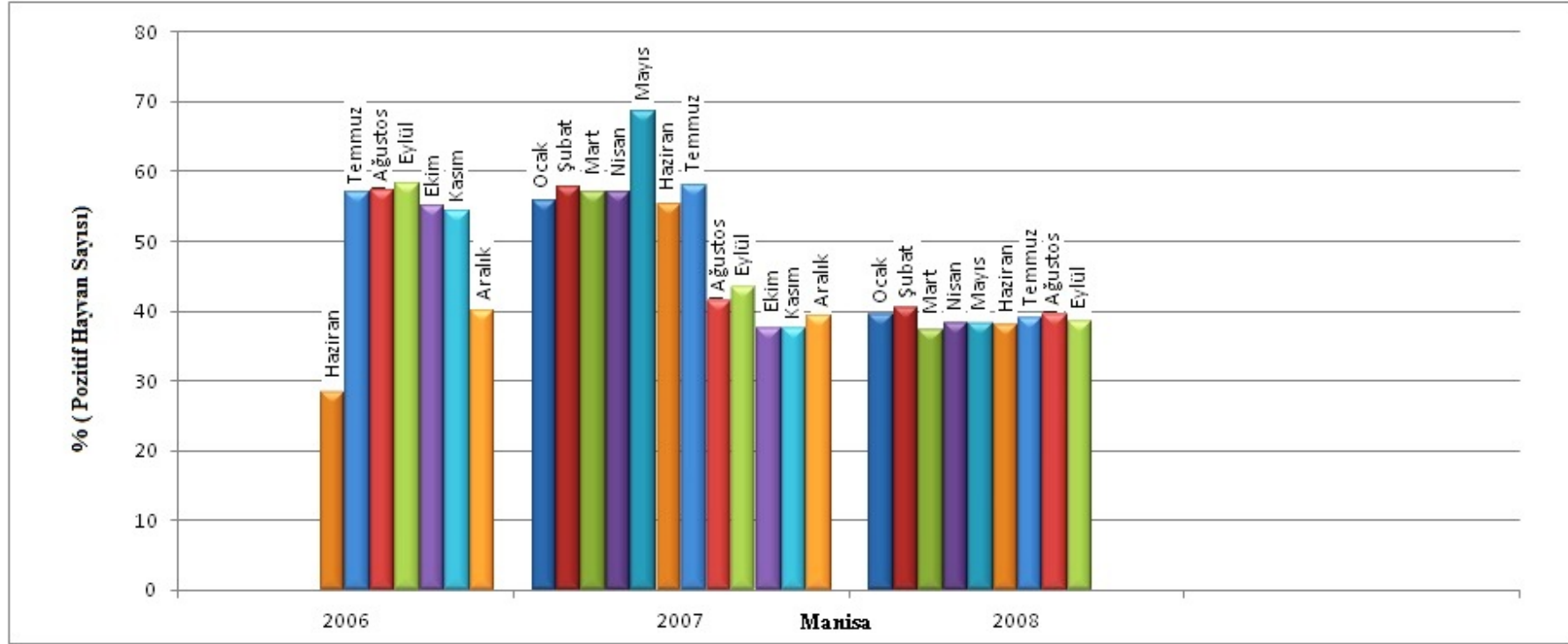
a: RLB Tekniği uygulanarak bakılan örnek sayısı b: Enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınamamıştır.



Grafik 4.10. Manisa İli Alaşehir ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



Grafik 4.11. Manisa İli Gölçarmara ilçesinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı



Grafik 4.12. Manisa İli genelinde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında *T. annulata*'nın aylara göre dağılımı

Aydın, İzmir ve Manisa İleri genelinde toplamda alınan kan örnekleri içerisinde *T. annulata*'nın 2006, 2007 ve 2008 yıllarında aylara göre dağılımı Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Çizelge 4.4.'de görüldüğü gibi; Aydın İlinde toplam % 54.92, İzmir İlinde % 23.41 ve Manisa ilinde % 48.14 oranında *T. annulata* pozitif örnek saptanmıştır. Bu sonuçlara göre Aydın İlinde yüksek oranda *T. annulata* enfeksiyonu görülürken; İzmir İlinde ise daha düşük oranda rastlanmıştır.

Aydın, İzmir ve Manisa İleri genelinde 2006 yılı *T. annulata*'nın aylara göre dağılımının karşılaştırılması Grafik 4.13.'de verilmiştir. Çizelge 4.4. ve Grafik 4.13.'e göre, Aydın İlinde 2006 yılında en yüksek *T. annulata* oranı % 63.15 ile Ekim ayında; İzmir İlinde % 20.95 oranı ile Eylül ayında; Manisa İlinde % 58.41 oranı ile Eylül ayında saptanmıştır.

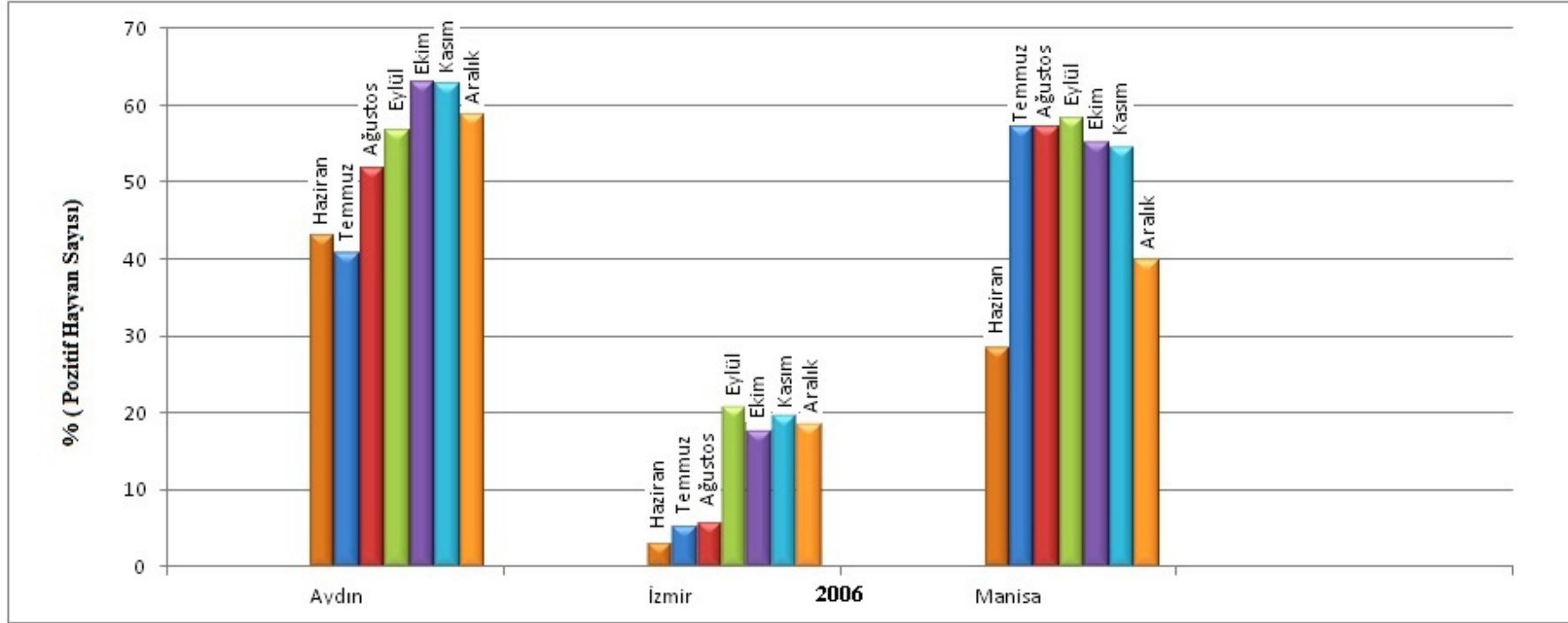
2007 yılında Aydın, İzmir ve Manisa İleri genelinde *T. annulata*'nın aylara göre dağılımının karşılaştırılması Grafik 4.14.'de verilmiştir. Çizelge 4.4. ve Grafik 4.14.'e göre, Aydın İlinde 2007 yılında *T. annulata* oranı en yüksek % 63.15 ile Ekim ayında; İzmir İlinde % 36.95 oranı ile Eylül ayında; Manisa İlinde ise % 68.75 oranı ile Mayıs ayında tespit edilmiştir.

T. annulata'nın 2008 yılında Aydın, İzmir ve Manisa İleri genelinde aylara göre dağılımı Grafik 4.15.'de karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.4. ve Grafik 4.15.'e göre, Aydın İlinde 2008 yılında *T. annulata* en yüksek % 64.12 ile Eylül ayında; İzmir İlinde % 34.84 oranı ile Nisan ve Temmuz aylarında; Manisa İlinde % 40.50 oranı ile Şubat ayında görülmüştür.

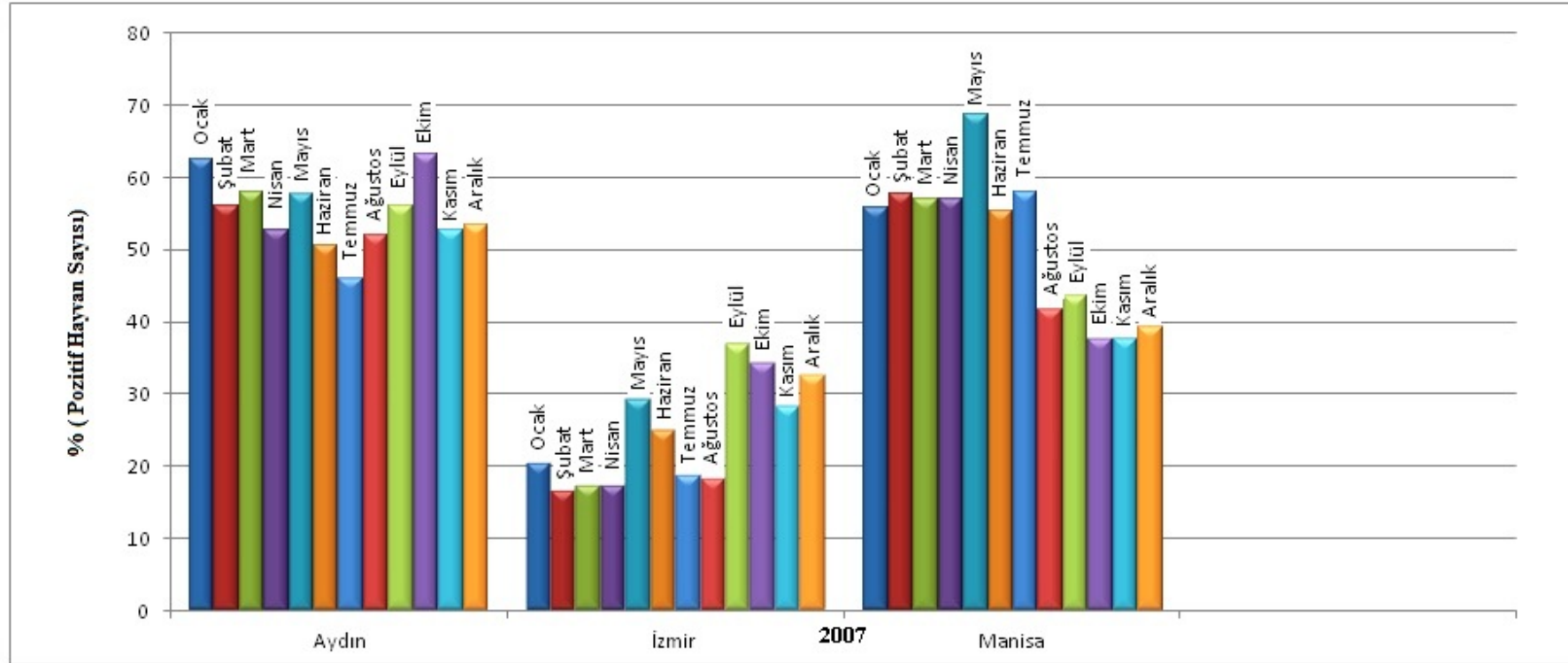
Çizelge 4.4. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Aydın, İzmir ve Manisa illeri genelinde *Theileria annulata*'nın aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Aydın			İzmir			Manisa		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%
2006	Haziran	132	57	43,18	92	3	3,26	49	14	28,57
	Temmuz	130	53	40,76	94	5	5,3	98	56	57,14
	Ağustos	174	90	51,72	86	5	5,8	103	59	57,28
	Eylül	210	119	56,66	105	22	20,95	101	59	58,41
	Ekim	171	108	63,15	102	18	17,64	96	53	55,20
	Kasım	143	90	62,93	91	18	19,78	90	49	54,44
	Aralık	107	63	58,87	107	20	18,69	75	30	40
2007	Ocak	136	85	62,5	112	23	20,53	95	53	55,78
	Şubat	157	88	56,05	126	21	16,66	90	52	57,77
	Mart	126	73	57,93	115	20	17,39	91	52	57,14
	Nisan	131	69	52,67	98	17	17,34	91	52	57,14
	Mayıs	149	86	57,71	99	29	29,29	80	55	68,75
	Haziran	154	78	50,64	112	28	25	94	52	55,31
	Temmuz	143	66	46,15	96	18	18,75	93	54	58,06
	Ağustos	179	93	51,95	93	17	18,27	72	30	41,66
	Eylül	139	78	56,11	92	34	36,95	78	34	43,58
	Ekim	171	108	63,15	99	34	34,34	85	32	37,64
	Kasım	176	93	52,84	116	33	28,44	85	32	37,64
Aralık	157	84	53,50	129	42	32,55	84	33	39,28	
2008	Ocak	137	73	53,28	119	37	31,09	81	32	39,50
	Şubat	136	81	59,55	112	32	28,57	79	32	40,50
	Mart	125	68	54,4	85	29	34,11	75	28	37,33
	Nisan	111	57	51,35	66	23	34,84	68	26	38,23
	Mayıs	120	70	58,33	70	21	30	60	23	38,33
	Haziran	136	83	61,02	73	23	31,50	63	24	38,09
	Temmuz	100	55	55	66	23	34,84	64	25	39,06
	Ağustos	x	x	x	36	7	19,44	63	25	39,68
	Eylül	131	84	64,12	53	17	32,07	57	22	38,59
	Toplam	3918	2152	54,92	2644	619	23,41	2260	1088	48,14

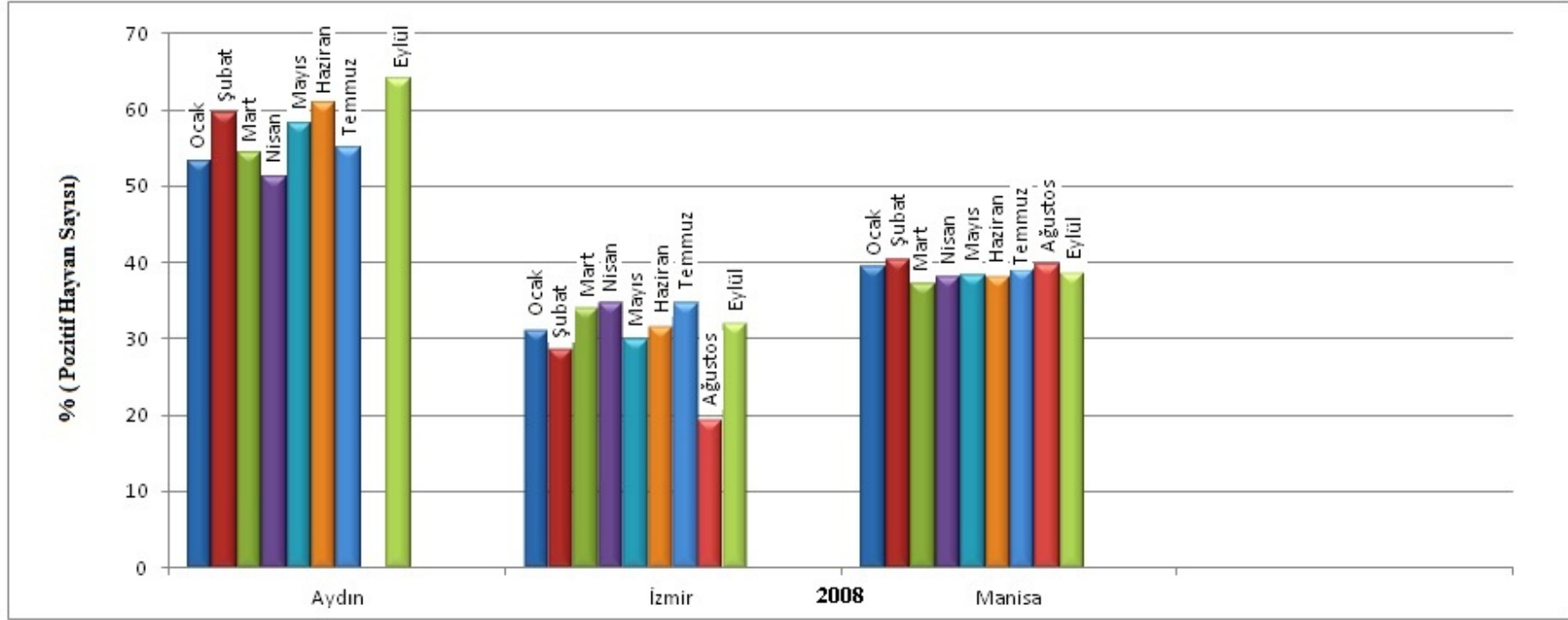
a: RLB Tekniği uygulanarak bakılan örnek sayısı b: Enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınmamıştır



Grafik 4.13. Aydın, İzmir ve Manisa İlleri genelinde 2006 yılı *T. annulata*'nın aylara göre dağılımının karşılaştırılması



Grafik 4.14. Aydın, İzmir ve Manisa İlleri genelinde 2007 yılı *T. annulata*'nın aylara göre dağılımının karşılaştırılması



Grafik 4.15. Aydın, İzmir ve Manisa illeri genelinde 2008 yılı *T. annulata*'nın aylara göre dağılımının karşılaştırılması

Reverse line blot tekniği sonucunda Aydın, İzmir ve Manisa İllerindeki odaklarda bulunan sığırlarda tespit edilen *B. bovis*'in aylara göre dağılımı Çizelge 4.5., Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Aydın İli genelinde toplam 1226 sığır kan örneği toplanmış ve bu örneklerden 12'si (% 0.97) RLB tekniği ile *B. bovis* pozitif tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi; Aydın İli Yenipazar ilçesinde Eylül ayında 49 örneğin 11'inde (% 22.4) *B. bovis* tespit edilmiştir. Aynı ilçede Haziran ayında yalnızca 40 örneğin 1'inde (% 2.5) *B. bovis* saptanmıştır.

İzmir İli genelinde *B. bovis* oranına bakıldığında, toplam 462 adet alınan sığır kan örneğinden 17'si (% 3.67) RLB testi sonucu *B. bovis* pozitif görülmüştür (Çizelge 4.6). Çizelge 4.6.'a göre; İzmir İli Tire ilçesinde Eylül ayında 50 örneğin 16'sında (% 32) *B. bovis* saptanmıştır. Aliağa ilçesinde ise 31 örneğin 1'inde (% 3.2) *B. bovis* tespit edilmiştir.

Manisa İli genelinde toplam 523 adet sığır kan örneği RLB tekniği ile incelenmiş ve yalnızca 1 (% 0.19) kan örneğinde *B. bovis*'e rastlanmıştır (Çizelge 4.7). Çizelge 4.7.'e bakıldığında; Manisa İli Alaşehir ilçesinde Eylül ayında 50 örneğin yalnızca 1'inde (% 2) *B. bovis*'e rastlanmıştır.

Çizelge 4.5. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Aydın İlindeki odaklarda *Babesia bovis*'in aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Yenipazar			Çine			Söke			Osmanbükü			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	b	%
2006	Haziran	40	1	2,5	46	0	0	x	x	x	46	0	0	132	1	0,75
	Ağustos	50	0	0	25	0	0	50	0	0	49	0	0	174	0	0
	Eylül	49	11	22,4	52	0	0	61	0	0	48	0	0	210	11	5,23
2007	Mayıs	27	0	0	29	0	0	54	0	0	39	0	0	149	0	0
	Eylül	45	0	0	4	0	0	51	0	0	39	0	0	139	0	0
	Ekim	43	0	0	40	0	0	51	0	0	37	0	0	171	0	0
2008	Mayıs	29	0	0	31	0	0	25	0	0	35	0	0	120	0	0
	Eylül	34	0	0	30	0	0	39	0	0	28	0	0	131	0	0
	Toplam	317	12	3,78	257	0	0	331	0	0	321	0	0	1226	12	0,97

a: Odaklardan toplanan örnek sayısı b: Enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınamamıştır

Çizelge 4.6. Reverse line blot tekniği sonucuna göre İzmir İlindeki odaklarda *Babesia bovis*'in aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Tire			Aliğa			Kınık			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	B	%
2006	Haziran	43	0	0	49	0	0	x	x	x	43	0	0
	Eylül	50	16	32	31	1	3,2	24	0	0	105	17	16,19
2007	Mayıs	49	0	0	34	0	0	16	0	0	99	0	0
	Eylül	45	0	0	37	0	0	10	0	0	92	0	0
2008	Mayıs	28	0	0	25	0	0	17	0	0	70	0	0
	Eylül	26	0	0	19	0	0	8	0	0	53	0	0
	Toplam	241	16	6,63	195	1	0,51	75	0	0	462	17	3,67

a: Odaklardan toplanan örnek sayısı b: Enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınamamıştır

Çizelge 4.7. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Manisa İlindeki odaklarda *Babesia bovis*'in aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Alaşehir			Gölmarmara			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%
2006	Haziran	49	0	0	x	x	x	49	0	0
	Temmuz	50	0	0	48	0	0	98	0	0
	Eylül	50	1	2	51	0	0	101	1	0,99
2007	Mayıs	43	0	0	37	0	0	80	0	0
	Eylül	41	0	0	37	0	0	78	0	0
2008	Mayıs	29	0	0	31	0	0	60	0	0
	Eylül	26	0	0	31	0	0	57	0	0
	Toplam	288	1	0,34	235	0	0	523	1	0,19

a: Odaklardan toplanan örnek sayısı b: Enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınamamıştır

Reverse line blot tekniği sonucunda Aydın, İzmir ve Manisa İllerindeki odaklarda bulunan sığırlarda tespit edilen *B. bigemina*'nın aylara göre dağılımı Çizelge 4.8., Çizelge 4.9. ve Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi; Aydın merkez, Yenipazar, Çine ve Söke ilçelerinde *B. bigemina*'ya rastlanmamıştır.

İzmir İli genelinde toplam incelenen 675 adet sığır kan örneğinden 2'si (% 0.29) *B. bigemina* pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.9). Çizelge 4.9.'da görüldüğü gibi; İzmir İli Kınık ilçesinde Mart ve Nisan aylarında yalnızca birer örnekte *B. bigemina*'ya rastlanmış olup; Mart ayında % 2.7, Nisan ayında ise % 4 oranında tespit edilmiştir. Tire ve Aliağa ilçelerinde ise *B. bigemina*'ya rastlanmamıştır.

Manisa İlinde *B. bigemina*'nın genel dağılımına bakıldığında 523 sığırdan 1'inde (% 0.19) *B. bigemina* saptanmıştır (Çizelge 4.10.). Çizelge 4.10.'a göre Manisa İli Alaşehir ilçesinde Eylül ayında alınan 50 örneğin 1'inde (% 2) *B. bigemina* görülmüştür. Gölarmara ilçesinde ise *B. bigemina* tespit edilememiştir.

Çalışmamızda Aydın, İzmir, Manisa illerinde *B. divergens* ve *B. major* türlerine ise rastlanmamıştır.

Çizelge 4.8. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Aydın İlindeki odaklarda *Babesia bigemina*'nın aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Yenipazar			Çine			Söke			Osmanbükü			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	b	%
2006	Haziran	40	0	0	46	0	0	x	x	x	46	0	0	132	0	0
	Ağustos	50	0	0	25	0	0	50	0	0	49	0	0	174	0	0
	Eylül	49	0	0	52	0	0	61	0	0	48	0	0	210	0	0
2007	Mayıs	27	0	0	29	0	0	54	0	0	39	0	0	149	0	0
	Eylül	45	0	0	4	0	0	51	0	0	39	0	0	139	0	0
	Ekim	43	0	0	40	0	0	51	0	0	37	0	0	171	0	0
2008	Mayıs	29	0	0	31	0	0	25	0	0	35	0	0	120	0	0
	Eylül	34	0	0	30	0	0	39	0	0	28	0	0	131	0	0
	Toplam	317	0	0	257	0	0	331	0	0	321	0	0	1226	0	0

a: Odaklardan toplanan örnek sayısı b: Enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınamamıştır

Çizelge 4.9. Reverse line blot tekniği sonucuna göre İzmir İlindeki odaklarda *Babesia bigemina*'nın aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Tire			Aliğa			Kınık			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%	a	B	%
2006	Haziran	43	0	0	49	0	0	x	x	x	43	0	0
	Eylül	50	0	0	31	0	0	24	0	0	105	0	0
2007	Mart	48	0	0	30	0	0	37	1	2,7	115	1	0.86
	Nisan	42	0	0	31	0	0	25	1	4	98	1	1.02
	Mayıs	49	0	0	34	0	0	16	0	0	99	0	0
	Eylül	45	0	0	37	0	0	10	0	0	92	0	0
2008	Mayıs	28	0	0	25	0	0	17	0	0	70	0	0
	Eylül	26	0	0	19	0	0	8	0	0	53	0	0
	Toplam	331	0	0	256	0	0	137	2	1,45	675	2	0,29

a: Odaklardan toplanan örnek sayısı b: Enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınamamıştı

Çizelge 4.10. Reverse line blot tekniği sonucuna göre Manisa İlindeki odaklarda *Babesia bigemina*'nın aylara göre dağılımı

Yıl	Aylar	Alaşehir			Gölmarmara			Toplam		
		a	b	%	a	b	%	a	b	%
2006	Haziran	49	0	0	x	x	x	49	0	0
	Temmuz	50	0	0	48	0	0	98	0	0
	Eylül	50	1	2	51	0	0	101	1	0,99
2007	Mayıs	43	0	0	37	0	0	80	0	0
	Eylül	41	0	0	37	0	0	78	0	0
2008	Mayıs	29	0	0	31	0	0	60	0	0
	Eylül	26	0	0	31	0	0	57	0	0
	Toplam	288	1	0,34	235	0	0	523	1	0,19

a: Odaklardan toplanan örnek sayısı b: Enfekte hayvan sayısı %: Enfeksiyon oranı x: Kan örneği alınamamıştır

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm dünyada olduğu gibi subtropikal iklim kuşağında yer alan ülkemizde de hayvanlarda kene kaynaklı paraziter hastalıklar yaygın olarak görülmekte ve sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Sığırlarda yaygın olarak görülen *T. annulata*'nın neden olduğu kene kaynaklı paraziter hastalıklardan tropikal theileriosis, Akdeniz havzası, Avrupa, Orta Doğu, Güney Asya ve Afrika gibi geniş bir coğrafyada endemik olarak görülmektedir (Dolan 1989, Norval ve ark 1992). *Hyalomma* türü keneler tarafından nakledilen hastalığın, Türkiye'nin de hemen hemen her bölgesinde görüldüğü yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Eren ve ark 1995, Aktaş ve ark 2001, Vatansever ve Nalbantoğlu 2002, Dumanlı ve ark 2002, İça ve ark 2007, İnci ve ark 2008, Altay ve ark 2008, Orkun ve ark 2011, Deniz ve ark 2012). Türkiye'de özellikle yüksek verimli ithal hayvanlarda mortalite ve verim düşüklüğü sonucu ekonomik kayıplara yol açan tropikal theileriosis, sığır yetiştiriciliğini tehdit etmektedir. Ayrıca apatojen ya da düşük patojen *Theileria* türü olarak bilinen *T. buffeli*'de yaygın olmamakla birlikte, Türkiye'de tespit edilmiştir (Vatansever ve ark 2002, İnci ve ark 2003, Deniz ve Karaer 2006, Aktaş ve ark 2006, Altay ve ark 2007, Altay ve ark 2008, Deniz ve ark 2012).

Dünyada çiftlik hayvanlarında yaygın olarak görülen ve keneler tarafından nakledilen diğer bir protozoer hastalık olan babesiosis, insanlarda kene kaynaklı zoonoz olarak dikkatleri üzerine çekmektedir. Sığırlarda babesiosis *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* ve *B. major* türü protozoonlar tarafından oluşturulan, dünya çapında oldukça

önemli ve sık karşılaşılan bir hastalıktır (McCosker 1981, Uilenberg 1995). Sığırlarda neden olduğu mortalite ve ekonomik kayıplar bakımından sığır yetiştiriciliğinde önemli bir tehdit olarak görülmektedir. Türkiye’de sığırlarda *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* ve *B. major* türlerinin varlığı bildirilmiştir. Fakat en fazla yaşanan ekonomik kaybın Türkiye’de yaygın olarak görülen *B. bigemina* ve *B. bovis* türlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Çakmak 1987, Sayın ve ark 1989, Dinçer ve ark 1991, İnci 1992, Çakmak ve Öz 1993, Eren 1993, Sayın ve ark 1996, Tanyüksel ve ark 2000, Aktaş ve ark 2001, İnci ve ark 2002, Vatansver ve ark 2002, Tanyüksel ve ark 2002, Karatepe ve ark 2003, İça 2004, Altay ve ark 2008, Kalkan ve ark 2010).

Theileria ve *Babesia* türlerinin oluşturduğu akut enfeksiyonlarda ilk laboratuvar teşhisi, geleneksel olarak Giemsa boyama yöntemi ile boyanan kan frotilerinin mikroskopik muayenesi ile yapılmaktadır (Soulsby 1982, Mehlhorn 2004, d’Oliveira 1995). Ancak türlerin morfolojik yapılarında görülen benzerlikler bu yöntemle tür ayrımı yapılmasına imkan vermemektedir. Ayrıca enfeksiyonu atlatan hayvanlarda etkenin uzun süre taşındığı ve dolayısıyla kanda paraziteminin oldukça düşük seyrettiği durumlarda mikroskopik bakı yanıltıcı olabilmektedir (Uilenberg 1981, Norval ve ark 1992). Bu noktada serolojik testler, taşıyıcı hayvanların belirlenmesi ve sublinik enfeksiyonların teşhisi amacıyla epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Fakat serolojide türler arasında çapraz reaksiyonların görülebilmesi, zayıf spesifik immun cevap alınması ya da uzun süre taşıyıcılık durumunda antikorların her zaman tespit edilememesi bu testleri tartışılır hale getirmektedir (Burrige ve ark 1974). Teşhiste yaşanan bu olumsuzluklar daha duyarlı ve spesifik olan moleküler yöntemlere başvurulmasına ihtiyaç duyurmuştur. Hem omurgalı hem de omurgasız konaklardan elde edilen DNA örneklerinde parazite ait çok küçük miktarlardaki DNA’yı kolayca ve özgül olarak çoğaltabilen PCR yöntemi, günümüzde en sık başvurulmuş moleküler testlerden biridir. PCR ile hibridizasyonun birleştiği aynı anda birden çok parazit türünün teşhisinin yapılabildiği, duyarlı bir test olan RLB testi de sağladığı avantajdan dolayı parazitolojide yaygın kullanım alanı bulmuştur (Gubbels ve ark 1999, Sparagano ve ark 2000, Georges ve ark 2001, Almeria ve ark 2002, Vatansver ve ark 2002, Brigido ve ark 2004, Oura ve ark 2004, İça 2004, Garcia-Sanmartin ve ark 2006, Salih ve ark 2007, İça ve ark 2007, Altay ve ark 2008, Silva ve ark 2010, Yıldırım ve ark 2013). Bu çalışmada Aydın, İzmir, Manisa illerindeki sığırlarda

Theileria ve *Babesia* türlerinin belirlenmesi amacıyla RLB testi kullanılmıştır. RLB yöntemi ile *T. annulata*, *T. buffeli*, *B. bovis*, *B. bigemina* türlerinin varlığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada bir catch all (*Theileria-Babesia*) ve altı tür spesifik prob kullanılmıştır (Çizelge 3.5.). *Theileria/Babesia* genel primerleri (RLB-F2/RLB-R2) ile sığır kan örneklerinden elde edilen amplikonların bir kısmı *T. annulata*, *T. buffeli*, *B. bovis*, *B. bigemina* spesifik prob karşılıkları ile sinyal verirken, yalnızca üç örnek *Theileria/Babesia* soy spesifik prob ile sinyal oluşturmuştur. RLB yönteminde soy spesifik prob ile reaksiyon veren, membrana bağlanmış fakat tür spesifik problemler ile sinyal oluşturmayan amplikonlar, yeni bir türün, alt türün ya da farklı bir genotipin varlığını işaret edebilmektedir. Bu noktada söz konusu üç örneğin sekans analizi yapılmamıştır. Dolayısıyla bu örneklerin genetik olarak farklı bir genotip olup olmadıkları konusunda herhangi bir netlik kazanmamıştır. Fakat örneklerin soy spesifik prob ile sinyal verdiği ayı takip eden diğer ay *T. annulata* pozitif sonuç verdiği görülmüştür.

Türkiye’de sığırlarda tropikal theileriosis üzerine pek çok epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Moleküler yöntemlerin (PCR, RLB) kullanıldığı, tropikal theileriosisin yaygınlığının değerlendirildiği epidemiyolojik çalışmalarda Ankara (% 61.2 - % 36.6), Diyarbakır (% 74.6 - % 23), Şanlıurfa (% 60.3), Elazığ (% 60.2), Bingöl (% 61.7), Muş (% 58.7), Adıyaman (% 43.1), Van (% 27.8), Erzincan (% 15.45), Kayseri (% 9.3), Kırşehir (% 2.32) ve Doğu Karadeniz (% 1.28) illerinde *T. annulata* farklı yaygınlık oranlarında tespit edilmiştir (Vatansever ve Nalbantoğlu 2002, Vatansever ve ark 2002, Dumanlı ve ark 2005, Aktaş ve ark 2006, İça ve ark 2007, Altay ve ark 2007, Altay ve ark 2008, Orkun ve ark 2011, Deniz ve ark 2012). Bölgelere ait çeşitli illerde yapılan seroprevalans çalışmalarında ise Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi (% 91.4 - % 2.7), Karadeniz Bölgesi (% 46.8), Ege Bölgesi (% 40), Marmara Bölgesi (% 33.3) ve İç Anadolu Bölgesi’nde (% 67.5 - % 29) *T. annulata*’ya önemli oranlarda rastlanmıştır (Eren ve ark 1995, Aktaş ve ark 2001, Aktaş ve Çakmak 2001, Vatansever ve Nalbantoğlu 2002, Dumanlı ve ark 2002, Sayın ve ark 2003, İnci ve ark 2008, Sevgili ve ark 2010).

Bu çalışma Aydın, İzmir ve Manisa illerinde *T. annulata*’nın yaygınlığının moleküler olarak belirlendiği önemli bir çalışmadır. RLB hibridizasyon tekniği ile incelenen kan örneklerinin illere göre sonuçları incelendiğinde; Aydın ilinde toplam 3918

sığır kan örneğinden 2152'si (% 54.92), İzmir ilinde toplam 2644 sığır kan örneğinden 619'u (% 23.41), Manisa ilinde toplam 2260 sığır kan örneğinden 1088'i (% 48.14) *T. annulata* pozitif tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre İzmir iline nispeten Aydın ve Manisa illerinde *T. annulata* daha yaygın olarak görülmüştür. Çalışmamızın yapıldığı illeri kapsayan, Batı Ege Bölgesi'nde sığırlardaki kene türlerinin mevsimsel aktivitesi ve dağılımı üzerine yapılan bir çalışmada Aydın ve İzmir illerinde tespit edilen başlıca kene türünün *H. marginatum* (% 47.71 - % 33.29) olduğu bildirilirken, Manisa ilinde *H. detritum* (% 32.16) ağırlıklı olarak tespit edilmiştir. Manisa ilinde *H. detritum*'u *H. excavatum* (% 28.53), İzmir ilinde *H. marginatum*'u *R. turanicus* (% 18.37) ve *H. excavatum* (% 14.61), Aydın ilinde *H. marginatum*'u *H. excavatum* (% 24.97) ve *H. detritum* (% 17.51) türleri takip etmiştir. Bu illerde tespit edilen *Hyalomma* türleri içerisinde *H. anatolicum* türü ise küçük bir oranı temsil etmiştir (Serkan ve ark 2012). Ayrıca Türkiye'de kenelerin coğrafik dağılımı üzerine yapılan derleme makalede de çalışmamızın yapıldığı Ege Bölgesi'nde *Hyalomma* soyuna ait türlerin varlığı bildirilmektedir (Aydın ve Bakırcı 2007). Bu çalışmalarla paralel olarak *T. annulata*'nın başlıca vektörü olan *Hyalomma* türlerinin Aydın, İzmir ve Manisa illerinde de yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir. Dolayısıyla *T. annulata*'nın yaygınlığı üzerine elde ettiğimiz sonuçlar kene türleri üzerine yapılan bu çalışmalarla desteklenmektedir. Batı Ege Bölgesi'nde yapılan çalışmada aynı zamanda kene türlerinin mevsimsel aktivitesi incelenerek, *Hyalomma* soyu içerisinde yer alan türlerin farklı mevsimsel dağılımlar gösterdiği bildirilmiştir (Bakırcı ve ark 2012). Bu çalışmadaki sonuçlara göre *H. marginatum* türlerinin çoğunluğu (% 97) ilkbahar ve yaz aylarında, *H. excavatum* (% 42) sonbahar, *H. detritum*'un (% 97) yüksek bir oranı ise yaz ayında toplanmıştır (Serkan ve ark 2012). Çalışmamızda *T. annulata*'nın mevsimsel yoğunluk oranlarına bakıldığında, Aydın ilinde % 64.12 ve İzmir ilinde % 36.95 oranları ile *T. annulata* yoğun olarak Eylül ayında tespit edilmiştir. Manisa ilinde ise *T. annulata*'nın en yoğun görüldüğü ay Mayıs (% 68.75) ayı olarak tespit edilmiştir. Batı Ege Bölgesi'nde yapılan çalışmada *Hyalomma* türlerinin mevsimsel aktivitesi üzerine elde edilen sonuçlar ile *T. annulata*'nın mevsimsel yoğunluğu üzerine elde ettiğimiz bulgular desteklenmektedir. Kene aktivitesinin başlaması ile birlikte theileriosis enfeksiyonlarının sayısında artış olması da kaçınılmazdır.

Apatojen ya da ılımlı *Theileria* türü olarak bilinen *T. buffeli* üzerine Türkiye’de çok fazla epidemiyolojik çalışma bulunmamaktadır. *T. buffeli*’nin ülkemizdeki varlığı ilk olarak 2002 yılında Ankara ve çevresinde RLB tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur (Vatansever ve ark 2002). Çalışma sonucunda % 11.8 oranında *T. buffeli* tespit edilmiştir. Aynı çalışmada % 8.4 oranında *T. buffeli*, *T. annulata* ile miks olarak görülmüştür (Vatansever ve ark 2002). Kayseri ve yöresinde RLB metodu kullanılarak incelenen 100 sığırın 12’sinde *T. buffeli* tespit edilmiştir (İnci ve ark 2003). Yine Ankara bölgesi’nde yapılan bir çalışmada % 6.4 *T. buffeli*, % 7,2 *T. annulata* – *T. buffeli* miks enfeksiyonu saptanmıştır (Deniz ve Karaer 2006). Doğu Anadolu Bölgesi’nde Haziran ve Temmuz aylarında PCR yöntemi ile % 7 oranında *T. buffeli*’ye rastlanırken; Erzincan ve yöresinde farklı odaklardan toplanan sığır kan örnekleri RLB tekniği ile incelenerek % 9.76 *T. buffeli* tespit edilmiştir (Aktaş ve ark 2006, Altay ve ark 2007). Doğu Karadeniz Bölgesi’nde RLB tekniği ile % 11.56 *T. buffeli* görülmüştür. Diyarbakır ve çevresinde multipleks PCR ile 100 sığırdan yalnızca 1’inde *T. annulata* ile *T. buffeli* miks enfeksiyonu görülerek en düşük bu bölgede tespit edilmiştir (Altay ve ark 2008, Deniz ve ark 2012). Çalışmamızda İzmir ili Tire ilçesinde Eylül ayında yalnızca 1 örnekte (% 0.08) *T. annulata* - *T. buffeli* miks enfeksiyonuna rastlanmıştır.

Türkiye’de sığırlarda babesiosis üzerine özellikle serolojik çalışmalar başta olmak üzere çok sayıda epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır. İç Anadolu Bölgesi’nde yapılan çalışmalara bakıldığında; Ankara ve çevresinde *B. bigemina* (% 100 - % 3.6), *B. bovis* (% 59 - % 2.3), *B. divergens* (% 1.1 - % 1.6) ve *B. major* (% 0.2) bildirilmiştir (Çakmak 1987, Sayın ve ark 1989, İnci 1992, Eren 1993, Tanyüksel ve ark 2000, Vatansever ve ark 2002, Tanyüksel ve ark 2002, İça 2004). Konya ve çevresinde *B. bigemina* (% 53.06 - % 42.9) tespit edilmiştir (Sevinç ve ark 2001, Ekici ve Sevinç 2009). Kayseri’de *B. bigemina* (% 23.03) ve *B. bovis* (% 1.04) saptanırken (İnci ve ark 2002); Niğde’de yalnızca *B. bigemina* (% 30) görülmüştür (Karatepe ve ark 2003). Sivas’da yapılan çalışmada ise *B. bigemina* (% 37.5) ve *B. bovis* (% 13.3) tespit edilmiştir (Kalkan ve ark 2010). Doğu Anadolu Bölgesi’nde Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde *Babesia* türlerinin varlığı ve oranları yapılan çalışmalarla incelenmiştir. Elazığ’da *B. bigemina* (% 42.9 - % 31.9), *B. bovis* (% 5.6 - % 1.4) ve *B. divergens* (% 3.5) saptanırken; Malatya’da yalnızca *B. bigemina* (% 7.1) ve *B. divergens* (% 0.6) görülmüştür. Tunceli’de ise *B. bigemina* (% 7.3), *B. bovis* (% 0.6) ve *B. divergens* (% 1.2) bildirilmiştir (Sayın ve ark 1996, Aktaş

ve ark 2001). Akdeniz Bölgesi'nde Adana ili ve çevresinde *B. bigemina* % 55 - % 50.8; *B. bovis* % 43.8 - % 31.6 oranlarında tespit edilmiştir (Çakmak ve Öz 1993, Sayın ve ark 1996). Güneydoğu Anadolu Bölgesi Şanlıurfa'da yalnızca *B. bigemina* (% 43.97) saptanmıştır (Sevgili ve ark 2010). Marmara Bölgesi'nde Bursa ilinde yapılan çalışmada % 48.9 *B. bigemina*, % 41.8 *B. bovis* görülmüştür (Sayın ve ark 1996). Karadeniz'de % 61 *B. bigemina*, % 46 *B. bovis* ve % 75 *B. divergens* bildirilmiş (Dinçer ve ark 1991); fakat Doğu Karadeniz'de sadece *B. bigemina* % 0.77 tespit edilmiştir (Altay ve ark 2008).

Ege Bölgesi'nde Aydın, İzmir ve Manisa illerinde RLB tekniği kullanılarak yapılan bu çalışmada *B. bovis*'in varlığı ve oranlarına bakıldığında; Aydın ili Yenipazar ilçesinde Eylül ayında incelenen 49 sığır kan örneğinin 11'inde (% 22.4) *B. bovis* tespit edilmiştir. Haziran ayında 40 örnekten 1'inde *B. bovis* görülmüştür. Aydın ilinin Çine, Söke ve Osmanbükü ilçelerinde *B. bovis* saptanmamıştır. Toplamda Aydın ilinde 1226 sığır kan örneğinden 12'sinde (% 0.97) *B. bovis* tespit edilmiştir. İzmir ili Tire ilçesinde Eylül ayında incelenen 50 sığır kan örneğinin 16'sında (% 32) *B. bovis* görülmüştür. Aliağa ilçesinde ise Eylül ayında yalnızca 1 örnekte (% 3.2) *B. bovis*'e rastlanmıştır. İzmir ili genelinde *B. bovis* oranı % 3.67 bulunmuştur. Manisa ilinde *B. bovis* oranına bakıldığında yalnızca Alaşehir ilçesinde Eylül ayında 50 örnekten 1'inde *B. bovis* tespit edilmiş olup, toplam oranı % 0.19'dur. *B. bovis*, *R. annulatus*, *R. microplus*, *R. bursa* ve *I. ricinus* türleri tarafından nakledilmektedir. Ayrıca Türkiye'deki kene türlerinin coğrafik dağılımının incelendiği derleme makalede de Ege Bölgesi'nde *R. annulatus*, *R. bursa* türlerinin varlığı bildirilmektedir (Aydın ve Bakırcı 2007). Batı Ege Bölgesi'nde kene türlerinin dağılımı ve mevsimsel aktivitesinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada *I. ricinus* bu bölgede ilk defa ortaya konmuştur (Bakırcı ve ark 2012). Yapılan çalışmada Manisa ilinde yalnızca 1 adet (0.03) *I. ricinus* türü saptanırken; İzmir ilindeki sığırlar üzerinden 588 adet (% 5.23) *I. ricinus* türü toplanmıştır. Aydın ilinde ise *I. ricinus*'a rastlanmamıştır. Genellikle yüksek rakım ve ormanlık alanları tercih eden *I. ricinus* türünün enfestasyon oranları ise en yüksek Aralık ve Mart ayları arasında tespit edilmiştir. Şubat ayında *I. ricinus* enfestasyonunun pik yaptığı görülmüştür. Aynı çalışmada Aydın ve Manisa illerinde *R. annulatus*, sığırlar üzerinden Temmuz ve Kasım ayları arasında toplanmış; fakat oldukça az sayıda elde edilmiştir. İzmir ilinde ise *R. annulatus* tespit edilememiştir. Çalışmada *B. bovis*'in diğer bir vektörü olan *R. bursa* en fazla yaz aylarında toplanmıştır. Aydın ilinde *R. bursa*'ya (% 0.05) oldukça az sayıda rastlanırken; İzmir ve Manisa illerinde sırası ile % 11.24 -

% 10.12 oranlarında görülmüştür (Bakırcı ve ark 2012). Bu tez çalışmasında, kene türleri üzerine elde edilen diğer çalışma sonuçları ile paralel olarak, Aydın ve Manisa illerinde *B. bovis*'in vektör potansiyeli değerlendirildiğinde, tespit edilen *B. bovis* oranının düşük elde edilmesi muhtemel bir sonuçtur. İzmir ilinde hem *I. ricinus* hem de *R. bursa*'nın görülmesi dolayısıyla, *B. bovis*'in bu ildeki oranı diğer illere göre biraz daha fazla oranda tespit edilmiştir. Aydın, İzmir ve Manisa ilinde *B. bovis*'in mevsimsel yoğunluğunun ise Eylül ayında olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasında *B. bigemina*'nın varlığı ve oranları incelendiğinde; Aydın ili Merkez, Yenipazar, Çine ve Söke ilçelerinde *B. bigemina*'ya rastlanmamıştır. İzmir ili Kınık ilçesi'nde ise alınan 137 sığır kan örneğinden 2'sinde (% 1.45) *B. bigemina* tespit edilmiştir. Tire ve Aliağa ilçelerinde *B. bigemina* görülmemiştir. Manisa ili Gölarmara ilçesinde *B. bigemina*'ya rastlanmazken; Alaşehir ilçesinde 288 örnekten yalnızca 1'inde (% 0.34) *B. bigemina* saptanmıştır. *B. bigemina*, *R. microplus*, *R. annulatus*, *R. bursa*, *R. evertsi* ve *Haemaphysalis punctata* türleri tarafından nakledilmektedir. Fakat Türkiye'de tespit edilen kene türleri arasında *R. microplus* ve *R. evertsi* türleri bildirilmemiştir. Türkiye'deki kene türlerinin coğrafik dağılımının incelendiği çalışmalarda Ege Bölgesi'nde *R. annulatus*, *R. bursa* ve *H. punctata* türlerinin varlığı bildirilmektedir (Aydın ve Bakırcı 2007). Batı Ege Bölgesi'nde sığırlar üzerinden toplanan kene türlerinin dağılımı ve mevsimsel aktivitesinin tespit edildiği diğer bir çalışmada; *Hae. punctata* türüne Aydın, İzmir ve Manisa illerinde rastlanmamıştır. Aydın ilinde *R. annulatus* (% 0.05) ve *R. bursa* (% 0.05) türleri ise oldukça az oranlarda görülmüştür. İzmir ilinde *R. annulatus*'a rastlanmazken; *R. bursa* % 11.24 oranında görülmüştür. Manisa ilinde *R. annulatus* (% 0.63) oldukça az oranda tespit edilirken; *R. bursa* % 10.12 olarak bildirilmiştir. Batı Ege Bölgesi'nde yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarla paralel olarak Aydın ilinde *B. bigemina*'nın vektör potansiyelinin düşük olması sebebi ile bu tez çalışmasında Aydın ilinde *B. bigemina*'ya rastlanmamıştır. İzmir ve Manisa ilinde *R. bursa* yaklaşık % 10 oranlarında görülmekte; fakat çalışmamızda bu illerde *B. bigemina* oranı oldukça düşük elde edilmiştir. Batı Ege Bölgesi'nde yapılan çalışmada sığırlar üzerinden *R. bursa* en fazla yaz aylarında, *R. annulatus* ise en fazla Temmuz ve Kasım ayları arasında toplanmıştır. Bu tez çalışmasında İzmir ilinde *B. bigemina*'nın mevsimsel aktivitesi Mart ve Nisan ayları, Manisa ilinde ise Eylül ayı olarak tespit edilmiştir.

Sığırlarda görülen *Babesia* türlerinden *B. divergens* ve *B. major* türlerine ise Aydın, İzmir ve Manisa illerinde rastlanmamıştır. *B. divergens* *I. ricinus* tarafından, *B. major* ise *Hae. punctata* tarafından nakledilmektedir. Her iki türün de Türkiye'deki varlığı bildirilmektedir (Aydın ve Bakırcı 2007, Bakırcı ve ark 2012). Ancak Batı Ege Bölgesi'nde kene türlerinin dağılımının incelendiği çalışmada Aydın, İzmir ve Manisa İlleri'nde *H. punctata* türü keneler tespit edilememiştir. Aynı çalışmada *I. ricinus* türü keneler Manisa İli'nde % 0.03, İzmir İli'nde % 5.23 oranında bildirilmiştir (Bakırcı ve ark 2012). Bu çalışma ile *B. divergens* ve *B. major* türlerinin tespit edilemediği çalışmamızda alınan sonuçlar paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma Batı Ege Bölgesi'nde yer alan Aydın, Manisa ve İzmir İlleri'nde sığırlarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin moleküler olarak araştırıldığı önemli bir çalışmadır. RLB tekniği kullanılarak yapılan çalışma ile *T. annulata*, *T. buffeli*, *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin yaygınlığı ve mevsimsel yoğunluğu hakkında bilgi edinilmiştir. Alınan sonuçlar RLB testinin aynı anda çok sayıda parazitin saptanabilmesi, tek bir testte çok sayıda örneğin işlenebilmesi ve membranının defalarca kullanılabilmesi açısından RLB'nin epidemiyolojik çalışmalar için uygun bir test olduğunu göstermiştir.

ÖZET

Bu çalışmada sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin Reverse Line Blot hibridizasyon tekniği ile Aydın, İzmir ve Manisa İlleri'nde teşhisi amaçlanmıştır. Bu amaçla Aydın, İzmir ve Manisa illerine bağlı çeşitli odaklardan (Aydın- Merkez, Yenipazar, Çine, Söke; İzmir- Tire, Aliğa, Kınık; Manisa- Alaşehir, Gölarmara) Haziran 2006 - Eylül 2008 tarihleri arasında alınan kan örnekleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda Aydın İli'nde toplam 3918 kan örneğinden 2152 (% 54.92)'sinde *T. annulata* saptanmıştır. Aydın İli Çine ilçesinde % 89.40; Söke ilçesinde % 60.87; merkez ilçesi Osmanbükü'nde % 57.91 ve Yenipazar ilçesinde % 20.06 oranında *T. annulata* enfeksiyonu tespit edilmiştir. İzmir İli'nde toplam 2644 sığırdan kan örneği alınmış ve bu örneklerin 619 (% 23.41)'unda *T. annulata* enfeksiyonu saptanmıştır. İzmir İli Kınık, Tire, Aliğa ilçelerinde *T. annulata* pozitif örnek oranları sırasıyla % 37.93, % 22.33, % 15.86'dır. İzmir İli Tire ilçesinde yalnızca birer örnekte *T. annulata*-*B. bovis* ve *T. annulata*-*T. buffeli* miks enfeksiyonu saptanmıştır. Manisa İli'nde toplam 2260 adet sığır kan örneğinden 1088 (% 48.14)'inde *T. annulata* tespit edilirken; Alaşehir ve Gölarmara ilçelerinde *T. annulata* pozitif örnek oranı sırasıyla % 67 ve % 27.34 bulunmuştur. RLB hibridizasyon tekniği ile elde edilen sonuçlara göre; *B. bovis* pozitif örnek oranı, Aydın İli Yenipazar ilçesinde % 3.78; İzmir İli Tire ilçesinde % 6.63, Aliğa ilçesinde % 0.51; Manisa İli Alaşehir ilçesinde % 0.34 olarak tespit edilmiştir. Aydın İli ve ilçelerinde *B. bigemina* enfeksiyonu saptanmamış; fakat İzmir İli Kınık ilçesinde (% 1.45) ve Manisa İli Alaşehir ilçesinde (% 0.34) *B. bigemina* tespit edilmiştir. Çalışmada Aydın, İzmir ve Manisa İlleri'ndeki sığır popülasyonunda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin epidemiyolojisi belirlenmiş olup; RLB tekniğinin aynı anda pek çok enfeksiyonu tespit edebilme avantajından yararlanılmıştır. Ayrıca bu çalışma ile sığır yetiştiriciliğinde önemli hastalıklara yol açan bu türlerin varlığı ortaya konarak gerekli kontrol programlarının geliştirilmesine katkıda bulunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Babesia*, Reverse Line Blot Hibridizasyon Testi, *Theileria*.

SUMMARY

The aim of the present study was the diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species, causing significant economic losses in cattle, by Reverse Line Blot hybridization technique in Aydin, Izmir and Manisa provinces. For this purpose, blood samples taken from various districts (Aydin-Central, Yenipazar, Cine, Soke; Izmir- Tire, Aliaga; Manisa- Golmarmara, Alasehir) between June 2006- September 2008 were analyzed. As a result of analyses, a total of 2152 (54.92 %) out of 3918 blood samples has been identified to be positive for *T. annulata* in Aydin province. The infection rate of *T. annulata* in Cine, Soke, Osmanbuku and Yenipazar districts were 89.40, 60.87, 57.91 and 20.06 %, respectively. A total of 2644 blood samples from were collected in Izmir and 619 (23.41 %) of these samples were identified to be infected with *T. annulata*. The rate of *T. annulata* positive samples of in Kınık, Tire, Aliaga districts in Izmir province were 37.93, 22.33 and 15.86 %, respectively. In only one example, *T. annulata* - *B. bovis* and *T. annulata* - *T. buffeli* mix infections were detected in Tire district. A total of 1088 (48.14 %) out of 2260 blood samples has been identified to be positive for *T. annulata* in Manisa province; the positive sample rates of *T. annulata* in Alasehir and Golmarmara districts were 67 and 27.34 %, respectively. According to the results obtained by RLB hybridization technique, the positive rates of *B. bovis* were as follows: 3.78 % in Yenipazar district of Aydin province; 6.63 and 0.51 % in Tire and Aliaga districts of Izmir, respectively; 0.34 % in Alasehir district of Manisa province. *B. bigemina* infection was not detected in Aydin province and all its districts. However, *B. bigemina* was detected in Kınık district (1.45 %) of Izmir province and in Alasehir district (0.34 %) of Manisa province. In the study, the epidemiology of the *Theileria* and *Babesia* species in the cattle population in Aydin, Izmir and Manisa provinces was determined using the RLB technique which allows simultaneous detection of all tick-borne infections. Furthermore, the present study contributed to the development of control programs by identifying the the presence of the above mentioned species causing major diseases in cattle production.

Key Words: *Babesia*, Reverse Line Blot Hybridization Technique and *Theileria*

KAYNAKLAR

Abdo J, Kristersson T, Seitzer U, Renneker S, Merza M, Ahmed J (2010) *Development and laboratory evaluation of a lateral flow device (LFD) for the serodiagnosis of Theileria annulata infection*, Parasitology Research, 107: 1241-1248.

Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I (2010a) *Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of Babesia bovis from cattle blood*, Veterinary Parasitology, 172: 65-70.

Aboulaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I (2010b) *Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of Babesia parasites*, Parasitology International, 59, (2), 278-282.

Agbede RIS, Kemp DH, Hoyte HMD (1986) *Secretary and digest cells of female Boophilus microplus: invasion and development of Babesia bovis; light and electron microscope studies*, Sauer JR, Hair AJ (eds), *Morphology, Physiology and Behavioural Biology of Ticks*, pp: 457-471, New York.

Aikawa M, Rabbege J, Uni S, Ristic M, Miller LH (1985) *Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with Babesia bovis*, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 34(1): 45-49.

Aktaş M, Sevgili M, Dumanlı N (2001) *Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde Theileria annulata'nın seroprevalansı*, Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences, 25: 359-363.

Aktaş M, Dumanlı N, Angın M (2004) *Cattle infestation by Hyalomma ticks and prevalence of Theileria in Hyalomma species in the east of Turkey*, Veterinary Parasitology, 119: 1-8

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

Aktaş M, Çakmak A (2001) *Malatya yöresinde tropikal theileriosisin epidemiyolojisi*, Vet. Bil. Derg., 17(2): 19-22.

Aktaş M, Dumanlı N (2001) *Malatya yöresinde Hyalomma soyuna bağlı kene türlerinde doğal Theileria annulata enfeksiyonları*, Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences, 25: 119-124.

Aktaş M, Dumanlı N, Karaer Z, Çakmak A, Sevgili M (2001) *Seroprevalences of Babesia species in cattle in Elazığ, Malatya and Tunceli provinces*, Turk. J. Vet. Anim. Sci., 25: 447-451.

Aktaş M, Altay K, Ozubek S, Dumanlı N (2012) *A survey of ixodid ticks feeding on cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea region of Turkey*, Veterinary Parasitology, 187: 567-571.

Aktaş M, Vatansever Z, Altay K, Aydın MF, Dumanlı N (2010) *Molecular evidence for Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus from Turkey*, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 104(1): 10-15.

Almeria S, Castella J, Ferrer D, Ortuno A, Estrada-Pena A, Gutierrez JF (2001) *Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection*, Vet. Parasitol., 99: 249-259.

Almeria S, Castella J, Ferrer D, Gutierrez JF, Estrada-Pena A, Sparagano O (2002) *Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 969: 78-82.

Allred DR, Carlton JM, Satcher RL, Long JA, Brown WC, Patterson PE, O'Connor RM, Stroup SE (2000) *The ves multigene family of B. bovis encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface*, Mol. Cell, 5: 153-162.

Allred DR (2001) *Antigenic variation in babesiosis: is there more than one 'why'?* Microbes Infect., 3: 481-491.

Allsopp BA, Baylis HA, Allsoppi MTEP, Cavalier-Smith T, Bishop RP, Carrington DM, Sohanpal B, Spooner P (1993) *Six different species of Theileria can be diagnosed using specific DNA probes*, Parasitology, 107(2): 157-165

Altay K, Aktaş M (2004) *Sığır theileriosisi*, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 18(2): 79-86.

Altay K, Aydın MF, Dumanlı N, Aktaş M (2008) *Molecular detection of Theileria and Babesia infections in cattle*, Veterinary Parasitology, 158: 295-301.

Altay K, Aktaş M, Dumanlı N (2007) *Erzincan yöresinde sığırlarda Theileria annulata ve Theileria buffeli/orientalis'in reverse line blotting yöntemi ile araştırılması*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 31: 94-97.

Araujo FR, Madruga CR, Leal CRB, Schenk MAM, Kessler RH, Marques APC, Lemaire DC (1998). *Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination test in detecting antibodies against Babesia bovis*, Vet. Parasitol., 74: 101–108.

Aydın L, Bakırcı S (2007) *Geographical distribution of ticks in Turkey*, Parasitology Research, 101(2): 163-166.

Aysul N, Karagenc T, Eren H, Aypak S, Bakırcı S (2008) *Aydın ili sığırlarında tropikal theileriosisün yaygınlığı ve Theileria annulata şizont aşısının sahada etkinliğinin değerlendirilmesi*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32(4): 322-327

Bai Q, Liu GY, Yin H, Zhao QZ, Liu DK, Ren JX, Li X (2002a) *Theileria sinensis sp nov: a new species of Bovine Theileria—classical taxonomic studies*, Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 33: 73–77.

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

Bakheit MA, Schnittger L, Salih DA, Boguslawski K, Beyer D, Fadl M, Ahmed JS (2004) *Application of the recombinant Theileria annulata surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis*, Parasitology Research, 92:299–302.

Bakırcı S, Saralı H, Aydın L, Latif A, Eren H, Karagenc T (2011) *Hyalomma rufipes (Koch, 1844) infesting cattle in the West Aegean region of Turkey*, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 35(5). 359-363.

Bakırcı S, Saralı H, Aydın L, Eren H, Karagenc T (2012) *Distribution and seasonal activity of tick species on cattle in the West Aegean region of Turkey*, Experimental Applied Acarology, 56(2): 165-178.

Barnett SF (1963) *The biological races of the bovine Theileria and their host-parasite relationship*, in *Immunity to protozoa*, Garnham PCC, Pierce AE, Roitt I (eds), *A Symposium of British Society for Immunology*, Blackwell Scientific Publications, 180-195, Oxford.

Barnett SF (1968) *Theileriosis*, Weinman D, Ristic M (eds), *Infectious Blood Diseases of Man and Animals*, Academic Press, 2: 269-328, New York.

Barnett SF (1977) *Babesia, Theileria, Myxosporida, Microsporida, Bartonellaceae, Anaplasmataceae, Ehrlichia and Pneumocystis*, Kreier JP (ed), *Parasitic Protozoa IV*, Academic Press, 77-113, London.

Basagoudanavar SH, Rao JR, Singh RK, Butchaiah G (1998) *Random amplification of polymorphic DNA finger printing of Trypanosoma evansi*, Vet. Res. Commun., 23: 249-255.

Bazasuranga T, Geysen D, Vercruysse J, Marcotty T (2008) *The sensitivity of PCR and serology in different Theileria parva epidemiological situations in Rwanda*, Veterinary Parasitology, 154: 21-31.

Ben Miled L, Dellagi K, Bernard G, Melrose TR, Darghouth M, Bouattour A, Kinnaird J, Shiels B, Tait A, Brown CGD (1994) *Genomic and phenotypic diversity of Tunisian Theileria annulata isolates*, Parasitology, 108: 51-60.

Bilgic HB, Karagenc T, Shiels B, Tait A, Eren H, Weir W (2010) *Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR-based detection of T. annulata carrier animals*, Veterinary Parasitology, 174: 341–347.

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

Bishop RP, Spooner PR, Kanhai GK, Kiarie J, Latif AA, Hove T, Masaka S, Dolan TT (1994) *Molecular characterization of Theileria parasites: application to the epidemiology of theileriosis in Zimbabwe*, Parasitology, 109(5): 573-581.

Bishop RP, Odongo DO, Mann DJ, Pearson TW, Sugimoto C, Haines LR, Glass E, Jensen K, Seitzer U, Ahmed JS, Graham SP, de Villiers EP (2009) *Genome Mapping and Genomics in Animal-Associated Microbes*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 6: 191-231.

Bock RE, Devos AJ, Rayner AC, Lehmann W, Singh S, Molloy JB (1997) *Assessment of the risk of tick fever mortalities in north-western Queensland beef industry, Challenging the Boundaries, Proceedings of Annual Conference, Australian Association of Cattle Veterinarians*, Australian Veterinary Association, pp: 175–182. Brisbane.

Bock RE, Kingston TG, Standfast NF, De Vos AJ (1999) *Effect of cattle breed on innate resistance to inoculations of Babesia bigemina*, Australian Veterinary Journal, 77: 465–466.

Bock RE, Lew AE, Minchin CM, Jeston PJ, Jorgensen WK (2000) *Application of PCR assays to determine the genotype of Babesia bovis parasites isolated from cattle with clinical babesiosis soon after vaccination against tick fever*, Aust. Vet. J., 78: 179-181.

Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W (2004). *Babesiosis of cattle*, Parasitology, 129: 247–269.

Bonnet S, Jouglin M, L’Hostis M, Chauvin A (2007) *Babesia sp. EU1 from roedeer and transmission within Ixodes ricinus*, Emerg.Infect.Dis., 13: 1208–1210.

Bono MF, Mangold AJ, Baravalle ME, Valentini BS, Thompson CS, Wilkowsky SE, Echaide IE, Farber MD, Torioni de Echaide SM (2008) *Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with Babesia bovis*, Veterinary Parasitology, 157: 203-210

Boonchit S, Xuan X, Yokoyama N, Goff WL, Wagner G, Igarashi I (2002) *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rhoptry-associated protein-1 antigen of Babesia bovis for the detection of specific antibodies in cattle*, J. Clin. Microbiol., 40: 3771–3775.

Boonchit S, Xuan X, Yokoyama N, Goff WL, Waghela SD, Wagner G, Igarashi I (2004) *Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of Babesia bovis rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies in cattle*, J. Clin. Microbiol., 42: 1601–1604.

Bork S, Yokoyama N, Matsuo T, Claveria FG, Fujisaki K, Igarashi I (2003) *Growth inhibitory effect of triclosan on equine and bovine Babesia parasites*, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 68(3): 334-340.

Bork S, Okamura M, Boonchit S, Hirata H, Yokoyama N, Igarashi I (2004) *Identification of Babesia bovis L-lactate dehydrogenase as a potential chemotherapeutical target against bovine babesiosis*, Molecular and Biochemical Parasitology, 136 (2): 165-172

Bose R, Jacobson RH, Gale KR, Waltisbuhl DJ, Wright IG (1990) *An improved ELISA for detection of antibodies against Babesia bovis using either a native or a recombinant B. bovis antigen*, Parasitol. Res., 76: 648–652.

Bose R, Jorgensen WK, Dalgliesh R J, Friedhoff KT, de Vos AJ (1995) *Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis*, Veterinary Parasitology, 57(1-3): 61-74.

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

Brayton KA, Lau AO, Herndon DR, Hannick L, Kappmeyer LS, Berens SJ, Bidwell SL, Brown WC, Crabtree J, Fadrosch D, Feldblum T, Forberger HA, Haas BJ, Howell JM, Khouri H, Koo H, Mann DJ, Norimine J, Paulsen IT, Radune D, Ren Q, Smith Jr RK, Suarez CE, White O, Wortman JR, Knowles Jr DP, McElwain TF, Nene VM

(2007) *Genome sequence of Babesia bovis and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa*, PLoS Pathog., 3: 1401-1413.

Brigido C, da Fonseca IP, Parreira R, Fazendeiro I, do Rosario VE, Centeno-Lima S (2004) *Molecular and phylogenetic characterization of Theileria spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal*, Vet. Parasitol., 123: 17–23.

Brocklesby D (1979) *Human babesiosis*, Journal of South African Veterinary Association, 50: 302-307.

Brown WC, Logan KS, Wagner GG, Tetzlaff CL (1991) *Cell-mediated immune responses to Babesia bovis merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites*, Infection and Immunity, 59: 2418–2426.

Brown WC, Zhao S, Woods VM, Dobbelaere DA, Rice-Ficht AC (1993). *Babesia bovis-specific CD4+ T cell clones from immune cattle express either the Th 0 or Th 1 profile of cytokines*, Revue D'Elevage et De Medecine Veterinaire Des Pays Tropicaux, 46: 65–69.

Brown WC, Ruef BJ, Norimine J, Kegerreis KA, Suarez CE, Conley PG, Stich RW, Carson KH, Rice-Ficht AC (2001) *A novel 20-kilodalton protein conserved in Babesia bovis and B. bigemina stimulates memory CD4(+) T lymphocyte responses in B. bovis-immune cattle*, Molecular and Biochemical Parasitology, 118: 97–109.

Brown CG (1990) *Control of tropical theileriosis (Theileria annulata infection) of cattle*, Parasitologia, 32: 23-31.

Brown CG, Duncan CD, Williamson SM, Ben Miled L (1994) *Methods for diagnosis of theileriosis in developing countries*, Uilenberg G, Permin A, Hansen JW (eds), *Use of applicable biotechnological methods for diagnosing haemoparasites*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp: 156, Roma.

Buening GM, Barbet A, Meyler P, Mahan S, Nene V, McGuire TC (1990) *Characterization of a repetitive DNA probe for Babesia bigemina*, Vet. Parasitol., 36: 11-20.

Buening GM, Figueroa JV (1992) *Detection of Babesia bigemina infection: use of DNA probe – a review*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87(3): 207-211, Rio de Janeiro.

Burridge MJ, Kimber CD (1973) *Duration of serological response to the indirect fluorescent antibody test of cattle recovered from Theileria parva infection*, Res. Vet. Sci., 14: 270–271.

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

Caccio S, Camma C, Onuma M, Severini C (2000) *The beta-tubulin gene of Babesia and Theileria parasites is an informative marker for species discrimination*, *Int. J. Parasitol.*, 30: 1181–1185.

Calder JAM, Reddy GR, Chieves L, Courtney CH, Littell R, Livengood JR, Norval RA I, Smith C, Dame JB (1996) *Monitoring Babesia bovis infections in cattle by using PCR-based tests*, *Journal of Clinical Microbiology*, pp: 2748-2755.

Callow LL (1977) *Vaccination against bovine babesiosis*, Miller LH, Pino JA, McKelvey JJ (eds), *Immunity to Blood Parasites of Man and Animals*, Plenum Press, pp: 121–149. New York.

Callow LL (1979) *Some aspects of the epidemiology and control of bovine babesiosis in Australia*, *Journal of the South African Veterinary Association*, 50: 353–356.

Callow LL (1984) *Piroplasms, Animal Health in Australia, Protozoal and Rickettsial Diseases*, pp: 121–160, Canberra.

Callow LL, Hoyte HMD (1961) *Transmission experiments using Babesia bigemina, Theileria mutans, Borrelia sp. and the tick cattle Boophilus microplus*, *Australian Veterinary Journal*, 37: 381–390.

Campbell JD, Brown DJ, Nichani AK, Howie SE, Spooner RL, Glass EJ (1997) *A non-protective T helper 1 response against the intra-macrophage protozoan Theileria annulata*, *Clinical and Experimental Immunology*, 108: 463-470.

Cao S, Aboge GO, Terkawi MA, Yu L, Kamyngkird K, Luo Y, Li Y, Goo YK, Yamagishi J, Nishikawa Y, Naoaki Yokoyama N, Suzuki H, Igarashi I, Maeda R, Inpankaew T, Jittapalapong S, Xuan X (2012) *Molecular detection and identification of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle in northern Thailand*, *Parasitol. Res.*, 111: 1259-1266.

Caskey TC (1987) *Disease diagnosis by recombinant DNA methods*, *Science*, 236: 1223-1228.

Chan R, Chen J, York MK, Setijono N, Kaplan RL, Graham F, Tanowitz HB (2000) *Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of Giardia and Cryptosporidium antigens*, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 393–394.

Chandler J, Gurmin T, Robinson N (2000) *The place of gold in rapid tests*, *IVD Technol.* 6: 37-49.

Chaudhry ZI, Suleman M, Younus M, Aslim A (2010) *Molecular detection of Babesia bigemina and Babesia bovis in crossbred carrier cattle through PCR*, Pakistan J. Zool., 42(2): 201-204.

Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D (2011) *Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives*, Veterinary Parasitology, 182: 14-21.

Conrad PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thomford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford III SR, Herwaldt BL (2006) *Description of Babesia duncani n.sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms*, Int. J. Parasitol., 36: 779–789.

Costa-Junior LM, Rabelo EML, Filho OAM, Ribeiro MFB (2006) *Comparison of different direct diagnostic methods to identify Babesia bovis and Babesia bigemina in animals vaccinated with live attenuated parasites*, Vet. Parasitol., 139: 231–236.

Court RA, Jackson LA, Lee RP (2001) *Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with Babesia bovis*, International Journal for Parasitology, 31: 29–37.

Cowman AF, Timms P, Kemp DJ (1984) *DNA polymorphisms and subpopulations in Babesia bovis*, Mol. Biochem. Parasitol., 11: 91-103.

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

Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC (2003a) *Presence of Mycoplasma haemofelis, Mycoplasma haemominutum and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study*. Vet. Microbiol., 93: 307-317.

Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC (2003b) *Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in Southern Europe. Part I: Epizootiological aspects*, Vet. Parasitol., 113: 189-201.

Çakmak A (1987) *Untersuchungen zur inzidenz von hamoparaziten in einer rinderherde in der provinz Ankara*, Tierarztl. Hochsch., Diss., Hannover.

Çakmak A, Öz İ (1993) *Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 40(1): 70-77.

Dana KJ, Nathans D (1971) *Specific cleavage of SV40 DNA by restriction endonucleases of Hemophilus influenzae*, Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 2913, USA.

Dalrymple BP (1990) *Cloning and characterization of the rRNA genes and flanking regions from Babesia bovis: use of the genes as strain discriminating probes*, Mol. Biochem. Parasitol., 43: 117-124.

Darghouth ME, Bouattour A, Ben Miled L, Sassi L (1996) *Diagnosis of Theileria annulata infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears*, Vet. Res., 27: 613–621.

De Echaide ST, Echaide IE, Gaido AB, Mangold AJ, Lugaresi CI, Vancini VR, Guglielmo AA (1995) *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay kit to detect Babesia bovis antibodies in cattle*, Prev. Vet. Med., 24: 277-283.

De Kok JB, d'Oliveira C, Jongejan F (1993) *Detection of the protozoan parasite Theileria annulata in Hyalomma ticks by the polymerase chain reaction*, Exp. Appl. Acarol., 17: 839–846.

Deniz A, Öncel T, İçen H, Şimşek A (2012) *Diyarbakır yöresinde sığırlarda Theileria annulata ve T. buffeli'nin multipleks PCR ile saptanması*, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 18: A111-A114.

De Vos AJ, Potgieter FT (1994) *Bovine babesiosis*, Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC (eds), *Infectious diseases of livestock*, Oxford University Press, pp: 278–294, Cape Town, South Africa.

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

Dhar S, Guatam OP (1977) *Indirect fluorescent antibody test for serodiagnosis in cattle infected with Theileria annulata*, Indian J. Anim. Sci., 47: 720–723.

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

Diñçer Ş, Sayın F, Karaer Z, Çakmak A, Friedhoff KT, Müller I, İnci A, Yukarı B A, Eren H (1991) *Karadeniz Bölgesi sığırlarında bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar*, A. Ü. Vet. Fak. Derg., 38(1-2): 206-226.

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

D'Oliveira C, Van Der Weide M, Habela MA, Jacquiet P, Jongejan F (1995) *Detection of Theileria annulata in blood samples of carrier cattle by PCR*, J. Clin. Microbiol., 33: 2665–2669.

D'Oliveira C, Van Der Weide M, Jacquet P, Jongejan F (1997) *Detection of Theileria annulata by the PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in Mauritania*, Exp. Appl. Acarol., 21: 279–291.

Dschunkowsky E, Luhs J (1904) *Die piroplasmosen der rinder, zentralblatt fur bacteriology, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 35: 486-492.

Dumanlı N (1987) *Theileria annulata'nın sebep olduğu sığır theileriosisinin Hyalomma excavatum ile nakli üzerine deneysel araştırmalar*, Doğa. Türk. Vet. ve Hay. Derg., 11(1): 14-26.

Dumanlı N, Aktaş M, Çetinkaya B, Çakmak A, Köroğlu E, şaki CE, Erdoğmuş Z, Nalbantoğlu S, Öngör H, şimşek S, Karahan M (2002) *Bazı Doğu ve Güneydoğu illerinde theileriosisin Yayılışının mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması*, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu.

Dumanlı N, Aktaş M, Çetinkaya B, Çakmak A, Köroğlu E, şaki CE, Erdoğmuş Z, Nalbantoğlu S, Öngör H, şimşek S, Karahan M, Altay K (2005) *Prevalance and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey*, Vet. Parasitology, 127: 9-15

Durrani AZ, Kamal N (2008) *Identification of ticks and detection of blood protozoa in Friesian cattle by polymerase chain reaction test and estimation of blood parameters in district Kasur, Pakistan*, Trop. Anim. Health Prod., 40: 441–447.

Düzgün A, Alabay M, Çerçi H, Emre Z, Çakmak A (1992) *A serological survey using ELISA for Babesia bovis infection of cattle in Turkey*, IAEA-TECDOC-657: 175-177.

Ekici ÖD, Sevinç F (2009) *Seroepidemiology of Babesia bigemina in cattle in the Konya Province, Turkey: Endemic status*, Bull. Vet. Inst. Pulawy, 53: 645-649.

Eren H (1993) *Ankara yöresinde sığır babesiosisinin sero-prevalansı*, Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 40: 23-37.

Eren H, Çakmak A, Yukarı BA (1995) *Türkiye'nin Farklı Coğrafik Bölgelerinde Theileria annulata'nın Sero-Prevalansı*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 42: 57-60.

Etkind P, Piesman J, Ruebush II T, Spielman A, Juranek DD (1980) *Methods for detecting Babesia microti infection in wild rodents*, J. Parasitol., 66: 107–110.

Fahrimal Y, Goff WL, Jasmer DP (1992) *Detection of Babesia bovis carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA*, J. Clin. Microbiol., 30: 1374–1379

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

Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM (1992) *Detection of Babesia bigemina-infected carriers by polymerase chain reaction amplification*, J. Clin. Microbiol., 30: 2576-2582

Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM (1993) *Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of Babesia bigemina, Babesia bovis and Anaplasma marginale DNA in bovine blood*, Vet. Parasitol., 50: 69–81.

Figueroa JV, Buening GM (1995) *Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick borne haemoparasites of veterinary importance*, Vet. Parasitol., 75: 75-92.

Figueroa JV, Alvarez JA, Rojas EE, Ramos JA, Mosqueda JJ, Canto GJ, Vega CA, Buening GM (1998) *Use of a duplex PCR/DNA probe assay to monitor Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle during a vaccination trial*, Rev. Latinoam Microbiol., 40: 39-44.

Flach EJ, Ouhellie H (1992) *The Epidemiology of Tropical Theileriosis (Theileria infection on cattle) in An Endemic Area of Morocco*, Vet. Parasitol., 44: 51-65.

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

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

Foppa IM, Krause PJ, Spielman A, Goethert H, Gern L, Brand B, Telford SR 3rd (2002) *Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of Babesia microti, eastern Switzerland*, Emerg. Infect. Dis., 8(7): 722-726.

Friedhoff K, Scholtyseck E (1968) *Fine structure of Babesia ovis (Piroplasmidea) in Rhipicephalus bursa (Ixodoidea): transformation from spheroid to vermicule form*, Z. Parasitenkd., 30(4): 347-359.

Friedhoff K, Scholtyseck E (1969) *Fine structure of the merozoites of Babesia bigemina in the ovary of Boophilus microplus and Boophilus decoloratus*, Z. Parasitenkd., 32(3): 266-283.

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

Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FF, de Vries E (2004) *A Babesia bovis merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in Plasmodium sporozoites*, Mol. Biochem. Parasitol., 136: 25–34.

Gale KR, Waltisbuhl DJ, Bowden JM, Jorgensen WK, Matheson J, East IJ, Zakrzewski H, Leatch G (1998) *Amelioration of virulent Babesia bovis infection in calves by administration of the nitric oxide synthase inhibitor aminoguanidine*, Parasite Immunology, 20: 441–445.

Garcia-Sanmartin J, Nagore D, Garcia Perez AL, Juste RA, Hurtado A (2006) *Molecular diagnosis of Theileria and Babesia species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macro arrays*, BMC Vet. Res., 2(16): 1746-6148.

Gayo V, Romito M, Nel LH, Solari MA, Viljoen GJ (2003) *PCR-based detection of the transovarial transmission of Uruguayan Babesia bovis and Babesia bigemina vaccine strains*, Onderstepoort. J. Vet. Res., 70: 197–204.

Gelfand JA, Callahan MV (1998) *Babesiosis*, Remington JS, Swartz MN (eds), *İnfeksiyon Hastalıklarında Güncel Yaklaşımlar*, Bonus Ltd. Şti. Ankara, 222-236.

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

Ghosh S, Azhahanambı P, Fuente J (2006) *Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control*, Experimental Applied Acarology, 40(17): 49-66.

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

Gill BS, Bhattacharyulu Y, Singh A, Kaur D, Gill HS (1981) *Chemotherapy against Theileria annulata*, Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (eds), *Advances in the Control of Theileriosis*, The Hague: Martinus Nijhoff, pp: 218-222.

Glass EJ, Innes EA, Spooner RL, Brown CG (1989) *Infection of bovine monocyte/macrophage populations with Theileria annulata and Theileria parva*, Vet. Immunol. Immunopathol., 22: 355–368.

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

Glass EJ, Jensen K (2007) *Resistance and susceptibility to a protozoan parasite of cattle – gene expression differences in macrophages from different breeds of cattle*, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 120: 20–30

Goff WL, Wagner GG, Craig TM, Long RF (1982) *The bovine immune response to tick-derived Babesia bovis infection: serological studies of isolated immunoglobulins*, *Veterinary Parasitology*, 11: 109–120.

Goff WL, Wagner GG, Craig TM (1984) *Increased activity of bovine ADCC effector cells during acute Babesia bovis infection*, *Veterinary Parasitology*, 16: 5–15.

Goff WL, Johnson WC, Parish SM, Barrington GM, Tuo W, Valdez RA (2001) *The age-related immunity in cattle to Babesia bovis infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen*, *Parasite Immunology*, 23: 463–471.

Goff WL, Johnson WC, Parish SM, Barrington GM, Elsasser TH, Davis WC, Valdez RA (2002) *IL-4 and IL-10 inhibition of IFN-gamma- and TNF-alpha-dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to Babesia bovis merozoites*, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 84: 237–251.

Goff WL, McElwain TF, Suarez CE, Johnson WC, Brown WC, Norimine J, Knowles D P (2003) *Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies Babesia bovis-infected cattle*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10: 38–43.

Goff WL, Molloy JB, Johnson WC, Suarez CE, Pino I, Rhalern A, Sahibi H, Ceci L, Carelli G, Adarns DS, McGuire TC, Knowles DP, McElwain TF (2006) *Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against Babesia bovis*, *Clin. Vaccine Immunol.*, 13: 1212–1216.

Gohil S, Kats LM, Sturm A, Cooke BM (2010) *Recent insights into alteration of red blood cells by Babesia bovis: moovin' forward*, *Trends. Parasitol.*, 26: 591-599

Gonzales EF, Todorovic RA, Adams LG (1971) *Ultrastructural de Babesia bigemina*, *Rev. Inst. Col. Agropecuario*, 6: 87-112.

Goo YK, Jia H, Aboge GO, Terkawi MA, Kuriki K, Nakamura C, Kumagai A, Zhou J, Lee EG, Nishikawa Y, Igarashi I, Fujisaki K, Xuan X (2008) *Babesia gibsoni: serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP*, *Exp. Parasitol.*, 118: 555–560.

Goo YK, Terkawi MA, Jia H, Aboge GO, Ooka H, Nelson B, Kim S, Sunaga F, Namikawa K, Igarashi I, Nishikawa Y, Xuan X (2010) *Artesunate, a potential drug for treatment of Babesia infection*, *Parasitology International*, 59(3);481-486.

Goodger BV, Wright IG, Mahoney DF (1981) *Initial characterization of cryoprecipitates in cattle recovering from acute Babesia bovis (Argentina) infection*, Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, 59: 521–529.

Gorenflot A, Moubri K, Precigout E, Carcy B, Schetters TP (1998) *Human babesiosis*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 92: 489–501.

Gough JM, Jorgensen WK, Kemp DH (1998) *Development of tick gut forms of Babesia bigemina in vitro*, Journal of Eukaryotic Microbiology, 45: 298–306.

Gray J, Von Stedingk LV, Gürtelschmid M, Granström M (2002) *Transmission studies of Babesia microti in Ixodes ricinus ticks and gerbils*, J. Clin. Microbiol., 40(4): 1259-63.

Gray JS, Weiss LM (2008) *Babesia microti*, Khan N (ed), *Emerging Protozoan Pathogens*, Taylor and Francis, pp: 303–349, Abingdon, UK,

Gubbels JM, d'Oliveira C, Jongejan F (2000) *Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Theileria annulata infection in cattle*, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7(3): 404-411.

Gubbels JM, De Vos AP, Van Der Weide M, Viseras J, Schouls LM, De Vries E, Jongejan F (1999) *Simultaneous detection of bovine Theileria and Babesia species by reverse line blot hybridization*, J. Clin. Microbiol., 37: 1782–1789.

Gubbels M J, Katzer F, Hide G, Jongejan F, Shiels BR (2000) *Generation of a mosaic pattern of diversity in the major merozoite-piroplasm surface antigen of Theileria annulata*, Molecular and Biochemical Parasitology, 110: 23-32.

Guerrero FD, Nene VM, George JE, Barker SC, Willadsen P (2006) *Sequencing a new target genome: the Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) genome Project*, J. Med. Entomol., 43: 9-16.

Gün H, Tanyüksel M, Yukarı BA, Çakmak A, Karaer Z. (1996) *Türkiye'de babesiosisin ilk insan serodiagnozu*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 20(1): 1-7.

Güneş T, Kaya S, Poyraz O, Engin A (2007) *The prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks in the Sinop region of Turkey*, Turk. J. Vet. Anim. Sci, 31: 153-158.

Hagiwara K, Ichikawa T, Takahashi M (1996) *Studies on an experimental system for the invasion of Theileria sergenti merozoite into erythrocytes*, Veterinary Parasitology 63: 187-193.

Hagiwara K, Takahashi M, Ichikawa T, Tsuji M, Ikuta K, Ishihara C (1997) *Inhibitory effort of heparin on red blood cell invasion by Theileria sergenti merozoites*, International Journal for Parasitology, 27: 535-539.

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

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

Hardrys H, Balik M, Schierwater B (1992) *Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology*, Mol. Ecol., 1: 55-63

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

Hashemi-Fesharki R (1991) *Prophylactic effect of schizont tissue culture vaccine against Theileria annulata infection in Iran, 15-17*. Anand, India, National Dairy Development Board. Proceedings of the second EEC workshop on orientation and co-ordination of research on tropical theileriosis.

Hayashida K, Hara Y, Abe T, Yamasaki C, Toyoda A, Kosuge T, Suzuki Y, Sato Y, Kawashima S, Katayama T, Wakaguri H, Inoue N, Homma K, Tada-Umezaki M, Yagi Y, Fujii Y, Habara T, Kanehisa M, Watanabe H, Ito K, Gojobori T, Sugawara H, Imanishi T, Weir W, Gardner M, Pain A, Shiels B, Hattori M, Nene V, Sugimoto C (2012) *Comparative Genome Analysis of Three Eukaryotic Parasites with Differing Abilities To Transform Leukocytes Reveals Key Mediators of Theileria-Induced Leukocyte Transformation*, mBio, 3(5): 204.

Herwaldt B, Persing DH, Precigout EA, Goff WL, Mathiesen DA, Taylor PW, Eberhard ML, Gorenflot AF (1996) *A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans*, Ann. Intern. Med., 124: 643-650.

Herwaldt BL, Caccio S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Loschenberger K, Tura S, Pieniazek N J (2003) *Molecular characterization of a non-Babesia divergens organism causing zoonotic babesiosis in Europe*, Emerg. Infect.Dis., 9: 942-948.

Higuchi R (1989) *Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood*, Amplifications, 2: 1-3.

Hines SA, Palmer GH, Brown WC, McElwain TF, Suarez CE, Vidotto O, Rice-Ficht AC (1995) *Genetic and antigenic characterization of Babesia bovis merozoite spherical body protein Bb-1*, Mol. Biochem. Parasitol., 69: 149-159.

Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehntopf M, Fricke HJ, Straube E (2007) *First confirmed autochthonous case of human Babesia microti infection in Europe*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 26(8): 595–601.

Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, Krause PJ, Persing DH (2000) *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology, 13(3): 451-469.

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

Hooshmand-Rad P (1976) *The pathogenesis of anaemia in Theileria annulata infection*, Research in Veterinary Science, 20: 324-329.

Horak IG, Camicas JL, Keirans JE (2002) *The Argasidae, Ixodidae and Nuttallidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names*, Experimental and Applied Acarology, 28: 27-54.

Houghton RL, Stevens YY, Hjerrild K, Guderian J, Okamoto M, Kabir M, Reed SG, Leiby DA, Morrow WJ, Lorca M, Raychaudhuri S (2009) *Lateral flow immunoassay for diagnosis of Trypanosoma cruzi infection with high correlation to the radioimmunoassay*, Clin. Vaccine. Immunol., 16: 515–520.

Howell JM, Ueti MW, Palmer GH, Scoles GA, Knowles DP (2007) *Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of Babesia bovis by Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, J. Clin. Microbiol., 45: 3155-3159.

Hoyte HM (1961) *Initial development of infectious Babesia bigemina*, Australian Veterinary Journal, 8: 462–466.

Huang X, Xuan X, Hirata H, Yokoyama N, Xu L, Suzuki N, Igarashi I (2004a) *Rapid immunochromatographic test using recombinant SAG2 for detection of antibodies against Toxoplasma gondii in cats*, J. Clin. Microbiol., 42: 351–353

Huang X, Xuan X, Xu L, Zhang S, Yokoyama N, Suzuki N, Igarashi I (2004b) *Development of an immunochromatographic test with recombinant EMA-2 for the rapid detection of antibodies against Babesia equi in horses*, J. Clin. Microbiol., 42: 359–361

Huang X, Xuan X, Verdida R A, Zhang S, Yokoyama N, Xu L, Igarashi I (2006) *Immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of Babesia caballi and B. equi infections in horses*. Clinical and Vaccine Immunology, 13(5): 553-555.

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

Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS (2008) *Babesiosis: recent insights into an ancient disease*, International Journal for Parasitology, 38(11): 1219-1237.

Hutchings CL, Li A, Fernandez KM, Fletcher T, Jackson LA, Molly JB, Jorgensen WK, Lim CT, Cooke BM (2007) *New insights into the altered adhesive and mechanical properties of red blood cells parasitized by Babesia bovis*, Mol. Microbiol., 65: 1092-1105.

Ilhan T (1995) *Theileria annulata: immunity and carrier state*, Master Tezi. The University of Edinburgh. Edinburgh.

Ilhan T, Williamson S, Kirvar E, Shiels B, Brown CG (1998) *Theileria annulata: carrier state and immunity*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 849: 109–125.

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

Iseki H, Zhou L, Kim C, Inpankaew T, Sununta C, Yokoyama N, Xuan X, Jittapalapong S, Igarashi I (2010) *Seroprevalence of Babesia infections of dairy cows in northern Thailand*, Vet. Parasitol., 170: 193–196

İça A, İnci A, Yıldırım A (2007) *Parasitological and molecular prevalence of bovine Theileria and Babesia species in the vicinity of Kayseri*, Turk. J. Vet. Anim. Sci.31(1): 33-38.

İça A (2004) *Sığırlarda bazı Babesia türlerinin reverse line blotting ve indirek floresan antikör testi ile karşılaştırılmalı tanısı*, Erciyes Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi, 1(2): 77-85.

İça A, Vatansever Z, Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A (2007) *Detection of Theileria and Babesia species in ticks collected from cattle*, Veterinary Parasitology, 148(2): 156-160.

İnci A (1992) *Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosisin seroinsidensi üzerine araştırmalar*, Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi, 39(1-2): 153-167.

İnci A, İça A, Yıldırım A, Vatansever Z, Çakmak A, Albasan H, Çam Y, Atasever A, Düzlü Ö (2008) *Epidemiology of tropical theileriosis in the Cappadocia region*, Turk. J. Vet. Anim. Sci., 32(1): 57-64.

İnci A, Çakmak A, Karaer Z, Dinçer Ş, Sayın F, İça A (2002) *Kayseri yöresinde sığırlarda babesiosisin seroprevalansı*, Turk. J. Vet. Animal. Sci., 26: 1345-1350.

Jacobson RH, Parrodi F, Wright IG, Fitzgerald CJ, Dobson C (1993) *Babesia bovis: in vitro phagocytosis promoted by immune serum and by antibodies produced against protective antigens*, Parasitology Research, 79: 221–226.

Jacobson LS (2006) *The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004*, Veterinary Parasitology, 138(1-2): 126-139.

Jasmer DP, Reduker DW, Goff WL, Stiller D, McGuire TC (1990) *DNA probes distinguish geographical isolates and identify a novel DNA molecule of Babesia bovis*, J. Parasitol., 76: 834-841.

Jongejan F, Uilenberg G (2004) *The global importance of ticks*, Parasitology, 129: 3-14.

Kakoma I, Mehlhorn H (1993) *Babesia of domestic animals*, Kreier JP (ed), *Parasitic protozoa*, Academic Press, pp: 141–216, San Diego, California.

Kalkan K (2008) *Sivas yöresindeki insan ve sığırlarda babesiosis yaygınlığının ifat yöntemiyle belirlenmesi*, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.

Kalkan K, Özçelik S, Malatyalı E (2010) *Sivas'ta insanlarda babesiosis seroprevalansının araştırılması*, Cumhuriyet Tıp Dergisi, 32: 276-280.

Kamau J, de Vos AJ, Playford M, Salim B, Kinyanjui P, Sugimoto C (2011) *Emergence of new types of Theileria orientalis in Australian cattle and possible cause of theileriosis outbreaks*, Parasites and Vectors, 4(1) : 22.

Karaer Z, Yukarı BA, Aydın L (1997) *Türkiye keneleri ve vektörleri*, Özcel MA, Daldal N. (Eds), *Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları ve Vektörler*, Türkiye Parazitoloji Derneği, 13: 363-434, İzmir.

Karatepe B, Karatepe M, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A (2003) *Niğde yöresinde sığırlarda babesiosisin prevalansı*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 27(4): 243-246.

Kaya G, Çakmak A, Karaer Z (2006) *Seroprevalence of theileriosis and babesiosis of cattle*, Med. Veter., 62(2): 156-158.

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

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

Khukhuu A, Lan DTB, Long PT, Ueno A, Li Y, Luo Y, Macedo AC, Matsumoto K, Inokuma H, Kawazu S, Igarashi I, Xuan X, Yokoyama N (2011) *Molecular epidemiological survey of Theileria orientalis in Thua Thien Hue Province, Vietnam*, J. Vet. Med. Sci., 73(5): 701–705.

Kiltz HH, Uilenberg G, Franssen FF, Perie NM (1986) *Theileria orientalis occurs in Central Africa*, Res. Vet. Sci., 40: 197–200.

Kim JY, Yokoyama N, Kumar S, Inoue N, Yamaguchi T, Sentoku S, Fujisaki K, Sugimoto C (2004) *Molecular epidemiological survey of benign Theileria parasites of cattle in Japan: detection of a new type of major piroplasm surface protein gene*, J. Vet. Med. Sci., 66: 251–6.

Kim CM, Alhassan A, Verdida RA, Yokoyama N, Xuan X, Fujisaki K, Kawazu S, Igarashi I (2007) *Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis*, Vet. Parasitol., 148: 137–143.

Kim CM, Blanco LB, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I (2008) *Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by Babesia bovis and Babesia bigemina*, Am. J. Trop. Med. Hyg., 78: 117–121.

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

Kjemtrup AM, Thomford J, Robinson T, Conrad PA (2000) *Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene*, Parasitology, 120: 487-493.

Kubota S, Sugimoto C, Onuma M (1996) *Population dynamics of Theileria sergenti in persistently infected cattle and vector ticks analysed by a polymerase chain reaction*, Parasitology, 112(5): 437– 442.

Kuttler KL (1984) *Babesiosis*, Foreign Animal Diseases, pp: 76-96.

Kuttler KL, Zaugg L, Yunker CE (1988) *The pathogenicity and immunologic relationship of virulent and tissue culture adapted Babesiosis bovis*, Veterinary Parasitology, 27: 239-244.

Lawrence JA, Perry BD, Williamson SM (2006) *East Coast Fever*, Coetzer JAW, Tustin RC (eds), *Infectious Diseases of Livestock*, Oxford University Press, 448-467, Oxford.

Leemans I, Brown D, Hooshmand-Rad P, Kirvar E, Uggla A (1999). *Infectivity and cross-immunity studies of Theileria lestoquardi and Theileria annulata in sheep and cattle, I. In vivo responses*. *Vet. Parasitol.*, 82: 179–192.

Levine ND (1985) *Apicomplexa: The Piroplasms*, *Veterinary Parasitology*, 291-328.

Levine ND (1988) *The protozoan phylum Apicomplexa*, Vol. I and II. CRC press: Boca Raton, Florida, USA.

Lew AE, Dalrymple B, Jeston P, Bock RE (1997) *PCR methods for discrimination of Babesia bovis isolates*, *Veterinary Parasitology*, 71: 223-237.

Liao M, Zhang S, Xuan X, Zhang G, Huang X, Igarashi I, Fujisaki K (2005) *Development of rapid immunochromatographic test with recombinant NcSAG1 for detection of antibodies to Neospora caninum in cattle*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12: 885–887.

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 (2012) *Rapid identification and differentiation of Theileria sergenti and Theileria sinensis using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay*, *Veterinary Parasitology*, 8.

Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MR, Valadao IF, Barci LG, Malheiros EB (1997) *An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against Babesia bovis in cattle*, *Vet. Parasitol.*, 71: 17–26.

Mackensted U, Gauer M, Fuchs P, Zapf F, Schein E, Mehlhorn H (1995) *DNA measurements reveal differences in the life cycles of Babesia bigemina and B. canis, two typical members of the genus Babesia*, *Parasitol. Res.*, 81: 595–604.

Mahmmod YS, El-Balkemy FA, Yuan ZG, El-Mekawy MF, Monazie AM, Zhu XQ (2010) *Field evaluation of PCR assays for the diagnosis of tropical theileriosis in cattle and water Buffaloes in Egypt*, *J. Anim. Vet. Adv.*, 9: 696–699.

Mahoney DF (1972) *Immune responses to hemoprotozoa II. Babesia spp*, Soulsby EJJ (ed), *Immunity to Animal Parasites*, Academic Press, pp: 301–341, New York.

Mahoney DF (1977) *Babesia of domestic animals*, Kreier JP (ed), *Parasitic Protozoa*, Academic Press, p. 152, New York.

Mahoney DF, Mirre GB (1977) *The selection of larvae of Boophilus microplus infected with Babesia bovis (syn B argentina)*, Research in Veterinary Science, 23(1): 126-127.

Mahoney DF, Kerr JD, Goodber BV, Wright IG (1979) *The immune response of cattle to Babesia bovis (syn. B. argentina)*, Studies on the nature and specificity of protection, International Journal for Parasitology, 9: 297–306.

Malandrin L, Jouglin M, Moreau E, Chauvin A (2009) *Individual heterogeneity in erythrocyte susceptibility to Babesia divergens is a critical factor for the outcome of experimental spleen-intact sheep infections*, Vet. Res., 40: 25.

Manuja A, Nichani AK, Kumar R, Rakha NK, Kumar B, Sharma KD (2000) *Comparison of cellular schizont, soluble schizont and soluble piroplasm antigens in ELISA for detecting antibodies against Theileria annulata*, Vet. Parasitol., 87: 93–101.

Manuja A, Malhotra DV, Sikka VK, Sangwan AK, Sharma R, Kumar B, Mehta BD, Gulati BR, Nichani AK (2006) *Isolates of Theileria annulata collected from different parts of India show phenotypic and genetic diversity*, Veterinary Parasitology, 137: 242-252.

Martin-Sanchez J, Viseras J, Adroher F J, Garcia-Fernandez P (1999) *Nested polymerase chain reaction for detection of Theileria annulata and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies*, Parasitol. Res., 85: 243–245.

Martins TM, Pedro OC, Caldeira RA, Do Rosario VE, Neves L, Domingos A (2008) *Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method*, Vet. Parasitol., 153: 225–230

Mc Cosker PJ (1981) *The Global Importance of Babesiosis*, Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis, Academic Press, pp: 1-24, New York.

Mc Fadden AMJ, Rawdon TG, Meyer J, Makin J, Morley CM, Clough RR, Tham K, Mullner P, Geysen D (2011) *An outbreak of haemolytic anaemia associated with infection of Theileria orientalis in naive cattle*, N. Z. Vet. J., 59(2): 79–85.

Mc Hardy N, Wekesa LS, Hudson AT, Randall AW (1987) *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.

Mehlhorn H, Schein E (1984) *The piroplasms: life cycle and sexual stages*. Adv. Parasitologi, 23, 37–103.

Mehlhorn H, Schein E, Ahmed JS (1993) *Theileria*, Kreier JP (ed), *Parasitic protozoa*, Academic Press, pp: 217–304, New York.

Mehlhorn H, Schein E, Ahmed JS (1994) *Theileria*, Kreier JP (ed), *Parasitic protozoa*, Academic Press, pp: 217–304, San Diego.

Mehlhorn H (2001) *Encyclopedic reference of parasitology. Disease, Treatment, Therapy*, Berlin, Heidelberg, Springer.

Mehlhorn H (2004) *Babesiosis, Theileriosis*. Encyclopedic reference of parasitology, Universitat Würzburg, Springer-Verlag Heidelberg.

Meng L, Mohan R, Kwok BH, Eloffson M, Sin N, Crews CM (1999) *Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96(18): 10403-10408.

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

Mills CD, Burgess DC, Taylor HJ, Kain KC (1999) *Evaluation of a rapid and inexpensive dipstick assay for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria*, Bull World Health Organ, 77: 553–559.

Mimioğlu M, Göksu K. ve Sayın F (1969) *Piroplasmida*, Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 880-938.

Mimioğlu M, Güler S, Ulutas M (1973) *Yurdumuz sığırlarında bulunan kan parazitleri üzerinde araştırmalar*, Türk. Vet. Hek. Dern. Derg. 43:8-16.

Minjauw B, De Castro J J (2000) *Host resistance to ticks and tick-borne diseases: its role in integrated control*, Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB (Eds), *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, CABI, Wallingford, pp: 153–169

Morisod A, Brossard M, Lambert C, Suter H, Aeschlimann A (1972) *Babesia bovis: Transmission par Ixodes ricinus (Ixodoidea) dans la plaine du Rhone*, Schweizer Arch. f. Tierheil., 114: 387-394.

Morzaria S, Katende J, Kairo A, Nene V, Musoke A (1992) *New methods for the diagnosis of Babesia bigemina infection*, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 3: 201-205.

Mosqueda J, Olvera-Ramirez A, Aguilar-Tipacamu G, Canto GJ (2012) *Current advances in detection and treatment of babesiosis*, Current Medicinal Chemistry, 19: 1504-1518.

Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T (2001) *Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template*, *Clinical Chemistry*, 47: 1742-1743.

Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002) *Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers*, *Mol. Cell. Probes*, 16: 223–229.

Nalbantoğlu S (1998) *Çukurova yöresinde tropikal theileriosise karşı aşılanan sığırlar üzerinde saha çalışmaları*, *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 45: 39-51.

Neitz WO (1957) *Theileriosis, gonderioses and cyauxzoonoses: a review 2 Theileria annulata infection*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 27: 319-346.

Norval RA, Perry BD, Young AS (1992) *The Epidemiology of Theileriosis in Africa*, Academic Press, London U K. 481.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*, *Nucleic Acids Research*, I–VII.

O'Connor RM, Long JA, Allred DR (1999) *Cytoadherence of Babesia bovis-infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides an in vitro model for sequestration*, *Infect. Immun.*, 67: 3921- 3928.

O'Connor RM, Allred DR (2000) *Selection of Babesia bovis-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms*, *J. Immunol.*, 164: 2037-2045.

Oliveira MCS, Oliveira-Sequeira TCG, Araujo Jr JP, Amarante AFT, Oliveira HN (2005) *Babesia spp. infection in Boophilus microplus engorged females and eggs in Sao Paulo State Brazil*, *Vet. Parasitol.*, 130: 61–67.

Oliveira MCS, Oliveira-Sequeira TCG, Regitano LCA, Alencar MM, Neo TA, Silva AM, Oliveira HN (2008) *Detection of Babesia bigemina in cattle of different genetic groups and in Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick*, *Veterinary Parasitology*, 155: 281- 286.

Oliveira-Sequeira TC, Oliveira MC, Araujo Jr JP, Amarante AF (2005) *PCR-based detection of Babesia bovis and Babesia bigemina in their natural host Boophilus microplus and cattle*, *Int. J. Parasitol.*, 35: 105–111.

Omanwar S, Rao JR, Singh RK, Butchaiah G (2001) *DNA polymorphism in Trypanosoma evansi by randomly amplified polymorphic DNA-PCR*, *Vet. Rec.*, 148: 244-246.

Onar E (1989) *Türkiye'de Tropical Theileriosis'e (Theileria annulata) karşı aşı hazırlama ve uygulama çalışmaları*, *Demirözü K, Uysal Y, Nadas ÜG, Türkaslan J, Altinel C, Alp H*

(Eds), *Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu*, Pendik Hayvan Hastalıkları Merkezi Araştırma Enstitüsü Yayınları, 10: 47- 52.

Orkun Ö, Deniz A, Güven E (2012) *Kırşehir yöresi sığırlarında Theileria annulata ve Theileria buffeli/orientalis varlığının multiplex-PCR yöntemiyle araştırılması*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 36(1). 9-11.

Ota N, Mizuno D, Kuboki N, Igarashi I, Nakamura Y, Yamashina H, Hanzaike (2009) *Epidemiological survey of Theileria orientalis infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido*, Jpn. J. Vet. Med. Sci., 71: 937–44.

Oura CAL, Bishop RP, Wampande EM, Lubega GW, Tait A (2004) *Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda*, Int. J. Parasitol., 34: 603–613.

Öncel T, Vural G, Karaer Z, Çakmak A, Yurtalan S, Öz İ, Erhan ZN, Beyazıt A, Pişkin Ç, Deniz A, Ütük AE, Handemir E, Altınöz F, Kamburgil K, Aytekin H, Kurt M, Aydın İ, Kaya S, Bastem Z, Kalkan Y, Temur A, İçyeroğlu H, İçyeroğlu A, Çaya H, Balkaya İ, Aksın N, Açııcı M (2010) *Türkiye’de sığırlarda Babesia bovis ve B. bigemina’nın seroprevalansı*, Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg., 37(1): 33-42.

Özkoç Ü, Pipano E (1981) *Trials with cell culture vaccine against theileriosis in Turkey*, Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (Eds), *Advances in the Control of Theileriosis*, Martinus Nijhoff, The Hague, pp: 256-258.

Palmer GH, McElwain TF, Perryman LE, Davis WC, Reduker DR, Jasmer DP, Shkap V, Pipano E, Goff WL, McGuire TC (1991) *Strain variation of Babesia bovis merozoite surface-exposed epitopes*, Infection and Immunity, 59(9): 3340–3342.

Papli N, Landt O, Fleischer C, Koekemoer JO, Mans BJ, Pienaar R, Josemans A, Zweggarth, E, Potgieter F, Latif AA (2011) *Evaluation of a TaqMan real-time PCR for the detection of Theileria parva in buffalo and cattle*, Vet. Parasitol, 175: 356–359.

Parker RJ, Shepherd RK, Trueman KF, Jones GW, Kent AS, Polkinghorne IG (1985) *Susceptibility of Bos indicus and Bos taurus to Anaplasma marginale and Babesia bigemina infections*, Veterinary Parasitology, 17: 205–213.

Persing DH, Mathiesen D, Marshall WF, Telford SR, Spielman A, Thomford JW, Conrad PA (1992) *Detection of Babesia microti by polymerase chain reaction*, Journal of Clinical Microbiology, 30: (8): 2097-2103.

Persing DH, Conrad PA (1995) *Babesiosis: new insights from phylogenetic analysis*, Infect. Agents Dis., 4: 182–195.

Petrigh R, Ruybal P, Thompson C, Neumann R, Moretta R, Wilkowsky S, Draghi G, Echaide I (2008) *Improved molecular tools for detection of Babesia bigemina*, Animal Biodiversity and Emerging Diseases, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1149: 155-157.

Pipano E, Weishman Y, Benado A (1974) *The virulence of four local strains of Theileria annulata*, Refuah Veterinarith, 23: 186-194.

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

Pipano E (1989) *Vaccination against Theileria annulata theileriosis*, Wright LG, Pres CRC (eds), *Cited in Veterinary Protozoan and Haemoparasite Vaccines*, 203-234.

Pipano E (1994) *Theileria annulata theileriosis, in Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*, Oxford University: Cape Down.

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

Pipano E, Shkap V (2006) *Theileria annulata infection, in infectious diseases of livestock, 2nd edition*, Oxford University Pres, 1: 486-497.

Poyraz Ö, Güneş T (2010) *Sinop yöresinde kırsal kesimde yaşayan insanlarda Babesia microti seroprevalansı*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 34(2): 81-85.

Preston PM, Brown CGD (1981) *Transformation of bovine lymphocytes in co-cultivation with autologous Theileria annulata-transformed cell lines*, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 75: 328.

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

Preston PM, Brown CG (1985) *Inhibition of lymphocyte invasion by sporozoites and the transformation of trophozoite infected lymphocytes in vitro by serum from Theileria annulata immune cattle*, Parasite Immunology, 7: 301-314.

Preston PM, Brown CG (1988) *Macrophage-mediated cytostasis and lymphocyte cytotoxicity in cattle immunized with Theileria annulata sporozoites or macroschizont-infected cell lines*, Parasite Immunology, 10: 631-647.

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

Preston PM, Brown CGD, Bell-Sakyi L, Richardson W, Sanderson A (1992) *Tropical theileriosis in Bos taurus and Bos taurus cross Bos indicus calves: response to infection with graded doses of sporozoites of Theileria annulata*, Res. Vet. Sci., pp: 230–243.

Preston PM, Brown CG, Entrican G, Richardson W, Boid R (1993) *Synthesis of tumour necrosis factor-alpha and interferons by mononuclear cells from Theileria annulata-infected cattle*, Parasite Immunology, 15: 525-534.

Preston PM, Glass EJ, Campbell JD, Darghouth MA, Ahmed JS, Shiels BR, Spooner RL, Jongejan F, Brown CG, Hall FR (1999) *Innate and adaptive immune responses cooperate to protect cattle against Theileria annulata*, Parasitol Today, 15: 268–274.

Preston PM, Darghouth M, Boulter NR, Hall FR, Kirvar RTE, Brown CGA (2002) *Dual role for immunosuppressor mechanisms in infection with Theileria annulata well-regulated suppressor macrophages help in recovery from infection; profound immunosuppression promotes non-healing disease*, Parasitol. Res., 88: 522-534.

Purnell RE (1981) *Babesiosis in Various Hosts*, Ristic M, Kreier JP (eds), *Babesiosis*, Academic Press, pp: 25-63, New York.

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

Ravindran R, Rao JR, Mishra AK (2006) *Detection of Babesia bigemina DNA in ticks by DNA hybridization using a nonradioactive probe generated by arbitrary PCR*, Veterinary Parasitology, 141: 181-185.

Reddy GR, Chakrabarti D, Yowell CA, Dame JB (1991) *Sequence microheterogeneity of the three small subunit ribosomal RNA genes of Babesia bigemina: expression in erythrocyte culture*, Nucl. Acids Res., 19: 3641-3645.

Reddy GR, Dame JR (1992) *rRNA-based method for sensitive detection of Babesia bigemina in bovine blood*, J. Clin. Microbiol., 30: 1811-1814.

Reddy YA, Rao JR, Butchaiah G, Sharma B (1998) *Random amplified polymorphic DNA for the specific detection of bubaline Echinococcus granulosus by hybridization assay*, Vet. Parasitol., 79: 315-323.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR (2002) *Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR*, J. Clin. Microbiol., 40: 2352–2356.

Renneker S, Kullmann B, Gerber S, Dobschanski J, Bakheit MA, Geysen D, Shiels B, Tait A, Ahmed JS, Seitzer U (2008) *Development of a competitive ELISA for detection of Theileria annulata infection*, *Transbound Emerg. Dis.*, 55: 249–256.

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

Richardson JO, Forsyth LM, Brown CGD, Preston PM (1998) *Nitric oxide causes the macroschizonts of Theileria annulata to disappear and host cells to become apoptotic*, *Vet. Res. Commun.*, 22(1): 31–45.

Riek RF (1964) *The life cycle of Babesia bigemina (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector Boophilus microplus (Canestrini)*, *Aust. J. Agric. Res.*, 15: 802–821.

Riek RF (1966) *The life cycle of Babesia argentina (Lignie`res, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector Boophilus microplus (Canestrini)*, *Australian Journal of Agricultural Research*, 17: 247–254.

Riek RF (1968) *Babesiosis*, Weinman D, Ristic M (eds), *II. Infectious Blood Diseases of Man and Animals*, Academic Press, pp: 219–268, New York.

Ristic M (1981) *Babesiosis*, Ristic M, McIntyre I (eds), *Diseases of Cattle in the Tropics* Martinus Nijhoff Publishers, pp: 443–468, Boston, London.

Ristic M, Lewis G E (1977) *Babesia in man, wild and laboratory-adapted mammals*, Kreier JP (ed), *Parasitic Protozoa IV, Babesia, Theileria, Myxosporida, Microsporida, Bartonellaceae, Anaplasmataceae, Ehrlichia and Pneumocystis*, Academic Press, pp: 53–76, New York.

Robinson PM (1982) *Theileria annulata and its transmission—a review*, *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 14: 3–12.

Rodriguez SD, Palmer GH, Mcelwan TF, Mcguire TC, Ruef BJ, Chitko-Mckown MG, Brown WC (1996) *CD4+ T-helper lymphocyte responses against Babesia bigemina rhoptry-associated protein I*, *Infection and Immunity*, 64: 2079–2087.

Ros-Garcia A, Nicolas A, Garcia-Perez AL, Juste RA, Hurtado A (2012) *Development and evaluation of a real-time PCR assay for the quantitative detection of Theileria annulata in cattle*, *Parasites & Vectors*, 5: 171.

Rudolf I, Golovchenko M, Sikutová S, Rudenko N, Grubhoffer L, Hubálek Z (2005) *Babesia microti (Piroplasmida: Babesiidae) in nymphal Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in the Czech Republic*, *Folia Parasitol.*, 52(3): 274–276.

Ruebush TK, Cassaday PB, Marsh HJ, Lisker SA, Voorhees DB, Mahoney EB, Healy GR (1977) *Human babesiosis on Nantucket Island: clinical features*, *Ann. Intern. Med.*, 86: 6–9.

Salem GH, Liu XJ, Johnsrude JD, Dame JB, Roman RG (1999) *Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis*, *Mol. Cell Probes*, 13: 107-113.

Salih DE, Ahmed JS, Bakheit MA, Ali EB, El Hussein AM, Hassan SM, Shariff OE, Fadl M, Jongejan F (2005) *Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Theileria annulata infection in cattle*, *Parasitol. Res.*, 97: 302–308.

Salih DA, Liu Z, Bakheit MA, Ali AM, El Hussein AM, Unger H, Viljoen G, Seitzer U, Ahmed JS (2008) *Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis*, *Transbound. Emerg. Dis.*, 55: 238–243.

Salih DA, El Hussein AM, Seitzer U, Ahmed JS (2007) *Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan*, *Parasitol. Res.*, 101: 1035–1044.

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

Sato M, Kamio T, Kawazu S, Taniguchi T, Minami T, Fujisaki K (1993) *Histological observations on the schizonts in cattle infected with Japanese Theileria sergenti*, *J. Vet. Med. Sci.*, 55(4): 571-574.

Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı B A, Eren H, Friehoff K T, Müller I (1996) *Studies of sero-prevalance Babesia infection of cattle in Turkey*, Özcel MA (ed), *New Dimensions*, *Parasitol.*, 20(1): 505-516.

Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, İnci A (1989) *Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar*, *Türk Vet. Hek. I. Bilim Kongresi, Bildiri özetleri, Tebliğ no:103, 26-29 Eylül, İstanbul.*

Sayın F, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H (1999) *Ankara yöresinden elde edilen Theileria annulata (Dschunkowsky ve Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar*, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46(2-3): 207- 218.

Sayın F, Dinçer S, Çakmak A, İnci A, Yukarı A, Vatanserver Z, Nabantoğlu S, Deniz A (1997) *Tick-borne diseases in Turkey*, *Trop. Anim. Health Prod.*, 29(4): 53.

Sayın F, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı B A, Eren H, Vatansever Z, Nalbantoglu S (2003) *Studies on the Epidemiology of Tropical Theileriosis (Theileria annulata Infection) in Cattle in Central Anatolia, Turkey*, Trop. Anim. Health Prod., 35(6): 521-539.

Sayın F, Dinçer S, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Nalbantoglu S, Vatansever Z (2000) *Türkiye'de tropikal theileriosis üzerine araştırmalar*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 47 (1): 1- 11.

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

Sayın F, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Dinçer Ş, Vatansever Z, İnci A, Yukarı B A, Eren H, Günay M, Onar E, Alp H (2004)*Türkiye'de tropikal theileriosis üzerine araştırmalar*, Turk. J. Vet. Anim. Sci., 28: 963-971.

Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, Zeybek H, Dünder B, Nalbantoğlu S, Vatansever Z, Yaralı C, Deniz A (2005) *Sığırlarda tropikal theileriosis üzerine epidemiyolojik araştırmalar*, Etlik Vet. Mik. Derg., 16(1-2): 43-55.

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

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

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

Schnittger L, Katzer F, Biermann R, Shayan P, Boguslawski K, Mckellar S, Beyer D, Shiels BR, Ahmed JS (2002) *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*, Mol. Biochem. Parasitol., 120:247–256

Seifert HHS (1996) *Tropical Animal Health*, Kluwer Academic Publishers, 352-355.

Sergent E, Donatien A, Parrot L, Lestoquard F (1945) *Etudes sur les piraplasmes bovines*, Institut Pasteur d'Algerie, Algiers.

Sevgili M, Çakmak A, Gökçen A, Atlas M G, Ergun G (2010) *Prevalance of Theileria annulata and Babesia bigemina in cattle in the vicinity of Şanlıurfa*, Journal of Animal and Veterinary Advances, 9 (2): 292-296.

Sevinç F, Sevinç M, Birdane FM, Altınöz F (2001) *Prevalence of Babesia bigemina in cattle*, Revue Med. Vet., 152(5): 395-398

Shah-Fischer M, Say RR (1989) *Manual of tropical veterinary parasitology*, C.A.B. Int, Wallingford, UK.

Shahnawaz S, Ali M, Aslam MA, Fatima R, Chaudhry ZI, Hassan MU, Ali M, Iqbal F (2011) *A study on the prevalence of a tick-transmitted pathogen, Theileria annulata and hematological profile of cattle from Southern Punjab (Pakistan)*, Parasitol. Res., 109: 1155–1160.

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

Sharma RD, Brown CGD (1981) *In vitro studies on two strains of Theileria annulata*, Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (eds), *Advances in the control of Theileriosis*, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 140-143, Boston, London.

Shayan P, Ahmed A J S (1997) *Theileria-mediated constitutive expression of the casein kinase II-alpha subunit in bovine lymphoblastoid cells*. Parasitol. Res, 83(6): 526–532.

Shayan P, Biermann R, Schein E, Gerdes J, Ahmed JS (1998) *Detection and differentiation of Theileria annulata and Theileria parva using macroschizont-derived DNA probes*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 849: 88–95.

Shayan P, Rahbari S (2005) *Simultaneous differentiation between Theileria spp. and Babesia spp. on stained blood smear using PCR*, Parasitol. Res., 97: 281–286.

Shaw MK, Tilney LG, Musoke AJ (1991) *The entry of Theileria parva sporozoites into bovine lymphocytes: evidence for MHC class I involvement*, J. Cell Biol., 113(1): 87-101.

Shaw MK, Tilney LG (1992) *How individual cells develop from a syncytium: merogony in Theileria parva (Apicomplexa)*, J. Cell Sci., 101: 109–123.

Shaw MK, Young AS (1994) *The biology of Theileria species in ixodid ticks in relation to parasite transmission*, Advances in Disease Vector Research,10: 23-63.

Shaw MK (1997) *The same, but different: the biology of Theileria sporozoite entry into bovine cells*, Int. J. Parasitol, 27: 457–474.

Shaw MK (1999) *Theileria parva: Sporozoite entry into bovine lymphocytes is not dependent on the parasite cytoskeleton*, *Experimental Parasitology*, 92: 24–31.

Shaw MK (2002) *Theileria development and host cell invasion*, Dobbelaere DAE, McKeever DJ (eds) *World Class Parasites*, Kluwer Academic Publishers, pp 1–22, Boston, London, UK.

Shaw MK (2003) *Cell invasion by Theileria sporozoites*, *Trends in Parasitology*, 19(1): 2–6.

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

Shiels BR, D'Oliveira C, McKellar S, Ben Miled L, Kawazu S, Hide G (1995). *Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of Theileria parasites*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 72: 149-162.

Shoda LK, Palmer GH, Florin-Christensen J, Florin-Christensen M, Godson DL, Brown WC (2000) *Babesia bovis-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro*, *Infection and Immunity*, 68: 5139–5145.

Sibeko KP, Oosthuizen MC, Collins NE, Geysen D, Rambritch NE, Latif AA, Groeneveld HT, Potgieter FT, Coetzer JA (2008) *Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of Theileria parva infections in Cape buffalo (Syncerus caffer) and cattle*, *Veterinary Parasitology*, 155: 37–48.

Singh DK (1990) *Recent developments in research and control of Theileria annulata in India*, Dolan TT (ed), *Recent developments in the Research and control of Theileria annulata*, ILRAD, pp: 11-13, Nairobi.

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

Silva MG, Gisela Henriques G, Sanchez C, Marques PX, Suarez CE, Oliva A (2009) *First survey for Babesia bovis and Babesia bigemina infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods*, *Veterinary Parasitology*, 166: 66-72.

Silva MG, Marques PX, Oliva A (2010) *Detection of Babesia and Theileria species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method*, Veterinary Parasitology, 174: 199-205.

Sivakumar T, Altangerel K, Battsetseg B, Battur B, Aboulaila M, Munkhjargal T, Yoshinari T, Yokoyama N, Igarashi I (2012) *Genetic detection of Babesia bigemina from Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene-based PCR assay*, Veterinary Parasitology, 187(1-2): 17-22.

Smeenk I, Kelly PJ, Wray K, Musuka G, Trees AJ, Jongejan F (2000) *Babesia bovis and B. bigemina DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction*, J. S. Afr. Vet. Assoc. 71: 21–24.

Soulsby E JL (1982) *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*, Bailliere Tindall, pp: 733–735, London.

Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, De Vos AP, Caracappa S, Jongejan F (2000) *Integrated molecular diagnosis of Theileria and Babesia species of cattle in Italy*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 916: 533–539.

Sparagano OA, Carelli G, Ceci L, Shkap V, Molad T, Vitale F, Loria GR, Reale S, Caracappa S, Bouattour A, Almeria S, Castella J, Corchero E, Habela M (2002) *Pan-Mediterranean comparison for the molecular detection of Theileria annulata*. Ann. N.Y. Acad. Sci, 969: 73–77.

Suarez CE, Palmer GH, Jasmer DP, Hines SA, Perryman LE, Mc Elwain TF (1991) *Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton Babesia bovis merozoite protein with conserved and surface–exposed epitopes*, Mol. Biochem. Parasitol., 46: 45–52.

Suarez C E, Noh S (2011) *Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis*, Veterinary Parasitology, 180(1-2): 109-125.

Sugimoto C, Fujisaki K (2002) *Non-transforming Theileria parasites of ruminants*, Dirk AE Dobbelaere DAE, McKeever DJ (Ed), *Word Class Parasites*, Kluwer Academic Publishers, pp: 93-106, Boston, Dordrecht, London.

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

Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, Araz E, Haznedaroğlu T, Yukarı BA, Açııcı M (2002) *Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi*, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Proje No: VHAG-1418, 1-30.

Thammasirirak S, Siriteptawee J, Sattayasai N, Indrakamhang P, Araki T (2003) *Detection of Babesia bovis in cattle by PCR-ELISA*, S. E. Asian J. Trop. Med. Public Health, 34: 751-757.

Telford 3rd SR, Gorenflot A, Brasseur P, Spielman A (1993) *Babesial infection in human and wildlife*, Kreier JP, Baker JR (eds), *Parasitic Protozoa*, Academic Press, pp. 1–47, San Diego.

Telford 3rd S R, Goethert H K (2004) *Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new'?* Parasitology, 129: 301–327.

Terkawi MA, Huyen NX, Wibowo PE, Seuseu J, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I (2011) *Spherical Body Protein 4 Is a New Serological Antigen for Global Detection of Babesia bovis Infection in Cattle*. American Society for Microbiology, 18(2): 337-342.

Terkawi MA, Amornthep A, Ooka H, Aboge G, Jia H, Goo YK, Nelson B, Yamagishi J, Nishikawa Y, Igarashi I, Kawazu SI, Fujisaki K, Xuan X (2009) *Molecular characterizations of three distinct Babesia gibsoni rhoptry-associated protein-1s (RAP-1s)*, Parasitology, 136(10): 1147–1160.

Tetzlaff CL, Rice-Ficht AC, Woods VM, Brown WC (1992) *Induction of proliferative responses of T cells from Babesia bovis-immune cattle with a recombinant 77-kilodalton merozoite protein (Bb-1)*, Infect. Immun., 60: 644–652.

Tomley FM, Soldati DS (2001) *Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites*, Trends Parasitol, 17: 81–88.

Uilenberg G (1972) *Diagnosis of Babesia argentina infection in cattle using brain smears*, Australian Veterinary Journal, 48(9): 534.

Uilenberg G (1981) *Theilerial species of domestic livestock*, in *Advances in the Control of Theileriosis*, Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (eds), Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 4-37, Boston, London.

Uilenberg G (2006) *Babesia-A historical overview*, Veterinary Parasitology, 138: 3-10.

Uilenberg G, Perie NM, Lawrence JA, De Vos AJ, Paling RW, Spanier AAM (1982) *Causal agents of bovine theileriosis in South Africa*, Tropical Animal Health and Production, 14: 127-140.

Uilenberg G, Permin A, Hansen JW (1993) *Use of applicable biotechnological methods for diagnosing haemoparasites*, Proceedings of the Expert Consultation, p: 166, Merida, Mexico.

Uilenberg G, Perie NM, Spanjer AA, Franssen FF (1985) *Theileria orientalis, cosmopolitan parasites of cattle demonstration of the schizont stage*, Res. Vet. Sci., 38: 352–60.

Waltisbuhl DJ, Goodger BV, Wright IG, Commins MA, Mahoney DF (1987) *An enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose Babesia bovis infection in cattle*, Parasitol. Res., 73: 126–131.

Webster P, Dobbelaere DA, Fawcett DW (1985) *The entry of sporozoites of Theileria parva into bovine lymphocytes in vitro, immunoelectron microscopic observations*. Eur. J. Cell Biol., 36(2): 157-162.

Weiland G, Reiter I (1988) *Methods for serological response to Babesia*, Ristic M (ed), *Babesiosis of domestic animals and man*, CRC Press, p. 143–158, Inc., Boca Raton, FL.

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

Wenshun L, Hong Y (1994) *Bovine and ovine theileriosis in China and its immune prophylaxis*, European Union third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Temmuz, 7-10, Antalya-Turkey.

Williamson S, Tait A, Brown D, Walker A, Beck P, Shiels B, Fletcher J, Hall R (1989) *Theileria annulata sporozoite surface antigen expressed in Escherichia coli elicits neutralizing antibody*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 4639–4643.

Williamson S, Matita G, Ilhan T, Knight P, McDonald F, Shiels B and Boulter N (1994) *Sporozoite and piroplasm recombinants: Their potential for use in diagnostic ELISAs*, Third European Union Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey.

Wilson SM (1991) *Nucleic-acid techniques and the detection of parasitic diseases*, Parasitology Today, 7: 255-259.

Vannier E, Krause PJ (2009) *Update on Babesiosis*, Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 9.

Vatansever Z, Nalbantoğlu S, Deniz A, Çizmeçi Ş G (2002) *Sığırlarda bulunan Theileria ve Babesia türlerinin reverse line blotting tekniği ile eşzamanlı teşhisi*, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Proje No: VHAG-1640, 1-17.

Vatansever Z, Nalbantoğlu S (2002) *Sahada Theileria annulata ile enfekte sığırların nested PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), IFA (İndirekt Floresan Antikor) testi ve kan frotisi bakışı ile saptanması*, Turk. J. Vet. Anim. Sci, 26: 1465-1469.

Vial HJ, Gorenflot A (2006) *Chemotherapy against babesiosis*, Veterinary Parasitology, 138(1-2): 147-160.

Visser AE, Abraham A, Sakyi LJ, Brown CG, Preston PM (1995) *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, 17: 91-102.

Yeruham I, Pipano E, Davidson MA (1985) *A field strain of Babesia bovis apparently resistant to amicarbalide isethionate*, Tropical Animal Health and Production, 17(1): 29-30.

Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A, Önder Z, Çiloğlu A (2013) *Sığırlarda Babesia bovis ve Babesia bigemina'nın Reverse Line Blotting, Nested PCR ve Real Time PCR teknikleri ile karşılaştırmalı tanısı*, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(5): 895-902.

Young AS, Dolan TT, Morzaria SP, Mwakima FN, Norval RAI, Scott JS, Sherriff A, Gettinby G (1996). *Factors influencing infections in Rhipicephalus appendiculatus ticks fed on cattle infected with Theileria parva*, Parasitology, 113: 255–266.

Yokoyama N, Suthisak B, Hirata H, Matsuo T, Inoue N, Sugimoto C, Igarashi I (2002) *Cellular localization of Babesia bovis merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity*, Infect. Immun., 70: 5822–5826.

Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I (2006) *Erythrocyte invasion by Babesia parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage*, Vet. Parasitol., 138: 22–32.

Yu L, Terkawi MA, Cruz-Flores MJ, Claveria FG, Aboge GO, Yamagishi J, Goo YK, Cao S, Masatani T, Nishikawa Y, Xuan X (2013) *Epidemiological survey of Babesia bovis and Babesia bigemina infections of cattle in Philippines*, J. Vet. Med. Sci., 75(7): 995-998.

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

Zakimi S, Kim JY, Oshiro M, Hayashida K, Fujisaki K, Sugimoto C (2006) *Genetic diversity of benign Theileria parasites of cattle in the Okinawa Prefecture*, J. Vet. Med. Sci., 68: 1335–1338.

Zhang ZH (1990) *Theileria annulata* in control in China, Dolan TT (ed), *Recent Developments in the research and control of T. annulata*, Proceedings of Workshop, 17-18, Nairobi-Kenya.

Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS (2003) *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4): 622-636.

TEŐEKKÜR

Bana her türlü desteği sağlayan başta eŐim ve ailem olmak üzere, doktora tezimin çalışmalarında ve hazırlanmasında bana her türlü imkanı veren danıŐmanım Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ ile Anabilim Dalı baŐkanımız Prof. Dr. Hasan EREN'e teŐekkür ederim. Bunun yanında doktora çalıŐmalarım esnasında gerek materyal sağlamada gerekse de laboratuvar aşamasında bana her türlü desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Serkan BAKIRCI, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİ, Uzman Veteriner Hekim Hakan SARALI, Dr. Veteriner Hekim Murat HOŐGÖR, Uzman Doktor Veteriner Hekim Hakkı ÜNLÜ, AraÇ. Gör. Selin ÜNER HACILARLIOğLU ile diğer tüm arkadaşlara desteklerinden ve gösterdikleri hoŐgörüden dolayı teŐekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Denizli Sarayköy İlçesi'nde doğdu. İlk öğrenimini Denizli Atatürk İlkokulu, 19 Mayıs İlkokulu ve Aydın Yedieylül İlkokulu'nda; Orta öğrenimini Manisa Atatürk Ortaokulu ve Tütüncüoğlu Ortaokulu'nda; Lise öğrenimini Manisa Atatürk Lisesi'nde tamamladı. 1997 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı ve 2003 yılında mezun oldu. 2003 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladı ve 2006 yılında mezun oldu. 2006 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda Doktora'ya başladı. Gülcan PEKEL evli olup, çocuğu yoktur.