

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

**MANDALARDA *BABESIA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Proje No:TSY-09-968

**Proje Türü
TEZ PROJESİ, YÜKSEK LİSANS**

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Vet. Hek. Volkan LALE
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Kasım 2010

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

“Mandalarda *Babesia* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı TSY-09-968 kod numarası ile finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
TEŞEKKÜR.....	3
İÇİNDEKİLER	4
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	6
ÖZET	7
ABSTRACT	8
1. GİRİŞ VE AMAÇ	9
2. GENEL BİLGİLER	12
2.1. BABESİOSIS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ.....	12
2.2. <i>BABESIA</i> TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ.....	14
2.3. <i>BABESIA</i> TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU	15
2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme	16
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim	16
2.4. MANDALARDAKİ <i>BABESIA</i> TÜRLERİ	19
2.5. BABESİOSIS'TE BAĞIŞIKLIK	19
2.5.1. Kazanılmış Bağışıklık.....	21
2.5.1.1. Humoral İmmun Yanıt.....	21
2.5.1.2. Hücrel İmmun Yanıt.....	22
2.5.2. Doğal Bağışıklık (Nonspesifik İmmun Yanıt)	23
2.6. BABESİOSIS'TE TEŞHİS.....	24
2.6.1. Mikroskopik Muayene	25
2.6.2. Serolojik Testler	26
2.6.3. Moleküler Teknikler	27
2.7. BABESİOSIS'TE TEDAVİ	28
2.8. BABESİOSIS'TE KORUNMA VE KONTROL	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. SAHA ÇALIŞMALARI	30
3.1.1. Hayvan Materyali (Mandalar)	30
3.1.2. Kan Örnekleri	30
3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI	30
3.2.1. Mikroskopik İnceleme	30
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu.....	31
3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	33

3.2.4. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi	35
3.2.5. Reverse Line Blotting (RLB).....	36
3.2.5.1. RLB Problarının Seçimi	36
3.2.5.2. RLB Membranın Hazırlanması.....	37
3.2.5.3. RLB Hibridizasyonu	38
3.2.5.4. Membranın Temizlenmesi ve Muhafazası.....	39
3.2.5.5. RLB'de Kullanılan Solusyonların Hazırlanması.....	39
4. BULGULAR	41
4.1. MİKROSKOBİK BULGULAR.....	41
4.2. PCR SONUÇLARI	41
4.3. RLB SONUÇLARI.....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR	45

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ticari Kitin İçeriği.....	29
Tablo 3.2. RLB testi amacıyla yapılan PCR'da kullanılan primerler.....	31
Tablo 3.3. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları	32
Tablo 3.4. PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar	33
Tablo 3.5. RLB Problarının Sekans Dizilimleri	35
Şekil 2.1. <i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	13
Şekil 2.2. <i>Babesia</i> türlerinin yaşam siklusu.....	16
Şekil 4.1. RLB sonuçlarının görüntüsü (Orijinal)	40

MANDALARDA *BABESIA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada reverse line blotting (RLB) ve mikroskopik muayene metotları kullanılarak, Yozgat yöresinde mandalarda *Babesia* türlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, toplam 50 mandadan EDTA'lı tüplere tam kan örneği alınmış ve her hayvanın perifer kan frotsi hazırlanmıştır. Hazırlanan frotiler mikroskopta *Babesia* spp.'nin piroplasmik formları yönünden incelenmiştir. Alınan kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lerden *Babesia* türlerinin 18 S rRNA geni amplifiye edilerek RLB testinde kullanılmıştır. Bu amaçla, PCR ürünleri catch all (*Theileria* spp, *Babesia* spp.), *Babesia* spp., *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* ve *B. major* türleri için spesifik proplarla hibridizasyona tabi tutulmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Türkiye'de mandalar üzerinde babesiosis konusunda ilk kez bir saha çalışması yapılmıştır. İncelenen mandalarda gerek mikroskopik muayenede piroplasmik formlar gerekse moleküler olarak RLB testi ile herhangi bir *Babesia* türü tespit edilememiştir.

Anahtar Sözcükler: *Babesia* spp., manda, moleküler karakterizasyon, Yozgat

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BABESIA* SPECIES IN WATER
BUFFALOS
ABSTRACT**

This study was carried out to investigate *Babesia* species in water buffalos in the region of Yozgat via reverse line blotting (RLB) and microscopical examination. A total of 50 blood samples were collected from water buffalos into the tubes with EDTA technically and thin blood smears were prepared. Thin blood smears were microscopically examined for *Babesia* piroplasms. The 18S SSU rRNA gene in the DNA of *Babesia* spp. extracted from blood was amplified and used in RLB. For this purpose, PCR products were hybridized with specific probes for catch all (*Theileria* spp, *Babesia* spp.), *Babesia* spp., *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* and *B. major*.

As a result, it was firstly carried out a field study on water buffalos for babesiosis. No piroplasmic forms in microscopic examination and no *Babesia* spp. molecularly by RLB on water buffalos was detected.

Keywords: *Babesia* spp., water buffalos, molecular characterization, Yozgat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Subtropikal iklim kuşağında yer alan Türkiye'nin ekonomisinde hayvancılık çok önemli bir paya sahiptir. Bununla beraber son yıllarda tarımsal ihracat içerisinde hayvancılığın payında önemli azalmalar olmuştur. Türkiye İhracatçıları Meclisi (TİM)'nin verilerine göre toplam ihracat içerisinde tarımsal ihracatın oranı 1990'lı yıllarda %17,54 iken, 2009 yılında %15,34'e gerilemiştir. Tarımsal ihracat içerisinde hayvansal ürünlerin payı ise 1990 yılında %11,15 iken, 2009 yılında %5,57'ye düşmüş, toplam ihracat içerisinde hayvancılığın payı da %1,95'ten %0,85'e gerilemiştir.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin 2009 yılı verilerine göre Türkiye'nin büyük baş hayvan varlığının; 10.723.958'ni sığır ve 87.207'ni manda teşkil etmektedir. Yıllar itibariyle sığır yetiştiriciliğindeki düşüşe paralel olarak ve hatta ondan da hızlı bir azalma manda sayısında olmuştur. Mantiki ve bilimsel bir izahı olmayan, İtalya ve bazı Avrupa ülkelerinde sütündeki %9,5'lik yağ oranı için özel amaçlı manda üretim çiftliklerinde yoğun manda yetiştiriciliği yapılmasına rağmen Türkiye'de bu dramatik düşüş sonucunda manda sayısı yok denilebilecek kadar az seviyeye düşmüştür. Bu düşüş böyle devam ederse manda, Türkiye'de nesli tükenen türler arasındaki yerini alacaktır.

Türkiye'de hayvancılığın gelişmesini olumsuz yönde etkileyen barınak, bakım ve besleme gibi yetiştiricilik hatalarının yanında, bakteriyel, viral ve paraziter orijinli hastalıklar halen daha hüküm sürmektedir. Paraziter hastalıklar içerisinde en yaygın olanlarından biri de çok önemli bir protozoon hastalık olan babesiosis'tir. Türkiye'ye ithal edilen kültür ırkı sığırlar

ve bunların melezleri babesiosis'e karşı oldukça duyarlı ve bu hastalığın tehditi altındadırlar. Hastalık, özellikle kültür ırklarında yüksek oranda ölümlere neden olmaktadır. Ayrıca et ve süt verimlerinde önemli ölçülerde düşüslere de neden olan babesiosis, dolayısıyla Türkiye ekonomisine önemli oranda zarar vermektedir. Mandalar tabiatları itibariyle birçok enfeksiyöz hastalığa dirençlidirler. Bununla beraber birçok patojen için rezervuar görevi yaparlar. Bu hastalık etkenleri arasında Ixodid kenelerle bulaşan babesiosis de yer almaktadır.

Babesiosis; tropik ve subtropik iklim kuşağındaki evcil ve yabani memeli hayvanlar ile insanlarda da görülen ve vektör kenelerle transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir hastalıktır. Hastalık özellikle yaz aylarında vektör kenelerin aktifleşmesiyle birlikte yüksek ateş, anemi, anoreksi, kaşeksi, hemoglobinüri, hipotansif şok ile seyretmekte ve ölümlere neden olmaktadır. Önceleri sadece memeli hayvanların bir hastalığı olarak bilinen babesiosisin son 35 yıldır insanlar için de önemli bir hastalık olduğu bildirilmiştir. Bugüne kadar insanlarda *Babesia microti*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. duncani* (WA1), *B. venatorum* (EU1) türleri ile MO1 ve KO1 suşlarının babesiosis'e sebep olduğu rapor edilmiştir.

Halk arasında "Ağrıma, Ağrık, Sarılık" gibi isimlerle bilinen babesiosis'in teşhisinde klinik semptomların yanında, mevsim, kene enfestasyonu, unstabil bölge gibi epidemiyolojik veriler de şüpheleri artırabilmektedir. Ancak hastalığın teşhisi, perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskopik incelenmesinde eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle olur. Hastalığa hangi türün yol açtığını belirlemek için ise, parazite karşı oluşan spesifik antikorların serolojik yöntemlerle (IFAT, ELISA, IHA vb.) saptanması veya parazit DNA'sının moleküler yöntemlerle (PCR, RLB, Nested-PCR, Real-Time PCR vb.) tespit edilmesi gerekir.

Sığırlarda bu hastalığa *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. major* ve *B. divergens* türleri yol açmaktadır. Mandalarda ise bu türlerin yanında ayrıca *B. orientalis* türü babesiosise sebep olmaktadır. Sığırlarda enfeksiyonlara yol açan türler, mandalarda genelde hafif enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bununla birlikte, sığırlar için bu etkenlere rezervuarlık da yapmaktadır. Bu sebeplerle, keneler için hastalığın kaynağını oluşturan latent enfekte portör hayvanların ortaya çıkarılması ve hastalığın rezervuar olan mandalardaki durumunun

saptanması büyük önem taşımaktadır. Ancak Türkiye'de bugüne kadar mandalarda babesiosis üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma ile Yozgat Yöresi'ndeki mandalarda *Babesia* etkenlerinin DNA izolatlarının elde edilmesi, 18s rRNA gen bölgesini kodlayan primerler kullanılarak reverse line blotting testi ile teşhis edilmesi, çıkan pozitif örneklerin sekanslanması ve GenBanka kayıtlarının yapılması ile dünyadaki benzer suşlarla filogenetik olarak akrabalık derecelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BABESIOSIS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ

Babesiosis; Apicomplexa anaç altındaki *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerdeki evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda da görülen, *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir protozoer hastalıktır. Hastalıkla ilgili ilk bilgiler, 19. yüzyılın sonlarında ortaya çıkmıştır. İlk defa 1888 yılında Romanya’da, sığırlarda görülen ve hızla yayılan bir hastalığın sebebinin ne olduğunun araştırılması amacıyla Romanya Hükümeti tarafından görevlendirilen Victor Babes sığır eritrositleri içerisinde birtakım mikroorganizmler keşfetmiş ve bunların “sığır hemaglobinürisi” ile bağlantısı olduğunu ileri sürmüştür. Babes, daha sonra aynı mikroorganizmleri koyun eritrositlerinde de gözlemlemiştir. Diğer yandan Amerika Birleşik Devletleri’nde 1893’de Smith ve Kilborne “Texas Fever” olarak adlandırılan hastalıkta, eritrositler içindeki etkeni, *Pyrosoma bigeminum* olarak isimlendirmişler ve bunun bir kene tarafından nakledildiğini de keşfetmişlerdir. Aynı yıl Starcovici, bu parazitlere sırasıyla *Babesia bovis*, *B. ovis* ve *B. bigemina* isimlerini vermiştir (1, 2). Diğer yandan “Texas Fever” (babesiosis) etkeni *Pyrosoma bigeminum* (*Babesia bigemina*)’un vektör kene *Boophilus annulatus* tarafından sığırlara nakledildiğinin yayınlanmasından sonra babesiosis, dünyanın çeşitli bölgelerinde de keşfedilmiştir. Avustralya’da Dr. Sidney Hunt babesiosis’i (bovine redwater), “Texas fever”ın identifiği

olarak konfirme etmiştir. Arjantin’de, 1903’te Lignieres sığır babesiosis (Tristeza) için form A ve form C olmak üzere iki form tarif etmiş olup bunlardan birinin Smith ve Kilborne’un tanımladığına benzer şekilde büyük, diğerinin ise daha küçük intraeritrositik etkenler olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı, küçük olan etkenin, genellikle kan frotilerinde zor görülmesine karşın, böbrek ve merkezi sinir sisteminin meningeslerindeki kapıllarlardan yapılan frotilerde daha kolay tespit edilebildiğini bildirmiş, 1910 yılında bu küçük organizmaları önce *Piroplasma argentina* daha sonra *Babesia argentina* olarak isimlendirmiştir. *Babesia argentina* ismi Avusturalya ile Güney ve Orta Amerika’da uzun yıllar kullanılmıştır. Bu durum 1970’li yılların ortalarına kadar sürmüş, *B. argentina* ile *B. bovis*’in aynı özelliklere sahip olduğu anlaşılmış ve isimlendirmede *B. bovis*’in kullanımının daha uygun olacağı kabul edilmiştir (1, 2). M’Fadyean ve Stockman 1911’de İngiltere’de yine sığırlarda genellikle eritrositin periferinde yer alan etkenler tespit etmişler ve bunları önce *Piroplasma divergens* daha sonra *Babesia divergens* olarak isimlendirmişlerdir (1, 2). Yine aynı araştırmacılar 1911 yılında *B. bigemina*’ya benzer büyük bir etkenin bulunduğunu bildirmişler, daha sonra Sergent ve arkadaşları 1926 yılında bu etkeni *B. major* olarak adlandırmışlardır (1, 2). Brocklesby 1976 yılında sığırlarda babesiosis etkenlerinden *B.bigemina*, *B.major*, *B.bovis* ve *B.divergens*’in önemli olduğunu bildirmiştir. Sığırlardaki *Babesia* türlerinin 1960’lı yılların sonlarında Hoyte ve 1976 yılında Brocklesby tarafından gözden geçirilmesini takiben, *B. bovis* (*B. argentina*; *B. berbara*; *B. colchica*), *B. bigemina*, *B. divergens* (*B. caucasica*; *B. occidentalis*; *B. karelica*) ve *B. major*’ün sığırlarda babesiosise yol açan başlıca türler oldukları kabul edilmiştir (3, 4).

Türkiye’de ilk babesiosis olgusu, Nicoll ve Adil Bey tarafından 1890’da sığırlarda tarif edilmiş, bunu Samuel ve Raif, İbrahim Ekrem, Lestoquard, Gören ve Yetkin, Aysoy’un çalışmaları izlemiştir. Takiben 1950- 1980 arasında mikroskopik; 1980’li yılların sonunda mikroskopik bakının yanında serolojik; 2000’li yılların başlarında ise bunlara ilave nükleik asit tabanlı moleküler araştırmalar yapılmıştır (5). Dünya’da mandalarda *Babesia* türleri üzerine sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda genel olarak *B. orientalis* türü saptanmış olup bunun yanında, *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin de hastalığa sebep olduğu rapor edilmiştir. Türkiye’de ise bugüne kadar mandalarda babesiosis üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

2.2. *BABESIA* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ

Babesia türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir (6).

Biota (Canlılar)

Domain: *Eukaryota* Chatton, 1925

Kingdom: *Protozoa* (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858

Subkingdom: *Bicilialata*

İnfrakingdom: *Alveolata* Cavalier-Smith, 1991

Phylum: *Myzozoa* Cavalier-Smith ve Chao, 2004

Subphylum: *Apicomplexa* Levine, 1970

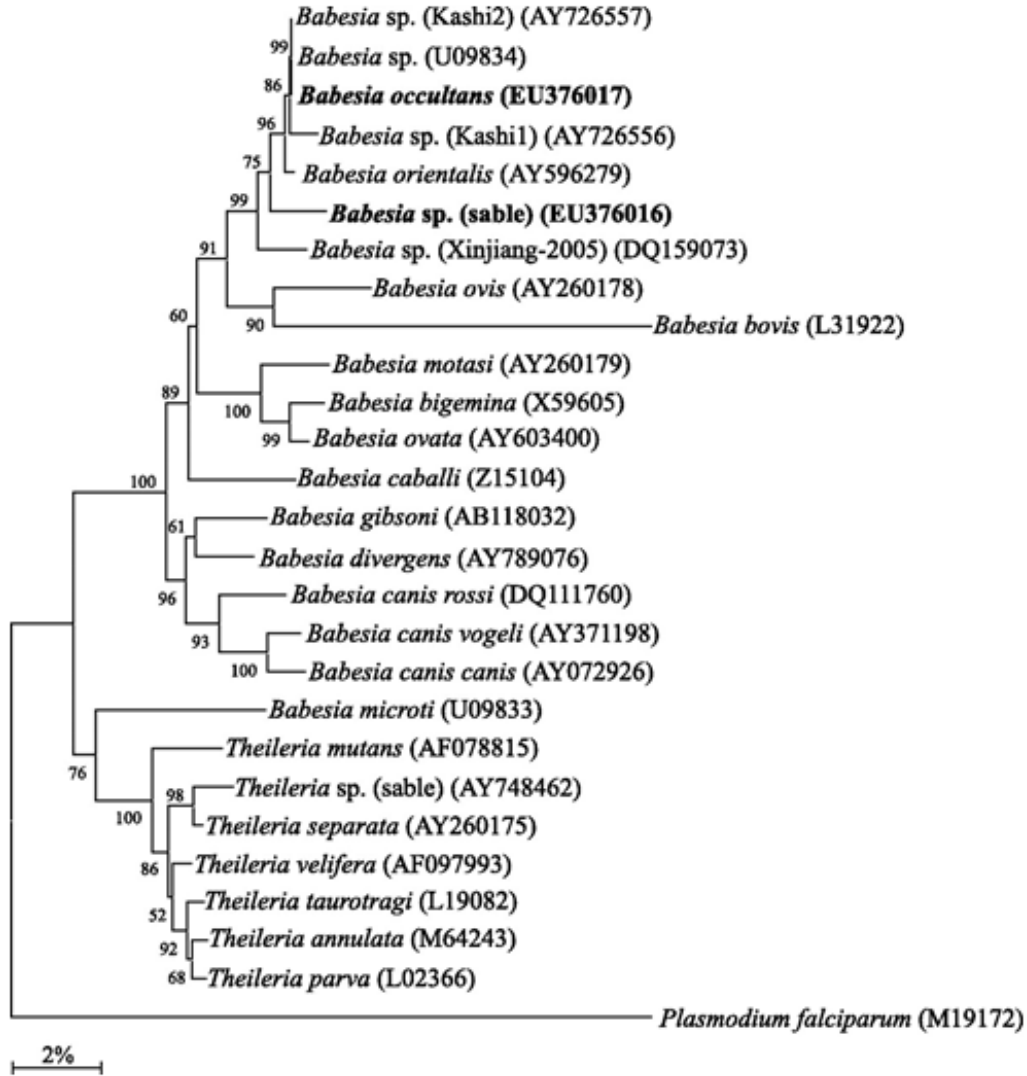
Class: *Aconoidasida* Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

Order: *Piroplasmorida* Wenyon, 1926

Family: *Babesiidae* Poche, 1913

Genus: *Babesia* Starcovici, 1893

Son yıllarda moleküler olarak *Babesia* ve *Theileria* türlerinin sınıflandırılmasında 18S rRNA gen bölgelerine göre filogenetik akrabalık dereceleri esas alınarak da sınıflandırmalar yapılmaktadır (7) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (7).

2.3. BABESIA TÜRLERİNİN HAYAT SIKLUSU

Babesia türleri heteroksen gelişme gösteren protozoonlardır. Bu gelişme omurgalı konaklar ile *Ixodidae* ailesine bağlı kenelerde olmak üzere iki safhada gerçekleşir. *Babesia* türlerinin yaşam döngüleri genel olarak birbirine benzemektedir. Bütün *Babesia* türleri doğal olarak enfekte kenelerin konaklarından kan emmeleriyle nakledilirler. Hayat sikluslarındaki başlıca farklılıklar, bazı *Babesia* türlerinde [gerçek (true) (=sensu stricto) *Babesia* spp.] ve

gerçek olmayan (=sensu-lato) *Babesia* (*B. microti*-benzeri, örn. *Theileria annae*)] transovaryal naklin varlığı ile ilgilidir (8-10).

2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme

Enfekte kene kan emmek için konağını soktuğunda sporozoitler, konağa enjekte olurlar ve doğrudan eritrositlere girerler. Bu sporozoitler ön kısımlarında polar halka, mikronemler ve roptriden oluşan apikal kompleksi ihtiva etmektedirler. *Babesia* sporozoitlerinin konak eritrositlerine giriş fenomeni, *Babesia* türlerini *Theileria* türlerinden ayırır. *Theileria* sporozoitleri, başlangıçta lenfositlere veya monositlere girerler ve orada şizogoni gelişimini tamamladıktan sonra merozoit olarak eritrositlere penetre olurlar (4). Konakta, enfekte eritrositler içerisindeki *Babesia* sporozoitleri, piroplazm (trofozoit) haline gelişirler. Trofozoitin olgunlaşması ile, sitoplazmada meydana gelen değişimler sonucunda, mikronem, roptri, subpelliküler mikrotubuller ve polar halka gibi apikal kompleks'i oluşturan yapılar tekrar meydana gelir. Olgunlaşan trofozoit, şizogoniye benzer şekilde ikiye bölünerek çoğalır (11-13). Bu bölünme sırasında parazitin yuvarlak, oval formdan, ameoboid ve armut formlarına kadar değişen şekilleri görülür ki, bunlara piroplasmik formlar da denilmektedir. Trofozoit ikiye veya dörde bölünerek kız hücreleri (merozoitler) meydana getirir. Mackenstedt ve ark. (14) *B. bigemina*'da, diploid DNA seviyesine sahip piroplasmalardan farklı olarak "gamont prekürsörleri" adı verilen oval şekilli bir merozoit tanımlamışlardır. Bu gamont prekürsörleri, vektör kene tarafından alınıncaya kadar gelişmezler. Diğer yandan enfekte eritrositin parçalanması sonucu serbest kalan merozoitler, diğer sağlam eritrositlere girerek onları da enfekte ederler. Bu şekilde enfeksiyon ya konağın ölümüyle veya konağın direnç (immunité) kazanıp parazitleri temizlemesiyle sonuçlanır (15, 16) (Şekil 2.2).

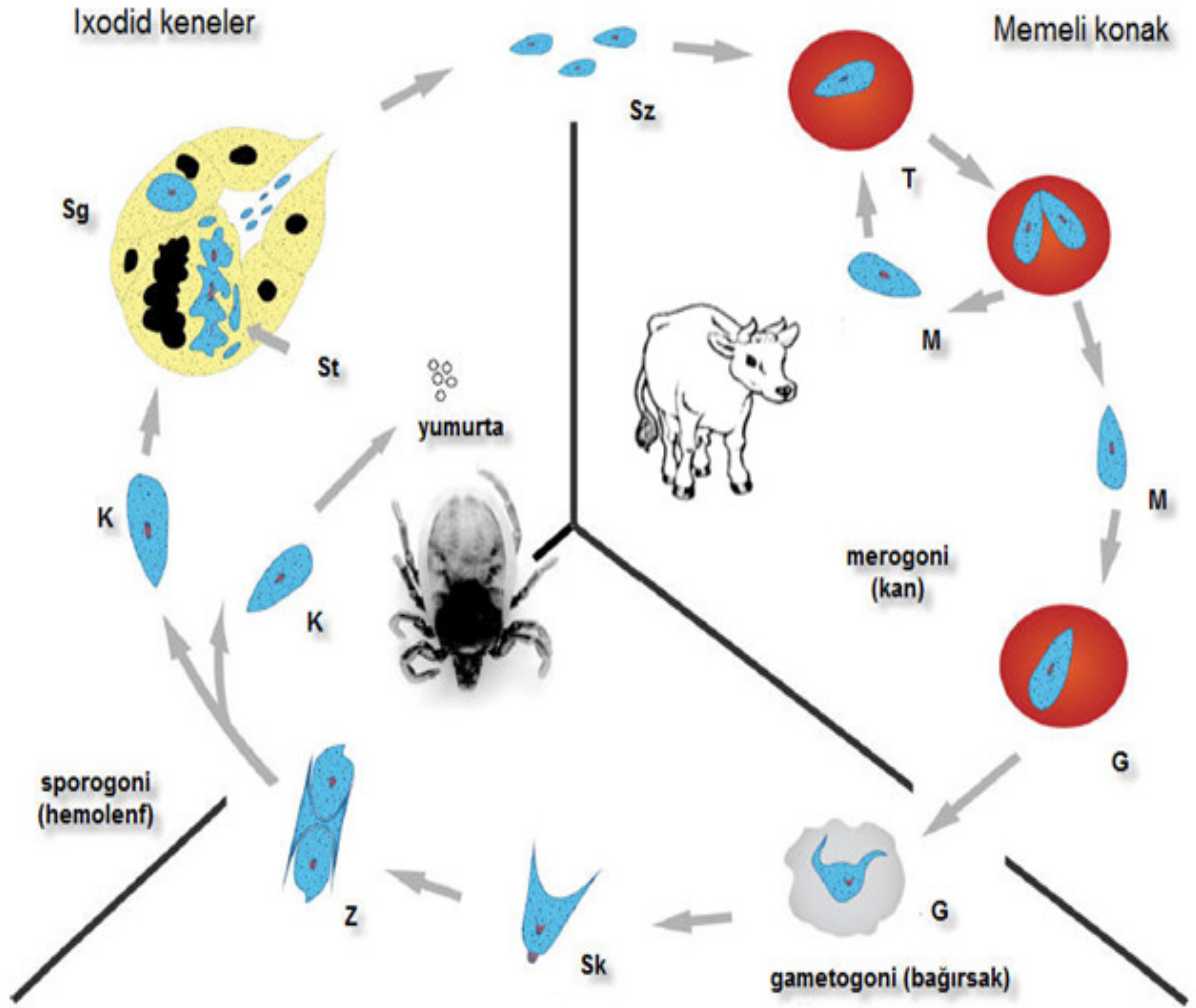
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim

Babesia türlerinin enfekte konaktan kan emen vektör kenede ve vertikal (transovarial) olarak enfekte doğan larvalarda çeşitli gelişim evreleri geçer. Vektör kenenin enfekte konağından emdiği kanın kenenin orta bağırsağına geçmesiyle değişiklikler başlar. Enfekte eritrositlerle alınan gamontlardan "strahlenkörper" adı verilen, çıkıntılı formda ışınal-cisimciklerinin (ray-bodies) iki popülasyonu oluşur (17). Daha sonra bunlar eritrosit içerisinde çoğalmalarını sürdürür ve çoğalma, bunlar ortaya çıktıktan sonra da devam eder.

Çok çekirdekli ışınsal cisimciklerin bir araya gelmesiyle büyük topluluklar oluşur. Bir kez bölünme olduğunda haploid sayıda tek çekirdekli ışınsal cisimcikler meydana gelir (14). Daha sonra bu yapıların bir çifti bir araya gelerek singami (17) yolu ile küresel hücre olarak da adlandırılan zigotu (13) oluştururlar. Oluşan zigot, kene bağırsağında tercihen sindirim hücrelerini enfekte eder. Muhtemelen burada çoğaldıktan sonra, vitellojen sentezleyen bazofilik hücrelere yerleşir. Burada daha fazla bölünmeyle hareket kabiliyetli ookinetler (vermiküller, sporokinetler) meydana gelir. Daha sonra kinetler, buradan kenenin hemolenfine göç ederler (18). *Babesia bigemina*, kene bağırsağındaki gelişiminin bazı safhalarında, haploid sayıda zigot oluşturmak için tek basamaklı bir mayoz geçirir (14, 19). Kene bağırsak hücrelerinde, poliploid kinetlerin şekillenmesiyle şizogoni oluşur (14). Bu çomak şekilli hareketli kinetler kenenin hemolenfine geçerek ovaryumlar dahil olmak üzere değişik tipte hücre ve dokuları enfekte ederler ki, buralarda sekonder şizogoninin tekrarlayan siklusları gerçekleşir. Böylece, enfekte kenenin yumurtalarıyla larval döneme transovarial nakil gerçekleşir. Bu nakil, tek konutluluk özelliğine sahip *Boophilus* gibi vektörler için olduğu kadar, *Babesia* için de önemli bir hayat siklusu adaptasyonudur.

Transovaryal yolla enfekte doğan larvalarda kinetler, tükürük bezi salgı hücrelerine girerler ve çok çekirdekli dönemlere transforme olurlar. Sporogoni yolu ile önce sporoblastlar, sonra sporoblastların parçalanmasıyla küçük, haploid sayıda sporozoitler meydana gelir (14) (Şekil 2.2).

Bütün *Babesia* türlerinde sporozoit gelişimi, her zaman enfekte kene kan emmek için omurgalı konağına tutunduğunda başlar. *Babesia bigemina*'da, sporozoitlerin gelişimi enfekte larvanın konağından kan emmesiyle başlar. Ancak enfektif sporozoitlerin ortaya çıkması yaklaşık 9 günü alır. Dolayısıyla enfektif sporozitler, sadece kenenin nimf ve ergin dönemlerinde ortaya çıkabilirler (20, 21). Nakil, larva döneminin dışında kalan nimf dönemi ve ergin (erkek ve dişi) gelişme dönemlerinde gerçekleşebilir (22-24). Bu durum, *B. bovis*'te farklılık gösterir. *Babesia bovis*'te enfektif sporozoitlerin oluşumu, enfekte doğan larvanın konağından kan emmeye başlamasını takiben 2-3 günde gerçekleşir (25).



Şekil 2.2. *Babesia* türlerinin yaşam siklusu. *Babesia* türlerinin yaşam siklusu merogoni, gametogoni ve sporogoni evrelerinden oluşur. Enfekte kenenin kan emmesi esnasında sporozoitler (Sz) memeli konağa transfer olur. Sporozoitler daha sonra eritrositlere girer ve trofozoitlere (T) dönüşür. Trofozoitler ikiye bölünerek merozoitleri (M) meydana getirir. Bazı trofozoitler gametositlere (G) dönüşür. Gametositler vektör kenede enfeksiyonu başlatabilir. Kene bağırsağında gametositler "Strahlenkörper" (Sk) cisimciklerine dönüşür. Bu cisimcikler birleşerek zigotu (Z) oluştururlar. Zigottan da kinet (K) meydana gelir. Kinetler kene hemolenfine girer, çoğalır ve kenenin çeşitli organlarına girer. *Babesia* türleri ovaryumları enfekte edebilir ve transovaryal olarak yumurta yoluyla nakledilebilir. Kenelerin bütün yaşam evreleri (larva, nimf, olgun dişi) potansiyel enfektif olabilir. Bunun yanında *B. microti*-benzeri türler yalnızca bir yaşam evresinden diğerine transstadial olarak nakledilebilmektedir. Kinetler kenenin tükürük bezine (Sg) girdiğinde sporogoni evresi başlar. Burada parazit çok çekirdekli sporoblastlara (St) dönüşür. Sporoblastlardan yeni gelişen sporozoitler kenenin kan emmesiyle memeli konağa nakledilir (26).

2.4. MANDALARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİ

Mandalarda bugüne kadar *B. orientalis*, *B. bigemina* ve *B. bovis* türleri bildirilmiştir. Bu türler arasında özellikle *B. orientalis* mandalarda babesiosis etkeni olarak rapor edilmiştir. Mandalarda *B. orientalis*'in tek memeli konağıdır. Mandalarda *B. orientalis*'in vektörlüğünü *Rhipicephalus haemaphysaloides* kenisi yapmaktadır (27). Bu kene türü Türkiye'de bulunmamaktadır. Mandalarda babesiosis'e yol açan diğer türlerden *B. bigemina*'nın vektörlüğünü *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus*, *B. microplus*, *B. australis*, *B. calcaratus*, *B. decoloratus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. evertsi*, *R. bursa* keneleri yapmaktadır (13, 28, 29). Türkiye'de *B. annulatus*, *Hae. punctata* ve *R. bursa* türleri bulunmaktadır. *B. bovis*'in vektörlüğünü ise *Boophilus calcaratus*, *B. microplus*, *B. australis*, *Rhipicephalus bursa* ve *Ixodes persulcatus* keneleri yapmaktadır (13, 28, 29). Türkiye'de *R. bursa* türü bulunmaktadır.

2.5. BABESİOSİS'TE BAĞIŞIKLIK

Babesiosis'e karşı immunitede, hem sıvısal (humoral) ve hem de hücrel (cellular) faktörler görev alırlar. Parazite konaklık yapan bütün memelilerde ya enfeksiyona maruz kalıp iyileştikten ya da profilaktik bir immunizasyondan sonra (aşılama gibi) *Babesia* türlerine karşı immunité gelişebilir (30, 31). Bununla birlikte bazı *Babesia* türleri, sığırlar için immun baskılayıcıdır. Örneğin, *B. bovis* ile enfekte sığırlarda vektör kene *Boophilus microplus* daha iyi kan emebilir. Böylece enfekte sığırlar, enfekte olmayanlara göre daha fazla kene taşır ve dolayısıyla *B. bovis*' in naklindeki etkinlikleri de artar (32). Diğer yandan *Trypanosoma* türlerinde sıklıkla görülen yüzey antijenlerindeki varyasyon, *Babesia* türlerinde de görülür (33, 34). *Babesia* türleri, hayat sikluslarının ilk basamağı olan eritrositlere invazyon aşamasında, konak hücrelerine tutunmak için yüzey kısımlarında bulunan antijenleri kullanır. Bu yüzey antijenlerine karşı meydana gelen antikorlar ise parazitin konak eritrositlerine girişine engel olur (35). *Babesia bovis*, VMSA ailesine bağlı beş [*msa-1*, *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b* ve *msa-2c*]; *B. bigemina* iki (*gp45* ve *gp55*); her iki *Babesia* türü ise ortak bir [rhoptry-associated protein-1 (*rap-1a*, *rap1b*, *rap-1c*)] protein ihtiva eder. Bunların dışında *B. divergens*'de *Bd37*, *B. canis*'de *Bc28* (36, 37) ve *B. gibsoni*'de *P50* (38, 39) genleri bulunur. Merozoit yüzey antijeni tespiti için yapılan tüm

alışmalar aşı geliştirilmesine yöneliktir. Keneler, akarisitlere karşı direnç gösterdiklerinden ilaçlama ile yeterli başarı sağlanamaz (40). Bu yüzden babesiosis'e karşı mücadelede aşılama çalışmaları, çok büyük önem kazanmıştır. Bununla birlikte apicomplexan parazitlerden *Babesia*, *Theileria* ve *Plasmodium* gibi patojenlere karşı etkili rekombinant aşılarda geliştirilmesi oldukça zordur. Babesial patojenlerin genomik sekansları, yeni aşı antijenlerinin hızlı identifikasyonuna yardımcı olur. Bu amaçla saha ve laboratuvar çalışmaları yapılmıştır (41-43). Diğer taraftan babesiosis tedavisi gören (örneğin imidocarb dipropionate ile) sığırlarda, aynı parazitin homolog suşlarına karşı yıllarca süren direnç görülürken, heterolog suşlara karşı korunmada enfeksiyon zorunludur (32, 44). *Babesia* taşıyıcı hayvanların dalağının çıkarılması, hastalığın klinik görülmesi ile sonuçlanır. Bu hastalıkta dalak, sadece antikor üretmez, enfekte olmuş eritrositleri de yok eder (45, 46).

Babesiosis'e karşı dirençte, genetik (örneğin, *B. bigemina*'ya karşı *Bos indicus*, *Bos taurus* sığırlarına göre daha dirençli) (43) ve yaş (47, 48) gibi birçok faktör etkilidir. Yaş direnci antikordan bağımsızdır (19, 49, 50). Genç danalarda, interleukin 18 (IL-18) ve IL-12 veya *B. bovis* tarafından stimule olmuş ve IL-12 ihtiva eden makrofajları içeren süpernatantlar vasıtasıyla uyarılan splenik doğal öldürücü (NK) hücreler, IFN- γ 'yı üretirler (51-53). *Babesia bovis*'e karşı oluşan erken immün yanıtta, IL-12 aracılığıyla NK'lerin uyarılması ve bu hücreler tarafından üretilen IFN- γ ile makrofajların aktive olması, bunların NO üretimi, NO'nun da hücre içi paraziti öldürmesi enfeksiyonu engeller. Böylece kazanılmış immünite gelişir (54-56). Öte yandan babesiosis'e karşı immünitede, patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs) olarak adlandırılan motifleri tanıyan ve bunlarla bağlanabilen, doğal immünitenin uyarılmasını ve takiben kazanılmış yanıtın başlatılmasını sağlayan Toll-like reseptörler (TLR)'den TLR9 ve TLR11 sorumludurlar (57-58).

Hem sıvısal ve hem de hücresel faktörler babesiosise karşı bağıışıklıkta önemli rol oynar (59). Başlangıçta immün sistem, etkili bir "primed" (güçlü immün aktivasyon) kazanır (46). Enfeksiyon konağa bulaştırıldığında sporozoitler, kısa bir müddet dolaşımda plazma içerisinde serbesttirler. Bu aşamada, immunoglobulin G (IgG), sporozoitlerin hedef hücrelere girmesinden önce onlara bağlanıp nötrale ederek enfeksiyonu engelleyebilir. Sporozoitler eritrositlere girdikten sonra ise yeni bir dönem başlar. Bu evrede parazitemi yükselir ve akut babesiosis görülebilir. Doğal immün sistem hücreleri, parazitin gelişme

hızını kontrol ederek paraziteminin süresini belirler. Makrofajların ve NK hücrelerin yokluğunda, kısa süre içerisinde yüksek bir parazitemi gelişir. Paraziteminin engellenmesi, çözünebilir faktörlerin üretimiyle gerçekleşir. Bu faktörler; NK hücreler tarafından salınan IFN- γ ve makrofajlar tarafından üretilen TNF- α , NO ve reaktif oksijen türleri (ROSs)'dir. Parazitemideki düşme, parazitlerin dejenerasyonu ve bunların dalak tarafından temizlenmesi ile sağlanır. Bu sırada enfeksiyon çözülme evresine girer ve hastalık şiddetliden sakin döneme geçer. Hastalığın gerileme evresinde, parazitlerin ölümü için T lenfositleri, özellikle de CD4+ (Cluster Designation 4+) ve IFN- γ subpopulasyonları gereklidir (59).

2.5.1.Kazanılmış Bağışıklık

2.5.1.1. Humoral İmmun Yanıt

Babesia enfeksiyonlarında humoral bağışıklığın önemi sınırlıdır (59). Antikorların plazmada serbest haldeki parazitler üzerine olan etkileri, eritrosit içerisindeki parazitelere göre daha fazladır. Bu yüzden, antikorların koruyucu rolleri, parazitlerin kan dolaşımına ulaştıkları zaman ile hedef hücrelere girdikleri zaman arasında geçen süreyle sınırlıdır. Bu evrede IgG'ler sporozoitlere bağlanarak hedef hücrelere girmelerini engellerler. Sporozoitlerin eritrositlere penetrasyonu, alternatif komplement sistemin aktivasyonunu sağlarken, eritrositlerdeki *Babesia* antijenleri de antikor üretimini teşvik ederler. Antikorlar, eritrositleri opsonize ederek fagositik hücreler (dalak orijinli makrofajlar) tarafından yok edilmelerini kolaylaştırırlar (60). Fagositoz, başlangıçta nonspesifikken ileri dönemde opsonizasyona bağlı olarak spesifik hale geçer (61, 62). *Babesia* türleri, humoral immün yanıtı alt edebilir ve onu kendi yararına göre değiştirebilirler. *Babesia bigemina* enfeksiyonunda, konak eritrosit yüzeyinde bulunan bir parazit proteini IgM'yi bağlar ve bu bağlanma parazitin gelişmesi ve hayatta kalmasında yararlı olur (63). Komplement sistem ile olan ilişkilerde de benzer bir taktik söz konusudur. Komplement ile *Babesia* türlerinin lize edildiği tespit edilememişse de *B. rodhaini*'nin eritrositlere invazyonunda, komplement sistemin çeşitli unsurlarının esas olduğu görülmüştür (64). Ayrıca *B. rodhaini* merozoitlerinin fagositosisini artırmak için komplement kullanılan bir çalışmada komplementin, umulmadık şekilde patojenin fagositosisini inhibe ettiği görülmüştür (65).

2.5.1.2. Hücresel İmmun Yanıt

Babesiosis'e karşı dirençte hücresel immunitenin rolü (59), konağın savunma sisteminde dalağın öneminin fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır (45). Dalak; T, B ve NK hücreleri ile makrofajların yer aldığı büyük bir lenfoid organdır. Bu hücre popülasyonlarının bazıları koruyucu etkiden sorumludurlar. Bağışık hayvanların dalak hücrelerinin, *Babesia* ile enfekte farelere transfer edilmesiyle fareleri enfeksiyona karşı korumak mümkündür (66). Bundan başka, iyi seviyelerdeki korumanın lenf yumrusu hücreleriyle değil de, özellikle dalak hücreleri tarafından sağlanması, sistemik olarak antijenlerin muhtemelen perifer lenf yumruları yerine tercihen dalağa yönlendirildiğini yansıtır (67). T hücrelerinin spesifik rolü, timus-yetersiz hayvanlar kullanılarak araştırılmıştır. Timussuz farelerin *B. microti* ile konjenital enfeksiyonunda, yüksek inatçı bir parazitemiye karşılık normal farelerde geçici parazitemi saptanmıştır (67, 68). Bu veriler, T hücrelerin babesiosis'e karşı dirençte kritik öneme sahip olduğunu ve ayrıca enfeksiyonun çözülme döneminde de T hücre aracılı mekanizmaların rol aldığını gösterir (67). Keza T hücreleri, öldürücü *Babesia* türlerine karşı korunmadan da sorumludurlar. *Babesia rodhaini*'ye karşı bağışık farelerde, antitimusit serum verildiğinde parazitemide yükselme ve yüksek mortalite görülür (69). Öte yandan immün hayvanlardan elde edilen saflaştırılmış T lenfositlerinin enfeksiyonla karşılaşmamış (naive) farelere nakli, *B. microti*'ye karşı immünite oluşturmada (67); immün yetersiz farelere immün timusitlerin edinsel transferi ise *B. microti* enfeksiyonunu ortadan kaldırma kabiliyeti kazandırmada yeterlidir (70). *Babesia microti* antijenleri, T hücrelerinin spesifik aktivasyonunu tetikleyebilir. Serbest merozoitlerde olduğu gibi enfekte eritrositler de, fareleri gecikmiş hipersensitiviteye duyarlı hale getirirler (71). CD4+ T hücreleri azalmış farelerin, *B. microti* enfeksiyonuna karşı normal farelerden daha duyarlı oldukları; CD8+ sitotoksik T'lerin azaldığı farelerde ise bu duyarlılığın artmadığı, tersine azaldığı ve bu yüzden *B. microti* enfeksiyonuna karşı korumada başlıca sorumlu subpopülasyonun CD4+ T hücreler olduğu ileri sürülmektedir (72, 73). Buna karşın A.B.D.'de hasta bir insandan izole edilen (74), patojenitesi ve öldürme gücü (%100) itibarıyla *B. bovis*'e iyi bir model kabul edilen WA1 *Babesia* suşu ile farelerde oluşturulan enfeksiyon, CD8+ T hücrelerince üretilen IFN- γ ve $\gamma\delta$ T hücrelerince üretilen TNF- α ile karakterize bulunmuştur

(75). Öte yandan TNF reseptör yetersiz farelerde WA1 *Babesia* enfeksiyonunun daha hafif seyrettiği ve farelerin %90'nın hayatta kaldığı gözlenmiştir. Takiben genetiği değiştirilmiş farelerde (knockout mice) yapılan deneyde, akut WA1 *Babesia* enfeksiyonu gözlenmiş; IL-12, IFN- γ ve NO'nin koruyucu rol üstlendikleri; bu enfeksiyonda ne B hücreleri ne de CD4+ T hücreleri immuniteye katkı sağlamazken, NK hücreler ve makrofajlar önemli bulunmuştur. Bu veriler, WA1 *Babesia* suşuna karşı doğal immunitenin, kazanılmış bağışıklığın gelişimi ve enfeksiyonun kontrolünde kritik öneme sahip olan IL-12 ve IFN- γ aracılığı ile makrofaj aktivasyonunu ve NO üretimini kapsadığını gösterir (76).

Genelde immun hücre aktivasyonunun babesiosis'e karşı koruyucu olduğunun görülmesine karşın, bazı güçlü immun hücre populasyonlarının hastalığın patogenezisinde de görev alma olasılığı vardır. Bu olasılık, öldürücü *B. rodhaini* suşu ile challenge edilen immun sistemi baskılanmış farelerin, tedavi edilmeyen immun yeterli (immunocompetent) farelere göre hayatta daha fazla kalmalarıyla desteklenmiştir (77).

2.5.2. Doğal Bağışıklık (Nonspesifik İmmun Yanıt)

Babesiosis'e karşı doğal immunité, spesifik olmayan (nonspesifik) komponentler ile sağlanır. Bunun yanında doğal bağışıklıkta, çeşitli spesifik moleküllerin sorumlu olduğu ve özellikle NK hücrelerin ve makrofajların antibabesial aktivitede yer aldığı ortaya konmuştur (78). Makrofaj inhibisyonu (69) veya kaybı (79) *Babesia* türlerine karşı bağışık farelerin korunmasını tümüyle ortadan kaldırır ve yüksek oranda ölümlere yol açar. Tersine, immun hayvanlardan alınan makrofajların transferiyle, önceden patojenle karşılaşmamış (naive) fareleri *B. microti*'ye karşı korumak da mümkündür. Bu koruma, immun T hücrelerin transferiyle sağlanandan çok daha iyidir (66). Spesifik olmayan çeşitli enfeksiyon uyarımlarına cevaben, makrofajların ve NK hücrelerin çözünebilir mediatör üretmeleri, belirleyici özellikleridir. Çözünebilir mediatör üretimi, babesiosis için primer öneme sahiptir. Akut enfeksiyona yol açan WA1 *Babesia* suşuna karşı doğal bağışıklık mekanizmasında, IL-12 ve IFN- γ aracılığı ile makrofaj aktivasyonu ve NO üretimi çok önemlidir (56, 76). Enfekte farelerde makrofajların NO üretimi, parazitin gelişimini durdurur (80). Babesiosis'de bir diğer makrofaj çözünebilir faktör olan TNF- α da paraziti öldürür (81). Ayrıca, *B. bovis*'in eritrosit içi ölümünde ROSs'ın da rolü vardır.

Babesiosis'e karşı doğal immunitede, TLR'lerden CpG (TLR9) ve profilin (TLR11)'nin rolü ortaya konmuştur (56, 59). *Babesia bovis* merozoit ekstraktlarının sığır PBMC (peripheral blood mononuclear cells) proliferasyonunu non-spesifik olarak aktive etmesi TLR9'un varlığından ileri gelir (57). Ayrıca *E. coli*'de olduğu gibi, *T. cruzi*, *T. brucei* ve *B. bovis*'te de aktive makrofajların IL-1 β , IL-12, TNF α ve NO üretiminden sorumlu DNA, *B. bovis* lipid ve *Babesia* merozoit ektratlarında da gösterilmiştir (55, 56, 82). Hem sığırlarda TLR9'nin varlığını ortaya koyan çalışmada (58) hem de yukarıda bahsi geçen çalışmalarda (55, 56, 82) TLR9'un fonksiyonel olduğu gösterilmiştir. *T. gondii* ve diğer protozoonlarda identifiye edilen TLR11, IL-12 üretimini sağlayan bir proteindir (83). *Babesia bovis* Texas suşu (T₂Bo)'nun genomik sekansının homolog genleri için yapılan parçalamada, 17.5 kDa'luk profilin benzeri bir protein identifiye edilmiş ve bunun *P. falciparum*, *T. gondii* ve *T. parva* profilleri ile %34-64 identik olduğu saptanmıştır. Ancak, aynı şartlarda ne *Cryptosporidium parvum* ne de recombinant *B. bovis* TLR11'leri, sığır APC (activated protein C)'siyle IL-12 üretimini stimule etmezken; *B. bovis* DNA ve *E. coli* DNA TLR11'leri IL-12 üretimini stimule etmiştir (56, 82). Bugüne kadar sığır genomunda TLR11'in homologları identifiye edilememiştir (56). İlginç olarak TLR11, insan hücrelerinde bulunmadığı gibi (84), kedi, köpek ve şempazenin de aralarında bulunduğu çeşitli memelilerde de (85) ifade edilememiştir. Bu sebeple, protozoon enfeksiyonlarında non-murine memeli immün yanıtında apicomlexal TLR11'lerin rolü halen bilinmemektedir (56).

2.6. BABESIOSIS'TE TEŞHİS

Bütün hayvan türlerinde akut babesiosis'te yüksek ateş (40- 41,5°C), anemi, ikterus ve hemoglobüri gibi klinik belirtiler görülür. Bunun yanında kırgınlık, depresyon ve zayıflık gibi genel semptomlar da görülebilir. İnsanlarda ise semptomlar, malarya'ya benzemekle beraber aniden ortaya çıkar ve intravasküler hemoliz, hemoglobüri, sarılık, kaslarda ağrı, titreme, solunum güçlüğü ve sürekli ateşle seyrederek (86, 87). Teşhiste; mevsim, kene enfestasyonu, instabil bölge gibi epidemiyolojik veriler şüpheleri artırabilir. Ancak hastalığın teşhisi perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskopik incelenmesinde eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle olur. Hastalığa hangi türün yol açtığını belirlemek için ise, parazite karşı oluşan spesifik antikorların

serolojik yöntemlerle (IFAT, ELISA vb.) saptanması veya parazit DNA'sının moleküler yöntemlerle (PCR, RLB, Nested-PCR vb.) tespit edilmesi gerekir (87, 88). Bu testler için konusunda uzman kişilere ihtiyaç duyulması, uzun zaman alması, laboratuvar malzemelerine ihtiyaç duyulması ve saha şartlarında uygulanamaması gibi dezavantajlar olduğundan son zamanlarda Japonya'da immunochromatographic test (ICT) adı verilen hızlı ve basit bir strip serodiagnostik test geliştirilmiştir. Uzman olmayan kişilerin dahi kolaylıkla kullanabileceği bu test nitroselüloz membran tabanlı olup, membran üzerine *B. bovis* (rap-1), *B. bigemina* (rap-1), *T. equi* (EMA-2t) ve *B. caballi* (Bc48)'ye ait rekombinant proteinler emdirilmiş ve bu membran üzerine şüpheli hayvana ait bir damla kan (antikor) damlatılarak kolaylıkla teşhis yapılabilmektedir (89).

2.6.1. Mikroskopik Muayene

Bu yöntem, tekniğine uygun olarak hasta hayvanlardan alınmış kan örneklerinden ince yayma veya kalın yayma preparatlar hazırlanması suretiyle ince yayma frotiler metil alkolde 5 dakika, kalın yayma frotiler ise 100 °C'de 15 dakika tutularak tespit edildikten sonra Giemsa ile boyanarak mikroskop altında incelenmesi ve etkenlerin görülmesiyle yapılmaktadır. Yöntem kolaylıkla uygulanabilmekte olup deneyimli personel gerektirmektedir (90, 91). Mikroskopik muayene için alınan kanın vena jugularis yerine, kapillar damarların geçtiği kuyruk ucu veya kulak ucundan alınması tercih edilmelidir. Çünkü *Babesia* etkenlerini içeren eritrositler kapillar damarlarda birikme eğilimindedirler. Ölüm sonrası yapılan muayenelerde de kandan veya dalak, karaciğer, kemik iliği gibi organlardan hazırlanan sürme preparatlarla da teşhis yapılabilmektedir (90, 91).

Mikroskopik muayene, ince yayma froti veya kalın yayma froti yöntemleriyle yapılmaktadır. Paraziteminin çok yoğun olduğu durumlarda etkenlerin morfolojilerinin daha sağlıklı teşhis edilebilmesi amacıyla ince yayma froti yöntemi kullanılmaktadır. Bunun için çok az miktarda kan temiz bir lam üzerine damlatılarak froti hazırlanır. Kalın yayma froti yöntemi ise paraziteminin düşük olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Kalın damla kan preparatlarıyla daha fazla hacimde kan incelenir (90, 91). Her iki yöntemle yapılan frotilerde de lam ve lamellerin temiz olmasına, boyama solusyonun dikkatli hazırlanmasına özen gösterilmelidir. Çünkü deneyimli olmayan personel tarafından yapılan incelemelerde toz partikülleri ile etkenler bazen karıştırılabilmektedir. İnceleme esnasında tüm saha

dikkatle incelenmelidir. Asgari 200 mikroskop sahasının incelenmesi esasına dayanan bu durum çok sayıda inceleme yapılmasını gerektiren durumlarda oldukça zaman almaktadır. Her iki yöntemle de yapılan mikroskopik incelemelerde etkenlerin görülmesi enfeksiyonun varlığının göstergesidir. Fakat bazı durumlarda (hastalığın çok erken dönemi veya kronik dönem) frotilerde etkenler görülemeyebilir. Etkenin frotilerde görülememesi enfeksiyonun hayvanda kesinlikle olmadığı manasına gelmez (91, 92). Mikroskopik bakıda pozitif bulunan hayvanlarda paraziteminin hesaplanmasında; en az 50 mikroskop sahasındaki enfekte olan ve enfekte olmayan eritrositler sayılır. Bulunan rakamların ortalaması 4 ile çarpılarak 200 mikroskop sahasındaki sayılar bulunur. Parazitemi;

Parazitemi (%) = $\frac{\text{Enfekte eritrosit sayısı}}{\text{Enfekte olan} + \text{enfekte olmayan eritrosit sayısı}} \times 100$ formülü ile hesaplanır.

2.6.2. Serolojik Testler

Babesiosis'in tanısında, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test), sELISA (Slide Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IHAT (Indirect Hemagglutination Test), CFT (Complement Fixation Test), LAT (Latex Agglutination Test) ve RIA (Radioimmunoassay) gibi serolojik testler kullanılmaktadır (90, 93). Akut babesiosisli hayvanların eritrosit, serum veya dokularından hazırlanan antijenlerin kullanıldığı bu testler subklinik seyirli hayvanların serumlarında antikor aranması tekniğine dayanmaktadır. Bu testlerle parazit antijenlerine karşı antikor aranmasının yanında parazit antikorlarına karşı antijen aranması da mümkündür. Serolojik testler, kronik enfeksiyonların teşhisinde kullanışlı değildir. Çünkü hayvanın kanında etken olmasa bile antikorların varlığı devam etmekte olduğundan serolojik testlerin yanlış pozitiflikler verdiği ve bazı *Babesia* türleri arasında çapraz reaksiyonların şekillenebildiği bildirilmiştir (90, 93).

Babesiosis'in serolojik olarak teşhisinde ilk olarak kullanılan test CFT testidir. Fakat bu testin duyarlılığı düşüktür (94, 95). Bu teste göre duyarlılığı ve güvenilirliği daha fazla olan IFAT tekniği babesiosis'in teşhisinde en sık kullanılan serolojik testlerdendir. Ancak bu testte *Babesia* türleri kendi aralarında çapraz reaksiyonlar verebilmektedir (96-98). Serolojik yöntemlerden ELISA testi de oldukça duyarlı ve etkili bir testtir. Bu test ile bir seferde çok miktarda örnek incelenebilmektedir. Bununla birlikte, testte antijen kalitesi testin duyarlılığını etkilemektedir. Enfekte eritrositlerden hazırlanan antijenler, konak

eritrositleri ile kontamine olduklarından, anti-eritrositik antikorlar sebebiyle yanlış sonuçlara sebep olmaktadır. Bu sorunun önüne geçebilmek için saflaştırılmış rekombinant antijenler kullanılmaktadır (99-101).

2.6.3. Moleküler Teknikler

Son yıllarda, mikroskopik incelemeler ve serolojik yöntemlerden farklı olarak parazite ait DNA veya RNA'nın varlığını ortaya koymaya yarayan PCR (Polymerase Chain Reaction), Multiplex PCR, Nested PCR, Reverse Transcriptase PCR, Real-Time PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR, RLB (Reverse Line Blotting) gibi moleküler testler babesiosis'in teşhisinde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır (90, 91, 102, 103).

Elbetteki her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Doğrudan etkeni görmeye yönelik yapılan mikroskopik muayenenin; basit olması, parazitlerin morfolojik olarak ayrımlarının yapılabilmesi, parazitin direkt araştırılması gibi avantajlarının yanında; zaman alması, zahmetli ve yorucu olması, parazit sayısının düşük olduğu durumlarda yanıltıcı olabilmesi, parazitlerin morfolojik olarak ayrımlarında karışıklıkların olabilmesi ve deneyimli personel gereksinimi gibi dezavantajları da mevcuttur (236, 237, 248). Yine serolojik yöntemlerin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Basit ve hızlı olması, otomasyona olanak vermesi, çok sayıda örneğin eş zamanlı olarak teşhis edilebilmesi serolojik testlerin avantajlarından olup; düşük özgüllük, aktif ile atlatılmış veya latent enfeksiyonların ayırt edilememesi, parazitler arasında çapraz reaksiyonların şekillenmesi bu testlerin olumsuz yanlarını yansıtmaktadır (90, 91, 102). Bu yöntemlere alternatif olarak geliştirilen nükleik asit tabanlı moleküler teknikler ile immun sistemden bağımsız veya atlatılmış enfeksiyonlardan etkilenmeksizin konak vücudunda çok az miktarda etken olsa dahi direkt hastalığa neden olan türlerin teşhisleri yapılabilmektedir. Bu moleküler yöntemlerle hastalığa neden olan parazit türlerinin eş zamanlı olarak teşhisleri de yapılabilmektedir. Tabi ki her yöntem gibi bu moleküler yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemler ekonomik olarak pahalı ve çok aşamalı yöntemler olup, inhibitörleri nedeniyle yanlış negatiflikler verebilmekte ve kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflikler de gösterebilmektedir (90, 91, 102).

Bu moleküler yöntemlerin hemen hepsinde PCR aşaması mevcuttur. PCR kullanılmaya başlandığından bu yana sürekli geliştirilmekte ve daha duyarlı ve güvenilir sonuçlar için çeşitli varyasyonları ortaya konulmaktadır. Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, binlerce kez çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. PCR'ın modifiye edilmesiyle birlikte; PCR ürününün daha spesifik primerlerle ikinci kez PCR'ını kapsayan Nested PCR (104), birden fazla primer çifti kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılmasını sağlayan Multiplex PCR (105, 106), kantitatif olarak parazit DNA'sının miktarını tespit eden ve dolayısıyla varlığını ortaya koyan Real-Time PCR (107), bir testte eş zamanlı olarak çok sayıda hastalık etkeninin tespit edilmesine olanak sağlayan RLB (108, 109), parazitin RNA'sının tespitine yönelik yapılan Reverse Transcriptase PCR (110-111) testi gibi testler geliştirilmiştir. Bu testler babesiosis'in teşhisinde son yıllarda Türkiye'de ve Dünya'da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'de bu yöntemlerle yapılan çalışmalarda genellikle *Babesia* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmış ve bunların sekans dizilimleri ortaya konmuştur (108, 109). Dünya'da da bu gen bölgesi sıklıkla kullanılmakta (102, 112-119), bunun yanında özellikle sığır babesiosis'i üzerine yapılan aşı çalışmalarında VMSA genleri (*msa-1*, *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b*, *msa-2c*) ve *rap-1* geninin amplifikasyonu yapılmakta ve bu gen bölgelerini içeren suşların sekans dizilimleri ortaya konmaktadır (34, 36 120--137).

2.7. BABESIOSIS'TE TEDAVİ

Babesiosis'in tedavisinde sığırlarda yıllarca quinuronium sulphate, amicarbalide isothionate ve diminazene aceturate kullanılmış; 1970'ten sonra dördüncü bir ürün olarak da imidocarb dipropionate kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde de tedavi bu ürün ile yapılmaktadır (87, 88). Türkiye'de mandalarda akut babesiosis olgularında yapılmış olan tedavilere ait herhangi bir kayıt bulunmamaktadır.

2.8. BABESIOSIS'TE KORUNMA VE KONTROL

Babesiosis'te esas olan, hastalığın sağaltımından ziyade karşı koruyucu önlemlerin alınmasıdır. Koruyucu önlemler vektör kenelerle mücadele, premunizasyon ve aşılama (28, 29). Bununla beraber mandalar hastalığa karşı dirençli kabul edildiklerinden korunma ve kontrol için herhangi bir işlem yapılmamaktadır. Ancak rezervuar olabilecekleri

yönünden sığır babesiosisi bakımından önemsenmektedir. mandalar meraya bırakıldıklarında gün içinde mutlaka bir çamur banyosu yapmak isterler. Bu tercihleri ile de başta keneler olmak üzere birçok ektoparazite karşı korunmuş olurlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SAHA ÇALIŞMALARI

3.1.1. Hayvan Materyali (Mandalar)

Bu çalışmanın materyalini, 2009-2010 yıllarının çeşitli dönemlerinde Yozgat yöresindeki 50 mandadan alınan kan örnekleri oluşturmuştur. Hayvanlara ait bilgiler (yaş, cinsiyet vb.) hayvan sahiplerinden alınmış ve genel sağlık durumları kaydedilmiştir.

3.1.2. Kan Örnekleri

Rastgele seçilen toplam 50 mandanın *vena jugularis*'inden tekniğine uygun olarak 5 ml'lik steril EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) tüplere kan alınmış ve örnekler soğuk zincirde taşınarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Protozooloji-Entomoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'na getirilmiştir. Laboratuara getirilen kan örneklerinin herbirine protokol numarası verilmiştir. Kan örneklerinden mikroskopik inceleme için preparatlar hazırlanmış ve analizleri yapılmaya kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Mikroskopik İnceleme

Mandaların vena jugularis'den alınarak EDTA'lı tüpler içerisinde laboratuara getirilen kan örneklerinden her bir hayvan için sürme preparatlar hazırlanmıştır. Frotiler havada kurutulduktan sonra metil alkolde 5 dakika tespit edilmiş ve %5'lik Giemsa boya solusyonu (pH 7.2) içerisinde oda sıcaklığında 40 dakika süreyle boyanmıştır. Süre sonunda boyanan

preparatlar hafifçe akan musluk suyu altında yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar, kuruduktan sonra ışık mikroskobu altında immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile *Babesia* türleri yönünden incelenmiştir.

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

Manda kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Protozooloji-Entomoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Analize tabi tutulana kadar -20°C'de muhafaza edilen örnekler ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden DNA ekstraksiyonu, Axygen Firmasına ait AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit'inin prosedürüne göre yapılmıştır. Kullanılan ticari kitin içeriği Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ticari Kitin İçeriği

Kitin İçeriği	AP-MN-BL-GDNA-250 örnek için
Miniprep column	250 adet
2 ml Microfuge tube	250 adet
1.5 ml Microfuge tube	250 adet
Buffer AP1	150 ml
Buffer AP2	30 ml
Buffer W1A concentrate	120 ml
Buffer W2A concentrate	2x72 ml
Buffer TE	60 ml

Ekstraksiyon işlemine başlamadan önce ticari kitin prosedürüne göre Buffer W1A ve Buffer W2A solusyonları üzerine %100'lük ethanol eklenmiştir. Kit, kullanılabileceği kadar oda ısısında muhafaza edilmiştir. Ticari kitin önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır:

1. İşleme başlamadan önce, kan örnekleri vorteksle homojenize edildi. İşlenecek numune sayısına göre, örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine hayvanlara

ait protokol numaraları yazıldı. Kit içerisinde bulunan Buffer TE, önceden ısısı 65 °C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde konuldu.

2. 1.5 ml'lik ependorflara 500 µl Buffer AP1 eklendi.
3. Herbiri farklı sığıra ait kan örneklerinden 200 µl kan, pipetle alınarak protokol numaralarına göre ependorflara ilave edildi. Tüplerin ağızları kapatılarak 10 saniye vortekslendi.
4. İyice vortekslenen örneklerin üzerine 100 µl Buffer AP2 ilave edilerek ependorf tüpleri tekrar vortekslendi.
5. Örnekler oda ısısında 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücresel kısımların dibe çökmesi sağlandı.
6. Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine miniprep kolon yerleştirildi. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınarak miniprep kolonlar içerisinde konularak 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifügasyon sonucu, süpernatant içerisinde parazite ait genomik DNA varsa, bunlar DNA'yı tutma özelliğinde olan miniprep column'da kaldı ve geri kalan süpernatant da 2 ml'lik ependorfların dip kısımlarına süzüldü. Dibe çöken süpernatantlar döküldü ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. Miniprep kolonlar içerisine ilk yıkama solusyonu olan 700 µl Buffer W1A ilave edilerek oda ısısında 2 dakika bekletildi. Sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Miniprep kolondan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırıldı. Miniprep kolonlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. İçerisine ikinci yıkama solusyonu olan Buffer W2A'dan 800 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılarak miniprep kolonlar bu tüplere geri yerleştirildi. Bu basamakta ikinci yıkama solusyonu Buffer W2A'dan 500 µl eklenip 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tekrar yıkama işlemi yapıldı. Bu son yıkama opsiyonel olarak yapılan bir işlem olup sekanslama işlemlerinde problem teşkil edebilecek tuz ve enzimlerin tamamen elimine edilmesi amacıyla yapılmıştır.
10. Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirildi. Herhangi bir solusyon eklenmeden boş tüpler 14.000

rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solusyonları içerisindeki etanolün tamamen uçması sağlandı.

11. Herbir örneğe ait miniprep kolonlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine, önceden 65 °C'lik su banyosuna konulmuş olan Buffer TE'den 80 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edildi.

3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reverse Line Blotting testinin yapılabilmesi için gerekli ampikonların elde edilmesi amacıyla PCR işlemi yapılmıştır. PCR solusyonları, herhangi bir kontaminasyonun önüne geçmek amacıyla ultraviyole (UV) sterilizasyon özelliği olan steril laminar kabinde (Biolaf) hazırlanmıştır. PCR solusyonlarının hazırlanması esnasında sadece PCR amaçlı kullanılan steril pipetler, pipet uçları ve deiyonize su kullanılmıştır. Çalışma esnasında sürekli steril pudrasız eldivenler kullanılmış ve en ufak bir şüphede dahi eldivenler değiştirilmiştir.

PCR reaksiyonunda primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA (ribosomal RNA) geninin değişken V4 bölgesinden, büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp (base pairs= baz çifti) arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler (Tablo 3.2) kullanılmıştır. Bu reaksiyonda kullanılan primerler Georges ve ark. (113)'nın bildirdiği şekilde kullanılmıştır. RLB işlemi için reverse primeri biotinle işaretlettirilmiştir. Primeler, İontek firmasına sentezlettirilmiştir.

Tablo 3.2. RLB testi amacıyla yapılan PCR'da kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizilimi (5'---3')	TM* (°C)
RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	56,9
RLB-R2	biotin-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT	52,2

*TM: Melting Temperature

Liyofilize halde firmadan teslim alınan primerler firmanın önerileri doğrultusunda her birinin konsantrasyonu 100 pmol/ µl olacak şekilde steril deiyonize su ile sulandırılmıştır.

Yine firmanın önerileri doğrultusunda sulandırılan primerlerin, sürekli dondurulup çözündülerek zarar görmelerinin engellenmesi ve stok primer solusyonunun kontaminasyon riskinin önlenmesi amacıyla 0,5 ml'lik bir ependorf tüpüne stok primer solusyonundan 30 µl miktarında primer solusyonu hazırlanarak ana stok solusyon parsellenmiştir. Bu 30 µl'lik primer solusyonu bittiğinde ise esas primer stoğundan tekrar aynı miktarda hazırlanmıştır.

PCR testinin çalışıp çalışmadığının ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak laboratuvarımızda mevcut olan *Babesia* ve *Theileria* yönünden pozitif saptanan örnekler, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

PCR reaksiyonu için karışım hazırlanırken Georges ve ark. (113) ve Gubbels ve ark. (138) tarafından bildirilen miktarlar modifiye edilmiş ve uygun bir optimizasyon sağlanmıştır. Reaksiyon için 50 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Bu reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	Miktarları (µl)
10XTaq buffer (with (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,25 ml)	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM each)	1
RLB-F2 primeri (100 pmol/ µl)	0,7
RLB-R2 primeri (100 pmol/ µl)	0,7
Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 u/ µl, 500 u)	1
Deiyonize su	32,6
Genomik DNA	5
TOPLAM HACİM	50

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler thermal cycler

cihazına (Thermo Hybaid) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. Amplifikasyon için gerekli PCR şartları Tablo 3.4'da verilmiştir.

Tablo 3.4. PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar

Siklus Sayısı	Isı	Süre
1 siklus	94 °C	3 dakika
2 siklus	94 °C	20 saniye
	67 °C	30 saniye
	72 °C	30 saniye
2 siklus	94 °C	20 saniye
	65 °C	30 saniye
	72 °C	30 saniye
2 siklus	94 °C	20 saniye
	63 °C	30 saniye
	72 °C	30 saniye
2 siklus	94 °C	20 saniye
	61 °C	30 saniye
	72 °C	30 saniye
2 siklus	94 °C	20 saniye
	59 °C	30 saniye
	72 °C	30 saniye
40 siklus	94 °C	20 saniye
	57 °C	30 saniye
	72 °C	30 saniye
1 siklus	72 °C	10 dakika

3.2.4. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi

PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen amplikonların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (CLP) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 1XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solusyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinde doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Jelin fazla kalın olmaması için 500 ml'lik bir beher içerisinde toplam hacim 50 ml olacak şekilde; 0,75 mg agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1XTAE ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım; agaroz, sıvı içerisinde tamamen eriyene kadar ısıtılmıştır. Karışımın buharlaşmasını engellemek amacıyla beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Karışım hazır hale geldiğinde biraz soğumaya bırakıldıktan sonra üzerine 3 µl ethidium bromide ilave edilmiş ve ethidium bromidin sıvı içerisinde tamamen dağılması için yavaş bir şekilde bilek hareketleriyle solusyon karıştırılmıştır. Tamamen hazır hale gelen solusyon jel tablasına dökülmüş ve incelenecek örnek sayısına göre taraklar yerleştirilmiştir. Jel tamamen soğuduğunda jel tablası ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 1XTAE solusyonu ile dolu tankın içerisinde taraklar yavaşça çıkarılmıştır. Elden edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp, 1 µl 6X loading dye (Fermentas) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. İlk gözlemlere bantların boylarının ölçülmesinde kullanılan DNA ladder (Fermentas), son kuyucuklara ise pozitif ve negatif örnekler yüklenmiştir. Yüklenen örnekler; sabit akımda, 90 V'da 50 dakika süreyle yürütülmüştür. Süre sonunda örnekler jel dökümentasyon sistemi (Gen Genuis) ile UV ışın altında görüntülenmiştir. PCR ürünlerinden arta kalan 40 µl'lik amplikonlar ise RLB hibridizasyonunda kullanılmak amacıyla +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Reverse Line Blotting (RLB)

3.2.5.1. RLB Problarının Seçimi

RLB'de kullanılacak proplar, negatif yüklü olan Biodyne C membrana (Pall Biosupport group, Ann Arbor, MI) kovalent olarak bağlanabilmeleri için, 5'- uçlarında amino grubu (N-terminal N-trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl phosphoramitide (TFA)-C₆ aminolinker) içerecek şekilde Genset (Fransa), Isogen (Hollanda) ve MWG

(Almanya) firmalarına sentezlettirilmiştir. Probların sekans dizilimleri, Gubbels ve ark. (138) ve Georges ve ark. (113)'na göre alınmış olup Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5. RLB Problarının Sekans Dizilimleri

Özgün Türler	Konsantrasyon (pmol)	Prob dizilimi (5'---3')
<i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> Türleri (Catch All)	100	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG
<i>Babesia bovis</i>	100	CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG
<i>Babesia bigemina</i>	100	CGTTTTTCCCTTTTGTTGG
<i>Babesia divergens</i>	400	GTAAATATTGACTAATGTGCGAG
<i>Babesia major</i>	200	TCCGACTTTGGTTGGTGT
<i>Theileria annulata</i>	400	CCTCTGGGGTCTGTGCA
<i>Theileria buffeli/orientalis</i>	400	GGCTTATTTCCGWTTGATTTT

T: Thymine; A: Adenine; C: Cytosine; G: Guanine; R: A veya G; W: A veya T

3.2.5.2. RLB Membranının Hazırlanması

RLB için membranın hazırlanması şu şekilde yapılmıştır:

1. Problar optimum konsantrasyon için 100-500 pmol/150 µl oranlarında sulandırıldı. Sulandırmada pH'sı 8.4 olan 500 mM'lık NaHCO₃ kullanıldı.
2. Membran oda ısısında, taze hazırlanmış 10 ml %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) içerisinde 10 dakika aktive edildi ve sonra su ile yıkandı.
3. Membran yıkama işleminden sonra MN45 miniblottera (Immunetics, Cambridge, Mass) yerleştirildi. Miniblotterın vidaları sıkılandı ve fazla su slotlardan vakumla uzaklaştırıldı.
4. Miniblotterın ilk ve son kanalı 2X SSPE ile 1:100 oranında sulandırılmış mürekkep, diğer kanalları ise 150 µl sulandırılmış oligonükleotid solusyonu ile dolduruldu.
5. Tüm örnekler konduktan sonra oda ısısında 2-3 dakika inkübe edildi.
6. İnkubasyondan sonra oligo solusyonları dolduruğu şekilde uzaklaştırıldı.

7. Membran pens yardımıyla miniblotterdan uzaklaştırılarak 100 mM'lık NaOH içinde 10 dakika inkübe edildi. Bu sürenin aşılmasına dikkat edildi. Çünkü 10 dakikadan fazla süren inkübasyonlarda zayıf sinyal hibridizasyonu meydana gelmektedir.
8. Membran 2X SSPE/0.1 SDS içerisinde 60 °C'de 5 dakika boyunca yıkanarak kullanıma hazır şekle getirildi.

3.2.5.3. RLB Hibridizasyonu

RLB hibridizasyonu şu şekilde yapılmıştır:

1. PCR sonucu elde edilen PCR ürünlerinden 40 µl alınarak üzeri 2X SSPE/0.1 SDS karışımı ile 150 µl'ye tamamlandı.
2. Sulandırılan örnekler 100 °C'de 10 dakika süre ile denatüre edildi ve denatüre edilen ürünler tekrar yapışmaya maruz kalmamaları için aniden buz üzerinde soğutuldu.
3. Membran oda ısısında 2X SSPE/0.1 SDS ile sallanan bir platformda 5 dakika inkübe edildi.
4. Membran önceden yüklenen oligonükleotid sıraları ile miniblotterın kanalları 90° açı yapacak şekilde miniblottera yerleştirildi.
5. Membranda kalan fazla sıvı uzaklaştırıldı.
6. Hava kabarcığı olmayacak şekilde, sulandırılmış PCR ürünleri slotlara dolduruldu. Düz bir zeminde 42 °C'de 1 saat hibridize edildi. Bu esnada slotlar arasında geçiş olmamasına dikkat edildi ve platformun sallanmamasına özen gösterildi.
7. İnkübasyon sonunda aspirasyon ile örnekler membrandan uzaklaştırıldı. Membran pens yardımıyla alındı.
8. Miniblotterdan alınan membran, 52°C'de 2X SSPE/0.5 SDS solusyonu ile 2 defa 10 dakika yıkandı.
9. Daha sonra membran 42 °C'de 30 dakika 5 ml peroksidad ile işaretlenmiş streptavidin konjugatı ile hafif çalkalanarak (2X SSPE/%0.5 SDS ile 1:4000 oranında sulandırıldı) inkübe edildi.
10. Membran, 42°C'de 2X SSPE/0.5 SDS solusyonu ile 2 defa 10 dakika yıkandı.

11. Bu yıkama işlemini takiben membran oda ısısında 2X SSPE ile 2 defa 4 dakika yıkandı.
12. Membran daha sonra 4 ml ECL sıvısı ile 1 dakika inkübe edildi.
13. İnkübasyondan sonra membranın üzeri asetat ile örtülerek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
14. Görüntüleme amacıyla karanlık odada asetatın üzerine ECL filmi koyuldu ve sinyal yoğunluğuna göre 1 dakika ile 10 dakika arasında film asetatın üzerinde tutuldu.
15. ECL film daha sonra banyo edildi.

Değerlendirmede filmler üzerinde prob ve PCR ürünlerinin döküldüğü sıralarının kesiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edildi.

3.2.5.4. Membranın Temizlenmesi ve Muhafazası

Görüntüleme işleminden sonra membranı temizlemek ve sadece oligonükleotidleri membranda bırakmak amacıyla membran öncelikle 90 °C'de %1 SDS ile 2 defa 30'ar dakika inkübe edildi. Daha sonra membran 20 mM'lık EDTA ile dolu bir plastik kaptaki 15 dakika inkübasyona tabi tutuldu. En son aşamada muhafaza amaçlı bir sonraki kullanıma kadar membran 20 mM'lık EDTA bulunan plastik bir kaba koyularak +4 °C'de muhafaza edildi.

3.2.5.5. RLB'de Kullanılan Solusyonların Hazırlanması

1. 2 X SSPE/0.5SDS: 100 ml 20X SSPE+50 ml 10 % SDS +2 ml 0,5 M EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır.
2. 2 X SSPE/0.1 SDS: 100 ml 20X SSPE+10 ml 10 % SDS +2 ml 0.5 M EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır.
3. %10 SDS : 10g SDS'in üzeri deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.
4. 20 X SSPE: 175,35 g NaCl+27,6 g NaH₂PO₄(H₂O)+7,45g EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır. 10 N'lik NaOH ile pH 7.4 olacak şekilde ayarlanır. Kaynatılarak tamamen çözünme sağlanır.
5. %16 EDAC: 1,6 g EDAC'ın üzeri 10 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.

6. 500 mM NaHCO_3 : 42 g NaHCO_3 'ün üzeri deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır. pH'sı 8,4 olarak ayarlanır.
7. 10 N NaOH: 40 g NaOH'ın üzeri deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.

4. BULGULAR

4.1. MİKROSKOBİK BULGULAR

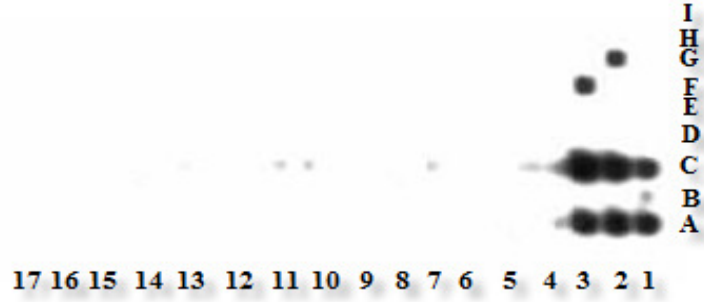
EDTA'lı kan örneklerinden hazırlanan kan frotileri %5'lik Giemsa solusyonu ile boyanmıştır. Frotiler üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskopun x100'lük objektifinde en az 50 saha incelenmiştir. İnceleme sonucunda *Babesia* türlerine ait bir piroplasmik forma rastlanılmamıştır.

4.2. PCR SONUÇLARI

Reverse line blotting testinde kullanılacak ampikonları elde etmek amacıyla yapılan PCR reaksiyonunda *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA geninin değişken V4 bölgesinden büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler kullanılmış fakat PCR'da pozitif herhangi bir bant elde edilmemiştir.

4.3. RLB SONUÇLARI

İncelenen toplam 50 mandaya ait kan numunelerine RLB testi uygulanmış fakat test sonucu manda kanlarında herhangi bir *Babesia* etkeni tespit edilmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. RLB sonuçlarının görüntüsü (Orijinal). (A) Catch-all, (B) *Theileria* spp., (C) *Babesia* spp., (D) *T. annulata*, (E) *T. orientalis*, (F) *B. bovis*, (G) *B. bigemina*, (H) *B. divergens*, (I) *B. major*; 1-3: Pozitif kontroller, 4-17: Negatif örnekler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Babesiosis'in teşhisinde eskiden beri mikroskopik muayene ve serolojik teşhis yöntemleri (IFAT, ELISA vb.) kullanılmıştır. Ancak hızla ilerleyen teknolojiyle birlikte son yıllarda nükleik asit tabanlı teşhis yöntemleri (PCR, RLB, Real-Time PCR vb.) babesiosis'in teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (87, 88). *Babesia* türlerinin tespit edilmesinde mikroskopik muayene yetersiz kalabilmektedir. Hastalığı atlatmış hayvanlar vücutlarında çok az da olsa etkeni taşıyabilmektedir. Dolayısıyla bu durumdaki hayvanların kanlarından yapılan frotilerde etkenin saptanması çok zor olabilmektedir. Kanda etken görülse dahi, bunun hangi tür olduğunun tespiti de yanıltıcı durumlar doğurabilir. Ayrıca mikroskopik muayene için deneyimli personele ihtiyaç bulunmaktadır (91, 139). Babesiosis'in teşhisinde sıklıkla kullanılan ve parazite karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla kullanılan serolojik yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Sığır kanında etken bulunmasa dahi parazite ait antikorlar varlığını sürdürebilmekte, dolayısıyla teşhiste yanlış veya çapraz pozitifliklere sebep olmaktadır (102, 138).

Son yıllarda mikroskopik ve serolojik teşhis yöntemlerindeki bu sıkıntıları gidermek amacıyla, parazitin DNA'sını veya RNA'sını tespit etmeye yönelik moleküler teşhis yöntemleri geliştirilmiştir. Moleküler teşhis yöntemleriyle birlikte tespit edilen parazit türlerinin çeşitli gen bölgelerine göre moleküler karakterizasyonları yapılmakta ve

Dünya'nın çeşitli bölgelerindeki aynı tür parazitlerle akrabalık dereceleri saptanmaktadır (119, 120, 125, 128, 132, 140, 141).

Türkiye'de mandalarda bugüne kadar babesiosis üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Dünyada'da mandalarda babesiosis üzerine yapılan çalışma sayısı da çok az olup genellikle çalışmalar serolojik çalışmalardır. Çin'de 230 manda üzerinde yapılan serolojik bir çalışmada *B. orientalis* seropozitifliği %1,7 olarak tespit edilmiştir (142). Hindistan'da yapılan bir çalışmada mandalar üzerinden toplanan kenelerde mikroskopik olarak %2,6 oranında *B. bigemina* tespit edilmiştir (139). Moleküler olarak mandalar üzerinde yapılan çalışmalarda Liu ve ark. (143) 121 mandadan 24'ünü semi-nested PCR metodu ile *B. orientalis* yönünden pozitif bulmuştur. Aynı şekilde Ferreri ve ark. (144) nested PCR metodu ile 103 mandadan 35'ini *B. orientalis* yönünden pozitif olarak tespit etmiştir. Mingalo ve ark (145) yaptıkları moleküler epidemiyolojik çalışma sonucunda mandalarda %4,4 oranında *B. bigemina* pozitiflik saptamıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Türkiye'de ilk defa mandalarda *Babesia* türlerinin moleküler yöntemlerle varlığı araştırılmıştır. Yozgat Yöresinde yapılan bu çalışma sonucunda mandalarda *Babesia* etkenleri tespit edilememiştir. Bu durum öncelikli olarak manda sayısındaki dramatik azalma ve mevcutların managementleri ile ilgilidir. Mevcut az sayıdaki mandalar yaşama şekillerinden ötürü ısığa duyarlı olmaları bakımından sürekli çamur banyosu yapmaları, buna bağlı olarak da kenelerin manda derisine tutunmayı tercih etmedikleri gösterilebilir. Mandalar yaşam bölgesi olarak geniş sulak bölgeleri, bataklıkları ve ırmak vadilerini tercih ederler. Mandaların derisi, hem çok kalın hem de koyu renk olduğu için, çabuk sıcaklar ve serinlemek için suya girmesi gerekir. Serinlemek ve böcek/sineklerden kurtulmak için hergün saatlerce suya veya çamura girerler. Çamurdan çıktıklarından sonra üzerlerinde kuruyup kalan çamur da onları bir süre kan emici sineklere ve kenelere karşı korur. Bu özelliklerinden dolayı mandalarda etken saptanamamasının sebebinin kene enfestasyonlarına çok fazla maruz kalmamaları olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. McCosker JP. The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 1-24.
2. Kuttler KL, Clifford DJ, Touray BN. Prevalance of anaplasmosis and babesiosis in N'Dama cattle of the Gambia. Trop Anim Hlth Prod 1988; 20(1): 37-41.
3. Angus B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasitol 1996; 26: 1341-1355.
4. Uilenberg G. *Babesia* – A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138: 3-10.
5. İnci A. Orta Anadolu Bölgesinde Sığır Babesiosisi, XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp 18-23 Kasım 2007, ss 77-78.
6. Systema Naturae 2000, The Taxonomicon, Universal Taxonomic Services, Amsterdam. Erişim: [<http://sn2000.taxonomy.nl/>], Erişim Tarihi: 08.01.2010
7. Oosthuizen MC, Zwegarth E, Collins NE, et al. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2247-2251.

8. Purnell RE. Babesiosis in various hosts. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 25-64.
9. Allsopp MT, Cavalier-Smith T, De Waal DT, Allsopp BA. Phylogeny and evolution of the piroplasms. Parasitology 1994; 108: 147-152.
10. Allsopp MT, Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. Ann N Y Acad Sci 2006; 1081: 509-517.
11. Rudzinska MA. Host-cell-parasite relationships. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 88-135.
12. Mehlhorn H, Schein E. The piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. In: Baker JR, Muller R (eds), Advances in Parasitology. Academic Press 1984; pp 69-89.
13. Friedhoff KT. Transmission of Babesia. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man, Boca Raton, Florida, CRC Press 1988; pp 23-52.
14. Mackenstedt U, Gauer M, Fuchs P, et al. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. Parasitol Res 1995; 81: 595-604.
15. De Vos AJ, Dalglish RJ, Callow LL. Babesia. In: Soulsby EJJ (ed), Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis, Vol. III Boca Raton, CRC Press Inc 1987.
16. Gray JS, Weiss LM. *Babesia microti*. In: Khan N (ed.), Emerging Protozoan Pathogens. Taylor and Francis, Abingdon, UK 2008; pp 303-349.
17. Gough JM, Jorgensen WK, Kemp DH. Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* in vitro. J Eukaryot Microbiol 1998; 45: 298-306.
18. Agbede RIS, Kemp DH, Hoyte HMD. Secretory and digest cells of female *Boophilus microplus*: invasion and development of *Babesia bovis*; light and electron microscope studies. In: Sauer JR, Hair AJ (eds), Morphology, Physiology and Behavioural Biology of Ticks. New York, Wiley and Sons 1986; pp 457-471.
19. Bock R, Jackson L, de Vos A, et al. Babesiosis of cattle. Parasitology 2004; 129: 247-269.

20. Hoyte HM. Initial development of infectious *Babesia bigemina*. Aust Vet J 1961; 8: 462-466.
21. Potgieter FT, Els HJ. Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. Onderstepoort J Vet 1977; 44: 213-231.
22. Callow LL, Hoyte HMD. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the tick cattle *Boophilus microplus*. Aust Vet J 1961; 37: 381-390.
23. Riek RF. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agr Res 1964; 15: 802-821.
24. Dalgliesh RJ, Stewart NP, Callow LL. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus* [letter]. Aust Vet J 1978; 54: 205-206.
25. Riek RF. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignie`res, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agr Res 1966; 17: 247-254.
26. Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. Int J Parasitol 2008; 38: 1219-1237.
27. He L, Zhou YQ, Oosthuizen MC, Zhao JL. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection of *Babesia orientalis* in water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in China. Vet Parasitol. 2009;165(1-2):36-40.
28. Levine ND. Veterinary Protozoology. Iowa State University Press Ames, 1th Edition 1985; pp 291-312.
29. Soulsby EJJ. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall. 1986, London.
30. Homer MJ, Bruinsma ES, Lodes MJ, et al. A polymorphic multigene family encoding an immunodominant protein from *Babesia microti*. J Clin Microbiol 2000; 38: 362-368.
31. İnci A, İça A, Albaskan H. *Babesia* Enfeksiyonlarında İmmunite. In: Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E (eds), Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 2007, No:21, ss 508-515.

32. Tizard IR. Veterinary immunology: An Introduction. 8th Edition, Saunders 2009; pp 312-329.
33. Allred DR, Al-Khedery B. Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 50-60.
34. Mosqueda J, McElwain TF, Palmer GH. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. Infect Immun 2002; 70 (11): 6448-6455.
35. James MA. Application of exoantigens of *Babesia* and *Plasmodium* in vaccine development. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989; 83: 67-72.
36. Suarez CE, Florin-Christensen M, Hines SA, et al. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. Infect Immun 2000; 68 (12): 6865-6870.
37. Carcy B, Précigout E, Schetters T, et al. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 33-49.
38. Fukumoto S, Tamaki Y, Shirafuji H, et al. Immunization with recombinant surface antigen P50 of *Babesia gibsoni* expressed in insect cells induced parasite growth inhibition in dogs. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12 (4): 557-559.
39. Terkawi MA, Jia H, Zhou J, et al. *Babesia gibsoni* ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against *B. microti* infection in mice. Vaccine 2007; 25 (11): 2027-2035.
40. De la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol 2006; 28 (7): 275-283.
41. De Vos AJ, Bock RE. Vaccination against bovine babesiosis. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 540-545.

42. Edelhofer R, Müller A, Schuh M, et al. Differentiation of *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* and *B. major* by western blotting--first report of *B. bovis* in Austrian cattle. *Parasitol Res* 2004; 92 (5): 433-435.
43. Shkap V, Leibovitz B, Krigel Y, et al. Vaccination of older *Bos taurus* bulls against bovine babesiosis. *Vet Parasitol* 2005; 129 (3-4): 235-242.
44. De Waal DT, Combrink MP. Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet Parasitol* 2006; 138 (1-2): 88-96.
45. Zwart D, Brocklesby DW. Babesiosis: non-specific resistance, immunological factors and pathogenesis. *Adv Parasitol* 1979; 17: 49-113.
46. Levy MG, Clabaugh G, Ristic M. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infect Immun* 1982; 37 (3): 1127-1131.
47. Zintl A, Gray JS, Skerrett HE, et al. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunol* 2005; 27 (4): 115-120.
48. Goff WL, Johnson WC, Parish SM, et al. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol* 2001; 23 (9): 463-471.
49. Joyner LP, Donnelly J, Payne R, et al. The indirect fluorescent antibody test for the differentiation of infections with *Babesia divergens* or *Babesia major*. *Res Vet Sci* 1972; 13 (6): 515-518.
50. Christensson DA. Inverse age resistance to experimental *Babesia divergens* infection in cattle. *Acta Vet Scand* 1989; 30 (4): 453-464.
51. Johnson WC, Cluff CW, Goff WL, et al. Reactive oxygen and nitrogen intermediates and products from polyamine degradation are Babesiicidal in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 791: 136-147.
52. Goff WL, Johnson WC, Horn RH, et al. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunol* 2003; 25 (4): 185-188.

53. Goff WL, Storset AK, Johnson WC, et al. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol* 2006; 28 (5): 221-228.
54. Stich RW, Shoda LK, Dreewes M, et al. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect Immun* 1998; 66 (9): 4130-4136.
55. Shoda LK, Palmer GH, Florin-Christensen J, et al. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect Immun* 2000; 68 (9): 5139-5145.
56. Brown GK, Canfield PJ, Dunstan RH, et al. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. *Aust Vet J* 2006; 84 (9): 321-325.
57. Brown WC, Estes DM, Chantler SE, et al. DNA and a CpG oligonucleotide derived from *Babesia bovis* are mitogenic for bovine B cells. *Infect Immun* 1998; 66 (11): 5423-5432.
58. Werling D, Hope JC, Howard CJ, et al. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 2004; 111 (1): 41-52.
59. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, et al. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(3): 451-469.
60. McGuire TC, Musoke AJ, Kurtii T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. *Immunology* 1979; 38: 249-256.
61. Dalglish RJ. Babesiosis. In: Warren KS (ed), *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. Oxford, Blackwell 1993, pp 352-383.
62. Estes DM, Closser NM, Allen GK. IFN- γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cell Immunol* 1994; 154: 287-295.
63. Echaide IE, Hines SA, McElwain TF, et al. In vivo binding of immunoglobulin M to the surfaces of *Babesia bigemina*-infected erythrocytes. *Infect Immun* 1998; 66: 2922-2927.

64. Chapman WE, Ward PA. *Babesia rodhaini*: requirement of complement for penetration of human erythrocytes. *Science* 1977; 196 (4285): 67-70.
65. Parrodi F, Jacobson RH, Wright IG, et al.. The effect of immune serum and complement on the in vitro phagocytosis of *Babesia rodhaini*. *Parasite Immunol* 1991; 13: 457-471.
66. Meeusen E, Lloyd S, Soulsby EJ. *Babesia microti* in mice: adoptive transfer of immunity with serum and cells. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1984; 62: 551-566.
67. Ruebush MJ, Hanson WL. Transfer of immunity to *Babesia microti* of human origin using T lymphocytes in mice. *Cell Immunol* 1980; 52: 255-265.
68. Clark IA, Allison AC. *Babesia microti* and *Plasmodium berghei yoelii* infections in nude mice. *Nature* 1974; 252: 328-329.
69. Zivkovic D, Speksnijder JE, Kuil H, et al. Immunity to *Babesia* in mice. III. The effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum on mice immune to *Babesia rodhaini*. *Vet Immunol* 1985; 9: 131-142.
70. Matsubara J, Koura M, Kamiyama T. Infection of immunodeficient mice with a mouse-adapted substrain of the gray strain of *Babesia microti*. *J Parasitol* 1993; 79: 783-786.
71. Ruebush MJ, Troutman EH, Kennedy DA. Delayed-type hypersensitivity to *Babesia microti*-infected erythrocytes in mice. *Cell Immunol* 1986; 98: 289-299.
72. Igarashi I, Waki S, Ito M, et al. Role of CD4⁺ T cells in the control of primary infection with *Babesia microti* in mice. *J Protozool Res* 1994; 4: 164-171.
73. Shimada T, Shikano S, Hashiguchi R, et al. Effects of depletion of T cell subpopulations on the course of infection and anti-parasite delayed type hypersensitivity response in mice infected with *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 343-347.
74. Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW. Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? *Ann Int Med* 1993; 119: 284-290.
75. Hemmer RM, Ferrick DA, Conrad PA. Role of T cells and cytokines in fatal and resolving experimental babesiosis: protection in TNFR p55 ^{-/-} mice infected with the human *Babesia* WA1 parasite. *J Parasitol* 2000; 86: 736-742.

76. Aguilar-Delfin I, Homer MJ, Wettstein PJ, et al. Innate resistance to *Babesia* infection is influenced by genetic background and gender. *Infect Immun* 2001; 69: 7955-7958.
77. Zivkovic D, Seinen W, Kuil H, et al. Immunity to *Babesia* in mice. I. adoptive transfer of immunity to *Babesia rodhaini* with immune spleen cells and the effect of irradiation on the protection of immune mice. *Vet Immunol* 1984; 5: 343-357.
78. Eugui EM, Allison AC. Differences in susceptibility of various mouse strains to haemoprotozoan infections: possible correlation with natural killer activity. *Parasitol Immunol* 1980; 2: 277-292.
79. Saeki H, Ishii T. Effect of silica treatment on resistance to *Babesia rodhaini* infection in immunized mice. *Vet Parasitol* 1996; 61: 201-210.
80. Rosenblatt-Bin H, Klein A, Sredni B. Antibabesial effect of the immunomodulator AS101 in mice: role of increased production of nitric oxide. *Parasite Immunol* 1996; 18: 297-306.
81. Clark IA. Does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? *Lancet* 1978; 75-77.
82. Shoda LKM, Kegerreis KA, Suarez CE, et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor-alpha, and nitric oxide. *Infect Immun* 2001; 69: 2162-2171.
83. Yarovinski F, Zhang D, Andersen JF. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005; 308: 1626-1629.
84. Zhang D, Zhang G, Hayden MS. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004, 303: 1522-1526.
85. Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 2005; 26: 509-511.
86. Vial HJ, Eldin P, Tielens AG, et al. Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 126 (2):143-154.

87. Skotarczak B. Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics. *Wiad Parazytol* 2007; 53 (4): 271-280.
88. Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, et al. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(4): 622-636.
89. Kim C, Alhassan A, Verdida RA, et al. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. *Vet Parasitol* 2007; 148 (2): 137-143.
90. Böse R, Jorgensen WK, Dalglish RJ, Friedhoff KT, De Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol* 1995; 57: 61-74.
91. Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. *Clin Infect Dis* 2009; 49(7):1103-1108.
92. Todorovic RA, Carson CA. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In: Ristic M, Kreier JP (eds), *Babesiosis*. New York, Academic Press 1981; pp 381-409.
93. Bakheit MA, Seitzer U, Mbatia PA, et al. Serological diagnostic tools for the major tick-borne protozoan diseases of livestock. *Parassitologia* 2007; 49 Suppl 1: 53-62.
94. Rehbein G, Heidrich-Joswig S. Use of schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody and complement fixation tests. *Vet Parasitol* 1983; 12(2):135-144.
95. Weiland G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Parasitol* 1986; 20(1-3):43-48.
96. Singh H, Mishra AK, Rao JR, et al. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41(2):153-9.
97. Urdaz-Rodríguez JH, Fosgate GT, Waghela SD, et al. Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for *Babesia bovis* in commercial dairy farms of Puerto Rico. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41(7):1465-1473.

98. Cantu CA, Ortega-S JA, García-Vázquez Z, et al. Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico. J Parasitol 2009; 95(3):536-542.
99. Ferreri L, Benitez D, Dominguez M, et al. Water buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149:149-151.
100. Silva MG, Henriques G, Sánchez C, et al. First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. Vet Parasitol 2009; 166(1-2):66-72.
101. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, et al. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. Parasitol Res 2009;105(1):249-254.
102. Criado-Fornelio A. A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. Parassitologia 2007; 49 Suppl 1:39-44.
103. Lau AO, Tibbals DL, McElwain TF. *Babesia bovis*: the development of an expression oligonucleotide microarray. Exp Parasitol 2007; 117(1):93-98.
104. Liu Q, Zhou YQ, Zhou DN, et al. Semi-nested PCR detection of *Babesia orientalis* in its natural hosts *Rhipicephalus haemaphysaloides* and buffalo. Vet Parasitol 2007; 143(3-4): 260-266.
105. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. J Microbiol Methods 2007; 71(3):281-287.
106. Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* in canine blood. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009; 40(1):35-39.
107. Kim C, Iseki H, Herbas MS, et al. Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Am J Trop Med Hyg 2007; 77(5):837-841.

108. Ica A, Vatansever Z, Yildirim A, et al. Investigation of ovine blood protozoa by reverse line blotting in the Kayseri region. 2. Babesia World Summit, Palermo, Italy, Parassitologia 2007a; 49 (1): 90.
109. Altay K, Aktas M, Dumanli N, et al.. Evaluation of a PCR and comparison with RLB for detection and differentiation of *Theileria* sp. MK and other *Theileria* and *Babesia* species of small ruminants. Parasitol Res 2008; 103: 319-323.
110. Laughery JM, Lau AO, White SN, et al. *Babesia bovis*: transcriptional analysis of rRNA gene unit expression. Exp Parasitol 2009; 123(1):45-50.
111. Suarez CE, McElwain TF. Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites. Int J Parasitol 2009; 39(3): 289-297.
112. Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, et al. Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 533-539.
113. Georges K, Loria GR, Riili S, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. Vet. Parasitol 2001; 99: 273-286.
114. García-Sanmartín J, Nagore D, García-Pérez AL, et al. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. BMC Vet Res 2006; 9: 2-16.
115. Almeria S, Castella J, Ferrer D, et al. Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. Ann N Y Acad Sci 2002; 969: 78-82.
116. Almería S, Delgado-Neira Y, Adelantado C, et al. 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 2009; 95(3): 598-603.
117. Luo J, Yin H, Liu Z, et al. Molecular phylogenetic studies on an unnamed bovine *Babesia* sp. based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. Vet Parasitol 2005; 133(1):1-6.

118. Liu Q, Zhao JL, Zhou YQ, et al. Study on some molecular characterization of *Babesia orientalis*. Vet Parasitol 2005; 130(3-4):191-198.
119. Martins TM, Neves L, Pedro OC, et al. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. Parasitology 2010; 4:1-8.
120. Florin-Christensen M, Suarez CE, Hines SA, et al. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. Infect Immun 2002; 70: 3566-3575.
121. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, et al. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. Infect Immun 1995; 63: 349-352.
122. O'Connor RM, Lane TJ, Stroup SE, et al. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. Mol Biochem Parasitol 1997; 89: 259-270.
123. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, et al. Sequence and functional analysis of the intergenic regions separating babesial rhoptry-associated protein-1 (rap-1) genes. Exp Parasitol 1998; 90 (2): 189-194.
124. De Vries E, Corton C, Harris B, et al. Expressed sequence tag (EST) analysis of the erythrocytic stages of *Babesia bovis*. Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 61-74.
125. Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, et al. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. Mol Biochem Parasitol 2003; 127(2):133-141.
126. Wilkowsky SE, Farber M, Gil G, et al. Molecular characterization of *Babesia bovis* strains using PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the msa2-a/b genes. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149:141-144.
127. Zupańska AK, Drummond PB, Swetnam DM, et al. Universal primers suitable to assess population dynamics reveal apparent mutually exclusive transcription of the *Babesia bovis* ves1alpha gene. Mol Biochem Parasitol 2009; 166(1):47-53.

128. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, et al. *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149:145-148.
129. Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, et al. Phylogenetic analysis of Mexican *Babesia bovis* isolates using *msa* and *ssrRNA* gene sequences. Ann N Y Acad Sci 2008;1149: 121-125.
130. Genis AD, Perez J, Mosqueda JJ, et al. Using *msa-2b* as a molecular marker for genotyping Mexican isolates of *Babesia bovis*. Infect Genet Evol 2009; 9(6):1102-1107.
131. Brown WC, Norimine J, Goff WL, et al. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. Parasite Immunol 2006; 28(7): 315-327.
132. Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, et al. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. Infect Immun 2002; 70(3):1599-1603.
133. Suarez CE, McElwain TF. Transfection systems for *Babesia bovis*: a review of methods for the transient and stable expression of exogenous genes. Vet Parasitol 2010; 167(2-4): 205-215.
134. Dominguez M, Echaide I, Echaide ST, et al. In silico predicted conserved B-cell epitopes in the merozoite surface antigen-2 family of *B. bovis* are neutralization sensitive. Vet Parasitol 2010; 167(2-4):216-226.
135. Leroith T, Brayton KA, Molloy JB, et al. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. Infect Immun 2005; 73(9):5388-5394.
136. Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, et al. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. Infect Immun 2005; 73(11):7180-7189.
137. Bono MF, Mangold AJ, Baravalle ME, et al. Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. Vet Parasitol 2008; 157(3-4):203-210.

138. Gubbels MJ, De Vos S, Van Der Weide M, Viseras J, Schouls LM, De Vries E, Jongejan F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blotting hybridization. J. Clin. Microbiol 1999; 37: 1782-1789.
139. Miranpuri GS. Ticks parasitising the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) and their possible role in disease transmission. Vet Parasitol. 1988, 27(3-4):357-62.
140. İça A, İnci A, Yıldırım A. Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. Turk J Vet Anim Sci 2007; 31: 33-38.
141. Altay K, Aydin MF, Dumanli N, et al. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158: 295-301.
142. Yao B, Zhao J, Liu E, et al.. Serological investigations on *Babesia orientalis* infection. Status of water buffaloes in Hubei Province. Parasitol Res. 2002 88(13 Suppl 1):S11-2.
143. Liu Q, Zhou YQ, Zhou DN, et al. Semi-nested PCR detection of *Babesia orientalis* in its natural hosts *Rhipicephalus haemaphysaloides* and buffalo. Vet Parasitol. 2007, 143(3-4):260-266.
144. Ferreri L, Benitez D, Dominguez M, et al. Water Buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. Ann N Y Acad Sci. 2008, 1149:149-51.
145. Mingala CN, Konnai S, Cruz LC, et al. Comparative moleculo-immunological analysis of swamp- and riverine-type water buffaloes responses. Cytokine. 2009, 46(2):273-82.



T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Sayı : B.30.2.ERC.01.00.01/ 500- 780
 Konu : Kayıt Silinme

30/09/2010

VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitü Yönetim Kurulunun 20/09/2010 tarih ve 482 sayılı toplantısında; Danışmanlığını Prof. Dr. Abdullah İNCİ'nin yürüttüğü Anabilim Dalınız yüksek lisans programı tez dönemi öğrencisi Volkan LALE, 2009-2010 Eğitim Öğretim yılı bahar döneminde belirtilen süre içinde (30 Ağustos 2010'a kadar) tezini Enstitüye teslim etmediği için Yönetmeliğin 42-3.maddesine göre kaydı silinmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Müdür

Payın 12/13
 4775269
 Fax istenilmez

Deneyin Zuhur
 J.

MADDE 42 – (3) Kredili dersleri ve seminer dersini başarıyla tamamlayan, ancak tez çalışmasını birinci fıkrada belirtildiği üzere dört yarıyıl sonuna kadar tamamlayamadığı için tez savunma sınavına giremeyen bir öğrenciye, tez danışmanının ve ana bilim/ana sanat dalı başkanlığının önerisi ve Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile tezini jüri önünde savunması için en fazla iki yarıyıl ek süre verilebilir. Bu süre sonuna kadar tezini tamamlayıp tez savunma sınavına girmeyen öğrencinin kaydı silinir.

