

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIKKALE YÖRESİNDE SIĞIRLARDA *THEILERIA ANNULATA* VE
THEILERIA BUFFELI/ORIENTALIS'İN PCR-REVERSE LINE BLOTTING
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Sami GÖKPINAR
VETERİNER HEKİM**

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral AYDENİZÖZ**

2013-KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIKKALE YÖRESİNDE SIĞIRLARDA *THEILERIA ANNULATA* VE
THEILERIA BUFFELI/ORIENTALIS'İN PCR-REVERSE LINE BLOTTING
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Sami GÖKPINAR
VETERİNER HEKİM**

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral AYDENİZÖZ**

Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, 2010/2

2013-KIRIKKALE

KABUL VE ONAY

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Parazitoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/01/2013



Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı



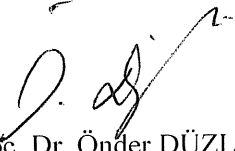
Prof. Dr. Meral AYDENİZÖZ
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Üye



Prof. Dr. Kader YILDIZ
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Üye



Prof. Dr. Oğuz KUL
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VI
Simgeler ve Kısaltmalar	IX
Şekiller	XII
Çizelgeler	XIII
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
1.1. Theileriosis'in Tanımı	5
1.2. Theileriosis'in Tarihçesi	6
1.3. Sığırlarda Bulunan <i>Theileria</i> Türleri	7
1.3.1. <i>Theileria annulata</i>	8
1.3.2. <i>Theileria sergenti/buffeli/orientalis</i>	10
1.3.3. <i>Theileria parva</i>	11
1.3.4. <i>Theileria mutans</i>	13
1.3.5. <i>Theileria velifera</i>	13
1.3.6. <i>Theileria taurotragi</i>	13
1.4. Sığırlardaki <i>Theileria</i> Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri	14
1.5. <i>Theileria</i> Türlerinin Biyolojisi	14
1.5.1. Vektör Kenelerde Gelişme	14
1.5.2. Memeli Hayvanlarda Gelişme	16
1.6. Sığırlarda <i>Theileria</i> Türlerinin Patogenezi ve Klinik Belirtiler	17
1.7. <i>Theileria</i> Enfeksiyonlarında Sığırlarda Kan Tablosunda Meydana Gelen Değişiklikler	20
1.8. Nekropsi Bulguları	21

1.9. <i>Theileria</i> Türlerinde Epidemiyoloji	21
1.10. Türkiye Sığırlarında Theileriosis	23
1.11. Dünya Sığırlarında Theileriosis	27
1.12. Sığırlarda <i>Theileria</i> Enfeksiyonlarında İmmunite	29
1.13. Theileriosis'in Teşhisi	31
1.13.1. Parazitin Direkt Tespit Edilmesi	31
1.13.2. Mikroskopik Muayene	31
1.13.3. Serolojik Teşhis	32
1.13.4. Moleküler Teknikler	34
1.13.4.1. Reverse Line Blotting (RLB)	34
1.14. Theileriosis Tedavisi	37
1.15. Theileriosis'te Korunma ve Kontrol	38
1.15.1. Vektör Kenelerle Mücadele	38
1.15.2. Dirençli Irkların Kullanılması	39
1.15.3. Theileriosis'te Aşılama	40
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Örnek Alınacak Hayvan Sayısının Belirlenmesi	47
2.2. Saha Çalışmaları	47
2.2.1. Numunelerin Toplanması	48
2.2.2. Frotilerin Hazırlanması	50
2.4. Laboratuvar Çalışmaları	50
2.4.1. Yayma Kan Frotilerinin Boyanması	50
2.4.2. DNA Ekstraksiyonu	51
2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	53
2.4.3.1. Primer Seçimi	53
2.4.3.2. Pozitif ve Negatif Kontrol	54
2.4.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Karışımı ve Amplifikasyon Koşulları	54
2.4.3.4. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	55
2.4.4. Reverse Line Hibridizasyon Yöntemi	56
2.4.4.1. RLB Membranının Hazırlanması	57
2.4.4.2. Reverse Line Hibridizasyonu	58

2.4.4.3. RLB Ürünlerinin İncelenmesi ve Tür tayini	59
2.4.4.4. Membranın Temizlenmesi ve Saklanması	59
2.4.4.6. Gereç ve Yöntemde Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasallar	59
2. 5. İstatistiksel Değerlendirme	62
3. BULGULAR	63
3.1. Verilerin Dağılım Sıklığı	63
3.2. Mikroskobik Muayene Sonuçları	64
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları	68
3.4. Reverse Line Blotting Sonuçları	70
4.TARTIŞMAVE SONUÇ	75
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	105

ÖNSÖZ

Kene kaynaklı hastalıklar tropikal ve subtropikal bölgeler başta olmak üzere dünyanın hemen hemen her bölgesinde görülmekte ve hayvancılık ekonomisine zarar vermektedir. *Ixodidae* ailesine bağlı kene türleri tarafından çeşitli hayvan türlerine nakledilen theileriosis, sığır yetiştiriciliğine önemli derecede zarar veren zorunlu hücre içi parazitlerden *Theileria* türlerinin sebep olduğu protozoer bir hastalıktır. Hastalık başta sığırlar olmak üzere koyun, keçi ve diğer evcil ve yabani ruminantlarda görülebilmektedir. Sığırlarda patojen olan türler *T.annulata* ve *T.parva*'dır. Ülkemiz sığırlarında yaygın olarak bulunan *T.annulata* Tropikal theileriosise neden olmakta ve ülkemiz sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Sığırların apatojen *Theileria* türlerinden biri olarak kabul edilen *T.buffeli/orientalis*, Amerika, Uzak doğu, Avrupa ve Afrika'nın tüm bölgeleri başta olmak üzere hemen hemen tüm dünyadan bildirilmiştir. Normalde apatojen olan bu tür başka bir etkenle birlikte bulunduğu patojen olabilmektedir.

Theileria türlerinin teşhisi klinik bulgular eşliğinde kan frotilerinin ve lenf yumrusu biyopsilerinin Giemsa ile boyanmış preparatlarının mikroskopik bakışı ile yapılmaktadır. Mikroskopik bakı ile *Theileria* türleri arasında ayırım yapmak imkansızdır. Bu nedenle etkene karşı konakta gelişen antikorları ortaya koymayı amaçlayan serolojik yöntemler kullanılmakta, ancak bu yöntemlerde farklı *Theileria* türleri arasında çapraz reaksiyon oluşumu görülmektedir. Bütün bu olumsuzluklar *Theileria* türlerinin teşhisinde moleküler tekniklerin kullanılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Ülkemizde *Theileria* hemen hemen her bölgede sığırlarda bulunmakta ve ülkemiz büyükbaş yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Öneminden dolayı ülkemizde yıllardan beri üzerinde sürekli çalışılan sığır theileriosis'inde akut hasta hayvanlar yanında sağlıklı görümlü hayvanlar üzerinde de mikroskopik, serolojik ve moleküler çalışma yapılarak ülkemizde sığır theileriosisinden sorumlu türlerin tespiti, yaygınlığının belirlenmesi ve portör hayvanların ortaya konması amaçlanmıştır. Bu çalışmalar kapsamında ülkemizde Tropikal theileriosis etkeni *T.annulata* ve apatojen bir tür kabul edilen *T.buffeli/orientalis*'in varlığı ortaya konmuştur.

Bu tez kapsamında Kırıkkale yöresinde *T.annulata* ve *T.buffeli/orientalis*'in bölge sığırlarında varlığı araştırılmıştır. Araştırmanın amacı bölgemizdeki *Theileria* türlerinin ortaya konması, bölgedeki yaygınlıklarının belirlenmesi ve sağlıklı görünümlü hayvanlarda bu etkenlerin varlığının tespiti ile bölgedeki epidemiyolojinin ortaya konmasıdır.

Doktora eğitimim süresince yetişmemde büyük katkıları ve emekleri olan, bilimsel etiği öğreten, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tezimin hazırlanmasında bana yol gösterip, yardımlarını esirgemeyen, doktora eğitiminin sadece bilimsel çalışma etiği değil, aynı zamanda hayatta karşılaşılabilecek sorunlarla mücadele etmenin yollarını da öğrettiğini, öğrenmenin ve bilmenin gelecek için en iyi birikim olduğunu bana öğrettiği için tez danışmanım Hocam Prof. Dr. Meral AYDENİZÖZ'e;

Bilimsel alanda çaba ve azmini örnek aldığım, doktora eğitimim süresince beni her zaman yönlendiren, her zaman desteğini gördüğüm Hocam Prof. Dr. Kader YILDIZ'a;

RLB tekniğini öğrenmem de bana yardımını esirgemeyen, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ ve Öğretim Görevlisi Zuhal BİŞKİN'e, laboratuvarlarını kullanmama müsaade eden Prof. Dr. Abdullah İNCİ, Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM'a ve birimin tüm üyelerine; Etkenlerin pozitif kontrollerini temin etmemde yardımlarını esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ'e; Moleküler çalışmalar sırasında yardımını esirgemeyen Viroloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Veteriner Hekim Muhammed Eren ARSLAN'a; Saha çalışmalarında ilk günden son güne kadar hep yanımda olan ve yardımını esirgemeyen Veteriner Hekim Dursun ERKOL ve emeği geçen bütün öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

En zor anlarımda dahi yanımda olan, her konuda desteğini aldığım, beni sürekli teşvik eden ve cesaretlendiren nişanlım Ezgi DEMİRCİ'ye; Çocukluğumdan beri hep yanımda olan, anne ve babamın yokluğunu hiç hissettirmeyen, beni daima savunan ve destekleyen, bugünlere gelmemde büyük rol oynayan, hayatı, sevgiyi,

saygıyı öğreten başta abim Aydın GÖKPINAR'a, canımdan çok sevdiğim tüm abla ve abilerime sevgi ve emekleri için tüm kalbimle teşekkür ediyorum. İyi ki varsınız, iyi ki yanımdasınız.

Tez projemi maddi yönden destekleyen Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR


bp	Baz çifti
°C	Derece Celcius
CFT	Komplement Fiksasyon testi
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksinükleotriposfat
dN/dS	Ortolog Genler Arasında Sinonim ve Sinonim Olmayan Değişimlerin Oranı
ECL	Chemiluminescent Detection Agent
EDAC	1-etil-3 dimetilaminopropil karbodimin
EDTA	Etilendiamintetra-asetik asit
ELISA	Enzym Linked Immunosorbant Assay
g	Gram
HCL	Hidroklorik asit
IFAT	İndirek Floresan Antikor Testi
IFN-γ	Interferon gama
IL-2	Interleukin 2
ISA	Improved Serum Antibody
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
lt	Litre
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür

ml	Mililitre
mM	Milimolar
MPSA	<i>Theileria sergenti</i> merozoit/piroplasma yüzey antijeni
NaHCO ₃	Sodyum Hidrojen Karbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NK	Natural Killer Cell
PCR	Poylmerase Chain Reaction
PGVGV	Elastin reseptör ligantı
pH	Potansiyel Hidrojen
pmol	Pikomol
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik asit
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RLB	Reverse Line Blotting
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
spp.	Species (Türler)
SPAG-1	<i>Theileria</i> sporozoit yüzey antijeni
SSPE	Standart Sodyumfosfat EDTA
Ssu rRNA	Small Subunit Ribosomal RNA
\$	Amerikan Doları
TaD	<i>Theileria annulata</i> şizont yüzey antijeni
TAE	Tris-acetate- EDTA
Tams-1	<i>Theileria annulata</i> merozoit/piroplasma yüzey antijeni
TaMS1	<i>Theileria annulata</i> merozoit yüzey proteini
TaSP	<i>Theileria annulata</i> yüzey proteini

TaSE	<i>Theileria annulata</i> şizont proteini
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Th1	T-Helper 1
ThO	T-Helper O hücresi
TNF α	Tümör nekrozis faktör alfa
TpMS1	<i>Theileria parva</i> merozoit yüzey proteini
VGVAPG	Elastin reseptör ligantı

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1	<i>Theileria annulata</i> piroplasma (oklar)	9
Şekil 1.2	<i>Theileria annulata</i> şizont formu (oklar)	9
Şekil 1.3	<i>Theileria buffeli/orientalis</i> piroplasmaları (oklar)	11
Şekil 1.4	<i>Theileria parva</i> piroplasma (oklar)	12
Şekil 1.5	<i>Theileria parva</i> şizont formu (oklar)	12
Şekil 1.6	<i>Theileria annulata</i> yaşam çemberi	16
Şekil 1.7	Sığırların önemli <i>Theileria</i> türlerinin dağılımı	21
Şekil 1.8	Türkiye'de sığırlarda <i>Theileria</i> türlerinin belirlendiği iller  ■ <i>Theileria</i> türlerinin belirlendiği iller ■ <i>Theileria</i> türlerinin bulunmadığı ve/veya bakılmadığı iller ■ Çalışmanın yapıldığı Kırıkkale ili	27
Şekil 1.9	Hibridizasyon prensibinin şematik olarak gösterilmesi	35
Şekil 1.10	RLB testinin şematik görüntüsü	35
Şekil 2.1	Çalışma kapsamında kan örneklerinin alındığı odaklar ve alınan örnek sayısı	48
Şekil 2.2	Froti hazırlanması amacıyla kulak ucundan kan alma	50
Şekil 2.3	Kan frotilerinin Giemsa boyası ile boyanması	51
Şekil 3.1	<i>Theileria</i> spp. piroplasmaları (oklar)	65
Şekil 3.2	İlçelere göre <i>Theileria</i> spp. yönünden pozitif hayvan sayısı ve oranı	66
Şekil 3.3	Cinsiyete göre mikroskopik bakıda pozitif hayvanların oranı	66
Şekil 3.4	Mikroskopik bakıya göre pozitif örneklerin yaşa göre dağılımı	67
Şekil 3.5	Mikroskopik bakıda pozitif örneklerin ırklara göre dağılımı	68
Şekil 3.6	Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü (Ta+ : <i>T.annulata</i> Pozitif Kontrol, Tb+ : <i>Theileria buffeli</i> Pozitif kontrol, NK : Negatif kontrol, T1-T9 : İncelenen örneklerin bazıları)	69
Şekil 3.7	RLB membran görüntüsü (*: <i>T.buffeli/orientalis</i> pozitif kontrol, #: <i>T.annulata</i> pozitif kontrol)	70

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 1.1	<i>Theileria</i> türleri, vektörleri, konakları ve dağılımı	5
Çizelge 1.2	Sığırlardaki <i>Theileria</i> türleri, vektör, konak, oluşturdukları hastalık ve coğrafi dağılımı	7
Çizelge 2.1	Çalışma kapsamında örnek alınan ilçe, çiftlik, toplam hayvan sayısı ve örnek sayısı	47
Çizelge 2.2	Örnek alınan sığırların yaş ve cinsiyetine göre oranları	49
Çizelge 2.3	Örnek alınan hayvanların ırklara göre dağılımı	49
Çizelge 2.4	PCR reaksiyon sıvısında kullanılan malzemeler ve miktarları	54
Çizelge 2.5	PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar	55
Çizelge 2.6	RLB testinde kullanılan aminolinkerli problemlerin 5'-3' dizilişi	56
Çizelge 3.1	Merkezlere göre verilerin dağılım sıklığı	63
Çizelge 3.2	İrklara göre verilerin dağılım sıklığı	63
Çizelge 3.3	Cinsiyete göre verilerin dağılım sıklığı	64
Çizelge 3.4	Yaşa göre verilerin dağılım sıklığı	64
Çizelge 3.5	İlçelere göre PCR'da pozitif hayvan sayısı	68
Çizelge 3.6	RLB ile belirlenen pozitiflik oranlarının ilçelere göre karşılaştırılması	71
Çizelge 3.7	RLB sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı	71
Çizelge 3.8	RLB sonucu pozitif örneklerin yaşa göre dağılımı	72
Çizelge 3.9	RLB sonucu pozitif örneklerin ırklara göre dağılımı	72
Çizelge 3.10	Mikroskopik bakı, PCR ve RLB sonuçlarının karşılaştırılması	73
Çizelge 3.11	Mikroskopik bakı, PCR ve RLB sonuçlarının ilçelere göre dağılımı	73

ÖZET

Theileria türleri başta sığırlar olmak üzere çeşitli evcil ve yabani ruminantlara *Ixodidae* ailesine bağlı kene türleri ile nakledilen zorunlu hücre içi parazitlerdir. Sığırlarda bu türlerden *T.annulata*, *T.parva*, *T.buffeli/orientalis*, *T.mutans*, *T.taurotragi* ve *T.velifera* enfeksiyon oluşturur. *T.annulata* ve *T.parva* en patojen iki türdür. Türkiye'de bu türlerden Tropikal theileriosis etkeni olan, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip *T.annulata*, düşük patojeniteli veya apatojen bir tür olarak kabul edilen *T.buffeli/orientalis* varlığı bildirilmiştir. *Theileria annulata* ülkemizde hemen hemen her bölgede bulunmakta ve ülkemiz hayvancılığında önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. *T.buffeli/orientalis* ise ülkemizde moleküler çalışmaların başlamasıyla birlikte varlığı belirlenmiş olan bir türdür.

Theileriosis teşhisi akut olgularda klinik belirtiler ışığında Giemsa ile boyanmış kan ve lenf yumrusu frotilerinin mikroskopik bakışı ile yapılmaktadır. Latent seyreden enfeksiyonların tanısında uzun yıllar serolojik yöntemlerden yararlanılmıştır. Direkt parazit DNA'sını saptamaya yarayan moleküler metodların gelişmeye başlamasıyla birlikte bu etkenlerin varlığı, tür teşhisi ve yaygınlığının ortaya konmasında bu yöntemlere başvurulmuştur. Son yıllarda bir defada kanda bulunan tüm kan parazitlerini teşhis etmeyi sağlayan, PCR ile hibridizasyonun birlikte kullanıldığı reverse line blotting (RLB) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır.

Bu tezde RLB yöntemi kullanılarak Kırıkkale yöresinde sığırlarda, daha önce ülkemizin çeşitli bölgelerinde tespit edilen *T.annulata* ve *T.buffeli/orientalis*'in varlığının ve yaygınlığının araştırılması ve yöntemin mikroskopik muayene ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Örnekler Mayıs 2010-Ekim 2010 tarihleri arasında Kırıkkale'nin 9 ilçesinden (Kırıkkale Merkez, Bahşılı, Balışeyh, Çelebi, Delice, Karakeçili, Keskin, Sulakyurt ve Yahşihan) 294 sığırdan toplanmıştır. Ulaşılan her hayvandan kulak ucundan alınan kandan yayma kan frotisi hazırlanıp, vena jugularis'ten EDTA'lı tüplere kan alınmıştır. Örnek alınan hayvanların 1 yaş üzerinde olması ve en az 1 mera sezonunu geçirmiş olmasına dikkat edilmiştir. Yayma kan frotileri Giemsa ile boyanarak ışık mikroskobu altında *Theileria* spp. piroplasmalarının varlığı yönünden muayene edilmiştir. Pozitif bulunan örnekler

fotoğraflanmıştır. EDTA'lı tüplere alınan kanlardan DNA ekstraksiyonu yapılarak RLB işleminde kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda mikroskopik bakıda 294 örneğin 44 tanesinde (%15) *Theileria* spp. piroplazmaları, RLB'de ise 77 tanesinde (%26.1) *T.annulata* saptanmıştır. Alınan örneklerin hiç birinde *T.buffeli/orientalis* tespit edilmemiştir. *Theileria* spp. ve *T.annulata*'nın en yaygın olduğu ilçe Keskin ilçesi olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma Kırıkkale'de *Theileria* türlerinin varlığı ve yaygınlığının belirlendiği ilk çalışmadır. Çalışma sonunda, bölge sığırlarında *T.annulata* türünün var olduğu, *T.buffeli/orientalis*'in ise bulunmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Kırıkkale, mikroskopik bakı, RLB, *Theileria annulata*, *Theileria buffeli/orientalis*, yaygınlık

SUMMARY

Theileria species are obligate intracellular parasites of various wild and domestic ruminants, especially cattle, and are transferred by species of ticks under *Ixodidae* family. Among these species, *T.annulata* and *T.parva* being the most pathogenic, *T.buffeli/orientalis*, *T.mutans*, *T.taurotragi* and *T.velifera* are infectious for cattle. *T.annulata*, the cause of Tropical theileriosis with a high morbidity and mortality rate and a low pathogenic or an apathogenic species *T.buffeli/orientalis* have been reported from Turkey. While *T.annulata* is found throughout Turkey and has long been associated with economical losses in animal husbandry, *T.buffeli/orientalis* was only recognized with introduction of molecular techniques.

In acute cases, with the light of clinical signs diagnosis of theileriosis is done with microscopic inspection of either Giemsa stained blood or lymph smears while in latent cases, serological methods has long been used. With development of techniques that directly targets the DNA of the parasite, molecular methods have been being used for determination of prevalence, identification and presence of these species. Lately, reverse line blotting (RLB) that consists of a PCR and hybridization step and is capable of detecting all blood parasites at once has been introduced.

In this thesis, determination of prevalence and presence of *T.annulata* and *T.buffeli/orientalis* species, that were previously been reported from various parts of Turkey, in cattle from Kirikkale province, using RLB and its comparison to microscopic inspection was aimed. Samples were collected between May-October 2010 from 294 cattle in 9 districts of Kirikkale (Center, Bahsili, Baliseyh, Celebi, Delice, Karakecili, Keskin, Sulakyurt and Yahsihan). From each cattle that is over one year old of age and has at least been once in grazing season, a blood smear from ear tip peripheral blood was prepared and a venal blood sample from vena jugularis was drawn into tubes with EDTA. Blood smears were inspected and documented for the presence of *Theileria* spp. piroplasms after Giemsa staining. Venal blood samples were used for extraction of DNA for RLB.

From 294 samples taken into analysis, a total of 44 (15%) *Theileria* spp. piroplasms were found with microscopic inspection while 77 (26.1%) harbored *T.annulata* as determined by RLB. None of samples harbored *T.buffeli/orientalis*. Keskin district showed the highest prevalence for *Theileria* spp. and *T.annulata*.

This is the first study that shows the prevalence and presence of *Theileria* species in Kirikkale and it was determined that while *T.annulata* is present in the cattle of the province *T.buffeli/orientalis* is not.

Keywords: Kirikkale, microscopic inspection, prevalence, RLB, *Theileria annulata*, *Theileria buffeli/orientalis*

1. GİRİŞ

1.1. Theileriosis'in Tanımı

Theileriosis, çeşitli hayvan türlerinde *Ixodidae* ailesine bağlı keneler tarafından nakledilen, zorunlu hücre içi parazitlerden *Theileria* türlerinin sebep olduğu protozoer bir hastalıktır. Hastalık tropikal ve subtropikal iklim kuşağında yaygın olarak görülür ve sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olur (Neitz 1957). *Theileridae* ailesinde yer alan türler sığır, koyun, keçi ve çeşitli evcil ve yabani ruminantları enfekte eder. Oluşturdukları hastalıklar da farklı isimlerle adlandırılmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. *Theileria* türleri, vektörleri, konakları ve dağılımı (Aktaş ve Dumanlı 2010)

Tür	Vektör	Konak	Oluşturduğu hastalık	Dağılım
<i>Theileria parva parva</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Sığır, manda	Doğu sahil humması	Afrika
<i>T.parva lawrenci</i>	<i>R.appendiculatus</i> <i>Rhipicephalus</i> spp.	Sığır, manda	Koridor Hastalığı	Afrika
<i>T.annulata</i>	<i>Hyalomma</i> spp.	Sığır, su mandası	Tropikal theileriosis	Asya, Kuzey Avrupa, Afrika, Türkiye
<i>T. mutans</i>	<i>Ambylomma</i> spp.	Sığır, manda	İyi huylu afrikan theileriosis	Afrika
<i>T.velifera</i>	<i>Ambylomma</i> spp.	Sığır, manda	-	Afrika
<i>T.taurotragi</i>	<i>R.appendiculatus</i> <i>Rhipicephalus</i> spp.	Sığır	İyi huylu afrikan theileriosis	Afrika
<i>T.sergenti</i> (<i>T.orientalis</i>)	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Sığır, manda	Oriental theileriosis	Asya, Kuzey Afrika, Türkiye, Avrupa, Avustralya
<i>T.orientalis</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Sığır	Asian theileriosis	Japonya, Güney ve Doğu Asya
<i>T.hicri</i> (<i>lestoguardi</i>)	<i>Hyalomma</i> spp. <i>H.impeltatum</i>	Koyun, keçi	Kötü huylu koyun ve keçi theileriosisi	Güney Avrupa, Asya, Afrika
<i>T.ovis</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Hyalomma</i> spp.	Koyun	-	Afrika, Avrupa, Türkiye
<i>T.separata</i>	<i>R. evertsi</i> <i>Rhipicephalus</i> spp.	Koyun	-	Afrika
<i>T.equi</i> (<i>Babesia equi</i>)	<i>Dermacentor</i> spp. <i>Hyalomma</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp.	At, eşek, katır	At theileriosisi	Güney Avrupa, Afrika, Asya, Amerika, Türkiye

1.2. Theileriosis'in Tarihçesi

Theileria etkenleri ilk defa ünlü Alman Mikrobiyolog Robert Koch tarafından 1897 yılında, Doğu Afrika'da Dar es Salaam bölgesindeki sığırların eritrositlerinde Giemsa boyama ile tespit edilmiştir. Koch bu sığırlarda *Babesia*'nın küçük ve büyük formlarının aynı anda var olduğunu açıklamıştır. 1901 yılında Güney Afrika'daki Doğu sahil humması salgınlarında geniş bir çalışma olanağı bulmuştur. Uzun süreli periyotta Koch '**mavi cisimcikler**' olarak bilinen lenfoid hücre içi aşama olan şizontları tanımlamıştır. 1904 yılında Doğu sahil humması etkeni, Theiler tarafından *Piroplasma parvum* olarak adlandırılmıştır. Bu isim 1907 yılında Bettencourt, França ve Borges tarafından *Theileria parva* olarak değiştirilmiştir. Yine 1904 yılında Dschunkowsky ve Luhs etkenlerin çoğunun yuvarlak olması nedeniyle *Piroplasma annulatum* olarak tanımladıkları diğerlerinden tamamen farklı bir coğrafyada görülen ve sığırlardaki diğer etkenlere tarif olarak uyan yeni bir tür tanımlamışlardır (Norval ve ark. 1992). Norval ve ark. (1992)'na göre Bettencourt ve ark. (1907) *P.annulatum*'u, *P.bigeminum* ile karşılaştırdıklarında, iç organlarda *P.annulatum* şizontlarına rastlanmasına rağmen, *P.bigeminum*'da şizont görülmediğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar *P.annulatum* adı verilen bu küçük organizmaları da *Theileria* adını verdikleri bir soy içine almışlardır. Daha sonra bu etkenlerin iç organlardaki gelişme şekilleri ve diğer piroplasmalar ile arasındaki farklar belirlenerek, 1918'de *Theileridae* ailesi şekillendirilmiştir (Norval ve ark. 1992).

Uilenberg (1981)'e göre, *Theileria sergenti* 1930 yılında Yakimoff ve Dekhtereff tarafından Sibiry'a'nın doğusunda Vladivostok bölgesinde sığırlarda tanımlanmıştır. Bulunan etken *Gonderia (Theileria) sergenti* olarak adlandırılmış ve klinik theileriosis nedeni olarak düşünülmüştür (Fujisaki 1992). 1931 yılında Yakimoff ve Saudatschenkoff tarafından Sibiry'a'nın Primorye bölgesinde ikinci bir sığır *Theileria* türü belirlenmiş ve bu *Gonderia (Theileria) orientalis* olarak adlandırılmıştır. Üçüncü tür olan *Theileria buffeli* ise ilk defa 1908 yılında Schein tarafından Vietnam'da Asya Su buffalolarında (*Bubalis bubalis*) tespit edilmiştir (Fujisaki 1992).

1.3. Sığırlarda Bulunan *Theileria* Türleri

Sığırlarda *T.parva*, *T.annulata*, *T.mutans*, *T.taurotragi*, *T.velifera*, *T.sergenti/buffeli/orientalis* olmak üzere altı *Theileria* türü bulunmaktadır. Tropikal theileriosis etkeni olan *T.annulata* ve Doğu sahil humması etkeni olan *T.parva* en patojen iki tür olup, sığırlarda lenfoproliferatif karakterde, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden hastalıklara sebep olurlar. Bu iki tür dışında kalan türler daha az patojen veya apatojen türler olarak tanımlanmaktadır. *Theileria mutans* çoğu araştırmacı tarafından apatojen (Mimioğlu ve ark. 1969, Sayın 1985), bazı araştırmacılar tarafından ise patojen bir tür olarak nitelendirilmektedir (Young ve ark. 1978). Geyik ve antiloplarda bulunan *T.taurotragi*'nin sığırlarda düşük patojeniteye sahip olduğu, manda ve sığırlarda bulunan *T.velifera*'nın ise apatojen bir tür olduğu belirtilmektedir (Uilenberg 1981). İyi huylu theileriosis etkeni olarak kabul edilen *T.sergenti/buffeli/orientalis* grubu parazitlerin patojenitesi, taksonomi ve nomenklatördeki yerleri konusunda tam bir görüş birliği sağlanamamakla birlikte non-transformik *Theileria* türleri olarak sınıflandırılmışlardır (Chansiri ve ark. 1999, Kawazu ve ark. 1999, Sugimoto ve Fujisaki 2002, Altay ve Aktaş 2004).

Sığırlarda bulunan *Theileria* türleri, vektörleri, konak, oluşturdukları hastalık ve coğrafi dağılımı Çizelge 1.2'de verilmiştir.

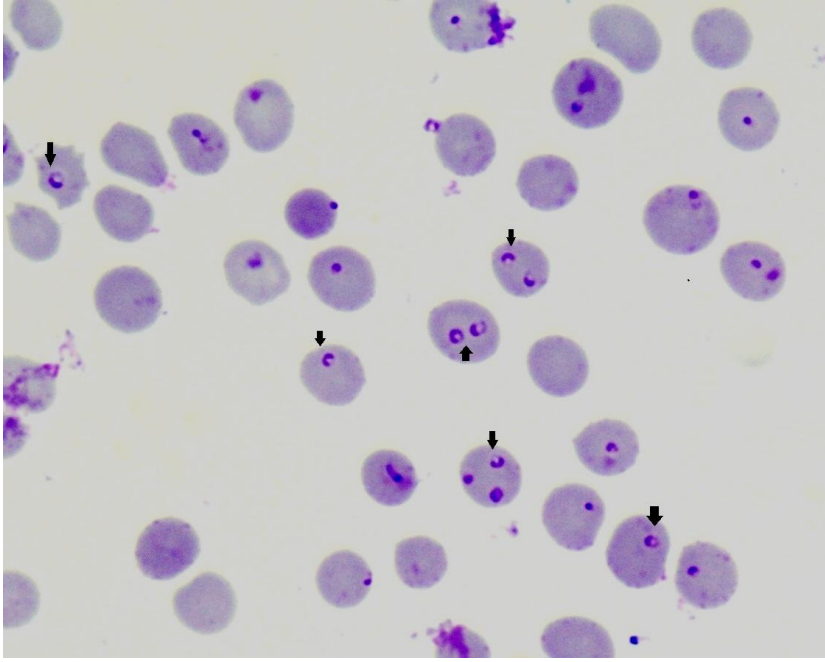
Çizelge 1.2. Sığırlardaki *Theileria* türleri, vektör, konak, oluşturdukları hastalık ve coğrafi dağılımı (Uilenberg 1981)

Tür	Vektör kene türleri	Konakları	Oluşturduğu hastalık	Coğrafi dağılımı
<i>T.parva parva</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Sığır, manda	Doğu sahil Humması	Afrika
<i>T.parva lawrenci</i>	<i>R. appendiculatus</i> <i>Rhipicephalus</i> spp.	Sığır, manda	Koridor Hastalığı	Afrika
<i>T. annulata</i>	<i>Hyalomma</i> spp.	Sığır, su mandası	Tropikal theileriosis	Asya, Afrika, Kuzey Avrupa, Türkiye
<i>T.mutans</i>	<i>Ambylomma</i> spp.	Sığır, manda	İyi huylu afrikan theileriosis	Afrika
<i>T.velifera</i>	<i>Ambylomma</i> spp.	Sığır, manda	Patojen değil	Afrika
<i>T.taurotragi</i>	<i>R.appendiculatus</i> <i>Rhipicephalus</i> spp.	Sığır	İyi huylu afrikan theileriosis	Afrika
<i>T.sergenti</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Sığır, manda	Oriental theileriosis	Asya, Avrupa, Avustralya, Kuzey Afrika, Türkiye
<i>T.orientalis</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Sığır	Asian theileriosis	Japonya, Güney ve Doğu Asya

1.3.1. *Theileria annulata*

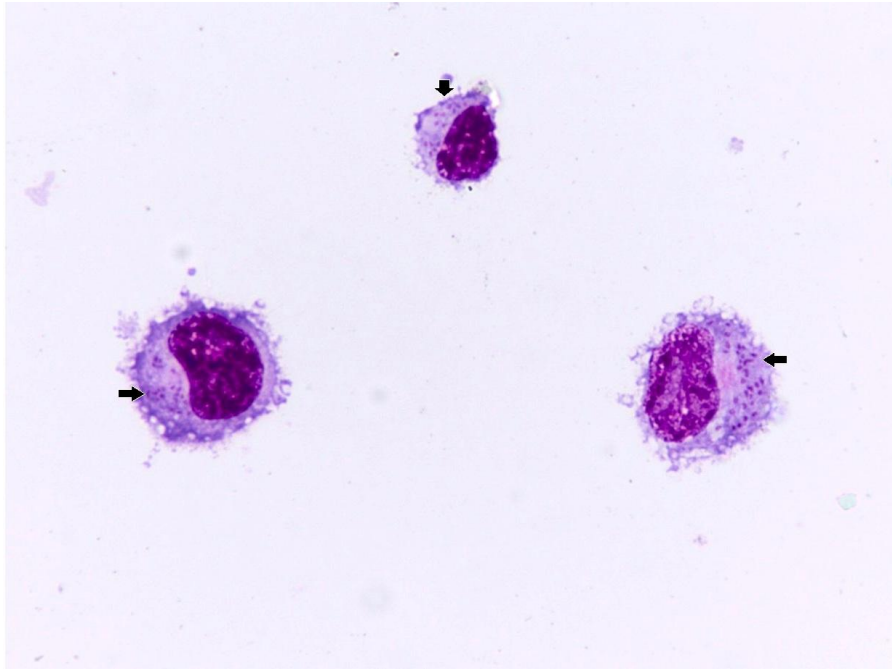
Sığırların önemli hücre içi parazitlerinden biri olan *T.annulata*, *Hyalomma* cinsine bağlı kene türleriyle nakledilmektedir. Etken tarafından sığırlarda oluşturulan Tropikal theileriosis, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden bir enfeksiyondur. Hastalık ülkemizde hemen her bölgede bulunmakta ve sığır yetiştiriciliği için önemli bir risk oluşturmaktadır (Aktaş ve ark. 2006, Altay ve ark. 2007b). Hastalığa kültür ırkı sığırlar, yerli ırk sığırlara oranla daha duyarlıdır. Hastalık özellikle verimi yüksek olan hayvanlarda verim kayıplarına ve ölümlere neden olmaktadır. Hastalığın klinik belirtileri, konak duyarlılığı ve yaşı ile etkenin patojenitesine göre değişiklik göstermektedir (Kızıl ve ark. 2007).

Theileria annulata piroplasmalarının şekil ve boyutları birbirinden farklıdır. Bu formların %70-80'i oval, yuvarlak veya yüzük şeklindedir. Geri kalan %20-30'luk bölümün çoğu toplu iğne veya virgül şeklinde, az bir kısmı da anaplazmoid şekillidir (Şekil 1.1). Oval olanlar $2 \times 0.6 \mu\text{m}$, virgül veya toplu iğne şeklinde olanlar $1.2-1.6 \times 0.5 \mu\text{m}$ boyutunda iken, yuvarlak olanlar $0.5-2.7 \mu\text{m}$ ve anaplazmoid etkenler $0.5 \mu\text{m}$ çapındadır. Eritrositlerin içerisinde bir veya birkaç (maksimum 8 adet) etkenin bulunabileceği bildirilmiştir (Neitz 1957, Uilenberg 1981, Soulsby 1982, Kaufmann 1996).



Şekil 1.1. *Theileria annulata* piroplasma (oklar)
(Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Orijinal)

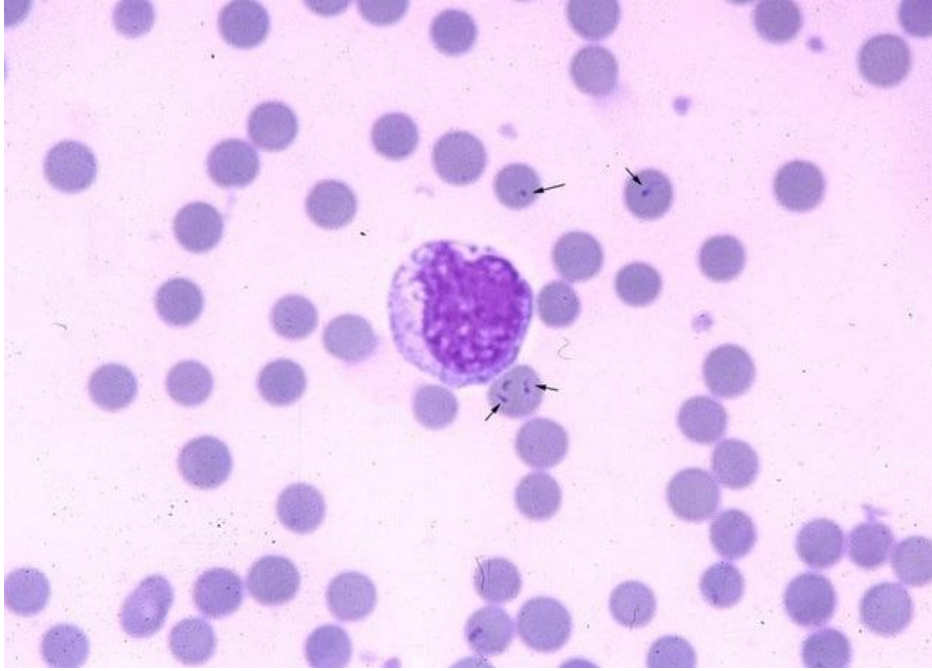
Lenf yumruları ve dalak lenfositlerinde yer alan şizontlar 8 μ m veya daha büyük çapta olabilmektedir (Şekil 1.2) (Kaufmann 1996).



Şekil 1.2. *Theileria annulata* şizont formu (oklar)
(Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Orijinal)

1.3.2. *Theileria sergenti/buffeli/orientalis*

Theileria sergenti/buffeli/orientalis grubundaki parazitler kene ile bulaşan, tüm dünyada hayvanlarda theileriosis'e sebep olan hücre içi apicomplexan parazitlerdir (Şekil 1.3) (Jang ve ark. 2004). Bu gruptaki parazitler Amerika, Uzak doğu, Avrupa ve Afrika'nın hemen hemen tüm bölgelerinden bildirilmiştir (Stewart ve ark. 1996, Sugimoto ve Fujisaki 2002). Bu türler Asya'da öncelikli olarak *Haemaphysalis* türlerine bağlı keneler tarafından nakledilmektedir. Bunun yanında Çin'de *Dermacentor* ve *Amblyomma* cinslerine bağlı kene türlerinden (Sugimoto ve Fujisaki 2002), Japonya'da *I.persulcatus* ve *I.ovatus*'tan da izole edilmiştir (Yokoyama ve ark. 2012). Bu türlerin yaşam çemberi, lökositlerde şizont gelişmemesi ve bunun sonucunda transforme olmaması ve ölümcül lenfoproliferasyon şekillenmemesi dışında diğer *Theileria* türlerine benzemektedir. Patogenezde rol oynamayan şizontlar, bazen geçici olarak lenf nodülleri, dalak ve karaciğerde bulunmaktadır. Bu türlerin patojeniteleri apatojenden orta derecede patojene kadar değişir. İyi huylu theileriosis'e sebep olan bu türler benzer özelliklere sahiptir ve etkenlerin isimlendirilmesinde çoğu kez buldukları coğrafi bölge, makroşizont bulunup bulunmadığı, konak spesifikliği ve vektör kene gibi kriterler göz önüne alınmaktadır (Sugimoto ve Fujisaki 2002). Bu etkenler Avrupa'da *T.orientalis*, Avustralya'da *T.buffeli* ve Japonya'da *T.sergenti* olarak adlandırılmaktadır. Altay ve Aktaş (2004) Levine'e atfen *T.sergenti*'nin klinik olarak *T.buffeli* ve *T.orientalis*'ten farklı bir tür olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacılar Uilenberg'e atfen morfolojik ve serolojik özellikleri dikkate alarak bu üç türün aynı olduğunu ve *T.orientalis* olarak adlandırılmasını önermiş, fakat bazı araştırmacılar *T.buffeli* ile *T.orientalis*'in aynı tür olduğunu, *T.sergenti*'nin ayrı bir tür olduğunu ifade etmişlerdir. Callow ve ark. (1976) iyi huylu theileriosis etkenlerinin mandalardan sığırlara geçtiğini bildirmiş ve *T.buffeli* olarak adlandırmışlardır. Aynı etken Çin ve Hindistan'da yapılan çalışmalarda sığırlara aktarılamamıştır. Bu nedenle Avustralya'daki türün farklı olduğu düşünülmüştür. *Theileria orientalis* sığırlarda, *T.buffeli* ise mandalarda bulunduğu için Çin ve Hindistan'da manda kökenli etkenler *T.buffeli* olarak, diğer türler *T.orientalis* olarak adlandırılmaktadır (Stewart ve ark. 1996).

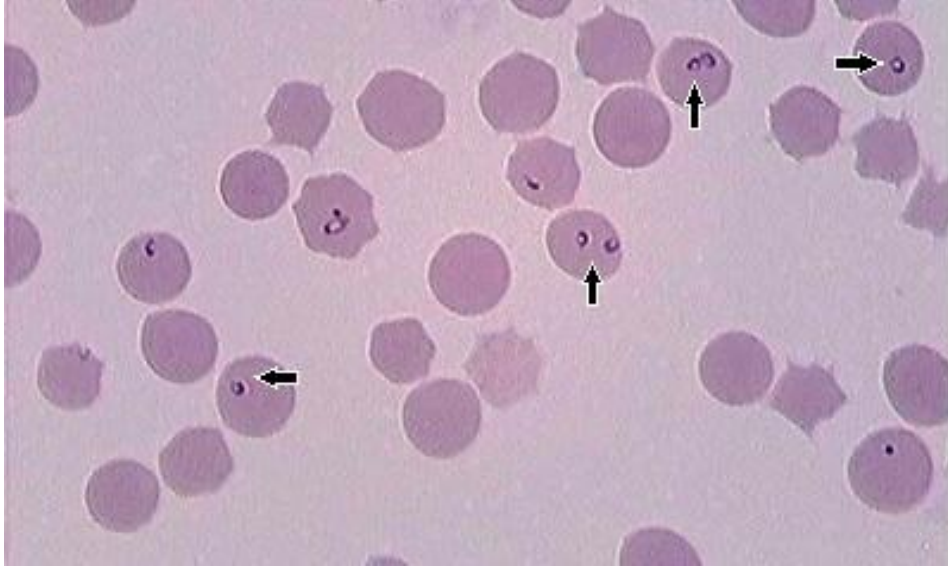


Şekil 1.3. *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* piroplasmaları (oklar)

[http://www.veterinariavirtual.uab.es/parasito/diagnos003\\$/hematologia/frotis/arles/image9.htm](http://www.veterinariavirtual.uab.es/parasito/diagnos003$/hematologia/frotis/arles/imagepages/image9.htm). Erişim Tarihi: 31.12.2012.

1.3.3. *Theileria parva*

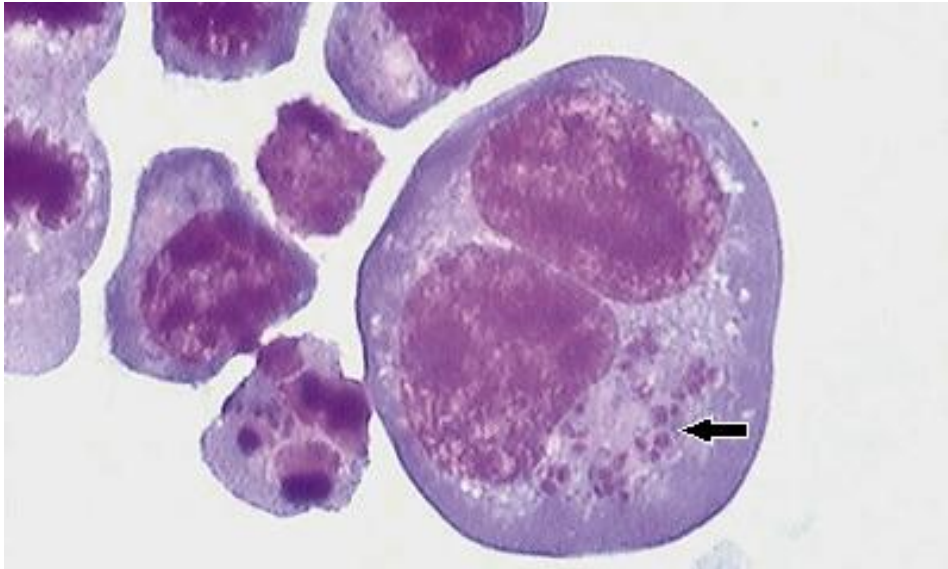
Theileria parva'nın Doğu sahil humması etkeni *T.parva parva*, Koridor hastalığı etkeni *T.parva lawrenci* ve Zimbabwe theileriosisi veya Ocak ayı hastalığı etkeni olan *T.parva bovis* olmak üzere 3 alt tipi bulunmaktadır (Kaufmann 1996, Lawrence ve ark. 2006). Bu alt tipler arasında morfolojik ve serolojik farklılıklar yoktur, ancak epidemiyolojik açıdan farklılıklar bulunmaktadır. Vektörleri *R.appendiculatus*, *R.zambesiensis*, *R.duttoni*, *R.simus*, *R.evertsi*, *H.excavatum*, *H.dromedarii*, *H.truncatum*'dur (Norval ve ark. 1992, Kaufmann 1996). Etken hem eritrositlere hem de lenfositlere yerleşir. Eritrositik formları genellikle çomak şeklinde 1.5-2x0.5-1 µm büyüklüğündedir. Etkenin yuvarlak, oval, virgül ve yüzük şeklinde olan formları da vardır (Şekil 1.4). Şizontlar 8 µm büyüklüğünde ve yuvarlak ya da düzensiz şekillidir (Şekil 1.5) (Kaufmann 1996).



Şekil 1.4. *Theileria parva* piroplasma (oklar)

<http://www.itg.be/internet/jaarverslag00/en/dep-diergeneeskunde.htm>. Erişim Tarihi:31.12.2012.

Theileria parva parva asıl patojen etkisini şizont döneminde gösterir. Endemik instabil bölgelerde mortalite oranı %90-100 iken, endemik stabil bölgelerde bu oran daha düşüktür. *Theileria parva lawrenci* esas konağı olan Afrika buffalosunda hafif bir enfeksiyon oluştururken, su mandaları ve sığırlar için oldukça patojendir (Soulsby 1982).



Şekil 1.5. *Theileria parva* şizont formu (ok)

<http://www.itg.be/internet/jaarverslag00/en/dep-diergeneeskunde.htm>. Erişim Tarihi:31.12.2012.

1.3.4. *Theileria mutans*

İlk defa Güney Afrika'da sığırlarda bildirilen bu tür daha sonra tüm dünyadaki iyi huylu theileriosis etkenleri ile karşılaştırılmış ve yapılan çalışmalarda *T.mutans*'in sadece tropikal Afrika'da görüldüğü ortaya çıkmıştır. Vektörleri *Ambylomma* cinsine bağlı kene türleridir. Etken esas proliferasyonu piroplasma döneminde gerçekleştirir (Lawrence ve ark. 2006). Sığırların iyi huylu theileriosis etkenlerindedir, fakat Afrika'nın doğusunda ciddi enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmektedir (Shah-Fischer ve Say 1989). Ülkemizde bulunduğu bildirilse de daha sonraki çalışmalarda sadece tropikal Afrika'da bulunan bir tür olduğu ifade edilmiştir (Altay ve Aktaş 2004).

Etkenin intraeritrositik formları yuvarlak, oval, armut şeklinde, virgül ve anaplazmoid tiptedir. Yuvarlak formları 1-2 µm ve oval formları 1.5x0.6 µm çapındadır (Kaufmann 1996).

1.3.5. *Theileria velifera*

Sığırların apatojen *Theileria* etkenlerinden biridir. Afrika'da esas olarak mandalarda görülen bir türdür. Vektörleri *A.variegatum*, *A.lepidum* ve *A.hebraeum* türü kenelerdir (Kaufmann 1996, Altay ve Aktaş 2004, Bilgin 2007). Eritrositik formları pleomorfik veya çomak şeklindedir. Çoğu 1-2 µm uzunluktadır. Büyük bir çoğunluğu dikdörtgen şeklinde, 1-3.5 µm uzunluğunda "veil" içerir (Kaufmann 1996).

1.3.6. *Theileria taurotragi*

Esas olarak geyik ve antilopların paraziti olan bu tür sığırlarda da enfeksiyon oluşturabilmektedir. Sığırlarda oluşan enfeksiyon genellikle hafif veya subklinik olarak seyredir. Etkenin vektörlüğünü *R.appendiculatus* yapar. Bu tür *T.parva* ile tek

yönlü çapraz reaksiyonlar vermesinden dolayı, *T.parva* ile yapılan tanı ve kontrol çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır (Karagenç ve ark. 2009).

1.4. Sığırlardaki *Theileria* Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri (Systema Naturae 2000)

Alem: Protozoa

Alt alem: Biciliata

Şube: Myozozoa

Altşube: Apicomplexa

Sınıf: Aconoidasida

Takım: Piroplasmorida

Aile: *Theileriidae*

Soy: *Theileria*

Tür: *Theileria annulata*

Tür: *Theileria buffeli*

Tür: *Theileria mutans*

Tür: *Theileria lawrenci*

Tür: *Theileria parva*

Tür: *Theileria sergenti*

Tür: *Theileria taurotragi*

Tür: *Theileria velifera*

1.5. *Theileria* Türlerinin Biyolojisi

1.5.1. Vektör Kenelerde Gelişme

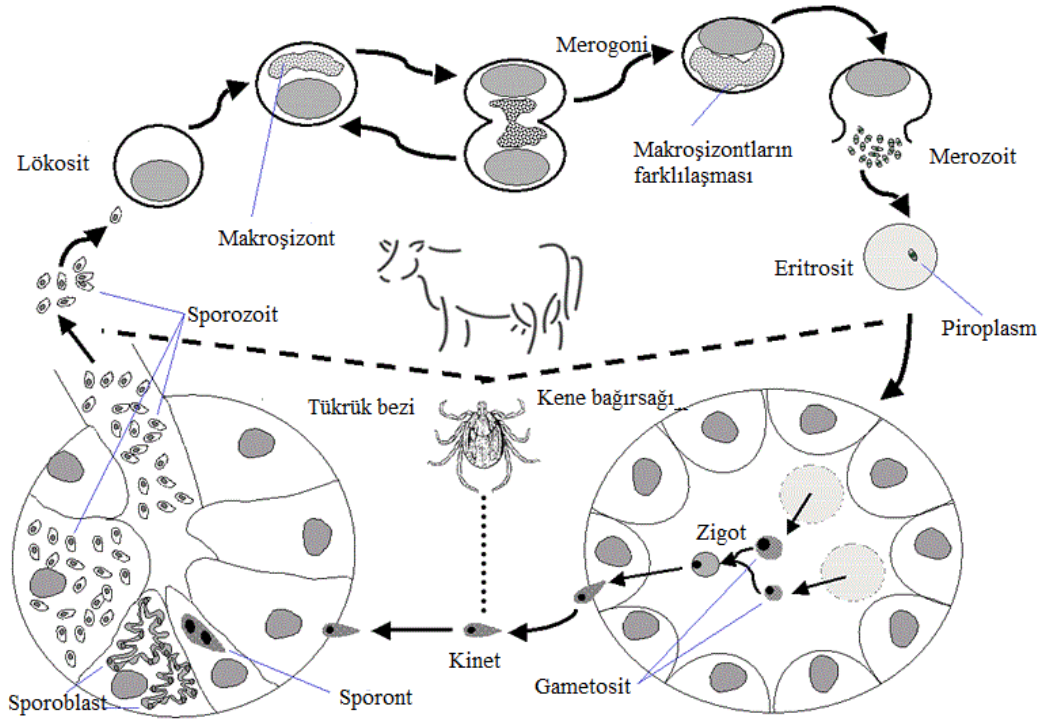
Theileria türlerinin biyolojisi küçük farklılıklar dışında birbirine benzer. Yaşam çemberi *Ixodidae* ailesinde yer alan keneler ile sığır, koyun, keçi gibi çeşitli memeli

hayvanlar arasında geçer. Larva ve nimf aşamasında enfekte hayvanlardan kan emen keneler parazitin piroplasma ya da gametosit olarak adlandırılan eritrositik formlarını alırlar. Piroplasmalar kene bağırsağında birbirini takip edecek şekilde seksüel ve aseksüel gelişmeler gösterir. Buna göre gömlek değiştirmek amacıyla doyup enfekte konağı terk eden kenenin bağırsağında, enfekte eritrositlerin sindirilmesini takiben piroplasmalar serbest kalır. Serbest kalan piroplasmalardan özellikle halka şeklindeki formlar gelişerek bir kısmı mikrogamont ve mikrogametleri oluştururlar. Diğer formlar makrogamontları ve bunlardan da makrogametleri oluştururlar. Kene bağırsağında mikrogametinin makrogameti döllemesi sonucu zigot oluşur. Zigot kenenin mide duvarını delerek hemolenfe geçer ve uzayarak hareketli ookinetlere dönüşür. Bu hareketli ookinetler kenede tükürük bezlerine giderek burada sporogoni yoluyla çoğalırlar. Sporogoni yoluyla çoğalmak üzere parazitlerin aktive olması kenenin gömlek değiştirip yeni bir konağı enfekte etmesinden kısa bir süre önce meydana gelir ve kenenin tükürük bezi asini hücreleri sitoplazmasında sporozoitler oluşur. Sporozoitler memeli konaklar için enfektif aşamadır. Sporozoitlerin meydana gelmesiyle birlikte kenedeki gelişim tamamlanmış olur. Keneler *Theileria* etkenlerini gelişme dönemlerinin bir aşamasında almakta, gömlek değiştirip takip eden gelişme döneminde kan emdiği sırada başka bir konağı nakletmektedir. Yani keneler tarafından *Theileria* türleri transstadial (dönemden döneme) nakledilir (Kauffman 1996, Aktaş ve Dumanlı 2010). Transstadial nakil, vektörlük yapan kenenin biyolojik özelliğine göre larva döneminden, nimf dönemine veya nimf döneminden erişkin döneme olmaktadır. Larva döneminde enfekte bir hayvandan kan emen kene, taşıdığı *Theileria* etkenlerini kan emdiği sırada konağın duyarlı olup olmadığına dikkat etmeksizin vererek erişkin dönemde steril hale geçer. Yani larva döneminden erişkin döneme bir nakil söz konusu değildir (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Keneler erişkin dönemde enfekte bir konaktan kan emseler bile, aldıkları etkenleri ovaryumlarına ve dolayısı ile yumurtalarına nakledemez. Bu nedenle *Theileria* türlerinin kenelerde transovarian olarak nakledilmesi mümkün değildir (Aktaş ve Dumanlı 2010).

1.5.2. Memeli Hayvanlarda Gelişme

Konak olan memeli hayvanların enfeksiyonu, enfekte kenenin tükürük bezi asini hücrelerinde bulunan sporozoitlerin, kenenin kan emmesi sırasında inoküle edilmesi ile gerçekleşir. Sporozoitler en erken kenenin konağa tutunmasını takiben 48 saat sonra verilir. Sporozoitlerin konağa verilmesinden sonra ilk 5 gün içerisinde memeli hayvanların hiçbir doku ve organında etken görülmez. Etkenlere inokulasyondan 5-8 gün sonra lenf düğümlerinde lenfosit sitoplazmasında rastlanır. Sporozoitler hızla lenfositlere girer ve şizogoni yoluyla çoğalarak şizontları oluştururlar. Şizontlar "**Koch cisimciği**" olarak da adlandırılır. Bu sırada konak hücrenin de bölünmesini uyarırlar. Şizogoni sonucu önce makroşizontlar ve daha sonra bunlardan mikroşizontlar ve en sonunda merozoitler oluşur. Merozoitler kan yolu ile eritrositlere girerek piroplasma formları oluştururlar ve parazitlerin son konaktaki gelişmesi tamamlanmış olur (Şekil 1.6) (Aktaş ve Dumanlı 2010).



Şekil 1.6. *Theileria annulata* yaşam çemberi

theileria.org. Erişim adresi: <http://theileria.org/ahdw/background.htm>. Erişim Tarihi: 31.12.2012.

Piroplasma formlarının *T.parva*'da bölünmediği ve bu nedenle sonkonak memelilerdeki enfeksiyonun nihai formu olduğu, *T.annulata*'da ise aseksüel olarak ikiye bölünme tarzında çoğaldığı bilinmektedir.

1.6. Sığırlarda *Theileria* Türlerinin Patogenezi ve Klinik Belirtiler

Sığırlarda *Theileria* türlerinin meydana getirdiği enfeksiyonların şiddeti birbirinden oldukça farklıdır. Bazı *Theileria* türleri çok patojen olup yüksek mortalite oluştururken, bazı türlerin patojenitesi düşük ve bazıları da nonpatojendir. Patogenez etkenin lenf hücreleri ve eritrositlerde oluşturduğu tahribat sonucu ortaya çıkar. Bu tahribatın oluşmasında *Theileria* türüne göre farklı gelişme dönemleri ilgilidir. *Theileria parva*'da şizontlar; *T.mutans* ve *T.sergenti/buffeli/orientalis*'te piroplasmalar; *T.annulata*'da ise hem şizontlar hem de piroplasmalar etkin rol oynar (Sugimoto ve Fujisaki 2002, Altay ve Aktaş 2004)

Theileria annulata enfeksiyonlarında etkenler en çok lenfoid doku ve kan hücrelerini etkilediğinden başlıca bulgular anemi ve lenf yumrularının büyümesidir. Bunlardan başka yüksek ateş, iştahsızlık, sarılık, malasi, dispne ve sindirim sistemine yerleşmiş olan ülserler görülür. Perakut enfeksiyon şekillenebilir, fakat genellikle hastalık uzun sürer (Robinson 1982).

Theileria annulata'nın sebep olduğu Tropikal theileriosis özellikle kültür ırkı sığırlarda şiddetli seyrederek ölümlere sebep olur. Kültür ırklarında mortalite %90, yerli ırklarda %5 veya daha azdır. Etkenin en patojen olduğu dönem şizont dönemidir. Bu dönemde lenfositler sınırsız bir şekilde çoğalır ve daha sonra lenf hücreleri parçalanır. Bu nedenle hastalığın patolojisi özellikle şizontların lenfositlerde, daha az olarak da piroplasmaların eritrositlerde meydana getirdiği tahribata bağlı olarak şekillenir. Tropikal theileriosis'te, *T.parva* tarafından oluşturulan Doğu sahil hummasından farklı olarak anemi ve sarılık ve nadiren de olsa hemoglobüri görülür (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Theileria annulata şizontlarının hedefi sığır makrofajları ve B lenfositlerdir. Şizogoni döneminde bağışıklık sisteminde meydana gelen tahribata bağlı olarak, diğer patojenlerin de enfeksiyon oluşturabilme yetenekleri artar ve sekonder enfeksiyonlar *Theileria* enfeksiyonuna eşlik eder. Şizont ve piroplasma formları

hayvanların genel durumları üzerine olan patojen etkilerini eş zamanlı olarak gösterirler. Bu patojen etkiler, lökosit ve eritrosit sayısında önemli miktarda azalma, lenf yumruları, dalak, timus ve kemik iliği gibi doku ve organlarda hasar, anemi, sarılık ve ishaldir. İshal bazı durumlarda kanlı olabilir (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Klinik belirtiler, sporozoitlerin vücuda girişi ile başlar. Konak hayvanda görülen ilk reaksiyon kenenin kan emdiği bölgeye en yakın olan lenf yumrularında meydana gelen büyümedir. Lenf yumrularından kesit yapılırsa veya froti hazırlanırsa çok sayıda sitoplazması yoğun büyümüş lenfoblastlar ve bölünmekte olan lenfositlere rastlanır. Bu lenfositlerin bazılarında '**Koch cisimcikleri**'de görülebilir. Lenf yumrularının büyümesinden 1-2 gün sonra vücut ısısı 40-42 °C'ye yükselir. Çok hafif enfeksiyonlarda vücut ısısı değişmeyebilir ve etkenlere sadece etkenin vücuda giriş yerine yakın olan lenf yumrularında rastlanır. Makroşizontların kademeli olarak artışı ile birlikte seyreden 4-5 günlük yüksek ateşli bir dönemden sonra, lenf yumrularında mikroşizontlar ve eritrositlerde piroplasmalara rastlanır. *Theileria annulata* enfeksiyonlarında *T.parva*'dan farklı olarak lökopeni yoktur ve eritrositlerin piroplasmalar tarafından istila edilme oranları daha yüksektir. Çok sayıda eritrositin piroplasmalar tarafından istila edilmesi, özellikle şiddetli *T.annulata* enfeksiyonlarında hemoglobinemi, bilirubinemi ve aneminin birlikte görülmesine neden olur (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Uygun koşullarda konak ile etken arasındaki etkileşim konak duyarlılığı, konağın yaşı, parazitin suşu ve konak üzerinde bulunan kene sayısına bağlıdır. Bu koşullara göre enfeksiyon hafif, perakut, akut, subakut veya kronik seyreder. İnkubasyon süresi ortalama 15 gün civarındadır. Genellikle bağışık sığırlarda görülen hafif enfeksiyonlarda, semptomlar tipik değildir. Hafif ateş, iştahsızlık, sindirim bozukluğu, gözyaşı akıntısı, çevreye kayıtsız kalma ve orta derecede bir anemi görülür (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Perakut form oldukça yaygındır. Yüksek ateş, iştahsızlık, dermansızlık, kulaklarda sarkma, başın yere doğru eğilmesi, seröz burun akıntısı, salya akışı, gözyaşı akıntısı, yüzeysel lenf yumrularında şişme, tremor, sallantılı yürüyüş, süt veriminde azalma, solunum güçlüğü, nabız artışı, anemi ve sarılıkla karakterizedir (Aktaş ve Dumanlı 2010). Vücut sıcaklığı düşer ve 3-4 gün içinde ölüm meydana gelir (Dinçer 1990, Aktaş ve Dumanlı 2010). Lenf yumrularından hazırlanan yayma

kan frotilerinde şizontlar görülür. Yayma kan frotilerinde eritrositlerin yaklaşık %50'sinin piroplasmalar tarafından istila edildiği görülür (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Akut enfeksiyonlarda ilk belirti yüksek ateştir. Bu devamlı veya intermittent olarak 5-20 gün devam eder (Dinçer 1990). İştahsızlık, geviş getirmenin durması, yüzeysel lenf yumrularında büyüme, salya akması, seröz burun akıntısı, göz kapaklarında şişme, nabız artışı, süt veriminde azalma, anemi ve nadiren sinirsel semptomlar görülür (Dinçer 1990, Aktaş ve Dumanlı 2010). Konjunktivada peteşiyal kanamalar vardır. Enfeksiyonun başında dışkı katı halde iken, daha sonra ishal başlar. Dışkıda kan ve mukus görülebilir. 1-2 hafta içinde ölüm görülür (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Subakut formda, akut formdakilere benzer, ancak daha az belirgin olan semptomlar dikkat çeker. Ateş 10-15 gün devam eder ve genellikle düzensizdir. Gebe hayvanlarda abort görülebilir (Dinçer 1990, Aktaş ve Dumanlı 2010).

Kronik formda ateş düzensiz aralıklarla yükselir. İştahsızlık, anemi ve sarılık görülür. Genellikle hayvanlar 4 hafta içinde iyileşir, fakat bazen akut forma dönerek ölüm meydana gelebilir (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Tropikal theileriosis tipik olmayan farklı karakterde semptomlarla da ortaya çıkar. Özellikle kulak, boyun ve bacaklarda bir süre sonra ülserleşen lezyonlar görülebilir. Bunun yanında sinirsel semptomlarla seyreden vakalar da tanımlanmıştır. Bu olgularda hayvanlarda kas titremesi ve yürümede bozukluk görülür. Hayvan yere yatar, başını sabit bir yere dayar, bacaklarını devamlı ve yavaş bir şekilde hareket ettirir, şuurunu kaybeder ve ölüm görülür. Serebral theileriosisli sığırlarda klinik belirti olarak, ataksi, depresyon, dönme, baş sıkışması, hiperestezi, körlük, hipermetri, nistagmus, propriyoseptif eksiklik ve saldırganlık durumu göze çarpar. Hastalık ölümcül olduğunda hayvan boylu boyunca yere yatar ve opistotonus, tonik titreme nöbetleri ve koma hali görülür. Sinirsel belirtiler beyindeki vaskulitis ve lenfokistik yangı sonucu oluşur (Dabak ve ark. 2004).

Theileria sergenti/buffeli/orientalis enfeksiyonlarında piroplasmalar enfeksiyondan yaklaşık 10 gün sonra eritrositlerde bulunur. Bu dönemde ateş ve anemi gelişebilir. Hayvanlar genellikle enfeksiyonu atlatır, fakat parazitler muhtemelen yaşam süresince kalır, seyrek olarak tekrar nüks eder. Gebelik, laktasyon, çevredeki ani değişikliklerde piroplasmalar aniden çoğalarak

enfeksiyonun tekrarlamasına sebep olur. Anemi genellikle ölümcül değilken, *Anaplasma* ve *Babesia* ile miks enfeksiyonlarda tedavi yapılmazsa ölüm görülebilir. Dalağı alınmış hayvanlarda paraziteminin arttığı bildirilmiştir (Sugimoto ve Fujisaki 2002).

Theileria parva tarafından oluşturulan Doğu sahil hummasında yüksek ateş, lenf yumrularında şişme, dispne ve ölüm görülür. Ateş 42°C civarındadır. Lenf yumruları belirgindir. Anoreksi, kondisyonda azalma, lakrimasyon ve burun akıntısı görülür. Ölümden önce vücut ısısı bariz bir şekilde azalır ve burun deliklerinden eksudat boşalır (Kaufmann 1996).

Theileria mutans olgularında oluşan klinik belirtiler *T.annulata* enfeksiyonlarındakilere benzer. En belirgin klinik belirti anemidir. Sarılık ve lenf nodüllerinde şişkinlik görülür (Kauffman 1996).

1.7. *Theileria* Enfeksiyonlarında Sığırlarda Kan Tablosunda Meydana Gelen Değişiklikler

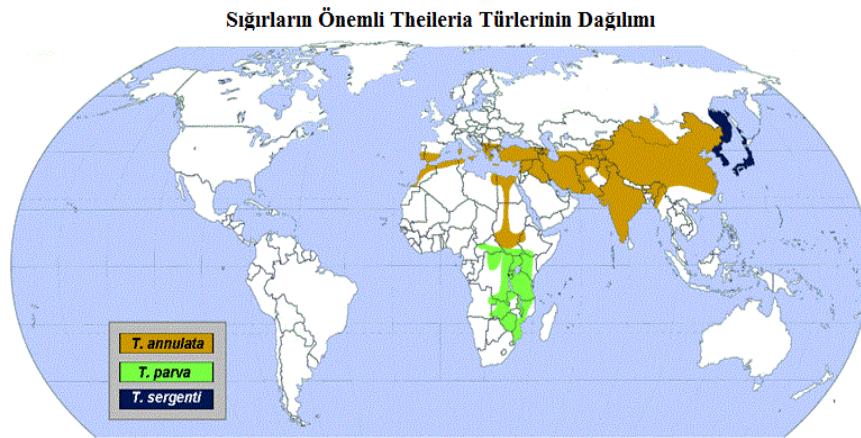
Tropikal theileriosis'te enfeksiyonun başında kan normal kıvamda iken, ileri dönemlerde anemiden dolayı sulanır ve rengi açılır. Anizositozis, noktalı bazofiller, polikromasi, jolly cisimcikleri, normoblastlar görülür. Retikulosit sayısı artmıştır. Akut enfeksiyonlarda lökositlerde artış görülür. Enfekte hayvanların tümünde eritrosit sayısı, hematokrit düzeyi ve hemogloblin miktarı normalden çok düşüktür (İssi ve ark. 2010). Hasta hayvanların kan sedimentasyon hızında artış, kandaki üre miktarında artma dikkati çeker. Karaciğer hasarına bağlı olarak serum bilirubin miktarı ile alkalin fosfataz miktarının normal sınırların üzerine çıktığı ifade edilmektedir (Aktaş ve Dumanlı 2010, İssi ve ark. 2010). Yine theileriosisli sığırlarda adenosin diaminaz düzeyi ve serum sialik asit düzeyinin sağlıklı hayvanlara oranla daha yüksek, total antioksidan düzeyinin ise düşük olduğu bildirilmiştir (Altuğ ve ark. 2008, Güzel ve ark. 2008).

1.8. Nekropsi Bulguları

Tropikal theileriosis sonucu ölen hayvanların nekropsisinde subkutan dokulara yayılmış halde kanamalar görülür. Dalak ödemli, şişkin ve büyümüştür. Karaciğerin kıvamı gevrek bir hal alır ve büyür. Karaciğer yüzeyinde boz renkte nekroz alanları görülür. Yüzeysel lenf yumruları belirgin bir şekilde büyümüş ve kesit yüzlerinde peteşiler görülür. Safra kesesi duvarı kalınlaşır ve içerisinde granüler yapıda safra bulunur. Böbrekler üzerinde boz beyaz renkte nekroz odakları görülür. Abomazumda zimba deliği şeklindeki ülserlere rastlanır. Ülserler bazen bağırsaklarda da dikkati çeker. İdrar kesesi duvarında ekimotik alanlara rastlanılır. Larinks ve trakea mukozalarında peteşiyal kanamalar mevcuttur. Kalp kasında yumuşama, kanama odakları (Aktaş ve Dumanlı 2010) ve miyokarditis görülür (Hervas ve ark. 1998). Miyokardiyumun yapısal muayenesinde lenfosit ve makrofajlarda *Theileria* türlerinin birkaç şizont formuna, interstisyumda serbest merozoitlere, *Theileria* spp. eritrositik formlarına rastlanıldığı bildirilmiştir (Hervas ve ark. 1998). Bazen beyin hemisferleri ve meninklerde akut konjesyon ve hemorajiler görülebilir (Aktaş ve Dumanlı 2010).

1.9. *Theileria* Türlerinde Epidemiyoloji

Theileriosis; Akdeniz havzası (Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Anadolu yarımadası), Ortadoğu, Orta ve Güney Asya'da yaygın olarak görülmekte ve yaklaşık 250 milyon sığırı tehdit etmektedir (Şekil 1.7) (Tait ve Hall 1990).



Şekil 1.7. Sığırların önemli *Theileria* türlerinin dağılımı.

theileria.org.<http://www.theileria.org/ahdw/pictures/largemap.gif>. Erişim Tarihi: 27.11.2012.

Theileriosis'in epidemiyolojisinde, bölgenin coğrafi konumu, hastalığın durumu, vektör canlıların biyoloji ve mevsimsel aktiviteleri, konak ve etken arasındaki ilişki ile hastalığın yayılma yolları önemlidir (Sayın 1985, Brown 1990).

Ülkemizde klinik theileriosisten sorumlu olan *T.annulata*, *Hyalomma* cinsine bağlı yaklaşık 15 kene türü ile doğal veya deneysel olarak nakledilmektedir. Bunların en önemlileri *H.detrutum*, *H.anatolicum anatolicum*, *H.a.excavatum*, *H.dromedarii* ve *H.scupense*'dir (Robinson 1982). Bu türler iki veya üç konaklı kene türleridir.

Ülkemizde iyi huylu *Theileria* türü olarak kabul edilen *T.buffeli/orientalis*'in vektörlüğünü Asya'da *Haemaphysalis* cinsi kene türleri yapmaktadır. Avusturya'da etkenin taşınmasında etkili olan türün 3 konaklı *H.longicornis* olduğu rapor edilmektedir. Etken Teksas ve Çin'de *Haemaphysalis* cinsine bağlı türler yanında, *Amblyomma* ve *Dermacentor* cinsine bağlı kene türlerinden de izole edilmiştir (Sugimoto ve Fujisaki 2002).

Theileriosiste enfeksiyon şiddetinin enfekte kenelerin inoküle ettiği sporozoit miktarı ile hayvanın duyarlılığına bağlı olduğu bildirilmektedir. *Theileria annulata* ile enfekte bir veya iki adet kene kan emdiğinde hayvanlarda gözlenen enfeksiyonun hafif olduğu ve bu hayvanların bağışıklık kazandığı bildirilmektedir (Gill ve ark. 1977). Buna karşılık Norval ve ark. (1992) kene tükürük bezlerinde bulunan enfekte bir asini hücreesindeki tek bir sporoblastta bulunan sporozoitlerin enfeksiyon oluşturabilecek en düşük inokulum olarak kabul etmektedirler.

Deniz (2003) Walker'e atfen (1990) *Theileria* türlerinin sığırlar kadar keneler için de patojen olduğunu ve bu nedenle kenelerin bu protozoonun gelişmesi için uygun yaşam koşulları oluşturmak yerine bunlara karşı direnç geliştirdiği bildirmektedir. *Theileria annulata*'nın kenelerde gelişmeleri sırasında karşılaştıkları engeller; çevre şartlarının olumsuz etkileri, kenelerin canlı kalabilme ve uygun konağı bulabilme olanağının az olması, kenelerin tükürük bezi ve bağırsak enzimlerinin parazitin yaşaması için uygun olmaması şeklinde sıralanmaktadır.

Enfeksiyonun ortaya çıkışını etkileyen faktörlerden biri de hayvanların ırk özellikleridir. Yapılan çalışmalarda kültür ırkı sığırların, yerli ve melez sığırlara oranla daha duyarlı olduğu saptanmıştır (Brown 1990). Kültür ırkı sığırlarda ölüm oranının %90'a ulaştığı ifade edilmektedir (Aktaş ve Dumanlı 2010).

1.10. Türkiye Sığırlarında Theileriosis

Ülkemizde sığır kan parazitleri üzerine ilk yayın İsmail Hakkı ve İsmail Rıza tarafından yapılmış ve bu araştırmacılar Erzincan yöresinde *T.parva* gördüklerini iddia etmişlerdir. Daha sonra Ekrem ve Lestoquard ülkemizde *T.annulata* ve *T.mutans*'in var olduğunu bildirmişlerdir. Mimioğlu ve ark. (1972) ilk kez *T.annulata* ve *T.mutans*'in morfolojik farkları üzerinde durmuş ve *T.mutans*'in ülkemizde çok yaygın olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ülkemiz sığırlarındaki theileriosis etkenlerinin *T.annulata* ve *T.mutans* olduğunu, *T.parva*'nın ülkemizde bulunmadığını bildirmişlerdir. Uilenberg (1981) *T.mutans*'in sadece Afrika'da bulunduğunu, Afrika dışında *T.mutans* olarak tespit edilen türün *T.buffeli* olabileceğini ileri sürmüştür.

Sığır theileriosisi ülkemiz hayvancılığının önemli problemlerinden biri olup, ülkemizin hemen her bölgesinde görülmektedir. Mikroskopik, serolojik ve moleküler bakılarda ülkemizde sığırlarda iki farklı türün bulunduğu ve bunların *T.annulata* ve *T.buffeli/orientalis* oldukları tespit edilmiştir (Deniz 2003).

Ülkemizde saf ve melez ırklardan 10.761.000 sığırın 6.554.000'i (%60) Tropikal theileriosis riski altındadır (Sayın ve ark. 2003). En duyarlı grubu oluşturan aşısız saf ırklarda mortalite %70 iken, yerli melez hayvanlarda mortalite %45 civarındadır (Sayın ve ark. 2003, Sayın ve ark. 2004).

Mimioğlu ve ark. (1969)'a göre Türkiye'de *T.annulata* varlığı ilk defa 1930 yılında Samuel ve Raif tarafından bildirilmiştir. Daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından mikroskopik, serolojik ve moleküler metotlarla sığırlarda *Theileria* türlerinin tespit edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Mimioğlu 1956, Göksu 1968, Çakmak 1990, Vatansver ve Nalbantoğlu 2002, Deniz 2003, Dumanlı ve ark. 2005). Bazı çalışmalarda *Theileria* türleri vektör kenelerin tükürük bezlerinde mikroskopik ve moleküler tekniklerle de belirlenmeye çalışılmıştır (Aktaş ve Dumanlı 2001, İça ve ark. 2007b). Mikroskopik ve serolojik teşhis ülkemizin yedi coğrafi bölgesinin tümünde yapıldığı halde, moleküler teşhis altı coğrafi bölgede (İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu, Marmara, Karadeniz ve Ege) yapılmıştır (Mimioğlu 1956, Eren ve ark. 1998, Aktaş ve ark. 2001, İnci ve ark. 2002, Kaya ve ark. 2006, Sevgili ve ark. 2010).

Mikroskopik inceleme sonucu sığırlarda Marmara Bölgesi'nde *T.annulata* (Alp 1995), Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde *T.annulata* (Eren ve ark. 1998, Kaya ve ark. 2006) İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu'da *T.annulata* (Özer ve ark. 1993, Vatansever ve Nalbantoğlu 2002) ve *Theileria* spp. (Sayın ve ark. 2003, Dumanlı ve ark. 2005), Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde de *T.annulata* (Mimioğlu 1956, Dumanlı ve Özer 1987) ve *Theileria* spp. (Celep 1984, Dumanlı ve ark. 2005) tespit edilmiştir.

Karadeniz Bölgesi sığırlarında mikroskopik bakıda *T.annulata* oranı %7.2-32.8 arasında (Mimioğlu 1956, Göksu 1968, Dinçer ve ark. 1991, Açıcı 1995, 2002), *Theileria* spp. %5.4 (Celep 1984) olarak saptanmıştır. Ege Bölgesi sığırlarında *T.annulata* oranı %9-43.2 (Erkut 1967, Eren ve ark. 1998) olarak bildirilmiştir. İç Anadolu Bölgesi'nde sığırlarda *T.annulata* %2.3-60.5 (Göksu 1959, Zeybek ve ark. 1995, Yaman 1998, İnci ve ark. 2002, Vatansever ve Nalbantoğlu 2002, İnci ve ark. 2008), *Theileria* spp., %11.1-29.6 (Sayın ve ark. 2003, Vatansever ve ark. 2003a) oranında bildirilmiştir. Akdeniz Bölgesi'nde *T.annulata* oranı %1.8-9.3 (Sayın ve ark. 1994, Nalbantoğlu 1998, Öz 1999, Kaya ve ark. 2006) olarak tespit edilmiştir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde *T.annulata* oranı %9.94-27.2 (Özer ve ark. 1993, Sevgili ve ark. 2010) *Theileria* spp., ise %5-33 (Özer ve ark. 1993, Dumanlı ve ark. 2005, Deniz ve ark. 2012) olarak bildirilmiştir. Marmara Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda *T.annulata* oranı %23.1-23.4 oranında belirlenmiştir (Tüzer 1981, Alp 1995). Doğu Anadolu Bölgesi'nde de yapılan mikroskopik çalışmalarda *T.annulata* ve *Theileria* spp. varlığı bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre *T.annulata* %2.3-32 (Dumanlı ve Özer 1987, Özer ve ark. 1993, Aktaş ve Dumanlı 1999, Aktaş ve ark. 2001), *Theileria* spp., %11.3-16.2 (Özer ve ark. 1993, Dumanlı ve ark. 2005, Aktaş ve ark. 2006, Altay ve ark. 2007a) olarak belirlenmiştir.

Türkiye'de sığırlarda serolojik olarak *Theileria* türlerinin belirlenmesi ilk defa Çakmak (1990) tarafından yapılmıştır. Ankara'nın Beytepe köyündeki 185 sığırdan elde edilen 494 serumda IFA (İndirekt Floresan Antikor) testi kullanarak %6.4 oranında *T.annulata* seropozitifliği saptanmıştır. Daha sonra farklı araştırmacılar tarafından yine IFA testi kullanılarak Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerinde *Theileria* türleri serolojik olarak tespit edilmiştir. Karadeniz Bölgesi'nde %1.9-63.1 (Dinçer ve ark. 1991, Eren ve ark. 1995, Açıcı 2002), Ege Bölgesi'nde %31-40 (Eren ve ark.

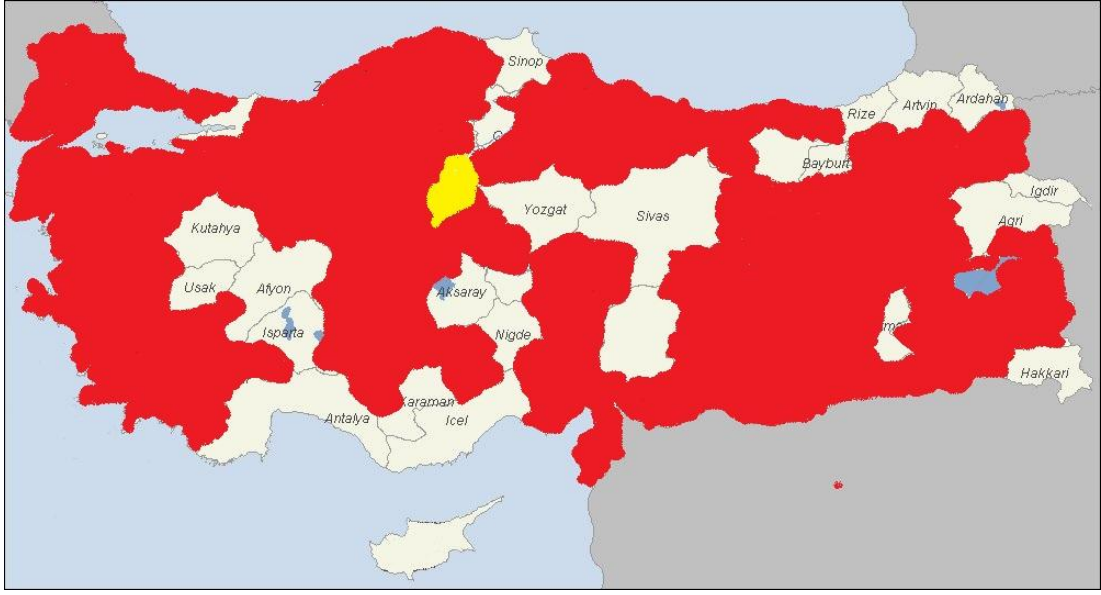
1995, Eren ve ark. 1998), İç Anadolu Bölgesi'nde %6.4-67.5 (Çakmak 1990, Eren ve ark. 1995, Zeybek ve ark. 1995, Yaman 1998, İnci ve ark. 2002, Vatanserver ve Nalbantoğlu 2002, Sayın ve ark. 2003, Vatanserver ve ark. 2003b, İnci ve ark. 2008), Akdeniz Bölgesi'nde %1.8-16 (Çakmak ve Öz 1993, Nalbantoğlu 1998, Öz 1999, Kaya ve ark. 2006), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %65.3-91.4 (Eren ve ark. 1995, Dumanlı ve ark. 2005, Sevgili ve ark. 2010), Marmara Bölgesi'nde %12.7-33.3 (Alp 1995, Eren ve ark. 1995, Beyazıt 1997), Doğu Anadolu Bölgesi'nde %21.9-30.9 (Aktaş ve Dumanlı 1999, Aktaş ve ark. 2001, Dumanlı ve ark. 2005) *T.annulata* seropozitifliği saptanmıştır.

Son yıllarda theileriosis tespitinde direkt olarak parazit DNA sını saptayan, spesifitesi ve duyarlılığı yüksek olan polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) kullanılmaya başlanmıştır. *Theileria* türlerinin moleküler tespitinde Nested-PCR, PCR ve RLB teknikleri ülkemizde birçok çalışmada kullanılmıştır. Bu tekniklerin kullanılması ile birlikte ülkemiz sığırlarında kötü huylu *T.annulata* yanında, iyi huylu *Theileria* etkeni olarak kabul edilen *T.buffeli/orientalis*'in de bulunduğu belirlenmiştir (Vatanserver ve Nalbantoğlu 2002, Deniz 2003, Vatanserver ve ark. 2003a, Dumanlı ve ark. 2005, Altay ve ark. 2007a, İça ve ark. 2007a).

Türkiye'de moleküler tekniklerle sığırlarda *Theileria* türlerinin varlığı ilk defa Vatanserver ve Nalbantoğlu (2002) tarafından yapılmıştır. Daha sonra farklı PCR teknikleri kullanılarak etken belirlenmeye çalışılmıştır. İç Anadolu Bölgesi'nde Nested-PCR ile *T.annulata*'nın yaygınlığı %61.2 olarak belirlenmiştir (Vatanserver ve Nalbantoğlu 2002). Türkiye'nin doğusunda klasik PCR ile *T.annulata* oranı %29.1-58.4, *T.buffeli/orientalis* ise %7.1 oranında saptanmıştır (Dumanlı ve ark. 2005, Aktaş ve ark. 2006). Altay ve ark. (2008b) Multiplex PCR yöntemini kullanarak *T.annulata* ve *T.buffeli/orientalis*'in varlığının aynı anda belirlenebileceğini ortaya koymuşlardır. Deniz ve ark. (2012) aynı metodla Diyarbakır'da *T.annulata* oranını %23, miks enfeksiyonu (*T.annulata*+*T.buffeli*) ise %1, Orkun ve ark. (2012) ise Kırşehir'de yine aynı yöntemi kullanarak *T.annulata* oranını %2.32 olarak belirlemişlerdir. Ülkemizde RLB testi ile yapılan çalışmalarda İç Anadolu Bölgesi'nde *T.annulata* oranı %18.1-44, *T.buffeli/orientalis* %0.9-13.6, miks enfeksiyon %7.2 oranında saptanmıştır (Deniz 2003, Vatanserver ve ark. 2003a, İça ve ark. 2007a). Aynı yöntemle Doğu Anadolu Bölgesi'nde *T.annulata* %15.4,

T.buffeli/orientalis %9.7, miks enfeksiyon %2.4 oranında saptanmıştır (Altay ve ark. 2007a).

Ülkemizde *Theileria* türlerinin kenelerde belirlenmesine yönelik çalışmalar da yapılmıştır. İnci ve ark. (2008) Kapadokya bölgesinde sığırlar üzerinden toplanan kenelerden *H.a.anatolicum* cinsine bağlı olanlarda *T.annulata*'nın gelişim formlarına mikroskopik muayenede rastladıklarını bildirmişlerdir. Elazığ bölgesinde *T.annulata*'ya karşı aşılınmış sığırlardan toplanan ve tükürük bezi açılan 212 *H.a.anatolicum*'un 28'i ve 16 adet *H.detrutum*'un 1'i enfekte bulunmuştur (Aktaş ve Dumanlı 1999). Malatya yöresinde sığırlar üzerinden ve barınaklardan toplanan kenelerin tükürük bezleri Methylegreen/Pyronin boyama metodu ile muayene edildiğinde sığırlar üzerinden toplanan 720 *H.a.anatolicum*'un 89'unun (%12.4), hayvan barınaklarından toplanan 443 *H.a.anatolicum*'un ise 83'ünün (%18.7) *T.annulata* ile enfekte olduğu belirtilmiştir. Yine sığırlar üzerinden toplanan 258 *H.a.excavatum*'un 20'sinin (%7.8) ve 87 *H.detrutum*'un 4'ünün (%4.6) tükürük bezinde *T.annulata*'nın sporoblastlarına rastlandığı bildirilmiştir (Aktaş ve Dumanlı 2001). Kayseri yöresinde sığırlar üzerinden toplanan *R.bursa*, *R.sanguineus*, *R.turanicus*, *H.marginatum*, *H.a.anatolicum*, *H.a.excavatum* erişkinleri ve *Hyalomma* spp. nimflerinin tükürük bezlerinde aynı yöntemle *T.annulata*'nın gelişme dönemleri araştırılmış ancak herhangi bir etkene rastlanmamıştır (İnci ve ark. 2002). Aktaş ve ark. (2004) Elazığ ve Malatya'da sığır ve barınaklardan topladıkları *Hyalomma* cinsi kenelerde yine aynı metodu kullanarak *Theileria* türlerini araştırmış, sığırlardan toplanan 2147 *H.a.anatolicum*'dan 412'si, 820 *H.a.excavatum*'dan 20'si, 495 *H.detrutum*'dan 23'ü ve barınaklardan toplanan 2447 *H.a.anatolicum*'dan 1150 tanesini *Theileria* ile enfekte bulmuşlardır. İça ve ark. (2007b) sığırların üzerinden ve barınaklarından toplanan 1160 adet 11 tür Ixodid keneden hazırlanan 43 kene havuzunda *Theileria* spp., *Babesia* spp., *T.annulata*, *T.buffeli/orientalis*, *B.bigemina*, *B.bovis* ve *B.divergens* varlığını RLB tekniğini kullanarak araştırmışlardır. Bu çalışmada 43 kene havuzundan 6 tanesinin *B.bigemina*, 4'ünün *T.annulata*, 1'inin *Babesia* spp. ve 1'inin *B.bigemina*+*T.annulata* ile enfekte olduğunu saptamışlardır. Türkiye'de sığırlarda *Theileria* türlerinin belirlendiği iller Şekil 1.8'de topluca gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Türkiye'de sığırlarda *Theileria* türlerinin belirlendiği iller

- *Theileria* türlerinin belirlendiği iller
- *Theileria* türlerinin bulunmadığı ve/veya bakılmadığı iller
- Çalışmanın yapıldığı Kırıkkale ili

1.11. Dünya Sığırlarında Theileriosis

Sığırlarda theileriosis, dünyanın çeşitli bölgelerinde farklı *Theileria* türleri tarafından oluşturulmaktadır. *Theileria annulata* Güney Avrupa, Ortadoğu, Kuzey Afrika ve Asya'nın bir bölümü ve Akdeniz kıyıları boyunca, *T.parva*'ya ise sadece Afrika'da rastlanır. Bu iki tür genellikle Sudan'ın güneyi dışında hiçbir bölgede bir arada bulunmamaktadır. Afrika ve bazı Karayip adalarında yaygın olan *T.mutans*, 1950-1975 yıllarında arasında Amerika'da da bildirilmiştir. *Theileria sergenti*, Asya'nın bazı bölgelerinden bildirilirken, *T.velifera* ve *T.taurotragi* Afrika'da yayılış gösterir. *Theileria buffeli* yaygın olup, Avrupa, Asya, Kuzey Amerika ve Afrika'nın bazı bölgelerinde rapor edilmiştir (OIE 2009).

Asya'da sığırlarda theileriosis farklı türler tarafından oluşturulmaktadır. *T.annulata* Çin'de, yerli sığırlarda %11-46, kültür ırkı sığırlarda %61, Pakistan'da mikroskopide %3, PCR ile %19-33.33 (Durrani ve Kamal 2008, Shahnawaz ve ark. 2011), İran'da ise sırasıyla %8.57-20 (Azizi ve ark. 2008, Razmi ve ark. 2009) ve %7.5-40 olarak belirlenmiştir (Azizi ve ark. 2008, Ghaemi ve ark. 2012). *Theileria sergenti* Çin'de %97.5 (Jianxun ve Wenshun 1997), Kore'de %67.8 oranında

bildirilmiştir (Song ve Sang 2003). *Theileria orientalis* oranı Japonya'da %2.2 (Ota ve ark. 2009), Vietnam'da %13.8 (Khukhuu ve ark. 2011), İran'da %5.62 (Ghaemi ve ark. 2012) olarak saptanmıştır. Kamau ve ark. (2011)'na göre *T.orientalis*'in sebep olduğu theileriosis olguları, Japonya, Kore, Rusya'nın bir kısmı, Çin ve Avustralya'dan bildirilmiştir.

Afrika'da Bangore'de mikroskopide *T.annulata* oranı %31.06 (Ananda ve ark. 2009) olarak belirlenmiştir. Sudan'da *Theileria* spp. mikroskopide %20, ELISA'da %64.3 (Tabidi ve ark. 2006), *T.annulata* mikroskopide %16.7, PCR'de %48.1, RLB'de %0.2-65.4, serolojide %30.8 oranında bildirilmiştir (Awadia ve ark. 2006, Salih ve ark. 2007a, Salih ve ark. 2009). Bu ülkede *T.mutans* serolojide %6.1, RLB'de %73, *T.parva* RLB'de %71.2, *T.velifera* %45.3, *T.taurotragi* %2.7, *T.buffeli* %0.5 oranında saptanmıştır (Salih ve ark. 2007b). Kenya'da *T.parva* oranı ELISA ile sığırlarda %19.3 oranında saptanmıştır (Gachohi ve ark. 2010). Mısır'da PCR'da *T.annulata* oranı kan örneklerinde %65.6 ve lenf örneklerinde %45.3 oranında bildirilmiştir (Abdel Rady ve ark. 2010). Oura ve ark. (2004) Uganda'da RLB tekniğini kullanarak yerli ve melez sığırların kan parazitlerini tespit etmişlerdir. Çalışmada yerli ve melez hayvanlarda sırasıyla *T.parva* %7-63, *T.mutans* %95-77, *T.taurotragi* %5-44, *T.velifera* %91-65 oranlarında tespit edilmiştir.

Avrupa'da da farklı *Theileria* türleri sığırlarda enfeksiyon oluşturmaktadır. İspanya'da *T.annulata* mikroskopik bakı, IFAT ve PCR'da sırasıyla %62.26, %69.86, %78.04 (Martin Sanchez ve ark. 1999), RLB'de ise %8.4-61.6 (Almeria ve ark. 2002, Garcia-Sanmartin ve ark. 2006, Almeria ve ark. 2009) oranında tespit edilmiştir. *T.buffeli* ise RLB tekniği kullanılarak %42.6-89.5 arasında belirlenmiştir (Almeria ve ark. 2002, Garcia-Sanmartin ve ark. 2006, Almeria ve ark. 2009). Portekiz'de *Theileria* spp. oranı %2.58 (Brigido ve ark. 2004), *T.buffeli* %69.9, *T.annulata* %30.2 olarak belirlenmiştir (Silva ve ark. 2010). İtalya'da yılın farklı mevsimlerinde yapılan çalışmada RLB ile *T.annulata* %80.4-84.3, *T.buffeli/orientalis* %78.6-94.1 olarak kaydedilmiştir (Sparagano ve ark. 2000).

Avustralya'da sığırlarda theileriosisin *T.buffeli* ve *T.orientalis* grubu parazitler tarafından oluşturulduğu (Islam ve ark. 2011), *T.buffeli*'ye %75 oranında rastlanıldığı ifade edilmiştir (Stewart ve ark. 1992).

Son yıllarda Amerika'da iyi huylu theileriosis etkeni olan *T.buffeli*'nin Teksas, Missouri, Michigan, Kuzey Karolina bölgelerinde sığırlardan izole edildiği belirtilmiştir (Stockham ve ark. 2000, Cossio-Bayugar ve ark. 2002).

1.12. Sığırlarda *Theileria* Enfeksiyonlarında İmmunite

Theileria enfeksiyonlarında hastalığı atlatan hayvanlar reenfeksiyonlara karşı bağışıktır. Bu bağışıklık *T.parva*'da steril bağışıklık şeklinde iken, *T.annulata*'da preimmünisyon şeklinde olmaktadır. *Theileria lawrenci* ve *T.annulata* arasında çapraz bağışıklık söz konusudur. Diğer türler arasında bu durum söz konusu değildir (Karagenç ve Eren 2007).

Theileria annulata enfeksiyonlarında sporozoit ve merozoit gibi ekstraselüler dönemlere karşı humoral yanıt, şizontlarla enfekte hücrelerde ise hücreyel yanıt önemlidir. Tropikal theileriosis olgularında makrofajlar çok önemli bir yere sahiptir. Hücreler tarafından salınan sitokinler koruma dışında hastalığın patogenezinde de önemli bir rol oynamaktadır (Preston ve ark. 1999, Ahmed 2002, Karagenç ve Eren 2007). *Theileria annulata*'nın etken olduğu doğal theileriosis olgularında veya makroşizontlar ile enfekte hücre kültürleri ya da sporozoit inokulasyonunu takiben oluşan bağışıklık sonucu, hayvanlarda homolog suşlar tarafından oluşturulacak reenfeksiyonlara karşı kalıcı bir bağışıklık gelişir. Aynı şekilde heterolog suşlara karşı oluşan bağışıklık da iyi derecede olmaktadır (Hall 1988, Karagenç ve Eren 2007). Enfeksiyon sonucu kazanılan bağışıklık 3 yıl ve reenfeksiyonların oluşması sonucu daha uzun süre devam etmektedir. *Theileria*'ya karşı şekillenen kompleks immun yanıt, enfeksiyona karşı koruyucu bir bağışıklığın oluşmasında rol oynamaktadır (Karagenç ve Eren 2007).

Parazitin dozu ve virulensi enfeksiyona karşı oluşan immun yanıtta etkilidir. Duyarlı hayvanlara yüksek dozda sporozoit inoküle edildiğinde ölümcül bir hastalık tablosu oluşturmaktadır. İyileşme dönemindeki hayvanlara subletal dozlarda sporozoit ile yapılan reenfeksiyonlara karşı kalıcı ve uzun süreli bir bağışıklık oluşur (Preston ve ark. 1999). Sporozoitlere karşı humoral bağışıklığın oluştuğu ve oluşan

bu bağışıklığın özellikle nötralizasyonla ilgili olduğu düşünölmektedir (Boulter ve Hall 1999). Sporozoitlerin konak hücresine invazyonu çok kısa bir sürede gerçekleşmesinden dolayı korumanın oluşması için antikör titresi yüksek düzeyde olmalıdır. Doğal enfeksiyonlarda bu titreler ancak enfekte kenelerin sığırlardan tekrar tekrar kan emmesine bağılı olmaktadır.

Tropikal theileriosis olgularında enfekte sığırlarda immun yanıtın oluşumunda sitotoksik T hücreleri ile birlikte sitokinler ve enfekte hücrelerin aktivasyonu ile oluşan sitotoksik makrofajlar önemli bir yer tutar (Preston ve Brown 1988). *Theileria annulata*'ya karşı gelişen doğal bağışıklıkta NK (doğal öldürücü hücreler) hücreleri önemli bir yere sahiptir. Enfeksiyon sırasında aktive olan makrofajlar ve NK hücrelerinden salınan ürünlerin kazanılmış Th1 yanıtının artmasına sebep olabilecekleri bildirilmiştir. Artan Th1 yanıtı, sitotoksik hücrelerin çoğalmasını, IFN-γ üretimini hızlandırır ve nitrik oksit üretimi için makrofajları aktive eder (Preston ve ark. 1999).

Şizontla enfekte olan hücreler konağın immun cevaplarını düzenlemektedir. İn vitro çalışmalarda, enfekte hücrelerin sitokin ve koruyucu bağışıklık mekanizmalarını düzenleyen faktörleri üretmek amacıyla enfekte olmayan makrofaj ve lenfositleri uyardıkları gösterilmiştir. Enfekte hücreler IFN-γ üretmek için CD4+ T hücrelerini, TNFα üretmek için enfekte olmayan makrofajları, nitrik oksit üretmek için lenfosit ve makrofaj kültürlerini, IL-2 varlığında çoğalmak için γδT hücrelerini uyarır. Enfekte makrofajların sitokin profilleri, doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşimlere yön veren enfekte olmamış makrofajların sitokin profiline benzer. Bu durum, enfekte makrofajların litik olma ve IFN-γ üretmek için NK hücrelerini uyarabileceğini göstermektedir. Bu ise indirekt olarak makrofajların nitrik oksit sentezlemesine olanak sağlamakta ve Th0 hücrelerinin CD4+ ve CD8+ T hücreleri şeklinde gelişmelerini hızlandırmaktadır (Campbell ve ark. 1997, Preston ve ark. 1999).

Theileria buffeli/orientalis grubunun oluşturduğu iyi huylu theileriosis olgularını atlatan sığırlar yaşamları boyunca bu etkenleri taşır. Bakım ve beslenme koşullarında meydana gelen ani değişiklikler, gebelik ve laktasyon gibi stres yaratan durumlarda enfeksiyon tekrar edebilir (Sugimoto ve Fujisaki 2002).

Norval ve ark. (1992)'na göre enzootik stabilitenin olmadığı bölgelerde yaşlı hayvanlar kenelerle karşılaştıklarından daha fazla risk altındadır. Bu bölgelerdeki genç hayvanlarda ise maternal antikorların oluşturduğu koruma görecelidir. Enzootik bölgelerde genç hayvanlarda ve ithal olanlarda klinik enfeksiyon söz konusudur. Yaşlı hayvanlar ise sürekli olarak kenelere maruz kaldıkları için oluşan preimmünisyonun dolayısıyla hastalığa karşı dirençlidirler.

1.13.Theileriosis'in Teşhisi

Theileriosis teşhisi, direkt olarak parazitin kendisinin veya parazite karşı oluşan spesifik antikorların tespit edilmesi ile olmaktadır (Figueroa ve Buening 1995).

1.13.1. Parazitin Direkt Tespit Edilmesi

Parazitlerin direkt olarak tespit edilmesi ya etkenin perifer kan yaymalarının ya da lenf yumru içeriği frotilerinin Giemsa ile boyanarak mikroskopik bakışı ve çeşitli yöntemlerle parazit nükleotidlerinin tespit edilmesine dayanır (Figueroa ve Buening 1995, Zarlenga ve Higgins 2001, Deniz 2003).

1.13.2. Mikroskopik Muayene

Theileriosis teşhisi akut olgularda klinik belirtiler ve Giemsa ile boyanan kan ve lenf nodülü içeriği frotilerinde veya karaciğer biyopsilerinde etkenin mikroskopik olarak belirlenmesine dayanmaktadır (Aktaş ve Dumanlı 2010).

Perifer kan yaymalarından hazırlanan frotilerin mikroskopik bakışında eritrositler içinde piroplasmalar, lenf nodüllerinden hazırlanan yayma frotilerde ise lenfosit sitoplazmasında ya da serbest halde bulunan şizontlar tespit edilir (Aktaş ve Dumanlı 2010). Karaciğer biyopsilerinden hazırlanan yayma preparatlarda şizontlar görülür. Lenf yumrusu ve karaciğer biyopsilerinden hazırlanan preparatlarda

şizontların görülmesi akut theileriosisin tanımlanması açısından yeterli olmaktadır (Sugimoto ve Fujisaki 2002). Enfeksiyonun başlarında henüz parazitemi şekillenmemiş olabilir. Bu durumda kanda piroplasmalar görülmeyebilir. Ancak daha önce enfeksiyonu atlatmış hayvanların da perifer kanında belli bir süre piroplasmalara rastlanabilir (Aktaş ve Dumanlı 2010). Eritrositlerin yüksek bir yüzdesinin piroplasmalarla enfekte olması klinik bir enfeksiyon olduğunu gösterir. Ancak paraziteminin yüksek olması ile enfeksiyon şiddeti her zaman doğru orantılı değildir (Nagore ve ark. 2004).

Perifer kan yaymalarının boyanmasında son zamanlarda, özellikle *Malaria* etkenlerinin boyanmasında kullanılan fleuresan bir boya olan acridin orange kullanılmaktadır. Bu boyanın Giemsa ile boyamaya göre daha kısa sürede sonuç verdiği ve Giemsa boya ile %100 korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Yine aynı boyanın *T.annulata* akut enfeksiyonlarında IFA testine göre daha başarılı sonuç verdiği de belirtilmiştir (Ömer ve ark. 2011).

1.13.3. Serolojik Teşhis

Theileriosis teşhisinde IFA, ELISA, CFT (komplement fikzasyon testi), Latex Aglütinasyon Testi, ISA (Improved Serum Antibody), Kapillar Tüp Aglütinasyon ve İndirekt Hemaglütinasyon Testi (IHA) gibi serolojik testler de kullanılmaktadır. Subklinik enfeksiyonların teşhisinde serolojik yöntemler çoğu kez kullanışlıdır. Serolojik testlerde de çapraz reaksiyonlar nedeniyle genellikle yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Uzun süren enfeksiyonlarda taşıyıcı hayvanlarda antikorların belirlenmesindeki eksiklik nedeniyle spesifik immun yanıt azalır. Bu nedenle serolojik testlerin sonuçları da şüphelidir (Burridge ve ark. 1974, Leemans ve ark. 1999, Gubbels ve ark. 2000, Dumanlı ve ark. 2005).

Theileria annulata'ya karşı gelişen antikorların belirlenmesi için en çok kullanılan serolojik test IFA'dır. Bu testin özgüllüğü ve duyarlılığının daha yüksek olması ve kolay uygulanabilmesinden dolayı diğer testlere oranla daha fazla kullanılmaktadır. Testde şizont ve eritrositik merozoitlerin her ikisi de antijen olarak kullanılır (Sugimoto ve Fujisaki 2002). Test *T.annulata* prevalans çalışmaları,

aşılannmış hayvanlarda antikor yanıtının belirlenmesinde yoğun olarak kullanılır (Pipano 1974). Subjektif olan bu test farklı *Theileria* türleri (*T.parva*, *T.annulata*, *T.mutans*, *T.taurotragi*) (Burrige ve ark. 1974) ve *B.bigemina*, *B.bovis*, *A.marginale* ve *A.centrale* ile çapraz reaksiyon verebilmektedir (Burrige ve ark. 1974, Kiltz ve ark. 1986, Kocan ve ark. 2000, Molad ve ark. 2006). Test sürüdeki taşıyıcı hayvanların belirlenmesi yönünden önemlidir, fakat tüm enfekte bireylerin belirlenmesi açısından yeterli düzeyde değildir (Burrige ve ark. 1974).

ELISA anti-*T.annulata* antikorlarının belirlenmesi için başarılı bir şekilde adapte edilmiştir. Kachani ve ark. (1992) ham piroplasma antijenleri kullanarak yapılan ELISA'nın, bağışık hayvanlardan alınan serum örnekleri ile hem şizontlardan hazırlanan antijenlere göre daha etkili olduğu hem de daha az özgül olmayan bağlanma gösterdiğini bildirmişlerdir. IFA testinin aksine ELISA'da kullanılan şizont antijenleri, eritrositik merozoitlerden hazırlanan antijenlerden daha az duyarlı ve spesifiktir (Sugimoto ve Fujisaki 2002). Ancak ELISA testinin IFA testinden daha uzun bir süre antikor tespit ettiği bildirilmiştir (Kachani ve ark. 1992). Bakheit ve ark. (2004) rekombinant yüzey proteinlerini kullanarak geliştirilen ELISA yönteminin Tropikal theileriosis tanısında başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Jeong ve ark. (2005) *T.sergenti* tanısında uyguladıkları Latex aglütinasyon testinin, etkenin epidemiyolojik olarak belirleneceği çalışmalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kuttler ve ark. (1967) CFT'nin akut dönemde *Theileria* antikorlarını tespit edebildiğini, fakat kronik dönemde duyarlılığın yetersiz olduğunu bildirmişlerdir.

Serolojik testler hayvanlarda antijen veya antikor varlığını ortaya koymakta ancak parazit varlığı ve hayvanın taşıyıcı olup olmadığı hakkında bilgi vermemektedir. Bunun yanında klinik olarak iyileşen hayvanlar uzun süre piroplasmaları taşımakta ve vektör kene için enfeksiyon kaynağı olmaya devam etmekte, ancak bir zaman sonra vücuttaki antikorlar kaybolabilmektedir (d'Oliveira ve ark. 1995).

1.13.4. Moleküler Teknikler

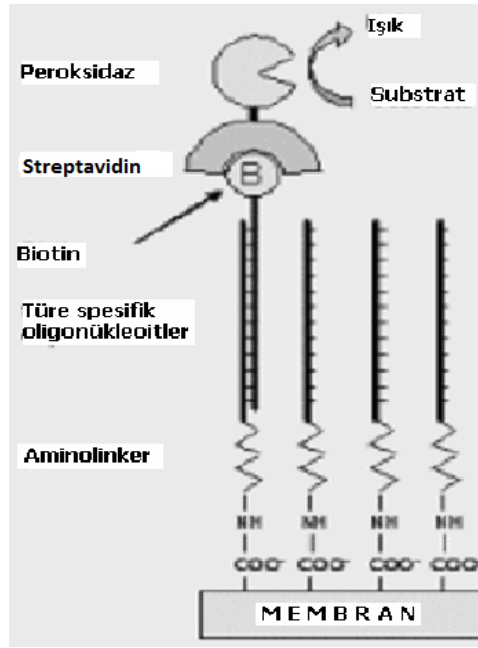
Günümüzde kan protozoonlarının moleküler yöntemlerle belirlenmesine yönelik çok sayıda araştırma mevcuttur. Son yıllarda epidemiyolojik çalışmalarda Tropikal theileriosis'in teşhisindeki en öncelikli metot PCR'dır, çünkü bu teknik IFA ve benzeri bilinen tekniklerden daha duyarlı ve spesifiktir (d'Oliveira ve ark. 1995, Martin- Sanchez ve ark. 1999, Almeria ve ark. 2002).

1.13.4.1. Reverse Line Blotting

Reverse line blotting farklı cins ve türlere ait etkenlerin eş zamanlı olarak tanı ve ayrımları için geliştirilen bir tekniktir. Tekniğin esası, 16S ve/veya 18S rDNA bölgelerinin amplifikasyonu ve elde edilen ürünlerin daha önce bir membrana kovalent olarak bağlanmış tür spesifik problarla hibridizasyonudur (Bilgin 2007). Problar membran üzerinde farklı sıralarda dizilmiştir ve bu durum her ürünün aynı anda tüm problarla karşılaşmasını ve böylece birden fazla etkene ait gen dizilimlerinin eş zamanlı tanısını ve ayrımını sağlamaktadır.

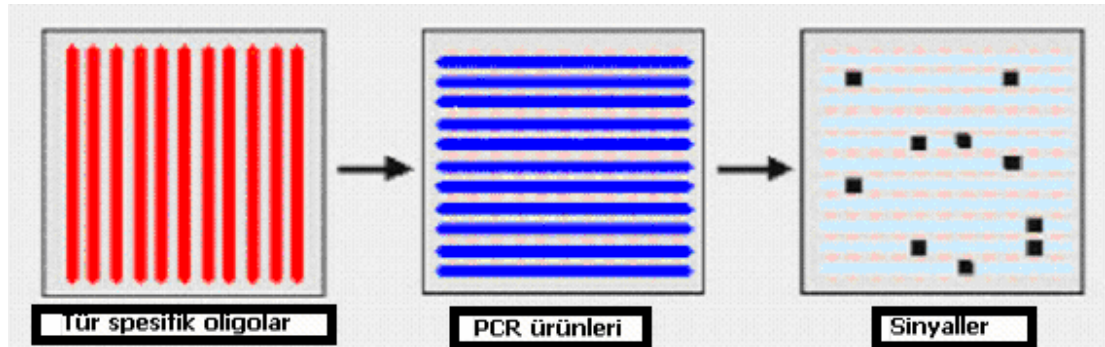
Test PCR, probların membrana bağlanması, PCR ürünleri ile probların hibridizasyonu ve sonuçların görüntülenmesi olmak üzere başlıca 4 aşamadan oluşmaktadır (Gubbels ve ark. 1999, Vatansever ve ark. 2003b, Biotech 2004, Bilgin 2007).

PCR aşamasında kullanılacak olan primerler aranacak etkenlerin 16 S ve/veya 18S rDNA bölgelerinden bir DNA parçasını amplifiye edecek şekilde seçilir. Kullanılacak olan reverse primer biotinle işaretlidir. Yapılan PCR sonucu elde edilen ürünler aranan tüm parazitlerde mevcut olan ortak DNA bölgesi ürünlerini içermektedir. Primerler yardımıyla amplifiye edilen bölgeden her bir parazite özgü olan problar seçilir. Seçilen bu probların 5' uçları amino grubu içerecek şekilde sentezletilmektedir. Problar miniblotter tanklarındaki slotlara ayrı ayrı dökülerek bunların Biodyne-C membrana kovalent olarak bağlanması sağlanmaktadır. Membran tanktaki oluklarla dik açı yapacak şekilde döndürülür. PCR ürünleri denatüre edildikten sonra miniblotter tankının oluklarına dökülerek membrana sabitlenmiş olan aminolinkerli problarla hibridizasyonu sağlanır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Hibridizasyon prensibinin şematik olarak gösterilmesi (Biotech 2004)

Membran yıkandıktan sonra peroksidaz ile işaretli streptavidinle muamele edilerek streptavidin-biotin kompleksinin oluşması sağlanır. Oluşan kompleksin görünür hale gelmesi için membran son olarak ECL ile muamele edilir ve oluşan reaksiyon karanlık bir ortamda hyperfilm'e aktarılarak banyo edilir (Şekil 1.10) (Bilgin 2007).



Şekil 1.10. RLB testinin şematik görüntüsü (Biotech 2004)

Polimeraz zincir reaksiyonu ile hibridizasyonun bir arada kullanılmasını sağlayan RLB tekniğinin en önemli özelliği bir hayvanda kanda bulunan tüm protozoonların aynı anda tespit edilmesine imkan vermesidir. PCR aynı anda bir hayvandaki kan protozoonlarının tümünün belirlenmesine imkan vermemektedir.

Ancak RLB tekniğinde çeşitli patojenleri tanımlayan çok sayıda prob kullanılarak hayvanda bulunan tüm kan parazitlerinin aynı anda belirlenmesi söz konusudur (Almeria ve ark. 2009). RLB tekniği günümüzde hayvanlara bulaşan kene kaynaklı tüm hastalıkların teşhisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Georges ve ark. 2001). Bu teknik ilk defa Saiki ve ark. (1988) tarafından insanlarda orak hücreli anemi ile β Talasemi hastalıklarının teşhisinde kullanılmıştır. Daha sonra bu teknik kullanılarak değişik çalışmalar yapılmıştır. Rijpkema ve ark. (1995) aynı kenede bulunan dört *Borrelia* türünü bu tekniği kullanarak tespit etmişlerdir. Yine *Mycobacterium tuberculosis*'in teşhisi ve tiplendirilmesi de aynı teknik kullanılarak yapılmıştır (Kamerbeek ve ark. 1997).

RLB sığırlardaki *Theileria* türlerinin belirlenmesinde, ilk defa Gubbels ve ark. (1999) tarafından kullanılmıştır. Bu araştırmacılar 18S rRNA genindeki V4 değişken bölgesini çoğaltan primerleri kullanarak elde ettikleri PCR ürünlerini RLB tekniğinde kullanmışlardır. Çalışmaları sonunda sığırlardaki *T.parva*, *T.annulata*, *T.mutans*, *T.taurotragi*, *T.velifera*, *T.buffeli*, *B.bigemina*, *B.bovis* ve *B.divergens*'in aynı anda tespit edilebileceğini göstermişlerdir. *Theileria* ve *Babesia* türlerinin saptanmasında bu tekniğin serolojik ve mikroskopik tekniğe göre daha duyarlı olduğu Almeria ve ark. (2002) tarafından ifade edilmiştir.

RLB tekniği kanda bulunan protozoonların yanı sıra riketsial etkenlerin de teşhisinde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Schouls ve ark. 1999). Georges ve ark. (2001) 18S rRNA ve 16S rRNA bölgelerini çoğaltan primerlerle yaptıkları PCR'ın ürünlerini kullanarak *T.annulata*, *T.buffeli/orientalis*, *B.bigemina*, *B.bovis*, *B.divergens*, *Ehrlichia bovis*, *A.marginale* ve *A.centrale*'yi aynı anda tespit etmişlerdir.

Son yıllarda ülkemizde de bu test hayvanlarda kan protozoonlarının tespit edilmesinde kullanılmaya başlanmıştır (Deniz 2003, Altay ve ark. 2007a, Altay ve ark. 2008b, İnci ve ark. 2010).

Son yıllarda bu teknik hayvanların üzerinden toplanan kenelerde bulunan kan parazitlerinin teşhisi amacıyla da kullanılmaktadır. Mghirbi ve ark. (2010) Tunus'ta sığırlardan toplanan 576 erişkin kenede aynı anda *Theileria* spp. ve *Babesia* spp. varlığını saptamışlardır. Türkiye'de de İça ve ark. (2007b) sığırlardan toplanan Ixodid

kenelerden hazırlanan kene havuzlarında *Theileria* spp., *Babesia* spp., *T.annulata*, *T.buffeli/orientalis*, *B.bigemina*, *B.bovis* ve *B.divergens* varlığını bu tekniği kullanarak araştırmışlardır.

1.14. Theileriosis Tedavisi

Theileria annulata tarafından oluşturulan Tropikal theileriosis'e karşı günümüze kadar çok sayıda farklı preparatlar denenmiştir. Bu preparatlar parvaquone, buparvaquone, arsenik bileşikleri, sülfonamidler, halofuginon, antimon bileşikleri, acridin türevleri, bizmut bileşikleri, 4-8 amino quinolein derivelere, diazoamino benzol türevleri, antibiyotikler ve biyolojik maddelerdir (Can ve ark. 1987).

Yapılan tedavi denemelerinde, etiyolojik ve semptomatik tedavinin birlikte uygulandığı durumlarda ve etiyolojik tedavide birkaç preparatın birlikte uygulandığı durumlarda daha başarılı sonuçlar alınmıştır (Can ve ark. 1987).

MacHardy (1984) *T.annulata*'ya karşı 20 mg/kg kas içi tek doz halinde verilen parvaquone'nin enfeksiyonun birinci gününde tedavi edilen 4 sığırın tümünde başarılı olduğunu, yine ateş ve şizontların görüldüğü hastalığın üçüncü gününde tedavi edilen 4 sığırdan da başarılı sonuçların alındığını bildirmiştir. Yapılan kapsamlı çalışmalar sonucu parvaquone'nin güvenilir bir ilaç olduğu ve kas içi uygulandığında çok az veya hiç bir yan etki gelişmediği bildirilmiştir (Güralp 1985).

Buparvaquone ülkemizde sığır theileriosisi tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçtır. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada bu etken maddenin *T.annulata*'dan ileri gelen theileriosis'e karşı etkili olduğu bildirilmiştir. *Theileria annulata* ile doğal enfekte sığırların tedavisinde buparvaquon, 2.5 mg/kg dozda intramuskuler olarak uygulandığında etiyolojik, klinik ve laboratuvar bulguları bakımından etkili olduğu bildirilmektedir (Paşa 2008).

Son dönemlerde Tunus'ta *T.annulata*'nın buparvaquone karşı direnç geliştirdiği in vivo çalışmalarla gösterilmiştir (Mhadhbi ve ark. 2010). Daha sonra ülkemizde Aydın bölgesinde 2 farklı izolatta sitokrom B üzerinde dirençle ilgili

olabileceği düşünölen mutasyonlar belirlenmiştir (Üner ve ark. 2011). Yine Sharifiyazdi ve ark. (2012) parazitin mitokondrial sitokrom B geni üzerinde bu ilaca karşı direnç gelişmesine neden olan nokta mutasyonların varlığını ortaya koymuşlardır.

Theileriosis tedavisinde antibabesial ilaçlar fazla etkili değildir, fakat primaquin diphosphate ve imidocarb dipropionate'in *T.orientalis* ve *T.sergenti* enfeksiyonlarında parazitemiyi azalttığı gösterilmiştir. Primaquin diphosphate 1 mg/kg, imidocarb dipropionate ise 1.2 mg/kg dozda uygulanır (Mehlhorn 2004).

Theileria tedavisinde tetrasiklinlere de başvurulmaktadır. Bu gruptaki ilaçlar parazitin şizont dönemini baskıladığından, klinik enfeksiyonlarda destek tedavi ve kimyasal immunizasyon amacıyla kullanılmaktadır (Mehlhorn 2004).

1.15. Theileriosis'te Korunma ve Kontrol

Theileriosis'ten korunma tedaviden daha kolay ve ekonomiktir. Hastalığın endemik olduğu bölgelerde kene mücadelesi, hayvan hareketlerinin kontrolü, hastalığa dirençli sığır ırklarının geliştirilmesi ve aşlamayı içine alan stratejik kontrol programları uygulanmalıdır (Brown 1990, Aktaş ve Dumanlı 2010).

1.15.1.Vektör Kenelerle Mücadele

Theileriosisin etkilerini azaltmada endemik bölgelerde kullanılan klasik yöntemlerden biri vektör kenelerle yapılan mücadeledir. Hastalığın hayvanlara naklinin önlenmesinde ortaya konulan ana hedef duyarlı olan konak ile vektör kenenin temasını önleyerek, enfeksiyonun omurgalı konağa naklini engellemek ya da omurgalı hayvanları hastalığa karşı en dirençli oldukları dönemde enfekte kenelere maruz bırakarak enzootik stabilite oluşumunu sağlamaktır. Etkili yöntemlerden biri *T.annulata*'nın vektörlüğünü yapan *Hyalomma* cinsi kenelerle mücadele edilirken barınakların ve hayvanların akaridlerle ilaçlanmasıdır (Brown 1990). Akarisidlerle

yapılan kene mücadelesinde pek çok sorun bulunmaktadır (Tait ve Hall 1990). Uygulamanın başarılı olabilmesi için mücadele programının çok iyi planlanmış olması gerekir. Akarisidlerin uzun süre kullanılması kenelerin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesine neden olabilmektedir (Karagenç ve Eren 2002). Akarisidlerle mücadele enzootik stabilite olmayan yerlerde önemlidir. Enzootik stabilite olan yerlerde akarisidlerle yapılan kene mücadelesi, kene popülasyonunu azaltarak bölgenin instabil hale gelmesine neden olmaktadır. Bu durumda akarisid kullanımındaki herhangi bir aksama bölgede ciddi enfeksiyonların oluşumuna neden olur (Norval ve ark. 1992, Deniz 2003, Bilgin 2007). Akarisid mücadelesinin aynı zamanda pahalı olması, ilaçların hayvanların et ve sütlerinde kalıntı bırakmaları ve çevreyi kirletme gibi dezavantajları vardır (Norval ve ark. 1992).

1.15.2. Dirençli Irkların Kullanılması

Kene kaynaklı enfeksiyonların kontrolünde en önemli yollardan biri hastalıklara dirençli ırkların geliştirilmesidir. Theileriosis ve kene enfestasyonlarına karşı geliştirilen dirençli ırklar enfeksiyonun yayılışının kontrol altına alınmasında büyük pay sahibidir (Brown 1990). Bakheit ve Latif (2002) tarafından yapılan bir deneysel çalışmada Sudan'da yerli Kenana ırkı ile ithal Friesian ırkı sığırlar *T.annulata*'nın öldürücü dozları ile enfekte edilmiş, Kenana ırkı sığırların sadece iki tanesi tedaviye ihtiyaç duyarken, Friesian ırkı sığırların tümünün öldüğü ifade edilmiş, neden olarak da enfeksiyon sırasında Kenana ırkı sığırlarda düşük şizont parazitozu görülmesi ve lökopeninin azalması sonucu meydana gelen düşük lenfoid doku hasarıyla ilgili olduğu düşünülmüştür. Hindistan'da ithal hayvan sayısının azaltılarak Tropikal theileriosis'in prevalansının düşürüldüğü bildirilmiştir (Glass ve ark. 2005).

Tropikal theileriosis enfeksiyonlarından korunmada, kene enfestasyonlarına karşı dirençli ırkların geliştirilmesi dolaylı yolla etkilidir. *Bos indicus* ırkı sığırların, *Bos taurus*'lara oranla %10-40 oranında daha az kene taşıdıkları ifade edilmiştir (Campbell 1978).

1.15.3. Theileriosis'te Aşılama

Theileriosiste aşılama ilk defa Cezayir'de patent dönemde enfekte hayvanlardan alınan kanların mekanik olarak sığırlara enjekte edilmesi ile başlamıştır. Bu çalışmada düşük virulense sahip suş ile enfekte edilen hayvanlardan alınan kan sığırdan sığıra mekanik olarak nakledilerek parazitin merozoite dönüşme yeteneği kaybolmuş ve bu kanlar transfüzyon yoluyla enfekte olmayan hayvanlara verilerek koruma sağlanmıştır (Sergent ve ark. 1945).

Ülkemizde kullanılan Tropikal theileriosis aşısı 1982 yılından beri Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilmektedir. Aşı Ankara yöresi izolatından elde edilmektedir (Onar 1989). Özkoç ve Pipano (1981) tam attenüasyonun ancak 250'inci pasajda elde edildiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak ileri pasajlarda aşının virulens kazanmadığı da saptanmıştır.

Birçok ülkede başarılı bir şekilde kullanılan attenüe canlı aşılardan bazı dezavantajları da söz konusudur. En önemli dezavantaj hayvanın başka patojen ajanlarla enfekte edilebilme riskinin olmasıdır. Aşı hazırlanması zaman almakta, zor ve hazırlanan aşı serisinin kontrol edilmesi maliyeti arttırmaktadır. Aşı kısa süreli bir koruma sağlamakta ve endemik stabilite yoksa aşı tekrarlanmalıdır. Aşının bu gibi olumsuzluklarının önüne geçmek amacıyla rekombinat aşı çalışmaları son yıllarda önem kazanmaya başlamıştır (Karagenç ve Eren 2002).

Hücre kültürü aşıları, dünyanın her tarafında endemik bölgelerde kullanılmaktadır. Makroşizontların hayvana inoküle edildikten sonra konak mononükleer hücrelerine girerek yerleşme özelliğinden faydalanılarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Şizontlar ile enfekte edilen hücre kültürleri *in vitro* ortamda pasajlanarak attenüe edilmektedir (Darghouth ve ark. 1996, Pipano ve Shkap 2000) Tropikal theileriosis'e karşı korumada makroşizont ile enfekte hücre kültürü aşıları önemli bir yer tutmaktadır. *Theileria annulata* hücre kültürü aşıları Türkiye dahil dünyanın çeşitli ülkelerinde kullanılmaktadır. *Theileria annulata*'nın *in vitro* kültürünün yapılabilmesi ile doku kültürü aşıları da geliştirilmeye başlanmıştır (Tsur ve ark. 1964). *Theileria annulata*'nın şizont formlarının *in vitro* kültürünün yapıldığı 1945 ile 1965 yılları arasında Tropikal theileriosis'e karşı aşılamada önemli ilerlemeler meydana gelmiştir (Tchernomoretz 1945, Nalbantoğlu 1998). Parazitin *in*

vitro subkültivasyonu yapıldığında, enfeksiyon oluşturma yeteneğini zamanla kaybettiği ve daha sonra etkenin sığırlara inokülasyonu sonucu konakta merozoit ve piroplasmaların şekillenmediği Brown tarafından bildirilmiştir (Nalbantoğlu 1998). Hücre kültürü aşılı ile aşılama sonrası immunitenin ne kadar süre kaldığı konusunda yeterli miktarda araştırma yoktur. Ancak bazı çalışmalarda tekrarlayan bir enfeksiyon olmadığı takdirde aşılama sonrası 6 ay ile 3.5 yıl arasında koruyuculuk sağladığı rapor edilmiştir (Zablotsky 1991, Beniwal 2000). Kullanılan doza bağlı olarak kimi aşılama sonrası yedi ay gibi bir sürenin sonuna kadar koruma sağlanamadığı bildirilmiştir. Bu durum tekrarlayan enfeksiyonların yeterli olmadığı dönemlerde bölgedeki hayvanların tekrar aşılama gerektirdiğini göstermektedir (Ouhelli ve ark. 1994).

Hücre kültürü aşılı theileriosis'e karşı korumada başarılı olmasına rağmen, hazırlanmasının zahmetli olması, bunların kısa sürede bozulması (Zhang 1991), soğuk zincirde transfer edilmesi gerekliliği, oluşan bağışıklığın piroplasmaların oluşmasını tam olarak engelleyememesi ve aşılama sonrası taşıyıcı olması (Zablotsky 1991), aşılama sonrası diğer patojenlerin bulaşabilme riski olması, gebe ve laktasyon dönemindeki hayvanlarda aşılama sonrası meydana gelen kısa süreli ateş (Hashemi-Fesharki 1988) bu aşılama kullanımını kısıtlamaktadır. Bu istenmeyen durumların ortadan kaldırılması için subunit aşılama kullanılabilir. Weir (2006)'e atfen Bilgiç (2010) *T.annulata*'nın sporozoitlerine karşı kullanılacak aşılama sayesinde parazitin enfektif dozunda yani hücreleri enfekte eden parazit sayısında azalmaya bağlı klinik bulguların azalmasının sağlanabileceği, buna ek olarak mononükleer hücrelerin çoğalmasının ve patolojik etkilerinin kontrolü için makroşizont dönemine spesifik antijenler kullanılarak subunit aşılama geliştirilebileceği ve son olarak eritrosit enfeksiyonunun azalması ve hastalığın vektör kenelere naklinin engellenmesi için merozoit/piroplasma dönemine karşı geliştirilen subunit aşılama kullanımını bildirmiştir. Günümüze kadar subunit aşılama sporozoit antijenleri, makroşizont antijenleri ve merozoit/piroplasma antijenleri kullanılmıştır.

Williamson (1988)'a atfen Bilgiç (2010) enfekte kenelerle reenfestasyona maruz kalan hayvanlarda sporozoitlere karşı humoral bir bağışıklık şekillendiğini

bildirmiştir. İnaktive edilmiş sporozoitler kullanılarak yapılan deneysel bir çalışmada, hayvanlar tekrar enfeksiyona maruz bırakıldıklarında makroşizont gelişiminde yavaşlama görüldüğü bildirilmiştir. Aynı zamanda, sporozoitlere karşı doğal ortamda gelişen bağışıklığın hayvanları Tropikal theileriosis'e karşı tam olarak korumasının beklenemeyeceği ileri sürülmüştür (Williamson ve ark. 1989).

Theileria annulata sporozoitlerine karşı gelişen humoral bağışıklıktan sorumlu antijeni kodlayan gen bölgesi Williamson ve ark. (1989) tarafından belirlenmiş ve araştırmacılar tarafından bu bölge SPAG-1 olarak isimlendirilmiştir. Araştırmacılar IFA testleri ile sporozoitlere özel monoklonal antikoları üreten hibridoma hücrelerini belirlemişlerdir. *Theileria annulata* sporozoitlerine karşı elde edilen bu antikorlardan biri olan 1A7 ve *T.annulata* sporozoit ekstraktlarına karşı bir seri polipeptid belirlenmiş ve polipeptidlerin tek bir genin proteolitik prosesinin bir ürünü olduğu düşünülmüştür (Williamson ve ark. 1989). Hall ve ark. (1992) SPAG-proteininde PGVGV ve VGVAPG peptid motiflerinden oluşan tekrarlı bölgelerin genin N-terminal kısmında bulunduğu ve bu motiflerin sığır elastinlerinde bulunan tekrarlı bölgeler ile amino asit düzeyinde yüksek benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu tekrarlayan bölgelerin varlığı sporozoitlerin hücreye girişte sığır elastin reseptörlerine bağlanarak, elastine benzer davranış ortaya koyduğu düşünülmüş, buna ek olarak bölgenin polimorfik olduğu (Katzner ve ark. 1994) ve sporozoitlerin elastin reseptörü bulunmayan hücrelere girebildiği de anlaşılmıştır (Campbell ve ark. 1994). SPAG-1 ile sığır elastini arasındaki tekrarlı alanların benzerliği iki şekilde açıklanmıştır. Bunların ilkinde, parazitin konak proteinleri ile benzerlik gösteren alanları kullanarak bağışık yanıtın korunduğudur. Ancak bu durumda, SPAG-1 proteini kullanılarak yapılan aşılmalarda konakta ya oto immun hastalık tablosu ya da proteine karşı bağışık yanıt geliştirmeme ortaya çıkmalıdır. Elastin reseptörlerinin VGVAPG elastin peptidlerine bağlanarak, *T.annulata* sporozoitlerinin tercihen invaze oldukları monositik hücrelerin pozitif kemotaksisinde rol oynadığı bilinmektedir (Blood ve ark. 1988).

Ankara (A₂) hücre kültüründen elde edilen merozoitlerin yüzeyindeki *T.annulata* immunodominant merozoit ve piroplasma antijeni olan Tams-1'in belirlenmesi ile bu protein üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır. Daha sonra yapılan

çalışmalarda, TaA₂ stoğundan elde edilen klonlarda bu moleküle ait 30 kDa ve 32 kDa moleküler ağırlığında iki varyant belirlenmiştir. Alleller arasında korunmuş antijenik epitoplar olmasına karşın, her proteine özgün epitoplar belirlenmiştir (Dickson ve Shiels 1993). *Theileria sergenti* üzerinde yapılan çalışmalar sonucu baskın merozoit/piroplasma yüzey antijenini (MPSA) kodlayan gen Sugimoto ve ark. (1991) tarafından belirlenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda 32 kDa'luk bu proteindeki antijenik farklılık ve 23 kDa merozoit/piroplasma proteini belirlenmiştir (Zhuang ve ark 1995, Kubota ve ark. 1996).

TaMS1 geni üzerinde yapılan RFLP analizleri sonucunda Tams-1 geninin tek kopya gen olduğu ve bundan dolayı farklı haploid genotiplere uygun genin farklı allellere ait RFLP profilleri belirlenmiştir (Shiels ve ark. 1995). Tams-1 olarak isimlendirilen gene ait farklı boyutlardaki allelleri Tams-1 (30 kDa) ve Tams1-2 (32 kDa) olarak adlandırılmıştır. Tams-1 geninin *T.buffeli/orientalis* grubu, *T.sergenti* ve *T.parva* (TpMS1) türlerindeki ortologları karşılaştırıldığında yüksek oranda polimorfizm gözlenmiş bu da proteinin N terminaldeki 50 ve 60. kısmındaki muhtemel glikolizasyon bağlanma bölgesinden kaynaklanabileceği, Tams1-1 ve Tams1-2 polipeptidleri arasında gözlenen moleküler ağırlık farkının bu glikolizasyon kısmındaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünölmüştür (Katzner ve ark. 2002). Bununla birlikte çalışmada Tams-1 genine ait protein eksprese eden kısımların bazı bölümleri birbiri üstüne gelecek şekilde epitopları belirlenmeye çalışılmış ve sonuçta molekülün tamamına karşı geliştirilen antiserum ile bir monoklonal antikorun proteinin birbirinden bağımsız epitopları ile reaksiyon verdiği görölmüş ve bunun da proteinin tersiyer konfirmasyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca proteinin korunmuş bölgelerine ait epitopların tersiyer yapı tarafından maskelenerek konak bağışık yanıtına karşı korurken, farklılaşmış bölgelerin konakta bağışık yanıt oluşması için bağışıklık hücrelerine sunulduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak TaMS1 proteininin kendi ile birleşerek kompleksler, veya parazit yüzeyinde kafes şeklinde polimerik yapılar oluşturabileceği gösterilmiştir. TaMS1 geninde görölen çeşitliliğın araştırılmasında yapılan çalışmalarda kullanılan izolatlarda (Tunus, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Hindistan) hem amino asit hem de nükleotid bazında aynı oranda çeşitlilik ya da farklılık görölmüş ve Tunus populasyonlarında yüksek oranda heterojeniteye

rastlanmıştır (Shiels ve ark. 1995, Katzer ve ark. 1998, Gubbels ve ark. 2000). Bu sonuçlar ile yapılan dN/dS analizleri, *T.annulata* Tams-1 proteinlerinde pozitif seleksiyon oluştuğunu göstermiştir (Molano ve ark. 1992). İntragenik rekombinasyonda rol alan altı bölge belirlenmiş ve molekülün korunmuş kısımlarının fonksiyonel/yapısal rol alırken, değişken bölgelerin konak bağışıklık sisteminden korunmak için gelişim esnasında farklılaştığı öne sürülmüştür (Gubbels ve ark. 2000). *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* kullanılarak Tams1-1 ve Tams1-2 proteinlerinin iç bölgeleri rekombinant olarak üretilip sığırların aşılmasında kullanılmış ve tüm rekombinant proteinler bağışık sığır serumları tarafından belirlenmiştir (d'Oliveira ve ark. 1996). Daha sonra yapılan çalışmada, Tams-1 rekombinant proteini ile aşılana hayvanlarda *T.annulata* kan stabilatı ile oluşturulan reenfeksiyonlara karşı korunma oluşmuş ve her hangi klinik belirti gözlenmemiştir. Aşılana hayvanlardan reenfeksiyon oluşturulmadan önce alınan serum örnekleri kullanılarak yapılan IFA testi sonucunda piroplasmaların yüzey kısımlarında reaksiyon oluşmuştur. Korunma dolaşımdaki anti-Tams1 antikorlarının merozoitlere bağlanıp onları opsonize ederek ya da eritrositlere invazyonu inhibe ederek gelişmiş olabileceği ifade edilmiştir. Reenfeksiyonda kullanılan yöntem nedeniyle çalışmada gözlenen klinik bulguların sadece parazitin eritrositik dönemine karşı geliştiği belirtilmiştir. Ayrıca, aşılana iki hayvanda rekombinant proteinlere karşı herhangi bir reaksiyon gözlenmemiş ve bu hayvanlardaki bağışıklığın T hücre bağımlı olduğu düşünülmüştür (d'Oliveira ve ark. 1997).

Konakta doğal koruyucu bağışıklığın gelişmesinde makroşizontlar ile enfekte lökositlere karşı oluşan hücre aracılı cevabın önem taşıdığı ve Tropikal theileriosis'e karşı geliştirilen rekombinant aşılarda şizont safhasının büyük öneme sahip olduğu belirtilmiştir (Preston ve ark. 1999). Weir (2006)'e atfen Bilgiç (2010) Tropikal theileriosis'e karşı gelişen doğal bağışıklığın genelde diğer suşlara karşı da koruma sağladığı, *T.annulata* ile bulaşmada patogenezin enfekte lökositlerde ortaya çıkan kontrolsüz çoğalma sonucu oluştuğu ve bu nedenle, parazitin şizont dönemine karşı geliştirilecek olan aşılara hem konak hücre çoğalmasını hem de metastazını önleyebileceği veya azaltabileceğini ve bunun sonucunda hastalığın şiddetinin azaltılmış olacağını ifade etmiştir. Farklı coğrafik bölgelere ait izolatlar karşılaştırıldığında sadece farklı coğrafik bölgeler arasında değil aynı zamanda tek

izolata ait farklı klonlarda da farklılıklar görülmüştür. Farklı izolatlara ait TaSP'nin ilk 37 ve son 121 amino asitlik kısmının iyi şekilde korunmuş olmasına karşın 154–171 aminoasitler arasında merkezi bölgede değişiklikler ve büyüklük farkları bulunmuştur (Schnittger ve ark. 2002). Awadia ve ark. (2008) *T.annulata*'nın farklı izolatları ve farklı bölgelerden izole edilen hücre kültürleri kullanılarak yaptıkları çalışmada, proteinin aminoasit düzeyinde yüksek oranda farklılıklara rastladıklarını ifade etmişlerdir. TaSP molekülünün 26–157'nci amino asitlerinden oluşan kısmı rekombinant olarak üretilmiş ve buna karşı geliştirilen antiserumlar kullanılarak yapılan IFA testi sonucunda molekülün parazit çekirdeği ile makroşizontların yüzeyinde yoğunlaştığı bulunmuştur.

Theileria annulata ile enfekte sekiz farklı serum kullanılarak yapılan çalışmada tüm serumların rekombinant protein ile kuvvetli reaksiyon gösterdiği bulunmuştur (Schnittger ve ark. 2002). Bu da TaSP molekülü üzerinde B hücre epitoplarnın varlığını ve bu moleküle karşı konağın geliştirdiği humoral bağışık yanıtı göstermektedir. Bununla birlikte *T.parva* ve *T.annulata* arasında herhangi bir çapraz reaksiyon olup olmadığı belirlenmemiştir. Ayrıca, Çin'de *Theileria* spp. ile enfekte küçük ruminantlarda alınan serum örnekleri kullanılarak yapılan çalışmada, serum örneklerinin çoğu hem ELISA hem de Western blot ile TaSP ile çapraz reaksiyon göstermiştir ve bu iki tür arasında yüksek oranda benzerlikler olduğunu düşündürmüştür (Miranda ve ark. 2004). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda *T.annulata*'nın sporozoit, şizont ve piroplasma dönemlerinde eksprese edilen bir protein belirlenmiş ve TaD olarak adlandırılmıştır (Schneider ve ark. 2004).

Son dönemlerde yapılan çalışmalarda tek bir gen bölgesi tarafından kodlanan, piroplasma ve şizont dönemlerinde eksprese edilen ve farklı parazit suşları arasında %95 oranında korunmuş olan *T.annulata* proteini (TaSE) tanımlanmıştır. Bu proteinin parazitin içinde, membranında ve konak hücre sitoplazmasında yerleştiği ve bunlara ek olarak konak hücre mikrotubulleri ile birlikte yerleşim gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Proteinin yerleşim bölgeleri göz önüne alındığında hücre transformasyonunda rol alabileceği öngörülmüş, buna ilaveten korunmuş amino asit dizilimlerine sahip olması ve konak hücre sitoplazmasına salgılanması proteinin sınıf I molekülleri tarafından konak tarafından sunulabileceğini ve sub unit aşılmalarda kullanılabileceğini düşündürmüştür (Schneider ve ark. 2007).

Bu tezde reverse line blotting (RLB) yöntemi kullanılarak Kırıkkale yöresinde sığırlarda, daha önce ülkemizin çeşitli bölgelerinde tespit edilen *T.annulata* ve *T.buffeli/orientalis*'in varlığının ve yaygınlığının araştırılması ve yöntemin mikroskopik muayene ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. *Theileria* türleri ülkemizin geniş bir alanına yayılmış olup, ülkemiz hayvancılığında önemli bir ekonomik kayıp oluşturmaktadır. Bu etkenlerin Kırıkkale yöresinde bulunduğu bilinmesine rağmen bu bölgedeki yayılışı ve hangi türlerin bulunduğu dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın Kırıkkale'de ilk defa sığırlarda *Theileria* türlerinin moleküler olarak tür teşhisi ve bölgede enfeksiyonun yayılışının belirlenmesi bakımından önemli olacağı düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örnek Alınacak Hayvan Sayısının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak örnek sayısının belirlenmesi sırasında öncelikle Kırıkkale yöresindeki toplam hayvan sayısı Tarım İl Müdürlüğü verilerine göre tespit edildi. Çalışma kapsamına alınan 1 yaş ve üzeri sığırların sayısı bu verilere göre 21140 olarak belirlendi. 21140 sığırın Minitab 15.1.30.0 paket programında $\alpha= 0.05$ I. tip hata yapma olasılığı ile güç değeri 0.95 olarak hesaplandı ve sonuçta örnek alınacak hayvan sayısı 294 olarak bulundu. İlçelerden alınacak hayvan sayısı belirlenirken, ilçede var olan 1 yaş üzeri sığırların oranı ile orantılı olmasına dikkat edildi (Çizelge 2.1).

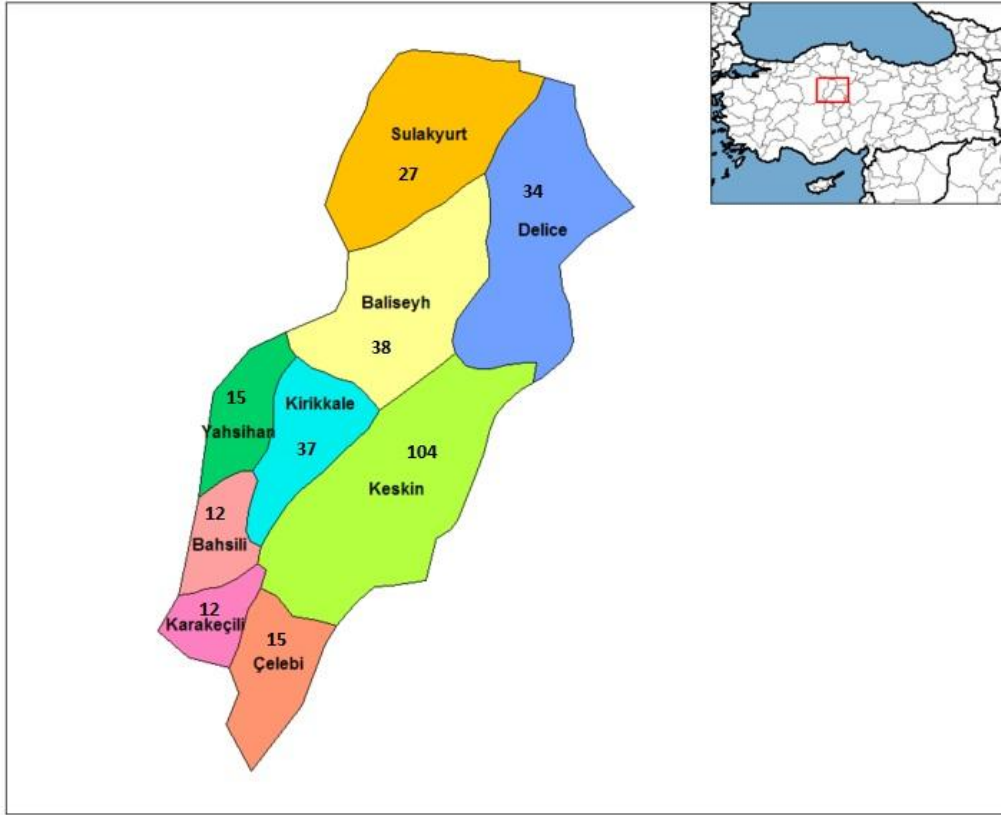
Çizelge 2.1. Çalışma kapsamında örnek alınan ilçe, çiftlik, toplam hayvan sayısı ve örnek sayısı

Örnek alınan ilçeler	Örnek alınan çiftlik sayısı	İlçelerdeki 1 yaş üzeri sığır sayısı	Örnek alınan hayvan sayısı
Kırıkkale Merkez	16	2700	37
Balışeyh	4	2750	38
Bahşılı	2	800	12
Çelebi	4	1000	15
Delice	6	2500	34
Karakeçili	5	900	12
Keskin	8	7490	104
Sulakyurt	3	2000	27
Yahşihan	3	1000	15

2.2. Saha Çalışmaları

Bu araştırmada saha çalışmaları Mayıs 2010-Ekim 2010 tarihleri arasında Kırıkkale ilinde gerçekleştirilmiştir. Kırıkkale 39.846821 kuzey enlemi ve 33.525251 doğu boylamında yer alır. Sert bir kara ikliminin sürdüğü Kırıkkale ilinde, hava sıcaklığı -21 ile +39 °C arasında değişir. Kışları soğuk, yazları ise sıcak geçer. Bölge iklimi *Theileria* türlerinin vektörlüğünü yapan *Hyalomma* cinsi keneler için uygundur. Örnek toplama işlemi Mayıs 2010- Ekim 2010 tarihleri arasında il'in 9 ilçesine

(Kırıkkale Merkez, Balıseyh, Bahşılı, Çelebi, Delice, Karakeçili, Keskin, Sulakyurt, Yahşihan) ait 24 köy ve 51 çiftlikte gerçekleştirildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çalışma kapsamında kan örneklerinin alındığı odaklar ve alınan örnek sayısı

2.2.1. Numunelerin Toplanması

Numuneler toplanırken Katmanlı rastgele örnekleme (Stratified random sampling) yöntemi ile ulaşılan her bir çiftlikten %10 örnekleme yapıldı ve her bir çiftlikten alınan örnek sayısı birbirinden bağımsız hesaplandı. Çalışma kapsamındaki hayvanların Kırıkkale'de yetişmiş olan hayvanlardan seçilmesine özen gösterildi. Hayvanların yaşı, ırkı, cinsiyeti, theileriosis'e karşı aşılanıp aşılanmadığı, daha önce enfeksiyon geçirip geçirmediği, akarisit kullanılıp kullanılmadığının belirlenmesi amacıyla hayvan sahibinin bilgisine başvuruldu ve bilgiler kayıt altına alındı. Örnek alınan hayvanların genel muayeneleri yapıldı ve üzerlerinde kene olup olmadığı kontrol edildi.

Çalışma kapsamında örnek alınacak hayvanların 1 yaş ve üzerinde olmasına ve en az bir enfeksiyon dönemini geçirmiş olmasına dikkat edildi. Kan örnekleri 22 erkek, 272 dişi sığırdan toplandı. Örnek alınan erkek hayvanlar 1-4 yaşları arasında, dişiler ise 1-18 yaşları arasındaydı. İncelenen sığırlar 1-3 yaşlı, 4-6 yaşlı, 7-9 yaşlı ve 10 yaş ve üzerindeki hayvanlar olarak 4 farklı grupta değerlendirildi (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Örnek alınan sığırların yaş ve cinsiyetine göre oranları

Yaş	Erkek	%	Dişi	%	Toplam
1-3 yaşlı	21	95.5	120	44.1	141
4-6 yaşlı	1	4.5	112	41.2	113
7-9 yaşlı	0	0	34	12.5	34
10 yaş ve üzeri	0	0	6	2.2	6

Çalışma kapsamında 9 farklı ırka mensup sığırdan örnek alındı. Örnek alınan sığırlar genellikle kültür ırkı (%64) ve melez (%32.7), çok az bir kısmı ise (%3.3) yerli ırklarımızdandı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Örnek alınan hayvanların ırklara göre dağılımı

İrklar	Örnek alınan hayvan sayısı	Oranı (%)	Kültür ırk ve yerli ırk Sayısı ve oranı
Holstein	105	35.7	Kültür ırkı: 188 (% 64)
Simental	36	12	
Montofon	43	15	
Jersey	3	1	
Belçika mavisi	1	0.3	
Yerli kara	8	2.7	Yerli ırk: 10 (%3.3)
Bozırk	1	0.3	
Anadolu esmeri	1	0.3	
Melez	96	32.7	96 (%32.7)

DNA ekstraksiyonunda kullanılacak kanlar steril vakumlu, 3 ml'lik EDTA'lı tüplere, her bir hayvanın vena jugularis'inden tekniğine uygun olarak alındı. Alınan kan örnekleri soğuk zincirde Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Laboratuvarı'na getirildi. DNA ekstraksiyonu yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.2. Frotilerin Hazırlanması

Mikroskopik muayene için, kan alınan tüm hayvanların kulak ucundan 4'er adet yayma frotileri hazırlandı (Şekil 2.2). Hazırlanan frotiler havada kurutulduktan sonra metil alkolle 5 dakika tespit işlemi yapıldı. Tespit işleminden sonra frotiler uygun preparat kutularına yerleştirilerek Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na incelenmek üzere getirildi.



Şekil 2.2. Frotiler hazırlanması amacıyla kulak ucundan kan alma

2.4. Laboratuvar Çalışmaları

2.4.1. Yayma Kan Frotilerinin Boyanması

Sahadan tespit edilmiş şekilde laboratuvara getirilen yayma kan frotileri taze hazırlanmış %5'lik Giemsa boya solüsyonu ile oda ısısında 40 dakika boyamaya

bırakıldı (Şekil 2.3). Süre sonunda preparat üzerindeki fazla boyalar distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak, kamera bağlantısına (ICC50) sahip, ışık mikroskobunun (Leica DM 750) 100'lük objektifinde *Theileria* spp. varlığı yönünden incelendi. Her bir hayvandan hazırlanan 4'er adet frothinin her birinden eritrositlerin homojen dağıldığı, rastgele seçilen 200 er bölge incelendi. Tek bir etkenin görülmesi halinde dahi hayvan pozitif kabul edildi. *Theileria* spp. piroplasmaları yönünden pozitif bulunan örneklerin fotoğrafları çekildi.



Şekil 2.3. Kan frotilerinin Giemsa boyası ile boyanması

2.4.2. DNA Ekstraksiyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyonu ticari kit (Vivantis Nucleic Acid Extraction kit, GF-1 Blood DNA ekstraksiyon, GF-BD-100: 100 preps, Malezya) kullanılarak yapıldı.

Kitin İçeriği

1. Blood Lysis buffer (Buffer BB)	24 ml
2. Yıkama solüsyonu 1 (konsantre)	30 ml
3. Yıkama solüsyonu 2 (konsantre)	34 ml
4. Elution buffer	20 ml
5. Proteinaz K	2x1.05 ml
6. GF-1 Column	100 adet
7. Toplama tüpleri	100 adet

Kitin içerisindeki materyallerden Proteinaz K -20°C 'de diğerleri ise oda ısısında muhafaza edildi.

Yıkama solüsyonu 1 şişesinin içerisine 30 ml, yıkama solüsyonu 2 şişesinin içerisine 80 ml absolu ethanol eklenerek kullanılmaya kadar kapakları sıkı bir şekilde kapatılmış olarak oda ısısında saklandı.

Kan örneklerinden DNA izolasyonu işlemi üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Tüm işlemler Class II Laminar Flow Kabin (Nüve MN120, Türkiye) içerisinde yapıldı.

1. 3 ml'lik EDTA'lı tüplerde bulunan kanlar vorteksle karıştırıldıktan sonra (Velp Scientifica, İtalya) otomatik pipet (Thermo Scientific Finnpiette, Finlandiya) yardımıyla 1.5 ml'lik eppendorf tüplere (Star Lab, İsviçre) 200 μl aktarıldı. Üzerine 200 μl **Buffer BB** ilave edildi. Karışım iyice vortekslendi. Karışıma 20 μl **Proteinaz K** eklendi ve hemen sonra su banyosunda (Julabon SW23, Almanya) 65°C 'de 10 dk inkubasyona bırakıldı.

2. 200 μl **absolu ethanol** (Merck, Almanya) eklendi. Hemen karıştırıldı ve tamamen homojenize bir solüsyon elde edildi.

3. Karışım temiz 2 ml'lik eppendorf tüplere yerleştirilen spin kolonlara transfer edildi. 5000 g'de 1 dk santrifüj (Eppendorf 5417R centrifuge) edildi. Toplama tüpüne biriken sıvı döküldü.

4. Kolonlara 'yıkama solüsyonu 1' den 500 μl eklenerek 5000 g'de 1 dk santrifüj edilerek atık maddeler uzaklaştırıldı.

5. 500 μl 'yıkama solüsyonu 2' eklendikten sonra 5000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Atık maddeler uzaklaştırıldı.

6. Spin kolonlara 500 µl ‘**yıkama solüsyonu 2**’ eklenerek maksimum hızda 3 dk santrifüj edilerek atık maddelerin tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
7. Spin kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine (Star Lab, İsviçre) aktarıldı. Önceden 65 °C’de 15 dakika ısıtılmış **Elution buffer**’dan 100 µl eklendi. Elution buffer direkt olarak spin kolon membran üzerine eklenerek 2 dk beklendi.
8. DNA’nın ayrılması için 5000 g’de 1 dk santrifüj yapıldı.
9. Elde edilen DNA’lar PCR işlemine kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2.4.3.1. Primer Seçimi

Bu çalışmada Georges ve ark. (2001) tarafından bildirilen ve *Theileria* cinsi parazitlerin 18S rRNA geninin V4 değişken bölgesinden büyüklüğü 460 ile 520 bp arasında değişen bir parça amplifiye eden genel primerler kullanıldı. RLB işleminde kullanılacak olan reverse primer biotin ile işaretlendi.

Çalışmada kullanılan primerlerin dizilimi aşağıdaki gibidir.

RLB-F2 5’ GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G3’

RLB-R2 5’-biotin- CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT3’

Primer sentezi Biomers firması tarafından Almanya’da yapılarak liyofilize halde teslim alındı. Herbir primer firmanın önerdiği oranda steril ultrasafsu eklenerek final konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılan primerler kullanılmaya kadar -20 °C’de saklandı. Primerler kullanılacakları zaman çözdürülerek %50 oranında steril ultrasafsu ile tekrar sulandırılarak 50 pmol/µl oranı elde edildi.

2.4.3.2. Pozitif ve Negatif Kontrol

Pozitif kontrol olarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ tarafından sağlanan *T.annulata* ve *T.buffeli* izolatları, negatif kontrol olarak da steril ultrasafsu kullanıldı.

2.4.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Karışımı ve Amplifikasyon Koşulları

Reaksiyon toplam 50 µl reaksiyon sıvısında yapıldı. Bu reaksiyon sıvısında kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 2.4'te görülmektedir.

Çizelge 2.4. PCR reaksiyon sıvısında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	Miktarları (µl)
10X PCR buffer	5µl
MgCl ₂ (5mM)	1 µl
dNTP mix (10mM)	0.5 µl
Taq DNA polymerase (recombinant, 5u/µl, 500 U)	1 µl
RLB-F2 primeri (50pmol/µl)	5 µl
RLB-R2 primeri (50pmol/µl)	5 µl
Ultrasafsu	27,5 µl
Genomik DNA	5 µl
TOPLAM HACİM	50 µl

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 200 µl lik DNA'se ve RNA'se free PCR (Axygen, Amerika) tüplerinde yapıldı. Tüpler thermal cycler cihazına (Boeco Almanya) yerleştirildi ve amplifikasyona tabi tutuldu. Amplifikasyon için gerekli PCR şartları Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar

Siklus sayısı	Isı	Süre
1 siklus	94 ⁰ C	2 dk
2 siklus	94 ⁰ C	20 saniye
	67 ⁰ C	30 saniye
	72 ⁰ C	30 saniye
2 siklus	94 ⁰ C	20 saniye
	65 ⁰ C	30 saniye
	72 ⁰ C	30 saniye
2 siklus	94 ⁰ C	20 saniye
	63 ⁰ C	30 saniye
	72 ⁰ C	30 saniye
2 siklus	94 ⁰ C	20 saniye
	61 ⁰ C	30 saniye
	72 ⁰ C	30 saniye
2 siklus	94 ⁰ C	20 saniye
	59 ⁰ C	30 saniye
	72 ⁰ C	30 saniye
40 siklus	94 ⁰ C	20 saniye
	57 ⁰ C	30 saniye
	72 ⁰ C	30 saniye
1 siklus	72 ⁰ C	7 dk

Elde edilen ürünler RLB de kullanılmak üzere +4⁰C'de saklandı.

2.4.3.4. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1'lik Agarose jel ve 1X TAE buffer hazırlandı. Agaroz jelin soğuması aşamasında 2 µl Ethidium bromid (Sigma,

Almanya) eklendi. Jel hazırlandıktan sonra örneklerden 10 µl alınıp 6X Loading dye (Vivantis, Malezya) ile karıştırılacak yatay elektroforez tankına (Cleaver Scientific Ltd. İngiltere) alınan agaroz jelin kuyucuklarına eklendi. Her jelin ilk kuyucuğuna bantların bp değerini belirlemek amacıyla 100 bp'lik DNA ladder (Vivantis VC 100bp plus, Malezya)'dan 2µl eklendi. Yine her bir jelin 2 ve 3. kuyucuklarına sırasıyla *T.annulata* ve *T.buffeli/orientalis* pozitif kontroller ve son kuyucuğa negatif kontrol olarak ultrasafsu eklendi. 90 voltta 45 dk elektroforeze (Cleaver Scientific Ltd., İngiltere) tabi tutuldu. Süre bitiminde tanktan alınan jeller UV transilluminatör (NYXTECHNIK Illuminyx, Amerika) üzerine aktarılarak bantların görünür hale gelmeleri sağlandı ve DNA ladder ile karşılaştırılarak pozitif örnekler belirlendi.

2.4.4. Reverse Line Hibridizasyon Yöntemi

Bu aşamada kullanılacak bütün proplar Gubbels ve ark. (1999)'nın bildirdiği şekilde (Çizelge 2.6) negatif yüklü Biotin C membrana (Pall Biosupport group, Ann Arbor, MI) bağlanabilmeleri amacıyla, 5'-uçlarında N-terminal N-trifluoacetamidohexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl phosphoramidite (TFA)-C6 aminolinker içerecek şekilde SynGen (Amerika) firmasına sentezletirildi.

Çizelge 2.6. RLB testinde kullanılan aminolinkerli propların 5'-3' dizilişi ve konsantrasyonları

Proplar	Nükleotid dizilimi (5'.....3')	Konsantrasyon (pmol)	Kaynak
Catchall (<i>Theileria</i> spp. + <i>Babesia</i> spp.)	TAATGGTTAATAGGAACAGTTG	100	Gubbels ve ark. 1999
<i>Theileria</i> spp.	TGATGGGAATTTAAACCTCTTCCA	400	Gubbels ve ark. 1999
<i>T. annulata</i>	CCTCTGGGGTCTGTGCA	400	Gubbels ve ark. 1999
<i>T.buffeli/orientalis</i>	GGCTTATTTCCGWTTGATTTT	400	Gubbels ve ark. 1999

T: Thymine; A: Adenine; C: Cytosine; G: Guanine; W: Adenine/Thymine

2.4.4.1. RLB Membranının Hazırlanması

1. Problar optimum konsantrasyon için 100-400 pmol/150µl oranlarında sulandırıldı. Sulandırma amacıyla 500 mM'lık NaHCO₃ (pH: 8.4) kullanıldı.
2. Kullanılacak olan Biodyne C membran %16'lık EDAC (1 -ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodimide) (Sigma) solüsyonunun 10 ml'sinde oda ısısında 10 dk aktive edildi.
3. Membran steril deiyonize su yardımı ile yıkandı.
4. Membran daha sonra pens yardımı ile miniblotter (MN45 Immunetics, Cambridge) yastığına yerleştirildi. Miniblotter kapağı yardımı ile membran sabit hale getirildi. Fazla su kanallardan vakum yardımıyla uzaklaştırıldı.
5. Her bir probtan 150 µl miniblotterin ayrı kanallarına dökülerek oda ısısında 1-2 dakika inkube edildi ve problemlerin hibridizasyonu sağlandı. Bu aşamada ilk ve son kanallar boş bırakıldı ve buralara RLB uygulamaları sırasında membranın düzgün yerleşmesi amacıyla 2XSSPE buffer (AI0806-Amresco, U.S.A) ile 1:100 oranında sulandırılmış çini mürekkep doldurularak membran işaretlendi.
6. 1-2 dakikalık inkubasyondan sonra kanallarda bulunan prob solüsyonları aspire edildi.
7. Daha sonra membran pens yardımıyla miniblotterden çıkarılıp 100mM NaOH solüsyonunun 100 ml'si içinde, oda ısısında maksimum 10 dk inkube edildi. 10 dk'dan daha fazla süren inkubasyonlarda zayıf sinyal hibridizasyonu meydana geldiğinden bu sürenin aşılmamasına dikkat edildi.
8. Membran 125 ml 2XSSPE/%0.1 SDS karışımı içerisinde 60⁰C'de 5 dk yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.4.4.2. Reverse Line Hibridizasyonu

1. Önceden elde edilmiş olan PCR ürünlerinden 40'ar μ l alınarak, 2XSSPE/%0.1 SDS karışımı ile 150 μ l'ye tamamlandı.
2. 99⁰C'de 10 dk. denatüre edildikten sonra, denatüre edilen ürünler tekrar yapışmaya maruz kalmamaları için buz üstünde ani soğutuldu.
3. Membran oda ısısında 2XSSPE/%0.1 SDS ile plastik bir kapta hafif sallanarak 5 dakika inkube edildi.
4. Membran prob uygulanan yönüne dik açı yapacak şekilde miniblottera (Immunetics MN45, Amerika) yerleştirildi. Mürekkeple işaretlenmiş olan hattın numara hattının altında olmasına dikkat edildi.
5. Miniblotterin üst kapağı membran üzerine konarak membran sabitlendi. Membran üzerinde kalan fazla su kanallardan vakumlanmak suretiyle uzaklaştırıldı.
6. Bir pipet yardımıyla hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek sulandırılmış PCR ürünleri kanallara dolduruldu. Miniblotter kanalları arasında geçiş olmaması için hiç sallanmadan inkübatöre yerleştirildi ve düz bir zeminde ve 42⁰C'de 1 saat hibridizasyona bırakıldı.
7. Miniblotter inkubatörden çıkarıldı ve örnekler pipetle aspire edilerek uzaklaştırıldı.
8. Membran pens yardımı ile alınarak 125 ml 2XSSPE/%0.5 SDS ile 52⁰C'de 2 defa 10 dk yıkandı.
9. Bu işlemi takiben membran 42⁰C'de 30 dk 5 ml peroksidaz ile işaretli 2XSSPE/%0.5 SDS ile 1:4000 oranında sulandırılmış streptavidin (Sigma) solüsyonunda inkube edildi.
10. İnkubasyonu takiben membran 125 ml 2XSSPE/%0.5 SDS ile 42⁰C'de 10 dk 2 kez yıkandı.
11. Bu yıkama işlemi takiben membran oda ısısında 2XSSPE ile 2 defa 4 er dakika yıkandı.

12. Membran daha sonra 10 ml ECL tespit sıvısında (Amersham, Biotech) 1 dk bekletildi.
13. İnkübasyonu takiben sert bir zemine alınan membran, arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek iki asetat arasına yerleştirildi.

2.4.4.3. RLB Ürünlerinin İncelenmesi ve Tür Tayini

1. Karanlık bir ortamda asetatların üzerine ECL hyperfilm (Amersham, GE Healthcare) konuldu.
2. Bu işlemleri takiben membran karanlık odada ECL hyperfilm altında sinyal yoğunluğuna göre 1-10 dk arasında bekletildi.
3. Film banyo edildi.
4. Filmler üzerinde prob ve PCR sıralarının kesiştiği yerlerde oluşan siyah lekeler pozitif olarak kabul edildi.
5. Jel görüntüleme sistemi yardımıyla fotoğraflandı.

2.4.4.4. Membranın Temizlenmesi ve Saklanması

1. Kullanımdan sonra membran %1 lik SDS'de 90⁰C'de 30 dk 2 defa yıkanarak PCR ürünleri uzaklaştırıldı.
2. Membran 20 mM EDTA (pH:8) ile dolu plastik bir kapta 15 dk durulandı.
3. Membran, temiz 20 mM'lık EDTA solüsyonu bulunan plastik bir kap içerisinde +4⁰C'de tekrar kullanılmak üzere saklandı.

2.4.4.6. Gereç ve Yöntemde Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasallar

a) Mikroskobide Kullanılan Solüsyonlar

Metanol (Merck, Almanya)

Giemsa stok solüsyonu (Merck, Almanya)

Distile su

İmmersion Yağı

b) PCR'de Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar

1. 10 X TAE Buffer (Tris-acetate- EDTA) Hazırlanması (3lt)

145.2 g Tris- Base

60 ml 0.5 M EDTA pH: 8.0

34.26 ml Glasiyel asetik asit

HCl ile pH 7.6-7.8 olacak şekilde ayarlanır ve distile su ile 3000 ml'ye tamamlanır.

1X oranında olacak şekilde steril distile su ile sulandırılarak kullanıldı.

2. Agaroz Jel Hazırlanması

1gr Agarose (Sigma)

100 ml 1XTAE buffer

2µl ethidium bromide

c) RLB'de Kullanılan Solüsyonlar

1. 500 mM NaHCO₃ (pH: 8.4) Hazırlanması (NaHCO₃, Merck)

42g NaHCO₃

Deiyonize su ile 1lt'ye tamamlanır.

NaOH yardımıyla pH: 8.4 olacak şekilde ayarlanır.

2. %16 EDAC (1-etil-3 dimetilaminopropil karbodimin) Hazırlanması (EDAC, Sigma)

1,6g EDAC, distile su ile 10 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.

3. 10 X SDS (sodium dodecyl sulphate) Hazırlanması (SDS, Vivantis)

SDS 100g

Deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

4. 2 X SSPE/0.1 SDS (20X SSPE Buffer, AppliChem/ SDS, Vivantis)

100 ml 20X SSPE

10 ml %10 SDS

2 ml 0.5 M EDTA

Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır.

5. 2 X SSPE/0.5SDS (20X SSPE Buffer, AppliChem/ SDS, Vivantis)

100 ml 20X SSPE

50 ml %10 SDS

2 ml 0.5 M EDTA

Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır.

6. 100 mM NaOH (Sodyum Hidroksid, Merck)

1 gr NaOH 250 ml deiyonize su ile tamamlanır.

Oda ısısında 1 ay kadar saklanabilir.

7. 20 mM EDTA (EDTA, Disodium Salt Dihydrate, Vivantis)

7.4 gr EDTA

800 ml deiyonize su eklenir.

NaOH ile pH: 7.4'e ayarlanır.

Deiyonize su 1 lt'ye tamamlanır.

8. 0.5 M EDTA (EDTA, Disodium Salt Dihydrate, Vivantis)

10 ml 20 mM EDTA+90 ml deiyonize su eklenir.

2. 5. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen veriler Windows SPSS 12.0 bilgisayar programında analiz edildi. Tanımlayıcı Değerler “Sayı” ve “Yüzde” olarak belirtildi. Değerlendirme sonucunda kategorik veriler Ki-kare uygunluk testi ile karşılaştırıldı. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alındı.

3. BULGULAR

3.1. Verilerin Dağılım Sıklığı

Örneklerin ilçelere göre dağılım sıklığı irdelendiğinde en fazla örneğin Keskin ilçesinden (%35.4) en az örneğin ise Bahşılı (%4.1) ve Karakeçili (%4.1) ilçelerinden toplandığı belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Merkezlere göre verilerin dağılım sıklığı

İLÇELER	n	%
Kırıkkale Merkez	37	12.6
Balışeyh	38	12.9
Bahşılı	12	4.1
Çelebi	15	5.0
Delice	34	11.7
Karakeçili	12	4.1
Keskin	104	35.4
Sulakyurt	27	9.2
Yahşihan	15	5.0

Veri dağılım sıklığı ırk düzeyinde bakıldığında en çok örnek Holstein ırkına bağlı sığırlardan (%35.7), en az örneğin Belçika Mavisi, Anadolu Esmeri ve Bozırk'tan alındığı belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Irklara göre verilerin dağılım sıklığı

İrk	n	%
Holstein	105	35.7
Montofon	43	14.6
Simental	36	12.2
Belçika Mavisi	1	0.3
Anadolu Esmeri	1	0.3
Melez	96	32.7
Jersey	3	1.2
Yerli Kara	8	2.7
Bozırk	1	0.3

Örnek alınan dişi hayvanların oranı erkek hayvanlara oranla önemli miktarda yüksektir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Cinsiyete göre verilerin dağılım sıklığı

Cinsiyet	n	%
Dişi	272	92.5
Erkek	22	7.5

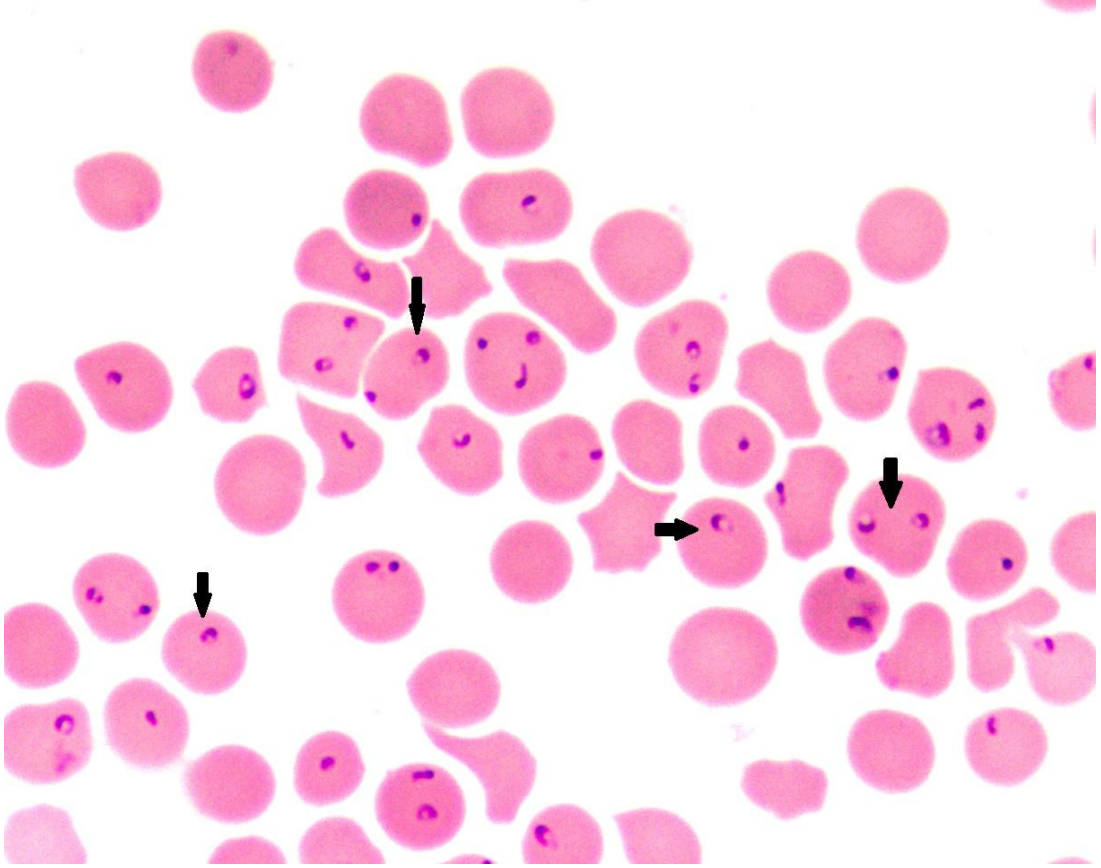
En fazla örnek 1-3 yaş arası (%48) en az ise 10 yaş ve üzeri hayvanlardan alınmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Yaşa göre verilerin dağılım sıklığı

YAŞ	n	%
1-3 yaş arası	141	48.0
4-6 yaş arası	113	38.4
7-9 yaş arası	34	11.6
10 yaş ve üzeri	6	2.0

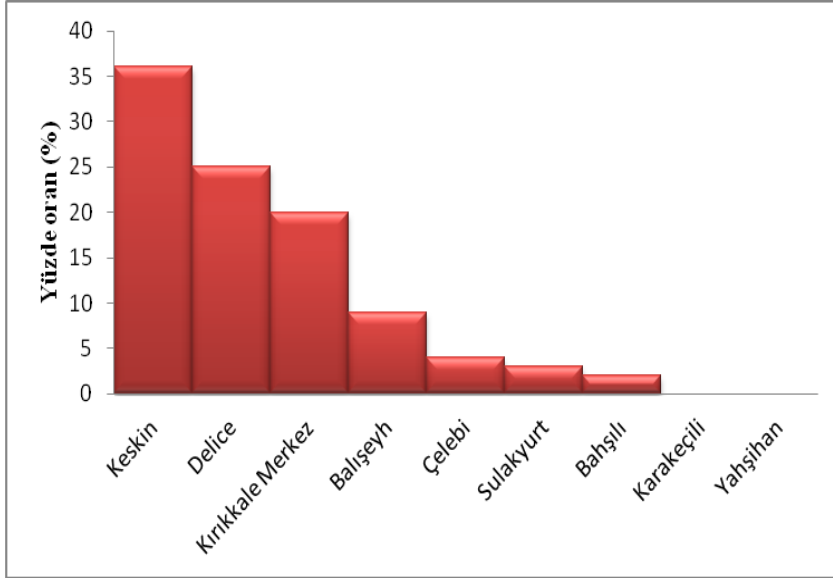
3.2. Mikroskopik Muayene Sonuçları

Örnek alınan 294 sığırın 44'ü (%15) *Theileria* spp. piroplasmaları yönünden pozitif olarak belirlenmiştir. İki hayvandan hazırlanan yayma frotide çok yoğun *Theileria* spp. piroplasmalarına rastlanmıştır (Şekil 3.1). Bazı örneklerde ise bir mikroskop sahasında sadece 1 piroplasma tespit edilmiştir.



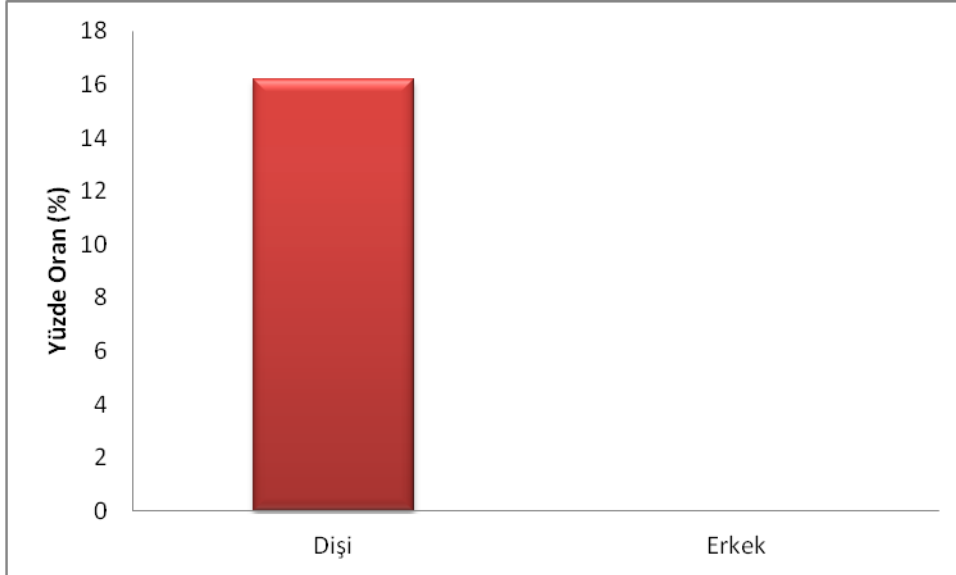
Şekil 3.1. *Theileria* spp. piroplasmaları, oklar (Orijinal).

Karakeçili ve Yahşihan ilçelerinden toplanan örneklerde *Theileria* spp. piroplasmaları saptanmamıştır. *Theileria* spp. piroplasmaları pozitif örnekler arasında en yoğun olarak Keskin (%36.3) ilçesinden alınan örneklerde bulunmuştur. Bunu sırasıyla Delice (%25), Kırıkkale Merkez (%20.4), Balışeyh (%9.1), Çelebi (%4.5), Sulakyurt (%2.3) ve Bahşılı (%2.3) ilçeleri takip etmiştir (Şekil 3.2).



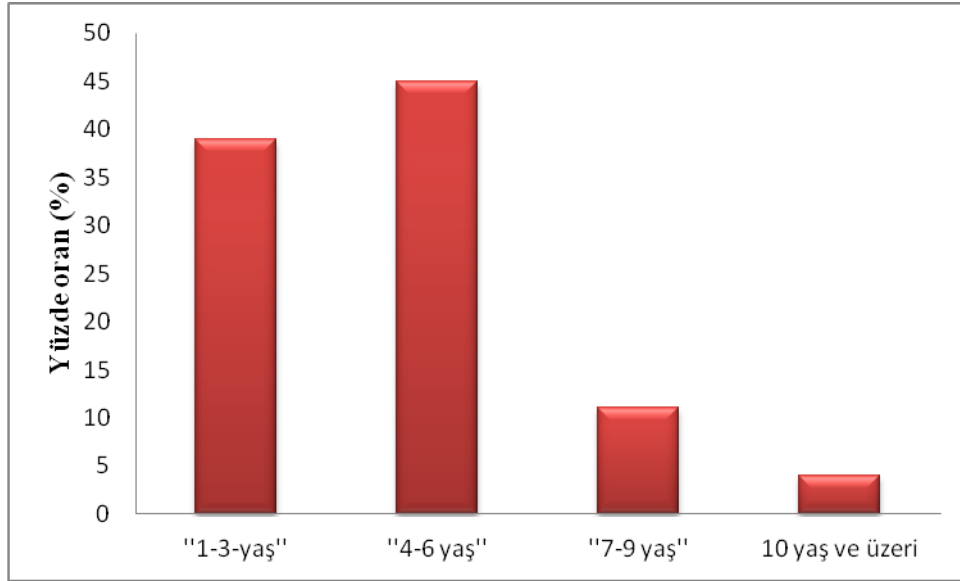
Şekil 3.2. İlçelere göre *Theileria* spp. yönünden pozitif hayvanların oranı

Mikroskobik muayene sonuçları cinsiyet yönünden ele alındığında *Theileria* spp. piroplasmaları erkek hayvanlarda tespit edilmezken, dişi hayvanların %16,17'sinde pozitiflik tespit edilmiştir (Şekil 3.3).



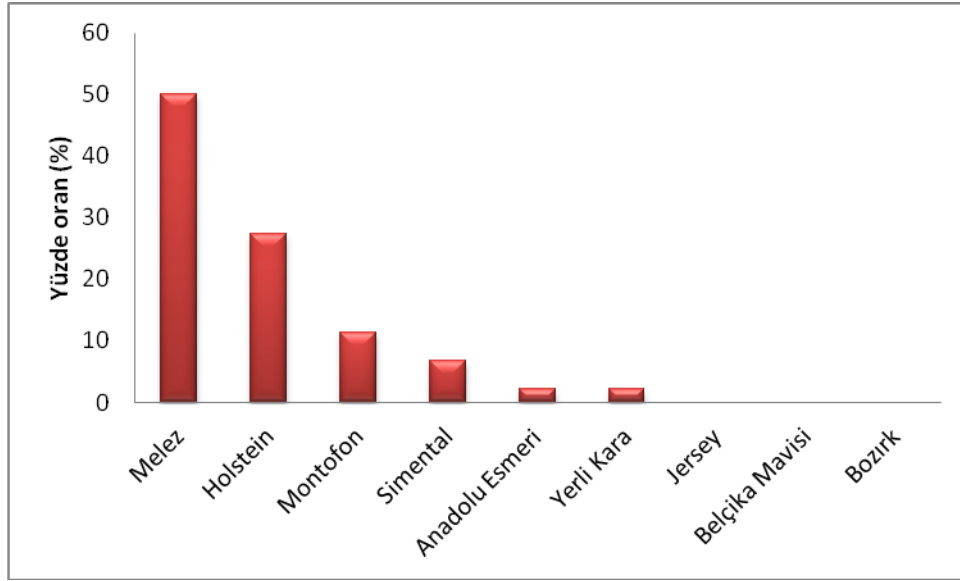
Şekil 3.3. Cinsiyete göre mikroskobik bakıda pozitif hayvanların oranı

Theileria spp. yönünden pozitif bulunan hayvanların yaşça en küçüğü 1 yaşında en büyüğü ise 18 yaşında olarak belirlenmiştir. Etken 4-6 yaş grubundaki hayvanlarda en yüksek seviyede (%45.5) bulunmuştur. Bunu sırasıyla 1-3 yaş grubu (%38.7), 7-9 yaş grubu (%11.3) ve 10 yaş üzerindeki hayvanlar (%4.5) takip etmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Mikroskopik bakıya göre pozitif örneklerin yaşa göre dağılımı

Muayene edilen örneklerden etkene en yoğun melez ırklarda (%50), daha sonra sırasıyla Holstein (%27.3), Montofon (%11.3), Simental (%6.8), Anadolu Esmeri (%2.2), Yerli Kara (%2.2) ırkı sığırlarda rastlanmıştır. Bozırk, Belçika Mavis ve Jersey ırklarında etkene rastlanmamıştır. *Theileria* spp. piropasmaları en fazla sırasıyla melez (%50), kültür (%45.5) ve yerli ırklarda (%4.5) tespit edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mikroskobik bakıda pozitif örneklerin ırklara göre dağılımı.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

Theileria türlerini çoğaltan genel primerler (RLB-F2, RLB-R2 Biotin) kullanılarak yapılan PCR sonuçları, ilçelere göre Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

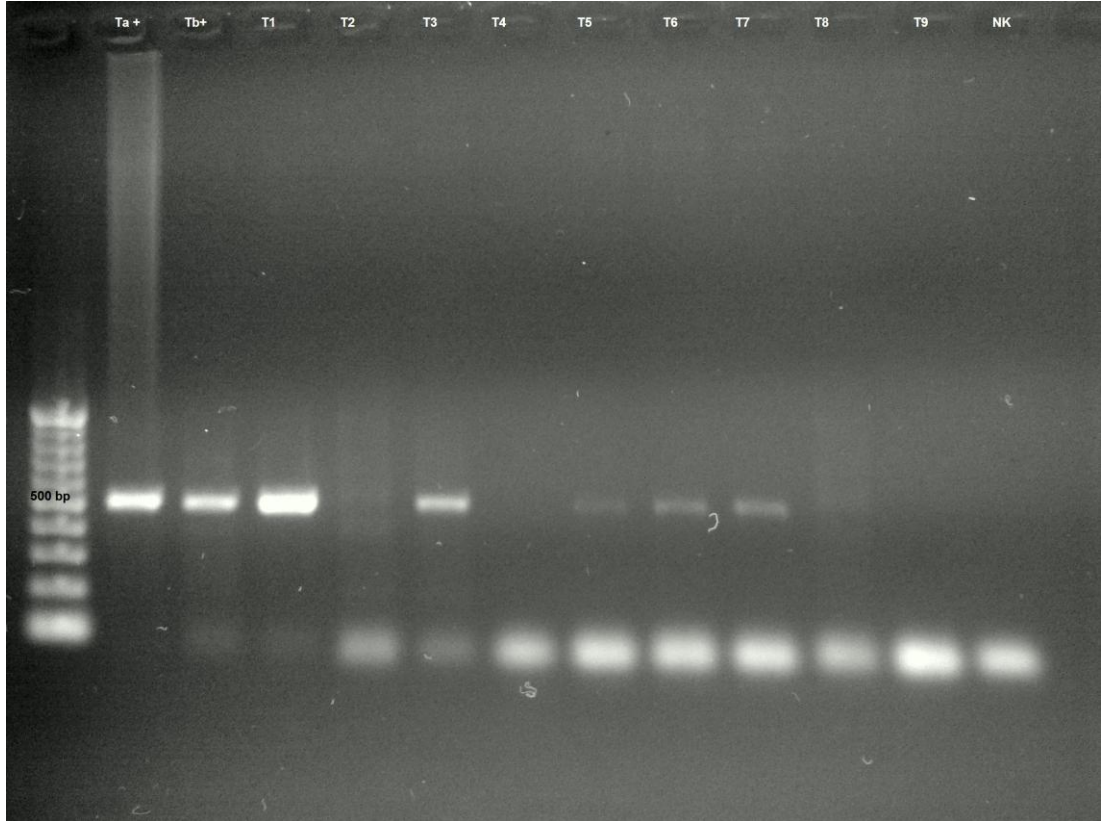
Çizelge 3.5. İlçelere göre PCR'da pozitif hayvan sayısı

İlçeler	ÖAHS	PCR+ (n)	Yaygınlık (%)
Kırıkkale Merkez	37	9	14.5
Balışeyh	38	5	8.1
Bahşılı	12	1	1.6
Çelebi	15	6	9.7
Delice	34	15	24.2
Karakeçili	12	0	0
Keskin	104	22	35.5
Sulakyurt	27	2	3.2
Yahşihan	15	2	3.2
	294	62	21.1

ÖAHS: Örnek alınan hayvan sayısı

Mikroskobik bakıda pozitif bulunan tüm örnekler PCR'da da pozitif olarak saptanmıştır. Balışeyh'te 1, Çelebi'de 4, Delice'de 4, Keskin'de 6, Sulakyurt'ta 1 ve Yahşihan'da 2 örnek mikroskobik bakıda negatif olmasına rağmen, PCR'da pozitif olarak saptanmıştır. Buna göre incelenen 294 örneğin 62 tanesinde (%21.1) pozitiflik

saptanmıştır. PCR ile en yoğun pozitiflik Keskin ilçesinde tespit edilmiş olup, bunu sırasıyla Delice, Kırıkkale Merkez, Çelebi, Balışeyh, Yahşihan, Sulakyurt ve Bahşılı izlemektedir. Karakeçili ilçesinden alınan tüm örnekler PCR'da negatif bulunmuştur. PCR'da elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez sonrası görünümü Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Ta+: *T.annulata* Pozitif Kontrol, **Tb+:** *Theileria buffeli* pozitif kontrol, **NK:** Negatif kontrol, **T1-T9:** İncelenen örneklerden bazıları

Genel primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonuçları cinsiyet yönünden ele alındığında pozitif hayvanlar arasında dişilerin oranı %96.8, erkeklerin oranı ise %3.2'dir.

İrklara göre PCR'da *Theileria* pozitifliği sırasıyla melez ırklarda %51.6, saf ırklarda ise %48.4 olarak tespit edilmiştir. *Theileria* DNA'sı en yoğun olarak sırasıyla Melez (%51.6), Holstein (%22.6), Montofon (%12.9), Simental (%8.1),

Yerli Kara (%3.2), Anadolu Esmeri'nde (%1.6) saptanmıştır. Bozırk, Belçika Mavisi ve Jersey ırklarında enfeksiyon saptanmamıştır.

Yaş'a göre PCR sonuçlarında ise *Theileria* spp. DNA'sı sırasıyla 1-3 yaş grubundaki hayvanlarda en yüksek seviyede (%46.7) bulunmuştur. Bunu sırasıyla 4-6 yaş grubu (%40.3), 7-9 yaş grubu (%9.7) ile 10 yaş ve üzerindeki hayvanlar (%3.2) takip etmiştir.

3.4. Reverse Line Blotting Sonuçları

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin RLB testine tabi tutulması sonucu alınan 294 örneğin 77 sinde (%26.2) pozitiflik saptanmıştır. Pozitif örneklerin tümü *T.annulata* olarak belirlenmiş olup, *T.buffeli/orientalis*'e rastlanmamıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. RLB membran görüntüsü. *: *T.buffeli/orientalis* pozitif kontrol
#: *T.annulata* pozitif kontrol

RLB pozitiflik oranının ilçelere göre dağılımında en yaygın pozitiflik sırasıyla Keskin, Delice, Kırıkkale Merkez, Balışeyh, Çelebi, Sulakyurt, Bahşılı ve Yahşihan'da belirlenmiştir. Keskin ilçesinde önemli düzeyde yüksek (%29.9), Bahşılı ve Yahşihan'da ise önemli düzeyde düşük (%2.6), Karakeçili'de ise saptanmamıştır ($p<0.05$) (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. RLB ile belirlenen pozitiflik oranlarının ilçelere göre karşılaştırılması

İLÇELER		<i>T.annulata</i>		p
		n	%	
	Keskin	23/77	29.9	0.00
	Delice	20/77	26.0	
	Kırıkkale Merkez	11/77	14.3	
	Balışeyh	9/77	11.7	
	Çelebi	7/77	9.0	
	Sulakyurt	3/77	3.9	
	Bahşılı	2/77	2.6	
	Yahşihan	2/77	2.6	
	Karakeçili	0/77	0.0	

Cinsiyete göre dişi hayvanların %27.2, erkek hayvanların %13.6'sı *T.annulata* yönünden pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.7). İstatistiki olarak cinsiyete göre dağılımda anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 3.7. RLB sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı

		RLB				
		negatif	%	<i>T.annulata</i>	%	p
Cinsiyet	dişi	198	72.8	74	27.2	0.25
	erkek	19	86.4	3	13.6	

Yaşa göre, pozitif hayvanlar arasında *T.annulata* en yaygın olarak 1-3 yaş, en düşük olarak 10 yaş ve üzerindeki hayvanlarda saptanmıştır (Çizelge 3.8). İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 3.8. RLB sonucu pozitif örneklerin yaşa göre dağılımı

		RLB		
		<i>T.annulata</i>		
		n	%	p
YAŞ	1-3 yaş arası	37	48.1	0.92
	4-6 yaş arası	28	36.4	
	7-9 yaş arası	10	13.0	
	10 yaş üzeri	2	2.6	

İrk düzeyinde pozitiflik sırasıyla Melez ırklar (%45.5), Holstein (%26), Montofon (%15.5), Simental (%9.1), Yerli Kara (%2.6) ve Anadolu Esmeri'nde (%1.3) saptanmıştır. Jersey, Bozırk ve Belçika Mavisi ırklarında etken DNA'sına rastlanmamıştır. Genel olarak etken kültür ırklarında %50.6, melez ırklarda %45.5 ve yerli ırklarda %3.9 oranında saptanmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. RLB sonucu pozitif örneklerin ırklara göre dağılımı

		<i>T.annulata</i>		
		n	%	p
IRKLAR	Melez	35/77	45.5	0.00
	Holstein	20/77	26.0	
	Montofon	12/77	15.5	
	Simental	7/77	9.1	
	Yerli Kara	2/77	2.6	
	Anadolu Esmeri	1/77	1.3	
	Jersey	0/77	0.0	
	Bozırk	0/77	0.0	
	Belçika mavisi	0/77	0.0	

Mikroskopi ve PCR'da pozitif olarak saptanan tüm örnekler RLB'de de pozitif saptanmış olup, negatif saptanan mikroskopik bakıdaki 33, PCR'daki 15 örnek RLB'de *T.annulata* yönünden pozitif olarak belirlenmiştir. Mikroskopik bakıda %15 piroplasma, PCR ile %21.1 *Theileria* spp. DNA'sı ve RLB ile %26.2 oranında *T.annulata* saptanmıştır (Çizelge 3.10). Üç yöntem karşılaştırıldığında RLB ile

mikroskopik bakı, RLB ile PCR yöntemleri arasında ve PCR ile mikroskopik bakı arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Her üç yöntem karşılaştırıldığında etkenin belirlenmesi açısından RLB'nin diğer iki yöntemle göre daha duyarlı bir test olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.10. Mikroskopik bakı, PCR ve RLB sonuçlarının karşılaştırılması

Yöntem	Negatif		Pozitif		Toplam n
	n	%	n	%	
RLB	217	73.8	77	26.2	294
MB*	250	85.0	44	15.0	294
PCR	232	78.9	62	21.1	294

RLB ile MB karşılaştırıldığında $X^2= 141.3$; $P= 0.0001$

RLB ile PCR karşılaştırıldığında $X^2= 216.6$; $P= 0.0001$

PCR ile MB karşılaştırıldığında $X^2= 188.1$; $P= 0.0001$

*MB: Mikroskopik bakı

Sonuçlar ilçeler düzeyinde karşılaştırıldığında etkene en yaygın olarak tüm yöntemlerle Keskin ilçesinde rastlanmıştır. Yahşihan ilçesinde hayvanlarda mikroskopik bakıda piropasma saptanamazken, PCR'da iki hayvanda agaroz jelde bant vermiş ve RLB ile bu iki hayvanda *T.annulata* tespit edilmiştir. Karakeçili ilçesinde ise her üç yöntemle de etken saptanmamıştır (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. Mikroskopik bakı, PCR ve RLB sonuçlarının ilçelere göre dağılımı

Merkezler	ÖAHS (n)	MB+ (n)	MB+ Yaygınlık (%)	PCR + (n)	PCR+ Yaygınlık (%)	RLB+ <i>T.annulata</i> (n)	RLB+ Yaygınlık (%)
Kırıkkale Merkez	37	9	20.4	9	14.5	11	14.3
Balışeyh	38	4	9.1	5	8.1	9	11.7
Bahşılı	12	1	2.3	1	1.6	2	2.6
Çelebi	15	2	4.5	6	9.7	7	9.0
Delice	34	11	25	15	24.2	20	26.0
Karakeçili	12	0	0	0	0	0	0
Keskin	104	16	36.3	22	35.5	23	29.9
Sulakyurt	27	1	2.2	2	3.2	3	3.0
Yahşihan	15	0	0	2	3.2	2	2.6
	294	44	15	62	21.1	77	26.2

ÖAHS: Örnek alınan hayvan sayısı

MB: Mikroskopik bakı

Örnek alınan hayvanların üzerinde kene olup olmadığına bakılıp, hayvan sahiplerinin bilgisine başvurulduğunda mikroskopik bakıda pozitif saptanan 44 hayvanın 34'ünün (%77.2) üzerinde kene saptanmış olup, 1'inin üzerinde daha önce çok sayıda kene olduğu, ancak akarisit mücadelesi ile kenelerden kurtulduğu ifade edilmiştir. RLB'de pozitif saptanan 77 hayvandan 51'inde (%66.2) yoğun kene enfestasyonu saptanmış, 2 hayvanda önceden çok yoğun kene enfestasyonunun olduğu hayvan sahipleri tarafından ifade edilmiştir. Pozitif saptanan hayvanların bazılarında kene enfestasyonunun önceden var olduğu ancak akarisit mücadelesi ile bunların hayvandan uzaklaştırıldığı bilgisi alınmıştır.

4. TARTIŞMAVE SONUÇ

Theileriosis, çeşitli hayvan türlerinde *Ixodidae* ailesine bağlı keneler tarafından nakledilen, zorunlu hücre içi parazitlerden *Theileria* türlerinin sebep olduğu protozoer bir hastalıktır. Hastalık tropikal ve subtropikal iklim kuşağında yaygın olarak görülür ve sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olur (Neitz 1957).

Günümüze kadar theileriosis teşhisi, Giemsa ile boyanmış yayma kan frotileri ve lenf yumrusu biyopsilerinin mikroskopik bakışı ya da etkene karşı konakta gelişen antikorların belirlenmesini hedef alan serolojik yöntemler ve son zamanlarda parazitin DNA'sını belirleyen moleküler biyolojik teknikler ile yapılmıştır. Bahsedilen bu tekniklerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajlarının olduğu bildirilmektedir (Zarlenga ve Higgins 2001).

Ülkemizde ve dünya'da *Theileria* türlerinin belirlenmesine yönelik olarak kullanılan mikroskopik bakının bazı dezavantajları sözkonusudur. Bunlardan en önemlisi theileriosis enfeksiyonunu atlatan hayvanlar portör haline gelip, vektör keneler için enfeksiyon kaynağı olmakta ve enfekte olmayan hayvanlardan klinik olarak ayırlanamamaktadır. Aynı zamanda pozitif olarak tespit edilen hayvanların portör hayvan olma ihtimalleri söz konusu olduğundan yanlış teşhise sebebiyet verebilmektedir. Bunun yanında bu etkenlerin piroplasma formlarını görmekle tür düzeyinde teşhis söz konusu olamamaktadır (Figuroa ve Buennig 1995). Saha koşullarında miks enfeksiyonlarda bu durum önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (d'Olivieria ve ark. 1995).

Mikroskopik bakının yanında kan protozoonlarının teşhisinde kullanılan ve parazite karşı konak kan dolaşımındaki antikorları belirlemeye çalışan serolojik testler de kesin teşhis için yeterli değildir. Bunların en önemli nedeni farklı *Theileria* türleri arasında çapraz reaksiyonların oluşabilmesidir ki, bu durum serolojik testlerin duyarlılığının yeterli düzeyde olmamasından kaynaklanmaktadır (Burridge ve ark. 1974). Bununla birlikte portör hayvanlarda mikroskopik bakıda kanda piroplasmalar

görülebilmesine rağmen, antikörlerin tespit edilemediği de bildirilmektedir (Pipano 1974).

Theileriosis teşhisinde hem mikroskopik, hem de serolojik yöntemlerle karşılaşılan olumsuzluklar moleküler çalışmalar yapılarak ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. PCR kullanılarak özellikle portör hayvanlarda *Theileria* türlerinin duyarlı bir şekilde teşhisi sağlanmıştır. d'Oliveira ve ark. (1995) parazit DNA'sının belirlendiği PCR'ın, piroplasmaların ışık mikroskopunda görülmesine dayanan mikroskopik bakı ve antikör saptamaya yarayan IFA testi'ne oranla çok daha duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmalarında 92 hayvandan mikroskopik bakı ile 20, IFA ile 36 hayvan pozitif belirlenmişken, PCR'da 68 hayvanın pozitif olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada ise örnek alınan 294 hayvandan mikroskopik bakı ile 44 örnekte (%15) *Theileria* spp. piroplasmaları saptanırken, genel primerler kullanılarak yapılan PCR'da 62 hayvanda (%21.1) pozitif bant görülmüştür. Diğer çalışmalarda belirtildiği gibi PCR'ın mikroskopik bakıya göre daha duyarlı olduğu bu çalışmada da gözlenmiştir.

PCR kullanılmasının da bazı dezavantajları sözkonusudur. PCR tür spesifiktir ve bu nedenle her bir tür için ayrı ayrı yapılması zaman ve ekonomik kayba neden olmaktadır. Bu kayıpların önüne geçilmesi için PCR ve hibridizasyonu bir arada kullanan RLB metodu geliştirilmiştir. Bu metod PCR'a oranla daha duyarlı (Sparagano ve ark. 2000) ve aynı anda birden çok paraziti tespit edilebilmesi nedeniyle çok avantajlıdır (Sparagano ve ark. 2000, Altay ve ark. 2007a). Bu durum epidemiyolojik çalışmalar için çok büyük öneme sahiptir. Bunun yanında RLB metodunda bir defa hazırlanan membran amplifiye edilen ürünlerin ayrılmasından sonra tekrar kullanılabilir. Membrana bağlı aynı problemler en az 20 defa kullanılabilir (Gubbels ve ark. 1999, Sparagano ve ark. 2000). Potansiyel olarak her defasında maksimum 45 farklı prob ve 45 numune incelenebilmekte ve bu durum moleküler tekniklerin maliyetini de azaltarak ekonomik kayıp oluşumunu engellemektedir (Sparagano ve ark. 2000). PCR'da *Theileria* etkenleri kanda 10^{-3} oranında olduğunda ancak tespit edilebilirken, RLB de daha düşük seviyede (10^{-6}) olduğunda dahi etkenin belirleneceği ifade edilmiştir (Gubbels ve ark. 1999).

Theileria türlerinin sığırlarda belirlenmesi ve yaygınlığına ilişkin olarak Türkiye'de ve dünya da çok sayıda çalışma yapılmış ve bölgelere göre farklı türler ve bu türlerin farklı oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir (d'Oliveira ve ark. 1995, Martin Sanchez ve ark. 1999, Almeria ve ark. 2002, Sayın ve ark. 2003, Vatanserver ve ark. 2003a, Garcia-Sanmartin ve ark. 2006, Almeria ve ark. 2009). Türkiye'de sığırlarda *Theileria* türleri mikroskopik bakı (Göksu 1959, Zeybek ve ark. 1995, Yaman 1998, İnci ve ark. 2008), serolojik yöntemler (Çakmak 1990, Nalbantoğlu 1998, Sevgili ve ark. 2010) ve moleküler yöntemlerle belirlenmeye çalışılmıştır (Aktaş ve ark. 2001, İnci ve ark. 2002, Vatanserver ve Nalbantoğlu 2002, Deniz 2003, Dumanlı ve ark. 2005, Deniz ve ark. 2012, Orkun ve ark. 2012). Bu çalışmalar sonucunda *T.annulata* ve *T.buffeli/orientalis*'in ülkemizde bulunduğu rapor edilmiştir (Deniz 2003, Altay ve ark. 2007a, Deniz ve ark. 2012).

Ülkemizde sığırlarda mikroskopik bakıda *Theileria* spp. piroplasmaları %1.8-60.5 arasında tespit edilmiştir. Aktaş ve ark. (2001) Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde piroplasma oranını sırasıyla %7, %5.5 ve %3 olarak tespit etmişlerdir. Dumanlı ve ark. (2005) ülkemizin doğusunda 11 farklı ilde %19.7 *Theileria* spp., Sevgili ve ark. (2010) Şanlıurfa yöresinde %9.94 oranında *T.annulata* saptadıklarını ifade etmişlerdir. Deniz ve ark. (2012) Diyarbakır yöresinde sağlıklı görünümlü sığırlarda *Theileria* spp. oranını %5 bulmuşlardır. Kaya ve ark. (2006) Antakya yöresinde %2.33, Nalbantoğlu (1998) Çukurova yöresinde Holstein ırkı sığırların %9.3 ünde *T.annulata* piroplasmalarına rastladıklarını bildirmişlerdir. Dinçer ve ark. (1991) Karadeniz Bölgesi'nde örnek alınan 76 sığırdan 26'sında *T.annulata* piroplasmalarına rastlamışlardır.

Bu araştırmanın yapıldığı İç Anadolu Bölgesi'nde sığırlarda *T.annulata* %2.3-60.5 (Göksu 1959, Zeybek ve ark. 1995, Yaman 1998, İnci ve ark. 2002, Vatanserver ve Nalbantoğlu 2002, İnci ve ark. 2008), *Theileria* spp., %11.1-29.6 (Sayın ve ark. 2003, Vatanserver ve ark. 2003a) oranında bildirilmiştir. Vatanserver ve Nalbantoğlu (2002) Ankara'nın Polatlı ilçesine ait 4 farklı yerleşim yerinde yaptıkları çalışmada %31.3, yine bu yörede Deniz (2003) ise pozitiflik oranını %27.57 olarak tespit etmiştir. İnci ve ark. (2008) Kapadokya bölgesinde *T.annulata* oranını %60.5 olarak belirlemişlerdir. Çalışmaların bazılarında *T.annulata*, bazılarında ise *Theileria* spp.

piroplasmaları olarak ifade edilen oranların, *Theileria* piroplasmalarını tür düzeyinde ayırmak mümkün olmadığından tek örnek olarak *Theileria* spp. şeklinde ifade edilmesi gerektiği tarafımızdan düşünülmektedir. Bu çalışmada *Theileria* spp. piroplasmaları %15 oranında saptanmıştır. Bu oran çalışmanın yapıldığı İç Anadolu Bölgesi'ndeki benzer çalışmalardaki verilerle uygunluk göstermektedir (Sayın ve ark. 2003, Vatansever ve ark. 2003a). İç Anadolu Bölgesi'ndeki diğer bazı çalışmalardan farklılık göstermesinin sebebi çalışmaların yapıldığı alanların farklı endemik özelliklere sahip bölgeler olması ile açıklanabilir.

Bu araştırmadaki mikroskopik bakı sonucunun (%15), İnci ve ark. (2008)'inkinden (%60.5) çok düşük olması bu araştırmacıların örnek aldıkları bazı hayvanların (%27.61) akut Tropikal theileriosis teşhisi konmuş hayvanlar olması, bu araştırmada ise örnek alınan hayvanların tamamen rastgele seçilmiş ve klinik belirti göstermeyen hayvanlar olmasıdır. Dolayısıyla belirlediğimiz oranın yukarıdaki çalışmaya göre düşük olması beklenen bir durumdur.

Mikroskopik bakıda Karakeçili ve Yahşihan ilçelerinde *Theileria* spp. piroplasmalarına rastlamamızın sebebi olarak, bu ilçelerde hayvancılığın tamamıyla kapalı bir sistem halinde olması, akarid mücadelesinin sürekli yapılması ve özellikle Karakeçili ilçesinde dışarıdan hayvan alımının söz konusu olmaması ve örnek alınan hayvanların genellikle merada kısa bir süre kalıp, tekrar ahıra alınan hayvanlar olmasından kaynaklanıyor olabileceği kanısına varılmıştır.

Araştırmada *Theileria* spp. piroplasmaları sadece dişi hayvanlarda rastlanılmış olup, erkeklerde gözlenmemiştir. RLB'de ise 3 erkek hayvanda pozitiflik saptanmıştır. Erkek hayvanlarda etkene rastlanmamasının sebebi alınan örnek sayısının dişilere oranla az olması ve genellikle sadece bir enfeksiyon sezonunu merada geçirmiş olmalarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca erkek hayvanların sayısının az olmasının sebebi, bu hayvanların genellikle meraya çıkarılmayıp kapalı veya yarı kapalı besicilik sisteminin yapılmasından dolayı planlanan çalışmaya uygun birey sayısının az olması ve çalışmanın yapıldığı Kırıkkale yöresinde hayvan sahiplerinin erkek hayvanlardan kan alınmasına müsaade etmemelerinden kaynaklanmıştır.

Son yıllarda ülkemizde moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalarda sığırlarda *T.annulata* ve *T.buffeli/orientalis*'in varlığı tespit edilmiştir. Türkiye'de PCR ile *T.annulata* varlığı ilk defa Aktaş ve ark. (2002) tarafından ortaya konmuştur. Bu çalışmada *T.annulata* Elazığ ve Malatya illerinden rastgele seçilen hayvanlarda %30.9 olarak tespit edilmiştir. Dumanlı ve ark. (2005) Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu'daki 11 farklı ilde *T.annulata* prevalansını %1.4-74.6 oranında tespit etmişlerdir. Aktaş ve ark. (2006) yine PCR yöntemini kullanarak Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki bazı illerde %39.8 *T.annulata* ve %7.14 *T.sergenti/buffeli/orientalis* bulunduğunu ifade etmişlerdir. Diyarbakır'da multipleks PCR kullanılarak %23 *T.annulata* ve %1 *T.annulata* ve *T.buffeli*'den oluşan miks enfeksiyon saptanmıştır (Deniz ve ark. 2012). Altay ve ark. (2007a) Erzincan'da RLB ile %15.45 *T.annulata*, %9.76 *T.buffeli/orientalis*, %2.43 oranında miks enfeksiyon (*T.annulata*+*T.buffeli/orientalis*) tespit etmişlerdir.

İç Anadolu Bölgesi'nde yapılan moleküler çalışmalarda Vatansver ve Nalbantoğlu (2002) Ankara'nın Polatlı ilçesinde Nested-PCR ile *T.annulata* yaygınlığını %61.2 olarak belirlemişlerdir. İç Anadolu Bölgesi'nde *T.buffeli/orientalis* varlığı ilk defa Deniz (2003) tarafından Ankara'da tespit edilmiştir. Bu çalışmada RLB tekniği kullanılarak *T.annulata* %32.92, *T.buffeli* ve miks enfeksiyon (*T.annulata*+*T.buffeli*) %6.58 oranında saptanmıştır. Vatansver ve ark. (2003) yine bu yörede RLB ile *T.annulata*'yı %41.6, *T.buffeli/orientalis*'i %13.6, İça ve ark. (2007a) aynı yöntemle Kayseri yöresinde erkenleri sırasıyla %18.1 ve %0.9 oranında belirlemişlerdir. Orkun ve ark. (2012) Kırşehir yöresinde *T.annulata*'yı %2.32 oranında saptarlarken, *T.buffeli/orientalis* tespit etmemişlerdir. Bu çalışmada RLB'de *T.annulata* %26.2 oranında tespit edilirken, *T.buffeli/orientalis* tespit edilmemiştir. Kırşehir'e benzer bir iklim ve ekolojiye sahip olan Kırıkkale'de de bu etkene rastlanmaması, bölgede bu türün ya çok düşük seviyelerde bulunduğunu ya da bu bölgede bulunmadığını düşündürmüştür. *Theileria buffeli/orientalis* çalışmanın yapıldığı İç Anadolu Bölgesi'nde yukarıda bahsedilen çalışmalar dikkate alındığında *T.annulata*'ya oranla çok daha düşük seviyede olduğu görülmektedir. Bütün bu çalışmalar ışığında Türkiye'de farklı oranlarda olmasına rağmen sığırlarda *Theileria* varlığının hemen her bölgede bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda mikroskopik bakıda *Theileria* spp. piroplasmaları saptanan örneklerin tümünde RLB'de *T.annulata* saptanmıştır. Mikroskopik bakıda negatif olarak tespit edilen 33 örnekte de RLB'de *T.annulata* tespit edilmiştir. Mikroskopik bakıda etkene %15 oranında rastlanırken, RLB'de etken %26.2 oranında belirlenmiştir. Çalışmamızda olduğu gibi İça ve ark. (2007a) Kayseri yöresinde *Theileria* ve *Babesia* yönünden mikroskopik bakıda negatif olarak tespit ettikleri 15 örneğin RLB'de pozitif saptadıklarını bildirmişlerdir. Garcia-Sanmartin ve ark. (2006) *Theileria* ve *Babesia* türlerinin yaygınlığını araştırdıkları çalışmada RLB'de pozitif saptanan 72 örneğin mikroskopik bakıda negatif belirlendiğini, negatif saptanan etkenlerin çoğunun *Theileria* türleri olduğunu çok az bir kısmını *Babesia* spp. olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada enfeksiyon mikroskopik bakı ile sadece %28.8 saptanırken, RLB'de 2 katı kadar (%54) pozitiflik belirlenmiştir. Sparagano ve ark. (2000) İtalya'da sığırlarda bulunan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin moleküler yöntemlerle teşhisine yönelik çalışmada PCR'de negatif saptadıkları 3 hayvanın RLB'de pozitif saptandığını bildirmişlerdir. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Altay ve ark. (2008a) *Babesia* ve *Theileria* türlerini mikroskopide %5.4, RLB'de ise %16.19 saptamışlardır. RLB'de pozitif saptanan 43 örnek mikroskopik bakıda negatif olarak tespit edilmiştir. Awadia ve ark. (2006) Sudan'da *T.annulata*'yı mikroskopik bakıda %16.7, PCR ile %48.1 ve RLB ile %65.4 oranında belirlemişlerdir. Sudan'da yapılan diğer bir çalışmada Salih ve ark. (2007b) *Theileria* ve *Babesia* etkenlerini mikroskopik bakı, PCR ve RLB ile sırasıyla %11.5, %49.5 ve %87.5 oranlarında saptamışlardır. Bu araştırmada ise bu oranlar sırasıyla %15, %21.1 ve %26.2'dir. Görüldüğü üzere RLB, mikroskopik bakı ve PCR testine oranla kan protozoonlarının teşhisinde daha duyarlıdır.

Bu araştırmada mikroskopik bakıda 44, PCR'da 62 örnek pozitif olarak belirlenmiştir. Mikroskopik bakıda negatif saptanan 18 örnek PCR'da pozitif olarak tespit edilmiştir. İspanya'da d'Olivieria ve ark. (1995) örnek aldıkları 92 hayvandan mikroskopik bakıda 20, PCR'da ise 68'inin pozitif olarak saptamışlardır. Azizi ve ark. (2008) 140 örneğin mikroskopik bakıda 12'sinde, PCR'da ise 56'sında *T.annulata* pozitifliği belirlemişlerdir. Dumanlı ve ark. (2005) Türkiye'nin doğusunda mikroskopik bakıda *Theileria* spp. miktarını %19.7 olarak tespit ederken, spesifik primerler kullanarak yaptıkları PCR'da %37.8 parazit DNA'sı saptamışlardır. Aktaş

ve ark. (2006) 252 kan örneğinden mikroskopik bakıda 41'nde, PCR'da ise 114 *Theileria* yönünden pozitiflik saptadıklarını ifade etmişlerdir. Çalışmamıza benzer olarak yukarıdaki çalışmalarda da aynı örneklerde PCR'da bulunan pozitiflik, mikroskopik bakıya oranla daha fazladır. Bu durum kanda çok az sayıda etken bulunduğu mikroskopik bakıda etken saptanamazken, parazit DNA'sının saptanabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla yapılacak epidemiyolojik çalışmalarda etken taşımayan keneler için portörlük ödevi gören hayvanların belirlenebilmesi için mikroskopik bakıdan ziyade moleküler yöntemlerle parazit DNA'sının aranmasının daha yararlı olabileceği kanısına varılmıştır.

Zeybek ve ark. (1995) Çankırı yöresinde mikroskopik bakı ile 1 yaş altı ve 1 yaş üzerindeki sığırlar arasında *T.annulata* piroplasmalarının görülmesi açısından fark olup olmadığına bakmışlar ve 0-1 yaşlı sığırlarda %2, 1 yaş üzerindeki sığırlarda %8.7 oranında etkene rastlamışlardır. Kapadokya bölgesinde örnek alınan hayvanlar yaş olarak 0-1 yaşlı, 1-2 yaşlı, >2 yaş olmak üzere 3 farklı yaş grubunda değerlendirildiklerinde, çalışmada mikroskopik bakıya göre sırasıyla %41.5, %66.1, %65.6, IFAT'a göre ise %53.3, %79.2, %71'lik oranlar belirlenmiştir (İnci ve ark. 2008). Kayseri yöresinde RLB ile *T.annulata* 0-1 yaş %13.2, >1-3 yaş %21.8 ve > 3 yaş %19.7, *Theileria buffeli/orientalis* ise >3 yaş hayvanlarda %2.5 oranında tespit edilmiştir (İça ve ark. 2007a). Bilgin (2007) Trakya bölgesinde RLB ile *T.annulata* oranını 1-3.5 yaşlı sığırlarda %6.25, 4-5.5 yaşları arasında %4.88, 6-13 yaşları arasında %2.86, *T.buffeli/orientalis* ise sırasıyla %61.48, %34.2 ve %28.57 oranında saptamıştır. Bu araştırmada alınan tüm örnekler 1 yaş ve üzerindeki hayvanlardan alınmış olup hayvanların en az bir mera sezonunu geriye bırakmış olduğuna dikkat edilmiştir. Sığırların enfekte olabilmeleri için kene ile temas etmesi gerekir. Sığırlarda bulunan *Theileria* türlerinin vektörlüğünü mera keneleri olarak da ifade edilen *Ixodidae* ailesine bağlı kene türleri yapmaktadır. Bunun yanında bu etkenlerin daha çok 1 yaş ve üzerindeki hayvanlarda enfeksiyon yapma yetenekleri artmaktadır. Bu nedenle enfekte olabilecek hayvanlar meraya çıkan, 1 yaş ve üzeri hayvanlar olacağından numuneler bu kategorideki hayvanlardan alınmıştır. Yaş durumuna göre örnekler 1-3 yaş, 4-6 yaş, 7-9 yaş ve 10 yaş ve üzerindeki hayvanlar olmak üzere 4 farklı grupta incelenmiştir. Çalışma sonucunda gruplarda etken mikroskopik bakıda sırasıyla %38.7, %45.5, %11.3 ve %4.5, RLB'de ise %48.1, %36.4, %13.0 ve %2.6

olarak belirlenmiştir. Bu araştırmadaki RLB sonuçları Trakya (Bilgin 2007) ve Kayseri bölgesindeki (İça ve ark. 2007a) etkenin yaş grupları arasında dağılımina paralellik göstermekte olup, etkene en fazla 1-3 yaş grubundaki hayvanlarda rastlanmıştır.

İrk düzeyinde karşılaştırma yapıldığında mikroskopik bakıda *Theileria* spp. piroplasmaları oranı sırasıyla melez ırklar (%50), kültür ırkları (%45.5) ve yerli ırklarda (%4.5) tespit edilmiştir. RLB'de ise bu oranlar kültür ırklarında %50.6, melez ırklarda %45.5 ve yerli ırklarda %3.9 olarak belirlenmiştir. Görüldüğü üzere mikroskopik bakı ve RLB paralel sonuç vermeyip, mikroskopik bakıda melez ırklarda daha fazla pozitiflik saptanırken, RLB'de kültür ırklarında daha fazladır. Bunun nedeni mikroskopik bakıda negatif, RLB'de pozitif saptanan 33 örneğin çoğunun tesadüfi olarak kültür ırkı hayvanlara ait olmasıdır. İnci ve ark. (2008) örnek aldıkları hayvanları saf ırklar ve melez+lokal ırklar olarak gruplandırmışlar ve mikroskopik bakıda sırasıyla %53.7 ve %71.2 oranında pozitiflik saptamışlardır. İnci ve ark. (2008) ile bu araştırmanın mikroskopik bakı sonuçları uyum içerisindedir.

Silva ve ark. (2010) etçi ırklarda enfeksiyon miktarının sütçü ırklara oranla daha yüksek olduğunu ve bunun sebebi olarak süt sığırı çiftliklerinde kene ile mücadelenin daha düzenli yapılmasından kaynaklanıyor olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmanın aksine araştırmamızda kültür ırkları arasında mikroskopik bakı ve RLB'de *Theileria* pozitifliğine Jersey hariç sütçü ırklarda (Holstein ve Montofon), kombine (Simental) ve etçi (Belçika Mavisı) ırklara oranla daha yüksek düzeyde rastlanmıştır. Kırıkkale yöresinde etçi sığır yetiştiriciliğinde hayvanlar kısa bir süre meraya çıkmakta ve daha sonra entansif besiyeye dönülmektedir. Dolayısıyla bu hayvanların kene ile teması çok az olmakta veya olmamaktadır. Sütçü sığır çiftlikleri ise genellikle mera hayvancılığı yapmakta ve hayvanlar kenelerin aktif oldukları dönemde sürekli temas halindedirler. Bu nedenle *Theileria* etkenlerine sütçü ırklarda etçi veya kombine ırklara göre daha fazla rastlanması beklenen bir durumdur.

Tropikal theileriosis endemik bölgelerde önemli kayıplara neden olmaktadır. Kayseri yöresinde klinik Tropikal theileriosis vakalarının ve bu hastalığa bağlı ölümlerin meydana getirdiğı ekonomik kayıpların araştırıldığı çalışmada endemik

stabil bölgede ekonomik kayıpların %7'si morbidite, %93'ünün ise mortaliteden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Klinik enfeksiyon gösteren aşı ve aşısız 87 sığır üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada 34 hayvanın öldüğü geri kalanların ise iyileştiği tespit edilmiştir. Ölen ve iyileşen hayvanların oluşturduğu ekonomik kaybın 130.000 Amerikan dolarına (\$) karşılık geldiği ifade edilmiştir (İnci ve ark. 2002). Diğer bir çalışmada Kapadokya'da Tropikal theileriosis'in 2 yıl içinde neden olduğu kayıpların 598.133 \$'a mal olduğu belirlenmiştir. Bunlar üretimin azalması (%87.26), diğer kayıplar (%9.29) ve kontrol bedeli (%3.45) olarak sıralanmıştır (İnci ve ark. 2007). Bu çalışmalardan da anlaşılacağı gibi Tropikal theileriosis ülke ekonomisine önemli zararlar vermektedir. Bu çalışma ile Kırıkkale bölgesinde ilk kez *T.annulata* varlığı tespit edilmiştir. Daha önce bilimsel olarak desteklenmemiş olmasına rağmen özellikle Keskin ve Delice ilçelerinde, bölgedeki meslektaşlarımız klinik belirtilere göre theileriosise bağlı ölümlerin gerçekleştiğini ve bazı bölgelerde bu oranın yüksek düzeyde olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışma kapsamında özellikle bu iki ilçede *T.annulata* düzeyinin diğer ilçelere oranla yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ışığında bölgemizde etkenin neden olduğu ekonomik kayıpların bilimsel olarak ortaya konmasına yönelik bir çalışmanın da yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Bu araştırmada mikroskopik bakıda pozitif saptanan 34, RLB'de *T.annulata* belirlenen 51 hayvanın üzerinde çok sayıda kene olduğu görülmüştür. Üzerinde kene görülüp pozitif saptanan hayvanların yaygınlığı Keskin ve Delice ilçelerinde dikkati çekmiştir. Karakeçili'de ise örnek alınan hayvanların hiçbirinde kene görülmemiştir. Bunun nedeninin Keskin ve Delice ilçesinde kenelerle mücadelenin düzenli olarak yapılmaması, hayvanların bahar ve yaz aylarında günün büyük bir bölümünü merada geçirmeleri, dolayısıyla kene ile temaslarının daha fazla olmasından, Karakeçili ilçesinde hayvancılığın kapalı bir sistemde yapılması ve merada bu hayvanların çok kısa bir süre kalmalarından dolayı kene ile temasın az olmasından kaynaklandığı şeklinde düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma Kırıkkale yöresinde *Theileria* türlerini ve yayılışının belirlenmesine yönelik ilk çalışmadır. Daha önce klinik belirtiler dikkate alınarak bölge Veteriner Hekimleri tarafından theileriosis teşhisi konulup tedavisi yapılmış, ancak buna neden olan türün hangi tür olduğu ve yaygınlığı hakkında herhangi bir

bilgi sözkonusu değildir. Kırıkkale'de *T.annulata* varlığı ilk defa bu çalışma ile bilimsel olarak ortaya konmuştur. Çalışmada yörede sadece *T.annulata*'nın bulunduğu, *T.buffeli/orientalis*'in ise bulunmadığı ortaya konmuştur.

Kırıkkale'de hayvancılığın en yoğun olduğu Keskin ilçesinde etkenin fazla miktarda olması, bölgede etkene karşı aşı uygulamalarının düzenli olarak, kenelerle mücadelenin daha dikkatli bir şekilde ve kurallara uygun yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Bu araştırmada Kırıkkale yöresinde *Theileria* spp. piroplasmalarına mikroskopik bakıda %15, PCR'da etken DNA'sına %21.1 ve RLB'de *T.annulata*'ya %26.2 oranında rastlanmıştır. Bu çalışma ile RLB testinin mikroskopik bakı ve PCR testine oranla *Theileria* türlerinin belirlenmesinde daha duyarlı olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır.

Bu çalışmanın ülkemiz sığır theileriosisi epidemiyolojisinin ortaya konmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- ABDEL-RADY A, AHMED LS, MOHAMED A, AL-HOSARY A (2010) Using polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of bovine theileriosis in Upper Egypt. *IJAVMS*, 4 (3), 67-74.
- AÇICI M (1995) Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 8, 271-277.
- AÇICI M (2002) Samsun yöresinde Tropikal theileriosis'e karşı aşılanan sığırlarda saha çalışmaları. *Türkiye Parazitol Derg*, 26 (3), 257-265.
- AHMED JS (2002) The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of pirolasmoses. *Parasitol Res*, 88, 48-50.
- AKTAS M, ALTAY K, DUMANLI N (2006) A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Vet Parasitol*, 138, 179-185.
- AKTAS M, DUMANLI N, CETINKAYA 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 (1999) Elazığ yöresinde Tropikal theileriosis'e karşı aşılanan sığırlarda saha çalışmaları. *FÜ Sağ Bil Derg*, 13, 79-87.
- AKTAŞ M, DUMANLI N (2001) Malatya yöresinde *Hyalomma* soyuna bağlı kene türlerinde doğal *Theileria annulata* enfeksiyonları. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 119-124.
- AKTAŞ M, DUMANLI N (2010) Theileriidae. "Veteriner Protozooloji" Ed. NAZİR DUMANLI, ZAFER KARAER, Medisan Yayınevi, Tıbbi Alet, İlaç, Kimyasal Madde, Gıda Sanayi İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti. Ankara, s: 207-218.
- AKTAŞ M, DUMANLI N, ANGIN M (2004) Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma* species in the east of Turkey. *Vet Parasitol*, 119, 1-8.
- AKTAŞ M, SEVGİLİ M, DUMANLI N, KARAER Z, ÇAKMAK A (2001) Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde Tropikal theileriosis'in seroprevalansı. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 359-363.

- ALMERIA S, CASTELLA J, FERRER D, GUTIERREZ JF, ESTRADA-PENA A, SPARAGANO O (2002) Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. *Ann NY Acad Sci*, 969, 78-82.
- ALMERIA S, DELGADO-NEIRA Y, ADELANTADO C, HUGUET M, VINENT J, NICOLAS A (2009) Mediterranean theileriosis and other tick transmitted piroplasmoses in cattle in Minorca (Balearic Islands, Spain): The effect of tick control on prevalence levels analyzed by reverse line blot (RLB) macroarrays. *J Parasitol*, 95 (3), 598–603.
- ALP HG (1995) İstanbul İli Sığırlarında Tropikal Theileriosis'in Yaygınlığı ve Yayılma Oranının Belirlenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ALTAY K, AKTAŞ M (2004) Sığır theileriosisi. *FÜ Sağlık Bil Dergisi*, 18 (2), 79-86.
- ALTAY K, AKTAŞ M, DUMANLI N (2007a) Erzincan yöresinde sığırlarda *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli/orientalis*'in reverse line blotting yöntemi ile araştırılması. *Türkiye Parazit Derg*, 31 (2), 94-97.
- ALTAY K, AKTAŞ M, DUMANLI N (2007b) *Theileria annulata* Tams1 geninin PCR-RFLP analizi. *Türkiye Parazit Derg*, 31 (3), 173-75.
- ALTAY K, AYDIN MF, DUMANLI N, AKTAS M (2008a) Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Vet Parasitol*, 158, 295–301.
- ALTAY K, AYDIN MF, ULUIŞIK U, AKTAŞ M, DUMANLI N (2008b) *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli*'nin teşhisinde multiplex PCR'ın kullanılması. *Turkiye Parazit Derg*, 32 (1), 1-3.
- ALTUG N, YUKSEK N, AGAOGLU ZT, KELES I (2008) Determination of adenosine deaminase activity in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Trop Anim Health Prod*, 40, 449–456.
- ANANDA KJ, D'SOUZA PE, PUTTALAKSHMAMMA GC (2009) Prevalence of haemoprotozoan diseases in crossbred cattle in Bangalore North. *Vet World*, 2 (1), 15-16.
- AWADIA MA, BAKHEIT MA, MUKHTAR MM, HASSAN S, AHMED JS, SEITZER U (2006) Epidemiology of *Theileria annulata* infection of dairy cattle in the Sudan using molecular techniques, *Ann NY Acad Sci*, 1081, 471–472 .

- AWADIA MA, SALIH D, BAKHEIT M, HUSSEIN AR, HASSAN SM, MUKHTAR MM, AHMED JS, SEITZER U (2008) Molecular structure of TaSP gene of *Theileria annulata*. Animal biodiversity and emerging diseases. *Ann NY Acad Sci*, 1149, 218–220.
- AZIZI H, SHIRAN B, DEHKORDI AF, SALEHI F, TAGHADISI C (2008) Detection of *Theileria annulata* by PCR and its comparison with smear method in native carrier cows. *Biotechnology*, 7, 574-577.
- BAKHEIT MA, LATIF AA (2002) The innate resistance of Kenana cattle to Tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Sudan. *Ann NY Acad Sci*, 969, 159-163.
- BAKHEIT MA, SCHNITTGER L, SALIH DA, BOGUSLAWSKI K, BEYER D, FADL M, AHMED JS (2004) Application of the recombinant *Theileria annulata* surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of Tropical theileriosis. *Parasitol Res*, 92, 299–302.
- BENIWAL RK, SHARMA RD, NICHANI AK (2000) Determination of duration of immunity of calves vaccinated with the *Theileria annulata* schizont cell culture vaccine. *Vet Parasitol*, 90, 25-35.
- BEYAZIT A (1997) Bursa Yöresinde *Theileria annulata*'nın Epidemiyolojisi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- BIOTECH (2004) <http://www.biotech-online.com/fileadmin/pdf/datasheet/reverse-line-blot-hybridisation-in-the-detection-of-tick-borne-diseases.pdf> Erişim Tarihi: 14.09.2011.
- BİLGİÇ HB (2010) *Theileria annulata*'nın Tanısında Serolojik (İndirekt ELISA) ve Moleküler (PZR, Çoklu PZR ve LAMP) Yöntemlerin Geliştirilmesi. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- BİLGİN Z (2007) Trakya'da Sığırlarda Bulunan *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin ve Bunların Sığırlarda Yaygınlığının Reverse Line Blotting (RLB) Tekniği ile Araştırılması. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- BLOOD CH, SASSE J, BRODT P, ZETTER BR (1988) Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol*, 107, 1987-1993.
- BOULTER N, HALL R (1999) Immunity and vaccine development in the bovine theilerioses. *Adv Parasitol*, 44, 41-97.

- BRIGIDO C, DA FONSECA IP, PARREIRA R, FAZENDEIRO I, DO ROSARIO VE, CENTENO-LIMA S (2004) Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal. *Vet Parasitol*, 123, 17–23.
- BROWN CG (1990) Control of Tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia*. 32 (1), 23-31.
- BURRIDGE MJ, BROWN CGD, KIMBER CD (1974) *Theileria annulata*: Cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. *Exp Parasitol*, 35 (3), 374-380.
- CALLOW LL, PARKER RJ, RODWELL BJ, OTTLEY ML (1976) Piroplasmosis in buffaloes and its serological diagnosis based on a homology between buffalo and bovine immunoglobulins. *Aust Vet J*, 52 (7), 342.
- CAMPBELL JD, BROWN DJ, GLASS EJ, HALL FR, SPOONER RL (1994) *Theileria annulata* sporozoite targets. *Parasite Immunol*, 16 (9), 501-505.
- CAMPBELL JDM, NICHANI AK, BROWN DJ, HOWIE SEM, SPOONER RL, GLASS EJ (1997) Parasite-mediated steps in immune response failure during primary *Theileria annulata* infection. *Trop Anim Health Prod*, 29, 133-135.
- CAMPBELL RSF (1978) The use of resistant cattle in the control of ticks and vector-borne diseases. In: Tick-borne Diseases and Their Vectors. Ed. WILDE, JKH. Lewis Reprints Ltd: University of Edinburgh. p: 251-257.
- CAN R, GÜLER S, ÖZDEMİR H (1987) Tropikal theileriosis'in halofuginone ve transamine ile tedavisi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 34 (1), 39-44.
- CELEP A (1984) Samsun ve Ordu illeri ile ilçelerinde sığırlarda gaita muayene sonuçlarına göre tesbit edilebilen helmintolojik bulgular ve perifer kan frotisi muayene sonuçları. *Etlik Vet Mikrob Enst Derg*, 5, 106-112.
- CHANSIRI K, KAWAZU S, KAMIO T, TERADA Y, FUJISAKI K, PHILIPPE H, SARATAPHAN N (1999) Molecular phylogenetic studies on *Theileria* parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Vet Parasitol*, 83, 99-105.

- COSSIO-BAYUGAR R, PILLARS R, SCHLATER J, HOLMAN PJ (2002) *Theileria buffeli* infection of a Michigan cow confirmed by small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Vet Parasitol*, 105, 105–110.
- ÇAKMAK A (1990) Ankara yöresinde bir sığır sürüsünde haemoparazitlerin insidensinin araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 37, 632-645.
- ÇAKMAK A, ÖZ İ (1993) Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının sero-diagnozu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 40, 70-77.
- DABAK M, DABAK DO, AKTAS M (2004) Cerebral theileriosis in a holstein calf. *Vet Rec*, 154, 533-534.
- DARGHOOUTH MA, BEN MILED L, BOUATTOUR A, MELROSE TR, BROWN CG, KILANI M (1996) A preliminary study on the attenuation of Tunisian schizont-infected cell lines of *Theileria annulata*. *Parasitol Res*, 82, 647-655.
- DENİZ A (2003) Sığırlarda *Theileria* Türlerinin Reverse Line Blotting ve İndirekt Floresan Antikor Testi ile Karşılaştırmalı Tanısı Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- DENİZ A, ÖNCEL T, İÇEN H, ŞİMŞEK A (2012) Diyarbakır yöresinde sığırlarda *Theileria annulata* ve *T. buffeli*'nin multiplex PCR ile saptanması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (Suppl-A), 111-114.
- DICKSON J, SHIELS BR (1993) Antigenic diversity of a major merozoite surface molecule in *Theileria annulata*. *Mol Biochem Parasitol*, 57, 55-64.
- DİNÇER Ş (1990) Ruminantlarda babesiosis ve theileriosis. Tigem Eğitim Semineri. 4-8 Haziran 1990, Dalaman. s:9
- DİNÇER Ş, SAYIN F, KARAER Z, ÇAKMAK A, FRIEDHOFF KT, MULLER I, İNCİ A, YUKARI BA, EREN H (1991) Karadeniz Bölgesi sığırlarında bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 38, 206-226.
- D'OLIVEIRA C, FEENSTRA A, VOS H, OSTERHAUS AD, SHIELS BR, CORNELISSEN AW, JONGEJAN F (1997) Induction of protective immunity to *Theileria annulata* using two major merozoite surface antigens presented by different delivery systems. *Vaccine*, 15, 1796-1804.

- D'OLIVEIRA C, TIJHAAR EJ, SHIELS BR, VAN DER WM, JONGEJAN F (1996) Expression of genes encoding two major *Theileria annulata* merozoite surface antigens in *Escherichia coli* and a *Salmonella typhimurium* aroA vaccine strain. *Gene*, 172, 33-39.
- D'OLIVERIA C, VAN DER WEIDE M, HABELA MA, JACQUIET P, JONGEJAN F (1995) Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J Clin Microbiol*, 33 (10), 2665–2669.
- DUMANLI N, AKTAS M, CETINKAYA B, ÇAKMAK A, KOROGLU E, SAKI CE, ERDOGMUS Z, NALBANTOGLU S, ONGOR H, SIMSEK S, KARAHAN M, ALTAY K (2005) Prevalence and distribution of Tropical theileriosis in eastern Turkey. *Vet Parasitol*, 127, 9–15.
- DUMANLI N, ÖZER E (1987) Elazığ yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. *SÜ Vet Fak Derg*, 3, 159-166.
- DURRANI AZ, KAMAL N (2008) Identification of ticks and detection of blood protozoa in Friesian cattle by polmerase chain reaction test and estimation of blood parameters in district Kasur, Pakistan. *Trop Anim Health Prod*, 40, 441–447.
- EREN H, ÇAKMAK A, YUKARI BA (1995) Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde *Theileria annulata*'nın sero-prevalansı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 42, 57-60.
- EREN H, ÖZLEM MB, SERT H, KAPLAN A (1998) Aydın yöresi sığırlarında *Theileria annulata* (Dschunkowsky ve Luhs, 1904)'nın prevalansı. *Türkiye Parazitol Derg*, 22, 177-179.
- ERKUT HM (1967) Ege Bölgesinde sığırlarda piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. *Bornova Vet Araş Enst Derg*, 16, 120-130.
- FIGUEROA JV, BUENING GM (1995) Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Vet Parasitol*, 57 (1-3), 75-92.
- FUJISAKI K (1992) A review of the taxonomy of *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* group parasites in cattle. *J Protozool Res*, 2, 87-96.
- GACHOHI JM, NGUMI PN, KITALA PM, SKILTON RA (2010) Estimatin seroprevalence and variation to four tick-borne infections and determination of associated risk factors in cattle under traditional mixed farming system in Mbeere District, Kenya. *Prev Vet Med*, 95, 208–223.

- GARCIA-SANMARTIN J, NAGORE D, GARCIA-PEREZ A, JUSTE R, HURTADO A (2006) Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *Vet Res*, 2,16 doi:10.1186/1746-6148-2-16.
- GEORGES K, LORIA GR, RIILI S, GRECO A, CARACAPPA S, JONGEJAN F, SPARAGANO O (2001) Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol*, 31 (4), 273-286.
- GHAEMI P, HOGHOUGH-RAD N, SHAYAN P, ECKERT B (2012) Detection of *Theileria orientalis* in Iran by semi-nested PCR. *Parasitol Res*, 110, 527-531.
- GILL BS, BHATTACHARYULU Y, KAUR D (1977). Symptoms and pathology of experimental bovine Tropical theileriosis (*Theileria annulata*). *Ann Parasitol Hum Comp*, 52 (6),597-608.
- GLASS EJ, PRESTON PM, SPRINGBETT A, CRAIGMILE S, KIRVAR E, WILKIE G, BROWN DCG (2005) *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. *Int J Parasitol*, 35, 337-347.
- GÖKSU K (1959) Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, No:115/60, Yeni Matbaa, Ankara. s:73.
- GÖKSU K (1968) Bazı Karadeniz Bölgesi illerinin sığırlarında müşahede edilen *Babesidae* (Sporozoa: Piroplasmida) enfeksiyonları ve kene enfestasyonları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 15, 46-57.
- GUBBELS JM, DE VOS AP, VAN DER WEIDE M, VISERAS J, SCHOULS LM, DE VRIES E, JONGEJAN F (1999) Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol*, 37 (6), 1782–1789.
- GUBBELS JM, D'OLIVERIA C, JONGEJAN F (2000) Development of an indirect Tams1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7 (3), 404–411.
- GUZEL M, KONTAS ASKAR T, KAYA G, ATAKISI E, ERBİL AVCI G (2008) Serum sialic acids, total antioxidant capacity, and adenosine deaminase activity in cattle with theileriosis and anaplasmosis. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 227-230.

- GÜRALP N (1985) Theileriosis'in sağaltımında yeni ilaçlar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 32 (1), 231-235.
- HALL FR (1988) Antigens and immunity in *Theileria annulata*. *Parasitol Today*, 4, 257-261.
- HALL R, HUNT PD, CARRINGTON M, SIMMONS D, WILLIAMSON S, MECHAM RP, TAIT A (1992) Mimicry of elastin repetitive motifs by *Theileria annulata* sporozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol*, 53, 105-112.
- HASHEMI-FESHARKI R (1988) Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitol Today*, 4, 36-40.
- HERVAS J, CARRASCO L, GOMEZ-VILLAMANDOS JC, CHACON-M de LARA F, SIERRA MA (1998) Myocarditis associated with *Theileria* spp. in calves. *J Vet Med*, 45, (1-10), 401-405.
- ICA A, INCI A, YILDIRIM A (2007a) Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 33-38.
- ICA A, VATANSEVER Z, YILDIRIM A, DUZLU O, INCI A (2007b) Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. *Vet Parasitol*, 148, 156-160.
- INCI A, ICA A, YILDIRIM A, DUZLU O (2010) Identification of *Babesia* and *Theileria* species in small ruminants in Central Anatolia (Turkey) via reverse line blotting. *Turk J Vet Anim Sci*, 34 (2), 205-210.
- INCI A, ICA A, YILDIRIM A, VATANSEVER Z, CAKMAK A, ALBASAN H, CAM Y, ATASEVER A, SARIOZKAN S, DUZLU O (2007) Economical impact of Tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey. *Parasitol Res*, 101 (2), 171-174.
- INCI A, ICA A, YILDIRIM A, VATANSEVER Z, CAKMAK A, ALBASAN H, CAM Y, ATASEVER A, DUZLU O (2008) Epidemiology of Tropical theileriosis in the Cappadocia region. *Turk J Vet Anim Sci*, 32 (1), 57-64.
- ISLAM MK, JABBAR A, CAMPBELL BE, CANTACESSI C, GASSER RB (2011) Bovine theileriosis—an emerging problem in south-eastern Australia?. *Infect Genet Evol*, 11 (8), 2095-2097.

ITG.BE (2012) Erişim adresi: <http://www.itg.be/internet/jaarverslag00/en/dep-diergeneeskunde.htm>.
Erişim Tarihi:31.12.2012.

İNCİ A, ÇAKMAK A, ÇAM Y, KARAER Z, ATASEVER A, İÇA A (2002) Kayseri yöresinde Tropikal theileriosis'e bağlı ekonomik kayıplar. *Türkiye Parazitol Derg*, 26 (2), 156-160.

İSSİ M, GÜL Y, BAŞBUĞ O, ŞAHİN N (2010) Tropikal theileriosis'li sığırlarda klinik, hematolojik ve bazı biyokimyasal parametreler ile serum kobalt ve B12 vitamin düzeyleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (6), 909-913.

JANG S, CHO K, CHAE JS, HO KANG S (2004) Fast diagnosis of bovine theileriosis by whole blood pcr and microchip electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*, 25 (5), 757-760.

JEONG W, KWEON CH, KIM JM, JANG H, PAIK SG (2005) Serological investigation of *Theileria sergenti* using latex agglutination test in South Korea. *J Parasitol*, 91 (1), 164-169.

JIANXUN L, WENSHUN L (1997) Cattle theileriosis in China. *Trop Anim Health Prod*, 29, 4-7.

KACHANI M, SPOONER RL, RAE P, BELL-SAKYI L, BROWN CG (1992) Stage-specific responses following infection with *Theileria annulata* as evaluated using ELISA. *Parasitol Res*, 78 (1), 43-47.

KAMAU J, SALIM B, YOKOYAMA N, KINYANJUI P, SUGIMOTO C (2011) Rapid discrimination and quantification of *Theileria orientalis* types using ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Infect Genet Evol*, 11, 407-414.

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.

KARAGENÇ T, AYSUL N, AYPAK S (2009) *Theileria*'ların moleküler biyolojik yapısı ve çalışmaları. "Moleküler Parazitoloji" Ed: ÖZCEL MA, TANYÜKSEL M, EREN H. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No 22. Meta Basım Matbaacılık, Bornova/İzmir. s:527-547.

- KARAGENÇ T, EREN H (2002) Tropikal theileriosis'de aşılama. *Türkiye Parazitol Derg*, 26 (3), 266-270.
- KARAGENÇ T, EREN H (2007) *Theileria annulata* enfeksiyonunda immunité. "Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji" Ed: ÖZCEL MA, İNCİ A, TURGAY N, KÖROĞLU E. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:21.İzmir. s: 516-523.
- KATZER F, CARRINGTON M, KNIGHT P, WILLIAMSON S, TAIT A, MORRISON IW, HALL R (1994) Polymorphism of SPAG1, a candidate antigen for inclusion in a sub-unit vaccine against *Theileria annulata*. *Mol Biochem Parasit*, 67, 1-10.
- KATZER F, MCKELLAR S, BENMILED L, D'OLIVEIRA C, SHIELS B (1998) Selection for antigenic diversity of Tams1, the major merozoite antigen of *Theileria annulata*. *Ann NY Acad Sci*, 849, 96-108.
- KATZER F, MCKELLAR S, FERGUSON MA, D'OLIVEIRA C, SHIELS BR (2002) A role for tertiary structure in the generation of antigenic diversity and molecular association of the Tams1 polypeptide in *Theileria annulata*. *Mol Biochem Parasitol*, 122, 55-67.
- KAUFMANN J (1996) Parasitic infections of domestic animals: A diagnostic manual. Birkhäuser Verlag. Germany. p: 55-83.
- KAWAZU S, KAMIO T, KAKUDA T, TERADA Y, SUGIMOTO C, FUJISAKI K (1999) Phylogenetic relationships of the benign *Theileria* species in cattle and Asian buffalo based on the major piroplasm surface protein (p33/34) gene sequences. *Int J Parasitol*, 29, 613- 618.
- KAYA G, ÇAKMAK A, KARAER Z (2006) Seroprevalence of theileriosis and babesiosis of cattle. *Medycyna Wet*, 62, 156-158.
- KHUKHUU A, LAN DTB, LONG PT, UENO A, LI Y, LUO Y, MACEDO ACC, MATSUMOTO K, INOKUMA H, KAWAZU SI, IGARASHI I, XUAN X, YOKOYAMA N (2011) Molecular epidemiological survey of *Theileria orientalis* in Thua Thien Hue province, Vietnam. *J Vet Med Sci*, 73 (5),701-705.
- KILTZ HH, UILENBERG G, FRANSSSEN FF, PERIE NM (1986) *Theileria orientalis* occurs in Central Africa. *Res Vet Sci*, 40, 197-200.

- KIZIL Ö, KARAPINAR T, BALIKÇI E, KIZIL M (2007) Tropikal tayleriyozis'li sığırlarda hemogram ve bazı serum parametrelerindeki değişiklikler. *FÜ Sağ Bil Derg*, 21 (1), 11–14.
- KOCAN KM, EDMOUR F, BLOUIN EF, BARBET AF (2000) *Anaplasmosis* control past, present, and future. *Ann NY Acad Sci*, 916, 501-509.
- KUBOTA S, SUGIMOTO C, KAKUDA T, ONUMA M (1996) Analysis of immunodominant piroplasm surface antigen alleles in mixed populations of *Theileria sergenti* and *T.buffeli*. *Int J Parasitol*, 26, 741-747.
- KUTTLER KL, ROBINSON RM, ROGERS WP (1967) The detection of specific complement-fixing antibodies in serum of white-tailed deer (*Odocoileus Virginianus*) with *Theileria* infection. *Can J Comp Med Vet Sci*, 31, 354-357.
- LAWRENCE JA, PERRY BD, WILLIAMSON S (2006). East Coast Fever. In: Infectious diseases of livestock, Ed: COETZER JAW, TUSTIN RC, Volume 2. Oxford University Press, Cape Town. p:448-467
- LEEMANS I, BROWN D, HOOSHMAND-RAD P, KIRVAR E, UGGLA A (1999) Infectivity and cross-immunity studies of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle In vivo response. *Vet Parasitol*, 82, 179–192.
- MACHARDY N (1984) Recent advances in the chemotherapy of theileriosis. *Prev Vet Med*, 2, 179-192.
- MARTIN-SANCHEZ J, VISERAS J, ADROHER FJ, GARCIA-FERNANDEZ P (1999) Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: Its use in epidemiology studies. *Parasitol Res*, 85, 243-245.
- MEHLHORN H (2004) Babesiosis, Theileriosis. Encyclopedic reference of parasitology (2nd ed), Universitat Würzburg, Springer-Verlag, Heidelberg.
- MGHIRBI Y, HURTADO A, BOUATTOUR A (2010) *Theileria* and *Babesia* parasites in ticks in Tunisia. *Transbound Emerg Dis*, 57 (1-2), 49-51.

- MHADHBI M, NAOUACH A, BOUMIZA A, CHAABANI MF, ABDERAZZAK SB, DARGHOUTH MA (2010) In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone. *Vet Parasitol*, 169, 241–247.
- MIRANDA J, STUMME B, BEYER D, CRUZ H, OLIVA AG, BAKHEIT M, WICKLEIN D, YIN H, LOU J, AHMED JS, SEITZER U (2004) Identification of antigenic proteins of a *Theileria* species pathogenic for small ruminants in China recognized by antisera of infected animals. *Ann NY Acad Sci*, 1026, 161-164.
- MİMİOĞLU M (1956) Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde “*Haematuria vesicalis bovis*”li sığırlarda parazitolojik araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2, 183-192.
- MİMİOĞLU M, GÖKSU K, SAYIN F (1969) Veteriner ve Tıbbi Protozooloji. Cilt 2. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları No:248. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- MİMİOĞLU M, ÖZCAN C, KESKİNTEPE H, ULUTAŞ M, GÜLER S (1972) Sığır theileriosis’inin yayılışı ve tedavisi üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 471-487.
- MOLAD T, MAZUZ ML, FLEIDEROVITZ L, FISH L, SAVITSKY I, KRIGEL Y, LEIBOVITZ B, MOLLAY J, JONGEHAN J, SHKAP V (2006) Molecular and serological detection of *A.centrale* and *A.marginale* infected cattle grazing within an endemic area. *Vet Microbiol*, 113, 55- 62.
- MOLANO A, SEGURA C, GUZMAN F, LOZADA D, PATARROYO ME (1992) In human malaria protective antibodies are directed mainly against the Lys-Glu ion pair within the Lys-Glu-Lys motif of the synthetic vaccine SPf 66. *Parasite Immunol*, 14, 111-124.
- NAGORE D, GARCIA-SANMARTIN J, GARCIA-PÉREZ AL, JUSTE RA, HURTADO A (2004) Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: Epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Vet Parasitol*, 123, 41–54.
- NALBANTOĞLU S (1998) Çukurova yöresinde Tropikal theileriosis'e karşı aşılanan sığırlar üzerinde saha çalışmaları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 45, 39-51.
- NEITZ WO (1957) Theileriosis, gonderioses and cyauxzoonoses: a review. *Gonderia annulata* infection. *Onderstepoort J Vet Res*, 27, 319-346.

- NORVAL RAI, PERRY BD, YOUNG AS (1992) The epidemiology of theileriosis in Africa. Academic Press Limited. s: 63-99.
- OMER OH, MAHMOUD OM, Al-SADRANI AA (2011) Evaluation of the acridine orange fluorescence technique and the indirect fluorescent antibody as diagnostic tests for Tropical theileriosis. *Vet World*, 4 (8), 341-344.
- OIE (2009) Erişim adresi: [http:// www. cfsph. iastate.edu/ Factsheets/ pdfs/ theileriosis_theileria_parva_and_theileria_annulata.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/theileriosis_theileria_parva_and_theileria_annulata.pdf). 10.01.2012.
- ONAR E (1989) Türkiye’de Tropikal theileriosis’e (*Theileria annulata*) karşı aşı hazırlama ve uygulama alışmaları. Ed: DEMİRÖZÜ K, UYSAL Y, NADAS ÜG, TÜRKASLAN J, ALTINEL C, ALP H. Uluslararası mycoplasmosis ve theileriosis sempozyumu, İstanbul: Pendik Hayv Hast Merk Araş Enst Yay: 10. 47-52.
- ORKUN Ö, DENİZ A, GÜVEN E (2012) Kırşehir yöresi sığırlarında *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli/orientalis* varlığının multiplex-PCR yöntemiyle araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 36, 9-11.
- OTA N, MIZUNO D, KUBOKI N, IGARASHI I, NAKAMURA Y, YAMASHINA H, HANZAIKE T, FUJII K, ONOE S, HATA H, KONDO S, MATSUI S, KOGA M, MATSUMOTO K, INOKUMA H, YOKOYAMA N (2009) Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the Eastern part of Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci*, 71,937-944.
- OUHELLI H, SPOONER R, EL HASNAOUI M, KACHANI M, WILLIAMSON S, FLACH E (1994) Review of immunisation against theileriosis in Morocco. In Third European Union Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, R. Spooner and Campbell, J. (eds): Antalya, Turkey.
- OURA CAL, BISHOP RP, WAMPANDE EM, LUBEGA GW, TAIT A (2004) Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. *Int J Parasitol*, 34, 603–613.
- OZKOC U, PIPANO E (1981) Trials with cell culture vaccine against theileriosis in Turkey, In: Irvin AD, Cunningham MP, Young AS, Advances in the Control of Theileriosis, Martinus Nijhoff The Hague, 256-258.
- ÖZ İ (1999) Adana Yöresinde Tropikal theileriosis’e Karşı Aşılanan Sığırklar Üzerinde Saha alışmaları. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- ÖZER E, ERDOĞMUŞ SZ, KÖROĞLU E (1993) Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. *Doğa Tr Vet Hay Derg*, 17, 209-215.
- PAŞA S (2008) Theileriosisli sığırlarda buparvaquone (buparvon)'un terapötik etkinliği. *Türkiye Parazitol Derg*, 32 (4), 317-321.
- PIPANO E (1974) Immunological aspects of *Theileria annulata* Infection. *Bull Off Int Epiz*, 31 (1-2), 139-159.
- PIPANO E, SHKAP V (2000) Vaccination against Tropical theileriosis. *Ann NY Acad Sci*, 916, 484-500.
- PRESTON PM, BROWN CG (1988) Macrophage-mediated cytostasis and lymphocyte cytotoxicity in cattle immunized with *Theileria annulata* sporozoites or macroschizont-infected cell lines. *Parasite Immunol*, 10 (6), 631-647.
- PRESTON PM, HALL FR, GLASS EJ, CAMPBELL JD, DARGHOUTH MA, AHMED JS, SHIELDS BR, SPOONER RL, JONGEJAN F, BROWN CG (1999) Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitol Today*, 15 (7), 268-274.
- RAZMI GR, BARATI F, ASLANI MR (2009) Prevalence of *Theileria annulata* in dairy cattle in Mashhad area, Iran. *J Vet Parasitol*, 23 (1), 81-83.
- RIJPKEMA SG, MOLKENBOER MJ, SCHOULS LM, JONGEJAN F, SCHELLEKENS JF (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 (12), 3091-3095.
- ROBINSON PM (1982) *Theileriosis annulata* and its transmission-a review. *Trop Anim Health Prod*, 14, 3-12.
- SAIKI RK, CHANG CA, LEVENSON CH, WARREN TC, BOEHM CD, KAZAZIAN HH, ERLICH HA (1988) Diagnosis of Sickle Cell Anemia and β -Thalassemia with

enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med*, 319, 537-541.

SALIH DA, ABDEL RAHMAN MB, MOHAMMED AS, AHMED R, KAMAL S, EL HUSSEIN AM (2009) Seroprevalence of tick-borne diseases among cattle in the Sudan. *Parasitol Res*, 104,845–850.

SALIH DA, EL HUSSEIN AM, KYULE MN, ZESSIN KH, AHMED JS, SEITZER U (2007a) Determination of potential risk factors associated with *Theileria annulata* and *Theileria parva* infections of cattle in the Sudan. *Parasitol Res*, 101,1285–1288.

SALIH DA, EL HUSSEIN AM, SEITZER U, AHMED JS (2007b) Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan. *Parasitol Res*, 101,1035–1044.

SAYIN F (1985) *Theileria* türlerinin patolojisi. "Theileriosis" Ed: SAYIN F. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No: 5. Bilgehan Basımevi, İzmir. 111-113.

SAYIN F, DINCER S, DUMANLI N, KARAER Z, ÇAKMAK A, İNCİ A, YUKARI BA, EREN H, BEYAZIT A, SPOONER RL, BROWN CGD (1994) Epidemiology of Tropical theileriosis in Turkey. European Union Third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis. October, 4-9, Antalya-Turkey.

SAYIN F, DINCER S, KARAER Z, ÇAKMAK A, İNCİ A, YUKARI BA, EREN H, VATANSEVER Z, NALBANTOĞLU S (2003) Studies on the epidemiology of Tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in cattle in Central Anatolia. Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 35, 521-539.

SAYIN F, NALBANTOĞLU S, KARAER Z, ÇAKMAK A, DİNÇER Ş, VATANSEVER Z, İNCİ A, YUKARI BA, EREN H, GÜNAY M, ONAR E, ALP H (2004) Atenüye *Theileria annulata* şizont aşılarının düşük dozlarının Tropikal theileriosis'e karşı sığırları korumadaki etkileri. *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 963-97.

SCHNEIDER I, HALLER D, KULLMANN B, BEYER D, AHMED JS, SEITZER U (2007) Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitol Res*, 101, 1471-1482.

SCHNEIDER I, HALLER D, SEITZER U, BEYER D AND AHMED JS (2004) Molecular genetic characterization and subcellular localization of a putative *Theileria annulata* membrane protein. *Parasitol Res*, 94, 405–415.

- SCHNITTGER L, KATZER F, BIERMANN R, SHAYAN P, BOGUSLAWSKI K, MCKELLAR S, BEYER D, SHIELS BR, AHMED JS (2002) Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Mol Biochem Parasitol*, 120, 247-256.
- SCHOOLS LM, VAN DE POL I, RIJKEMA SGT, SCHOT CS (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.
- SERGEANT E, DONATIEN AL, PARROT LM, LESTOQUARD F (1945) Etudes sur les piroplasmoses bovines. Institute Pasteur d'Algeria: Alger.
- SEVGILI M, CAKMAK A, GOKCEN A, ALTAS MG, ERGUN G (2010) Prevalence of *Theileria annulata* and *Babesia bigemina* in cattle in the vicinity of Sanliurfa. *J Anim Vet Adv*, 9 (2), 292-296.
- SHAH-FISCHER M, SAY R (1989) Manuel of tropical veterinary parasitology. English Edition. Published by C.A.B. International, p: 407-408.
- SHAHNAWAZ S, ALI M, ASLAM MA, FATIMA R, CHAUDHRY ZI, HASSAN MU, ALM M, IQBAL F (2011) A study on the prevalence of a tick-transmitted pathogen, *Theileria annulata*, and hematological profile of cattle from Southern Punjab (Pakistan). *Parasitol Res*, 109 (4):1155-1160.
- SHARIFIYAZDI H, NAMAZI F, ORYAN A, SHAHRIARI R, RAZAVI M (2012) Point mutations in the *Theileria annulata* cytochrome *b* gene is associated with buparvaquone treatment failure. *Vet Parasitol*, 187, 431-435.
- SHIELS BR, D'OLIVEIRA C, MCKELLAR S, BEN MILED L, KAWAZU S, HIDE G (1995) Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of *Theileria* parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 72, 149-162.
- SILVA MG, MARQUES PX, OLIVA A (2010) Detection of *Babesia* and *Theileria* species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method. *Vet Parasitol*, 174, 199-205.
- SONG KH, SANG BC (2003) Prevalence of *Theileria sergenti* infection in Korean native cattle by polymerase chain reaction. *Korean J Parasitol*, 41(3), 141-145.

- SOULSBY E JL (1982) Theileriidae. In: Helminths, Arthropods, and Protozoa of Domesticated Animals, 7th Edition. Bailliere Tindall. Philadelphia, p: 128-137.
- SPARAGANO O, LORIA GR, GUBBELS MJ, DE VOS AP, CARACAPPA S, JONGEJAN F (2000) Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. *Ann N Y Acad Sci*, 916,533-539.
- STEWART NP, STANDFAST NF, BALDOCK FC, REID DJ, DE VOS AJ (1992) The distribution and prevalence of *Theileria buffeli* in cattle in Queensland. *Aust Vet J* 69 (3), 59–61.
- STEWART NP, UILENBERG G, DE VOS AJ (1996) Review of Australian species of *Theileria*, with special reference to *Theileria buffeli* of cattle. *Trop Anim Health Prod*, 28, 81-90.
- STOCKHAM SL, KJEMTRUP AM, CONRAD PA, SCHMIDT DA, SCOTT MAROBINSON TW, TYLER JW, JOHNSON GC, CARSON CA, CUDDIHEE P (2000). Theileriosis in a Missouri beef herd caused by *Theileria buffeli*: Case report, herd investigation, ultrastructure, phylogenetic analysis, and experimental transmission. *Vet Pathol*, 37,11–21.
- SUGIMOTO C, FUJISAKI K (2002) Non-transforming *Theileria* parasites of ruminants. In: *Theileria*. Ed: DOBBELAERE, MCKEEVER D, Vol: 3, Kluwer Academic Publishers, USA, p: 93-106.
- SUGIMOTO C, KAWAZU S, KAMIO T, FUJISAKI K (1991) Protein analysis of *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* piroplasms by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology*, 102 (3), 341-346.
- SYSTEMA NATURAE (2000) Erişim Adresi: <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1315&tree=0.1>. Erişim Tarihi: 25.01.2013.
- TABIDI MH, HASSAN OM, EL JALII IM, HAMZA AE (2006) Surveillance of theileriosis in selected dairy farms in Khartoum and Gaizera States-Sudan. *J Anim Vet Adv*, 5 (11), 1043-1045.

- TAIT A, HALL FR (1990) *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. *Rev Sci Tech*, 9 (2), 387-403.
- TCHERNOMORETZ I (1945) Multiplication in vitro of Koch bodies of *Theileria annulata*. *Nature*, 156, 391.
- THEILERIA.ORG (2012) Erişim adresi: <http://theileria.org/ahdw/background.htm>. Erişim Tarihi: 31.12.2012.
- THEILERIA.ORG (2012) Erişim adresi: <http://www.theileria.org/ahdw/pictures/largemap.gif>. Erişim Tarihi: 27.11.2012.
- TSUR I, ADLER S, PIPANO E, SENFT Z (1964) Continuous growth of *Theileria annulata* schizonts in monolayer tissue culture. *Proceedings of the 1st International Congress on Parasitology*. 1, 266-267.
- TÜZER E (1981) İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 8, 97-110.
- UAB.ES (2012) Erişim tarihi: [http://www.veterinariavirtual.uab.es/parasito/diagnos003\\$/hematologia/frotis/arles/imagepages/image9.htm](http://www.veterinariavirtual.uab.es/parasito/diagnos003$/hematologia/frotis/arles/imagepages/image9.htm). Erişim Tarihi: 31.12.2012.
- UILENBERG G (1981) Theilerial species of domestic livestock. In: *Advances in the Control of Theileriosis*. Ed: IRVIN AD, CUNNINGHAM MP, YOUNG AS. *Proceeding of an International Conference Held at ILRAD, Nairobi, 9-13 February 1981*. Mertinus Nijhoff, The Hague, p: 4-37.
- ÜNER S, BİLGİÇ HB, BAKIRCI S, WEIR W, SHIELS B, TAIT A, KARAGENÇ T (2011) *Theileria annulata* sitokrom b geninin buparvaquone direnciyle ilişkisinin araştırılması. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu. 4-10 Eylül 2011. Kars/ Türkiye.185-186.
- VATANSEVER Z, İÇA A, DENİZ A, NALBANTOĞLU S, KARAER Z, ÇAKMAK A, SPARAGANO O (2003a) Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi. Eylül, 8-12, Konya.
- VATANSEVER Z, İÇA A, DENİZ A, NALBANTOĞLU S, KARAER Z, ÇAKMAK A, SPARAGANO O (2003b) Kenelerle nakledilen hastalıkların eşzamanlı tanısında

makroarray teknolojisinin kullanımı: Reverse line blotting tekniği. 13.Ulusal Parazitoloji Kongresi, 8-12 Eylül 2003, Konya. Program ve Özet Kitabı, s.195.

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.

WILLIAMSON SM, TAIT A, BROWN D, WALKER A, BECK P, SHIELS B, FLETCHER J, HALL R (1989) *Theileria annulata* sporozoite surface antigen expressed in *Escherichia coli* elicits neutralizing antibody. *Proc Natl Acadm Sci*, 86: 4639-4643.

YAMAN N (1998) Ankara Çubuk Yöresinde Tropikal Theileriosis'e Karşı Aşılana Sığırlarda Aşılama Sonrası Seroepidemiolojik Çalışmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

YOKOYAMA N, SIVAKUMAR T, OTA N, IGARASHI I, NAKAMURA Y, YAMASHINA H, MATSUI S, FUKUMOTO N, HATA H, KONDO S, OSHIRO M, ZAKIMI S, KURODA Y, KOJIMA N, MATSUMOTO K, INOKUMA H (2012) Genetic diversity of *Theileria orientalis* in tick vectors detected in Hokkaido and Okinawa, Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1669-1675.

YOUNG AS, PURNELL RE, PAYNE RC, BROWN CGD, KANHAI GK (1978) Studies on the transmission and course of infection of a Kenyan strain of *Theileria mutans*. *Parasitol*, 76, 99-115.

ZABLOTSKY VT (1991) Specific prevention of bovine theileriosis in Soviet Union. Ed: SINGH DK, VARSHNEY BC. Proceedings of the second EEC Workshop on Orientation and Coordination of Research on Tropical theileriosis. Held at National Dairy Development Board, ADRL, Anand, India. p: 9-10.

ZARLENGA DS, HIGGINS J (2001) PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet Parasitol*, 22, 215-230.

ZEYBEK H, YARALI C, DÜNDAR B (1995) Çankırı yöresi sığırlarında *Theileria annulata*'nın sero-prevalansı. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 8, 69-79.

ZHANG ZH (1991) *Theileria annulata* and its control in China. 11-14. Anand, India, National Dairy Development Board. Proceedings of the second EEC workshop on orientation and co-ordination of research on tropical theileriosis.

ZHUANG WZ, SUGIMOTO C, KUBOTA S, ONOE S, ONUMA M (1995) Antigenic alteration in major piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* during infection. *Vet Parasitol*, 60, 191-198.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Sami

Soyadı: GÖKPINAR

Doğum Yeri ve Tarihi: İskenderun/1984

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni Durumu: Bekar

Adres: Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı,
71451, Yahşihan, Kırıkkale

Telefon: 0318 357 4242/3348

E- posta:samigokpinar@hotmail.com

II. Eğitimi

2002-2007: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

1998-2001: İskenderun Barbaros Lisesi

1991-1998: Akçalı İlköğretim Okulu

Yabancı Dili: İngilizce

III. Mesleki deneyimi

2009-Araştırma Görevlisi

IV. Yayınları:

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **GÖKPINAR S, ÖZGEN EK, YILDIZ K** (2009) Ege Denizi'nin kuzeyinden yakalanan bir sarıgöz balığında *Ceratothoa oestroides* (Risso, 1826) (Isopoda: Cymothoidae). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33 (2), 188 – 190.
2. **GÖKPINAR S, YILDIZ K** (2010) Çeşitli sıcaklık derecelerinin kedi dışkılarındaki *Aelurostrongylus abstrusus* 1. dönem larvasının canlılığına etkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34 (2), 102-105.
3. **GÖKPINAR S, AYDENİZÖZ M** (2010) Göze Yerleşen Protozoon ve Artropodlar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34 (2): 137-144.
4. **GÖKPINAR S, AYDENİZÖZ M** (2010) Göze Yerleşen Helminthler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7 (1), 61-67.
5. **YILDIZ K, BASALAN M, DURU O, GOKPINAR S** (2011) Antiparasitic efficiency of *Artemisia absinthium* on *Toxocara cati* in naturally infected cats, *Turkiye Parasitol Derg.* 35 (1): 10-14.

Uluslar arası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **YILDIZ K, DURU SY, GOKPINAR S** (2011) Alteration in blood gases in cats naturally infected with *Aelurostrongylus abstrusus*. *Journal of Small Animal Practice*, 52 (7), 376-379.
2. **YILDIZ K, GOKPINAR S** (2011) *Aelurostrongylus abstrusus* ile doğal enfekte kedi akciğerlerinin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17(2), 315-318.
3. **GÖKPINAR S, YILDIZ K** (2012) Klinik bakımdan sağlıklı görünümlü koyunlarda coenurosis'in yaygınlığı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (Suppl-A), 187-191.
4. **KUL O, YILDIZ K, OCAL N, FREYRE A, DENİZ A, KARAHAN S, ATMACA HT, GOKPINAR S, DINCEL GC, UZUNALIOĞLU T, TERZİ OS** (2012) In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: A novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. *Res Vet Sci*, (Baskıda).
5. **GENCAY EY, YILDIZ K, GOKPINAR S, LEBLEBICIER A** (2013) A potential infection source for humans: Frozen buffalo meat can harbour tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. *Food Control*, (Baskıda).

6. GÖKPINAR S, YILDIZ K (2013) Koyun abomasumlarında Teladorsagiosis. Ankara Univ Vet Fak Derg, 60, 75-78.

Ulusal Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1. YILDIZ K, BAŞALAN M, DURU Ö, GÖKPINAR S.** Doğal enfekte kedilerde *Toxocara cati*'ye *Artemisia absinthium* Ekstresinin Etkisi. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi. 1-7 Kasım 2009 Adana s: 238
- 2. YILDIZ K, YASA DURU S, GÖKPINAR S.** Doğal enfekte kedilerde *Aelurostrongylus abstrusus*'un Fenbendazol ve İvermektin ile Tedavisi ve Enfekte Kedilerin kan gazlarındaki Değişimler. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi. 1-7 Kasım 2009 Adana s: 239.
- 3. GÖKPINAR S.** Köpeklerde Ekinokokkozis. 5. Ulusal Hidatidoloji Kongresi. 22-25 Eylül 2010, Antakya.
- 4. YILDIZ K, GÖKPINAR S, GAZYAĞCI AN.** Koyunlarda *Toxoplasma gondii* doku kistlerinin yaygınlığı. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu. 4-10 Eylül 2011, Kars. s;178
- 5. GÖKPINAR S, YILDIZ K.** Koyun gözlerinde *Toxoplasma gondii* doku kistlerinin yaygınlığı. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu. 4-10 Eylül 2011. s;178
- 6. GAZYAĞCI AN, GÖKPINAR S.** 2008-2010 Yılları Arasında Kırıkkale'de Kene Tutunma Şikayeti ile Sağlık Kuruluşlarına Başvuran Kişilerden Çıkarılan Kenelerin Türlerine Göre Dağılımı., 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu. 4-10 Eylül 2011. Kars,s; 302
- 7. GÖKPINAR S, YILDIZ K.** Koyun Abomasumlarında Teladorsagiosis., 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu. 4-10 Eylül 2011. Kars. s;190-191.
- 8. GÖKPINAR S.** Köpeklerde *Echinococcus granulosus*'a karşı aşı çalışmaları. 6. Ulusal Hidatidoloji Kongresi (Uluslar arası katılımlı). 12-15 Eylül 2012. Gaziantep. s:129

Uluslararası Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. SURSAL N, GOKPINAR S, YILDIZ K (2010). Prevalance of Parasitic Infections in Pocket Pets from Shops. 12. International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, 6-8 May, Istanbul.

2. UYSAL M, GOKPINAR S, YILDIZ K (2010). Fantastic Travel to World of the Parasites: Identification of Parasite by Step in laboratory. 12. International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, 6-8 May, Istanbul.

3. KUL O, OCAL N, YILDIZ K, ALBAY MK, ATMACA HT, DINCEL GC, GOKPINAR S (2010). Clinicopathologic findings in *Neospora caninum* infected born calves: epidemiologic importance of clinical neosporosis in dairy cattle. XVIII International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants, May 26-29, Durres Albania.

4. KUL O, YILDIZ K, OCAL N, FREYRE A, DENIZ A, KARAHAN S, ATMACA HT, GOKPINAR S, DINCEL GC, UZUNALIOGLU T, TERZI OS (2010). "In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: A novel strategy for avoidance of human exposure to red meat borne toxoplasmosis". XXVI. World Buiatrics Congress. November 14-18, Santiago, Chile.

5. KARAKURT G, GOKPINAR S, YILDIZ K. Prevalence of helminth infecitons in some farms using faecal examination. 13th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, Istanbul TURKEY, 2011.

6. DOYUK A, TOSUN EMB, TAN AO, GOKPINAR S, AYDENIZOZ M (2012). The Investigation of Parasitic Contamination in Dogs in Shelters, Dog Learning Centers and Petshops in Kırıkkale and Ankara Regions. , 14th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, 3-5 May, Istanbul.Sf:48-49.

V. Projeler

Ulusal Projeler

1. YILDIZ K, GÖKPINAR S. "Aelurostrongylus abtustus ile Enfekte Kedi Akciğerlerinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi". Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2009/5.

2. AYDENİZÖZ M, **GÖKPINAR S.** "Kırıkkale Yöresinde Sığırlarda *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli/orientalis*'in PCR-Reverse Line Blotting yöntemi ile Araştırılması." Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2010/2 (Devam etmektedir).
3. YILDIZ K, KUL O. "Koyunlarda *Toxoplasma gondii* Doku Kistlerinin Yaygınlığı ve Serolojik Sonuçlarla Karşılaştırılması." TUBITAK TOVAG, 1100497 (Bursiyer olarak çalışmıştır)
4. AYDENİZÖZ M, **GÖKPINAR S,** GAZYAĞCI AN. "Kırıkkale'de Yapraklı Sebzelere Parazitolojik Kontaminasyonun Araştırılması." Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2011/31 (Devam etmektedir).
5. YILDIZ K, PIŞKİN Ç, ÜTÜK AE, **GÖKPINAR S.** "Piyasada Satışa Sunulan Koyun Etlerinde *Toxoplasma Gondii* Doku Kistlerinin Yaygınlığının Araştırılması." Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2011/32 (Devam etmektedir).
6. ÇINAR M, AYDENİZÖZ M, **GÖKPINAR S,** BORAZAN ÖB. "*Dicrocoelium dentriticum* ve Kist Hidatik İle Enfekte Koyunlarda Oksidatif Stres ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Belirlenmesi." Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2011/42 (Devam etmektedir).
7. YILDIZ K, **GÖKPINAR S.** "*Sarcocystis gigantea*'nın SDS-PAGE ve Western Blot Kullanılarak Antijenik Analizi. " Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 2012/39 (Devam etmektedir).

Uluslararası Projeler

1. KUL O, YILDIZ K, OCAL N, KARAHAN S, ATMACA HT, **GOKPINAR S,** DINCEL GC. "*In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced Toxoplasma gondii tissue cysts in lambs: A novel strategy for avoidance of human exposure to red meat borne toxoplasmosis*" Effects on the infected born rate, humoral and cell mediated immune responses". Bayer Animal Healthcare AG, Monheim-Germany, Good Scientific Project, 2008, Avrupa Birliği Sanayi Ar-Ge projesi, 2008ABH9020003.

Diğer Bilgiler

1. Bir Asırlık Bilgi Işığında Toksoplazmoz. Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 19-20 Nisan 2009. Kırıkkale (Düzenleme komitesi).

2. *Toxoplasma gondii* serolojik tanısı ve in house antijen hazırlama Workshop. Yüzyıllık Tecrübe; *Toxoplasma gondii*. Uluslararası Katılımlı sempozyum ve Workshop. 17-20 Mart 2010, İzmir.
3. Toxoplasmosisin Nested PCR ve Real Time PCR ile Tanısı Workshop. Yüzyıllık Tecrübe; *Toxoplasma gondii*. Uluslararası Katılımlı sempozyum ve Workshop. 17-20 Mart 2010, İzmir.
4. Western Blot'lama Eğitim-Kursu. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları (KÜBTAL). 08-09 Şubat 2011. Kırıkkale.
5. Real Time PCR Eğitim-Kursu. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları (KÜBTAL). 22 Şubat 2011. Kırıkkale.