

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEŞİLHİSAR YÖRESİNDEKİ KOYUN VE KEÇİLERDEKİ
BABESIA ETKENLERİNİN REVERSE LINE BLOTTING
(RLB) YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Hülya ÖZ SARAYLI**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr. Abdullah İNCİ**

**Veteriner Parazitoloji
Yüksek Lisans Tezi**

**Eylül 2006
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEŞİLHİSAR YÖRESİNDEKİ KOYUN VE KEÇİLERDEKİ
BABESIA ETKENLERİNİN REVERSE LINE BLOTTING
(RLB) YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Hülya ÖZ SARAYLI**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr. Abdullah İNCİ**

**Veteriner Parazitoloji
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi araştırma fonu tarafından SBT 06-03 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

**Eylül 2006
KAYSERİ**

II

Prof.Dr. Abdullah İNCİ Danışmanlığında **Hülya ÖZ SARAYLI** tarafından hazırlanan: **“Yeşilhisar Yöresindeki Koyun ve Keçilerdeki Babesia Etkenlerinin Reverse Line Blotting (RLB) Yöntemi ile Araştırılması”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

29 / 09 / 2006

JÜRİ

İmza

Başkan : Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Üye : Doç. Dr. Süleyman YAZAR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Anıl İÇA

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof.Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmasının yürütülmesinde bana yol göstererek ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Danışman Hocam Sayın Prof.Dr. Abdullah İNCİ'ye, Yrd.Doç.Dr. Anıl İÇA'ya, Yrd.Doç.Dr. Alparslan YILDIRIM'a ve Araş.Gör. Önder DÜZLÜ'ye, çalışmalarım sırasında manevi ve maddi desteğini esirgemeyen eşime ve kızıma, Yüksek lisans tezini maddi yönden destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna, tez yazımındaki katkılarından dolayı İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğündeki mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

YEŞİLHİSAR YÖRESİNDEKİ KOYUN VE KEÇİLERDEKİ BABESIA ETKENLERİNİN REVERSE LINE BLOTTING (RLB) YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışma Yeşilhisar yöresinde Reverse Line Blotting (RLB) testi ve mikroskopik bakı ile koyun ve keçilerdeki *Babesia* türlerinin prevalansını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Yeşilhisar merkez ve köylerinden rastgele seçilen sağlıklı 200 koyun ve 100 keçi olmak üzere toplam 300 küçük ruminanttan EDTA' lı tüplere kan alınmıştır. Kanlar RLB testi ile Catch-all, *Babesia ovis* ve *Theileria ovis* yönünden incelenmiştir. Aynı zamanda bu hayvanlardan perifer kan frotileri hazırlanarak mikroskopik muayenesi yapılmıştır.

Mikroskopik muayene ile 200 koyunun 28'inde (% 14) ve 100 keçinin 5'inde (% 5) toplam 300 hayvanın 33'ünde (% 11) *Piroplasma* pozitif saptandı. Bunlardan 9 (% 3) tanesinde *Babesia* spp. ve 24 (% 8) tanesinde de *Theileria* spp. tespit edilmiştir.

RLB ile toplanan 200 koyun kan numunesinin 99'unda (% 49,5) ve 100 keçi numunesinin 18'inde (% 18) toplamda 300 kan numunesinin 117 tanesinde (% 39) catch-all pozitiflik saptanmıştır. Catch-all pozitif kanların 4 tanesinde (% 1,33) *Babesia ovis* tespit edilirken, 106 tanesinde (% 35,33) *Theileria ovis* ve 7 tanesinde (% 2,34) de *T.ovis+B.ovis* (miks enfeksiyon) tespit edilmiştir. *B.motasi* ve *B.crassa*'ya rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: RLB, Prevalans, Catch-all, *Piroplasma*, *Babesia* ,

**INVESTIGATION OF THE BABESIA AGENTS IN SHEEP AND GOATS BY
THE REVERSE LINE BLOT HYBRIDIZATION METHOD AROUND
YEŞİLHİSAR**

ABSTRACT

This study was carried out on sheep and goats to detect *Babesia* spp. prevalence by Reverse Line Blotting (RLB) test and microscopic examination around Yeşilhisar. In this purpose, the blood samples were randomly collected into the tubes with EDTA from a total of 300 healthy small ruminants that consist of 200 sheep and 100 goats in Yeşilhisar and vicinity. Blood samples were investigated against catch-all, *Babesia ovis* and *Theileria ovis* using RLB test. In addition, peripheral blood smears were prepared and examined under a microscope.

In the microscopic examination, *piroplasm* were determined in 28 (14 %) of 200 sheep, 5 (5 %) of 100 goats and totally 33 (11 %) of 300 small ruminants. It was also determined that 9 (3 %) of them had *Babesia* spp. and 24 (8 %) of them had *Theileria* spp.

In 300 small ruminants, catch-all positivity was found in 99 (49,5 %) of 200 sheep and 18 (18 %) of 100 goats totally 117 (39 %) of 300 using RLB. *T.ovis* was determined in 106 (39 %) of positive catch-all blood samples while both *T.ovis* and *B.ovis* were found mix infected in 7 (2,34 %) of them, *B. ovis* was found infected only in 4 (1,33 %) of them. *B.motasi* and *B.crassa* were not detected in the samples.

Key Word: RLB, Prevalance, Catch-all, *Piroplasm*, *Babesia*

VI

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| İÇ KAPAK..... | I |
| KABUL ONAY SAYFASI..... | II |
| TEŞEKKÜR..... | III |
| ÖZET..... | IV |
| ABSTRACT..... | V |
| İÇİNDEKİLER..... | VI |
| KISALTMALAR..... | VII |
| TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ..... | VIII |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. BABESIOSIS TANIMI ve TARİHÇESİ..... | 4 |
| 2.2. BABESIA TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ..... | 5 |
| 2.2.1. Koyun ve Keçilerde Babesiosis..... | 5 |
| 2.2.2. Türkiye' de Babesiosis..... | 6 |
| 2.3. BABESIA TÜRLERİNİN GELİŞME ŞEKİLLERİ..... | 7 |
| 2.3.1. Omurgalı Konaktaki Gelişme | 7 |
| 2.3.2. Vektör Kenedeki Gelişme..... | 9 |
| 2.4. BABESIOSIS'IN EPİDEMİYOLOJİSİ..... | 10 |
| 2.5. BABESIOSIS'IN TEŞHİSİ..... | 10 |
| 2.5.1. Parazitin Tespiti..... | 12 |
| 2.5.1.1. Mikroskopik Muayene..... | 12 |
| 2.5.1.1.1. İnce Yayma Froti Yöntemi..... | 12 |
| 2.5.1.1.2. Kalın Damla Yöntemi..... | 12 |
| 2.5.2. Nükleotid Tespiti..... | 13 |
| 2.5.2.1. DNA Amplifikasyon Teknikleri..... | 14 |
| 2.5.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... | 14 |
| 2.5.2.3. Reverse Line Blotting..... | 15 |
| 2.5.3. Serolojik Teşhis..... | 15 |
| 2.6. BABESIOSIS'İN TEDAVİSİ..... | 17 |
| 2.7. BABESIOSIS'DEN KORUNMA..... | 18 |
| 2.7.1. Vektör Kenelerle Mücadele..... | 18 |
| 2.7.2. Suni Preimmünizasyon Kazandırılması..... | 19 |
| 2.7.3. Aşılama..... | 19 |

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 20 |
| 3.1. SAHA ÇALIŞMASI..... | 20 |
| 3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI..... | 20 |
| 3.2.1. Kan frotilerinin Yapımı ve Muayenesi..... | 21 |
| 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... | 21 |
| 3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu..... | 21 |
| 3.2.2.2. PZR Yapılışı..... | 22 |
| 3.2.2.3. Pozitif ve Negatif Kontrol..... | 24 |
| 3.2.3. Reverse Line Blotting..... | 24 |
| 3.2.3.1. RLB Membranın Hazırlanması..... | 24 |
| 3.2.3.2. RLB Hibridizasyon..... | 25 |
| 3.2.3.3. RLB'nin Duyarlılığının Saptanması..... | 26 |
| 3.2.4. PZR ve RLB testlerinde Kullanılan Gereçler..... | 26 |
| 3.2.5. PZR ve RLB testlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 26 |
| 3.2.6. PZR ve RLB testlerinde Kullanılan Primerler ve Problar..... | 28 |
| 3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER..... | 29 |
| 4. BULGULAR..... | 30 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 32 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 36 |
| . ÖZGEÇMİŞ | |

VII

KISALTMALAR

| | |
|----------------|---------------------------------------|
| A | : Adenine |
| Bp | : Baz çifti |
| C | : Cytosine |
| ⁰ C | : Derece Celcius |
| cDNA | : Complementer deoksiribonükleik asit |
| CFT | : Complement Fiksasyon Test |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| ELISA | : Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| Fg | : figogram |
| G | : Guanine |
| IFAT | : İndirect Fluorescent Antibody Test |
| IgG | : İmmunglobulin G |
| Kb | : kilobaz |
| Ng | : nanogram |
| NO | : Nitrik oksit |
| Pg | : pikogram |
| PZR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RLB | : Reverse Line Blotting |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| rRNA | : ribozomal RNA |
| ssrRNA | : Small subunit ribozomal RNA |
| TBE | :Tris Borat |
| U | : Uracil |

TABLO LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| Tablo 2.1. Çeşitli Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması..... | 10 |
| Tablo 3.1. PZR’de kullanılan Primerler..... | 26 |
| Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan probların 5’-3’ dizilişi..... | 27 |
| Tablo 4.1. Mikroskopik muayene ile Yeşilhisar yöresinde koyun ve keçilerde tespit edilen piropiasm enfeksiyonlarının prevalansı..... | 28 |
| Tablo 4.2. Yeşilhisar yöresinde RLB ile tespit edilen türlerin moleküler prevalansı.. | 29 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde hekimlik alanında enfeksiyöz hastalıkların tanısında klinik, patolojik ve histopatolojik bulgular, etkenlerin izolasyon ve identifikasyonu, etkenlere ait antijenik maddelerin saptanması ve immunolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Sözü edilen geleneksel yöntemler aracılığı ile bazı hastalıkların tanısı % 100 doğrulukla konulabilmesine karşın genellikle zaman almakta şüpheli veya negatif sonuçlanmaktadır.

Klinik bulgular, tanıda ilk basamağı oluşturmakla beraber, bazı farklı hastalıklarda benzer klinik tablolar gözlenmekte ve subklinik ile perakut enfeksiyonlarda enfeksiyonun başlangıç aşamasında, kronik hastalıklarda, portör ve rezervuar hayvanlarda enfeksiyona özgü spesifik bulgular gözlenmemektedir. Nekropsi bulguları da kimi zaman spesifik olmamaktadır. Bazı vakalarda, primer etken yerine sekonder etkenler izole edilerek, sağaltım da bu doğrultuda hatalı yapılmaktadır. Geleneksel immunolojik yöntemler ile pek çok enfeksiyon indirekt olarak saptanabilirse de bazı olgularda bu yöntemler yetersiz kalmakta ve çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir.

Hibridizasyona dayalı nükleik asit prosedürleri son yıllarda insan ve veteriner hekimliğinde teşhis metodu olarak geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur. Bunun başlıca nedenleri pek çok hastalığın teşhisinde klasik olarak kullanılan immunolojik ve bakteriyolojik testlerin önemli ölçüde yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar

verebilmesi ve güvenilir olanların da çok uzun süre almasıdır. Moleküler biyolojide son yıllardaki en önemli ilerleme hiç şüphesiz Polimeraz Zincir Reaksiyonu' (PZR)'nin geliştirilmesi ile olmuştur. 1987 yılında Kary B. Mullis tarafından yayımlanan makalede PZR' tarif edilmiştir. 1988 yılında da Saiki tarafından yöntem ilk defa tanı amaçlı kullanılmıştır. Isı değişken olmayan "thermus aquaticus" Taq DNA polimeraz enziminin bulunmasıyla PZR pratik olarak uygulanabilir bir teknik haline gelmiştir. İlk çalışmalar manuel yöntemlerle su banyolarında uygulandığından sadece referans laboratuvarlar için uygun bir yöntem olarak tarif edilirken, şimdi neredeyse her özel laboratuvarında bulunmakta ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler klonlama, DNA'nın invitro mutogenezi, parmak izi, mikroorganizmaların saptanması, adli tıp, mumyalardan DNA amplifikasyonu ve değişik hayvanlara ait proteinlerin saptanması ile DNA ve RNA analizlerinde geniş kullanım alanları bulmuştur. Moleküler tanı yöntemlerinin parazitoloji alanında kullanıma girmesi daha geç olmuştur. Bu iki nedene bağlıdır; moleküler yöntemlerin geliştiği ülkelerde paraziter hastalıklara az rastlanması ve paraziter hastalıkların çok olduğu bölgeler için bu yöntemlerin maliyetinin yüksek olmasıdır.

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. 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' ye göre daha duyarlı olan Reverse Line Blot (RLB) yöntemi geliştirilmiştir. Bu test, soya özgü genel primerler ile elde edilen PZR ürünlerinin bir membranda aynı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasına dayanmaktadır.

Bu teknik; birçok etkenin aynı anda, bir çok prob ile karşılaştırılmasına olanak sağladığından oldukça pratik ve kullanışlıdır. İlk kullanımı aynı kenede bulunan 4 *Borrelia* türünün ayrılması için olmuştur. Daha sonra aynı metot *Ixodes ricinus* kenesindeki *Ehrlichia* ve *Borrelia* türlerinin teşhisinde kullanılmıştır. Nitekim bir grup araştırmacı bu teknikle sığırlardaki *Theileria anulata*, *T. parva*, *T.taurotragi*, *T.velifera*, *Babesia bovis*, *B.bigemina*, *B.divergens*' in aynı anda spesifik olarak teşhis edilebileceğini göstermişlerdir.

Günümüzde RLB kullanımı her alanda gittikçe artmakta ve parazitoloji alanında hayvanlarda bulunan bütün kene kökenli hastalıkların teşhisinde kullanılan standart haline gelmektedir.

Bu çalışma, Yeşilhisar bölgesinde klinik belirti göstermeyen koyun ve keçilerdeki *Babesia* türlerinin RLB ve mikroskopik muayene ile eş zamanlı teşhisini yapmak, yöredeki hastalığın mikroskopik ve moleküler prevalansını tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BABESIOSIS TANIMI VE TARİHÇESİ

Babesiosis *Apicomplexa* anacındaki *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerde evcil ve yabani hayvanlarda yaygın olarak görülen paraziter bir kan hastalığıdır. Bu kan protozoonları, heteroxen olup, omurgalı hayvanların eritrositleri içerisinde gelişmelerini tamamladıktan sonra *Ixodidae* ailesindeki vektör kenelerde gelişmelerini sürdürürler ve biyolojik olarak nakledilirler (1).

Piroplasmosis, tick fever, red water, texas fever, splenic fever olarak da isimlendirilen babesiosis, *Babesia* türleri tarafından meydana getirilir. Bugüne kadar hastalığa sebep olan 98'i memelilerde olmak üzere 112 tür tanımlanmıştır. *Babesia* türlerinin coğrafik dağılımı vektör kenelerin yayılışları ile yakından ilgilidir (2).

Babesiosis etkeni ilk defa 1888 yılında Babes tarafından hemoglobinürili bir sığırdaki küçük intra eritrositik organizmalar olarak görülmüş ve *Haematoccus bovis* olarak tanımlanmıştır. Diğer taraftan Smith 1889 yılında texas hummalı bir hastada gözlemlediği etkeni isimlendirmemiş, 1893 yılında Smith ve Kilborn bu paraziti önce *Pyrosoma bigeminum* daha sonra da *Babesia bigemina* olarak isimlendirmişlerdir. Aynı araştırmacılar ilk defa patojenik bir protozoonun artropod bir ara konakla nakledilebileceğini bildirmişlerdir (2).

2.2. BABESIA TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ

Babesia türlerinin sınıflandırmadaki yeri aşağıda verildiği gibi belirlenmiştir (3).

Alem: Animalia

Alem Altı: Protozoa

Kök: Apicomplexa

Sınıf: Aconoidasida

Dizi: Piroplasmida

Aile: Babesidae

Soy: *Babesia*

Tür: *B. ovis*

B. motasi

B. crassa

2.2.1. Koyun ve Keçilerde Babesiosis

Koyun ve keçilerde babesiosis; *Babesia ovis*, *Babesia motasi* ve *Babesia crassa*'nın neden olduğu bir hastalıktır. Türkiye'de bilhassa koyunlarda hastalık çok yaygın olup, ağrı, ağırma, zerk, sıtma ve kan işeme olarak bilinmektedir (4).

Babesia ovis, Avrupa'da, Yakın ve Orta Doğu, Orta Asya, Kuzey Batı ve Güney Afrika, Kuzey, Güney ve Orta Amerika'da; *B.motasi* Avrupa, Kafkas Cumhuriyetleri, Hindistan, Vietnam, Kuzey Batı Afrika'da; *B.crassa* İran'da görülmektedir.

B.ovis; *Rhicephalus bursa*, *R.turanicus*, *Hyolamma anaticum excavatum* ve *R.evertsi*; *B.motasi* ise *R. bursa*, *Haemaphysalis punctata* ve *Ixodes ricinus* keneleri tarafından nakledilmektedir. *B.crassa*'nın vektörü henüz bilinmemektedir (4).

2.2.2. Türkiye' de Babesiosis

Türkiye'de *B. ovis*'in varlığı gerek klinik ve mikroskopik muayene gerekse serolojik testler ile ortaya konulmuştur (5).

Türkiye'de *B. ovis*'in varlığının ilk kez Nicolle ve Laveran tarafından 1899'da rapor edildiği bildirilmiştir (6). Daha sonra Türkiye'nin çeşitli yörelerinde koyun ve keçilerde *B. ovis*, perifer kan frotilerinin mikroskopik kan muayenesi ile % 40 - % 67 (7-11), serolojik yöntemlerle % 42,12 - % 91,02 oranında tespit edilmiştir (12-19). Van yöresinde yapılan mikroskopik bir çalışmada, *B. motasi* 'nin varlığı rapor edilmiştir (11). Diğer taraftan bugüne kadar Türkiye'de *B. crassa*'nın varlığı ile ilgili bir yayına rastlanamamıştır.

Orta Anadolu, Samsun ve Konya'da klinik belirti göstermeyen koyunlar üzerinde yapılan mikroskopik muayenede, koyunların sırası ile % 0,41, % 67,3 ve % 11,5'inde *B. ovis* tespit edilirken, Elazığ bölgesinde yapılan araştırmada etken tespit edilememiştir (16). Afyon yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*' in seroprevalansını saptamak amacıyla yapılan çalışmada ELISA ile 204 koyunun 106' sında (% 51,96) *B. ovis*'e karşı antikor tespit edilirken mikroskopik muayene ile 1' inde (% 0.49) *B. ovis* görülmüştür (20). Klinik belirti gösteren sürülerin mikroskopik bakışında, Orta Anadolu'da koyunların % 34,2' sinde, A.Ü. Veteriner Fakültesi Dahiliye Kliniğine getirilen koyunların % 62,5' inde *B. ovis* görülmüştür (16). Malatya yöresinde yapılan bir çalışmada, klinik belirti göstermeyen 220 koyunun 4'ünde (% 1,8) mikroskopik muayene ile *B. ovis* saptanmıştır (12).

Van yöresinde IFA testi ile *B. ovis* yönünden kontrol edilen koyunların % 60,3'ünde seropozitiflik elde edilmiştir. Aynı araştırmada seropozitiflik oranının 6-12 aylık kuzularda % 64,7, 1-2 yaş grubu koyunlarda % 55, 2-3 yaş grubunda % 60, 3-4 yaş grubunda % 65, ve 4 yaş üzeri grupta % 58,3 olduğu bildirilmiştir (15). Aynı yöntemle Samsun yöresinde % 72 (14), Ankara yöresinde % 76 (19) seropozitiflik bulunmuştur.

Türkiye'nin değişik 18 yöresinden toplanan koyun serumlarının ELISA tekniği ile *B. ovis* yönünden incelenmesi sonucunda bölgelere göre % 28,1 ile % 80,9 arasında değişen oranlarda seropozitiflik elde edilmiş ve seropozitiflik oranının bir yaşından küçük kuzularda % 28,1 ile % 52,5 arasında değiştiği bildirilmiştir (21). Aynı teknikle

Konya, Ankara ve Elazığ yöresinde sırası ile % 42,1, % 73,8 ve % 45 oranında pozitiflik belirlenmiş olup, Elazığ yöresinde yapılan çalışmada seropozitiflik oranının bir yaşından küçük kuzularda % 24,3, bir yaşından büyük koyunlarda ise % 46,7 olduğu belirtilmiştir. Malatya yöresinde ELISA tekniği ile *B.ovis* yönünden kontrol edilen koyun serumlarının % 55,9'un da pozitiflik belirlenmiş, seropozitiflik oranının bir yaşına kadarki kuzularda % 49,2, bir yaşından büyük koyunlarda % 59 olduğu bildirilmiştir (12).

Kayseri yöresinde mikroskopik muayene ile 192 koyunun 34'ünde, 47 keçinin 3'ünde olmak üzere toplam 239 küçük ruminantın 37'inde *B. ovis* tespit edilmiş olup *B. ovis* prevalansı koyunlarda % 17,70 keçilerde ise % 6,38 bulunmuş, *B.motasi* ise tespit edilmemiştir (5).

Türkiye'de ilk defa moleküler parazitolojik teşhis yöntemlerinden RLB ile Kayseri yöresindeki koyunlarda yapılan bir çalışmada, %2,6 oranında *B. ovis*, % 5,1 oranında da *T. ovis* + *B. ovis* miks enfeksiyonu tespit edilmiştir (22).

2.3. BABESIA TÜRLERİNİN GELİŞME ŞEKİLLERİ

Babesia türleri, obligat heteroksen gelişen protozoonlardır. Gelişmelerini omurgalı konaklar ile *Ixodidae* ailesine bağlı kenelerde sürdürürler. Her bir *Babesia* türünün geliştiği gerek omurgalı gerekse *Ixodidae* keneleri türe özgüdür. Hiç bir zaman sığırdaki bulunan bir tür koyunda, koyundaki tür attaki tür ise köpekte gelişemez. Aynı durum omurgalıdaki gibi olmasa da keneler içinde geçerlidir. Ancak hayvanlarda bulunan bazı *Babesia* türlerinin (*B.equi*, *B.microti* ve *B.divergens*) insanlarda da gelişebildiği görülmüştür (2).

2.3.1. Omurgalı Konaktaki Gelişme

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. *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 stoplazması ile karşı karşıya kalır. Bundan sonraki safhalarda parazit tek katlı membranla yaşamını devam ettirir. Serbest merozoitlerin hücreye girişinde de aynı olaylar şekillenir (23).

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 stoplazmada 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 şekilde bölünme şekillenmesine karşın, şizogonide çekirdeğin bölünmesi, sitoplazmadaki değişimler, bölünmeden önce gerçekleşir. Bu bölünme sırasında, parazit yuvarlak, oval formdan, amoeboid ve armut formlarına kadar değişen şekilde gözlenir. Çoğalma sonucunda oluşan merozoitler, birbirinden ayrılır ve eritrosit membranını parçalayıp dışarı çıkararak yeni eritrositleri enfekte ederler. Merozoitler eritrositlere başarılı bir şekilde girdikten sonra, gelişir ve çoğalırlar. Bu eşeysiz safha sınırsız şekilde sürer, hayvanlar bazen ömür boyu enfekte kalabilirler. Bu olay sırasında konak hücreler de etkilenir ve morfolojik değişimler şekillenir (23).

2.3.2. Vektör Kenedeki Gelişme

Babesia etkenlerinin keneler aracılığı ile naklinin 1893 yılında saptanması, parazitolojide önemli bir dönüm noktası olmuştur. *B. ovis*; *Rhicephalus bursa*, *R. turanicus*, *Hyalomma anatolicum excavatum* ve *R. evertsi*; *B. motasi* ise *R. bursa*, *Haemaphysalis punctata* ve *Ixodes ricinus* keneleri tarafından nakledilmektedir. *B. crassa*'nın vektörü henüz bilinmemektedir (4).

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, kenenin bağırsağında beslenmesinden iki gün sonra sitostom, mikrotubuller, ok benzeri yapılar ve uzun bir kuyruk kazanarak gametleri meydana getirirler. Beslenmeden 2- 4 gün sonra ışınsal cisimlerin ikisi, hücre membranı 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 (23).

Bağırsakta oluşan zigottan, üç katlı membranla örtülmüş, ön ucu şemsiye şeklinde olan kinetler gelişir. Bağırsağı delen kinetler, hemolenf aracılığı ile vektör kenenin hematositleri, kas fibrilleri, malpighi tubul hücreleri ve dişi kenelerde ovaryum hücrelerini bulunduran çeşitli dokulara 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. Tükrük bezi hücrelerine penetrasyonla giren kinetler, karakteristik yapılarını kaybederler ve polimorfik sporontlara dönüşmeye başlarlar. Tüm türlerde, sporontun çoğa bölünmeleri sonucunda meydana gelen sporozoitlerin gelişimi sadece enfekte kene, omurgalı bir konağa tutunduğunda başlar ve sporozoit kan emme esnasında omurgalı konağa verilir. Böylece yaşam döngüsü tamamlanmış olur (23–25).

2.4. BABESIOSIS'İN EPİDEMİYOLOJİSİ

Babesiosis'in epidemiyolojisinde, bölgenin iklim özellikleri, vejetasyon durumu, coğrafik konumu, bölgede bulunan vektör kene türleri, bunların mevsimsel aktiviteleri, spesifik konakların varlığı, kene enfestasyon ve enfeksiyon oranları, önceki yıllarda o bölgedeki hastalıkların durumu, bunların yayılışları ve mevsimlere göre dağılımları değerlendirilmektedir (2).

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 (26).

2.5. BABESIOSIS'İN TEŞHİSİ

Geçmişte protozoonların tanımlanması ve sınıflandırılması, morfolojik özellikleri temel alınarak yapılmış ve bu durum morfolojik ayrımı yapılamayan organizmaların aynı tür olarak kabul edilmesi yanlışını doğurmuştur. Bu bağlamda, morfolojik ayrımında sıklıkla yanılgıya düşülen protozoon türleri izoenzim elektroforezis yönteminin uygulanmaya başlanmasıyla birlikte, klinik vakalardan izole edilen "patojen" ve asemptomatik vakalardan izole edilen "apatojen" şuşlar olarak iki gruba ayrılmışlardır. İzoenzim çalışmalarına ait verilerin antijenik ve DNA farklılıklarını ortaya koyan çalışmalarla desteklenmesi sonucunda, apatojen ve patojen olarak nitelendirilen bu iki izolatin, ışık mikroskopik muayenede morfolojik olarak ayrımı mümkün olmayan ayrı türler oldukları anlaşılmıştır. Günümüzde nükleik asit tabanlı teknikler ile immunité düzeyi ya da geçirilmiş hastalıklardan etkilenmeksizin, morfolojik olarak benzer veya aynı antijenik epitoplara paylaşan organizimlerin ayırt edilebildiği bildirilmektedir (2).

Parazit hastalıklarında etkene yönelik araştırmalar, doğrudan etkenin kendisine veya ona karşı oluşan antikörlere dayandırılmakta olup, her tanı metodunun parazitin tipi ya da incelenen klinik örnekten bağımsız olarak, kendi avantajları ve dezavantajları bulunduğu çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (27). (Tablo 2. 1).

Doğrudan mikroskopi yöntemi, parazit sayısı yeterince fazla ise parazitlerin morfolojik olarak araştırılması ve tür identifikasyonunda yeterli olup, nükleik asit tabanlı teknoloji çok sayıda örneğin otomatizasyonla bir arada incelenmesi dışında avantaj sağlamamaktadır. Ancak, parazitlerin az sayıda bulunduğu örneklerde nükleik asitlere

dayalı yöntemler, yüksek duyarlılıkları ile hassas bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır (27).

Parazitlere karşı oluşan antikörlerin serolojik yöntemlerle araştırılması parazitin doğrudan görülemediği durumlarda ve tarama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmakta, ancak antijenlere karşı oluşan çapraz reaksiyonlar ve aktif enfeksiyonla, geçirilmiş ya da latent enfeksiyonun ayrılmasındaki güçlükler nedeniyle yetersiz kalabilmektedir. Nükleik asit tabanlı teknikler ile immunité düzeyi ya da geçirilmiş hastalıklardan etkilenmeksizin, morfolojik olarak benzer veya aynı antijenik epitoplara paylaşan organizmaların ayırt edilebildiği bildirilmektedir (27).

Tablo 2.1. Çeşitli Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması

| Yöntem | Avantajları | Dezavantajları |
|----------------------|--|---|
| Moleküler Biyolojik | Doğrudan Paraziti İmmun sistemden ya da geçirilmiş hastalıklardan bağımsız Varyant araştırılması ve ayrımı | Pahalı Araştırılması çok aşamalı |
| Kültür Yöntemleri | Virulans ve infektifinin ölçülmesi Canlı parazitler saptanabilmesi | Ölü organizmaların da saptanması İnhibitörleri nedeniyle olası yanlış negatiflik (PZR) Kontaminasyon nedeniyle olası yanlış pozitiflik (PZR) |
| Mikroskopik İnceleme | Basit Parazitin direkt araştırılması Morfolojik olarak farklı organizmaların ayrımı | Yavaş Zahmetli ve Yorucu Parazit sayısının yüksek olmadığına düşük duyarlılık göstermesi Morfolojik olarak benzer organizmaların ayırt edilememesi Deneyimli mikroskopiste gereksinim duyulması |
| Serolojik tetkikler | Basit ve hızlı Otomasyona olanak vermesi Çok sayıda örneğin incelenmesine elverişli | Düşük özgüllük Aktif ile geçirilmiş yada latent enfeksiyonun ayırt edilememesi Standarize ayıraçların gerekliliği |

2.5.1. Parazitin tespiti

Babesia etkenlerinin saptanması, perifer kan frotilerinin mikroskopik muayenesiyle direkt olarak parazitin tespiti şeklinde olduğu gibi son yıllarda güncel olan moleküler biyolojik yöntemler ile nükleotid tespiti şeklinde de yapılmaktadır (28).

2.5.1.1. Mikroskobik Muayene

Akut hastalıkların teşhisinde mikroskobik muayenede iki yöntem uygulanmaktadır. Bunlar ince yayma froti ve kalın damla yöntemidir. Bu yöntemler akut Babesiosis'in seyri esnasında etkenin saptanması için hala en iyi ve en güçlü teşhis aracı olup, her laboratuarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak hastalığın serebral formunda olduğu gibi perifer kan frotilerinde etken her zaman görülmeyebilir. Ayrıca, yine yapılan kan frotilerinin mikroskobik bakışı için deneyimli personel de önemlidir. Çünkü parazitlerin az olduğu durumlarda, eritrosit içindeki gelişme formları gözden kaçabilir. Diğer taraftan, personel deneyimli de olsa günde çok sınırlı sayıda preparata bakmak mümkündür (25, 28, 29).

2.5.1.1.1. İnce Yayma Froti Yöntemi

Akut hastalıkların teşhisinde, mikroskobik muayenede ince yayma kan frotileri parazitin morfolojik detaylarının görülebilmesi sebebiyle kalın damla preparatlara göre daha fazla tercih edilmektedir. Ancak babesiosis olgularında meydana gelen anemi sonucunda perifer kanda parazitemi oranı düşükken, aynı hayvanların iç organlarından yapılan frotilerde ise parazitemi oranı daha yüksektir. Parazitemi oranının düşük olduğu durumlarda tercih kalın damla preparatlar yönünde olmalıdır (27-29).

2.5.1.1.2. 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 (28).

Yukarıda belirtildiği gibi ince yayma ve kalın damla kan frotilerinin saptanması enfeksiyonun varlığını gösterir. Ancak bu preparatlarda etkenin bulunmaması enfeksiyon olmadığının 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 (30)

2.5.2. Nükleotid Tespiti

Kanda görülen protozoer ve riketsiyal hastalıkların karakteristik özelliği olarak, hastalık atlatıldıktan sonra iyileşen hayvanlar taşıyıcı hale gelirler. Böyle taşıyıcı hayvanlar, vektör keneler için enfeksiyon kaynağı olup, görünüm itibarı ile enfekte olmayan hayvanlardan ayırt edilemezler. Taşıyıcı hayvanların kanında, genellikle çok az miktarda parazit bulunur ve bunlar frotilerde her zaman tespit edilemezler (31).

Kan protozoonlarının meydana getirdiği hastalıkların tanısında spesifik serolojik testlerden de yararlanır. Ancak bu testler genellikle indirekt uygulamalar olduğu için etkenin direkt kendi varlığını göstermezler. Bu tür hastalıkların teşhisinde bu ve bu gibi dezavantajlar, teşhiste daha özgül ve duyarlı metotların gerekliliğini ortaya koymuş, moleküler biyolojik teşhis yöntemlerinin gelişmesine sebep olmuştur (31- 33).

Parazitik ajanların nükleik asitlere dayalı yöntemlerle araştırılması, parazite özgü DNA ya da RNA sekenslarının belirleyici DNA molekülleri (prob) ile araştırılmasına dayanmaktadır. Oligonükleotid, DNA'nın bir bölümü, tek zincirli ya da plazmid DNA'sından oluşabilen proplar, radyoizotop, enzim veya kimyasal maddelerle işaretlenmekte, hedef örnekteki parazite ait nükleik asitlerle karşılaştırılmakta ve hibridize olmuş proplardan elde edilen direkt yada indirekt pozitif sinyaller değerlendirilmektedir (27).

Nükleik asit tabanlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesinde ilk aşama organizme özgü hedef sekansın tanımlanması ve elde edilmesi olup, özellikle belirli bir türün tüm izolatlarının saptanması amaçlandığında, polimorfik olmayan ve varyasyon bölgelerini içermeyen dizilimler seçilmesinin gerektiği bilinmektedir.

Sonucun görülebilir hale getirilmesi için, yüksek duyarlılıkları nedeniyle radyolojik olarak işaretlenmiş problemler kullanılmaktaysa da, radyoaktif olmayan problemler, stabil olmaları, standardize edilebilmeleri, çevreye ve personele daha az zarar vermeleri gibi avantajları sebebiyle günümüzde tercih edilmektedir (27).

2.5.2.1. DNA Amplifikasyon Teknikleri

Bu teknikler, klinik materyallerde bulunan veya izole edilen etkenlere ait DNA'ların ve ya bazı spesifik sekansların invitro ortamda enzimatik olarak amplifikasyonlarını amaçlar. Pratikte de bu DNA amplifikasyon yöntemi, diğerlerine oranla daha fazla uygulama alanı bulmuştur. RNA karakterindeki genomik materyaller de önce reverse transkriptaz (RT) ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilerek amplifikasyonu yapılır (34). Bu teknikler *Babesia* türlerinin teşhis ve ayrımında da kullanılmıştır. Bununla birlikte, metodun duyarlılığında örnekteki DNA'nın yoğunluğunun önem taşıdığı bildirilmiştir (28).

2.5.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bugün çeşitli hastalıklarda olduğu gibi babesiosis'de de bilinen teşhis yöntemlerine göre daha duyarlı olan PZR büyük oranda DNA problemlerinin yerini almıştır (28).

PZR, başlangıç ve bitiş uçları bilinen bir sekansın bir başka deyişle sınırları bilinen bir DNA segmentinin invitro amplifikasyonunda kullanılan biyoteknolojik bir tanı yöntemidir. Bu yöntem hedef DNA bölgesinin yüksek sıcaklığa maruz bırakılması sonucu denatürasyonu, kısa ve özgün oligonükleotid zincirler olan iki tür primerin, bir kendisine ait 5' terminusu (ucu) ile hedef DNA iplikçiklerinden birinin 3' ucuna, diğeri ise diğeri tek iplikçikli DNA'nın antiparalel 3' ucuna bağlanmak suretiyle amplifiye edilerek DNA segmentine bağlanması ve polimeraz enziminin katalize ettiği primer polimerizasyonu kapsayan siklusların tekrarlanması esasına dayanır (4).

Rutin olarak, PZR testleri 1pg miktarındaki DNA'yı tespit edebilir. Bu duyarlılık, nested PZR protokolleri ile 1fg DNA'ya kadar çıkabilmektedir (28).

2.5.2.3. Reverse Line Blotting (RLB)

RLB yöntemi, PZR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Teknik birçok etkenin aynı anda birçok prob ile karşılaştırılmasına olanak sağladığından, oldukça pratik ve kullanışlıdır. Bu yöntem ilk defa 1988 yılında insanlarda, orak hücre anemisi ile β Talasemi'nin teşhisinde kullanılmıştır (35). Rijpkema ve ark. (1995), bu tekniği, aynı kenede bulunabilen 4 *Borrelia* türünün ayrılması için kullanmışlardır (36). Kamerbeek ve ark.(1997), ise aynı metod ile, *Mycobacterium tuberculosis*' in teşhisini ve tiplendirmesini yapmışlardır (37). Bu yöntemin kan protozoonlarının saptanmasında kullanılması, Gubbels ve ark.(1999) tarafından gerçekleştirilmiştir. Aynı araştırmacılar 18S ssrRNA genindeki V4 değişken bölgesini çoğaltan primerlerle PZR' de çoğalttıkları gen bölgelerini, RLB tekniğinde kullanarak sığırlarda görülen *Theileria annulata*, *T. parva*, *T. mutans*, *T. taurogi*, *T. velifera*, *Babesia bovis*, *B.bigemina* ve *B. divergens*'in aynı anda özgül teşhislerinin yapılabileceğini göstermişlerdir (38). Ceci ve ark. (1999), RLB ile sığırlarda *T.buffeli/orientalis* ile *B.bigemina*'yı teşhis etmişlerdir (39). Kan protozoonlarının yanında, 16S rRNA gen bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PZR'yi takiben; RLB'nin kullanılması ile *Anaplasma* ve *Ehrlichia* gibi riketsiyal etkenlerin teşhisi de başarı ile yapılmıştır (40- 42).

Günümüzde özellikle kene kaynaklı hastalıklarla ilgili çalışmalarda, RLB kullanımı artmakta olup bu tür hastalıkların teşhisinde standart bir test haline geldiği bildirilmektedir (33, 41- 43).

2.5.3. Serolojik Teşhis

Babesia türlerine karşı oluşan özgül antikorların tespitine yönelik birçok immunodiagnostik test geliştirilmiştir. Bunlardan, ELISA (Enzym Linked İmmunosorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody), SELISA (Slide Enzyme Linked İmmunosorbent Assay), IHAT (İndirect Hemagglutination Test), CFT (Complement Fixation Test), LAT (Latex Agglutination Test) ve RIA (Radioimmunoassay) en çok kullanılan testlerdir (24, 29, 44,45).

Özellikle latent ve subklinik seyirli olgularda, *Babesia* parazitlerine karşı oluşan özgül antikorların serolojik testlerle indirekt olarak teşhisi sıklıkla kullanılmaktadır. Bu serolojik yöntemlerde kullanılan antijenler, akut babesiosis'li hayvanların doku, serum ve parazitli eritrositlerinden elde edilmektedir (29).

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 (29). Karşılaştırmalı olarak yapılan bir çalışmada, enfeksiyondan 14 gün sonra alınan serumda, duyarlılık ELISA, Western Blot, IFAT ve CFT için sırasıyla % 98,3; % 96,6; % 28,8 olarak bildirilmiştir (46).

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 (44).

Serolojik antikor tespitinde kullanılan serolojik yöntemler içerisinde IFAT, daha ekonomik, güvenilir ve diğerlerine göre daha hassas olması sebebiyle tercih edilen bir testtir (29, 44). IFAT tercih edilen testler arasında olmasına karşın, testin değerlendirilmesine bağlı olarak yanlışlıkların ortaya çıkması *Theileria-Babesia*, *Babesia-Plasmodium* türleri arasında ve *Babesia'* nın kendi türleri arasında çapraz reaksiyonların olması, testin dezavantajlarından (47, 48). Bunun yanında, uzun süreli portörlük durumlarında, kanda piroplasmik formlar bulunmasına rağmen, antikorlar her zaman tespit edilmeyebilir (2).

2.6. BABESİOSİSİN TEDAVİSİ

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 (43, 50).

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 da iyi bilinmesi gerekmektedir (50).

Saha da yaygın olarak kullanılan İmidocarb: Karbanilid türevi bir maddedir ve genellikle dipropiyanat tuzu şeklinde bulunur; beyaz renkli suda çözünmeyen bir tozdur. İlaç özellikle paranteral yolla kullanılır. Vücudu değişmemiş halde ve büyük ölçüde idrar ve dışkı yoluyla terk eder. İlaç verilen hayvanların doku ve organlarında 5,5- 6 ay süreyle kalıntılara rastlanır; bu sebeple, besi hayvanlarında kullanılmaktan kaçınılmalıdır (4).

Tedavi süresince ve son ilaç uygulamasından sonra koyunlar 21 gün geçmeden kesime gönderilmemelidir ve etleri insan gıdası olarak tüketilmemelidir. Sütü insan tüketimine sunulacak sağlamal koyunlara uygulanmaz. İmidocarb koyunlara 1-1,2 mg/kg dozda deri altı olarak 24 saat aralıkla 2 defa verilir (4).

2.7. BABESİOSİS'DEN KORUNMA

Babesiosis'de korucuyucu önlemlerin alınması büyük önem taşınmaktadır. Bu teknikler arasında, vektör kenelerle mücadele, suni preimmünizasyon ve aşılama önemlidir (25, 45, 51).

2.7.1.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 bio 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 (52, 53).

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 (54).

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 rekombinat proteinler kullanılmaktadır (53).

Diğer taraftan endemik stabil bölgelerde, yoğun biçimde akarisit kullanılması, kene popülasyonunu azaltarak bölgenin instabil olmasına yani bölgedeki hayvanların hastalığa karşı duyarlı hale gelmesine sebep olmaktadır. Bu yüzden özellikle sıkı kene mücadelesinin instabil bölgelerde uygulanması önerilmektedir (4).

2.7.2. Suni Preimmunizasyon Kazandırılması

Enzootik alanlarda yetiştirilen hayvanlar babesiosis'e karşı ilk altı ayda, enfeksiyon immunitesi ya da preimmunizasyon kazanırlar. Sonuç olarak bu hayvanlar az miktarda parazit taşırlar ve bölgedeki lokal şuşlara karşı belirli ölçüde bağışıklırlar, buna bağlı olarak ta klinik belirti göstermezler. Bölgeden kenelerin tamamen uzaklaştırılması ve küratif ajanlarla enfeksiyonun tamamen ortadan kaldırılması sonucu hayvan duyarlı hale gelir. Bu durumda olan ya da parazitin bulunmadığı instabil bölgelerden böyle endemik bölgelere gelecek olan hayvanlara suni preimmunizasyon kazandırma uygulamaları yapılabilir. Bunun için duyarlı olan hayvanlara, *Babesia* taşıyıcısı olan hayvanların kanı verilir ve oluşan ateş ve parazitemi takip edilir. Klinik belirtilerin oluşması ile birlikte kuratif dozun altında imidazol preparatı uygulanarak hastalığın çıkışı önlenir. Ancak belirli bir miktar parazitin canlı kalmasına mücade edilir. Böylece uygulama yapılan hayvanlarda yapay olarak preimmunizasyon uygulamaları sağlanmış olur (53).

2.3.3. Aşılama

Babesiosis'in naklinden sorumlu olan kenelere karşı yürütülen mücadelede çeşitli akarasilere karşı gelişen direnç sebebiyle, hastalıkla mücadelede etkene karşı aşılama yapılması önem kazanmıştır. Uzun yıllar preimmun durumdaki hayvanların kanları aşılamada kullanılmıştır (44,52).

Son yıllarda moleküler biyoloji ve gen teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak, DNA aşıları geliştirilmeye başlamıştır. İmmunolojik özelliği iyi olduğu tespit edilen, antijenik proteinleri kodlayan gen bölgesi saptanarak klonlanmış ve bu klonlama ile çoğaltılan antijenik proteinler aşılamada kullanılmıştır (53).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SAHA ÇALIŞMALARI

Bu çalışma için gerekli materyali toplamak amacıyla, çeşitli zamanlarda Yeşilhisar ve çevresindeki köylere gidilerek, klinik belirti göstermeyen sağlıklı hayvanlardan rastgele 200 koyun ile 100 keçi seçilmiştir. Bu koyun ve keçilerden RLB için EDTA'lı tüplere vena jugularis' den, tekniğine uygun olarak kan alınmış, ayrıca mikroskopik bakı için aynı hayvanların kulak ve kuyruk uçlarından perifer kan frotileri hazırlanmıştır.

3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

Toplanan EDTA'lı tüplerdeki kanlar DNA ekstraksiyonuna kadar +4 °C'de saklanmışlardır. Perifer kandan hazırlanan sürme preparatlar da tekniğe uygun şekilde boyanarak değerlendirilmek üzere hazırlanmıştır.

3.2.1. Kan Frotilerinin Yapımı ve Muayenesi

Perifer kandan yapılan kalın damla frotiler 100 °C' lik etüvde 15 dakika, sürme frotiler ise havada kurutulduktan sonra, metil alkolde 5 dakika tutularak tespit edilmiştir. Tespit edilen frotiler % 5'lik Giemsa boya solusyonu ile oda ısısında 30- 45 dakika boyanmıştır. Boyanan frotiler musluk suyu altında yıkanıp kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak mikroskobun 100'lük objektifi altında *Piroplasma*, *Babesia* ve *Theileria* türleri yönünden kontrol edilmiştir.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.2.2.1. 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 500 µl 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 500 µl 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 miske, kullanılmadan hemen önce 100µg / ml oranında ilave edilmiştir.
- PZR miskle 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 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.

3.2.2.2. PZR Yapılışı

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Biometre T Gradient (Whatmann, Biometra) PZR makinesi kullanılmıştır. Reaksiyonda Primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S ssr RNA (small subunit ribozomal RNA) geninin değişken V4 bölgesinden büyüklüğü 460 ile 520 bp (base pairs = baz çifti) arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler (RLBF₂ 5' GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G'3 ve RLBR₂ Biotinle işaretli 5'-TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC-3') kullanılmıştır (17,20).

- Reaksiyon Karışımı;
 - 1X PZR buffer
 - 1.5 mM MgCl₂
 - 200 µM her bir (datp, dCTP,dGTP), 100 µM (dTTP, dUTP) deoxynucleotiden
 - 50 pmol her bir primerden
 - 1,25 U taq DNA polimeraz
 - 1,25 U Uracil DNA glycosylase
 - 5 µl DNA örneği şeklinde hazırlanmıştır.
- Karışım her biri 200µl'lik ısıya dayanıklı özel PZR reaksiyon tüplerine (Tref Lab.) 45µl reaksiyon karışımı 5µl DNA olmak üzere porsiyonlanmıştır.
- Reaksiyon için tüpler otomatik PZR makinesine (Thermo-Hybrid) yerleştirilmiştir 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

- Amplikasyon sonunda elde edilen PZR ürünlerinin bir kısmı (20 µl) % 1,7'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, Gene Geneus Jel Dökümentasyon Sistemi ve imaj analiz programı (Syngene) kullanılarak görüntülenip analiz edilmiş, geri kalanı ise (30µl) RLB testinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.2.3. Pozitif ve Negatif Kontrol

Testin bilinen *Babesia* türlerinin DNA'larını amplifiye ettiğini göstermek amacıyla pozitif kontrol olarak, *B. ovis* (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesinden), *B.motasi*, *B.crassa*, *T.ovis* (Borstel, Germany) ve negatif kontrol olarak da sağlıklı koyun ve keçi DNA'sı kullanılmıştır.

3.2.3. Reverse Line Blotting (RLB)

3.2.3.1. RLB Membranın Hazırlanması

Bu aşamada kullanılan problemlerin tamamı negatif yüklü Biotin C membrana kovalent bağlanabilmesi amacıyla, 5'- uçlarında amino grubu N terminal N-(Trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl, N,N-diisopropyl phosporamidite (=TFA)-C₆ aminolinker) içerecek şekilde MWG (Almanya) firmasına sentezletirilmiştir. Membran Georges ve ark. (2001), Gubbels ve ark.(1999)'nın bildirdiği şekilde hazırlanmıştır.

- Problemler 500 mM NaHCO₃ (ph 8.4) içinde 100-400 pmol/150µl 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.

3.2.3.2. RLB Hibridizasyon

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, problarla hibridizasyonları sağlanmıştır. Bu aşamada miniblotterın çalkalanmasına 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.
- Membran 10 ml ECL sıvısında 10 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.

Değerlendirme de filmler üzerinde prob ve PZR ürünlerinin döküldüğü sıraların keşiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir. İstendiğinde ECL filmindeki görüntü UVP dökümantasyon sistemi ile fotoğraf haline getirilmiştir.

3.2.3.3. 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 özgülüğü ortaya konulmuştur. Kontrol DNA'lar ile yapılan testlerde kendi özgül problemleri dışında bağlanmalar gözlenmemiştir.

3.2.4. PZR ve RLB Testlerinde Kullanılan Gereçler

- PZR makinesi
- 200 µl 'lik PZR tüpü
- Elektroforez tankı
- Güç Kaynağı
- Dökümantasyon Sistemi
- Biodyn C membran
- MN 45 Miniblotter
- ECL hyperfilm

3.2.5. PZR ve RLB Testlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- **Lysis miks** : % 0,22 NaCl
1 mM EDTA
% 0,016 Saponin

- **PZR miiks** : 10 mM Tris-HCL ph 8.0
50 mM KCl
% 0,5 Tween 20
100 µg/ml Proteinase K*

Proteinase K PZR miiks tüplere dağıtılmadan az önce karışıma ilave edilmelidir.

- 1X PZR Buffer
- MgCl₂
- dNTP mix
- dUTP
- Uracil DNA glycosylase
- Taq Polymerase
- 500 mM NaHCO₃
- % 16 EDAC
- 100 mM NaOH
- 0,5 M EDTA
- **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 Sulphat)
100 ml H₂O

Karıştırılıp, 60 °C' lik su banyosunda eritilir.

- **20X SSPE:** 175,3 g NaCl
27,6 g NaH₂PO₄-H₂O
7,4 g EDTA
800 ml H₂O

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

- **2X SSPE/0.1 SDS:** 100 ml 2X SSPE
10 ml % 10 SDS
890 ml H₂O

Karıştırılıp, 60⁰C' lik su banyosunda eritilir.

- **2X SSPE/0.5 SDS:** 100 ml 2X SSPE
50 ml % 10 SDS
850 ml H₂O

Karıştırılıp, 60⁰C' lik su banyosunda eritilir.

- Streptavidin
- ECL tespit sıvısı

3.2.6. PZR ve RLB testlerinde Kullanılan Primerler ve Problar

PZR testinde kullanılan primer listesi kaynaklarıyla birlikte Tablo 3.1' de verilmiştir.

Biodyn C membrana tutturulan aminolinkerli probların 5'-3' dizilişleri ve kaynakları Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.1. PZR'da kullanılan Primerler

| Primerin Adı | Dizilişi | Kaynak |
|-------------------|--|----------------------------|
| RLBF ₂ | 5'GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G'3 | Gubbels ve ark., 1999 (38) |
| RLBR ₂ | Biotinle işaretli 5'TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC'3 | Gubbels ve ark., 1999 (38) |

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan problemlerin 5'-3' dizilişi

| Prob | Dizilişi | Kaynak |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Catchall | TAATGGTTAATAGGA(AG)C(AG)GTTG | Gubbels ve ark., 1999 (38) |
| <i>Theileria</i> spp. | TGATGGGAATTTAAACC(CT)CTTCCA | Nagora et al. 2004 (57) |
| <i>T. ovis</i> | TTTTGCTCCTTTACGAGTCTTTC | Nagora et al. 2004 (57) |
| <i>Babesia</i> spp. | CCT(GT)GGTAATGGTTAATAGGAA | Schnittger et al. 2004 (56). |
| <i>B. ovis</i> | GCGCGCGGCCTTTGCGTACT | Nagora et al. 2004 (57) |
| <i>B. motasi</i> | ATTGGAGTATTGCGCTTGCTTTTT | Nagora et al. 2004 (57) |
| <i>B. crassa</i> | TTATGGCCCGTTGGCTTAT | Schnittger et al. 2004 (56) |

T: thymine; A:adenine; C:cytosine; G:guanine

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER

Testlerin sonuçları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliği χ^2 (ki kare) testiyle incelenmiştir. Bu istatistiksel testler için SPSS 10.0 programından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Yeşilhisar yöresindeki klinik belirti göstermeyen sağlıklı 200 koyun ve 100 keçi babesiosis yönünden mikroskopik bakı ve RLB ile incelenmiştir.

Toplam 300 perifer kan frotisinin mikroskopik incelenmesi sonucunda, 33 (% 11) kan örneğinde *piroplasma* saptanmıştır. Saptanan bu 33 pozitifliğin 24 (% 8)'ünün *Theileria* spp.'ye ve 9 (% 3)'ünün *Babesia* spp.'ye ait olduğu tespit edilmiştir. Mikroskopik bakıda türlerin ayrımı yanlışlıklara sebep olabileceğinden, sadece soy düzeyinde değerlendirme yapılmıştır. Araştırmaya dahil koyun ve keçilerde saptanan mikroskopik sonuçlar Tablo 4.1' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Mikroskopik muayene ile Yeşilhisar yöresinde koyun ve keçilerde tespit edilen piroplasma enfeksiyonlarının prevalansı

| Muayene edilen hayvanın | | SONUÇ | | | | | | | | |
|-------------------------|--------|------------------|----|----------------------------|--------------------|---|----------------------------|-----------------------|----|----------------------------|
| Türü | Sayısı | <i>Piroplasm</i> | % | $X^2 = 4,635$ P = 0,019 | <i>Babesia</i> spp | % | $X^2 = 2,062$ P = 0,280 | <i>Theileria</i> spp. | % | $X^2 = 2,497$ P = 0,075 |
| Koyun | 200 | 28 | 14 | | 8 | 4 | | 20 | 20 | |
| Keçi | 100 | 5 | 5 | | 1 | 1 | | 4 | 4 | |
| Toplam | 300 | 33 | 11 | | 9 | 3 | | 24 | 8 | |

RLB testi ile incelenen 200 baş koyun ve 100 baş keçiye ait toplam 300 kan numunesinin sonuçları Tablo.4.2’de gösterilmiştir. Tablo.4.2’de verildiği gibi, RLB sonucunda koyunların 99 (% 49,5)’u, keçilerin 18 (% 18)’i olmak üzere toplam 117 (% 39) küçük ruminantta , *Theileria* ve *Babesia* türleri için ortak gen bölgesinden dizayn edilmiş olan catch-all probu ile pozitiflik saptanmıştır. Catch-all pozitif bulunan 99 koyunun 91(% 45,5)’inde *T. ovis*, 3 (% 1,5)’ünde *B. ovis* ve beşinde *B. ovis* + *T. ovis* (miks enfeksiyon) tespit edilmiştir. Catch-all pozitif 18 keçinin 15 (% 15)’inde *T. ovis*, 1(% 1)’inde *B. ovis* ve 2 (% 2)’sinde *B. ovis* + *T. ovis* (miks enfeksiyon) tespit edilmiştir.

Tablo 4.2. Yeşilhisar yöresinde RLB ile tespit edilen türlerin moleküler prevalansı

| Türü | Sayısı | Catch-all (+) | % | $\chi^2 = 27,806$ | $P = 0,000$ | <i>T. ovis</i> | % | $\chi^2 = 27,142$ | $P = 0,000$ | <i>B. ovis</i> | % | $\chi^2 = 0,127$ | $P = 1$ | <i>B. ovis</i> + <i>T. ovis</i> | % | $\chi^2 = 0,073$ | $P = 1$ |
|--------|--------|---------------|------|-------------------|-------------|----------------|-------|-------------------|-------------|----------------|------|------------------|---------|---------------------------------|------|------------------|---------|
| Koyun | 200 | 99 | 49,5 | | | 91 | 45,5 | | | 3 | 1,5 | | | 5 | 2,5 | | |
| Keçi | 100 | 18 | 18 | | | 15 | 15 | | | 1 | 1 | | | 2 | 2 | | |
| Toplam | 300 | 117 | 39 | | | 106 | 35,33 | | | 4 | 1,33 | | | 7 | 2,34 | | |

Yeşilhisar yöresinde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin mikroskopik prevalansı % 11, moleküler prevalansı % 39, olarak tespit edilmiştir. Türlerle göre bakıldığında *Babesia* spp. mikroskopik olarak % 3, *B. ovis* moleküler olarak % 1,3 olarak tespit edilmiştir. *Babesia motasi* ve *B. crassa* ise saptanamamıştır.

Diğer taraftan bu çalışmanın istatistiksel analizi yapıldığında, mikroskopik muayene ve RLB sonuçlarındaki *Piroplasma* ve Catch-all pozitifliğinin koyun ve keçiler arasındaki farklılığın istatistiksel öneme sahip olduğu ($p < 0.05$), soy düzeyinde ise *Babesia* ve *Theileria* yönünden istatistiksel önemin olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Koyun ve keçilerde babesiosis tropik ve subtropik bölgelerde, kenelerle nakledilen ve ekonomik kayıplara yol açan önemli bir hastalıktır. Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi Türkiye’de de hayvan 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 birbirlerine göre çeşitli avantaj ve dezavantajları ortaya çıkmıştır (44).

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 yanılığlara sebep olmaktadır (39, 58, 59).

Mikroskopik muayenede etkenin saptanmasının güçlüğü ile birlikte *Babesia* türlerinin ayrımlarını da yapmak zordur. Bu durum miks enfeksiyonlar da 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 (59, 60).

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 (61). Ancak bu yöntemlerde, etken bulunmadığı halde antikorların varlığını devam ettirmesine bağlı olarak ortaya çıkan seropozitifliklerin (38) ve çapraz reaksiyonların sebep olduğu yanlış seropozitifliklerin meydana gelebileceği bildirilmiştir (47).

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 (31, 60, 62–65). 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 (38, 41).

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 (59, 60, 65–67). PZR ve RLB ile minimum parazitemi değerlerinin 10^{-5} – 10^{-7} arasında olduğu durumlarda bile parazitlerin saptanabildiği bildirilmiştir. Gubbels ve ark. (1999) ise RLB yöntemi ile *Babesia* ve *Theileria* türlerini 10^{-6} parazitemi değerinde bile saptamışlardır. Bu çalışmada da *Babesia* türleri için tespit edilebilen minimum parazitemi değerinin 10^{-6} olduğu görülmüştür (38).

Çeşitli araştırmacılar tarafından Türkiye'de koyunlarda *B.ovis*' in varlığı mikroskopik ve serolojik metotlarla ortaya konmuştur. Orta Anadolu, Samsun ve Konya'da klinik belirti göstermeyen koyunlar üzerinde yapılan mikroskopik muayenede, koyunların sırası ile % 0,41, % 67,3 ve % 11,5'inde *B.ovis* tespit edilirken, Elazığ bölgesinde yapılan araştırmada etken tespit edilememiştir (16).

Afyon yöresinde koyunlarda *B.ovis*'in seroprevalansını saptamak amacıyla yapılan çalışmada ELISA ile 204 koyunun 106'sında (% 51,96) *B.ovis*'e karşı antikor tespit edilirken mikroskopik muayene ile 1'inde (% 0,49) *B.ovis* görülmüştür (20).

Klinik belirti gösteren sürülerin mikroskopik bakışında, Orta Anadolu'da koyunların %34,2'sinde, A.Ü. Veteriner Fakültesi Dahiliye Kliniğine getirilen koyunların %62,5'sinde *B. ovis* görülmüştür (5). Malatya yöresinde yapılan çalışmada klinik belirti göstermeyen 220 koyunun 4'ünde (% 1,8) mikroskopik muayene ile *B. ovis* saptanmıştır (12).

Van yöresinde IFA testi ile *B. ovis* yönünden kontrol edilen koyunların % 60,3'ünde seropozitiflik elde edilmiştir (15). Aynı araştırmada seropozitiflik oranının 6- 12 aylık kuzularda % 64,7, 1-2 yaş grubu koyunlarda % 55, 2-3 yaş grubunda % 60, 3-4 yaş grubunda % 65, ve 4 yaş üzeri grupta % 58,3 olduğu bildirilmiştir. Aynı yöntemle Samsun yöresinde % 72 (14), Ankara yöresinde % 76 (19) seropozitiflik bulunmuştur.

Türkiye'nin değişik 18 yöresinden toplanan koyun serumlarının ELİSA tekniği ile *B.ovis* yönünden incelenmesi sonucunda bölgelere göre % 28,1 ile % 80,9 arasında değişen oranlarda seropozitiflik elde edilmiş ve seropozitiflik oranının bir yaşından küçük kuzularda % 28,1 ile % 52,5 arasında değiştiği bildirilmiştir (21). Aynı teknikle Konya, Ankara ve Elazığ yöresinde sırası ile % 42,1, % 73,8 ve % 45 oranında pozitiflik belirlenmiş olup, Elazığ yöresinde yapılan çalışmada seropozitiflik oranının bir yaşından küçük kuzularda % 24,3, bir yaşından büyük koyunlarda ise % 46,7 olduğu belirtilmiştir. Malatya yöresinde ELİSA tekniği ile *B.ovis* yönünden kontrol edilen koyun serumlarının % 55,9' un da pozitiflik belirlenmiş, seropozitiflik oranının bir yaşına kadarki kuzularda % 49,2, bir yaşından büyük koyunlarda % 59 olduğu bildirilmiştir (12).

Kayseri yöresinde yapılan bir çalışmada mikroskopik muayene ile 192 koyunun 34'ünde, 47 keçinin 3'ünde ve toplam 239 küçük ruminantın 37'sinde *B. ovis* tespit edilmiş olup *B. ovis* prevalansı koyunlarda % 17,70, keçilerde ise % 6,38 bulunmuş, *B. motasi* ise tespit edilememiştir (5).

Türkiye’de ilk kez Kayseri yöresinde koyunlarda RLB ile yapılan moleküler parazitolojik çalışmada *B. ovis* varlığı % 2,6; *T. ovis* + *B. ovis* miks varlığı % 5,1 olarak tespit edilmiştir (22).

Bu çalışmada ise mikroskobik olarak toplam 300 küçük ruminantın 9’unda, *Babesia* spp. moleküler biyolojik olarak ta 4’ünde *B. ovis* ve 7’sinde *B. ovis*+*T. ovis* bulunmuştur. RLB testinde 300 kan numunesinin, catch-all probu ile 117’sinde pozitif reaksiyon vermesi sebebiyle örnekler *Theileria* spp. ve *T. ovis* problemleri ile de yoklanmıştır. Bunun sonucunda 117 catch- all pozitifliğinin, 106’sında *T. ovis*, 4’ünde *B. ovis* ve 7’sinde ise *B. ovis*+*T. ovis* türleri ile miks enfeksiyon tespit edilmiştir. *B. motasi* ve *B. crassa* ise tespit edilmemiştir. Bu bulgular daha önce bildirilenlerle uyumludur.

Sonuç olarak bu çalışmayla Kayseri’ye bağlı Yeşilhisar ilçesinde koyun ve keçilerde *B. ovis* prevalansı mikroskobik muayene yöntemine göre koyunlarda % 4, keçilerde % 1 olarak tespit edilirken RLB ile koyunlarda *B. ovis* prevalansı % 1,5, keçilerde ise % 1 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca koyunlarda % 2,5 ve keçilerde de % 2 oranında *B. ovis* + *T. ovis* miks enfeksiyonu varlığı ortaya konmuştur.

Elde edilen bu bulgular yukarıda bildirilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Diğer taraftan bu çalışmanın istatistiksel analizi yapıldığında, mikroskobik muayene ve RLB sonuçlarındaki *Piroplasma* ve Catch-all pozitifliğinin koyun ve keçiler arasındaki farklılığın istatistiksel öneme sahip olduğu ($p<0.05$), soy düzeyinde ise *Babesia* ve *Theileria* yönünden istatistiksel önemin olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bu durumun, koyun ve keçilerin meradaki davranış biçimleriyle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, Kayseri yöresinde benzeri moleküler parazitolojik kapsamlı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç olduğunu ortaya koymuştur.

6. KAYNAKLAR

1. İnci A, Çakmak A, Karaer Z, Dinçer Ş, Sayın F, İça A. Kayseri Yöresinde Sığırlarda Babesiosisin Seroprevalansı. Türk J Vet. Anim. Sci. 2002, 26:134-135
2. İça A. Sığırlarda Bazı *Babesia* Türlerinin Reverse Line Blotting ve Indirect Floresan Antikor Testi ile Karşılaştırmalı Tanısı Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara 2003
3. Boch J, Supperer R, Veterinary medizinische Parasitologie.3. Auflage,Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1983 p, 2-5
4. Karaer Z, Nalbantoğlu S. Protozoon Hastalıklarında Tedavi. Ed: Burgu A, Karaer Z. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıklarında Tedavi. İzmir, 2005 , ss 15,16.
5. İnci A, Karaer Z, İça A. Kayseri Yöresinde Koyun ve Keçilerde Babesiosis. Frat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2002, 16(1): 79-83
6. Göksu K. Yerli koyunlarımızda Babesidae ve Theileridae'lerin epizootiyolojik durumlarıyla biyolojilerine dair araştırmalar.AÜ.Vet.Fak.Yay.1976, 205
7. Güralp N, Sayın F, Tiğın Y, Tınar R. Texel merinos ve kıvırcık koyunları ile melezlerinde görülen parazit türler, bunların enfeksiyon oranları ve savaş çareleri. A.Ü.Vet.Fak. Derg. 1975, 22(1-2):1-7

8. İnci A, Yukarı BA, sayın F. Çankırı yöresinde bazı koyun ve keçi sürülerinde babesiosis ve theileriosis etkenlerinin mikroskopik kan muayenesi ile araştırılması. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 1998, 45(1):105-113
9. Kurtpınar H. Erzurum, Kars, Ağrı vilayetleri sığır, koyun, keçilerinin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurdukları hastalıklar. Türk Vet. Hek. Derg. 1956,26 (120-121): 3226-3232
10. Özcan HC, Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerine araştırmalar. AÜ.Vet.Fak.Yay.1979;143
11. Taşcı S. Van bölgesinde sığır ve koyunlarda görülen kene türleri ile bunların taşıdığı kan parazitleri arasındaki ilişkiler. A.Ü.Vet.Fak. Derg. 1989, 36(1):53-63.
12. Aktaş M, Düzgün A, Cahit B. Malatya Yöresinde Koyunlarda *B. ovis* 'in Seroprevalansı. Türk J.Vet.Anim.Sci. 2001, 25:241-243
13. Çakmak A, Dinçer Ş ve Karaer Z. Samsun Yöresinde Koyunlarda *B. ovis*'in Serodiagnozu Üzerinde Araştırmalar. A. Ü. Vet. Fak. Derg. 1991, 38(1-2):242-251.
14. Çakmak A, Dinçer Ş ve Karaer Z. Samsun Yöresinde Koyunlarda *B. ovis*' in Serodiagnozu Üzerinde Araştırmalar. A. Ü. Vet. Fak. Derg. 1991,38(1-2): 242-251
15. Değer MS. Van İlinde Koyunlarda Babesiosis'in Sero epidemiyolojisi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara 1990
16. Dumanlı N, Köroğlu E, Düzgün A, Angın M ve Küçükdem N. Elazığ Yöresinde Koyunlarda *B. ovis*' in Seroprevalansı Türk Journal of Veterinary and Animal Sciences 1997,21: 183-186
17. Özkoç Ü. Koyunlarda *B.ovis* enfeksiyonunun Indirekt Floresan Antikor Tekniği ile serolojik teşhisi üzerinde araştırma.Pendik Vet. Mikrobiol Ens.Derg, 1979;11(29): 70-83.
18. Sevinç F. Konya yöresi koyunlarında *B.ovis*' in IFAT ve ELİSA ile teşhisi. Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bil. Enst. Konya 1996
19. Yukarı BA, Çakmak A, Karaer Z, Düzgün A, Yaralı C. Ankara Yöresinde Koyunlarda *B. ovis*'in IFAT ve ELISA Yöntemleri ile Serodiagnozu. Türk Vet. Hek. Der. Derg. 1996, 67: 42-45

20. Çiçek H, Düzgün A, Emre Z, Karaer Z. Afyon Yöresinde Koyunlarda *B. ovis*'in Seroprevalansı, Türkiye XII. Ulusal Parazitoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Selçuk Üniversitesi, Konya 8-12/ Eylül 2003, ss 254
21. Düzgün A, Wring IG, Waltishbul DJ, Gale KR, Goodger DV. et al. An ELISA for the diagnosis of *Babesia ovis* infection utilising a synthetic *Babesia bovis* derived antijen Vet.Parasitol 1991 14: 44-52
22. İça A, Yıldırım A, İnci A.Kayseri yöresinde koyunlarda kan protozoonlarının Reverse Line Blotting Yöntemi ile Araştırılması. Türkiye XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi Kitabı, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir 18-25/ Eylül 2005, ss 161
23. Melhorn H, Schein E. The piroplasm life cycle and sexual stages. Advances in Parasitology. Ed: JR Baker, R.Müller Academic Press 1984 p:69-89
24. Friedhoof KT. Transmission of *Babesia* In Babesiosis of Domestic Animals and Man Ed: M. Ristic Boca Raton Florida CRC Press 1988 p: 23-52
25. Soulsby EJJ. Helminths Artropods and Protozoa of domesticated Animals. Baillere Tindall London 1986
26. Sayın F, Dumanlı N. Elazığ Bölgesinde Evcil Hayvanlarda görülen Kene Türleri ile ilgili Epizootiyolojik Araştırmalar A. Ü. Vet. Fak. Derg. 29(3-4): 344-362
27. Alkan Z, Özbel Y, Özensoy S, Atambay M. Moleküler Biyolojik Yöntemler Ed: Özcel MA, Altıntaş N.Parazit Hastalıklarında Tanı İzmir 1997 :373-411
28. Böse R, Jacobson RH, Gale KR, Waltisbuhl DJ, Wringht IG. An improved ELISA for the detection of antibodies aganist *Babesia bovis* using either anotive or a recombinant *B.bovis* antijen. Parasitol Res.1990 76:648-652
29. Sonenshine DE. Biyology of ticks,Vol II. Newyork, Oxford Üniversitesi Pres Chapter V.1993
30. Todorovic RA, Carson C A. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In ;Babesiosis Ed:Ristic M,Kreier JP Newyork Akademik Pres 1981 P:381-409
31. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine Blood. Vet. Parasitol.1993, 50:69-81

32. Comes AM, Humbert JF, Cabaret J, Elard L. Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology Vet.Res. 1996, 27:333-342
33. Sparagano O. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. J. Vet. Parasitol. 1999, 13(2):83-92
34. Arda M. Nükleik asitlerin invitro amplifikasyon yöntemleri. Temel Mikrobiyoloji Genişletilmiş 2. Baskı Medisan Yayınları Ankara 2001 58:483-493
35. Randal K, Saiki BS, Chu-an chan PD, Corey H, Levenson PD. et al. Diagnosis of sickle cell anemia and β Thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradio active allele-specific oligonucleotide probes.N. Engl. J.Med.1988, 309 (9): 537-541
36. Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schelekens JF. Simultaneous detection and genotyping of three genomic group of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and '3 S rRNA genes. J. Clin. Microbiol 1995, 33: 3091-3095
37. Kamerbeek J, Schouls L, Kalk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D. et al. Simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J.Clin.Microbiol 1997 35 (4): 907-914
38. Gubbels MJ, de VOS S, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM. et al. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using Reverse Line Blotting hybridization, J.Clin.Microbiol 1999, 37: 1782-1789
39. Ceci L, Jongejan F, Carelli G, Tass P, Sparagano O. Identification of *Theileria buffel/orientalis* and *Babesia bigemina* in adult cattle using molecular techniques and study of changes in Blood parameters. Parasitologia 1999, 41: 31-32
40. Schouls LM., Van de Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia*, *burgdorferi* sensu lato and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks J.Clin.Microbiol 1999, 37 (7): 2215-2222
41. Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S. et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridization with a note on the distribution of ticks in Sicily. Vet.Parasitol 2001,99:273-286

42. Beker C, de VOS S, Taoufik A, Sparagona O, Jongejan F. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Erlichia* species in ruminants and detection of *Erlichia ruminatum* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridisation Vet. Microbiol. 2002 89:223-238
43. Lunemann JD, Zarmes S, Priem S, Franz J, Schanderlein R. et al. Rapid typing of *Borrelia burgdoferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestation of lyme boreliosis. J.Clin.Microbiol 2001 39:1130-1133
44. Bose R, Jongensen WK, Dalgresh RS, Fredhoff KT, de Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis Vet.Parasitol 1995; 57:61-64
45. Levine ND. Veterinary Protozoology, Iowa State University Press Ames 1st Edition 1985 P: 291-312
46. Böse R, Peyman B. Diagnostic of *Babesia caballi* infections in horses by Enzym-Linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot. Int.J.parasitol 1994, 24:341-346
47. Papadopoulos B, Perie NM, Uilenberg G. *Piroplasm*s of domestic animals in the Macedonia region of Greece 1. Serological cross-reactions. Vet.Parasitol 1996 ;63: 41-56
48. Ludford CG, Hall WT.K, Sulzer AJ, Wilson M. *Babesia argentina*, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* antigenic cross reactions Exp. Parasitol 1972 24: 427-335
49. Mahoney DF. *Babesia* of domestic animals. In Parasitic Protozoa Ed: J.P.Kreier, Newyork Academic Press. 1977 p:1-52
50. Kuttler KL. Chemotherapy of Babesiosis; A review. In Babesiosis Ed: M.Ristic J.P.Kreier Newyork Academic Press 1981 p:65-85
51. Dinçer Ş. Ruminantlarda Babesiosis ve Theileriosis. Tıgем Eđitim semineri Dalaman +-8 Haziran 1990
52. Pipano E, Hadani A, Control of bovine babesiosis. In Malaria and Babesiosis, Ed: M.Ristic P. Ambroise-Thomas J. Kreier Dardrecht Boston Lancaster Mortinus Nijhoff Publishers 1984 p:263-303
53. Melhorn H. Encyclopedic reference of parasitology Diseases, treatment therapy. Berlin:Springer-Verlag 2001 p:61-71

54. Yukarı BA, Karaer Z. Babesiosis Vet.Hek.Der.Derg. 1996, 67:46-54
55. Pipano E. Live vaccines against haemoparasitic diseases in livestock Vet.parasitol 57:213-231
56. Schnittger L, Yin H, Oi B, Gubbels MJ, Beyer D et al. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res 2004,92: 189-196
57. Nagora D, Garcia Sammartin J, Garcia Perez AL, Juste RA, Hurtado A. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in sheep population from Northern Spain International Journal for parasitology 2004,34: 1059- 1067
58. Figueroa JV, Benning GM, Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. Vet.Parasitol. 1995, 75:75-92
59. Almeria S, Castella J, Ferrer D, Ortuno A, Estrada-pena A et al. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. Vet. Parasitol. 2001, 99:249-259
60. d'oliveira C, Van Der Weide M, Habella MA, Jacquet P, Jongejan F. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J.Clin.Mikrobiol 1995, 33:2665-2669
61. Anon Bovine Babesiosis. In: OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Off. Int. Epizoot., Paris 1996 p:305-312
62. Bishop R, Sohanpal B, Kariuki DP, Young AS, Nene V et al. Detection of carrier state in *Theileria parva* infected cattle by the Polymerase Chain reaction Parasitol 1992,104:215-232
63. Fahrimal Y, Goff WL, Jasmer DP. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. J.Clin.Microbiol 1992, 30 (6):1374-1379
64. Calder JAM, Reddy GR; Chieves L, Coutney CH; Littel R. et al. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. J.Clin.Microbiol 1996,34(11):2748-2755
65. Martin-Sanchez J, Viseras J, Adroher FJ, Garcia-Fernandez P. Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. Parasitol Res. 1999,85:243-245

66. Kırvar E, İlhan T, Katzer F, Hooshmand-Rad P, Zwegard E.et al. Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tam1 gene sequences. Parasitol 2000, 120:245-254
67. Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, Araz E, Haznedaroğlu T. ve ark. Sığır babesiosis'inin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi T.Parazitol Derg.2002, 26 (1):42-47

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Ankara'da doğdu. İlköğrenimini Ankara' da tamamladıktan sonra orta ve lise eğitimini Nevşehir'in Gülşehir ilçesinde yaptı. 1988 yılında kazanmış olduğu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde eğitime başladı ve 1993 yılında mezun oldu. Mezun olduktan sonra Nevşehir Tarım İl Müdürlüğünde geçici kadroyla çalışırken, 1997 yılında Iğdır İline Öğretmen olarak atandı. 1999 yılında kurumlar arası geçişle Iğdır Tarım İl Müdürlüğü' nde Veteriner Hekim olarak çalışmaya başladı. 2000 yılında Kayseri İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü' ne atandı ve halen aynı kurumda Yem Laboratuvar şefliğinde Veteriner Hekim olarak görevine devam etmektedir. Evli ve 1 çocuk annesidir.