

138217

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIRLARDA BAZI BABESİA TÜRLERİNİN REVERSE LINE  
BLOTTING VE İNDİREK FLORESAN ANTİKOR TESTİ İLE  
KARŞILAŞTIRMALI TANISI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Veteriner Hekim Anıl İÇAY.G. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BOKÜ MANTASYON MERKEZİ

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK

Bu tez, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 01-50-5  
proje numarası ile desteklenmiştir

2003 - Ankara

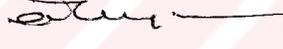
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Parazitoloji Doktora Programı**

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.04.2003

Prof. Dr. Ayşe BURGU  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Zafer KARAER  
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK  
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Arif KURTDEDE  
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Abdullah İNCİ  
Erciyes Üniversitesi



## ÖNSÖZ

Nüfusun hızla arttığı dünyamızda, yapılan çalışmalar 2020 yılında nüfusun 12 milyara ulaşacağını göstermektedir. Bu hızlı nüfus artışı karşısında, tüm insanlık dünyanın 12 milyar insanı nasıl taşıyacağını, kaynakların buna yeterli olup olmayacağını kısacası geleceğini düşünmektedir. Bu düşüncenin bir ürünü olarak 1992 yılında Rio De Janeiro'da yapılan çevre konferansında, yerkünün kaynaklarının belirlenmesi ve insanlara sunacağı kaynaklardan fazlasının alınmaması gerekliliği temelinde ortaya konan sürdürülebilir çevre ve kalkınma fikri tüm dünyada kabul görmüştür.

Bu çevre konferasına katılan Türkiye'de de durum farklı değildir. 2000'li yılların başında 70 milyona ulaşan ve artışına hızla devam eden nüfusa paralel olarak ortaya çıkan gıda açığı, ülkemizi kendi kendine yeten ülke konumundan çıkarmıştır. Gittikçe artan gıda açığının kapatılması için eldeki kaynaklar, bilinçsizce ve hoyratça harcanmakta ve sonuçta bu kaynaklar ya tükenmekte ya da kullanılamaz hale gelmektedir. Dolayısı ile sürdürülebilir kalkınma fikrinden de hareketle eldeki kaynakların iyi bir şekilde değerlendirilmesi, bu kaynaklardan elde edilen verimin rasyonel bir şekilde artırılması önem kazanmaktadır.

Ülkemizde hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında büyükbaş hayvanlardan elde edilen ürünlerin büyük bir yer tutması ve her geçen yıl bu ürünlere olan talebin artmasına karşın, Türkiye'deki sığır varlığı azalmaktadır. Mevcut sığır sayısı 1982'de 14 484 000 iken 2001 yılında 10 548 000'e gerilemiştir. Ancak sevindirici olan bir nokta ise mevcut olan sığırlardan elde edilen birim verim miktarını arttırmaya yönelik olarak yapılan çalışmaların sonuç vermeye başlamasıdır. Bu amaçla yurt dışından getirilen yüksek verimli kültür ırkı ve bunların yerli ırklarla melezlemeleri ile elde edilen kültür melezi sığırların sayısı artmaktadır. Türkiye'de 1990 yılında 1 013 000 kültür, 3 670 000 kültür melezi, 6 694 000 yerli ırk sığır mevcutken, 2001 yılında kültür ırkı sayısı 1 854 000, kültür melezi sayısı 4 620 000'e çıkmış, yerli ırk sığırların sayısı ise 4 074 000'e düşmüştür. Bu gelişmelere bağlı olarak süt üretimi, 1990 yılında 7 960 640 ton iken 2001 yılında 8 489 082'ye, et üretimi ise 1990 yılındaki 116 210 tondan 2001 yılında 161 057 tona çıkmıştır (Anon, 2001). Genel olarak, verimde bir artış olmasına karşın, bu istenen boyutlarda değildir. Bu artışın yeterince sağlanamamasının birçok nedeni vardır. Bunların başında, kültür ve kültür melezi sığırların, salgın hastalıklara karşı olan dayanıksızlığı ve bu hastalıklar konusunda hayvancılıkla uğraşan kişilerin bilinçsizliği gelmektedir. Bu hastalıklar içinde *Babesia*, *Theileria* gibi kene kökenli kan protozoonlarının neden olduğu babesiosis ve theileriosis'in yeri büyüktür. Bu hastalıklara yakalanan hayvanlarda büyük verim kayıpları meydana gelmekte, zamanında tedavi edilmediklerinde ölümlere yol açmaktadır. Kene kökenli hastalıkların kontrolünde, etkenin ve vektör kenelerin yayılım gösterdikleri bölgelerin tespiti, bu bölgelerde uygulanacak ilaçlama çalışmaları ve gerekli aşılama

çalışmalarının yapılması önem taşımaktadır. Bu mücadele yöntemlerinin belirlenmesinde, gerekli epidemiyolojik verilerin elde edilmesi için kullanılan serolojik testlerin yanında, vektör keneler için potansiyel enfeksiyon kaynağı olan taşıyıcı hayvanlarda etkenlerin bizzat kendisinin tespiti de önem taşımaktadır. Taşıyıcı hayvanların ortaya konmasında, son yıllarda gelişen moleküler biyolojik teşhis yöntemlerinin kullanılması gelecekte bu tür hastalıkların ülkedeki durumu ve buna karşı alınacak önlemlerin belirlenmesinde büyük yararlar sağlayacaktır.

Bu tez, “Sığırlarda Bazı *Babesia* Türlerinin Reverse Line Blotting (RLB) ve İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) ile Karşılaştırmalı Tanısı Üzerine Araştırmalar.” isimli proje olarak, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca, beni yönlendiren, bilimsel araştırma ve akademik terbiye kazandıran, her konuda ilgi ve desteklerini esirgemeyen ilk danışmanım Sayın Prof. Dr. Şükran Dinçer ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayşe Çakmak başta olmak üzere, bilgi ve ilgisini benden esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Zafer Karaer’e, RLB testinin uygulanmasında karşılaştığım her güçlükte desteğine başvurduğum Sayın Dr. Zati Vatansever’e, diğer laboratuvar ve saha çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalının tüm çalışanlarına, maddi, manevi her zaman yanımda olan eşime teşekkürlerimi borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. Babesiosis'in Tanımı ve Tarihçesi	1
1.2. <i>Babesia</i> Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri	3
1.3. <i>Babesia</i> Türlerinin Yaşam Döngüsü ve Gelişme Şekilleri	3
1.3.1. Omurgalı Konaktaki Gelişme	4
1.3.2. Vektör Kenelerdeki Gelişme	6
1.4. Babesiosis'in Klinik Belirtileri ve Patogenezi	8
1.5. Babesiosis'in Epidemiyolojisi	11
1.6. Dünya'da Sığır Babesiosis'i	14
1.7. Türkiye'de Sığır Babesiosis'i	16
1.8. Babesiosis'de Bağışıklık	21
1.9. Babesiosis'in Teşhisi	23
1.9.1. Parazitin Tespit Edilmesi	24
1.9.1.1. Mikroskopik Muayene	24
1.9.1.2. Nükleotid Tespiti	25
1.9.2. Spesifik Antikorların Tespiti	30
1.10. Babesiosis'in Tedavisi	31
1.11. Babesiosis'den Korunma	35
1.11.1. Vektör Kenelerle Mücadele	35
1.11.2. Preimmünisyon Kazandırılması	36
1.11.3. Aşılama	37
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	39
2.1. Saha Çalışmaları	39
2.2. Laboratuvar Çalışmaları	39
2.3 Kan Frotilerinin Yapımı ve Muayenesi	39
2.4. İndirek Floresans Antikor Testi	40
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	42
2.6 Reverse Line Blotting	45
2.7. Kenelerin Tür Teşhisi	51
2.8. İstatistiksel Değerlendirmeler	51
<b>3. BULGULAR</b>	52
<b>4. TARTIŞMA</b>	59
<b>5. SONUÇ</b>	65
<b>ÖZET</b>	66
<b>SUMMARY</b>	67
<b>KAYNAKLAR</b>	68

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

ARDS	Erişkin solunum baskılanma sendromu
bp	baz çifti
°C	Derece Celcius
cDNA	Komplementer deoksiribonükleikasit
CFT	Complement Fixation Test
DNA	Deoksiribonükleikasit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
fg	fikogram
$\gamma$ IFN	Gamma interferon
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test (İndirek Floresan Antikor Testi)
IgG	İmmunglobulin G
IL-12	İnterleukin 12
IL-18	İnterleukin 18
IL-4	İnterleukin 4
kb	kilobaz
ng	nanogram
NO	Nitrik oksit
pg	pikogram
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	ribozomal RNA
TNF $\alpha$	Tümör nekrosis faktör alfa

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. <i>Babesia</i> türlerinin yaşam döngüsü	8
Şekil 1.2. <i>Babesia bovis</i> 'e karşı gelişen kazanılmış ve doğal immün mekanizma	23
Şekil 2.1. PZR ürünlerinin RLB testine tabi tutulmasından sonra membranın görüntüsü	47
Şekil 3.1. Çalışma merkezlerine göre seroprevalans değerlerinin dağılımı	55
Şekil 3.2. RLB sonuçlarına göre babesiosis'in prevalansının çalışma merkezlerine göre dağılımı	57



## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1. Babesiosis’de kullanılan ilaçlar	33
Çizelge 2.1. PZR’da kullanılan primerler	50
Çizelge 2.2. Biodyne C membrana tutturulan aminolinkerli problemlerin 5’-3’ dizilişleri	50
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan problemlerin membrana tutturuluş sırası ve konsantrasyonları	50
Çizelge 3.1. Mikroskopik bakı, IFAT ve RLB sonuçlarının çalışma merkezlerine göre dağılımı	52
Çizelge 3.2. RLB, mikroskopik bakı ve IFAT sonuçlarının karşılaştırılması	53
Çizelge 3.3. Sığırlarda babesiosis etkenlerinin IFAT ve RLB pozitiflikleri	54
Çizelge 3.4. RLB ve IFAT sonuçlarının karşılaştırılması	54
Çizelge 3.5. Serolojik sonuçların çalışma merkezlerine göre dağılımı	55
Çizelge 3.6. RLB sonuçlarının çalışma merkezlerine göre dağılımı	56
Çizelge 3.7. Sığırlardan toplanan kene türlerinin çalışma merkezlerine göre dağılımı	57
Çizelge 3.8. Kene türlerinin aylara göre dağılımı	58

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Babesiosis'in Tanımı ve Tarihçesi

Babesiosis, tropik ve subtropik bölgelerde evcil ve yabani hayvanlarda yaygın olarak görülen ve *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial nakledilen protozoer bir hastalıktır. Piroplasmosis, tick fever, red water, Texas fever, splenic fever, tristeza olarak da isimlendirilen babesiosis *Babesia* türleri tarafından meydana getirilir. Bugüne kadar hastalığa sebep olan 73'den fazla tür tanımlanmış, türlerin 18'inin evcil memelilerde hastalığa neden olduğu bildirilmiştir. *Babesia* türlerinin coğrafik dağılımı vektör kenelerin yayılışları ile yakından ilgilidir (McCosker, 1981; Levine, 1985; Soulsby 1986; Friedhoff 1988).

Babesiosis etkeni ilk defa 1888 yılında Babes tarafından hemoglobinürili bir sığırdaki küçük intraeritrositik organizmalar olarak görülmüş ve *Haematococcus bovis* olarak tanımlanmıştır. Bunu takiben 1893 yılında Starcovici tarafından *Babesia bovis* olarak adlandırılmıştır. Diğer taraftan Smith 1889 yılında Texas Hummalı bir hastada gözlemlediği etkeni isimlendirmemiş, 1893 yılında Smith ve Kilborne bu paraziti önce *Pyrosoma bigeminum* daha sonra *Babesia bigemina* olarak isimlendirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, ilk defa patojenik bir protozoonun artropod bir ara konakla nakledilebileceğini bildirmişlerdir. Starcovici (1893), Smith ve Kilborne (1893) *B.bovis* ve *B.bigemina*'nın birbirine yakın olmasına karşın farklılıkların olabileceğini ifade etmişlerdir (McCosker, 1981; Kuttler, 1988). Lignieres, 1903 yılında Arjantin'de sığırlarda *B.bigemina*'nın 2 suşu olduğunu, bunlardan birinin Smith ve Kilborne'un tanımladığına benzer şekilde büyük, diğerinin ise daha küçük intraeritrositik etkenler olduğunu bildirmiştir (McCosker, 1981; Kuttler, 1988). Aynı araştırmacı, küçük olan etkenin, genellikle kan frotilerinde zor görülmesine karşın, böbrek ve merkezi sinir sisteminin meningeslerindeki kapillarlardan yapılan frotilerde daha kolay tespit edilebildiğini bildirmiş, 1910 yılında bu küçük organizmaları önce *Piroplasma argentina* daha sonra *Babesia argentina* olarak isimlendirmiştir. *B.argentina* ismi Avustralya ile Güney ve Orta Amerika'da uzun yıllar kullanılmıştır. Bu durum 1970'li yılların ortalarına kadar sürmüş, *B.argentina* ile

*B. bovis*'in aynı özelliklere sahip olduğu anlaşılmış ve isimlendirmede *B. bovis*'in kullanımının daha uygun olacağı kabul edilmiştir (McCosker, 1981; Kuttler, 1988).

M'Fadyean ve Stockman 1911'de İngiltere'de yine sığırlarda eritrosit içinde çift formları geniş açı yapan ve genellikle eritrositin periferinde yer alan etkenler tespit etmişler ve bunları önce *Piroplasma divergens* daha sonra *Babesia divergens* olarak isimlendirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından uzun yıllar bunlar *B. bovis*'e benzetilmiş ve *B. bovis*'le sinonim olarak kabul edilmiştir (McCosker, 1981; Kuttler, 1988).

M'Fadyean ve Stockman 1911 yılında *B. bigemina* 'ya benzer büyük bir etkenin bulunduğunu bildirmişler, daha sonra Sergent ve ark. 1926 yılında bu etkeni *B. major* olarak adlandırmışlardır (McCosker, 1981; Kuttler, 1988).

Brocklesby 1976 yılında, sığırlarda babesiosis etkenlerinden *B. bigemina*, *B. major*, *B. bovis* ve *B. divergens*'in önemli olduğunu bildirmiştir. Ancak son yıllarda serolojik çalışmalarla sığırlarda *B. ovata*, *B. jakimovi*, *B. occultans* gibi türlerin de varlığı tespit edilmiştir (Kuttler, 1988).

## 1.2. *Babesia* Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri

*Babesia* türlerinin sınıflandırmadaki yeri aşağıda verildiği gibi belirlenmiştir (Boch ve Supperer, 1983; Hiepe ve Jungman, 1983).

Alem: Animalia

Alem Altı: Protozoa

Kök: Apicomplexa

Sınıf: Sprozoa

Sınıf Altı: Piroplasmia

Dizi: Piroplasmida

Aile: Babesidae

Tür: *Babesia bigemina*

*Babesia bovis*

*Babesia divergens*

*Babesia major*

*Babesia ovata*

*Babesia jakimovi*

*Babesia occultans*

## 1.3. *Babesia* Türlerinin Yaşam Döngüsü ve Gelişme Şekilleri

*Babesia* türleri, obligat heteroksen gelişen protozoonlardır. Gelişmesini, omurgalı konaklar ile *Ixodidae* ailesine bağlı kenelerde sürdürürler. Her bir *Babesia* türünün geliştiği gerek omurgalı, gerekse *Ixodidae* keneleri türe özgüdür. Hiçbir zaman sığırdaki bulunan bir tür koyunda, koyundaki tür ata, attaki tür ise köpekte gelişemez; aynı durum omurgalıdaki gibi olmasa da keneler için de geçerlidir. Ancak hayvanlarda bulunan bazı *Babesia* türlerinin (*B. equi*, *B. microti* ve *B. divergens*) insanlarda da gelişebildiği görülmüştür. *Babesia* türlerinin omurgalılarda ve kenelerdeki gelişmesi esnasında farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Purnell, 1981).

### 1.3.1. Omurgalı Konaktaki Gelişme

Sığırlarda babesiosis meydana getiren etkenler, öküz, zebu, manda, Afrika bufalosu karaca ve geyiklerde de tespit edilmiştir. *Babesia divergens* ayrıca insanlarda da enfeksiyona yol açması sebebiyle zoonotik bir etkindir. Sığırlardaki *Babesia* türleri de diğer *Babesia* etkenleri gibi omurgalıda gelişme ve çoğalmalarını eritrositlerde gerçekleştirirler (Purnell, 1981; Levine, 1985).

Duyarlı hayvana, keneler tarafından kan emme esnasında verilen küçük ve uzamış şeklindeki sporozoitler, ön kısımlarında polar halka, mikronemler ve roptriden oluşan apikal komplekse sahiptirler. Hücre dışı serbest merozoitler ve sporozoitler, plazma membranına yapışık fibrillerden meydana gelen, fuzzy-coat denen yüzey örtüsü ile kaplıdır. Kenenin kan emmesi ile omurgalı konağa verilen bu parazitler endositozisle, konak hücre olarak kullandıkları eritrositlerin içine çekilerek, yutulurlar. Sporozoitlerin eritrositlere giriş işlemi 3 aşamada gerçekleşir. İlk aşamada, sporozoitler eritrosit yüzeyine göre pozisyon alırlar ve birbirilerine bitişirler. Penetrasyondan önce sporozoit, ön ucu ile konak hücreye yapışıp, roptri içeriğini boşalttıktan sonra, membranda invaginasyon başlar. *Babesia* sporozoitlerinin yüzeyinde bulunan ve ilk yapışma olayında büyük önem taşıyan fuzzy-coat, invaginasyon sırasında giriş kısmında çıkarılır ve geride bırakılır. Parazit, invagine olan membranın içine girdikten sonra, membranın kenarları parazitofor vakuolü meydana getirmek üzere birleşir. Böylece sporozoit, dışta konak hücreye, içte ise parazite ait olmak üzere iki katlı membranla sarılmış olur. Parazit eritrosite girdikten sonra bu parazitofor membran kalkar ve plazma membranı direk eritrositin sitoplazması ile karşı karşıya kalır. Bundan sonraki safhalarda parazit tek katlı membranla yaşamını devam ettirir. Serbest merozoitlerin hücreye girişinde de aynı olaylar şekillenir (Rudzinska, 1981; Mehlhorn ve Schein, 1984).

Sporozoit eritrosite girdikten sonra trofozoite dönüşerek, yuvarlak bir şekil alır. Bu formda parazitin sitoplazması ribozomlarla doludur ve endoplazmik retikulum belirgindir. Çekirdeğin etrafında yoğunlaşmış, ilkel golgi aygıtı olarak kabul edilen veziküller vardır. Trofozoitin gelişmeye devam etmesi ile sitoplazmada değişimler

başlar ve yeni organeller meydana gelir. Golgi aygıtından köken alan, bu aygıt ile ilişki halinde olan mikronemler ve roptriler şekillenir. İki katlı bir membranla çevrilmiş olan çekirdekte nükleoplazma homojen ve az yoğun bir yapıya sahiptir. Çekirdeğin homojen yapısı trofozoitin tüm gelişimi boyunca, üreme safhalarında ve merozoitlerde de aynıdır. Üremeden önce çekirdekte bölünme olmaz. Bölünmenin son safhasına kadar, çekirdeğin bir parçası ana vücuda bağlıdır. Trofozoitin olgunlaşması ile, sitoplazmada meydana gelen değişimler sonucunda, mikronemler, roptriler, mikrotubuller, polar halka ve konoid oluşur. Merozoitleri oluşturmak üzere, olgun trofozoitin uç kısmında tomurcuk şeklinde çıkıntı meydana gelerek, bölünme başlar. Çekirdeğin yapısı da değişerek, yeni oluşan merozoitlere doğru uzantı yapar. Şizogoniye benzer tarzda ikiye bölünme şekillenmesine karşın, şizogonide çekirdeğin bölünmesi, sitoplazmadaki değişimler ve bölünmeden önce gerçekleşir. Bu bölünme sırasında, parazit yuvarlak, oval formdan, amoeboid ve armut formlarına kadar değişen şekillerde gözlenir. *Babesia bigemina* merozoitleri, diğer türlere göre daha büyüktür. Daha sık rastlanan yuvarlak formlar, 2-3  $\mu$  çapında, uzamış formları ise, 4-5  $\mu$  uzunluğundadır. Bölünen formların arasında dar bir açı meydana gelir. *Babesia bovis*'de eritrositlerdeki merozoitler, yuvarlak, amoeboid veya çubuk şekildedir ancak vakuollü yüzük şeklindeki formlar daha yaygındır. *B. bigemina*'da görülen büyük amoeboid formlar görülmez. *B. bovis* merozoitleri 2.4x1.5  $\mu$ m büyüklüğündedir ve eritrositlerin orta kısımlarında yer alırlar. Ölümden kısa süre sonra iç organlardan yapılan frotilerde görülen formlar, büzüşmüştür ve perifer kandan alınanlara göre daha küçüktürler. *Babesia divergens*'de ise merozoitler genellikle çift halde, sopa şeklinde ve yaklaşık 1.5x0.5  $\mu$ m büyüklüğündedir. Çift armut şeklindeki merozoitlerin arasındaki açı geniştir ve konak eritrositinin periferine yerleşme eğilimindedirler. Diğer merozoitler, daha tombul, çomak şeklinde (2 x 1  $\mu$ m) veya yuvarlak (2  $\mu$ m'ye kadar) şekildedir ve amoeboid formlar nadiren görülür. Çoğalma sonrası bazı türlerde, 2 merozoit oluşurken, bazılarında tetrat şeklinde 4 merozoit oluşur. Oluşan merozoitler, birbirinden ayrılır ve eritrositlerin membranını parçalayıp, dışarı çıkarak yeni eritrositleri enfekte ederler. Bu eşeysiz safha sınırsız şekilde sürer, hayvanlar bazen ömür boyu enfekte kalabilirler (Herning, 1956; Hoyte, 1971; Rudzinska, 1981; Anon, 1984; Mehlhorn ve Schein, 1984; Friedhoff, 1988).

Merozoitler, eritrositlere başarılı bir şekilde girdikten sonra, gelişir ve çoğalırlar. Bu olay sırasında konak hücreler de etkilenir ve morfolojik değişimler sekillenir. *Babesia bigemina* ile enfekte eritrositler, enfekte olmayan eritrositlere göre daha büyüktür ve yüzey membranlarında bozulmalar, çıkıntılar meydana gelir. Özellikle bu çıkıntılarının daha fazla olduğu *B.bovis*'de kapillarların endotel hücrelerine yapışması ile serebral babesiosis meydana gelir. Bazı *B.bovis* suşları benzer bir etkiyi böbrek kapillarlarında da göstermektedir. Bu çıkıntılarının daha çok virulent *B.bovis* suşlarında meydana geldiği saptanmıştır (Mehlhorn ve Schein, 1984).

### 1.3.2. Vektör Kenelerdeki Gelişme

*Babesia*'nın keneler aracılığı ile naklinin, 1893 yılında Smith ve Kilborne tarafından saptanması, parazitolojide önemli bir dönüm noktası olmuştur (Mehlhorn ve Schein, 1984; Soulsby, 1986).

*Babesia bigemina*, *Boophilus microplus*, *B.decolaratus*, *B.annulatus* ve *Rhipicephalus evertsi* (Friedhoff ve Smith, 1981; Anon, 1984), *Babesia bovis*, *Boophilus calcaratus*, *B.microplus*, *B.geiye* ve *Ixodes ricinus* (Riek 1966, Akinboade ve Dipeolu, 1981; Friedhoff ve Smith, 1981; Friedhoff, 1988) *Babesia divergens* ise *Ixodes ricinus* ve *I.persulcatus* (Donnelly ve Peirce 1975; Levine, 1985; Soulsby, 1986; Friedhoff, 1988; Bouattour ve Darghouth, 1996) kene türleri tarafından nakledilmektedir.

Yukarıda belirtilen kene türlerinin, enfekte hayvanlardan kan emmesi esnasında, eritrositler içindeki etkenleri almasıyla vektördeki gelişmeler başlar. Eritrositlerdeki, parazitler trofozoitlere dönüşerek, yeni merozoitleri meydana getirirken, özellikle ovoid ve yuvarlak formlar gametositleri meydana getirirler. Kan emme esnasında alınan bu formlar, kenenin bağırsağında beslenmesinden 2 gün sonra sitostom, mikrotubuller, ok benzeri yapılar ve uzun bir kuyruk kazanarak, gametleri meydana getirirler. Beslenmeden 2-4 gün sonra ışınal cisimlerin ikisi,

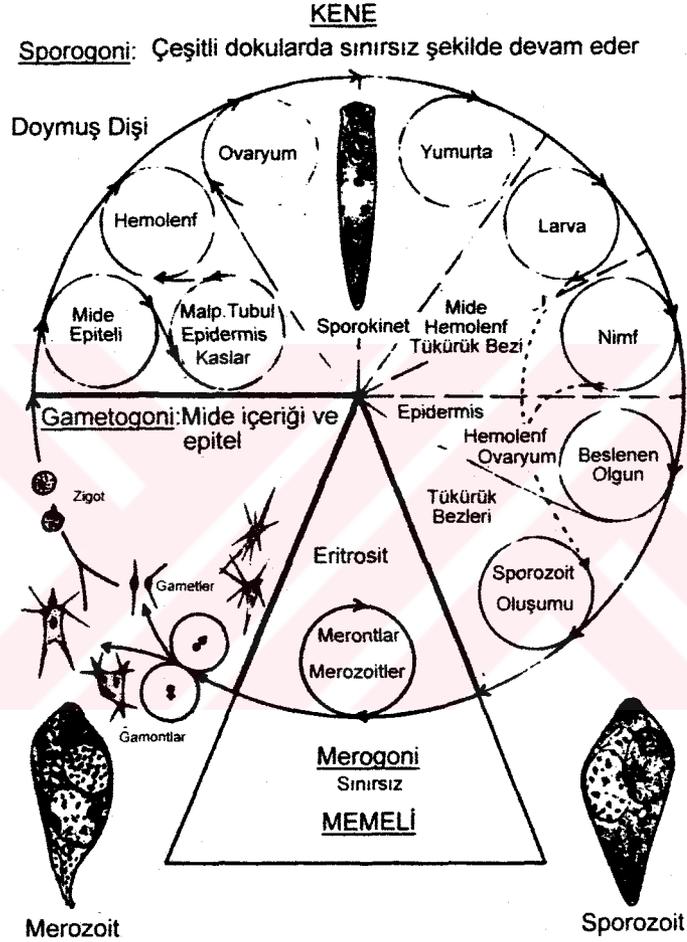
hücre membranları tek olan zigotu oluşturmak için temas noktalarından kaynaşırlar. Zigotu meydana getiren gametler ışık mikroskopta izogamet gibi görünmesine rağmen, farklı elektron yoğunluğu olması sebebiyle anizogamet olarak kabul edilirler. Fertilizasyondan sonra zigotlar, oluşan ok benzeri yapılar aracılığı ile midenin peritrofik membranını geçip, epitelial hücrelere girdikten sonra bu yapılarını kaybederler (Friedhoff, 1981; Mehlhorn ve Schein, 1984).

Bağırsakta oluşan zigottan, üç katlı membranla örtülmüş, ön ucu şemsiye şeklinde olan kinetler gelişir. Bu kinetler, 11-12 µm uzunluğundadırlar ve apikal komplekse ait çok sayıda mikronem, subpelliküler mikrotubul, polar halka ve roptriye sahiptirler. Buna karşın, golgi kompleksi, mitokondri ve konoid bulundurmazlar (Hoyte, 1971; Friedhoff, 1981; Anon, 1984; Friedhoff, 1988).

Bağırsağı delen kinetler, hemolenf aracılığı ile vektör kenenin hematositleri, kas fibrilleri, malpighi tubul hücreleri ve dişi kenelerde ovaryum hücrelerini bulduran çeşitli dokularına girerler. Bu dokularda geçirdikleri eşeysiz çoğalmalar sonucunda yeni kinetler meydana gelir. Bu döngü kene ölünceye kadar sınırsız olarak devam eder. Transovarial nakil sebebiyle yumurtalar ve bu yumurtalardan gelişecek yeni nesiller de enfekte olurlar. Benzer bölünmeler, embriyoda, beslenen, doymuş veya gömlek değiştiren larva, nimf ve ergin kenelerin çeşitli organlarında da meydana gelir (Friedhoff, 1981; Mehlhorn ve Schein, 1984).

*Babesia*'nın sığırlar için enfektif hale gelebilmesi, kenenin larva veya nimf aşamasındaki gömlek değiştirmesine bağlıdır. Larva gömlek değiştirdikten sonra, konağa tutunmasından sonraki 5. günde kinetler tükürük bezinde tespit edilebilirler. Tükürük bezi hücrelerine penetrasyonla giren kinetler, karakteristik yapılarını kaybederler ve polimorfik sporontlara dönüşmeye başlarlar. Sporontlar konak hücrelerini ve çekirdeğini hipertrofi yönünde uyarır ve bazı türlerde enfekte alveollerde belirgin bir genişlemeye sebep olurlar (Mehlhorn ve Schein, 1984; Aikawa ve ark., 1985; Soulsby, 1986).

Tüm türlerde, sporontun çoğa bölünmeleri sonucunda meydana gelen sporozoitlerin gelişimi sadece enfekte kene, omurgalı bir konağa tutunduğunda başlar ve genellikle 5 gün içinde tamamlanır. Bir alveolde üretilen 5 000-10 000 sporozoit kan emme esnasında omurgalı konağa verilir, böylece yaşam döngüsü tamamlanmış olur (Friedhoff, 1981; Mehlhorn ve Schein, 1984; Soulsby, 1986).



Şekil 1.1 *Babesia* türlerinin yaşam döngüsü (Friedhoff, 1981).

#### 1.4. Babesiosis'in Klinik Belirtileri ve Patogenezi

Babesiosis'de klinik belirtiler, etkenin kene ile konağa verilmesinden sonra 8-15 günlük inkübasyon süresini takiben ortaya çıkar. Hastalığın ilk belirtisi olan ateş, eritrositik paraziteminin artmasına paralel olarak 41-41,5°C'ye çıkar ve bir hafta

veya daha fazla devam edebilir. Akut formda, özellikle *B.bovis*'in sebep olduğu hastalıkta, hipertansif şok tablosu görülür. Hasta hayvanlar sakin ve bitkindir, iştah azalır, ruminasyon durur. Dışkı yeşilimsi kahverenkli ve kan izleri görülür. Gözler içe çökmüş şekildedir. Sekonder belirtiler olarak, kas titremeleri ve dış gıcırdatma görülebilir. Etkenlerin eritrositlere girmeleri ve onları parçalamaları sebebiyle şiddetli bir anemi vardır. Eritrositlerin %75'e yakını yıkımlanır. Hemoglobini çoğunlukla olmasına karşın bazı olgularda görülmeyebilir. Hasta hayvanlar zayıflamıştır, hemoglobiniyi takiben bazı türlerde (örneğin *B.bigemina*) görülen sarılığa, subakut vakalarda rastlanmaz. Akut olgularda 4-8 gün içinde ölüm görülür. Tedavi edilmeyen hayvanlarda mortalite, %50-90 arasında değişir. Kronik durumlarda, ateş çok yüksek değildir ve genellikle hemoglobini görülmez. Hastalığın başlangıcındaki ishal yerini konstipasyona bırakır (Jack ve Ward, 1981; Anon, 1984; Levine, 1985; Wright ve Goodger, 1988; Sonenshine, 1993).

Hastalığın şiddeti, tür veya suşlar arasındaki virulans farklılığına ve sığırın ırkına göre değişmektedir. Hastalık etkenleri özellikle erişkin hayvanlar için daha patojendir. Bir yaşından küçük olan hayvanlar anneden kolostrumla geçen antikorlar sebebiyle hastalıktan ciddi olarak etkilenmezler (Anon, 1984; Levine, 1985; Wright ve Goodger, 1988; Sonenshine, 1993).

Babesiosis'in patogenezinin temeli, eritrositlerdeki devamlı ve şiddetli parazitemi sonucu meydana gelen anemi ve anemik anoksidir. Anemi rejeneratif tipte olup, kan tablosuna bakıldığında retikülositler ve çekirdekli eritrositler görülür. Parazitli eritrositler genel dolaşımında çoğunlukla, beyin, çizgili kaslar ve böbreklerdeki kapillar damarlarda bulunurlar. Meydana gelen vazodilatasyon ve azalan kan dolaşımı sebebiyle, non-spesifik genel bir yangı tablosu oluşur. Azalan kan dolaşım hızı sebebiyle, bazı hayati organlarda anoksi meydana gelir ve parazitin toksik ürünleri ya da organlardan kaynaklanan metabolik ürünlerle genel bir organ tahribatı oluşur. Retiküloendotelial sistem hücrelerinin özellikle de histiyositlerin, ölü, anormal eritrositleri ve çözünmüş fibrini uzaklaştırması yanında enfekte eritrositleri uzaklaştırmada da rolü vardır. Histiyositler, dalak ve lenf nodüllerinin

sinüsleri ile karaciğerin sinüzoidlerini doldurarak bu organlarda hipertrofi ve hiperplazilere yol açarlar. Dalak ve lenf yumruları, ödem ve hemoglobinemiye bağlı olarak büyümüş ve siyah renklidir. Hemolitik olaylara oldukça duyarlı olan böbreklerde, glomeruluslar ve renal tubuller hemoglobin ile doludur. Normal şartlarda renal tubullerden geri emilebilen hemoglobin, miktarın fazla olduğu durumlarda emilemeyerek idrara geçer. Böbrekteki hasar hemolizin şiddetine bağlıdır. Akut olaylarda, böbrek büyümüş ve siyah renklidir, idrar kesesi, kırmızı renkli idrarla doludur (Jack ve Ward, 1981; Sonenshine, 1993).

Koagulasyon mekanizmasında meydana gelen bozukluklar da hastalığın patogeneğinde önemli bir yer tutar. Özellikle *B. bovis* enfeksiyonlarında, koagulasyon mekanizmasında ciddi bozukluklar meydana gelir. *B. bigemina*'da vasküler koagulasyon bozukluklarının meydana gelebilmesi için  $10^{12}$ - $10^{13}$  parazit gerekli iken *B. bovis* için bu miktar  $10^9$ - $10^{10}$ 'dur. Bilinenin aksine, yaygın intravasküler koagulasyon meydana gelmemesine karşın, pıhtılaşma süresinde azalma ve fibrinojen metabolizmasında değişiklikler oluşur. Koagulasyon zamanında meydana gelen bu şekildeki şiddetli düşüşler, akut babesiosis'in sebep olduğu en tehlikeli bozukluk olan kapillar stasise neden olur. Fibrinojen konsantrasyonundaki ve çözülmüş fibrindeki artış, plazma viskozitesini arttırdığı için, enfekte eritrositler birbirilerine yada endotelial hatta yapışırlar. Tüm bu olaylar, hayati organlara giden kapillar damarlarda, kan akışının durmasına sebep olur. Ayrıca etkenler, anafatoksin C3a ve C5a'nın üretimine sebep olan komplementleri de aktive ederler. Bu toksinler, damarları genişleterek, bradykinin ve kallikreinin aktivasyonuna sebep olur. Buna paralel olarak bradykinin ve kallikrein miktarını azaltan, serum karboksipeptidaz aktivitesi azalır. Bu faktörler, güçlü vasodilatasyona bağlı, şok sendromuna sebep olurlar. Virulent *Babesia* türlerinde,  $1 \times 10^9$  veya daha fazla parazit şok sendromunun oluşumuna sebep olabilir (Wright ve Goodger, 1988).

*Babesia*'nın diğer önemli fizyopatolojik etkisi ise bradykinine bağlı olarak şekillenen, non-spesifik yangıdır. Bu olay aynı zamanda azalan kortikosteroid miktarı ile de ilgilidir. Azalan kortikosteroid konsantrasyonu, prostoglandinlerin ve

komplementin aktivasyonuna katkıda bulunarak, koagülasyon sistemini aktive eder ve koagülasyon durumunu artırır. *Babesia* türlerinin diğer patolojik etkileri, plazma lipoproteinlerinde artma, karaciğer paransim hücrelerine yağ infiltrasyonu, immun komplekslerin üretimi ve plazma proteinlerinde meydana gelen değişiklikler olarak sayılabilir. Virulans, *Babesia* türlerine göre değişmektedir. Genellikle, *B. bovis*, *B. bigemina*'dan daha şiddetli bir enfeksiyona neden olmaktadır (Jack ve Ward, 1981; Sonenshine, 1993).

### 1.5. Babesiosis'in Epidemiyolojisi

Babesiosis'in epidemiyolojisinde, bölgenin iklim özellikleri, vejetasyon durumu, coğrafik konumu, bölgede bulunan vektör kene türleri, bunların mevsimsel aktiviteleri, spesifik konaklarının varlığı, kene enfestasyon ve enfeksiyon oranları, önceki yıllarda, o bölgedeki hastalıkların durumu, bunların yayılışları ve mevsimlere göre dağılımları değerlendirilmektedir (McCosker, 1981).

Hastalık vektör kenelerin ekolojik özelliklerinden dolayı, mevsimsel olarak seyretmektedir. Bu nedenle hastalık, bölge özelliklerine göre kenelerin aktif olduğu dönemlerde görülmektedir. Türkiye için bu dönemler ilkbahar ve yaz aylarıdır (Sayın ve Dumanlı, 1982).

Vektör keneler ve bunların doğru teşhisi, babesiosis'in epidemiyolojisinde çok önemli bir yere sahiptir. *Babesia bigemina*'yı *Boophilus microplus*, *B. decoloratus*, *B. annulatus* ve *Rhipicephalus evertsi* türleri nakletmektedir. Enfeksiyon, *Boophilus* türlerinin dışısının beslenmesi sırasında alınmakta, nimf ve olgun safhalarında ise duyarlı başka konaklara verilmektedir (Büscher 1988; Friedhoff, 1988). Bu türlerde vertikal nakil görülmesine karşın, farklı bölgelerden alınan *Boophilus* kenelerinin, farklı endemik bölgelerden elde edilen *B. bigemina* suşlarını nakletmediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar açıkça göstermektedir ki, vertikal nakil transstadial nakile göre çok daha yüksek oranda adaptasyona ihtiyaç duymaktadır (Yossef, 1980; Büscher 1988; Friedhoff, 1988). *Boophilus annulatus*'un da *B. bigemina*'yı vertikal

olarak naklettiği çeşitli deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur (Muangyai, 1974; Büscher 1988, Ouhelli ve Schein 1988).

Neitz (1956), *Babesia bigemina*'yı *Rhipicephalus evertsi*'nin larva ve erginlerinin naklettiğinden bahsetmesine karşın, Friedhoff (1988) enfeksiyonun bu kene türünün sadece nimfleri tarafından nakledildiğini bildirmiştir. Büscher (1988) ise, *R.evertsi*'nin vektörlüğünü doğrularken, duyarlılığının *Boophilus* türlerine göre daha düşük olduğunu bildirmiştir. Ayrıca enfekte *R.evertsi* nimflerinin kan emme ile etkeni omurgalı konağa verdikten sonra enfeksiyondan arındığı ve sonraki dönemlerinin steril olduğu tespit edilmiştir (Callow ve Hoyte, 1961; Potgieter ve Els, 1977; Mahoney ve Mirre, 1979; Friedhoff, 1988).

*Babesia bovis* ise *Boophilus calcaratus*, *B.microplus*, *B.geyi* ve *Ixodes ricinus* türleri tarafından nakledilmektedir (Friedhoff, 1988). Nakilde *Boophilus* türlerinin larvaları önem taşımaktadır. Larvalar enfeksiyonu bulaştırdıktan sonra enfektivitelerini kaybederler. Bu larvalardan gelişen nimf ve olgunlar enfekte değillerdir ve hastalığın naklinde rol almazlar. Dolayısıyla *B.bovis* in sebep olduğu hastalığın naklinde, alimenter enfeksiyon ve transovarial nakil temel teşkil etmektedir (Friedhoff ve Smith, 1981). Muangyai (1974) ve Yossef (1980) yaptıkları deneysel çalışmalarda *B.microplus* 'un *B.bovis*'i transovarial olarak naklettiğini ortaya koymuşlardır.

*Babesia divergens*'i *Ixodes ricinus* ve *I.persulcatus* keneleri transovarial ve transstadial olarak nakletmektedir (Donelly ve Peirce 1975; Levine, 1985 Soulsby, 1986; Friedhoff, 1988; Bouattour ve Darghouth, 1996). Dişi kenenin kan emmesi esnasında alınan enfeksiyon, *I.ricinus*'un larva, nimf ve olgun safhalarının tamamı tarafından nakledilmektedir (Friedhoff ve Smith, 1981). *B.major*'un vektörlüğünü ise *Haemaphysalis punctata*'nın yaptığı tespit edilmiştir (Morzaria ve ark, 1977, Friedhoff, 1988).

*Babesia* türlerinin kenedeki gelişimi ve naklini; sıcaklık, nisbi nem, ışık, kenenin yaşı, *Babesia*'nın kene üzerine patojen etkisi gibi bir çok faktörün etkilediğinden bahsedilmektedir (Friedhoff ve Smith, 1981; Friedhoff, 1988).

*Babesia* türlerinin vektördeki çoğalması sadece kenenin aktif olduğu dönemde gerçekleşir. Bu dönem ılıman iklim kuşaklarında, kısa bir zaman dilimini kapsamaktadır. Kenenin inaktif olduğu dönemlerde, *Babesia* etkenleri de kenenin vücudunda inaktif haldedirler. Enfekte kene aktive olduktan sonra çeşitli organların hücrelerinde çoğalmalar başlar ve 1-2 gün sonra sporokinet ve sporozoitler oluşur (Friedhoff, 1988).

Kenenin aktivasyonunu etkileyen en önemli faktör ise sıcaklıktır. Ilıman iklim kuşaklarında keneler, sıcaklığın düşük olduğu kış aylarında inaktiftirler. Örneğin, 20°C'de *Boophilus microplus* kenesinde *Babesia bigemina*'nın transovarial ve transstadial nakli tamamen inhibe edilmiş durumdadır. Yüksek sıcaklığın ise değişken bir etkisi vardır. Sürekli yüksek ısı enfeksiyonu inhibe eder, hatta ortadan kaldıracaktır (Ouhelli ve ark., 1987).

*Babesia* türlerinin vektör kenelerin yaşama ve üremeleri üzerine de olumsuz etkileri saptanmıştır. Ouhelli ve ark.(1982), 35°C'lik sıcaklığın enfekte olmayan kenelere bir etkisi olmadığı halde, enfekte olanların, fazla yaşayamadığını, aynı sıcaklığın *B.bigemina*'nın da gelişimini engelleyerek yumurtaya enfeksiyon geçiş oranını düşürdüğünü bildirmişlerdir. Ouhelli ve Schein (1988), epidemiyolojik yönden, sabit düşük ısıda inkübe edilen enfekte doymuş dişilerin, yüksek ısıda inkübe edilenlere oranla daha zararlı oldukları sonucuna varmışlardır.

Isı yanında nem de keneler ve hastalığın nakli açısından önemlidir. Kuraklığın hüküm sürdüğü ve nemin az olduğu yerlerde, dişi kenelerin toprağa bıraktığı yumurtaların çoğunun kuruması ve bu yumurtalardan larva çıkmaması sonucunda kene popülasyonunda azalma meydana gelir. Aynı ortamda, doymuş larva ve nimfler

gömlük değiştirmek üzere toprağa düştükleri zamam ölebilirler (Sayın ve Dumanlı, 1982).

Kenenin yaşı da enfeksiyon için önemlidir. Kenelerdeki enfeksiyon, saklama süresi ile orantılı olarak azalır. *Boophilus microplus* larvalarındaki *B.bovis* enfeksiyonun, 14°C sıcaklık ve %95 nisbi nemde ancak 65 gün canlılığını koruyabildiği bildirilmiştir (Friedhoff, 1988).

Babesiosis'in epidemiyolojisinde, sığırın ırkı, yaşı, doğduğu ve yaşadığı çevrenin hastalık açısından durumu da geniş ölçüde yer tutmaktadır. Bock ve ark. (1997), *Bos indicus* sığırlarının, melez ırklara göre, *B.bovis* inokulasyonlarına daha dayanıklı olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca, bağışık analardan doğan yavrular kolostrall bağışıklık sebebiyle hastalığa dirençlidir. Bu bağışıklık iki ayda sona ermekte, bunu 4-7 ayda sona eren yaş direnci izlemektedir. Genellikle bu tür sığırarda, ilk 6-9 ayda babesiosis nadiren klinik semptom göstermekte ve hayvanda uzun süreli bir bağışıklık şekillenmektedir (Bock ve ark., 1999). Endemik stabil bir bölgedeki sığırın %75'inin ilk 9 ayda babesiosis'e yakalanmaları durumunda, bu bölgede endemik stabilitenin korunacağı ve klinik hastalığa nadiren rastlanacağı bildirilmiştir (Mahoney, 1980).

## 1.6. Dünya'da Sığır Babesiosis'i

Sığır babesiosis'i, tropik ve subtropik bölgelerde görülen bir hastalık olarak kabul edilmesine karşın, gerçekte farklı patojenik *Babesia* türleri ve değişik türlerdeki vektörleri ile tüm dünyada görülen bir hastalıktır (Kuttler, 1988).

*Babesia bigemina* dünyanın birçok bölgesinde, Afrika, Avusturalya, Avrupa, Orta Doğu, Güney ve Orta Amerika'da, Karayiplerde, Güney Pasifik'te, *B.bovis*, ise özellikle Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya'da yaygın olarak görülmektedir. Avrupa'da özellikle de Avrupa'nın Kuzey kesimlerinde ise *B.divergens*'in daha

yaygın olduğu bildirilmektedir (Thompson ve ark., 1980; Payne ve Scott, 1982; Levine, 1985; Soulsby, 1986; Kuttler, 1988; Nari, 1995).

Johnston (1967), Avustralya'da mikroskopik bakı ile *B.bigemina*'yı Mart ve Mayıs aylarında %65-70, Kasım-Aralık aylarında %10, *B.argentina*'yı ise en yüksek %48 oranında tespit etmiştir. Curnow (1973a), Avusturalya'nın kuzeydoğu bölgesinde Komplement Fiksasyon Testi (CFT) ile subklinik *B.bigemina* ve *B.argentina* insidenslerinin en düşük %3,8 en yüksek %19,1 olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı (1973b), Avusturalya'da CFT ile New South Wales'da *B.bigemina*'yı %1,14, *B.bovis*'i %0,49 oranında tespit ederken, Queensland'da *B.bigemina*'yı %81, *B.bovis*'i %77 oranında tespit etmiştir. Applewhaite ve ark. (1981), Guyana'da *B.bigemina*'yı İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) ile %80, CFT ile %40, *B.bovis*'i ise IFAT ile %61, CFT ile %16 oranında tespit etmişlerdir. James ve ark. (1985), Venezuela'da prevalansı IFAT ile *B.bigemina*'da % 78,2, *B.bovis*'de % 38,8 olarak saptamışlardır. Jongejan ve ark. (1988), Zambia'da IFAT ile *B.bigemina*'nın tüm ülkede (%42,7-74), *B.bovis*'in ise ülkenin doğu ve kuzeydoğu (% 0-68) bölgelerinde yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Kuttler ve ark. (1988), Gambia'da 184 sığırdaki IFAT ile *B.bovis* ve *Anaplasma marginale*'yi negatif bulurlarken, *B.bigemina*'ya karşı % 65 oranında antikor tespit etmişlerdir. Woodford ve ark. (1990), Tanzanya'da Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) ile *B.bovis* için % 96, *B.bigemina* için % 88 pozitiflik saptamışlardır. Gomes ve ark. (1991), Angola'da, birçok bölgenin sığır babesiosis'i yönünden endemik stabil olduğunu saptamış ve hastalığın, geleneksel yetiştiriciliğin yapıldığı yerlerde, problem olmamasına karşın, kene kontrolünün yapıldığı çiftliklerde endemik instabilite sebebiyle hastalık olgularının görüldüğünü bildirmişlerdir. Alonso ve ark. (1992), Antiller'de *Babesia* türlerini IFAT, *Anaplasma*'yı ise kart testi ile yoklamışlar ve *B.bovis* için %62, *B.bigemina* için %52, *Anaplasma* için ise % 43 oranında prevalans tespit etmişlerdir. Chandrawathani ve ark. (1994), Malezya'da ELISA ile % 97,8 oranında *B.bigemina*'ya %72,6 oranında *B.bovis* 'e karşı antikor saptamışlardır. *B.ovata*'ya karşı antikoru ise çok düşük olarak bildirmişlerdir. L'Hostis ve ark. (1995), Fransa'da mikroskopik muayene ve gerbille yapılan intraperitoneal inokulasyonla kontrol ettikleri 1480 örneğin, 622'sinde (%42)

*B.divergens*, 1'inde ise *B.major* saptamışlardır. Guglielmoe (1995), *B.bovis* ve *B.bigemina*'nın sebep olduğu babesiosis'in Uruguay ve Kuzey Arjantin'den Guatemala'ya kadar olan bölgede sığırları etkilediğini bildirmiştir. Papadopolus ve ark. (1996a), Makedonya'da IFAT ile *B.bovis* , *B.bigemina*, *B.major* ve *B.divergens*'e karşı sırasıyla, %21,6, %15,2, %5,1 ve %2,7 oranında antikor saptamışlardır. Bouattour ve Darghout (1996), *B.divergens*'i Tunus'ta yerli bir sığır ırkında tespit etmişlerdir.

Dreyer ve ark. (1998), Güney Afrika'nın çeşitli bölgelerinde, geleneksel olarak sığır yetiştiriciliği yapılan çiftliklerden aldıkları örneklerde *Babesia* türleri için IFAT, *Anaplasma* türleri için ELISA ile yaptıkları kontrollerde, %62,42 oranında *B.bigemina*'ya, %19,47 oranında *B.bovis*'e, %98,6 oranında *A.marginale*'ye karşı antikor tespit etmişlerdir. L'Hostis ve Chauvin (1999), Fransa'da ELISA ile % 60 oranında *B.divergens* pozitifliği saptamışlardır. Solorio-Rivera ve ark. (1999), Meksika'da *B.bovis* prevalansını %73,8 olarak bildirmişlerdir. Carrique Mas ve ark. (2000), Bolivya'da ELISA ile *B.bovis* 'in prevalansını %75-78, *B.bigemina*'nın ise %24-57 arasında değiştiğini saptamışlardır. L'Hostis ve Seegers (2002) Fransa'da *B.divergens*'in insidensinin %2,1 olduğunu ayrıca Güneybatı bölgelerinde *B.major*'un da bulunduğunu bildirmişlerdir.

Smeenk ve ark. (2000) Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Zimbabwe'de 94 hayvandan 33'ünde (%35) *B.bigemina*, 58 hayvandan 27'sinde ise *B.bovis* tespit etmişlerdir. Almeria ve ark. (2001) standart PZR ve jel elektroforezle, Minorka'da kontrol edilen hayvanların %6'sında *B.bigemina*, %0,75'inde *B.bovis* saptamışlardır. Aynı çalışmada, *B.bigemina* ile enfekte hayvanların %31'inin aynı zamanda *Theileria annulata* ile de enfekte oldukları bildirilmiştir.

### 1.7. Türkiye'de Sığır Babesiosis'i

Türkiye'de ilk defa 1890 yılında Nicolle ve Adilbey sığırlarda *Babesia bigemina*'nın varlığından bahsetmişlerdir (Currason, 1943). Sonraki yıllarda, Samuel ve Raif

(1930), Ekrem (1931), Lestoquard (1931), Gören ve Yetkin (1935) ve Aysoy (1941), sığırlarda babesiosis'i tespit etmişlerdir. Kurtpınar (1956), Doğu Anadolu illerinde piroplazmoz vakalarından bahsetmiştir. Göksu (1959), Ankara civarında 996 sığırın 6'sında *B.bigemina*, 2'sinde ise *B.bovis* saptamıştır. Unat ve ark. (1965) Türkiye'nin parazitolojik coğrafyası konulu çalışmalarında, piroplazmosis vakalarının görüldüğünden bahsetmektedirler. Erkut (1967), Ege bölgesinde 141 sığırdan 7'sinde babesiosis tespit etmiştir. Mimioğlu (1968) Karadeniz bölgesinde 70 sığırın 5'inde *B.bigemina*'yı mikroskopik bakı ile saptamıştır. Göksu (1968), yine aynı bölgede 80 sığırın 3'ünde *B.bigemina*, 3'ünde ise *B.bovis* tespit etmiştir. Bu çalışma ile Karadeniz bölgesinde *B.bovis* ilk kez tespit edilmiştir. Aynı araştırmacı (1969), Doğu Anadolu'da *B.bigemina*'nın varlığından bahsetmektedir. Göksu (1970), Türkiye genelinde piroplazmozların yayılımı konusundaki değerlendirmesinde, Ege bölgesinde, *B.bigemina*, Marmara bölgesinde, *B.bigemina* ve *B.bovis*'in Güney Doğu Anadolu bölgesinde ise *B.bovis*'in bulunduğunu bildirmiştir. Hoffman ve ark. (1971), Türkiye'de, kontrol ettikleri sığırların, %3,5'inde *B.bigemina*'ya rastlamışlardır. Mimioğlu ve ark. (1973), Türkiye'de *B.bigemina*'nın yaygın olduğunu ancak Karadeniz bölgesinde *B.bovis*'in daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, *B.major*'un varlığından ve *B.divergens*'in de bulunabileceğinden bahsedilmektedir. Tüzer (1981), İstanbul çevresinde, 112 sığırın, 13'ünde *B.bigemina*, 39'unda *B.bovis*, 1'inde ise *B.bigemina* ve *Theileria annulata*'yı miks halde tespit etmiştir.

Türkiye'de sığır babesiosis'i konusundaki ilk serolojik çalışma, Çakmak (1987) tarafından yapılmıştır. Çakmak (1987), Ankara'nın Beytepe köyünde, 185 sığırdan yürüttüğü çalışmada, IFAT ile *B.bigemina*'ya karşı %4,8 *B.bovis*'e karşı ise %9,78 oranında antikor saptamıştır. *B.divergens* 'e karşı antikor yoklaması yaptığı halde tespit edememiştir. Sayın ve ark. (1989) Ankara yöresinde IFAT ile *B.bovis*'e karşı %47 oranında antikor tespit etmişlerdir. Düzgün ve ark. (1992) Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden 1428 sığırdan aldıkları kan örneklerinde, ELISA ile *B.bovis*'e karşı %51,2 oranında antikor saptamışlardır. Dinçer ve ark. (1991), Karadeniz bölgesinde, 76 sığırdan toplanan serum örneklerini IFAT ile yoklamışlar ve sonuçta 76 sığırın 47'sinde *B.bigemina*, 34'ünde *B.bovis*, 57'sinde *B.divergens* ve 48'inde

*T.annulata*'ya karşı antikor tespit etmişlerdir. Aynı hayvanların mikroskopik muayenelerinde ise 72 sığırdan *Babesia* spp., 26 sığırdan *T.annulata* saptamışlardır. Bu çalışma ile *B.divergens*'in Türkiye'de varlığını ilk kez serolojik yöntemlerle ortaya konmuş ayrıca, miks enfeksiyonların da görüldüğünü bildirilmiştir. İnci (1992), Ankara'nın Çubuk İlçesi köylerinde yürüttüğü, sero-insidens çalışmasında, 22 sığırın %100'ünde *B.bigemina*'ya, %59'unda *B.bovis*'e karşı antikor tespit etmiş, *B.divergens* 'e karşı antikor tespit edememiştir. Bu çalışma, sonucunda, Çubuk yöresinde bulunan sığırların, *B.bigemina*'ya duyarlı olmadıkları, buna karşın *B.bovis*'e karşı kısmen, *B.divergens* 'e karşı ise bütünüyle duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Özer ve ark (1993) Malatya ve Güneydoğu illerinde mikroskopik bakıyla, *T.annulata*, *B.bovis* ve *B.bigemina* türlerinin sebep olduğu latent enfeksiyonların prevalansının Malatya'da %38,5, Adıyaman'da %34,5, Şanlıurfa'da %33,5, Mardin'de %31,5, Diyarbakır'da %34,5 olduğunu bildirmişlerdir. Eren (1993) Ankara yöresinde IFAT ile 191 sığırın 94'ünde *B.bigemina*'ya, 20'sinde *B.bovis*'e karşı antikor saptamış, *B.divergens*'e karşı antikor tespit edememiştir. Aynı çalışmada seropozitif bulunan sığırların 78'inde yalnız *B.bigemina*'ya, 4'ünde yalnız *B.bovis*'e, 16'sında ise hem *B.bigemina* hem de *B.bovis*'e karşı antikor tespit etmiştir. Çakmak ve Öz (1993) Adana yöresinde, 131 sığırın 72'sinde *B.bigemina*, 57'sinde *B.bovis*, 17'sinde *B.divergens* ve 14'ünde *T.annulata*'ya karşı antikor tespit etmişlerdir. Günseli (1993), İstanbul ili sığırlarında ELISA ile *B.bovis*'in yaygınlığını araştırmış ve 1 yaşın altındaki 54 hayvanın 14'ünde, 1-2 yaş arasındaki 40 hayvanın 4'ünde, 2 yaşından büyük 125 hayvanın 40'ında *B.bovis*'e karşı antikor tespit etmiştir. Açıcı (1995), Samsun yöresinde, mikroskopik bakı ile, 184 sığırdan, 48'inde *B.bigemina*, 44'ünde *B.bovis*, 26'sında, *T.annulata*, 11'inde *Anaplasma marginale*, 20'sinde ise *B.bigemina* ile *Anaplasma marginale* veya *B.bovis*'i miks olarak tespit etmiştir. Gün ve ark. (1996), Ankara'da IFAT ile, Türkiye'de ilk defa insanlarda, *B.divergens* ve *B.bovis*'i tespit etmişlerdir. Aktaş ve ark. (2001) IFAT ile, Elazığ'da %31,9 *B.bigemina*, %1,4 *B.bovis*, %3,5 *B.divergens*, Malatya'da %7,1 *B.bigemina*, %0,6 oranında *B.divergens*'e karşı antikor tespit ederlerken, *B.bovis*'e karşı antikor tespit edememişlerdir. Aynı çalışmada, Tunceli'de, %7,3 *B.bigemina*, %0,6 *B.bovis*, %1,2 oranında *B.divergens* antikorlarına rastlamışlardır. Alp ve Güverer (2001) Tekirdağ ilinde IFAT ile, *B.bovis*'in seroprevalansını % 9,9 olarak saptamışlardır.

Tanyüksel ve ark. (2002) sığır ve insanlarda ilk kez PZR ile *Babesia* türlerini saptamışlardır. Bu çalışmaya göre *B.bovis*, Ankara'da % 12,68, Burdur'da % 8, Samsun'da % 3,85 oranında, *B.bigemina* Ankara'da % 8,45, Kayseri'de % 23,8 oranında bulunmuştur. *B.divergens*'i ise sadece Samsun'da % 3,37 oranında tespit etmişlerdir. İnci ve ark. (2002) Kayseri yöresinde IFAT ile yaptıkları çalışmada, %23,03 *B.bigemina*, %1,04 *B.bovis*, %2,09 oranında *B.divergens* 'e karşı antikor saptamışlardır.

Sığırlarda bulunan *Babesia* türlerini nakleden ve Türkiye'de bulunan *Ixodidae* ailesine bağlı kene türleri konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Kurtpınar (1954), yaptığı çalışmada, *Ixodidae* ailesine bağlı *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Boophilus*, *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* soylarında yer alan 21 türün bulunduğu bahsetmiştir. Aynı araştırmacı, *Babesia* türlerinin vektörlüğünü yapan, *Boophilus annulatus* ve *Ixodes ricinus*'un yaygınlığını %39,68 oranında tespit etmiştir. Mimioğlu (1954), Türkiye'nin birçok bölgesinde yürüttüğü çalışması sonucunda, *Hyalomma dromedarii*, *H.excavatum*, *H.savigny*, *H.detrutum*, *Rhipicephalus bursa*, *R.sanguineus*, *Haemaphysalis cholodkovskyi*, *H.sulcata*, *H.coninna*, *H.punctata*, *Dermacentor reticulatus*, *Boophilus annulatus*, *Ixodes ricinus* türlerini bulmuştur. Merdivenci (1969), Türkiye keneleri konusundaki çalışmasında, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Boophilus*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* soyuna bağlı 24 türün varlığından bahsetmektedir. Mimioğlu (1973), *Ixodes ricinus* ve *Boophilus annulatus*'un Karadeniz bölgesinde diğer bölgelere oranla daha yaygın olduğunu bildirmiştir. Özkoç (1979), Marmara bölgesinde *Boophilus calcaratus* kenesinde *B.bigemina*'nın gelişim formlarını saptadığını bildirmiştir. Sayın ve Dumanlı (1982) Elazığ yöresinde, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* soyunda 11 kene türü saptamışlardır. Karaer (1983), Ankara çevresinde, *Ixodidae* ailesinde, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Boophilus*, *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* soylarına bağlı kene türlerinin varlığını bildirmiştir. Zeybek ve Kalkan (1984) Ankara yöresinde *Rhipicephalus* ve *Hyalomma* soyuna bağlı kene türlerini ilkbahar ve yaz aylarında, *Haemaphysalis* ve *Dermacentor* soyuna bağlı türleri ise sonbahar ve kış aylarında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sayın ve Karaer (1987), Ankara yöresinde, *B.bigemina* ve *B.bovis*'in taşıyıcılığını yapan *Boophilus annulatus*'un %1

oranında ilkbahar, yaz ve sonbaharda, *B.major*'un vektörlüğünü yapan *Haemaphysalis punctata*'nın %2 oranında ilkbahar ve kış mevsiminde, *B.bovis* ve *B.divergens* 'in vektörlüğünü yapan *Ixodes ricinus*'un ise %3 oranında ilkbahar, sonbahar ve kış mevsimlerinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Güler ve ark. (1993) Malatya ve bazı Güneydoğu illerinde, sığır *Babesia* etkenleri için vektör özelliği gösteren *B.annulatus* ve *I.ricinus*'u da içine alan 5 soya ait 11 kene türü saptamışlardır. Açıcı ve Celep (1997), sığır ve koyunlarda, nisbi nemin yüksek olduğu Karadeniz bölgesinde, *B.annulatus*, *R.turanicus*, *R.bursa*, *H.punctata* ve *D.marginatus* türlerinin yüksek oranlarda enfestasyonlara sebep olduğunu buna karşın, *Hyalomma* soyuna bağlı türlerin daha düşük oranlarda yayılış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bölgede *B.annulatus* ve *I. ricinus* türlerinin yıl boyu görüldüğünü de bildirmişlerdir. Arslan ve ark. (1999) Kars yöresinde sığırlarda, 6 soya ait 9 tür saptamışlar ve bunların bulunma oranlarını, %0,9 *Boophilus annulatus*, %18,8 *Dermacentor marginatus*, %2,2 *D.niveus*, %14 *Haemaphysalis parva*, %3 *H.punctata*, %0,2 *Hyalomma anatolicum excavatum*, %3,9 *H.marginatum*, %0,2 *Ixodes ricinus*, %0,2 *Rhipicephalus bursa*, olarak bildirmişlerdir. Çiçek (2000), Ankara yöresinde sığırların *Haemaphysalis* türleri ile enfestasyon oranını %18,62 olarak belirlemiştir. Beyazıt (2000), Bursa yöresi sığırlarında, 13 kene türü tespit etmiş, ayrıca *Babesia* türlerinin vektörü olan kenelerden, *Ixodes ricinus*, *Boophilus annulatus* ve *Haemaphysalis punctata*'nın sırasıyla, %45,55; %7,56; %0,14 oranlarında bulunduğunu bildirmiştir. Sert ve ark. (2001a), özellikle birden fazla konutlu özellik gösteren kenelerin larva dönemlerini kemirici ve diğer küçük memelilerde geçirdiğini belirtmişler ve kemiricilerden topladıkları 194 keneden 184'ünün *Ixodidae* ailesine dahil olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* ve *Ixodes* soylarına ait larva ve nimflerle, *Rhipicephalus* soyuna ait larvalar bulmuşlardır. Sert ve ark. (2001b) yarasalarda yaptıkları benzer bir çalışmada, Türkiye'nin birçok bölgesinden örnekler toplamışlar ve *Ixodes* larva, nimf ve olgunları ile *Haemaphysalis* larvaları tespit etmişlerdir. Yukarı ve Umur (2002), Burdur yöresi sığırlarında *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis parva*, *Rhipicephalus turanicus*, *Boophilus annulatus* ve *Hyalomma marginatum* türlerini tespit etmişler, sığırlarda enfestasyon oranını ise %21,8 olarak bildirmişlerdir.

## 1.8. Babesiosis'de Bağışıklık

Protozoonlara karşı immun yanıt oluşmasında, konağın türü, ırkı, yaşı ve fizyolojik durumu ile parazitin suşu önem taşımaktadır (Carson ve Philips, 1981). *Babesia* enfeksiyonlarına karşı meydana gelen bağışıklık, etkenin antijenik yapılarına karşı oluşan spesifik cevabın yanısıra konağın doğal direnci ile de yakından ilgilidir.

Bağışıklığın meydana gelmesinde non-spesifik ve spesifik mekanizmalar rol oynar. *Babesia* etkenlerine karşı non-spesifik immunitenin uyarılmasında, aktive edilmiş makrofajlar ve bunların çözülebilir ürünleri olan monokinler etkilidir. Spesifik immun mekanizmalar ise, humoral ve hücre sel komponentleri içerir, humoral komponentleri içermesiyle de *Theileria*'dan ayrılır (James, 1988; Sonenshie, 1993). *Babesia* enfeksiyonlarında, IFAT ile tespit edilebilen antikorlar, dolaşım kanındaki merozoitlere karşı meydana gelir. Bu antikorlar, öncelikle yardımcı T lenfositlerini aktive ederek merozoitlerin eritrositlere girişini engeller ayrıca bu merozoitler ve enfekte eritrositlerin makrofajlar tarafından fagositozunu da arttırmaları. Bunların dışında parazitlerin gelişmeleri esnasında ortaya çıkan çözünebilir ekzoantijenlerin kan plazmasında bulunduğu, ancak bunların önemli olmadığı hatta bu çözünebilir antijenlerin, baskılayıcı T lenfositlerini uyararak, immun yanıtı da bloke edebileceği iddia edilmektedir (James, 1984; 1988, Sonenshie 1993).

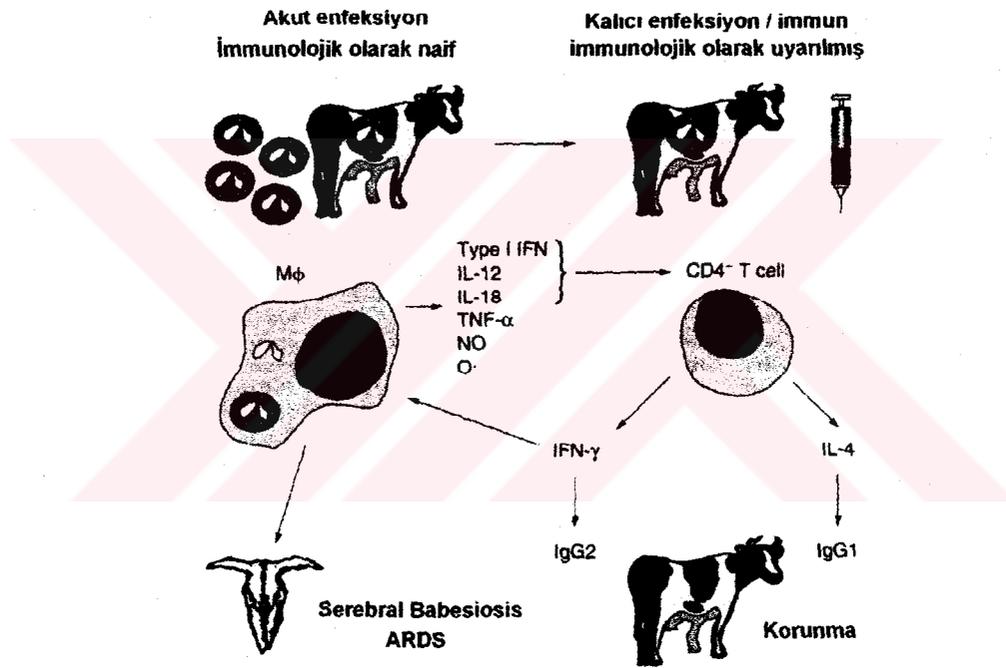
*Babesia* etkenlerine özgün antikorların, oluşmaya başlaması ve antikor titresinin seyri konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Mahoney (1962) kene ile nakilden 7-21 gün sonra antikorları saptamış ve bu antikorların 10 aydan fazla süre ile vücutta kaldığını bildirmiştir. Aynı çalışmada, antikor saptadığı hayvanların kanında parazite rastlamamasına rağmen bu kanı, dalağı çıkarılmış bir hayvana verdiğinde enfeksiyon meydana getirdiğini bildirmiştir. *Babesia bigemina* ve *B.bovis* türlerinden biriyle meydana gelen enfeksiyondan sonra sığırların homolog türlere karşı üç yıl yada daha fazla süreyle bağışık kaldıkları bildirilmiştir (Hall ve ark. 1968, Mahoney ve ark. 1973). Smith ve ark. (1980) *B.bigemina* veya *B.bovis* ile

meydana gelen bir enfeksiyon sonucunda, diğer kene kaynaklı enfeksiyonlar ve heterolog türlere karşı duyarlılığın azalmadığını tespit etmişlerdir.

*Babesia* enfeksiyonlarını atlatarak preimmün duruma gelen hayvanlar, uzun süre latent halde enfekte kaldıkları için hastalığın taşıyıcısı durumundadırlar. *Babesia bigemina* enfeksiyonlarında bu latent durum 12 yıla kadar çıkabilmektedir. Eğer otosterilizasyon, etkili sağaltım veya *Babesia*'nın olduğu alandan uzaklaştırma ile parazitler yok edilirse, hayvan tamamıyla duyarlı hale gelir. Endemik bölgelerde, kenelerle her yıl meydana gelen reenfeksiyonlarla hayvan uzunca bir süre immün durumda kalır. *B. bigemina* için enfeksiyon kaynağının uzaklaştırılması durumunda immunitenin 14-22 ayda ortadan kalkacağı bildirilmiştir (Soulsby, 1986). O'Donoghue ve ark. (1985), babesiosis için endemik bölgelerde yetiştirilen sığırların 3 aya kadar maternal kolostral antikorlar tarafından korunmaları esnasında yenilenen enfeksiyonlar sonucu 4-5'inci ayları kapsayan dönemde antikor titresinin pik yaptığını ve immunitenin en az 4 yıl sürdüğünü bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, *B. bigemina* enfeksiyonunda IgG antikorlarının enfeksiyondan 7 gün sonra görülmeye başladığını ve antikor titresinin 12. günde pik yaptıktan sonra 7 hafta bu seviyede kaldığını saptamışlardır. IgM antikorlarının ise enfeksiyon sonrası 7. günde görülmeye başladığını ve 12-22. günlerde maksimum seviyeye ulaşarak bu seviyede kaldığını, 28. günden itibaren de düşük düzeylere inmeye başladığını bildirmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *Babesia* enfeksiyonlarının immünite ve immunopatogenezinde sitokinlerin önemli bir yere sahip olduğu bildirilmektedir (Brown ve Palmer, 1999; Ahmed, 2002). Şekil 1.2'de belirtildiği gibi, *Babesia* etkeni ile ilk kez karşılaşan hayvanın akut enfeksiyonu esnasında, aktive edilen makrofajlar, yangıya sebep olan sitokinler, nitrojen ve oksijen içeren babesidal moleküller üretirler. Bu ürünlerin salınma zamanı ve miktarı, enfeksiyonun oluşmasında önemlidir. Akut enfeksiyon, parazitlerin aktive olan makrofajlar tarafından öldürülmesi ile sonuçlanır. Diğer taraftan, tümör nekrosis faktör  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) gibi yangısal sitokinlerin fazla salgılanması, serebral babesiosis'e ve yetişkin solunum baskılanma sendromuna bağlı ölümlere de sebep olabilir. Akut bir enfeksiyon yada başarılı bir aşılamaadan sonraki challangelara karşı CD4<sup>+</sup> T hücreleri tarafından

üretilen  $\gamma$  IFN'un salgılanması ile kazanılmış bağışıklık devreye girmektedir. Aynı zamanda aktive makrofajlarca üretilen  $\alpha$  IFN, interleukin 12 (IL-12) ve IL-18 gibi sitokinler,  $CD4^+$  T hücrelerince  $\gamma$  IFN'un salgılanmasına yardımcı olurlar. Diğer taraftan  $\gamma$  IFN, hem geriye dönük olarak uyarılmamış makrofajların aktivasyonunu hem de B lenfositleri aracılığı ile IgG2 antikor yanıtını sağlar. Bununla birlikte  $CD4^+$  T hücreleri IgG1 üretimini arttıran IL-4'ü de üretirler. Her iki antikor ve aktive  $CD4^+$  T hücreleri koruyucu bağışıklığın devam ettirilmesinde önemlidir (Brown ve Palmer, 1999).



Şekil 1.2. *Babesia bovis*'e karşı gelişen kazanılmış ve doğal immün mekanizma (Brown ve Palmer, 1999).

### 1.9. Babesiosis'in Teşhisi

Babesiosis'in teşhisi ya parazitin kendisinin saptanması yada parazite karşı oluşan özgün antikorların tespit edilmesi ile yapılmaktadır (Soulsby, 1986; Sonenshine, 1993; Böse ve ark., 1995).

### 1.9.1. Parazitin Tespiti

*Babesia* etkenlerinin saptanması, perifer kan frotilerinin mikroskopik bakısı ile olduğu gibi son yıllarda güncel olan moleküler biyolojik yöntemler ile nükleotid tespiti şeklinde de yapılmaktadır (Böse ve ark., 1995).

#### 1.9.1.1. Mikroskopik Muayene

Bu yöntem, akut babesiosis'in seyri esnasında etkenin saptanması için hala en iyi ve en güçlü teşhis aracı olup, her laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak hastalığın serebral formunda olduğu gibi perifer kan frotilerinde etken her zaman görülmeyebilir. Ayrıca, yine yapılan kan frotilerinin mikroskopik bakısı için deneyimli personel de önemlidir. Çünkü, paraziteminin az olduğu durumlarda, eritrositler içindeki gelişme formları gözden kaçabilir. Diğer taraftan, personel deneyimli de olsa günde çok sınırlı sayıda preparata bakmak mümkündür (Soulsby, 1986; Sonenshine, 1993; Böse ve ark., 1995).

#### *İnce Yayma Froti Yöntemi*

Akut hastalıkların teşhisinde, mikroskopik muayenede ince yayma kan frotileri parazitin morfolojik detaylarının görülebilmesi sebebiyle kalın damla preparatlara göre daha fazla tercih edilmektedir. Ancak paraziteminin düşük olduğu durumlarda tercih kalın damla preparatlar yönünde olmalıdır (Soulsby, 1986; Sonenshine, 1993; Böse ve ark., 1995).

Özellikle *Babesia bovis* enfeksiyonlarında sıklıkla meydana gelen şiddetli anemi sonucunda perifer kandaki parazitemi oranı çok düşüktür. Aynı hayvanların iç organlarından yapılan frotilerde ise parazitemi oranının çok yüksek olduğu görülmüştür (Anon, 1984). Post mortem teşhiste, yeni ölmüş hayvanın kanından ve dokularından yapılan preparatlar ile de teşhis mümkündür. Dekompozisyona uğramış

hayvanlarda bu frotiler dalak ve beyinden yapılabilir ancak dekompozisyon eritrosit ve parazitlerin yapısını bozduğu için teşhis güçtür (Soulsby, 1986; Sonenshine, 1993; Böse ve ark., 1995).

### ***Kalın Damla Yöntemi***

Bu yöntem paraziteminin düşük olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Aynı zamanda epidemiyolojik çalışmalarda serolojik testlerle birlikte kalın damla yönteminin de kullanılması tavsiye edilmektedir (Böse ve ark., 1995).

Yukarıda belirtildiği gibi ince yayma ve kalın damla kan frotilerinde, *Babesia* etkeninin saptanması enfeksiyonun varlığını gösterir. Ancak bu preparatlarda etkenin bulunmaması enfeksiyonun olmadığına göstergesi değildir. Çünkü hastalığın çok erken veya kronik dönemlerinde, parazitler kan preparatlarında nadir olarak tespit edilebilmektedir. Kan preparatlarında parazitin direk mikroskopik tanısı, özellikle preparat sayısının çok olduğu durumlarda, hem zaman kaybına hem de yanlış değerlendirmelere sebep olmaktadır (Todorovic ve Carson, 1981).

### **1.9.1.2. Nükleotid Tespiti**

Kanda görülen protozoer ve riketsiyal hastalıkların karakteristik özelliği olarak, hastalık atlatıldıktan sonra iyileşen hayvanlar taşıyıcı hale gelirler (Purnell, 1981). Böyle taşıyıcı hayvanlar, vektör keneler için enfeksiyon kaynağı olup, görünüm itibarı ile enfekte olmayan hayvanlardan ayırtedilemezler. Taşıyıcı hayvanların kanında, genellikle çok az miktarda parazit bulunur ve bunlar, frotilerde her zaman tespit edilemezler (Figueroa ve Buening, 1995).

Kan protozoonlarının meydana getirdiği hastalıkların tanısında spesifik serolojik testlerden de yararlanır. Ancak bu testler genellikle indirek uygulamalar olduğu için etkenin direk kendi varlığını göstermezler. Bu tür hastalıkların teşhisinde

ortaya çıkan bu ve bu gibi dezavantajlar, teşhiste daha özgül ve duyarlı metodların gerekliliğini ortaya koymuş, moleküler biyolojik teşhis yöntemlerinin gelişmesine sebep olmuştur (Figuroa ve Buenning, 1995; Comes ve ark., 1996; Sparagano, 1999).

### **DNA Probları**

Deoksiribonükleik asit (DNA) problemleri, kanda, dokularda ve kene dokularında parazit DNA'larının tespitinde kullanılabilir. Bu metod hedef DNA'nın, klonlanmış DNA parçası ile spesifik hibridizasyonu temeline dayanmaktadır. Bu yöntem *Babesia* türlerinin teşhis ve ayırımında da kullanılmıştır. Bununla birlikte, metodun duyarlılığında, örnekteki DNA'nın yoğunluğunun önem taşıdığı bildirilmiştir (Böse ve ark. 1995).

Nükleik asit problemleri, *Babesia bovis*'in tanısı ile ilgili başarılı çalışmalar yapılmıştır (Mc-Laughlin ve ark., 1986; Jasmer ve ark., 1990; Petchpoo ve ark., 1992). Restriksiyon enzim profillerinin prob analizleriyle, tanımlanan sekans farklılıkları yoluyla *B. bovis*'in Meksika ve Avusturalya izolatları (Jasmer ve ark., 1990), Meksika ve Thai izolatları (Petchpoo ve ark., 1992) ve Avusturalya'nın farklı coğrafik bölgelerindeki izolatları (Cowman ve ark. 1984; Dalrymple ve ark. 1992) birbirinden ayrılmıştır. Bunun yanında, DNA problemleri aracılığı ile *B. bovis*'in farklı virulanlara sahip alt türleri de saptanmıştır (Carson ve ark., 1990). Dalrymple ve ark. (1992), *B. bovis*'in BovA 1 ismini verdikleri bir cDNA probunu tanımlamışlar ve bu prob ile, *B. bovis*'in karışık popülasyonu içinden suşları birbirinden ayırmışlardır. Aynı araştırmacılar (Dalrymple ve ark. 1992), DNA'nın restriksiyon enzim analizi ile DNA prob kullanarak genetik olarak *B. bovis* 'in birçok alt tiplerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Posnett ve Ambrosio (1991), Southern Blot testi ile atlarda *Babesia caballi*'nin teşhisinde bu protozoonun 0,25 ng ve 0,125 ng miktarındaki DNA'sını tespit etmişlerdir. Posnett ve ark. (1991) DNA probu ile spot hibridizasyon tekniğini

kullanarak *B.equi* ile deneysel, doğal enfekte ve taşıyıcı atlarda *B.equi*'yi teşhis etmişler ayrıca bu yöntemin duyarlılığını %0,0025 parazitemi olarak bildirmişlerdir. Figueroa ve ark. (1992a), digoxigenin ile işaretli problemlerle yaptıkları Dot Blot testi sonucunda, en az 1 ng *B.bigemina* DNA'sını tespit edebildiklerini bildirmişlerdir. Benzer yöntemler kullanarak, Chen ve ark. (1991), *Rhipicephalus appendiculatus* kenesinin tükürük bezinde *Babesia* türlerinden farklı bir kan protozoonu olan *Theileria parva*'yı da saptamışlardır.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Bugün çeşitli hastalıklarda olduğu gibi babesiosis'de de bilinen teşhis yöntemlerine göre daha duyarlı olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) büyük oranda DNA problemlerinin yerini almıştır. Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. Rutin olarak, PZR testleri 1 pg miktarındaki DNA'yı tespit edebilir. Bu duyarlılık, nested PZR protokolleri ile 1 fg DNA'ya kadar çıkabilmektedir (Böse ve ark. 1995).

Fahrimal ve ark. (1992), PZR yöntemini kullanarak taşıyıcı hayvanlarda, *Babesia bovis*'in genomik DNA'sındaki 7,4 kb'lık DNA bölümünü çoğaltarak, Southern Blot ve Dot Blot yöntemleri ile %86 oranında pozitiflik saptamışlardır. Aynı zamanda, çoğaltılmamış parazit DNA'sına göre 1000 kat daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Persing ve ark. (1992), *B.microti*'nin 16S gen bölgesine özgül primerler kullanarak çoğalttıkları DNA'yı, Southern Blotting ile tespit etmişlerdir. Figueroa ve ark. (1992b) IA-IB primerleri ile *B.bigemina*'nın 278 bp'lik DNA parçasını çoğaltarak, teşhise gitmişlerdir. Calder ve ark. (1996), *B.bovis*'in ssr RNA (small subunit ribozomal ribonükleik asit) gen bölgesini çoğaltan PZR ile *B.bovis*'i taşıyıcı hayvanlarda teşhis etmişlerdir. Bashiruddin ve ark. (1999) ise, atlarda, *Babesia equi* ve *B.caballi*'nin 16 S rRNA genini çoğaltan primerler kullanarak PZR ile bu etkenlerin teşhisini yapmışlardır. Aynı araştırmacılar, mikroskopi ve DNA problemlerinde tespit ettikleri paraziteminin sırasıyla, %0,001 ve %0,00025

düzeylelerinde olmasına karşın PZR'da tespit ettikleri parazitemiyi %0,000083 olarak bildirmişlerdir. Salem ve ark. (1999), ise ekstra kromozomal DNA'daki apositokrom b genini çoğaltarak yapılan PZR'ın ribozomal DNA temelli PZR' a göre *B.bovis* ve *B.bigemina*'nın tanısında %20 oranında daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Smeenk ve ark. (2000), Zimbabwe'de sığırlarda ve kenelerde Nested-PZR ve jel elektroforezle, sığırlarda %35 oranında *B.bigemina*, %47 oranında *B.bovis* tespit etmişler aynı zamanda kenelerde *B.bigemina*'nın % 5, *B.bovis*'in ise %60 oranında bulunduğunu bildirmişlerdir. Almeria ve ark. (2001), PZR ile *B.bigemina* ve *B.bovis* yanında *Theileria annulata*'nın teşhisini de yapmışlardır. Tanyüksel ve ark. (2002) Türkiye'de ilk defa *Babesia* türlerinin tanısında PZR yöntemini kullanmışlardır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *Babesia* türlerinin tanısı yanında, diğer kan protozoonlarından biri olan *Theileria* türlerinin omurgalı konakta ve vektör kenelerdeki tanısı da yapılabilmektedir. Bishop ve ark. (1992), PZR ve Southern Blotla taşıyıcı hayvanlarda, *T.parva*'yı teşhis etmişlerdir. d'Oliviera ve ark. (1995), taşıyıcı sığırlarda, PZR, Southern Blot ve Mikroplate Hibridizasyon yöntemleri ile *T.annulata*'nın teşhisini yapmışlar ve 92 örneğin mikroskopi ile %22'sinde, IFAT ile %40'ında, PZR ile ise %75'inde pozitiflik tespit etmişlerdir. Martin-Sánchez ve ark. (1999), Nested PZR ile *T.annulata*'yı sığırlarda saptamışlardır. Türkiye'de ise Aktaş ve ark. (2002), PZR ve jel elektroforezle, Vatansever ve Nalbantoğlu (2002) ise Nested PZR ile sahadan toplanan kan örneklerinde *Theileria annulata*'nın teşhisini yapmışlardır. PZR yöntemi kullanılarak *Theileria annulata*'nın kenelerdeki teşhisleri de yapılmıştır (d'Kok ve ark.,1993; d'Oliveira ve ark.,1997; Kırvar ve ark.,2000).

Yukarıda bildirilen PZR ile ilgili çalışmaların yaygınlaşan kullanımının yanısıra, hayvanlarda bulunabilecek tüm kan parazitlerini bir defada ortaya koyabilecek kombine bir testin arayışları devam etmiştir. Bununla ilgili olarak, birden fazla parazit türünün PZR ile aynı anda teşhis edilebilmesini sağlayan ilk çalışmalar, Figueroa ve ark. (1993a) tarafından "Multiplex PCR" adı altında radyoaktif olmayan digoxigenin ile işaretli proplar kullanılarak, deneysel olarak enfekte edilen sığırlarda, *B.bovis*, *B.bigemina* ve *Anaplasma marginale*'nin saptanmasına yönelik olarak yapılmıştır. Bu çalışmanın sahada uygulanabilirliği kan

parazitleri yönünden endemik olan Meksika'nın güneyinde denenmiş ve taşıyıcı hayvanlarda, *B.bigemina*, *B.bovis* ve *Anaplasma marginale* enfeksiyonlarının prevalans değerleri sırasıyla %66,7; %60,1; %59 olarak tespit edilmiştir (Figuroa ve ark., 1993b).

Birden fazla parazitin aynı anda teşhisine yönelik çalışmalarda gerçek anlamda ilk gelişme (RLB) tekniğinin ortaya çıkması ile sağlanmıştır. Reverse Line Blotting yöntemi, PZR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Teknik birçok etkenin aynı anda bir çok prob ile karşılaştırılmasına olanak sağladığından, oldukça pratik ve kullanışlıdır. Bu yöntem ilk defa 1988 yılında insanlarda, orak hücre anemisi ile  $\beta$  Talasemi'nin teşhisinde kullanılmıştır (Randall ve ark. 1988). Rijpkema ve ark. (1995), bu tekniği, aynı kenede bulunabilen 4 *Borrelia* türünün ayrılması için kullanmışlardır. Kamerbeek ve ark. (1997), aynı metod ile, *Mycobacterium tuberculosis*'in teşhisini ve tiplendirmesini yapmışlardır. Bu yöntemin kan protozoonlarının saptanmasında kullanılması, Gubbels ve ark. (1999) tarafından gerçekleştirilmiştir. Aynı araştırmacılar (Gubbels ve ark.,1999), 18S ssrRNA genindeki V4 değişken bölgesini çoğaltan primerlerle PZR'da çoğaltıkları gen bölgelerini, RLB tekniğinde kullanarak sığırlarda görülen, *Theileria annulata*, *T.parva*, *T.mutans*, *T.taurotragi*, *T.velifera*, *Babesia bovis*, *B.bigemina* ve *B.divergens*'in aynı anda özgül teşhislerinin yapılabileceğini göstermişlerdir. Ceci ve ark. (1999), RLB ile sığırlarda *T.buffeli/orientalis* ile *B.bigemina*'yı teşhis etmişlerdir. Kan protozoonlarının yanında, 16S rRNA gen bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PZR'ı takiben, RLB'nin kullanılması ile *Anaplasma* ve *Erlichia* gibi riketsiyal etkenlerin teşhisi de başarı ile yapılmıştır (Schouls ve ark.,1999, Georges ve ark.,2001; Bekker ve ark.,2002).

Günümüzde özellikle kene kaynaklı hastalıklarla ilgili çalışmalarda, RLB kullanımını artmakta olup bu tür hastalıkların teşhisinde standart bir test haline geldiği bildirilmektedir (Sparagano ve Jongejan, 1999; Sparagano ve ark., 1999; Sparagano ve ark., 2000; Georges ve ark.,2001; Lunemann ve ark., 2001; Bekker ve ark., 2002; Qiu ve ark., 2002; Sparagano ve ark., 2002).

### 1.9.2. Spesifik Antikorların Tespiti

*Babesia* türlerine karşı oluşan özgül antikorların tespitine yönelik birçok immunodiagnostik test geliştirilmiştir. Bunlardan, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFAT ( Indirect Fluorescent Antibody Test), SELISA (Slide Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IHAT (Indirect Hemagglutination Test), CFT (Complement Fixation Test), LAT (Latex Agglutination Test), RIA (Radioimmunoassay) en çok kullanılan testlerdir (Todorovic ve Carson, 1981; Levine, 1985; Soulsby, 1986; Böse ve ark., 1995).

Özellikle latent ve subklinik seyirli olgularda, *Babesia* parazitlerine karşı oluşan özgül antikorların serolojik testlerle indirek olarak teşhisi sıklıkla kullanılmaktadır. Bu serolojik yöntemlerde kullanılan antijenler, akut babesiosis'li hayvanların doku, serum ve parazitli eritrositlerinden elde edilmektedir (Todorovic ve Carson, 1981).

Komplement fiksasyon testi babesiosis'in teşhisinde kullanılan ilk serolojik testtir. Primer enfeksiyonun erken safhalarında üretilen IgM'lerin tespitinde IgG'lere göre daha etkili bulunmuştur. Dolayısıyla, bu testin kronik babesiosis'li hayvanlarda duyarlılığı düşük olup enfeksiyonun başlangıcında, %94-100 oranında saptanan pozitiflik, 4-5 ay sonra %50 azalmaktadır (Todorovic ve Carson, 1981). Karşılaştırmalı olarak yapılan bir çalışmada, enfeksiyondan 14 gün sonra alınan serumda, duyarlılık ELISA, Western Blot, IFAT ve CFT için sırasıyla, %98,3; %94,9; %96,6; %28,8 olarak bildirilmiştir (Böse ve Peyman,1994).

Serolojik yöntemlerden ELISA, oldukça duyarlı ve etkili bir testtir. Bu test sonuçları bilgisayar tarafından değerlendirilmekte ve bir seferde çok miktarda örnek incelenebilmektedir. Bununla birlikte, testte antijen kalitesi testin duyarlılığını etkilemektedir. Direk enfekte eritrositlerden hazırlanan antijenler, konak eritrositleri ile kontamine olduklarından, anti-eritrositik antikorlar sebebiyle yanlış sonuçlara sebep olmaktadır. Bu sorunlar, iyi tanımlanmış, saflaştırılmış rekombinant antijenlerle giderilebilmektedir. Rekombinant antijenler, konak proteini içermezler,

göreceli olarak daha ucuzdurlar ve gruplar arasında varyasyon minimumdur, dolayısıyla daha duyarlıdırlar (Böse ve ark.,1995). Yapılan çalışmalarda, *Babesia bigemina* ve *B.bovis*'in hedef antijenleri klonlanmış ve elde edilen rekombinant antijenler ELISA testinde kullanılmıştır (McElwain ve ark., 1987; Goff ve ark., 1988; McElwain ve ark., 1988; Böse ve ark., 1990).

Spesifik antikor tespitinde kullanılan serolojik yöntemler içerisinde, IFAT, daha ekonomik, güvenilir ve diğerlerine göre daha hassas olması sebebiyle tercih edilen bir testtir (Todorovic ve Carson, 1981, Böse ve ark.,1995; Anon, 1996). Ross ve Lohr'a atfen Todorovic ve Carson (1981), *B.bigemina* enfeksiyonunu takiben, 21 gün sonra 1:1280 titrede maksimum seviyede saptadıkları antikorların azalmasına karşın, 24 ay sonra da tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. IFAT'ın tercih edilen testler arasında olmasına karşın, testin değerlendirmesine bağlı olarak yanlışlıkların ortaya çıkması (Böse ve ark.,1995; Anon, 1996), ayrıca *Theileria-Babesia*, *Babesia-Plasmodium* türleri arasında ve *Babesia* 'nın kendi türleri arasında çapraz reaksiyonların olması, testin dezavantajlarından (Ludford ve ark., 1972; Burrige ve ark. 1974; Papadopoulus ve ark., 1996b). Bunun yanında, uzun süreli portörlük durumlarında, kanda piroplazmik formlar bulunmasına rağmen, antikorlar her zaman tespit edilemeyebilir (Pipano, 1974).

### 1.10. Babesiosis'in Tedavisi

Babesiosis'in tedavisinde, uzun yıllardır çeşitli kimyasal bileşikler başarı ile uygulanmaktadır. Başarının derecesi babesiosis'i oluşturan *Babesia* türüne ve ilaca karşı hayvanın gösterdiği toleransa bağlıdır. Genellikle küçük *Babesia* etkenleri tedaviye daha dirençli olup, büyük *Babesia* etkenlerine göre daha geç sonuç alınmaktadır (Mahoney, 1977; Kuttler, 1981).

Akut babesiosis'in tedavisi, parazitemi sonucu ortaya çıkan anemi ve yüksek ateş ile karakterize olan klinik belirtilerin hafifletilmesi ile ilgilidir. Anti-babesidal bileşiklerin bazıları çok etkilidir ve tek bir enjeksiyonla paraziteminin ortadan

kaldırılması mümkündür. Bu durum hasta hayvan açısından olumlu bir sonuçtur. Ancak organizmanın parazitten tamamen arınması preimmünisyonun da sonu olacağından ve hayvan endemik bir bölgede ise reenfeksiyonlara duyarlı hale geleceğinden, ilaçların etki mekanizmalarının iyi bilinmesi gerekmektedir (Kuttler, 1981).

Babesiosis'de kullanılan ilaçlar ve özellikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir (Kuttler, 1981; Melhorn, 2001).



Kimyasal Grup	Yaklaşık Doz Uygulama şekli	Tescilli Olmayan İsmi (Ticari ismi ve üreticisi)	Özellikleri
Azo-naphthalene	2-3 mg/kg %1'lik solusyon, i.v	<b>Trypan Blue</b> *Trypan Blue SS (Centanuer Lab., G. Afrika)	<i>Babesia bigemina</i> ve diğer büyük <i>Babesia</i> etkenlerinde kullanılan ilk ilaçtır. Uygulama etin, vücut sekreterinin ve sütten maviye boyanmasına sebep olduğundan yerini büyük oranda diamidinelere bırakmıştır.
Acridine Derivatları	4,4 ml/100 kg, %5'lik sol., i.v	<b>Acriflavine hydrochloride</b> *Gonacrine (May and Baker)	Trypan blue gibi, <i>B. bigemina</i> ve diğer büyük <i>Babesia</i> türlerine etkilidir. <i>B. bovis</i> 'e karşı etkinliği düşüktür. Trypan blue'ya göre dokularda daha az renk değişikliğine sebep olur.
Üre derivatları (quinolone derivatları)	%5'lik Acaprin solusyonundan, 1-2 ml/100 kg dozunda 24 saat ara ile 1-2 uygulama, s.c	<b>Quinuronium sulphate</b> *Acaprin (Bayer) *Plazmozin (Vetas) *Ludobal (Bayer) *Babesan (ICI) *Akiron, Pirevan, Piroplasmin ve diğerleri	Uzun yıllar siğir babesiosis'inin tedavisinde kullanılmıştır. ( <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> , <i>B. divergens</i> ) İlaçım terapötik indeksi düşüktür ve parasempatik sinir sistemini uyarır (aşırı salivasyon, sık ürinsasyon, antikolinesteraz aktivitesine bağlı olarak meydana gelen dispnea, antidotu, adrenalin yada epinefrindir. Ülkemizde kullanımı yasaklanmıştır.
Diamidinelere	Carbanilides 5-10 mg/kg, i.m	<b>Amicarbalide diisethionate</b> *Diampron (May and Baker)	<i>B. bigemina</i> , <i>B. caballi</i> , <i>B. motasi</i> 'ye etkili bulunmuş fakat büyük <i>Babesia</i> türlerine karşı oluşan etkisi değişkindir. Küçük <i>Babesia</i> türlerine olan etkisinden fazla bahsedilmemektedir.
Diamidinelere	1,2-2,4 mg/kg s.c	<b>Imidocarb dipropionate</b> *Imizol (Burrroughs Wellcome) *Carbesia (F) *Forray-65 (Hoechst)	Siğir babesiosis'inin tedavi ve korunmasında etkilidir. Bağışıklığın gelişimine engel olmaz. Doza bağlı olarak korunma birkaç haftada bitebilir. İlaç vücuttan yavaş uzaklaştırılır, safra ile atılır. Etten arınma süresi 90, sütten ise 21 gündür. İlaçın tolerans aralığı yüksektir. Yan etkileri antikolinesteraz aktivitesine bağlıdır. Ölümcül toksikasyonda, renal nekroz, ödem, hidrotoraks, hidroperitonium, pulmoner konjesyon meydana gelir.
Aromatik Diamidinelere		<b>Phenamidine diisethionate</b> *Lomadine (May and Baker) *Oxopirvedine (Merieux)	Çoğunlukla köpek ve at babesiosis'inde kullanılan bu ilaç, <i>B. bigemina</i> enfeksiyonlarında da başarı ile kullanılmıştır.
Aromatik Diamidinelere	1-5 mg/kg, s.c	<b>Pentamidine diisethionate</b> *Lomadine (May and Baker)	<i>B. bigemina</i> 'ya bağlı, taşıyıcı, kalıcı enfeksiyonların Kemoimmünizasyonunda kullanılmıştır.

<b>Aromatik Diamidineler</b>	3-5 mg/kg. i.m	<p><b>Diminazene aceturate</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Berenil (Intervet)</li> <li>*Ganaseg (Squibb)</li> <li>*Fa.try.banil (Vetaş)</li> <li>*Berenil (Sanofi-DİF)</li> <li>*Babenil (Topkim)</li> </ul>	<p>Sığır, koyun, at ve köpek babesiosis'inde yüksek düzeyde etkili bulunmuştur. Küçük <i>Babesia</i> türleri büyük türlere göre tedaviye daha direçli bulunmuştur. Klinik belirtileri hafifletmesi ve bağışıklığın oluşmasına engel olmaması sebebiyle kemoimmunizasyon programlarında başarı ile kullanılmıştır.</p>
<b>8-Amino-quinolines</b>		<p><b>Primaquine diphosphate</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Primaquine (Bayer)</li> <li>*Neo-Quipenyl</li> <li>*Neo-Plasmochin</li> </ul>	<p>Özellikle <i>B.felis</i> için etkili bulunmuştur.</p>
<b>Tetracyclines</b>		<p><b>Oxytetracycline</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Tetramycin, LA (Pfizer)</li> <li>*Tenaline LA (Sanofi-DİF)</li> <li>*Alamycin LA (Topkim)</li> <li>*Depolen LA (Alke)</li> </ul>	<p><i>Ixodes ricinus</i> ile şiddetli enfeste alanlarda otlatılan hayvanlarda, <i>B.divergens</i>'in kontrolü amacıyla sürekli olarak 4 günde bir 20 mg/kg dozda uygularak kullanılabilir. Bağışıklığın gelişimine izin vermesi sebebiyle kemoimmunizasyonda kullanılabilir.</p>
<b>Tetracyclines</b>		<p><b>Chlortetracycline</b></p> <p>Aureomycine (Lederle)</p>	<p><i>B.equi</i>'nin erken dönemlerinde kontrolü amacıyla kullanılmıştır.</p>
<b>Macrolide Antibiyotikler</b>		<p><b>Clindamycin (Upjohn)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Clindavet (Roche)</li> </ul> <p><b>Vancomycin HCl (Lilly)</b></p>	<p>Özellikle insanlarda <i>B.microti</i>'ye bağlı babesiosis vakalarında kullanılmaktadır</p>
<b>Hydroxynaphthoquinones</b>		<p><b>Parvoquone</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Clexon (Wellcome)</li> <li>*Butalex (Wellcome)</li> </ul>	<p><i>B.equi</i> vakalarında etkili bulunmuştur.</p>

Hasta hayvanlarda kullanılan babesidal ilaçlarla birlikte kalp takviye edici, rumen atonisini giderici ilaçlar, eğer tedavide gecikilmiş ise kan nakli, serum ve vitamin gibi destekleyici tedaviler de uygulanmalıdır. Aynı zamanda hasta hayvan tedavi süresince, sürüden ayrılarak, serin ve temiz yere alınmalı, sulu gıdalarla beslenmelidir (Kuttler, 1981; Peregrine, 1994; Melhorn, 2001).

### **1.11. Babesiosis'den Korunma**

Babesiosis'de koruyucu önlemlerin alınması büyük önem taşımaktadır. Bu teknikler arasında, vektör kenelerle mücadele, suni preimmünizasyon ve aşılama önemlidir (Levine, 1985; Soulsby, 1986; Dinçer, 1990).

#### **1.11.1. Vektör Kenelerle Mücadele**

Hastalık kenelerle nakledildiği için bu hastalıktan, korunma ve kontrolde, kenelerle mücadele, yapılması gerekenlerden en önemlisidir. Vektör kenelerle mücadele edilmedikçe, hastalığı eradike etmek mümkün değildir. Kenelerle savaş için bölgenin kene faunası tespit edilmeli ve bu kenelerin biyo-ekolojik özellikleri araştırılmalıdır. Kene mücadelesi çeşitli akarisitlerle yapılabileceği gibi biyolojik ajanlarla da yapılabilir. Akarisit olarak, organik klorlu, organik fosforlu ve karbamatlı ilaçlardan banyo ve püskürtme şeklinde yararlanılabildiği gibi ivermektin deriveleri de enjeksiyon şeklinde uygulanabilir (Pipano ve Hadani, 1984; Yukarı ve Karaer, 1996; Melhorn, 2001).

Türkiye'de ilkbahar mevsiminde hayvanların üzerindeki keneleri uzaklaştırmak için banyo ve püskürtme yoluyla çeşitli akarisitler kullanılmaktadır. Bu mücadeleye Nisan ayı sonundan itibaren başlanmalı, her 15 günde bir ilaçlama tekrarlanmalı ve Ağustos ayının ortalarına kadar devam edilmelidir. Ayrıca hayvanların barınakları da vektör kene bakımından ilaçlanmalıdır. Aynı ilaç devamlı kullanıldığında direnç

sağlaması ve bu direncin genetik olarak yeni nesillere geçmesi sebebiyle kullanılan ilaçları zaman zaman değiştirmek gerekmektedir (Yukarı ve Karaer, 1996).

Kenelere karşı mücadele de biyolojik ajanlar da kullanılabilir. Bu amaçla, virus, bakteri, mantar, protozoon, nematod, insekt veya feromonlar kullanılmaktadır. Ancak bu ürünlerin etkinliği tam olarak bilinmemektedir. Bunun yanında, son yıllarda, kenelere karşı aşılar geliştirilmektedir. Antijen olarak, kenenin mide hücrelerinden elde edilen doğal veya rekombinant proteinler kullanılmaktadır (Melhorn, 2001).

Diğer taraftan, endemik stabil bölgelerde, yoğun biçimde akarisit kullanılması, kene populasyonunu azaltarak bölgenin instabil olmasına yani bölgedeki hayvanların hastalığa karşı duyarlı hale gelmesine sebep olmaktadır. Bu yüzden özellikle sıkı kene mücadelesinin instabil bölgelerde uygulanması önerilmektedir (Melhorn, 2001).

### **1.11.2. Preimmünizasyon Kazandırılması**

Enzootik alanlarda yetiştirilen, sığırlar babesiosis'e karşı ilk altı ayda, enfeksiyon immunitesi yada preimmünizasyon kazanırlar. Sonuç olarak bu hayvanlar az miktarda parazit taşırlar ve o bölgedeki lokal suşlara karşı belirli ölçüde bağışıklırlar buna bağlı olarak klinik belirti göstermezler. Bölgeden kenelerin tamamen uzaklaştırılması ve küratif ajanlarla enfeksiyonun tamamen ortadan kaldırılması sonucu hayvan duyarlı hale gelir. Bu durumda olan yada parazitin bulunmadığı instabil bölgelerden, böyle endemik bölgelere gelecek olan hayvanlara suni preimmünizasyon kazandırma uygulamaları yapılabilir. Bunun için duyarlı olan hayvanlara, *Babesia* taşıyıcı olan hayvanların, kanı verilir ve oluşan ateş ve parazitemi takip edilir. Klinik belirtilerin oluşması ile birlikte küratif dozun altında diminazen aseturat ve imidokarb preparatları uygulanarak hastalığın çıkışı önlenir ancak belirli bir miktar parazitin canlı kalmasına mücadele edilir. Böylece uygulama yapılan hayvanda yapay olarak preimmünizasyon oluşumu sağlanmış olur (Melhorn, 2001).

### 1.11.3. Aşılama

Sığırlarda babesiosis'in naklinden sorumlu olan, kenelere karşı yürütülen mücadelede çeşitli akarisitlere karşı gelişen direnç sebebiyle, hastalıkla mücadelede etkene karşı aşılamanın yapılması önem kazanmıştır. Uzun yıllar preimmün durumdaki hayvanların kanları aşılama da kullanılmıştır. Ancak daha sonraları bu canlı aşılar, dalağı çıkarılmış danalarda pasajlanarak ve eritrosit olmayan plazma benzeri mediu mlarda sulandırılarak, attenüe edilmiş ve  $10^7$  enfekte hücre dozu kullanılarak aşılama işle mi gerçekleştirilmiştir. Özellikle bu canlı aşılar Avusturalya'da ve İsrail'de *B. bovis* enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılmış ve 4 yıla kadar koruma sağladığı bildirilmiştir (Mahoney ve ark., 1979; Pipano, 1995, Melhorn, 2001)

Canlı aşıl arın sınırlı raf ömürleri, soğuk zincire mutlak bağı olması, diğ er patojen etkenlerle kontaminasyonu ve etkenlerin tekrar virulans kazanarak keneleri enfekte etme riskleri sebebiyle son yıllarda kullanımından büyük oranda vazgeçilmiştir. Canlı aşıl arın bu gibi dezavantajlarının bulunması bunun yanında, sürekli in-vitro kültür sistemlerinin de devreye girmesiyle konvansiyonel inaktif ve doğal protein sub-unit aşıl arın kullanımı gündeme gelmiştir. Sürekli in vitro kültür sistemlerinin geliştirilmesi sonucunda çözünebilir ekzoantijen içeren, parazit ve kültür süpernatantları aşıl amada kullanılmış ve heterolog suşlarla yapılan challangelarda başarı sağlanmıştır. Montenegro-James ve ark. (1987), *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın kültür kaynaklı çözünebilir immunojenleri ile yaptıkları aşıl ama sonucunda, virulent kene ve enjeksiyonla etken vererek yapılan challengelara karşı klinik olarak korunma sağlamışlardır. Ancak bu tür çalışmalar konusunda da farklı görüşler vardır. Bazı araştırmacılar bu tür aşıl arı başarılı bulurken diğ er bir grup immün sistemi uyardırma da yetersiz kaldıklarını bildirmektedir (Wright ve ark.,1992; Montenegro-James, 1995).

Son yıllarda moleküler biyoloji ve gen teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak, rekombinant DNA aşıl arı geliştirilmeye başlanmıştır. İmmunojenik özelliği iyi olduğu tespit edilen, antijenik proteinleri kodlayan gen bölgesi saptanarak

klonlanmış ve bu klonlama ile çoğaltılan antijenik proteinler aşılama da kullanılmıştır (Wright ve ark., 1992; Melhorn, 2001). Hines ve ark. (1995), *B.bovis* 'in rekombinant, merozoit yüzey antijeni-1'in, in-vitro olarak merozoit enfektivitesini nötralize ettiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışma ile, sığırlarda görülen *Babesia* türlerinden *Babesia bigemina*, *B.bovis* ve *B.divergens* 'in Reverse Line Blotting ile eş zamanlı teşhisinin yapılması ve bu yöntemin mikroskopik muayene, IFAT yöntemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Saha Çalışmaları

Bu çalışma için gerekli materyali toplamak amacıyla, 2001-2002 yıllarına ait çeşitli dönemlerde Ankara çevresinde 10 ilçeye ait köylere gidilmiş ve meraya çıkan 1 yaşın üstündeki hayvanlardan rastgele 300 sığır seçilmiştir. Bu sığırlardan PZR için EDTA'lı, IFAT için silika jelli tüplere vena jugularis'den tekniğine uygun olarak kan alınmıştır. Ayrıca aynı hayvanların kuyruk uçlarından perifer kan frotileri hazırlanmış ve aynı zamanda bu hayvanların kene yönünden de kontrolleri yapılmıştır.

### 2.2. Laboratuvar Çalışmaları

Toplanan EDTA'lı tüplerdeki kanlar DNA ekstraksiyonuna kadar +4°C'de saklanmışlardır. Silika jelli serum tüplerindeki kanlar ise 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve serumlar 1,5 ml'lik mikrotüplere porsiyonlanarak IFAT'da kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Perifer kandan hazırlanan sürme preparatlar da tekniğine uygun şekilde boyanarak değerlendirilmek üzere hazırlanmıştır. Sığırlar üzerinden toplanan keneler, içinde %70'lik alkol bulunan şişelere konularak tür identifikasyonları için saklanmıştır.

### 2.3. Kan Frotilerinin Yapımı ve Muayenesi

Sığırların kuyruk ucundan yapılan frotiler havada kurutulduktan sonra, metil alkolde 5 dakika tespit edilmiş ve %5'lik Giemsa boya solusyonu ile oda ısısında 30-45 dakika boyanmıştır. Boyanan frotiler musluk suyu altında yıkanıp kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak mikroskopun 100'lük objektifi altında *Babesia* türleri yönünden kontrol edilmiştir. *Babesia* türleri soy düzeyinde tespit edilmiş, tür teşhisine gidilmemiştir.

## 2.4. İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT)

### *Antijen*

Bu araştırmada kullanılan *Babesia bigemina*, *B.bovis*, *B.divergens* antijenleri, Hannover Veteriner Yüksek Okulu Parazitoloji Enstitüsü'nden elde edilmiştir.

### *Konjugat*

İndirek Floresan Antikor testinde Sigma, Cat. No: F-7509 konjugatı kullanılmıştır. Konjugatın en iyi floresan veren sulandırma basamağı Schachbrett titrasyonu ile tespit edilmiştir. Bu işlem akmak (1987)'in belirttiği şekilde yapılmıştır. Titrasyon sonunda, en iyi floresan veren sulandırma basamağı 1:32 olarak tespit edilmiştir.

### *IFAT'da Kullanılan Kontrol Maddeleri*

- **Buffer Kontrol:** Buffer kontrol olarak PBS (pH 7.2) kullanılmıştır.
- **Konjugat Kontrol:** Sulandırma basamağı tespit edilmiş konjugat
- **Negatif Kontrol:** Negatif serumlar A. Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı'nın yürüttüğü projelerde, deney hayvanı olarak kullanılmak üzere alınan steril 2.5-3 aylık holştayn danalardan, deneylerden önce alınan serumlardan temin edilmiştir. Bu serumların negatiflikleri Hannover Veteriner Yüksek Okulu Parazitoloji Enstitüsünden getirilen serumlarla doğrulanmıştır.
- **Pozitif Kontrol:** Pozitif serumlar Hannover Veteriner Yüksek Okulu Parazitoloji Enstitüsü'nden elde edilmiştir.

### *IFAT'ın Uygulanışı*

Testin uygulanışı akmak (1987)'in bildirdiğine göre yapılmıştır.

- İncelenecek serumlar bir gün önceden -20°C'den +4°C'ye konulmuştur.

- Testin yapılacağı gün antijen preparatları  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak, 2 saat önce  $\text{CaCl}_2$ 'li kaba konmuştur.
- İşlenecek ve referans olan serumlar tekniğine uygun olarak mikrolatelerde PBS ile sulandırılmıştır.
- Antijen lamları  $\text{CaCl}_2$ 'li kaptan çıkarılarak, numaralandırılmış ve tabanı nemlendirilmiş küvete yerleştirilmiştir. Sonra sulandırılmış serumlar antijen lamlarına damlatılmıştır.
- Küvetin ağzı kapatılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında lamlar önce pisetle, sonra manyetik karıştırıcıda 10 dakika PBS ile yıkanmıştır. Sonra PBS kalıntısını gidermek için lamlar distile su dolu kaba daldırılıp, çıkarılarak yıkanmıştır. Yıkama sonrası fön makinası ile kurutulmuştur.
- Kurutulan preparatlar tekrar rutubetli küvete alınarak, antijen lamlarının her gözüne, sulandırma solusyonu (3 kısım PBS + 1 kısım Evans Blue) ile 1:32 oranında sulandırılmış konjugat, PBS kontrol gözü hariç, damlatılmış ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Yukarıda belirtildiği şekilde yapılan yıkama ve kurutma işlemlerinden sonra lamların üzeri gliserin buffer damlatılarak lamelle kapatılmıştır.
- Hazırlanan antijen lamları, karanlık odada, floresan mikroskopun 40'lık neofluar objektifinde incelenmiştir.
- Testin pozitifliği karanlık sahadaki parlamalara göre değerlendirilmiştir. Testin değerlendirilmesinde temel titre *B.bigemina* için 1:80, *B.bovis* için 1:40, *B.divergens* için ise 1:20 olarak kabul edilmiştir. Temel titrenin altındaki değerler negatif, temel titre ve üstü değerler pozitif kabul edilmiştir.

### ***IFAT'da Kullanılan Kimyasal Maddeler***

- Fosfat Buffer Salin (PBS) Potasyumsuz
  - Alkali kısım: 17,44 gr NaCl  
 $\frac{7,16 \text{ gr Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}}{24,60 \text{ gr}}$  2000 ml distile suya tamamlanır.

- Asit kısım: 8,72 gr NaCl  
1,38 gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
10,10 gr 1000 ml distile suya tamamlanır.

Bu iki karışım birbiri ile karıştırılarak pH: 7,2'ye ayarlanmıştır.

- Evans Blue Merck, Cat. No: 3169
- Floresan mikroskop için gliserin Merck, Cat. No: 4095
- İmmersiyon yağı Merck, Cat. No: 4699
- Konjugat Sigma, Anti-bovine IgG  
FITC Conjugate, Cat. No:F-7509

## 2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

### *DNA Ekstraksiyonu*

Parazit DNA'sının elde edilmesi için EDTA'lı tüplere alınarak +4 °C'de saklanan kanlar kullanılmıştır. Kanda, eritrositlerin içindeki parazitlerin DNA'sının elde edilmesi için ekstraksiyon işlemi d'Oliveira ve ark. (1995) ile Gubbels ve ark. (1999)'nın bildirdiği şekilde yapılmıştır.

- Ekstraksiyon için kullanılan 1,5 ml'lik mikro tüplere 500µl lysis miks alınmış, üzerine 200 µl kan örneği ilave edilmiştir. Bu karışımın bulunduğu tüpler vorteksle iyice karıştırılarak eritrositlerin parçalanması sağlanmıştır.
- Vorteksle karıştırılan tüpler 3300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası üstteki sıvı atılmıştır.
- Çöküntünün üzerine 500µl lysis miks ilave edilerek aynı işlemler 3 kez daha tekrarlanmıştır.
- Son yıkama işleminden sonra çöküntünün üzerine 100 µl PZR miks ilave edilerek vortekslenmiştir. Proteinase K, stok halde hazır bulundurulan PZR mikse, kullanılmadan hemen önce 100 µg/ml oranında ilave edilmiştir.

- PZR miksle karıştırılan çöküntü, Proteinase K'nın aktivitesini göstermesi için 55 °C'deki su banyosunda 12 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örnekler 100°C'de 10 dakika su banyosunda ısıtılarak Proteinase K inaktive edilmiş, maksimum hızda 2 dakika santrifüj sonunda üst kısımda toplanan DNA süspansiyonu alınmıştır.
- Elde edilen DNA ekstraktları PZR işlemine kadar -20°C'de saklanmıştır.

### ***PZR'ın Yapılışı***

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Biometra TGradient (Whatmann, Biometra) PZR makinesi kullanılmıştır. Reaksiyonda primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S ssr RNA (small subunit ribosomal RNA) geninin değişken V4 bölgesinden büyüklüğü 460 ile 520 bp (base pairs= baz çifti) arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler (RLB-F2; 5'-GAGGTAGTGACAAGAAAT-AACAATA-3' ve RLB-R2; 5'biotin\*-TCTTCGATCCCCTAACTTTC-3') kullanılmıştır (Georges ve ark., 2001; Gubbels ve ark., 1999). Primerler, Isogen (Hollanda), Genset (Fransa) ve MWG (Almanya) firmalarına sentezlettirilmiştir.

Reaksiyon karışımı 50 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır.

- Reaksiyon karışımı;
  - 1X PCR buffer (Sigma ve Fermentas)
  - 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma ve Fermentas)
  - 200 µM herbir (dATP, dCTP, dGTP), 100 µM (dTTP, dUTP) deoxynucleotiden (Sigma ve Fermentas)
  - 50 pmol herbir primerden
  - 1,25 U *Taq* DNA polymerase (Sigma ve Fermentas)
  - 1,25 U Uracil DNA glycosylase (Fermentas)
  - 5 µl DNA örneği şeklinde hazırlanmıştır.
- Karışım herbiri 200 µl'lik ısıya dayanıklı özel PZR reaksiyon tüplerine (Tref Lab) 45 µl reaksiyon karışımı 5 µl DNA olmak üzere porsiyonlanmıştır.

- Reaksiyon için tüpler otomatik PZR makinesine yerleştirilmiş ve iki sikluslu touch down PZR programı uygulanmıştır.

- PZR programı

1 siklus	37 °C'de 3 dakika
	94 °C'de 10 dakika
2 siklus	94 °C'de 20 saniye
	67 °C'de 30 saniye
	72 °C'de 30 saniye
2 siklus	94 °C'de 20 saniye
	65 °C'de 30 saniye
	72 °C'de 30 saniye
2 siklus	94 °C'de 20 saniye
	63 °C'de 30 saniye
	72 °C'de 30 saniye
2 siklus	94 °C'de 20 saniye
	61 °C'de 30 saniye
	72 °C'de 30 saniye
2 siklus	94 °C'de 20 saniye
	59 °C'de 30 saniye
	72 °C'de 30 saniye
40 siklus	94 °C'de 20 saniye
	57 °C'de 30 saniye
	72 °C'de 30 saniye

65 °C'de bekle.

- Amplifikasyon sonunda elde edilen PZR ürünlerinin bir kısmı (20 µl) %1,7'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, UVP Jel Dokümentasyon Sistemi ve LabWorks imaj analiz programı (UVP INC. Upland, CA) kullanılarak görüntülenip analiz edilmiş, geri kalanı ise (30 µl ) RLB testinde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

## ***Pozitif ve Negatif Kontrol***

Testin bilinen *Babesia* türlerinin DNA'larını amplifiye ettiğini göstermek amacıyla pozitif kontrol olarak, *B.bovis* (Meksika izolatu), *B.divergens* (Hollanda izolatu), *B.bigemina* (Kayseri izolatu), *B.major* (Ankara izolatu) ve negatif kontrol olarak da sığır DNA'sı kullanılmıştır. Diğer kan parazitleri ile karşılaştırmalı kontrolü için *Theileria annulata* ve *T.orientalis* pozitif kontrolleri de kullanılmıştır. (Şekil 2.1)

## **2.6. Reverse Line Blotting (RLB)**

### ***RLB Membranın Hazırlanması***

Bu aşamada kullanılan problemlerin tamamı negatif yüklü Biotin C membrana (Pall Biosupport group, Ann Arbor, MI) kovalent bağlanabilmeleri amacıyla, 5'- uçlarında amino grubu (N-terminal N-(Trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl,N,N-diisopropyl phosphoramidite(=TFA))-C<sub>6</sub> aminolinker) içerecek şekilde Genset (Fransa), Isogen (Hollanda) ve MWG (Almanya) firmalarına sentezlettirilmiştir. Membran Georges ve ark. (2001), Gubbels ve ark. (1999)'nın bildirdiği şekilde hazırlanmıştır.

- Problemler 500 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.4) içinde 100-400 pmol/150 µl konsantrasyonlarda sulandırılmıştır.
- Kullanılacak olan membran oda ısısında 10 dakika, 10 ml %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) (Sigma) ile aktive edilmiş ve sonra su ile yıkanmıştır.
- Membran yıkama işleminden sonra MN45 miniblottera (Immunitics, Cambridge, Mass) yerleştirilmiştir.
- Membran üzerindeki kalıntı sıvılar iyice aspire edildikten sonra, ilk ve son kanala 2X SSPE ile %2 oranında sulandırılmış çini mürekkebi, diğer kanallara ise her probtan 150 µl dökülmüş, oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon sonunda kanallardaki sıvılar aynı şekilde aspire edilerek boşaltılmıştır.
- Miniblotterdan çıkarılan membran 100 mM NaOH içinde 10 dakika inkübe edilerek inaktive edilmiştir.
- İnaktivasyon sonunda membran 2X SSPE/0.1 SDS karışımında 60 °C'de 5 dakika yıkanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

### ***RLB Hibridizasyonu***

Hibridizasyon işlemi Georges ve ark. (2001), Gubbels ve ark. (1999)'nın bildirdiği şekilde yapılmıştır.

- Önceden elde edilen PZR ürünlerinin her birinden 30 µl alınarak, 2X SSPE/0.1 SDS karışımı ile 150 µl'ye tamamlanmış ve 100 °C'de 10 dakika denatüre edilmiştir.
- Membran önceden dökülen prob sıraları ile miniblotterın kanalları 90° açı yapacak şekilde miniblottera yerleştirilmiştir.
- Membrandaki fazla sıvı aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
- Denatüre edilen ve sulandırılan PZR ürünleri miniblotterın kanallarına dökülmüş 42°C'de 1 saat boyunca inkübe edilerek, problemlerle hibridizasyonları sağlanmıştır. Bu aşamada miniblotterın çalkalanmamasına dikkat edilmiştir.
- Hibridizasyon süresinin sonunda kanallardaki sıvı aspire edilmiştir.
- Miniblotterdan çıkarılan membran, 2X SSPE/0.1 SDS solusyonu ile 2 defa 52°C'de 10 dakika yavaşça çalkalanarak yıkanmıştır.
- Bu işlemi takiben membran, 42 °C'de 30 dakika 10 ml Horseradish Peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin solusyonunda hafif çalkalanarak (2X SSPE/%0.5 SDS ile 1:4000 oranında sulandırılmış) inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonu takiben membran 2X SSPE/0.5 SDS ile 2 defa 42°C'de 10 dakika yıkanmıştır.
- Son olarak, 2X SSPE ile 2 defa oda ısısında 5 dakika yıkanmıştır.
- Membran 10 ml ECL sıvısında 1 dakika inkübe edilmiştir.

- İnkübasyonu takiben sert bir zemine alınan membranın üzeri asetatla örtülerek, hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra karanlık ortamda üzerine ECL hyperfilm konulmuştur.
- Sinyal yoğunluğuna göre film 30 sn ile 1 saat arasında tutulmuştur.
- Daha sonra filmler banyo edilerek geliştirilmiştir.

Değerlendirmede filmler üzerinde prob ve PZR ürünlerinin döküldüğü sıralarının kesiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir. İstendiğinde ECL filmindeki görüntü UVP dokümantasyon sistemi ile fotoğraf haline getirilmiştir. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1 PZR ürünlerinin RLB testine tabi tutulmasından sonra membranın görüntüsü. (Orijinal)

### ***RLB'nin Duyarlılığının Saptanması***

Reverse Line Blotting testinin duyarlılığının tespiti amacıyla, *Babesia* ile enfekte parazitemisi bilinen kan enfekte olmayan kan ile  $10^9$  basamağına kadar sulandırılmıştır. RLB'nin tespit edebildiği en düşük parazitemi değeri  $10^6$  olarak saptanarak duyarlılığı, *Babesia* ve *Theileria* pozitif kontrol DNA'ları kullanılarak da özgüllüğü ortaya konmuştur. Kontrol DNA'larla yapılan testlerde kendi özgül problemleri dışında bağlanmalar gözlenmemiştir.

### ***PZR ve RLB Testlerinde Kullanılan Gereçler***

- PZR makinesi Biometra TGradient (Whatman, Biometra)
- 200 µl'lik PZR tüpü (Tref Lab)
- Elektroforez tankı (Anachem ScotLab)

- Güç Kaynağı Biometra P25 (Biometra)
- Dokümantasyon Sistemi (UVP Inc.)
- Biotyne C membran (Pall Biosupport Group)
- MN 45 Miniblotter (Immunetics, Cambridge, Mass)
- ECL hyperfilm (Amersham Biotech)

***PZR ve RLB Testlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solusyonlar***

- **Lysis miks:** %0.22 NaCl  
1 mM EDTA  
%0.015 Saponin
- **PZR miks:** 10 mM Tris-HCl pH 8.0  
50 mM KCl  
%0.5 Tween 20  
100 µg/ml Proteinase K\*

\* Proteinase K PZR miks tüplere dağıtılmadan az önce karışıma ilave edilmelidir.

- 1X PCR Buffer (Sigma ve Fermentas)
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma ve Fermentas)
- dNTP mix (Sigma ve Fermentas)
- dUTP (Fermentas)
- Uracil DNA glycosylase (Fermentas)
- *Taq* Polymerase (Sigma ve Fermentas)
- 500 mM NaHCO<sub>3</sub>
- %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) (Sigma)
- 100 mM NaOH
- 0,5 M EDTA (pH:8.0)
- **5X Tris-Borate EDTA (TBE):**

54 g	Tris base
27,5 g	Borik Asit
20 ml	0,5 M EDTA

1 lt'ye tamamlanıp manyetik karıştırıcıda karıştırılır.

- **%10 SDS:** 10 g SDS (Lauryl Sulphate) (Sigma)  
100 ml H<sub>2</sub>O

Karıştırılıp, 60°C'lik su banyosunda eritilir.

- **20X SSPE:** 175,3 g NaCl  
27,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O  
7,4 g EDTA  
800 ml H<sub>2</sub>O

10 N NaOH ile pH 7,4'e ayarlanır. 1 lt'ye tamamlanır.

- **2X SSPE/0.1 SDS:** 100 ml 20X SSPE  
10 ml %10 SDS  
890 ml H<sub>2</sub>O

Karıştırılıp, 60°C'lik su banyosunda eritilir.

- **2X SSPE/0.5 SDS:** 100 ml 20X SSPE  
50 ml %10 SDS  
850 ml H<sub>2</sub>O

Karıştırılıp, 60°C'lik su banyosunda eritilir.

- Streptavidin (Horseradish peroksidaz) (Serotec)
- ECL tespit sıvısı (Amersham Biotech)

## PZR ve RLB Testlerinde Kullanılan Primer ve Problar

Çizelge 2.1 PZR'da Kullanılan Primerler

Primerin Adı	Dizilişi	Kaynak
RLBF <sub>2</sub>	5'GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G'3	Gubbels ve ark.,1999
RLBR <sub>2</sub>	Biotinle işaretli 5'TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC'3	Gubbels ve ark.,1999

Çizelge 2.2 Biodyne C membrane tuturulan aminolinkerli problemlerin 5'-3' dizilişleri \*

Özgül Olduğu Tür	Dizilişi (5'-3')	Kaynak
<i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> Türleri (Catch All)	TAA TGG TTA ATA GGA RCR GTT G	Gubbels ve ark., 1999
<i>Babesia bovis</i>	CAG GT TTC GCC TGT ATA ATT GAG	Georges ve ark.,2001
<i>Babesia bigemina</i>	CGT TTT TTC CCT TTT GTT GG	Gubbels ve ark., 1999
<i>Babesia divergens</i>	GTT AAT ATT GAC TAA TGT CGA G	Gubbels ve ark., 1999

\* T: thymine; A: adenine; C: cytosine; G: guanine; R: A veya G

Çizelge 2.3 Çalışmada kullanılan problemlerin membrana tutturuluş sırası ve konsantrasyonları

Miniblotter	Prob	Konsantrasyon
Sırası	N-terminal C-6 aminolinker'lı	Pmol/150 µl
1	%2 çini mürekkebi	
2	NaHCO <sub>3</sub> Buffer	
3	<i>Babesia</i> + <i>Theileria</i> (Catch All)	100
4	<i>B. bigemina</i>	200
5	<i>B. bovis</i>	200
6	<i>B. divergens</i>	400
7-44	NaHCO <sub>3</sub> Buffer	
45	%2 çini mürekkebi	

## 2.7. Kenelerin Tür Teşhisi

Sığırlarda bulunan ve %70'lik alkole alınan kenelerin laboratuvarında stero-mikroskop altında morfolojik özellikleri incelenmiş ve ilgili kaynaklardaki teşhis anahtarları kullanılarak tür tayinleri yapılmıştır (Hoogstral, 1956; Merdivenci, 1969).

## 2.8 İstatistiksel Değerlendirmeler

Testlerin sonuçları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliği  $\chi^2$  (*ki kare*) testiyle, uyumlulukları ise *Kappa* testiyle incelenmiştir. Bu istatistiksel testler için SPSS 10.0 programından yararlanılmıştır.



### 3. BULGULAR

Bu çalışma ile 300 sığırın mikroskopik bakı, IFAT ve RLB ile babesiosis pozitiflikleri saptanmış ve Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Mikroskopik bakı, IFAT ve RLB sonuçlarının çalışma merkezlerine göre dağılımı

Çalışma Merkezi	Hayvan Sayısı	Mikroskopik Bakı		IFAT		RLB	
		Pozitif	%	Pozitif	%	Pozitif	%
Bala	32	1	3,12	4	12,5	1	3,12
Beypazarı	8	0	0	1	12,5	2	25
Çubuk	60	0	0	10	16,6	5	8,3
Elmadağ	52	2	3,84	6	11,5	10	19,23
Gölbaşı	3	0	0	0	0	0	0
Haymana	31	0	0	0	0	0	0
Kazan	7	1	14,2	1	14,2	1	14,29
Kızılcahamam	10	0	0	2	20	3	30
Merkez İlçe	57	1	1,75	2	3,5	1	1,75
Polatlı	40	3	7,5	1	2,5	7	17,5
<b>TOPLAM</b>	<b>300</b>	<b>8</b>	<b>2,7</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>30</b>	<b>10</b>

Bu çizelgeden de anlaşılacağı gibi (Çizelge 3.1) sığırlarda babesiosis prevalans değerleri, mikroskopik bakıya göre, %2,7 (8/300), IFAT’a göre %9 (27/300), RLB’ye göre de %10 (30/300) olarak saptanmıştır. Çalışma merkezlerine göre pozitifliğin dağılımı, mikroskopik bakıda prevalans değeri -0- olan Beypazarı, Çubuk, Gölbaşı, Haymana, Kızılcahamam hariç diğer çalışma merkezlerinde % 1,75-14,2 arasında, IFAT ile seroprevalansı -0- olan Gölbaşı ve Haymana hariç diğer merkezlerde %2,5-20 arasında, RLB ile IFAT’da da seroprevalansı -0- olan Gölbaşı ve Haymana hariç diğer çalışma merkezlerinde %1,75-30 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Yine Çizelge 3.1’de üç tanı yönteminden elde edilen ayrı ayrı pozitif sonuçların toplam 65 olduğu halde, bunlardan 21’inin uygulanan üç yöntemden en az ikisi ile pozitiflik verdiği saptanmış ve buna göre çalışmanın yapıldığı bölgede babesiosis prevalansının %14,6 (44/300) olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada uygulanan tanı yöntemlerinin istatistiksel değerlendirmelerinin yapılabilmesi amacı ile mikroskopik bakı, IFAT ve RLB'den elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 RLB, Mikroskopik bakı ve IFAT sonuçlarının karşılaştırılması

	RLB		TOPLAM
	-	+	
MB*- ; IFAT -	250	17	267
MB - ; IFAT +	20	5	25
MB + ; IFAT -	0	6	6
MB + ; IFAT +	0	2	2
<b>TOPLAM</b>	<b>270</b>	<b>30</b>	<b>300</b>

\*Mikroskopik bakı

Buna göre (Çizelge 3.2), RLB esas alındığında mikroskopik muayenenin duyarlılığının %26,7, özgüllüğünün ise %100 olduğu görülmüştür. Her iki test arasındaki uyumluluk, %39,6 olarak tespit edilmiştir. Mikroskopik muayene ile RLB testi sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır. ( $p<0,05$ ) Aynı şekilde RLB esas alındığında IFAT'ın duyarlılığının, %43,3 özgüllüğünün ise %94,8 olduğu görülmüştür. RLB ve IFAT'ın uyumluluğu % 39,9 olarak tespit edilmiştir. İki test sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ( $p<0,05$ )

Mikroskopik bakıda *Babesia* türlerinin ayrımı yanlışlıklara sebep olabileceğinden, sadece soy düzeyinde değerlendirilmiştir. IFAT ve RLB yöntemleri ile saptanan *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*'in çalışma merkezlerindeki poziflikleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Sığırlarda babesiosis etkenlerinin IFAT ve RLB pozitiflikleri

<b>Babesia Türleri</b>	<b>IFAT</b>	<b>RLB</b>
<i>B. bigemina</i>	22	12
<i>B. bovis</i>	4	7
<i>B. divergens</i>	0	5
<i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i>	1	3
<i>B. bigemina</i> + <i>B. divergens</i>	0	3
<b>TOPLAM</b>	<b>27</b>	<b>30</b>

Çizelge 3.3'den her iki yöntemle *B. bigemina*'nın diğer iki türe göre daha fazla görüldüğü, bununla birlikte *B. divergens*'in sadece RLB ile saptandığı, *B. bovis* ile *B. divergens*'in birlikte miks enfeksiyonlar oluşturmadığı anlaşılmaktadır.

Çizelge 3.4 RLB ve IFAT sonuçlarının karşılaştırılması

		<b>IFAT</b>		<b>Toplam</b>
		-	+	
<b>RLB</b>	-	256 (%94,8)	14 (%5,2)	270 (%100)
	+	17 (%56,7)	13 (%43,3)	30 (%100)
<b>Toplam</b>		273 (%91)	27 (%9)	300 (%100)

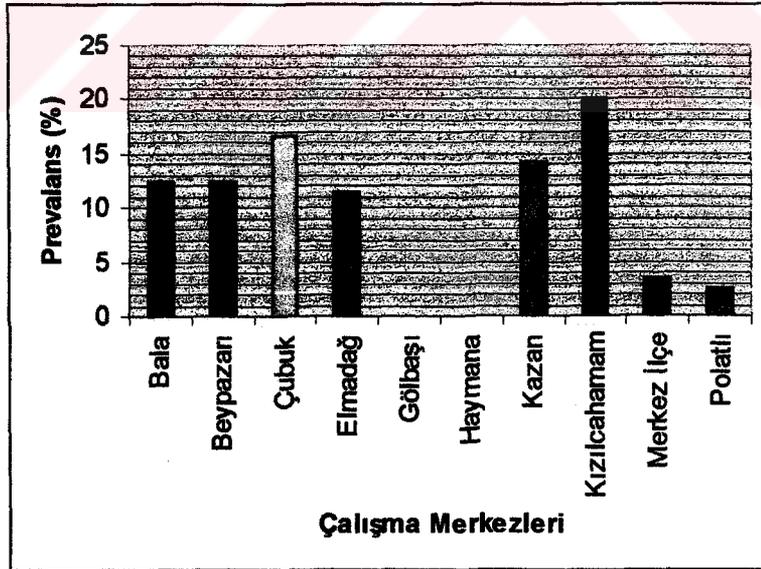
İndirek floresan antikor testi sonuçları ile RLB sonuçları karşılaştırıldığında, IFAT ile pozitif bulunan 13 örnek, RLB'de de pozitif sonuç verirken, IFAT ile tespit edilen 14 pozitif örnekte RLB ile pozitiflik saptanamamıştır. RLB ile pozitif bulunan 17 örnekte ise IFAT negatif sonuç vermiştir. IFAT ve RLB'de pozitif sonuç veren 13 örneğin 11'inde, bulunan türler paralellik göstermiştir. IFAT'da *B. bigemina* pozitif bulunan 2 örnekte RLB testi *B. bigemina* - *B. bovis* miks sonuç vermiştir. RLB ve IFAT sonuçlarının karşılaştırması Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çalışma merkezlerine göre, IFAT ile 27 (% 9) seropozitiflik saptanmış, bunlardan 22'sinde *B. bigemina*'ya, 4'ünde *B. bovis*'e ve birinde *B. bigemina*+*B. bovis*'e karşı antikor bulunduğu halde, *B. divergens*'e karşı antikor tespit edilmemiştir. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.1'de bu sonuçların çalışma merkezlerine göre dağılımları verilmiştir.

Çizelge 3.5 Serolojik sonuçların çalışma merkezlerine göre dağılımı.

Çalışma Merkezi	Hayvan Sayısı	Seroloji Pozitif		<i>B. bigemina</i>		<i>B. bovis</i>		<i>B. divergens</i>		<i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i>	
		Pozitif	%	Pozitif	%	Pozitif	%	Pozitif	%	Pozitif	%
Bala	32	4	12,5	3	9,4	1	3,1	0	0	0	0
Beypazarı	8	1	12,5	1	12,5	0	0	0	0	0	0
Çubuk	60	10	16,6	8	13,3	1	1,6	0	0	1	1,6
Elmadağ	52	6	11,5	6	11,5	0	0	0	0	0	0
Gölbaşı	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haymana	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kazan	7	1	14,2	1	14,2	0	0	0	0	0	0
Kızılcahamam	10	2	20	2	20	0	0	0	0	0	0
Merkez İlçe	57	2	3,5	0	0	2	3,5	0	0	0	0
Polatlı	40	1	2,5	1	2,5	0	0	0	0	0	0
<b>TOPLAM</b>	<b>300</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>22</b>	<b>7,3</b>	<b>4</b>	<b>1,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0,3</b>

Yine Çizelge 3.5’de 10 çalışma merkezinden 7’sinde *B. bigemina*, 3’ünde *B. bovis* seropozitifliği saptandığı, seropozitifliğin *B. bigemina*’da %2,5-20 oranında, *B. bovis*’de %1,6-3,5 arasında olduğu görülmektedir.



Şekil 3.1 Çalışma merkezlerine göre seroprevalans değerlerinin dağılımı

Şekil 3.1’de çalışma merkezlerinde IFAT ile babesiosis’in seroprevalansı gösterilmiştir. Buna göre, Gölbaşı ve Haymana dışındaki çalışma merkezlerinden Kızılcahamam’da seroprevalans değerinin en yüksek, Polatlı’da ise en düşük olduğu tespit edilmiştir.

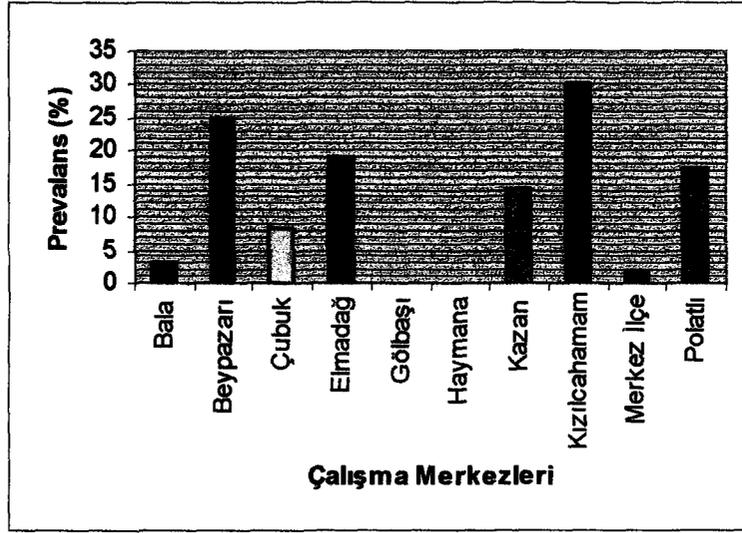
Reverse line blotting testi ile 300 sığırdan 30 (%10)’unun *Babesia* türlerini taşıdığı, bunlardan 24’ünün tek bir türle (12’sinde *B.bigemina*, 7’sinde *B.bovis*, 5’inde *B.divergens*) 6’sının iki türle (3’ünün *B.bigemina*-*B.divergens*, 3’ünün *B.bigemina*-*B.bovis*) enfekte olduğu tespit edilmiştir. (Çizelge 3.6)

Çizelge 3.6 RLB sonuçlarının çalışma merkezlerine göre dağılımı

Çalışma Merkezi	RLB Pozitif	<i>B.bigemina</i>	<i>B.bovis</i>	<i>B.divergens</i>	<i>B.bigemina</i>	
					+	+
					<i>B.divergens</i>	<i>B.bovis</i>
Bala	*1/32	0	0	0	0	1
Bey pazarı	2/8	1	0	0	0	1
Çubuk	5/60	3	1	0	0	1
Elmadağ	10/52	5	0	3	2	0
Gölbaşı	0/3	0	0	0	0	0
Haymana	0/3	0	0	0	0	0
Kazan	1/7	1	0	0	0	0
Kızılcahamam	3/10	0	1	1	1	0
Merkez İlçe	1/57	1	0	0	0	0
Polatlı	7/40	1	5	1	0	0
<b>TOPLAM</b>	<b>30/300</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

\*: n/x (n: enfekte hayvan sayısı; x:muayene edilen hayvan sayısı)

Çizelge 3.6’da ve Şekil 3.2’de Gölbaşı ve Haymana ilçelerinde *Babesia* türlerinin saptanamadığı, diğer ilçelerde ise %1,75 (Merkez İlçe 1/57) - %30 (Kızılcahamam 3/10) arasında olduğu görülmektedir.



Şekil 3.2 RLB sonuçlarına göre babesiosis'in prevalansının çalışma merkezlerine göre dağılımı

Şekil 3.2'de de çalışma merkezlerine göre RLB ile babesiosis'in prevalansı gösterilmiştir. Buna göre, Gölbaşı ve Haymana dışındaki çalışma merkezlerinden Kızılcahamam'da prevalans değerinin en yüksek (%30), Merkez İlçe'de ise en düşük (%1,75) olduğu tespit edilmiştir.

Sığırlardan toplanan kene türlerinin çalışma merkezlerine göre dağılımı Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7 Sığırlardan toplanan kene türlerinin çalışma merkezlerine göre dağılımı

Kene Türü		Bala	Elmadağ	Haymana	K.hamam	M. İlçe	Toplam
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Dişi	12	6	50	0	0	68
	Erkek	10	2	55	0	0	67
<i>Rhipicephalus bursa</i>	Dişi	0	0	13	10	0	23
	Erkek	0	0	8	20	0	28
<i>Boophilus annulatus</i>	Dişi	0	15	0	0	25	40
	Erkek	0	7	0	0	15	22
<i>Hyalomma anatolicum</i>	Dişi	3	10	0	3	3	19
	Erkek	2	5	0	5	2	14
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Dişi	0	0	1	0	0	1
	Erkek	0	0	0	0	0	0
<b>TOPLAM</b>		<b>27</b>	<b>45</b>	<b>127</b>	<b>38</b>	<b>45</b>	<b>282</b>

Çizelge 3.7’de de anlaşıldığı gibi, *Ixodidae* ailesinde 5 türe ait 282 olgun kene toplanmıştır. Bu kenelerin 151’i dişi 131’i erkek olarak tespit edilmiştir. Bunların dışında, 12 *Boophilus annulatus* nimfi de saptanmıştır. Kene bulunamayan, Beypazarı, Çubuk, Gölbaşı, Kazan, Polatlı hariç diğer çalışma merkezleri arasında en çok Haymana (127/282)’da en az Bala (27/282)’dan kene toplanmıştır. Tespit edilen kene türlerinin aylara göre dağılımı Çizelge 3.8’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.8 Kene türlerinin aylara göre dağılımı

Kene türü	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	TOPLAM
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	0	0	0	22	113	0	4	0	0	0	0	0	139
<i>Rhipicephalus bursa</i>	0	0	0	0	20	30	2	0	0	0	0	0	52
<i>Hyalomma anat. anatolicum</i>	0	0	0	5	15	8	0	0	0	0	0	0	28
<i>Boophilus annulatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	22	40	0	0	62
<i>Haemaphysalis punctata</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>TOPLAM</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>27</b>	<b>149</b>	<b>38</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>22</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>282</b>

Çizelge 3.8’de en fazla kenenin Mayıs ayında toplandığı Ocak, Şubat, Mart, Ağustos, Kasım ve Aralık aylarında kene bulunmadığı belirtilmiştir. Toplanan kene türleri içinde en çok *Rhipicephalus turanicus* (% 49,3) en az ise *Haemaphysalis punctata* (%0,4) tespit edilmiştir.

### 3. TARTIŞMA

Sığırlarda babesiosis tropik ve subtropik bölgelerde, kenelerle nakledilen ve ekonomik kayıplara yol açan önemli bir hastalıktır (Kuttler, 1988; Ulienberg, 1995). Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi Türkiye’de de sığır yetiştiriciliğini tehdit eden önemli sorunlardandır. Bugüne kadar babesiosis’in teşhisinde perifer kan frotilerinin mikroskopik muayenesi, serolojik muayene gibi teknikler kullanılmış, son yıllarda bunlara, PZR gibi moleküler biyolojik yöntemler de eklenmiştir. Bu teşhis yöntemlerinin uygulamaları sırasında birbirilerine göre çeşitli avantaj ve dezavantajları ortaya çıkmıştır (Böse ve ark., 1995).

Babesiosis’de hastalığı atlatan hayvanlar, uzun süre vücutlarında, az miktarda parazit taşıyarak vektör kenelerin enfeksiyon kaynağını oluşturmakta ve hastalık için portörlük yapmaktadırlar. Bu durumdaki taşıyıcı hayvanlarda mikroskopik muayene ile etkenleri teşhis etmek güçleşmekte ve yanılığara sebep olmaktadır (Figuroa ve Buening, 1995; Ceci ve ark., 1999; Almeira ve ark, 2001). Mikroskopik muayenede etkenin saptanmasının güçlüğü ile birlikte *Babesia* türlerinin ayrımlarını da yapmak zordur. Bu durum miks enfeksiyonlarda karışıklıklara sebep olmaktadır. Özellikle saha şartlarında hastalığın birden fazla tür tarafından oluşturulan miks enfeksiyonlar şeklinde seyrettiği göz önüne alındığında bu durum önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (d’Oliveira ve ark., 1995; Almeria ve ark., 2001).

Diğer taraftan, parazitin bizzat kendisinin değil de, ona karşı oluşan antikorların tespiti esasına dayandırılarak yapılan IFAT, ELISA, CFT gibi serolojik yöntemler ve bunlardan özellikle IFAT babesiosis’in teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Todorovic ve Carson, 1981; Anon, 1996). Ancak bu yöntemlerde, etken bulunmadığı halde antikorların varlığını devam ettirmesine bağlı olarak ortaya çıkan seropozitifliklerin (Gubbels ve ark., 1999) ve çapraz reaksiyonların sebep olduğu yanlış seropozitifliklerin meydana gelebileceği bildirilmiştir (Papadopoulos ve ark., 1996b).

Yukarıda açıklandığı gibi, parazitlerin teşhisinde gerek mikroskopik gerekse serolojik yöntemlerde karşılaşılan olumsuzluklar moleküler biyolojik çalışmalara paralel olarak geliştirilen PZR tekniği ile giderilmeye çalışılmıştır. Bu teknik ile özellikle taşıyıcı hayvanlarda *Babesia* türlerini de içine alan birçok patojen etkenin duyarlı ve özgül şekilde teşhis edilmesine olanak sağlanmıştır (Bishop ve ark., 1992; Fahrimal ve ark., 1992; Figueroa ve ark., 1992b; d'Oliviera ve ark., 1995; Calder ve ark., 1996). Ancak türe özgü PZR kullanılması durumunda, her hastalık etkeni için ayrı ayrı testlerin yapılması gerektiğinden bu durum hem zaman hem de ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu kayıpların giderilmesi amacıyla bir defada birden fazla parazit türünün teşhisine olanak sağlayan ve aynı zamanda PZR'a göre daha duyarlı olan RLB yöntemi geliştirilmiştir (Gubbels ve ark.,1999; Georges ve ark.,2001).

Geçmişte yapılan çalışmalarda, kan protozoonlarının teşhisinde PZR ve RLB'nin mikroskopik bakı ve IFAT'a göre hem daha duyarlı hem de daha özgül olduğu bildirilmiştir (d'Oliviera ve ark.,1995; Martin-Sánchez ve ark.,1999; Kırvar ve ark.,2000; Almeria ve ark.,2001; Tanyüksel ve ark.,2002; Vatansever ve Nalbantoğlu,2002). Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve RLB ile minimum parazitemi değerlerinin  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  arasında olduğu durumlarda bile parazitlerin saptanabildiği bildirilmiştir. Bununla ilgili olarak, PZR'ın saptayabildiği minimum parazitemi değerlerini Calder ve ark. (1996) *B.bovis* enfeksiyonlarında  $10^{-7}$ , Smeenck ve ark. (2000) *B.bovis* ve *B.bigemina* enfeksiyonlarında  $10^{-6}$  olarak tespit etmiş, Gubbels ve ark. (1999) ise RLB yöntemi ile *Babesia* ve *Theileria* türlerini  $10^{-6}$  parazitemi değerinde bile saptamışlardır. Gubbels ve ark. (1999) bildirdiği gibi bu çalışmada da *Babesia* türleri için tespit edilebilen minimum parazitemi değerinin  $10^{-6}$  olduğu görülmüştür.

Bugüne kadar babesiosis'in teşhisinde kullanılan mikroskopik bakı, serolojik yöntemler ve PZR'ın birbirileri ile duyarlılık bakımından karşılaştırılması yapıldığı halde (Calder ve ark.,1996; Krause ve ark.,1996; Almeria ve ark.,2001; Tanyüksel ve ark., 2002), RLB ile yukarıda belirtilen testler arasında duyarlılık karşılaştırmaları yapılmamıştır. Bu çalışma ile aynı zamanda, mikroskopik bakı, RLB ve serolojik

testlerden IFAT'ın duyarlılık ve özgüllük bakımından karşılaştırmaları da yapılmış, RLB'ye göre, mikroskopik bakının duyarlılığı %26,7; yine RLB'ye göre IFAT'ın duyarlılığı %43,3 olarak saptanmış, her üç yöntem arasında babesiosis'in teşhisi için RLB'nin daha duyarlı ve özgül olduğu tespit edilmiştir.

Diğer taraftan bu çalışmada uygulanan teşhis yöntemlerinden IFAT ve RLB'de saptanan pozitiflikler karşılaştırıldığında, IFAT'da pozitif olan 14 örneğin RLB'de negatif olması, yani kanda antikör olduğu halde parazitin bulunmaması, Kuttler (1981)'in, da bildirdiği gibi sahada yoğun olarak kullanılan bazı babesidal bileşiklerin hayvanı piroplazmlardan tamamen arındırdığını düşündürmektedir. Bunun yanında, yukarıdaki aksine RLB'de pozitif olan 17 örneğin, IFAT'da negatif olması, kanda parazit olduğu halde, antikörlerin saptanamamasını ifade etmektedir ki bu durumun da, d'Oliviera ve ark. (1995) ve Martin-Sánchez ve ark. (1999)'nın bildirdiği gibi, *Babesia* enfeksiyonlarında oluşan antikörlerin bir süre sonra azalmasına karşın piroplazmların kanda uzun süre kalmalarına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmadaki, IFAT ve RLB pozitiflikleri tür bazında karşılaştırıldığında, her iki yöntemde de pozitif olan 13 örneğin 11'inde aynı türlerin görülmesine karşın, IFAT'da *B.bigemina* pozitif olan 2 örneğin RLB'de *B.bigemina*+*B.bovis* miks halde saptanması, bunun yanında IFAT'da tespit edilemeyen *B.divergens*'in RLB'de pozitif sonuç vermesi, Papadopoulos ve ark. (1996b)'nın da bildirdiği gibi IFAT'da *Babesia bigemina*, *B.bovis* ve *B.divergens* türleri arasında görülen çapraz reaksiyonlara bağlanabilir.

Yukarıda da belirtildiği gibi, PZR ve RLB tekniklerinin, kan protozoonlarının teşhisi amacıyla kullanıldığında, gerek serolojik yöntemlere gerekse mikroskopik bakıya göre çok daha duyarlı ve özgül sonuçlar verdiği gösterilmiştir (d'Oliviera ve ark., 1995; Krause ve ark., 1996; Martin-Sánchez ve ark., 1999; Almeria ve ark., 2001; Georges ve ark., 2001; Aktaş ve ark., 2002; Tanyüksel ve ark., 2002; Vatansever ve Nalbantoğlu, 2002). Diğer moleküler biyolojik yöntemlerden farklı

olarak, RLB'de bir seferde çok sayıda örneğin birden fazla parazit türüne karşı yoklanabileceği ve miks enfeksiyonların ortaya konulabileceği (Gubbels ve ark., 1999; Georges ve ark., 2001), bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla doğrulanmıştır.

Türkiye'de de *Babesia* türlerinin varlığı ve yayılımı uzun yıllardan beri bilinmektedir (Ekrem, 1931, Lestoquard, 1931, Gören ve Yetkin, 1935; Aysoy, 1941, Currason, 1943). Bu parazitlere ait ilk veriler mikroskopik muayene sonuçlarına dayanmaktadır (Kurtpınar, 1956; Göksu, 1959, Unat, 1965, Erkut, 1967, Mimioğlu, 1968, Göksu, 1970; Hoffman ve ark., 1971, Mimioğlu ve ark., 1973; Tüzer, 1981). Bu çalışmalarda, Ege bölgesinde, babesiosis'in %4,9 (Erkut, 1967), Karadeniz bölgesinde *B.bigemina* %3,75-7 (Mimioğlu, 1968, Göksu, 1970), *B.bovis* %3,75 (Göksu, 1970), Marmara bölgesinde *B.bigemina* %11,6, *B.bovis* %34,8 (Tüzer, 1981), Türkiye genelinde ise babesiosis'in %3,5 (Hoffman ve ark., 1971) oranlarında olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise İç Anadolu Bölgesinde yer alan, Ankara yöresinde, mikroskopik bakıda babesiosis'in prevalansı %2,7 olarak tespit edilmiştir.

Türkiye'de IFAT ile yapılan serolojik yoklamalarda, *B.bigemina*, Ankara'da %4,8-%100 (Çakmak 1987; Sayın ve ark.,1989; İnci 1992; Eren 1993), Karadeniz bölgesinde %61,8 (Dinçer ve ark., 1991), Güney Doğu Anadolu bölgesinde %48,8 (Çakmak, 1993), Adana'da %54,9 (Çakmak ve Öz, 1993), Elazığ'da %31,9; Malatya'da %7,1; Tunceli'de %7,3 (Aktaş ve ark., 2001), Kayseri'de %23,03 (İnci ve ark., 2002); *B.bovis*, Ankara'da %9,78-59 (Çakmak 1987; Sayın ve ark.,1989; İnci 1992; Eren 1993), Karadeniz bölgesinde %44,7 (Dinçer ve ark., 1991); Güney Doğu Anadolu bölgesinde %0,6 (Çakmak, 1993), Adana'da %43,5 (Çakmak ve Öz, 1993); Elazığ'da %1,4; Tunceli'de %0,6 (Aktaş ve ark., 2001); Tekirdağ'da % 9,9 (Alp ve Güverer, 2001), Kayseri'de %1,04 (İnci ve ark., 2002); *B.divergens*, Karadeniz bölgesinde, %75 (Dinçer ve ark., 1991), Adana'da %17(Çakmak ve Öz, 1993), Elazığ'da %3,5; Malatya'da %0,6, Tunceli'de %1,2 (Aktaş ve ark., 2001), Kayseri'de %2,09 (İnci ve ark., 2002) oranlarında bulunmuştur.

Bu çalışmada ise IFAT sonuçlarına göre Ankara çevresinde babesiosis'in seroprevalansı %9 (%7 *B.bigemina*, %2 *B.bovis* ) olarak tespit edilmiştir. Bu

sonuçlar Çakmak (1987) ile uyumluluk göstermesine karşın, Sayın ve ark. (1989), İnci (1992) ve Eren (1993)'e göre düşük bulunmuştur.

Türkiye'de kan parazitlerinin teşhisi konusunda moleküler biyolojik metodlarla yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. *Babesia* türlerinin PZR ile saptandığı ilk ve tek çalışma Tanyüksel ve ark. (2002) tarafından yapılmış ve *B.bigemina*, Ankara'da %8,45; Kayseri'de %23,8 *B.bovis* Ankara'da %12,68; Burdur'da %8, Samsun'da %3,85; *B.divergens* Samsun'da %3,37 oranlarında tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ise, Ankara bölgesinde, RLB ile *Babesia* türlerinin prevalansı %10 (%6 *B.bigemina*, %2,3 *B.bovis*, %1,7 *B.divergens*) olarak tespit edilmiştir. Tanyüksel ve ark. (2002), PZR ile yaptığı çalışma ile karşılaştırıldığında genel olarak sonuçların uyumluluk gösterdiği, aradaki farklılığın ise örneklerin alındığı yörelere bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada *B.divergens* tek başına ve miks halde tespit edilmesine karşın Tanyüksel ve ark.(2002) *B.divergens* tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Bu durumun *B.divergens*'in yaygın olduğu bölgelerden gelebilecek muhtemel hayvan hareketlerine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak RLB ile tespit edilen etkenin diğer duyarlı hayvanlar için de risk oluşturabileceği düşünülebilir.

Babesiosis'in ortaya çıkması ve yayılması, *Babesia* türlerini taşıyan ve nakleden vektör keneler tarafından gerçekleştirilmektedir. Dolayısı ile hastalığın bir bölgedeki durumunun bilinmesi ve kontrol altına alınabilmesi için o bölgede *Babesia* türlerinin vektörlüğünü yapan kene türlerinin varlığı ile birlikte biyo-ekolojik özelliklerinin saptanması da büyük önem taşımaktadır (Karaer ve ark, 1997). Bu amaçla, Türkiye'de bulunan *Ixodidae* ailesine bağlı kene türlerinin belirlenmesi ile ilgili birçok çalışma yapılmış, bu aileye ait 6 soy ve sığır babesiosis etkenlerinin taşınmasında rol alan keneleri de içine alan çok sayıda tür tespit edilmiştir (Kurtınar, 1954; Mimioğlu, 1954, Merdivenci, 1969; Mimioğlu, 1973; Özkoç, 1979; Sayın ve Dumanlı, 1982; Güler ve ark., 1993; Açıcı ve Celep, 1997; Arslan ve ark., 1999; Beyazıt, 2000; Sert ve ark., 2001a; 2001b, Yukarı ve Umur, 2002).

Birçok araştırmacı (Karaer, 1983; Sayın ve Karaer, 1987) Ankara çevresinde sığır *Babesia* etkenlerinin vektörü *Boophilus annulatus* ve *Ixodes ricinus*'un varlığı bildirdiği halde Ankara yöresinde yapılan bu çalışmada sadece *B.annulatus* tespit edilmiştir.



## SONUÇ

Bu çalışma da Türkiye’de ilk defa PZR testini hibridizasyonla birleştiren RLB testi kullanılmıştır. Mikroskopik bakı ve IFAT ile yapılan karşılaştırmalarda daha duyarlı ve özgün olduğu ortaya konmuştur. RLB’de bir örnekte aynı anda birden fazla *Babesia* türünün bulunabileceği ve bunların miks enfeksiyonlar meydana getirebileceği tespit edilmiştir. Bu metod direk olarak etkenin tespitine yönelik olduğundan, bir bölgede hastalığın yayılmasında vektör keneler için hastalığın kaynağını oluşturan taşıyıcı hayvanların tespit edilmesi açısından da yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma ile RLB testinin kullanılması durumunda, incelenen bir örnekte birçok türün yoklanabileceği gösterilmiştir. Oysa ki, serolojik yöntemler veya türe özgü PZR kullanılması durumunda, her tür için ayrı ayrı testlerin yapılması gerekmektedir. Bu bakımdan RLB, zaman ve ekonomik kazanç yönünden bilinen diğer tanı yöntemlerine göre çok daha yararlı bulunmuştur.

Testin sağladığı pratik yararlar yanında, Ankara bölgesinde sığırlarda *Babesia* türlerinin yayılışı ile ilgili güncel veriler elde edilmiştir. Çalışma sonunda bu bölgede sığırlarda *Babesia* türlerinin prevalansında düşmeler olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında bu bölgede daha önce serolojik olarak yapılan yoklamalar sonucunda tespit edilemeyen *Babesia divergens*’in RLB ile piroplazmaları tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu etkene karşı duyarlı konumdaki bölge hayvanlarının bu etken yönünden de kontrollerinin yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

## ÖZET

### **Sığırlarda Bazı *Babesia* Türlerinin Reverse Line Blotting (RLB) ve İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) ile Karşılaştırmalı Tanısı Üzerine Araştırmalar.**

Bu çalışma, 2001-2002 tarihleri arasında Ankara yöresinde sığırlardan toplanan kanlarda *Babesia bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens*'in Reverse Line Blotting (RLB), İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) ve mikroskopik muayene ile karşılaştırmalı tanısı amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, çalışma dönemini kapsayan yıllarda, Ankara iline bağlı 10 ilçeye ait köylerden meraya çıkan bir yaşın üzerindeki, hayvanlardan rastgele seçilen 300 sığırdan IFAT ve RLB'de kullanılmak üzere kan alınmıştır. Kan alınan hayvanların kuyruk uçlarından perifer kan frotileri yapıp Giemsa ile boyanmış ve *Babesia* spp. piroplazmaları yönünden incelenmiştir. Bunun yanında, hayvanların kene yönünden de kontrolleri yapılmıştır.

Sığırlardan alınan 300 örneğin muayenesinde, testlere göre, kan frotesinin mikroskopik bakısında %2,7, IFAT'de %9; RLB yönteminde ise %10'luk pozitiflik tespit edilmiştir. Kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri karşılaştırıldığında RLB'ye göre, mikroskopik bakının %26,7; IFAT'ın ise %43,3 oranında duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, testler arasındaki sonuçların farklılığı istatistiksel olarak karşılaştırılmış, RLB tekniğinin mikroskopik bakı ve IFAT'a göre daha duyarlı ve özgül olduğu anlaşılmıştır.

Araştırma süresince, çalışma merkezi olarak seçilen köylerdeki hayvanlar üzerinden *Ixodidae* ailesinde 5 türe (*Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus bursa*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Boophilus annulatus*, *Haemaphysalis punctata*) ait 282 kene bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:**Ankara, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Babesia divergens*, IFAT, RLB, Sığır.

## SUMMARY

### **Comparative Studies on Detection of Some Bovine *Babesia* Species by Reverse Line Blotting (RLB) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)**

The aim of this study was comparative diagnosis of *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* by microscopy, IFAT and RLB in cattle blood specimens collected from the villages of Ankara region between 2001-2002. The blood specimens were collected from randomly selected 300 cattle which were over 1 year old and gone to pasture. At the same time, Giemsa stained peripheral blood smears were examined for the presence of *Babesia* parasites and also cattle were examined for the presence of ticks.

Of the 300 cattle blood and sera samples analyzed, 2.7%, 9%, 10% were found to be positive by microscopy, IFAT and RLB, respectively. The sensitivity and specificity of these diagnostic methods were compared. When RLB served as the definitions of infection, the sensitivity of microscopy was 26.7% and that of the IFAT was 43.3%. These results were compared statistically and it was observed that RLB was more sensitive and specific when compared to microscopy and IFAT.

Throughout the study period, 282 *Ixodidae* ticks belong to 5 species (*Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus bursa*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Boophilus annulatus*, *Haemaphysalis punctata*) were found on the cattle.

**Key Words:** Ankara, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Babesia divergens*, Cattle, IFAT, RLB.

## KAYNAKLAR

- AÇICI, M. (1995). Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. *Etlik Vet. Mik. Derg.* 8 (1-2): 271-277.
- AÇICI, M., CELEP, A. (1997). Samsun yöresi sığır ve koyunlarında görülen mera keneleri ve mevsimsel dağılımları. *Etlik Vet. Mik. Derg.* 9(2): 17-30.
- AHMED, J. S. (2002). The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. *Parasitol. Res.* 88: 48-50.
- AIKAWA, M., RABBEGE, J., UNI, S., RISTIC, M., MILLER, LH. (1985). Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with *Babesia bovis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34 (1):45-49.
- AKINBOADE, O. A., DIPEOLU, O. O. (1981). Detection of *Babesia bovis* infections in *Boophilus geigyi* with egg crushing, larval smears and haemolymph picture. *Vet. Quart.* 3: 143-147.
- AKTAŞ, M., DUMANLI, N., ÇETİNKAYA, B., ÇAKMAK, A. (2002). Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infection in cattle in eastern Turkey. *Vet. Rec.* 150:548-549.
- AKTAŞ, M., DUMANLI, N., KARAER, Z., ÇAKMAK, A., SEVGİLİ, M. (2001). Elazığ, Malatya, ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansı. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 25 (4): 447-451.
- ALMERIA, S., CASTELLÀ, J., FERRER, D., ORTUÑO, A., ESTRADA-PEÑA, A., GUTIÉREZ, J. F. (2001). Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet. Parasitol.* 99: 249-259.
- ALONSO, M., CAMUS, E., RODRIGUEZ DIEGO J., BERTAUDIÈRE, L., TATAREAU, J. C., LIABEUF, J. M. (1992). Situation actuelle des hémoparasitoses bovines en Martinique (Antilles françaises). *Revue Elev. Méd. Vet. Pays Trop.* 45 (1): 9-14.
- ALP, H. G., GÜVEREN, A. R. (2001). Tekirdağ ilinde *Theileria annulata* ve *Babesia bovis* enfeksiyonlarının seroprevalansı. *Pendik Vet. Mik. Derg.* 32 (1-2):15-19.
- ANON (1984). Tick and Tick-Borne Disease Control. A practical field manual. Vol. I and II, Food and Agriculture Organization(FAO), Rome.
- ANON (1996). Bovine babesiosis. In: OIE Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines. Off. Int. Epizoot., Paris. p:305-312.

- ANON (2001). Tarım istatistikleri özeti 1982-2001, Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları.
- APPLEWHAITE, L. M., CRAIG, T. M., WAGNER, G. G. (1981). Serological prevalence of bovine babesiosis in Guyana. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* **13**: 13-18.
- ARSLAN, M., Ö., UMUR, Ş., AYDIN, L. (1999). Kars yöresi sığırlarında *Ixodidae* türlerinin yaygınlığı. *T. Parazitol. Derg.* **23** (3):331-335.
- AYSOY, S. (1941). Piroplasmos (Piroplasmose). Tıbbi Klinik Kılavuzu, Talebe Ders Kılavuzu, Sayı 24, Yüksek Ziraat Enstitüsü Matbaası, Ankara.
- BASHIRUDDIN, J. B., CAMMA, C., REBÊLO, E. (1999). Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet. Parasitol.* **84**:75-83.
- BEKKER, C., de VOS, S., TAOUFİK, A., SPARAGANO, O., JONGEJAN, F. (2002). Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridisation. *Vet. Microbiol.* **89**: 223-238.
- BEYAZIT, A. (2000). Bursa yöresinde sığırlarda, *Ixodidae* türlerinin yayılışı. *Bornova Vet. Kont.ve Araş.Enst. Derg.* **25** (39): 17-23.
- BISHOP, R., SOHANPAL, B., KARIUKI, D. P., YOUNG, A. S., NENE, V., BAYLIS, H., ALLSOPP, B. A., SPOONER, P. R., DOLAN, T. T., MORZARIA, S. P. (1992). Detection of a carrier state in *Theileria parva*-infected cattle by the polymerase chain reaction. *Parasitol.* **104**: 215-232.
- BOCH, J., SUPPERER, R. (1983). Veterinärmedizinische Parasitologie. 3. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, p:2-5.
- BOCK, R. E., KINGSTON, T. G., DE VOS, A. J. (1999). Effect of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* **77** (7):461-464.
- BOCK, R. E., DE VOS, A. J., KINGSTON, T. G., MCLELLAN, D. J. (1997). Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale*. *Aust. Vet. J.* **75**: 337-340.
- BOUATTOUR, A., DARGHOUTH, M. A. (1996). First report of *Babesia divergens* in Tunisia. *Vet. Parasitol.* **63**: 161-165.
- BÖSE, R., PEYMAN, B. (1994). Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot. *Int. J. Parasitol.* **24**: 341-346.

- BÖSE, R., JACOBSON, R.H., GALE, K. R., WALTISBUHL, D. J., WRIGHT, I. G. (1990). An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B.bovis* antigen. *Parasitol. Res.* **76**: 648-652.
- BÖSE, R., JORGENSEN, W. K., DALGLIESH, R. J., FRIEDHOFF, K. T., de VOS, A. J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* **57**: 61-74.
- BROWN, W. C., PALMER, G. H. (1999). Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Today* **15** (7): 275-281.
- BURRIDGE, M. J., BROWN, C. G., KIMBER, C. D. (1974). *Theileria annulata*: cross-reactions between cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. *Exp. Parasitol.* **35**: 374-380.
- BÜSCHER, G. (1988). The infection of various tick species with *Babesia bigemina* its transmission and identification. *Parasitol. Res.* **74**: 324-330.
- CALDER, J. A. M., REDDY, G. R., CHIEVES, L., COUTNEY, C. H., LITTEL, R., LIVENGOOD, J. R., NORVAL, R. A. I., SMITH, C., DAME, J. B. (1996). Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J. Clin. Microbiol.* **34** (11): 2748-2755.
- CALLOW, L. L., HOYTE, H. M.D. (1961). Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. And the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* **37**: 381-390.
- CARRIQUE MAS, J. J., WIDDOWSON, M. A., CUÉLLAR, A. M., RIBERA, H., WALKER, A. R. (2000). Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz department, Bolivia. *Vet. Parasitol.* **93** :29-38.
- CARSON, C. A., PHILLIPS, R. S. (1981). Immunologic response of the vertebrate host to *Babesia*. In: *Babesiosis*, Ed: M. Ristic, J.P. Kreier, New York Academic Press, p:411-443.
- CARSON, C. A., TIMMS, P., COWMAN, A. F., STEWART, N. P. (1990). Evidence for selection of subpopulations during attenuation. *Exp. Parasitol.* **70**:404-410.
- CECI, L., JONGEJAN, F., CARELLI, G., TASSI, P., SPARAGANO, O. (1999). Identification of *Theileria buffeli/orientalis* and *Babesia bigemina* in Apulian cattle using molecular techniques and study of changes in blood parameters. *Parassitologia.* **41** (Suppl. 1): 31-32.
- CHANDRAWATHANI, P., TSUJI, N., KAWAZU, S., ISHIKAWA, M., FUJISAKI, K. (1994). Seroepidemiological studies of bovine babesiosis caused by *Babesia ovata*, *B.bigemina* and *B.bovis* in Peninsular Malaysia. *J. Vet. Med. Sci.* **56** (5): 929-932.

- CHEN, P. P., CONRAD, P. A., OLE-MOIYOI, O. K., BROWN, W. C., DOLAN, T. T. (1991). DNA probes detect *Theileria parva* in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasitol Res.* 77:590-594.
- COMES, A. M., HUMBERT, J. F., CABARET, J., ÉLARD, L. (1996). Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. *Vet. Res.* 27: 333-342.
- COWMAN, A. F., TIMMS, P., KEMP, D. J. (1984). DNA polymorphisms and subpopulations in *Babesia bovis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11:91-103.
- CURASSON, D. A. (1943). Famille des piroplasmides: Traite'de parasitologie veterinar et comparee, Tome III Ed: V. Freres. P: 160-190.
- CURNOW, J. A. (1973a). Studies on the epizootiology of bovine babesiosis in North Eastern New South Wales. *Aust. Vet. J.* 49 (6): 284-289.
- CURNOW, J. A. (1973b). Studies on the epizootiology of bovine babesiosis in common border areas of New South Wales. and Queensland. *Aust. Vet. J.* 49 (6): 294-297.
- ÇAKMAK, A. (1987). Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara, *Tierarztl. Hochsch. Diss.* Hannover.
- ÇAKMAK, A. (1993). Güney Doğu Anadolu bölgesi sığırlarında kan parazitlerinin serodiagnozu. VIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi Tebliğleri, 7-10 Eylül 1993, Trabzon, p:79.
- ÇAKMAK, A., ÖZ, İ. (1993). Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 40 (1):70-77.
- ÇİÇEK, H. (2000). Ankara yöresinde *Haemaphysalis* türleri üzeride epizootiyolojik çalışmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- d'OLIVEIRA, C., VAN DER WEIDE., JACQUIET, 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.
- d'OLIVEIRA, C., VAN DER WEIDE, M., HABELA, M. A., JACQUIET, P., JONGEJAN, F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2665-2669.
- DALRYMPLE, B. P., JORGENSEN, W. K., de VOS, A. J., WRIGHT, I.G. (1992). Analysis of the composition of samples of *Babesia bovis* and the influence of different enviromental conditions on geneticaly distinct subpopulations. *Int. J. Parasitol.* 22: 731-737.

- de KOK, J. B., 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.
- DİNÇER, Ş. (1990). Ruminantlarda babesiosis ve theileriosis, Tigem Eğitim Semineri, Dalaman 4-8 Haziran, 1990.
- DİNÇER, Ş., SAYIN, F., KARAER, Z., ÇAKMAK, A., FRIEDHOFF, K. T., MULLER, I., İNCİ, A., YUKARI, B. A., EREH, H. (1991). Karadeniz bölgesi sığırlarında, bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **38** (1-2): 206-226.
- DONELLY, J., PEIRCE, M. A. (1975). Experiments on the transmission of *Babesia divergens* to cattle by the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* **5**: 363.
- DREYER, K., FOURIE, L. J., KOK, D. J. (1998). Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Botshabelo and Thaba Nchu in the Free State province. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **65**:285-289.
- DÜZGÜN, A., ALABAY, M., ÇERÇİ, H., EMRE, Z., ÇAKMAK, A. (1992). Serological survey using elisa for babesia bovis infection of cattle in Turkey. *Iaea-Tecdoc-657*: 175-177.
- EKREM, İ. (1931). Piroplasmoslar hakkında en yeni malumat. *Türk Baytarlar Mecmuası.* **6**: 65-73.
- EREN, H. (1993). Ankara yöresinde sığır babesiosisinin sero-prevalansı. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **40** (1): 23-37.
- ERKUT, H. M. (1967). Ege bölgesindeki sığırlarda piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. *Bornova Vet. Araş. Enst. Derg.* **8**: 120-130.
- FAHRIMAL, Y., GOFF, W. L., JASMER, D. P. (1992). Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin. Microbiol.* **30** (6): 1374-1379.
- FIGUEROA, J. V., BUENING, G. M. (1995). Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **75**: 75-92.
- FIGUEROA, J. V., CHIEVES L. P., BYERS P. E., FRERISHS W. M., BUENING G. M. (1992a). Evaluation of a DNA-based probe for the detection of cattle experimentally infected with *Babesia bigemina*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **16** (653): 131-145.
- FIGUEROA, J. V., CHIEVES L. P., JOHNSON, G. S., BUENING G. M. (1992b). Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* **30** (10): 2576-2582.

- FIGUEROA, J. V., CHIEVES L. P., JOHNSON, G. S., BUENING G. M. (1993a). 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, J. V., ALVAREZ, J. A., RAMOS J. A., VEGA, C. A., BUENING G. M. (1993b). Use of multiplex polymerase chain reaction-based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* **46** (1-2): 71-75.
- FRIEDHOFF, K. T.(1981). Morphological aspects of *Babesia* in the tick. In: Babesiosis, Ed: M. Ristic, J. P. Kreier, New York, Academic Press, p: 143-164.
- FRIEDHOFF, K. T.(1988).Transmission of *Babesia*. In: Babesiosis of Domestic Animals and Man, Ed.: M. Ristic, Boca Raton, Florida, CRC Press, p: 23-52.
- FRIEDHOFF, K. T; SMITH, R. D. (1981). Transmission of *Babesia* by ticks. In: Babesiosis, Ed: M. Ristic, J. P. Kreier, New York, Academic Press, p: 267-321.
- GEORGES, K., LORIA, G. R., RIILLI, 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.
- GOFF, W. L., DAVIS, W. C., PALMER, G. H., McELWAIN, T. F., JOHNSON, W. C., BAILEY, J. F., McGUIRE, T. C. (1988). Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **56**: 2363-2368.
- GOMES, A. F., KAGERUKA, P., BRANDT, J. (1991). Épidémiologie de la babésiose bovine dans le sud-ouest de l'Angola. *Revue Elev. Méd. Vet. Pays Trop.* **44** (4):429-435.
- GÖKSU, K. (1959). Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. *Ank. Üni. Vet. Fak. Yay. No:115/60, Yeni Matbaa, Ankara.*
- GÖKSU, K. (1968). Batı Karadeniz bölgesi illerinin sığırlarında gözlenen *Babesidae* (Sporozoa: Piroplasmida) enfeksiyonları. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **15**: 46-57.
- GÖKSU, K. (1969). Doğu Anadolu bölgesinde, hayvanlarda görülen başlıca paraziter hastalıklar ve bunlarla savaşta gözönüne alınacak hususlar. *Türk Vet. Hek. Dern. Derg.* **39** (4): 13-22.
- GÖKSU, K. (1970). Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda *Piroplasmida* enfeksiyonları (piroplasmosis, babesiosis, theileriosis ve anaplasmosis'in yayılış durumları). *Türk Vet. Hek. Dern. Derg.* **40** (4): 29-39.

- GÖREN, S., YETKİN, R. (1935). Tek tırnaklılarda, sığırdada, koyunda, keçide ve köpekte piroplazmoz. *Milli Mü. Baytar Bakt. Serum ve Aşı Evi Yay.*
- GUBBELS, M. J., de VOS, S., van der WEIDE, M., VISERAS, J., SCHOOLS, L. M., de VRIES, E., JONGEJAN, F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blotting hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1782-1789.
- GUGLIELMONE, A. A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* **57**: 109-119.
- GÜLER, S., ÖZER, E., ERDOĞMUŞ, S. Z., KÖROĞLU, E., BEKTAŞ, İ. (1993). Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kene (*Ixodidae*) türleri. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* **17** (3):229-231.
- GÜN, H., TANYÜKSEL, M., YUKARI, B. A., ÇAKMAK, A., KARAER, Z. (1996). Türkiye'de babesiosisin ilk insan serodiyagnozu. *T. Parazitol. Derg.* **20** (1): 1-7.
- GÜNSELİ, H. (1993). İstanbul ili sığırlarında *Babesia bovis*'in yaygınlığının ELISA ile saptanması. *Pendik Vet. Mik. Derg.* **24** (1): 57-67.
- HALL, W. T. K., TAMMEMAGI, L., JOHNSON, L. A. Y. (1968). Bovine babesiosis: The immunity of calves to *Babesia bigemina* infection. *Aust. Vet. J.* **44**: 259-264.
- HERNING, M. W. (1956). Animal Diseases in South Africa. 3th Ed. Central News Agency Ltd. South Africa.
- HIEPE, T., JUNGMAN, R. (1983). Lehrbuch der Parasitologie. Band 2, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p: 436.
- HINES, S. A., PALMER, G. H., JASMER, D. P., GOFF, W. L., McELWAIN, T. F. (1995). Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infect. Immun.* **63** (1): 349-352.
- HOFFMAN, G., HÖRCHNER, F., SCHEIN, E., GERBER, H. (1971). Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in des asiatischen provinzen der Turkei. *Berl. Münch. Tierarztl. Wschr.* **84**: 152-156.
- HOOGSTAL, H. (1956). African *Ixodidae* Ticks of Sudan. U.S Naval Medical Research Unit 3, Cairo, Egypt.
- HOYTE, H. M. D. (1971). Differential diagnosis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in cattle using thin blood smears and brain smears. *Aust. Vet. J.* **47**: 248-250.

- İNÇİ, A. (1992). Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **39**(1-2): 153-167.
- İNÇİ, A., ÇAKMAK, A., KARAER, Z., DİNÇER, Ş., SAYIN, F., İÇA, A. (2002). Kayseri yöresinde sığırlarda babesiosisin seroprevalansı. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* **26**: 1345-1350.
- JACK, R. M., WARD, P. A. (1981). Organ and vascular pathology of babesiosis. In: *Babesiosis*, Ed: M.Ristic, J. P. Kreier, New York, Academic Press, p:459-470.
- JAMES, M. A. (1984). Immunology of *Babesia* infections. In: *Malaria and Babesiosis*, Ed: M. Ristic, P. Ambroise-Thomas, J. Kreier, Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, p:53-63.
- JAMES, M. A. (1988). Immunology of Babesiosis. In: *Babesiosis of Domestic Animals and Man*, Ed.: M. Ristic, Boca Raton, Florida, CRC Press, p: 119-130.
- JAMES, M. A., CORONADO, A., LOPEZ, W., MELENDEZ, R., RISTIC, M. (1985). Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* **17**: 9-18.
- JASMER, D. P., REDUKER, D. W., GOFF, W. L., STILLER, D., MC-GUIRE, T. C. (1990). DNA probes distinguish geographical isolates and identify a novel DNA molecule of *Babesia bovis*. *J. Parasitol.* **76**(6): 834-841.
- JOHNSTON, L. A. Y. (1967). Epidemiology of bovine babesiosis in Northern Queensland. *Aust. Vet. J.* **43** (10): 427-432.
- JONGEJAN, F., PERRY, B. D., MOORHOUSE, P. D. S., MUSISI, F. L., PEGRAM, R. G., SNACKEN, M. (1988). Epidemiology of bovine babesiosis and anaplasmosis in Zambia. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* **20**: 234-242.
- KAMERBEEK, J., SCHOULS, L., KOLK, A., VAN AGTERVELD, M., VAN SOOLINGEN, D., KUIJPER, S., BUNSCHOTEN, A., MOLHUIZEN, H., SHAW, R., GOYAL, M., VAN EMBDEN, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol* **35** (4): 907-914.
- KARAER, Z. (1983). Ankara ili ve civarında bulunan kene türleri ile *Hyalomma detritum*'un (Schulze, 1919) bazı ekolojik özellikleri üzerine araştırmalar. TÜBİTAK VII. Bilim Kongresi Tebliğleri, 371-378.
- KARAER, A., YUKARI, B. A., AYDIN, L. (1997). Türkiye Keneleri ve Vektörleri. Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler, Ed: M.A. Özcel, N. Daldal, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 13, İzmir, p: 363-457.

- KIRVAR, E., İLHAN, T., KATZER, F., HOOSHMAND-RAD, P., ZWEYGARTH, E., GERSTENBERG, C., PHIPPS, P., BROWN, C. G. D. (2000). Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitol.* **120**: 245-254.
- KRAUSE, P. J., TELFORD, S., SPIELMAN, A., RYAN, R., MAGERA, J., RAJAN, T. V., CHRISTIANSON, D., ALBERGHINI, T. V., BOW, L., PERSING, D. (1996). Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. *J. Clin. Microbiol.* **34**(11): 2791-2794.
- KURTPINAR, H. (1954). Türkiye Keneleri, Güven Matbaası, Ankara.
- KURTPINAR, H. (1956). Erzurum, Kars, Ağrı vilayetlerinde sığır, koyun ve keçilerin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurduğu hastalıklar. *Türk Vet. Hek. Dern. Derg.* **26**: 3226-3232.
- KUTTLER, K. L. (1981). Chemotherapy of babesiosis: A review. In: Babesiosis, Ed: M. Ristic, J. P. Kreier, New York, Academic Press, p: 65-85.
- KUTTLER, K. L. (1988). World-Wide Impact of Babesiosis. In: Babesiosis of Domestic Animals and Man, Ed.: M. Ristic, Boca Raton, Florida, CRC Press, p: 1-22.
- KUTTLER, K. L., CLIFFORD, D. J., TOURAY, B. N. (1988). Prevalance of anaplasmosis and babesiosis in N'Dama cattle of the Gambia. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* **20**(1): 37-41.
- L'HOSTIS, M., CHAUVIN. (1999). *Babesia divergens* in France: descriptive and analytical epidemiology. *Parassitologia* **41** (Suppl. 1): 59-62.
- L'HOSTIS, M., SEEGER, H. (2002). Tick-borne parasitic diseases in cattle: Current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems. *Vet. Res.* **33**: 599-611.
- L'HOSTIS, M., CHAUVIN, A., VALENTIN, A., MARCHAND, A., GORENFLOT, A. (1995). Large scale survey of bovine babesiosis due to *Babesia divergens* in France. *Vet. Rec.* **136** (2):36-38.
- LESTOQUARD, M. (1931). Piroplasmoslar. *Baytari Mecmua*.**9**: (8-9).
- LEVINE, N. D. (1985). Veterinary Protozoology, Iowa State University Press Ames 1th Edition p: 291-312
- LUDFORD, C. G., HALL, W. T. K., SULZER, A. J., WILSON, M. (1972). *Babesia argentina*, *Plasmodium vivax* and *P.falciparum*: Antigenic cross reactions. *Exp. Parasitol.* **24**: 327-335.

- LUNEMANN, J. D., ZARMAS, S., PRIEM, S., FRANZ, J., ZSCHENDERLEIN, R., ABERER, E., KLEIN, R., SCHOULS, L., BURMESTER, G. R., KRAUSE, A. (2001). Rapid typing of *Borrelia burgdoferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1130-1133.
- MAHONEY, D. F. (1962). Bovine babesiosis: Diagnosis of infection by a complement fixation test. *Aust. Vet. J.* **38**: 48-52.
- MAHONEY, D. F. (1977). *Babesia* of domestic animals. In: Parasitic Protozoa. Ed: J. P. Kreier, New York, Academic Press, p: 1-52.
- MAHONEY, D. F. (1980). The epidemiology of babesiosis. In: Tick and Tick-Borne Disease. Proceedings of a symposium held at the 56th. Annual Conference of the Australian Veterinary Association, Townsville. Ed: J. Johnston, M. G. Cooper. P:9-11.
- MAHONEY, D. F., MIRRE, G. B. (1979). A note on transmission of *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*) by the one host tick vector *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.* **26**: 253-254.
- MAHONEY, D. F., WRIGHT, I. G., GOODGER, B.V. (1979). Immunity in cattle to *Babesia bovis* after single infections with parasites of various origin. *Aust. Vet. J.* **55**:10-12.
- MAHONEY, D. F., WRIGHT, I. G., MIRRE, G. B. (1973). Bovine babesiosis: The persistence of immunity to *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **67**: 197-203.
- MARTÍN-SÁNCHEZ, J., VISERAS, J., ADROHER, F. J., GARCÍA-FERNÁNDEZ, 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.
- McCOSKER, J. P. (1981). The global importance of babesiosis. In: Babesiosis, Ed: M. Ristic, J. P. Kreier, New York, Academic Press, p: 1-24.
- McELWAIN, T. F., PALMER, G. H., GOFF, W. L., McGUIRE, T. C. (1988). Identification of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* merozoite proteins with isolate- and species-common epitopes recognised by antibodies in bovine immune sera. *Infect. Immun.* **56**:1658-1660.
- McELWAIN, T. F., PERRYMAN, L. E., DAVIS, W. C., McGUIRE, T. C. (1987). Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. *J. Immunol.* **138**: 2298-2304.
- MC-LAUGHLIN, G. L., EDLIND, T. D., IHLER, G. M. (1986). Detection of *Babesia bovis* using DNA hybridization. *J. Protozool.* **33**: 35-43.

- MEHLHORN, H. (2001). Encyclopedic reference of parasitology. Diseases, treatment, therapy. Berlin: Springer-Verlag, p: 61-71.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. (1984). The piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. In: Advances in Parasitology. Ed.: J.R. Baker, R. Muller, Academic Press. p: 69-89.
- MERDİVENÇİ, A. (1969). Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar. İst. Üni. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yay no: 1448. Kurtuluş Matbaası, Ankara.
- MİMİOĞLU, M. (1954). Die Schild-Zecken (Ixodidae) der Haustiere in der Türkei. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1: 20-34.
- MİMİOĞLU, M. (1968). Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde "Haematuri vesicalis bovis"li sığırlarda parazitolojik araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 11: 183-192.
- MİMİOĞLU, M. (1973). Veteriner ve Tıbbi Artropodoloji. Ank. Üni. Vet. Fak. Yay. No: 295. Ank. Üni. Basımevi, Ankara.
- MİMİOĞLU, M. M., ULUTAŞ, M., GÜLER, S. (1973). Yurdumuz sığırlarında theileriosis etkenleri ve diğer kan parazitleri. Ajans-Türk Matbaacılık Sanayii, Ankara.
- MONTENEGRO-JAMES, S., JOHNSON, W. C., GOFF, W. L. (1995). Development of conventional subunit vaccines for anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57: 255-266.
- MONTENEGRO-JAMES, S., BENITEZ, T. M., LEON, E., LOPEZ, R., RISTIC, M. (1987). Bovine babesiosis: induction of protective immunity with *Babesia bovis* and *B. bigemina* immunogens. *Parasitol. Res.* 74: 142-150.
- MORZARIA, S. P., BROCKLESBY, D. W., HARRADINE, D. L. (1977). Experimental transmission of *Babesia major* by *Haemaphysalis punctata*. *Res. Vet. Sci.* 23: 261.
- MUANGYAI, M. (1974). Quantitative untersuchung zur transovariellen infektion von *Boophilus annulatus* mit *Babesia bigemina*. PhD Thesis, Hannover.
- NARI, A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet. Parasitol.* 57: 153-165.
- NEITZ, W. O. (1956). A consolidation of our knowledge of the transmission of tick-borne diseases. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 27 (2): 115-163.
- O'DONOGHUE, P. J., FRIEDHOFF, K. T., VIZCAINO, O. G., WEYRETER, H. (1985). The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-definite antigens in enzyme immunoassays. *Vet. Parasitol.* 18: 1.

- OUHELLI, H., SCHEIN, E. (1988). Effect of temperature on transovarial transmission of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in *Boophilus annulatus* (Say, 1921). *Vet. Parasitol.* **26**: 229-235.
- OUHELLI, H., PANDEY, V. S., ABOUGHAL, A. (1987). Effect of infection by *Babesia* spp. on the development and survival of free-living stages of *Boophilus annulatus*. *Vet. Parasitol.* **23**: 147-154.
- OUHELLI, H., PANDEY, V. S., CHOUKRI, M. (1982). The effect of temperature, humidity, photoperiod and weight of the engorged female on oviposition of *Boophilus annulatus* (Say, 1921). *Vet. Parasitol.* **11**: 231-239.
- ÖZER, E., ERDOĞMUŞ, S. Z., KÖROĞLU, E., YILMAZ, F. (1993). Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* **17** (3): 209-215.
- ÖZKOÇ, Ü. (1979). Marmara bölgesinde, *Boophilus calcaratus*'un *Piroplasma bigemina*'nın vektörü olduğunu kanıtlayan bulgularımız. *Pendik Vet. Mik. Derg.* **6**: 105-116.
- PAPADOPOULOS, B., BROSSARD, M., PERIÉ, N. M. (1996a). Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece 2. Piroplasms of cattle. *Vet. Parasitol.* **63**: 57-66.
- PAPADOPOULOS, B., PERIÉ, N. M., UILENBERG, G. (1996b). Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece 1. Serological cross-reactions. *Vet. Parasitol.* **63**: 41-56.
- PAYNE, R. C., SCOTT, J. M. (1982). Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. *Trop. Anim. Health Prod.* **14**: 75.
- PEREGRINE, A.S. (1994). Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. *Vet Parasitol.* **54**: 223-248.
- PERSING, D. H., MATHIESEN, D., MARSHALL, W. F., TELFORD, S. R., SPIELMAN, A., THOMFORD, J.W., CONRAD, P. A. (1992). Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30** (8): 2097-2103.
- PETCHPOO, W., TAN-ARIYA, P., BOONSAENG, V., BROCKELMAN, C. R., WILAIRAT, P., PANYIM, S. (1992). A specific DNA probe which identifies *Babesia bovis* in the whole blood. *Vet. Parasitol.* **42**: 189-198.
- PIPANO, E. (1974). Immunological aspects of *Theileria annulata* infection. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **81**: 139-159.
- PIPANO, E. (1995). Live vaccines against haemoparasitic diseases in livestock. *Vet. Parasitol.* **57**: 213-231.

- PIPANO, E., HADANI, A. (1984). Control of bovine babesiosis. In: Malaria and Babesiosis, Ed: M. Ristic, P. Ambroise-Thomas, J. Kreier, Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, p:263-303.
- POSNETT, E. S., AMBROSIO, R. E. (1991). DNA probes for the detection of *Babesia caballi*. *Parasitology* **102**: 357-365.
- POSNETT, E. S., FEHRSEN, J., DE WALL D. T., AMBROSIO, R. E. (1991). Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. *Vet. Parasitol.* **39**:19-32.
- POTGIETER, F. T., ELS, H. J. (1977). Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **44**: 213-232.
- PURNELL, R. E. (1981). Babesiosis in various hosts. In: Babesiosis, Ed: M.Ristic, J. P. Kreier, New York, Academic Press, p:25-64.
- QIU, W., DYKHUIZEN, D. E., ACOSTA, M.S., LUFT, B. J. (2002). Geographic uniformity of the lyme disease Spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States. *Genetics.* **160**: 833-849.
- RANDALL, K., SAIKI, B. S., CHU-AN CHAN, P. D., COREY, H., LEVENSON, P. D., TINA, C., WARREN, B. A., CORINNE, D., BOEHM, M. S., HAIG, H., KAZAZIAN, Jr. M. D., HENRY, A., ERLICH, P. D. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -Thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N. Engl. J. Med.* **309** (9): 537-541.
- RIEK, R. F. (1966). The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* **17**: 247-254.
- RIJPKEMA, S. G., MOLKENBOER, M. J., SCHOULS, L. M., JONGEJAN, F., SCHELLEKENS, J. F. (1995). Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol* **33**: 3091-3095.
- RUDZINSKA, M. A. (1981). Host-cell-parasite relationships. In: Babesiosis, Ed: M.Ristic, J. P. Kreier, New York, Academic Press, p:88-135.
- SALEM, G. H., LIU, X, J., JOHNSRUDE, J. D., DAME, J. B., ROMAN REDDY, G. (1999). Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. *Mol. Cell. Prob.* **13**: 107-113.
- SAMUEL., RAİF. (1930). Koyun piroplasmosisi hakkında muafiyetin yeni usulleri. *Baytari Mecmua.* **7** (8), Milliyet Matbaası, İstanbul.

- SAYIN, F., DUMANLI, N. (1982). Elazığ bölgesinde evcil hayvanlarda görülen kene (*Ixodidae*) türleri ile ilgili epizootiyolojik araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **29** (3-4): 344-362.
- SAYIN, F., KARAER, Z. (1987). Ankara yöresinde sığır ve koyunlarda kene enfestasyonu üzerine araştırmalar. Türk Vet. Hekimliği I. Bilim Kongresi Bildiri Özeti No:24, Ankara.
- SAYIN, F., FRIEDHOFF, K. T., DİNÇER, Ş., KARAER, Z., ÇAKMAK, A., İNCİ, A., YUKARI, B. A., EREN, H. (1989). Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. Tebliğ No:103, İstanbul.
- SCHOULS, L. M., VAN DE POL, I., RIJKEMA, S. G., SCHOT, C. S. (1999). Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **37** (7): 2215-2222.
- SERT, H., YAĞCI, Ş., AKTAŞ, M., KARAER, Z. (2001a). Türkiye'nin farklı bölgelerinden yakalanan kemiricilerde kene (Acari: Ixodidae, Argasidae) enfestasyonu. *T. Parazitol. Derg.* **25** (3): 280-282.
- SERT, H., YAĞCI, Ş., ALBAYRAK, İ., AKTAŞ, M., KARAER, Z. (2001b). Türkiye'nin farklı bölgelerinden yakalanan yarasalarda (*Vespertilionida*, *Rhinolophidae*) kene (Acari: Ixodidae, Argasidae) enfestasyonu. *T. Parazitol. Derg.* **25** (1): 174-177.
- SMEENK, I., KELLY, P. J., WRAY, K., MUSUKA, G., TREES, A. J., JONGEJAN, F. (2000). *Babesia bovis* and *B. bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. *J. S. Afr. Vet. Ass.* **71** (1): 21-24.
- SMITH, R. D., MOLINAR, E., LARIOS, F., MONROY, J., TRIGO, F., RISTIC, M. (1980). Bovine babesiosis: Pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *B. bigemina* infections. *Am. J. Vet. Res.* **41**(12): 1957-1965.
- SOLORIO-RIVERA, J. L., RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I., PÉREZ-GUTIERREZ, E., WAGNER, G. (1999). Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalance in cattle from eastern Yucatán, Mexico. *Pre. Vet. Med.* **40**: 261-269.
- SONENSHINE, D. E. (1993). Biology of Ticks. Vol. II. Newyork, Oxford, Oxford University Press. Chapter V.
- SOULSBY, E. J. L. (1986). Helminths Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, Baillare Tindall, London.
- SPARAGANO, O. (1999). Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. *J. Vet. Parasitol.* **13** (2): 83-92.

- SPARAGANO, O., JONGEJAN, F. (1999). Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens. *Parassitologia*. **41** (Suppl. 1): 101-105.
- SPARAGANO, O., ALLSHOP, M. T., MANK, R. A., RIJPKEMA, S. G., FIGUEROA, J. V., JONGEJAN, F. (1999). Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* **23**: 929-960.
- SPARAGANO, O., LORIA, G. R., GUBBELS, M. J., DE VOS, A. P., CARACAPPA, S., JONGEJAN, F. (2000). Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **916**: 533-539.
- SPARAGANO, O., CARELLI, G., CECI, L., SHKAP, V., MOLAD, T., VITALE, F., LORIA, G. R., 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.
- TANYÜKSEL, M., VATANSEVER, Z., KARAER, Z., ARAZ, E., HAZNEDAROĞLU, T., YUKARI, B. A., AÇICI, M. (2002). Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. *T. Parazitol. Derg.* **26** (1): 42-47.
- THOMPSON, G. D., MEDELLIN, J. A., TREVINO, G. S., WAGNER, G. G. (1980). Bovine babesiosis in northern Mexico. *Trop. Anim. Health Prod.* **12**: 132.
- TODOROVIC, R. A., CARSON, C. A. (1981). Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In: Babesiosis, Ed: M.Ristic, J. P. Kreier, New York, Academic Press, p:381-409.
- TÜZER, E. (1981). İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve Anaplasma türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. *İstanbul Üni. Vet. Fak. Derg.* **8** (1): 97-110.
- UILENBERG, G. (1995). International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet Parasitol.* **57**:19-41.
- UNAT, E. K., YAŞAROL, Ş., MERDİVENCİ, A. (1965). Türkiye'nin Parazitoloji Coğrafyası, Ege Eni. Tıp Fak. Yay. No:42, Ege Üni. Matbaası, İzmir.
- 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.
- WOODFORD, J. D., JONES, T. W., RAE, P. F., BOID, R., BELL-SAKYI, L. (1990). Seroepidemiological studies of bovine babesiosis on Pemba Island, Tanzania. *Vet. Parasitol.* **37** (3-4): 175-184.

WRIGHT, I. G., GOODGER, B. V. (1988). Pathogenesis of Babesiosis In: Babesiosis of Domestic Animals and Man, Ed.: M. Ristic, Boca Raton, Florida, CRC Press, p: 99-118.

WRIGHT, I. G., CASU, R., COMMIS, M. A., DALRYMPLE, B. P., GALE, K. R., GOODGER, B. V., RIDDLES, P. W., WALTISBUHL, D. J., ABETZ, I., BERRIE, D. A., BOWLES, Y., DIMMIOCK, C., HAYES, T., KALNINS, H., LEATCH, G., McCRAE, R., MONTAGUE, P. E., NISBET, I. T., PARRODI, F., PETERS, J. M., SCHEIWE, P. C., SMITH, W., RODE-BRAMANIS., WHITE, M. A. (1992). The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet. Parasitol.* **44**: 3-13.

YOSSEF, L. S. E. A. (1980). Untersuchungen über die möglichkeit einer vertikalen infektion von *Boophilus microplus* mit *Babesia bigemina*. PhD Thesis, Hannover.

YUKARI, B. A., KARAER, Z. (1996). Babesiosis. *Vet Hek. Dern Derg.* **67**:46-54.

YUKARI, B. A., UMUR, Ş. (2002). Burdur yöresindeki sığır, koyun ve keçilerde kene (*Ixodidae*) türlerinin yayılışı. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* **26** :1263-1270.

ZEYBEK, H., KALKAN, A. (1984). Ankara yöresinde mer'a kenelerinin yayılışı ve mevsimlerle ilişkisi. *Etlik Vet. Mik. Derg.* **6** (6-7): 14-21.