T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

ERZURUM YÖRESİ SIĞIRLARINDA *BABESIA BOVIS* VE *BABESIA BIGEMINA*'NIN REAL-TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI VE İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Proje No: **TSA-10-3332**

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Araştırmacılar:
Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Doç. Dr. Hamza AVCIOĞLU
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Doç. Dr. İbrahim BALKAYA
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Ocak 2013

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırıcılar, bu çalışmaya TSA-10-3332 kod numaralı proje ile maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederler.

ERZURUM YÖRESİ SIĞIRLARINDA *BABESIA BOVIS* VE *BABESIA BIGEMINA*'NIN REAL-TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI VE İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışma, Erzurum yöresindeki sığırlarda *Babesia bovis* ve *B. bigemina*'nın Real Time PCR ile araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 2011-2012 yılları arasında toplam 300 sığırdan EDTA'lı tüplere kan örnekleri toplanmıştır. Kan örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'ların nanodrop spektrofotometre ile konsantrasyonları belirlenmiş ve moleküler analizler için optimal konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Genomik DNA ekstraktlarının *B. bovis ve B. bigemina* için sırasıyla Msa2c ve RAP-1 gen bölgelerini amplifiye eden spesifik primerlerle Sybergreen ve TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. İncelemesi yapılan 300 sığır kan örneğinin 28'inde (%9,3) *B. bovis*, 17'sinde (%5,7) ise *B. bigemina* pozitifliği saptanmıştır. İncelenen örneklerde miks enfeksiyona rastlanmamıştır. Ct (dR) değerleri *B. bovis* pozitif örneklerde ortalama 35,42±0,21, *B. bigemina* pozitif örneklerde ise 33,84±1,07 saptanmıştır. Moleküler karakterizasyon amacıyla pozitif belirlenen örneklerde *B. bovis* ve *B. bigemina* için sırasıyla Msa2c ve RAP-1a gen bölgelerini amplifiye eden spesifik primerler ile konvansiyonel PCR ve Nested PCR analizleri yapılmıştır. *B. bovis* pozitif 28 örnekten 4'ünün, *B. bigemina* pozitif 17 örnekten ise 3'ünün agaroz jel üzerinde sekans analizleri için uygun DNA bant profilleri gösterdiği saptanmıştır. Söz konusu izolatların pürifiye edildikten sonra Msa2c ve RAP-1a gen bölgeleri filogenetik analizler için sekanslanmıştır. *B. bovis* izolatlarının (BbovE1-BbovE4) Msa2c gen bölgesinin filogenetik analizi sonucunda, kendi aralarında, Türkiye'den ve dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ortalama sırasıyla %0,6, %2,3 ve %7,5 genetik farklılık belirlenmiştir. *B. bigemina* izolatlarının (BbigE1-BbigE3) RAP-1a gen bölgesinin filogenetik analizi sonucunda, kendi aralarında %0,3 ve dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ortalama %0,5 genetik farklılık tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Erzurum yöresi sığırlarında *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın varlığı ve yaygınlığı, diğer moleküler tabanlı teşhis yöntemlerine göre sensitivite ve spesifitesi oldukça yüksek olan Real Time PCR tekniği ile ortaya konmuştur. Elde edilen Ct (dR) değerleine göre enfekte sığırlarda her iki türün de düşük parazitemiye sahip olduğu görülmüştür. Bu açıdan özellikle rezervuar hayvanların ortaya konmasında Real Time PCR'ın oldukça avantajlı ve güvenilir bir yöntem olduğu dikkati çekmiştir. Ayrıca bu çalışma, Erzurum yöresinde sığır babesiosis'ine yol açan türlerin moleküler karakterizasyonlarının ortaya konulduğu ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: *Babesia bovis, Babesia bigemina*, sığır, Real Time PCR, moleküler karakterizasyon, Erzurum

INVESTIGATION OF *BABESIA BOVIS* AND *BABESIA BIGEMINA* IN CATTLE IN ERZURUM PROVINCE BY REAL TIME PCR AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE ISOLATES

ABSTRACT

This study was carried out to investigate *Babesia bovis* and *B. bigemina* in cattle in Erzurum province by Real Time PCR and to determine the molecular characterization of the isolates. For this aim, totally 300 blood samples from cattle were collected into the tubes with EDTA in 2011-2012. Genomic DNA extraction was performed to the blood samples. The concentrations of the obtained DNA's were analyzed by nanodrop spectrophotometry and optimal concentrations were prepared for the molecular analyses. Sybergreen and TaqMan probe based real time PCR analyses were carried out with *B.bovis* and *B. bigemina* specific primer pairs which amplify Msa-2c and Rap-1 gene regions, respectively. Totally 28 (9.3%) and 17 (5.7%) of the 300 bovine blood samples were found to be infected with *B. bovis* and *B. bigemina*, respectively. No mix infection was detected in the examined samples. The Ct (dR) values were determined as average 35,42±0,21 and 33,84±1,07 in *B. bovis* and *B. bigemina* positive samples, respectively. For the molecular analyses, conventional and Nested PCR analyses were performed with *B.bovis* and *B. bigemina* specific primer pairs which amplify Msa-2c and Rap-1 gene regions in positive samples. It was detected that 4 of 28 for *B.bovis*, and 3 of 17 for *B. bigemina* positive samples exhibited suitable DNA band profiles in the agarose gel for sequence analyses. These isolates were sequenced with respect to Msa-2c and Rap-1a gene regions for phylogenetical analyses after gel purification. According to the phylogenetic analyses of Msa-2c gene region of *B.bovis* isolates (BbovE1-BbovE4), average 0.6%, 2.3%, and 7.5% genetic distance were detected with eachother, with the other isolates in Turkey, and with some other isolates in the world, respectively. Similarly according to the phylogenetic analyses of Rap-1a gene region of *B.bigemina* isolates (BbigE1-BbigE3), average 0.3%, and 0.5% genetic distance were detected with eachother, and with some other isolates in the world, respectively.

In conclusion, the presence and prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle from Erzurum province were exhibited by Real Time PCR, which is more sensitive and more specific than the other molecular based diagnostic techniques, in this study. According to the Ct (dR) values, it was seen that both *B. bovis* and *B. bigemina* species have low parasitemia in cattle. Real Time PCR technique was found to be quite advantageous and reliable in the diagnosis of reservoir animals. However this was the first study on the molecular characterizations of the bovine *Babesia* species in Erzurum province.

Keywords: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, cattle, Real Time PCR, molecular characterization, Erzurum

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

TEŞEKKÜR 3
ÖZET 4
ABSTRACT 5
İÇİNDEKİLER 6
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ 8
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM 10
2. GENEL BİLGİLER 12
2.1. BABESIOSIS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ 12
2.2. *BABESIA* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YER 14
2.3. *BABESIA* TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU 15
2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme 16
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim 16
2.4. SIĞIRLARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİ 17
2.4.1. *Babesia bigemina* (Smith ve Kilborne, 1893) 18
2.4.1.1. Yayılış ve Epidemiyoloji 18
2.4.1.2. Gelişme 20
2.4.1.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler 21
2.4.2. *Babesia bovis* (Babes 1888, Starcovici, 1893) 22
2.4.2.1. Yayılış ve Epidemiyoloji 23
2.4.2.2. Gelişme 24
2.4.2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler 24
2.4.2.4. Zoonotik Önemi 24
2.4.3. *Babesia divergens* (M'Fadyean and Stockman, 1911) 25
2.4.3.1. Yayılış ve Epidemiyoloji 25
2.4.3.2. Gelişme 25
2.4.3.3. Zoonotik Önemi 25
2.4.4. *Babesia major* (Sergent,Donatien, ParrotiLestoquard and Plantureux,1926) 26
2.4.4.1. Yayılış ve Epidemiyoloji 26
2.4.4.2. Gelişme 26
2.4.4.3. Zoonotik Önemi 26
2.4.5. *Babesia jakimovi* 26
2.4.6. *Babesia occultans* 26
2.4.7. *Babesia ovate* 26

Sayfa no

2.5. BABESIOSIS'TE TEŞHİS 27
2.5.1. Mikroskobik Muayene 27
2.5.2. Serolojik Testler 28
2.5.3. Moleküler Teknikler 29
3. GEREÇ VE YÖNTEM 32
3.1. HAYVAN MATERYALİ (SIĞIRLAR) VE KAN ÖRNEKLERİ 32
3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI 33
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu 33
3.2.2. Real Time-PCR 33
3.2.3. *B. bovis* Msa2c geninin amplifikasyonu 35
3.2.4. *B. bigemina* RAP-1a geninin amplifikasyonu 35
3.2.5. *B. bovis* Msa2c ve *B. bigemina* Rap-1a Genlerinin Sekansı ve Filogenetik Analizi 36
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 37
4. BULGULAR 38
4.1 Real Time-PCR Sonuçları ve Babesiosis Prevalansı 38
4.2. Babesiosis'in Moleküler Prevalansında Bazı Epidemiyolojik Faktörlerin Analizi 42
4.3. Sekans ve Filogenetik Analizler 44
4.3.1. Msa2c ve RAP-1a genlerinin amplifikasyon sonuçları 44
4.3.2. *B. bovis* Msa2c Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi 46
4.3.3. *B. bigemina* Rap-1a Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi 59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 67
6. KAYNAKLAR 74

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 3.1. 2011-2012 yılları arasında Erzurum yöresinde örneklenen sığırların toplama merkezi, yaş, ırk ve cinsiyete göre dağılımları 32

Tablo 3.2. Real Time PCR'da Kullanılan Primer ve Problar 35

Tablo 4.1. Real Time PCR incelemesi yapılan sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın Yaygınlığı……..... 39

Tablo 4.2. Sığırlarda babesiosis prevalansının *Babesia* türlerine göre yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi 43

Tablo 4.3. *B. bovis* pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerelerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı 44

Tablo 4.4. *B. bigemina* pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerelerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı 44

Tablo 4.5. Erzurum yöresinde sığırlarda belirlenen *B. bovis* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları 46

Tablo 4.6. Türkiye ve dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *B. bovis* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler 49

Tablo 4.7. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ile Türkiye ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları 50

Tablo 4.8. Erzurum yöresinde sığırlarda belirlenen *B. bigemina* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları 59

Tablo 4.9. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer bazı *B. bigemina* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler 61

Tablo 4.10. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları 62

Şekil 2.1. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları 15

Şekil 4.1. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri 39

Şekil 4.2. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif örneklerin erime eğrileri (melting curve) 40

Şekil 4.3. TaqMan Prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri 40

Şekil 4.4. Real Time PCR'da *B. bovis* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı. 41

Sayfa no

Şekil 4.5. Real Time PCR'da *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı. 41
Şekil 4.6. *B. bovis* Msa2c gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü. 45
Şekil 4.7. *B. bigemina* Rap-1a gen bölgesini amplifiye eden primerler ile Nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü 45
Şekil 4.8. *B. bovis* BbovE1 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515389). 46
Şekil 4.9. *B. bovis* BbovE2 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515390) 47
Şekil 4.10. *B. bovis* BbovE3 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515391) 47
Şekil 4.11. *B. bovis* BbovE4 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515392) 48
Şekil 4.12. GenBank'a kayıtları yapılan Erzurum *B. bovis* izolatları ile Türkiye ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların msa-2c gen dizilimlerinin pairwise analizleri. 51
Şekil 4.13. Erzurum yöresinde sığırlarda belirlenen *B. bovis* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *B. bovis* izolatlarının complete msa-2c gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları 57
Şekil 4.14. Erzurum yöresinde sığırlarda saptanan *B. bovis* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *B. bovis* izolatlarının msa-2c gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli) 58
Şekil 4.15. *B. bigemina* BbigE1 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515386)…59
Şekil 4.16. *B. bigemina* BbigE2 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515387)….60
Şekil 4.17. *B. bigemina* BbigE3 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515388)….60
Şekil 4.18. GenBank'a kayıtları yapılan Erzurum *B. bigemina* izolatları ile Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların Rap-1 gen dizilimlerinin pairwise analizleri..... 63
Şekil 4.19. Erzurum yöresinde sığırlarda belirlenen *B. bigemina* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *B. bigemina* izolatlarının partial Rap-1 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları..... 65
Şekil 4.20. Erzurum yöresinde sığırlarda saptanan *B. bigemina* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *B. bigemina* izolatlarının Rap-1 gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). 66

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Subtropikal iklim kuşağında yer alan Türkiye'de hayvancılık, ekonomik açıdan çok önemli bir yere sahiptir. Türkiye'de hayvancılığın gelişmesini olumsuz yönde etkileyen barınak, bakım ve besleme gibi yetiştiricilik hatalarının yanında, bakteriyel, viral ve paraziter orijinli hastalıklar oldukça önem arz etmektedir. Paraziter hastalıklar içerisinde yaygın olanlardan biri de oldukça önemli bir protozoon hastalığı 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 yol açmaktadır. Ayrıca et ve süt verimlerinde önemli ölçülerde düşüşlere de neden olan babesiosis, dolayısıyla Türkiye ekonomisine önemli oranda zarar vermektedir.

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 mikroskobik 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. Konvansiyonel ve serolojik yöntemlerin çeşitli dezavantajları sebebiyle, teşhiste daha özgül ve duyarlı yöntemlere gereksinim duyulmuştur. Bunun sonucu olarak son yıllarda parazit DNA'sından teşhise yönelik ileri teknolojik moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler arasında son yıllarda Real Time PCR yöntemleri, duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması sebebiyle öne çıkmıştır. Sığırlarda babesiosis'in Türkiye'deki durumu hakkında yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunu mikroskobik ve serolojik çalışmalar oluşturmaktadır. Moleküler çalışmaların sayısı ise oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada, Erzurum yöresi sığırlarında *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın varlığının ve yaygınlığının, diğer moleküler tabanlı teşhis yöntemlerine göre sensitivite ve spesifitesi oldukça yüksek olan Real Time PCR tekniği ile ortaya konulması ve elde edilen pozitif izolatların moleküler karakterizasyonlarının yapılması 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 identiği olarak konfirme etmiştir. Arjantin’de, 1903’te Lignieres sığır babesiosisi (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 meningslerindeki kapillarlardan 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 araştırıcılar 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 babesiosis’e 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 mikroskobik; 1980’li yılların sonunda mikroskobik bakının yanında serolojik; 2000’li yılların başlarında ise bunlara ilave nükleik asit tabanlı moleküler araştırmalar yapılmıştır (5).

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

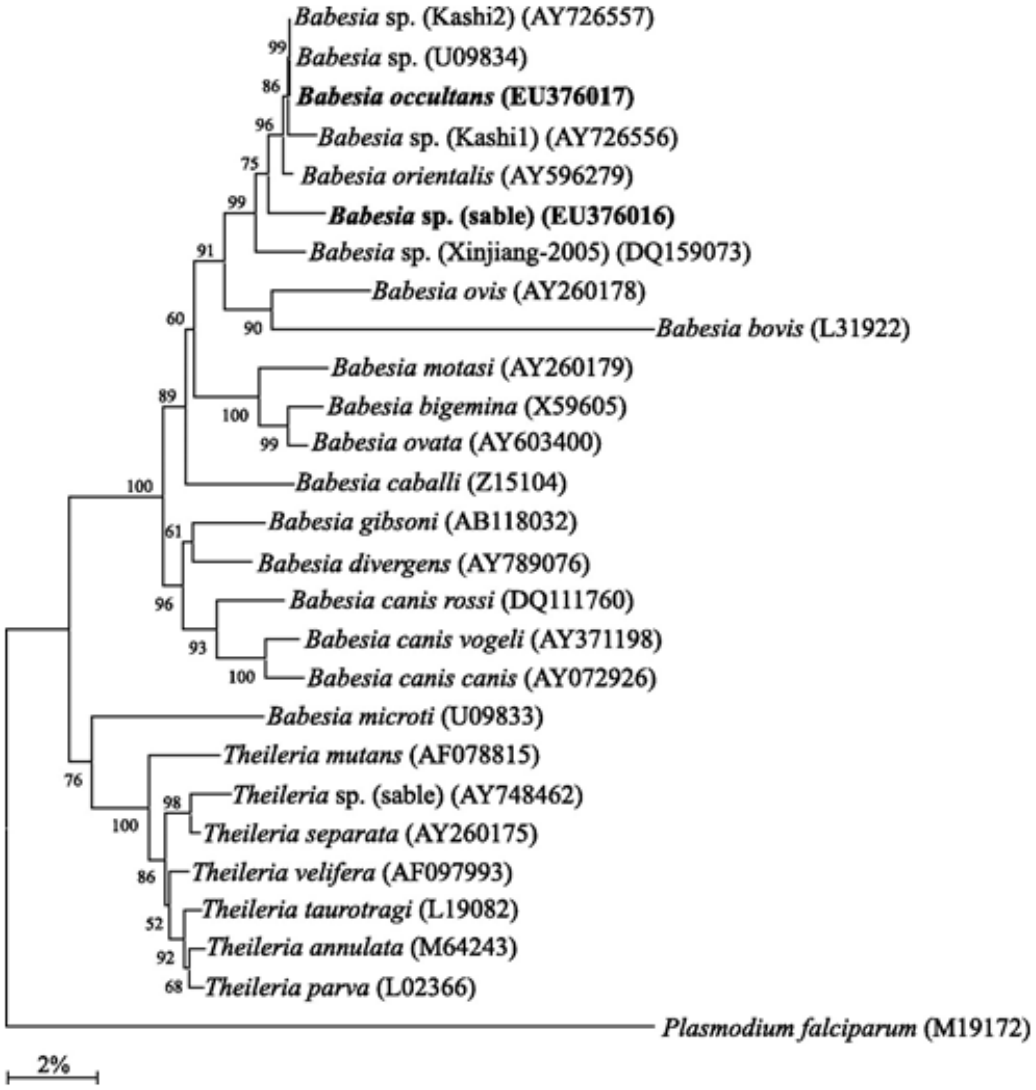
Class: ***Aconoidasida*** Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

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 SİKLUSU

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 piroplasmlardan farklı olarak "gamont prekürsörleri" adı verilen oval şekilli bir merozoit identifiye etmişlerdir. Bu gamont prekursörleri, 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 (immunite) kazanıp parazitleri temizlemesiyle sonuçlanır (15, 16).

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 ışınsal-cisimciklerinin (ray-bodies) iki populasyonu 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).

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).

2.4. SIĞIRLARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİ

Sığırlarda babesiosis'e; *B. bigemina, B. bovis, B. divergens, B. major* türleri sebep olmaktadır. Bu türlere ilaveten *B. jakimovi*, *B. occultans* ve *B. ovate* türlerinin de sığırlarda görülebildiği bildirilmiştir (4).

2.4.1. *Babesia bigemina* (Smith ve Kilborne, 1893)

Büyük *Babesia* türlerinden olup eritrositler içerisinde armut, yuvarlak, oval veya düzensiz şekilli olup genellikle çift armut formundadır. Yuvarlak formları 2-3µ çapta, uzamış formları ise 4-5µ uzunluğundadır. Eritrositer formlarda konoid, mikroporlar ve tipik mitokondri yoktur. Buna karşın, anterior ve posterior polar halka ve tipik iki adet roptri bulunur (13, 25, 26).

2.4.1.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Babesia bigemina tropik ve subtropik iklim kuşağında birçok ülkede görülmektedir. Özellikle, Afrika, Avustralya, Avrupa, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika'da yaygın olarak görülür; Amerika Birleşik Devletleri'nde ise eradike edilmiştir.

Türkiye'de ilk olarak 1890'da Nicole ve Adilbey tarafından mikroskobik tarifi yapılan *B. bigemina*'nın yol açtığı sığır babesiosis'i çalışmaları; İbrahim Ekrem (27), Lestoquard (28), Gören ve Yetkin (29), Aysoy (30), Mimioğlu (31), Kurtpınar (32)'ın araştırmaları ile devam etmiştir. Mimioğlu (31) Karadeniz Bölgesi'nde mikrokosobik bakısını yaptığı 70 sığırın 5'inde, Göksu (33) Ankara civarında 996 sığırın 6'sında ve takiben Özcan (34) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 194 sığırın 2'sinde *B. bigemina*'yı pozitif bulmuşlardır. Diğer yandan Erkut (35) Ege Bölgesi'nde incelediği 141 sığırın 7'sinde piroplasmosmosis görüldüğünü; Göksu (36) Karadeniz Bölgesi'nin bazı illerinde 37'si babesiosisden şüpheli, 43'ü sağlıklı toplam 80 sığırın 3'ünde, yine aynı araştırıcının Doğu Anadolu sığırları (37) ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında (38) Ege ve Marmara Bölgelerinde *B. bigemina*'nın bulunduğu rapor edilmiştir. Takiben Hoffman ve ark. (39) Türkiye'nin Asya bölümünde sığırlarda piroplasmosis vakalarının yaygın olduğunu ve muayenesi yapılan sığırların %3,5'inde hastalığın *B. bigemina*'dan kaynaklandığını; Mimioğlu ve ark. (40) Türkiye'de *B. bigemina*'nın diğer *Babesia* türlerine göre daha yaygın olduğunu ileri sürmüştür.

Türkiye'de sığır ve koyunlarda görülen anaplosmosis, piroplasmosis ve theileriosis olguları uluslararası epizootiyoloji bülteninde yer aldıktan sonra mikroskobik olarak *B. bigemina*; İstanbul ve çevresinde piroplasmozis semptomu gösteren 112 sığırın 13'ünde (41), Elazığ yöresinde 69 piroplasmosis şüpheli sığırın 4'ünde (42), Ankara'nın Beytepe köyünde 185 sığırın 3'ünde (43) görülmüştür. Öte yandan *B. bigemina*'nın Van Bölgesi sığırlarında bulunduğu (44), Karadeniz Bölgesi'nde 76

sığırın 72'sinde *Babesia* sp. saptandığı rapor edilmiştir (45). Aynı dönemde Ankara'nın Çubuk ilçesinde *B. bigemina*'nın mikroskobik insidensi %18,8 olarak bulunmuştur (46). Diğer yandan *B. bigemina*'nın mikroskobik prevalansı, Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1 arasında (47), Samsun yöresi sığırlarında %32,21 (48); Kayseri yöresinde %6,8 (49) olarak rapor edilmiştir. Takiben *Babesia* spp. prevalansı, Konya yöresinde %11,46 (50), Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde %0,6-1,4 arasında (51), Adana yöresinde ise %31,8 (52) oranında bildirilmiştir. Diğer yandan Konya'da Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 11 günlük bir buzağıda *B. bigemina*'dan ileri gelen akut babesiosis olgusu tespit edilmiştir (53).

Türkiye'de sığırlarda babesiosis'in serolojik teşhisi, IFAT ile seroinsidens şeklinde ilk kez Ankara'da yapılmış ve 185 sığırın 9'unda *B. bigemina*'ya karşı antikor saptanmıştır (54). Takiben bir kısım araştırıcı (43, 45, 46, 49-51, 55-61) IFAT ile *B. bigemina'*ya karşı antikor araştırmıştır.

Sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine yapılan çalışmalarda *B. bigemina*; Karadeniz Bölgesi'nde 76 sığırın 47'sinde (%61,84) (45), Ankara'nın Çubuk ilçesinde ise %100 bulunmuştur (46). Takiben *B. bigemina* seropozitifliği; Ankara civarında %49 (56), %80 (57), %7,3 (60) ve %8,8 (59); Adana yöresinde %55 (62) ve %75 (58); Elazığ'da %31,9, Malatya'da %7,1 ve Tunceli'de %7,3 (51); Konya yöresinde %53,07 (50); Kayseri yöresinde %23,03 (49) ve Antakya yöresinde %0,9 (61) olarak bildirilmiştir. Türkiye genelinde *B. bigemina* seropozitifliği, Karadeniz Bölgesi'nde %61,8, Doğu Anadolu Bölgesi'nde %42,9, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %48,8, Akdeniz Bölgesi'nde %50,8, Marmara Bölgesi'nde %48,9 ve Ege Bölgesi'nde %68,5 olarak rapor edilmiştir (57). Öte yandan Türkiye'de sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi ve hastalık insidensi, ilk kez Çukurova bölgesinde araştırılmış ve yapılan seroepidemiyolojik yoklamayla mevsimsel seroinsidens *B. bigemina* için 0,600, hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (58).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, hastalık etkenlerinin DNA'sını ortaya koymaya yönelik moleküler yöntemler (PCR, RLB vb.) ortaya çıkmış ve kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde bu yöntemler, hastalık etkenlerinin teşhisinde tercih edilir olmuşlardır. Bu gelişmelere paralel olarak, revers line bloting (RLB) tekniği geliştirilmiş ve ilk defa aynı kenede bulunabilen 4 *Borrelia* türünün

ayrılması için kullanılmıştır (63). Bu test PCR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Teknik, birçok etkenin aynı anda birçok prob ile karşılaştırılmasına olanak sağladığından, oldukça pratik ve kullanışlıdır. Nitekim Gubbels ve ark. (64) bu tekniği sığırlardaki, Schnittger ve ark. (65) ise koyun ve keçilerdeki *Theileria* ve *Babesia* türlerinin eş zamanlı teşhisinde kullanmışlardır.

Türkiye'de PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (66) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bulunmuştur. Bunu takiben Türkiye'de ilk defa RLB ile yapılan çalışmada, Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır (60). Kayseri yöresinde sığırlarda *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %0,6 (67) ve yine Kayseri'de sığır barınaklarından toplanan kenelerde Türkiye'de ilk defa RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %14 olarak tespit edilmiştir (68). Diğer yandan Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bigemina* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (69, 70). Ayrıca Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonucu *Babesia* sp. saptanmış ve bu suş *Babesia* sp. (*Kayseri 1*) olarak Genbanka kayıt ettirilmiştir (68). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sığırlar üzerinde yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında tespit edilmiştir (71). Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan diğer bir saha çalışmasında ise *B. bigemina* prevalansı %2,2 olarak bildirilmiştir (83). Diğer yandan Yıldırım ve ark. (147), Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş olan 400 adet kan örneğinde, RLB ile %14,75, Nested PCR ile %17,75 ve Real Time PCR ile %18,75 oranında *B. bigemina* pozitifliği belirlemişlerdir. Ayrıca RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 5'inin Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bigemina* 2'sinin ise *B. bigemina+B. bovis miks* olduğu aynı çalışmada (147) ortaya konmuştur.

2.4.1.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus, B. microplus, B. australis, B. calcaratus, B. decoloratus, Haemaphysalis punctata, Rhipicephalus appendiculatus, R. evertsi, R. bursa* keneleri yapmaktadır (13, 26, 72). Türkiye'de *B. annulatus, Hae. punctata* ve *R. bursa* türleri bulunmaktadır. Bu türün gelişim safhaları,

genel kısımda anlatıldığı gibidir. İntrauterin bulaşma görülebilir ancak bu, hastalığın epidemiyolojisinde önemli olacak seviyede değildir.

2.4.1.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Babesiosis'de klinik belirtiler etkenin vektör kene tarafından konaklara verilmesini takiben 9-12 gün içerisinde ortaya çıkar. Hasta hayvanlarda klinik belirtiler farklılık gösterebilmektedir. Bunun sebebi olarak da farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bigemina* izolatlarının patojenitelerindeki farklılıklar gösterilebilir. Yapılan bir çalışmada; Avustralya'daki sığırlarda tespit edilen *B. bigemina* suşunun hayvanlarda nadiren enfeksiyona sebep olduğu, buna karşın Afrika'da tespit edilen suşun ise çok daha patojenik olduğu rapor edilmiştir (73). Babesiosis'li hayvanlardaki ilk klinik semptom eritrositlerdeki yıkımlara bağlı olarak ortaya çıkan ve 41,5-42 ^{o}C'ye ulaşan yüksek ateştir. Hayvanlarda anoreksi ve ruminal atoni görülür. Tedirginlik, gölgelik alanlara sığınmaya çalışma ve sürekli yerde yatma isteği hasta hayvanlarda gözle görülebilen ilk şüphe uyandırıcı gözlemlerdir. Hayvanlar bulundukları yerde kendi etraflarında kavis çizerler, tüyleri karışmış ve kabarmış olup nefes alışverişlerinde güçlük ve taşikardi görülür. Başlangıçta müköz membranlar kırmızıdır fakat eritrositik yıkımı takiben anemiye bağlı müköz membranlarda soluklaşma oluşur. Anemi çok hızlı bir şekilde meydana gelir ve yaklaşık olarak eritrositlerin %75'i birkaç gün içerisinde yıkımlanır. Buna bağlı olarak da hemoglobinüri ve hemoglobinemi şekillenir. Hemoglobinüri, çoğunlukla olmasına karşın bazı olgularda görülmeyebilir. Hasta hayvanlarda kilo kaybı ve süt veriminde azalmalar görülür. Hemoglobinüriyi takiben ikterus ortaya çıkar. Kan suludur. Akut olgularda, 4-8 gün içinde ölüm görülür. Tedavi edilmeyen hayvanlarda mortalite, %50-90 arasında değişir. Kronik durumlarda ise ateş çok yüksek değildir ve genellikle hemoglobinüri görülmez (27, 72, 74-76).

Akut babesiosis'de konağın plazma bileşiminde değişimler olur. Kinin ve aktif kallikrein düzeyi artar, kininojen seviyesi azalır. Bunlara bağlı olarak damarlarda dilatasyon, kan akışında yavaşlama, kılcal damar duvarlarında bozulmalar olur ve damar duvarlarının geçirgenliği artar. Konglutinin ve fibronektin düzeylerinin azalması sonucu eritrositlerde kümelenme ve kapiller damarlarda tıkanmalar şekillenir. Fibrinojen ile ilgili ürünler artar, plazminojen azalır ve buna bağlı olarak koagulasyon bozuklukları ve eritrosit birikimi görülür. Bu tip patogenez, daha çok parazitli eritrositlerin kümelenerek damarları tıkadığı *B. bovis*'de görülür (26, 75). Bu kapiller

blokajın olmadığı *B. bigemina* ve *B. divergens* enfeksiyonlarında ise en önemli patolojik etki, eritrosit hasarıdır (77). Kinin ve benzeri maddelerin eritrosit yüzeyinin ozmotik geçirgenliğini bozmasıyla eritrositler kolayca lize olur (19). Bunun yanında şiddetli patogenezis; kısmen immunite, özellikle genç danaların dirençli olmasında etkili olan ve birçok hücre içi patojene karşı koruyucu immunitede rol oynayan interferon gama (IFN-γ), tümor nekrozis faktör alfa (TNF-α) ve nitrik oksit (NO)'i içeren mediatörlerle ilgilidir (78).

Patogenezisin temeli, eritrositlerdeki devamlı ve şiddetli parazitemi sonucu meydana gelen anemi ve anemik anoksidir. Anemi rejeneratif tipte olup, kan tablosuna bakıldığında retikülositler ve çekirdekli eritrositler görülür. Meydana gelen vazodilatasyon ve azalan kan dolaşımı sebebiyle, non-spesifik genel bir yangı tablosu oluşur (75, 77, 79). Azalan kan dolaşım hızı sebebiyle, bazı hayati organlarda anoksi meydana gelir ve parazitin toksik ürünleri ya da organlardan kaynaklanan metabolik ürünlerle genel bir organ tahribatı oluşur. Retiküloendotelyal sistem hücrelerinin özellikle de histiyositlerin; ölü, anormal eritrositleri ve çözünmüş fibrini uzaklaştırması yanında enfekte eritrositleri uzaklaştırmada da rolü vardır. Histiyositler, dalak ve lenf nodüllerinin sinüsleri ile karaciğerin sinüzoidlerini doldurarak bu organlarda hipertrofi ve hiperplazilere yol açarlar. Dalak ve lenf yumruları, ödem ve hemoglobinemiye bağlı olarak büyümüş ve siyah renklidir. Hemolitik olaylara oldukça duyarlı olan böbreklerde, glomeruluslar ve renal tubuller hemoglobin ile doludur. Normal şartlarda renal tubullerden geri emilebilen hemoglobin, miktarın fazla olduğu durumlarda emilemeyerek idrara geçer. Böbrekteki hasar, hemolizin şiddetine bağlıdır. Akut olaylarda, böbrek büyümüş ve siyah renklidir. İdrar kesesi, kırmızı renkli idrarla doludur. Koagulasyon mekanizmasında meydana gelen bozukluklar da hastalığın patogenezinde önemlidir (19, 77).

2.4.2. *Babesia bovis* (Babes 1888, Starcovici, 1893)

Küçük *Babesia* türlerindendir. Eritrositler içerisindeki merozoitler; armut, yuvarlak veya düzensiz şekillidirler. Vakuollü taşlı yüzük formları bu tür de yaygın olarak görülür. *Babesia bovis* merozoitleri, 1,5-2,4 µm büyüklüğünde olup genellikle eritrositlerin ortasına yerleşirler (13, 25, 26).

2.4.2.1.Yayılış ve Epidemiyoloji

Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada dışında tüm dünyada görülen bu tür, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya'da yaygın olarak görülmektedir. Güney Amerika'da *B. bigemina*'dan daha büyük önem taşımaktadır.

Türkiye'de *B. bovis*, ilk kez Mimioğlu (31) tarafından Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde sığırlarda "*Haemataurai vesicalis bovis*" araştırması ile gündeme gelmiş; Göksu (33) Ankara'da incelediği 996 sığırın 2'sinde, takiben aynı araştırıcı (36) bazı Karadeniz illerinde mikroskobik bakısı yapılan 80 sığırın 3'ünde *B. bovis*'i bulmuştur. Göksu (38) Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında *B. bovis*'in Marmara ve Güney Doğu Anadolu'da görüldüğünü; Mimioğlu ve ark. (40) *B. bovis* (*Babesia berbera*) Karadeniz bölgesinde daha fazla bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Öte yandan mikroskobik bakıyla, Elazığ yöresinde iç organlarından froti yapılan 4 sığırın 1'inde (42) ve Ankara'da 185 sığırın 1'inde (56) *B. bovis* saptanmıştır. *Babesia bovis*'in mikroskobik pozitifliği; Marmara bölgesinde %34,8 (41), Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1,5 arasında (47); Samsun yöresinde %29,53 (48), Kayseri yöresinde %1,04 (49) bulunmuş ve mikroskobik insidensi Ankara'nın Çubuk ilçesinde %9 olarak saptanmıştır (80).

Babesia bovis seroinsidensi; IFAT ile Ankara'nın Beytepe köyünde 185 sığırın 18'inde (43, 54), Ankara yöresinde 46 sığırın 22'sinde (55), Karadeniz bölgesinde 76 sığırın 34'ünde (%44,73) (45), Ankara'nın Çubuk ilçesinde %59 (80) bulunmuştur. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi *B. bovis* için 0,292 ve hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (58). *Babesia bovis* seropozitifliği; Türkiye genelinde ELISA ile %51,2 (81); IFAT ile Ankara civarında %10,4 (56), %41,6 (57), %1,3 (60) ve %2,4 (59); Elazığ'da %1,4 ve Tunceli'de %0,6 (51); Kayseri yöresinde %1,04 (49); Doğu Anadolu'da %5,6, Güneydoğu Anadolu'da %6,4, Akdeniz'de %31,6, Ege'de %51,4 ve Marmara'da %41,8 (57) olarak saptanmıştır.

Diğer yandan Türkiye'de *B. bovis*'in moleküler prevalansı; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (66); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (60), Trakya bölgesinde %1,3 (82) olarak saptanmıştır. Diğer yandan Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bovis* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (69, 70, 83, 84). Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan

bir çalışmada (83) *B. bovis*'in moleküler prevalansı; Amasya'da %4; Bartın'da %2,3, Bolu'da %4,2, Giresun'da %1,6, Karabük'te %1,4, Kastamonu'da %5,6, Samsun'da %3,8 ve Trabzon'da %2,2 olarak belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada (83) genel olarak Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in moleküler prevalansı %1,8 olarak tespit edilmiştir. Ege bölgesinde ise *B. bovis* prevalansı %1,02 olarak tespit edilmiştir (84) .

Diğer yandan Yıldırım ve ark. (147), Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş 400 adet kan örneğinde, RLB ile %4,50, Nested PCR ve Real Time PCR ile %5,75 oranında *B. bovis* pozitifliği bildirmişlerdir. Ayrıca söz konusu çalışmada (147) RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 9'unun Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bovis* olduğu ortaya konmuştur.

2.4.2.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus calcaratus, B. microplus, B. australis, Rhipicephalus bursa* ve *Ixodes persulcatus* keneleri yapmaktadır (13, 25, 26). Türkiye'de *R. bursa* türü bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Babesia bigemina ile benzerdir. İnkübasyon periyodu 2-10 gündür. Yüksek ateş 2-3 gün sürer. *Babesia bigemina*'ya göre daha patojen bir türdür. Anemi, ikterus ve ishal görülür. *Babesia bigemina*'dan farklı olarak hemoglobinüri ve hemoglobinemi oluşabilir fakat her zaman görülmeyebilir. Koagulasyon mekanizmasındaki bozukluklara bağlı klinik belirtiler, *B. bigemina*'dan daha şiddetlidir. Özellikle kapillar damarlarda görülen stazis ve tıkanmalar daha yaygındır. Bu lezyonlar, özellikle beyin kapillarlarında yaygın olarak görülür. Hastalığın akut formunda, hipertansif şok tablosu görülür. Ölüm *B. bigemina*'ya göre daha yaygındır. *Babesia bigemina* ile enfekte hayvanlarda ölüm genellikle hemotokrit değer %10'nun altına düştüğünde görülürken, *B. bovis* ile enfekte hayvanlarda bu oran %12 veya daha yüksek iken ölümler görülür (23, 73).

2.4.2.4. Zoonotik Önemi

Splenektomili insanlarda, bu türe bağlı babesiosis vakaları rapor edilmiştir (26, 85).

2.4.3. *Babesia divergens* (M'Fadyean and Stockman, 1911)

Küçük *Babesia* türlerindendir (0,4-1,5µm). Merozoitleri, genelde çift halde bulunurlar, aralarındaki açı geniştir ve genellikle eritrositlerin periferine yerleşirler. Ayrıca tombul, armut şeklinde ve yuvarlak formlar da görülebilir. Merozoitlerde, konoid, mikroporlar, tipik golgi aygıtı ve mitokondri yoktur. Mitokondri benzeri veziküller ve 3 veya daha fazla roptri vardır (13, 25, 26).

2.4.3.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Avrupa ve Rusya'da sık görülür. Özellikle Avrupa'nın Kuzey'inde daha yaygındır. Ancak Tunus gibi Akdeniz ülkelerinde de bildirilmiştir.

Türkiye'de *B. divergens* bugüne kadar mikroskobik olarak bildirilmemiştir. Bu türle ilgili serolojik çalışmalar da sınırlıdır. Ankara yöresinde (55) ve Ankara'nın Beytepe köyünde (43, 54) IFAT ile yapılan seroinsidens çalışmalarında ve Antakya yöresinde (61) IFAT ile yapılan seroprevalans yoklamasında *B. divergens*'e karşı antikor saptanamamıştır. Buna karşılık IFAT ile Karadeniz Bölgesi'nde yapılan seroinsidens çalışmasında 76 sığırın 57'sinde *B. divergens*'e karşı antikor oluştuğu saptanmıştır (45). Diğer yandan *B. divergens* seropozitifliği; Doğu Anadolu'da %3,7, Akdeniz'de %7,2, Ege'de %18,5, Marmara'da %2 ve Karadeniz'de %75 (57); Elazığ'da %3,5, Malatya'da %0,6 ve Tunceli'de %1,2 (51) ve Kayseri yöresinde %2,09 (49) olarak bildirmiştir. Çukurova'da sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi *B. divergens* için 0,121; hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (58).

Türkiye'de *B. divergens*'in moleküler prevalansı; PCR ile Samsun yöresinde %3,37 (66); Ankara yöresinde RLB ile %1,1 olarak saptanmıştır (59).

2.4.3.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Ixodes ricinus* yapmaktadır (13, 25, 26). Türkiye'de *I. ricinus* türü bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.3.3. Zoonotik Önemi

İnsanlarda özellikle de splenektomili kişilerde hastalığa sebep olmaktadır (77, 86, 87).

2.4.4. *Babesia major* (Sergent, Donatien, Parroti Lestoquard and Plantureux, 1926)

Büyük *Babesia* türlerindendir. Merozoitler, eritrositlerin merkezinde yer alır. Çift armut şeklindeki formlar 1,5x2,6 µm, yuvarlak formlar ise 1,8 µm çapında olup aralarındaki açı dardır (13, 25, 26, 72).

2.4.4.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Avrupa'da, Kuzey Afrika'da ve Rusya'da görülmektedir.

Babesia major'un Türkiye'nin Marmara bölgesinde varlığı iddia edilmiş (88) fakat bugüne kadar mikroskobik ve serolojik olarak pozitiflik bildirilmemiştir. Ayrıca, son yıllarda RLB ile yapılan araştırmalarda *B. major*'ün moleküler pozitifliği Ankara yöresinde %0,2 olarak saptanmıştır (59).

2.4.4.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus calcaratus, Haemaphysalis punctata* keneleri yapmaktadır (13, 25, 26). Türkiye'de *Hae. punctata* bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.4.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Patojenitesi düşük olup, klinik belirtiler *B. bigemina*'ya benzer.

2.4.5. *Babesia jakimovi*

Bu tür büyük *Babesia* etkenlerinden olup özellikle Sibirya'da sığırlarda görülmekte, bunun yanında karacalarda ve ren geyiklerinde de hastalığa sebep olmaktadır. Transovaryal olarak *Ixodes ricinus* kenesi tarafından nakledilmektedir. Ayrıca mekanik olarak at sinekleri tarafından da nakledildiği bildirilmiştir. Klinik belirtiler *Babesia bigemina*'ya benzemektedir (8).

2.4.6. *Babesia occultans*

Bu tür özellikle Güney Afrika'daki sığırlarda görülmekte olup *B. bigemina*'dan biraz küçük bir türdür. *Hyalomma marginatum rufipes* vektörlüğünü yapmaktadır (2, 19).

2.4.7. *Babesia ovate*

Bu tür de büyük *Babesia* etkenlerinden olup özellikle Japonya'daki sığırlarda tespit edilmiştir. *Babesia bigemina*'ya benzemektedir. Vektörlüğünü *Haemaphysalis longicornis* yapmaktadır (89).

2.5. BABESIOSIS'TE TEŞHİS

Bütün hayvan türlerinde akut babesiosis'te yüksek ateş (40- 41,5°C), anemi, ikterus ve hemoglobunüri 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, hemoglobunüri, sarılık, kaslarda ağrı, titreme, solunum güçlüğü ve sürekli ateşle seyreder (90, 91). Teşhiste; mevsim, kene enfestasyonu, unstabil bölge gibi epidemiyolojik veriler şüpheleri artırabilir. Ancak hastalığın teşhisi perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskobik 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 (77, 92). Bu testler için konusunda uzman kişilere ihtiyaç duyulması, uzun zaman alması, laboratuar 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 (93).

2.5.1. Mikroskobik 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 ^{o}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 (26, 76, 94, 95). Mikroskobik 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 (26, 76, 94, 95).

Mikroskobik 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 (26, 76, 94, 95). 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 mikroskobik 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 (94, 95). Mikroskobik 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 (%)=Enfekte eritrosit sayısı/Enfekte olan+enfekte olmayan eritrosit sayısı x100 formülü ile hesaplanır.

2.5.2. 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 (26, 76, 94, 96). 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 (26, 72, 94, 96).

Babesiosis'in serolojik olarak teşhisinde ilk olarak kullanılan test CFT testidir. Fakat bu testin duyarlılığı düşüktür (97, 98). 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 (99-101). 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 (102-104).

2.5.3. Moleküler Teknikler

Son yıllarda, mikroskobik 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 babesiosisin teşhisinde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır (94, 95, 105, 106).

Elbetteki her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Doğrudan etkeni görmeye yönelik yapılan mikroskobik 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 ayırımlarında karışıklıkların olabilmesi ve deneyimli personel gereksinimi gibi dezavantajları da mevcuttur (94,95,105). 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 (94, 95,105). 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 (94, 95, 105).

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 (107), birden fazla primer çifti kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılmasını sağlayan Multiplex PCR (108, 109), kantitatif olarak parazit DNA'sının miktarını tespit eden ve dolayısıyla varlığını ortaya koyan Real-Time PCR (110), bir testte eş zamanlı olarak çok sayıda hastalık etkeninin tespit edilmesine olanak sağlayan RLB (67, 111, 112), parazitin RNA'sının tespitine yönelik yapılan Reverse Transcriptase PCR (113, 114) 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 (67, 111, 112). Dünya'da da bu gen bölgesi sıklıkla kullanılmakta (64, 105, 115-122), bunun yanında özellikle sığır babesiosis'i üzerine yapılan aşı çalışmalarında VMSA genleri (*msa-1, msa-2a$_1$, msa-2a$_2$, msa-2b, msa-2c*) ve *rap-1* geninin amplifikasyonu yapılmakta ve bu gen bölgelerini içeren suşların sekans dizilimleri ortaya konmaktadır (123-142).

Real-time PCR, PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı

yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çesitli adlarla da isimlendirilmektedir (143).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA’nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA’nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını, patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, SNP (single nucleotide polymorphisms) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (144).

Spesifik olmayan çift zincirli DNA’nın çoğaltımında SYBR Green I ve Etidyum Bromid yöntemi, DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan isaretli problar kullanılır. Bu tekniklerin başında TaqMan prob, molecular beacon, FRET (fluorescence resonance energy transfer), hibridizasyon prob ve Scorpion primer gibi floresan işaretli problar kullanılarak yapılanlardır **(**144). Son yıllarda Real Time PCR tekniğinin sığırlarda babesiosis’in araştırılmasında da kullanılmaya başlandığı görülmektedir (92, 144, 145).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali (Sığırlar) ve Kan Örnekleri

Çalışmanın materyalini, 2011-2012 yılları arasında Erzurum'un farklı ilçelerindeki işletmelerde bulunan ve meraya çıkan toplam 300 sığır oluşturmuştur. Sığırların vena jugularis'inden EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) tüplere yaklaşık 1ml kan örneği alınmış ve örneklemesi yapılan hayvana ait bilgiler (yaş, cinsiyet, ırk) ve örnekleme tarihi protokol numarası ile birlikte kayıt altına alınmıştır. Örneklemeye alınan hayvanların örnekleme merkezi, yaş, cinsiyet ve ırka göre dağılımları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. 2011-2012 yılları arasında Erzurum yöresinde örneklenen sığırların toplama merkezi, yaş, ırk ve cinsiyete göre dağılımları

Araştırma Merkezi	**Sığır Sayısı**									
	Yaş (ay)			**Irk**				**Cinsiyet**		**Toplam**
	≤2	3-5	≥6	Simental	Holstein	Montofon	Melez	Erkek	Dişi	
Palandöken	50	30	20	4	-	61	35	17	83	**100**
Aziziye	55	30	16	1	6	69	25	28	73	**101**
Yakutiye	36	54	9	1	-	47	51	10	89	**99**
Toplam	**141**	**114**	**45**	**6**	**6**	**177**	**111**	**55**	**245**	**300**

3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Sığır kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Analize tabi tutulana kadar -20^{o}C'de muhafaza edilen EDTA'lı kan örnekleri ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazında (Bioneer Exiprep^{TM} 16) yapılmıştır. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmış ve elde edilen DNA miktarları Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılana dek -20 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Real Time-PCR

Kan örneklerinde *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin Real Time PCR ile araştırılmasında sırası ile Sybergreen ve TaqMan prob bazlı QPCR kullanılmıştır. Sybergreen tabanlı QPCR'da FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak *B. bovis'*in Msa2c gen bölgesinden 97-bp bölgeyi amplifiye eden *Msa2c* 2F, *Msa2c* 2R primerleri ile örneklerin Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (145). Pozitif kontrol olarak anabilim dalındaki referans *B. bovis* izolatı, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır. PCR master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 25 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

FastStart Universal SYBR Green Master Mix	12,5 µl
Msa2c 2F (10 pmol)	1,0 µl
Msa2c 2R (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	9,5 µl

Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. *B. bovis* için kullanılan termal profil aşağıda gösterilmiştir (145).

1. 50ºC 2dk } 1 siklus [uracil N-deglycosylase digest]

2. 95 ºC 2dk } 1 siklus
3. 95 ºC 30s
4. 60 ºC 15s } 40 siklus
5. 95 ºC 15s
6. 60 ºC 1dk
7. 95 ºC 15s } 1 siklus [Melting Curve Analizi]

TaqMan prob bazlı QPCR'da Brilliant II QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) kullanılarak *B. bigemina*'nın Rap-1 gen bölgesinden 95-bp bölgeyi amlifiye eden *Rap1* F ve *Rap1* R primerleri ve aynı gen bölgesinden dizayn edilen *Rap1* P probu ile örneklerin Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak anabilim dalındaki referans *B. bigemina* izolatı, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır. PCR master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 25 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Brilliant II QPCR Master Mix	12,5 µl
Rap1 F (10 pmol)	1,0 µl
Rap1 R (10 pmol)	1,0 µl
Rap1 P (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	8,5 µl

B. bigemina için kullanılan termal profil aşağıda gösterilmiştir (109).

1. 50 ºC 2dk } 1 siklus [uracil N-deglycosylase digest]
2. 95 ºC 10dk } 1 siklus
3. 95 ºC 20s
4. 55 ºC 1dk } 45 siklus

Real Time PCR analizinde kullanılan Primer, Prob dizileri ile reporter ve quencher boyalar Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Real Time PCR'da Kullanılan Primer ve Problar

	Primer/Prob		**Dizilimi (5'---3')**	**Referans**
B. bigemina	Primer	Rap1 F	TCAGCGACTACGTCCATTTG	147
		Rap1 R	AATCAACTTGGCAGGGTCAG	147
	Prob	Rap1 P	HEX-CCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAA-BHQ1	147
B.bovis	Primer	Msa2c 2F	GGACAAATTAAGCAACCTATACAAA	145
		Msa2c 2R	AGCTTTCCTTGTTTCGAATTTTATAA	145

3.2.3. *B. bovis* Msa2c geninin amplifikasyonu

Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif belirlenen tüm örnekler Msa2c genini (complete 798 bp) amplifiye eden msa-2cF (5'-ATGGTGTCTTTTAACATAATA-3') ve msa-2cR (5'-AAATGCAGAGAGAACGA AGTAGCAGAGAGT-3') spesifik primerleriyle PCR analizine tabii tutulmuştur (148). Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 1,5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 ℃'de 30 s; 35 siklus, denaturation: 95 ℃'de 30 s, annealing: 60 ℃'de 1dk, extension: 72℃'de 1 dk; final extension: 72 ℃'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR analizinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuarında mevcut olan çeşitli *B. bovis* izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.4. *B. bigemina* RAP-1a geninin amplifikasyonu

Real Time PCR analizleri sonucu *B. bigemina* pozitif belirlenen tüm örnekler RAP-1a geninin yaklaşık 412 bp parsiyel kısmını amplifiye eden spesifik primerlerle Nested-PCR analizine tabii tutulmuştur. Nested PCR analizinin ilk PCR basamağında (5'-GAGTCTGCCAAATCCTTAC-3') forward ve (5'- TCCTCTACAGCTGCTTCG-3')

reverse primerleri (149), ikinci PCR basamağında ise [5'-AGCTTGCTTTCACAACTCGCC-3'] forward ve [5'- TTGGTGCTTTGACCGACG ACAT-3'] reverse primerleri kullanılmıştır (150). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 3mM $MgCl_2$, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 50 ng/µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR için de initial denaturation: 94 ℃'de 5 dk; 35 siklus, denaturation: 94℃'de 1dk, annealing: (55℃'de 1 dk 1. PCR; 58℃'de 1 dk nPCR), extension: 72℃'de 1 dk; final extension: 72 ℃'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (149, 151). Nested PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuarında mevcut olan çeşitli *B. bigemina* izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.5. *B. bovis* Msa2c ve *B. bigemina* Rap-1a Genlerinin Sekansı ve Filogenetik Analizi

PCR analizleri sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen *B. bovis* için 4, *B. bigemina* için 3 izolata ait amplikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler ilgili gen bölgelerinin analizi için amplifikasyonda kullanılan primerlerle (Rap-1a için nested primeri) Genoks (Çankaya, Ankara, Türkiye) firmasına çift yönlü olarak sekanslatılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (152) ve Geneious 5.5.5 (153) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (154) ve Geneious 5.5.5 (153) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler

karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistik açıdan incelenen sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina* prevalansı ile yaş, cinsiyet ve ırk faktörlerinin ilişkisi, Fisher's Exact ve Pearson's Chi Square testleriyle araştırılmıştır. Pozitif örneklerde DNA yoğunluğunu dolayısıyla parazitemiyi gösteren eşik değer sikluslarıyla (Ct(dR)) yaş ve cinsiyet faktörlerinin ilişkisi Independent Samples T testi, ırk faktörünün ilişkisi ise One-Way Anova testiyle araştırılmıştır. İstatistik hesaplamaları SPSS 15.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

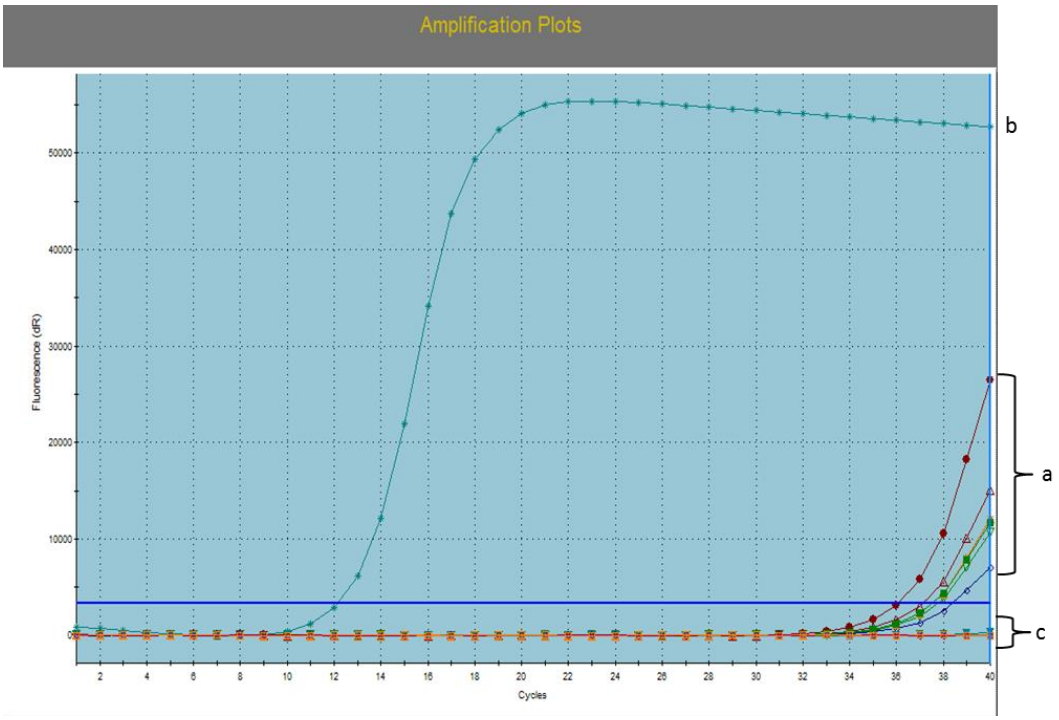
4.1. Real Time-PCR Sonuçları ve Babesiosis Prevalansı

Real Time PCR ile incelemesi yapılan toplam 300 sığırdan 17'si (%5,7) *B. bigemina,* 28'i (%9,3) de *B. bovis* ile enfekte bulunmuştur. İncelenen örneklerde miks enfeksiyona rastlanılmamıştır. Araştırma yöresinde sığır babesiosis'inin prevalansı %15,0 belirlenmiştir. Pozitif belirlenen örneklerin araştırma merkezlerine göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir. Palandöken'den örneklenen 100 sığırdan 2'sinde *B. bovis,* 6'sında *B. bigemina,* Aziziye'de 101 sığırdan 13'ünde *B. bovis,* 8'inde *B. bigemina* ve Yakutiye'den örneklenen 99 sığırdan 13'ünde *B. bovis,* 3'ünde de *B. bigemina* pozitifliği belirlenmiştir. Sybergreen tabanlı QPCR'da FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak *B. bovis'*in Msa2c gen bölgesinden 97-bp bölgeyi amlifiye eden *Msa2c* 2F, *Msa2c* 2R primerleri ile Real Time PCR analizleri sonucu pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon ve melting eğrileri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Pozitif örneklerde ortalama çözünme sıcaklığı (Tm) 78,1 ºC (±0,2 ºC) belirlenmiştir.

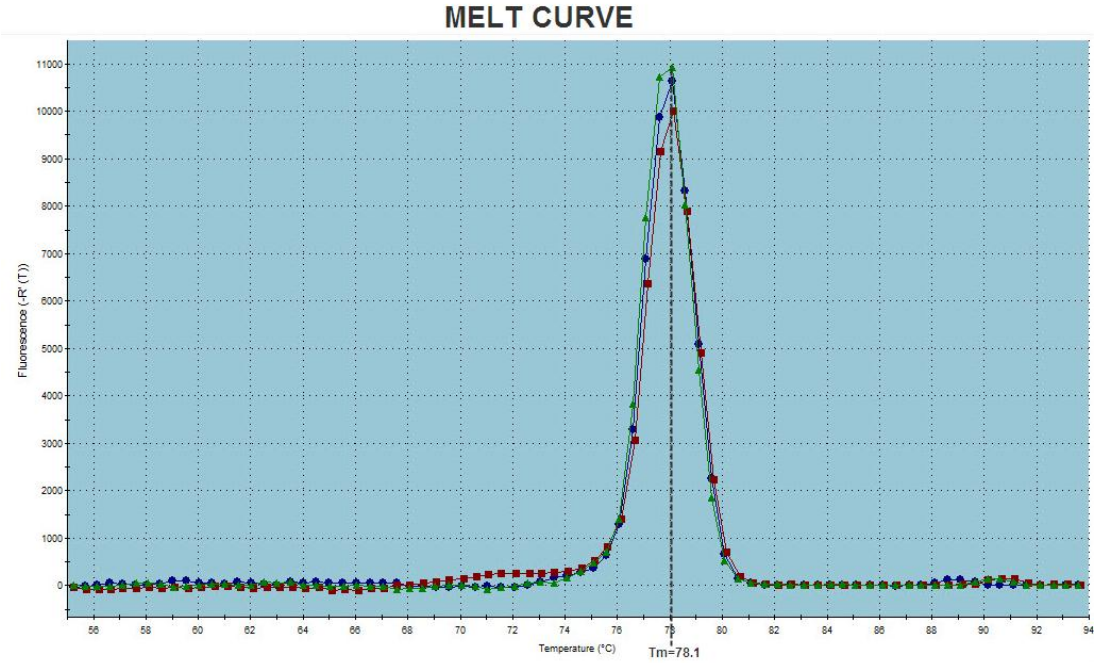
TaqMan prob tabanlı QPCR'da Brilliant II QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) kullanılarak *B. bigemina*'nın Rap-1 gen bölgesinden 95-bp bölgeyi amlifiye eden *Rap1* F ve *Rap1* R primerleri ve aynı gen bölgesinden dizayn edilen *Rap1* P probu ile pozitif belirlenen bazı örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Real Time PCR incelemesi yapılan sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın yaygınlığı

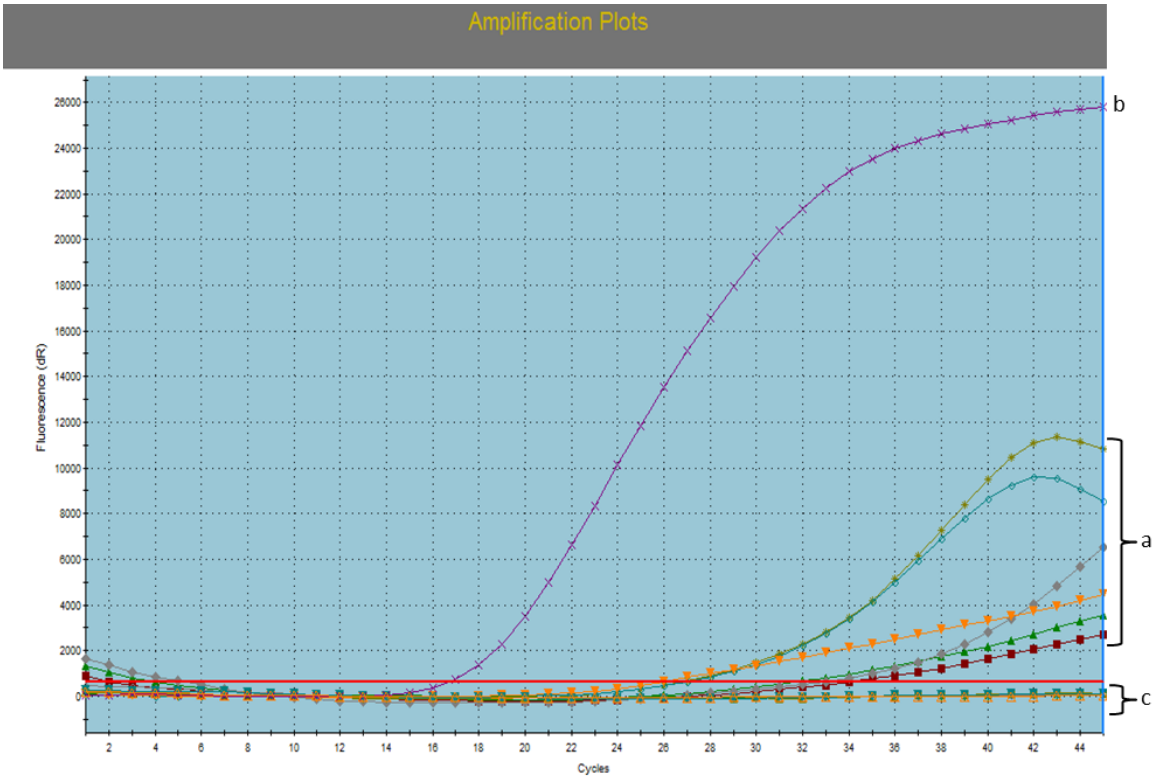
Araştırma Merkezi	**İncelenen Örnek Sayısı**	***B. bovis***		***B. bigemina***		**Toplam Prevalans**	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Palandöken	100	2	2,0	6	6,0	8	8,0
Aziziye	101	13	12,9	8	7,9	21	20,8
Yakutiye	99	13	13,1	3	3,1	16	16,2
Toplam	300	28	9,3	17	5,7	45	15,0



Şekil 4.1. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri. a: *B. bovis* pozitif örnekler; b: *B. bovis* pozitif kontrol; c: No DNA ve negatif örnekler

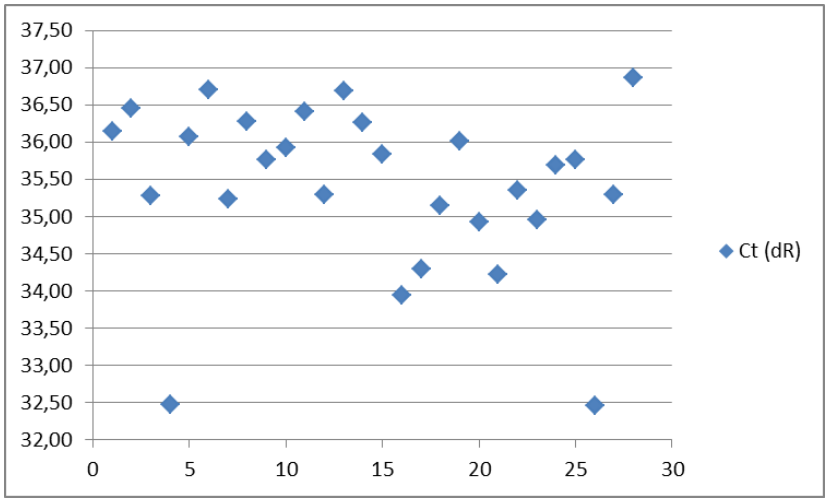


Şekil 4.2. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif örneklerin erime eğrileri (melting curve); Tm=78,1

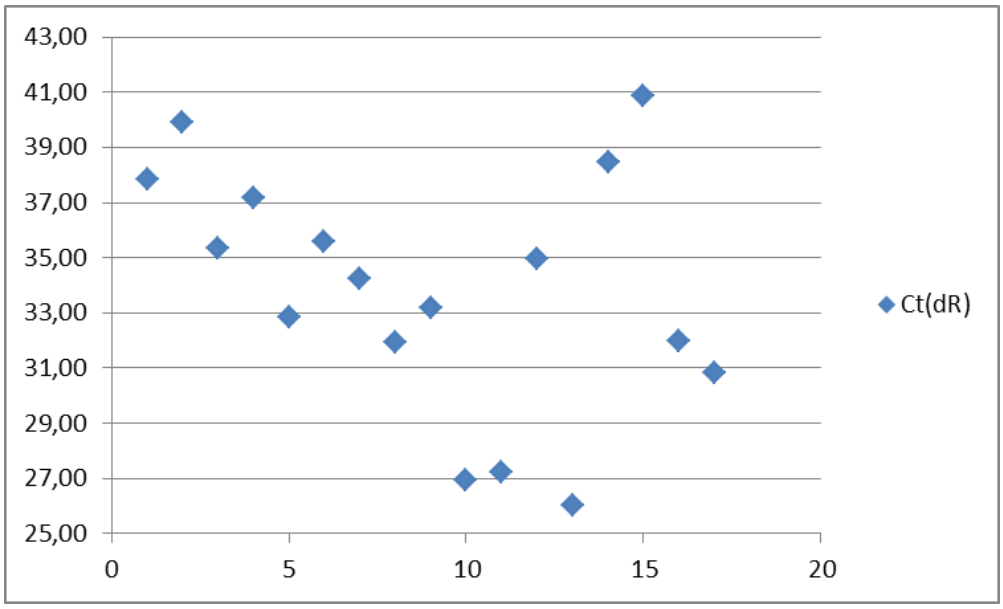


Şekil 4.3. TaqMan Prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri. a: *B. bigemina* pozitif örnekler; b: *B. bigemina* pozitif kontrol; c: No DNA ve negatif örnekler

Saptanan Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerleri *B. bovis* için Şekil 4.4, *B. bigemina* için de Şekil 4.5'de gösterilmiştir. *B. bovis* pozitif örneklerde ortalama Ct (dR) değeri 35,42±0,21 (min: 32,46; max: 36,87), *B. bigemina* pozitif örneklerde ise 33,84±1,07 (min: 26,00; max: 40,85) olarak belirlenmiştir. İki tür arasında parazitemi düzeyleri açısından istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir (p>0,05).



Şekil 4.4. Real Time PCR'da *B. bovis* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



Şekil 4.5. Real Time PCR'da *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı

4.2. Babesiosis'in Moleküler Prevalansında Bazı Epidemiyolojik Faktörlerin Analizi

B. bovis ve *B. bigemina* yönünden pozitif belirlenen örneklerin parazit türü temel alınarak sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımları ve istatistiksel verileri Tablo 4.2'de verilmiştir. Tablo 4.2'de görüldüğü üzere sığırların yaş gruplarına göre *B. bovis* prevalansının en yüksek ≤2 yaş grubunda, *B. bigemina* prevalansının ise en yüksek ≥6 yaş grubunda belirlenmesine karşın her iki türe bağlı enfeksiyonlarda yaşa bağlı istatistiksel bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Her iki tür için de enfeksiyon prevalansı erkeklerde daha yüksek tespit edilmesine karşın bu farklılık *B. bigemina*'da istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunurken *B. bovis* için önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. Irka bağlı istatistiksel analizlerde Simental ve Holstein ırkı sığırlarda örnek sayısının azlığı ve pozitiflik bulunmaması sebebiyle istatistiksel analizlerde değerlendirmeye alınmamıştır. Enfeksiyon oranı her iki tür için de melez ırkta Montofon ırkına oranla daha yüksek belirlenmiş ancak iki ırk arasındaki istatistiksel farklılık her iki tür için de önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Toplam 300 sığırda *B. bovis* prevalansı *B. bigemina*'ya oranla daha yüksek belirlenmesine karşın (Tablo 4.2) iki türün prevalansları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 4.2. Sığırlarda babesiosis prevalansının *Babesia* türlerine göre yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Tür	Enfektif sığır		χ^2	P
			Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)						
≤2	141	*B. bovis*[a]	14	9,9	0,112[a]	0,945[a]
		B.bigemina[b]	8	5,7		
3-5	114	*B. bovis*[a]	10	8,8		
		B.bigemina[b]	6	5,3	0,119[b]	0,942[b]
≥6	45	*B. bovis*[a]	4	8,9		
		B.bigemina[b]	3	6,7		
Cinsiyet						
Erkek	55	*B. bovis*[a]	8	14,5	2,162[a]	0,195[a*]
		B.bigemina[b]	8	14,5		
Dişi	245	*B. bovis*[a]	20	8,2	9,932[b]	0,005[b*]
		B.bigemina[b]	9	3,7		
Irk						
Simental	6	*B. bovis*	0[**]	0	2,958[a]	0,103[a*]
		B.bigemina	0[**]	0		
Holstein	6	*B. bovis*	0[**]	0		
		B.bigemina	0[**]	0		
Montofon	177	*B. bovis*[a]	13	7,3	1,581[b]	0,304[b*]
		B.bigemina[b]	8	4,5		
Melez	111	*B. bovis*[a]	15	13,5		
		B.bigemina[b]	9	8,1		
Toplam	300	*B. bovis*[a]	28	9,3	2,907	0,120[*]
		B.bigemina[b]	17	5,7		

χ^2: Pearson Chi-Square, Fisher
[*]: Fisher's Exact Test
[a,b]: Grupların *Babesia* türüne göre istatistiksel verileri
[**]: Örnek sayısının azlığı ve pozitiflik bulunmaması sebebi ile analiz dışı tutulmuştur

B. bovis ve *B. bigemina* pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı sırasıyla Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir. *B. bovis* pozitif örneklerde Ct (dR) değerlerine göre yaş gruplarına bağlı parazitemi düzeylerinde bir farklılık görülmezken ($p>0,05$), *B. bigemina* pozitif örneklerde ≤2 yaş grubunda paraziteminin diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Sığırların cinsiyetine göre *B. bigemina* pozitif örneklerde parazitemi, dişilerde erkeklere oranla daha yüksek ve önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. *B. bovis* pozitif örneklerde ise cinsiyete bağlı parazitemi düzeylerinde istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Irka bağlı olarak *B. bovis* pozitif örneklerde parazitemi, melez ırkta daha yüksek ve önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. *B. bigemina* pozitif örneklerde ise ırka bağlı parazitemi düzeylerinde istatistiksel bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.3. *B. bovis* pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerelerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı

Faktör	Ct (dR)			F	P
	Ort	Min-Max	Standart Hata		
Yaş grupları (yıl)					
≤2	35,71	33,94-36,70	0,23	1,500	0,243
3-5	35,00	32,46-36,87	0,39		
≥6	35,84	35,76-35,92	0,08		
Cinsiyet				t	P
Erkek	35,84	33,94-36,69	0,36	1,272	0,227
Dişi	35,28	32,46-36,87	0,25		
Irk				t	P
Melez	34,99[a]	32,46-36,41	0,31	-2,743	0,012
Montofon	35,97[b]	35,24-36,87	0,17		

t: Independent Samples T Test
F: One-Way Anova
[a,b]: aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir

Tablo 4.4. *B. bigemina* pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerelerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı

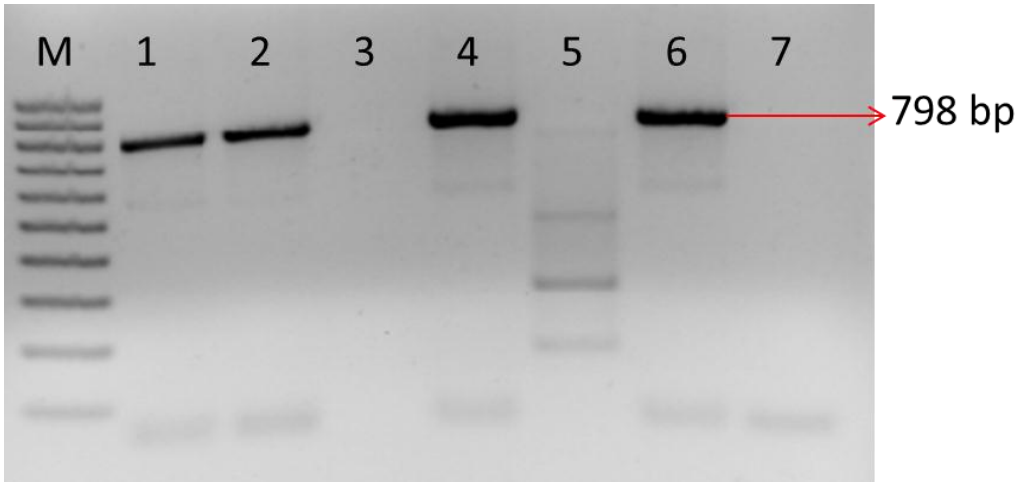
Faktör	Ct (dR)			F	P
	Ort	Min-Max	Standart Hata		
Yaş grupları (yıl)					
≤2	30,11[a]	26,00-33,19	1,03	17,395	0,000
3-5	36,30[b]	34,26-39,90	0,86		
≥6	38,82[b]	37,16-40,85	1,08		
Cinsiyet				t	P
Erkek	31,25[a]	26,00-35,56	1,38	-2,619	0,018
Dişi	36,13[b]	30,81-40,85	1,19		
Irk				t	P
Melez	33,83	26,00-40,85	1,56	0,002	0,998
Montofon	33,83	30,81-38,46	1,16		

t: Independent Samples T Test
F: One-Way Anova
[a,b]: aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir

4.3. Sekans ve Filogenetik Analizler

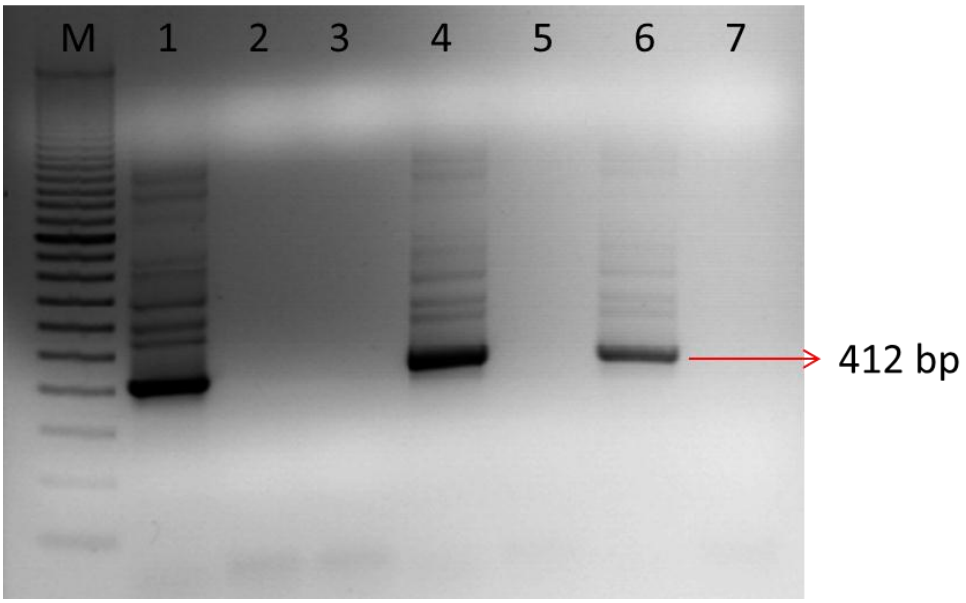
4.3.1. Msa2c ve RAP-1a genlerinin amplifikasyon sonuçları

Sybergreen tabanlı Real Time PCR analizlerinde *B. bovis* pozitif belirlenen örneklerin Msa2c gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile PCR analizleri sonucunda 4 örneğin agaroz jel üzerinde 798 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bazı pozitif izolatlarda Msa2c gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. *B. bovis* Msa2c gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1,2,4: Pozitif örnekler; 3,5: Negatif örnekler; 6: *B. bovis* pozitif kontrol; 7: No DNA

TaqMan prob tabanlı Real Time PCR analizlerinde *B. bigemina* pozitif belirlenen örneklerin Rap-1a gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile Nested PCR analizleri sonucunda 3 örneğin agaroz jel üzerinde 412 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bazı pozitif izolatlarda Rap-1a gen bölgesinin Nested PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.7'de verilmiştir. PCR analizleri sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen *B. bovis* ve *B. bigemina* izolatlarına ait amplikonlar, jel pürifiye edildikten sonra sekans analizlerine tabii tutulmuştur.



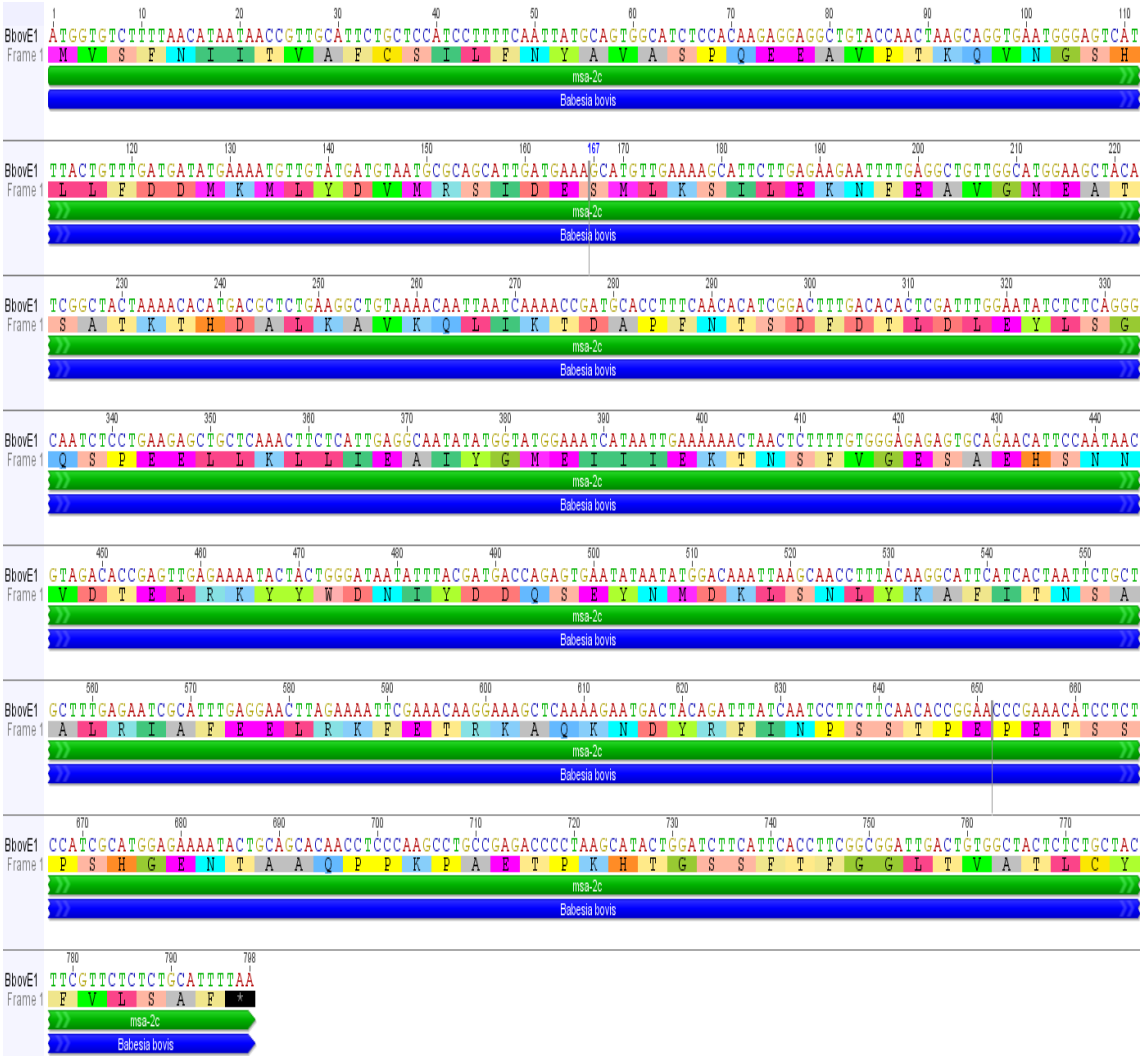
Şekil 4.7. *B. bigemina* Rap-1a gen bölgesini amplifiye eden primerler ile Nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1,4: Pozitif örnekler; 2,3,5: Negatif örnekler; 6: *B. bigemina* pozitif kontrol; 7: No DNA

4.3.2. *B. bovis* Msa2c Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi

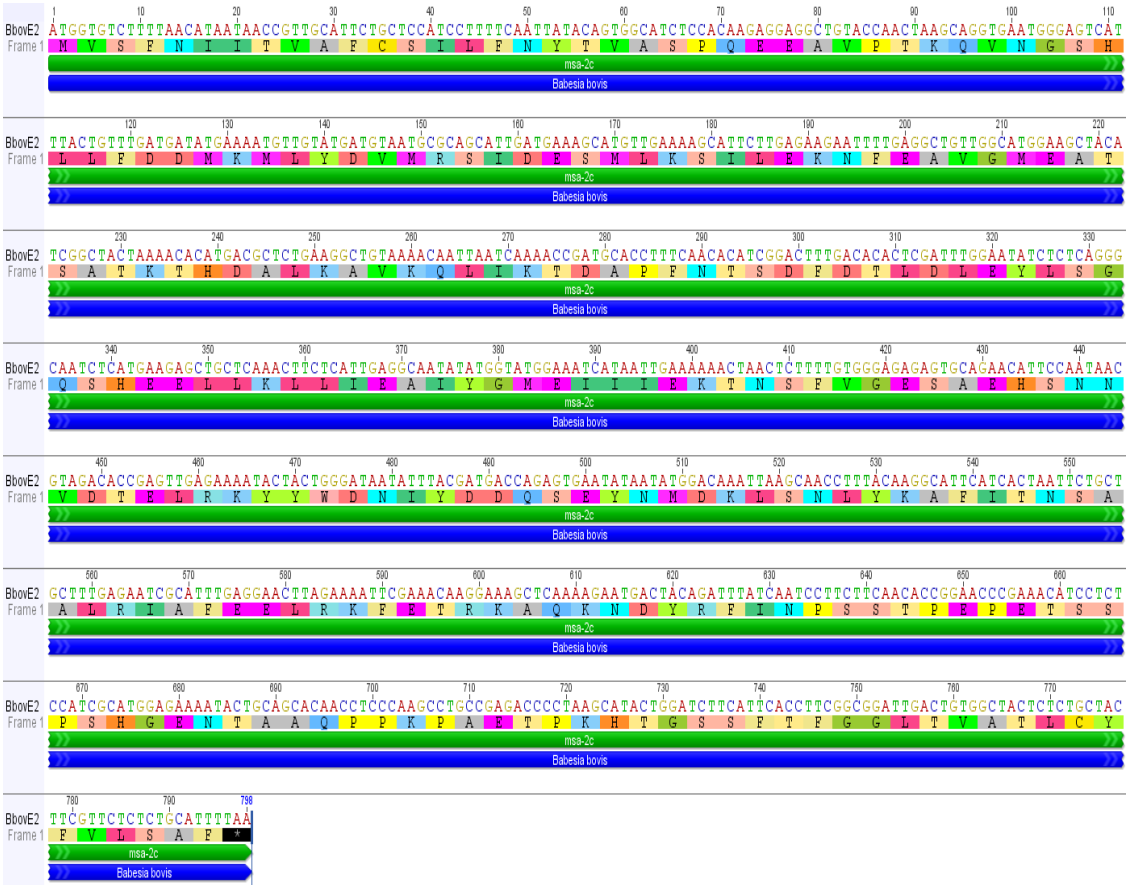
B. bovis Msa2c geni yönünden izolatlara ait DNA dizilerinin, konak, izolasyon kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.5'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.8-4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Erzurum yöresinde sığırlarda belirlenen *B. bovis* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları

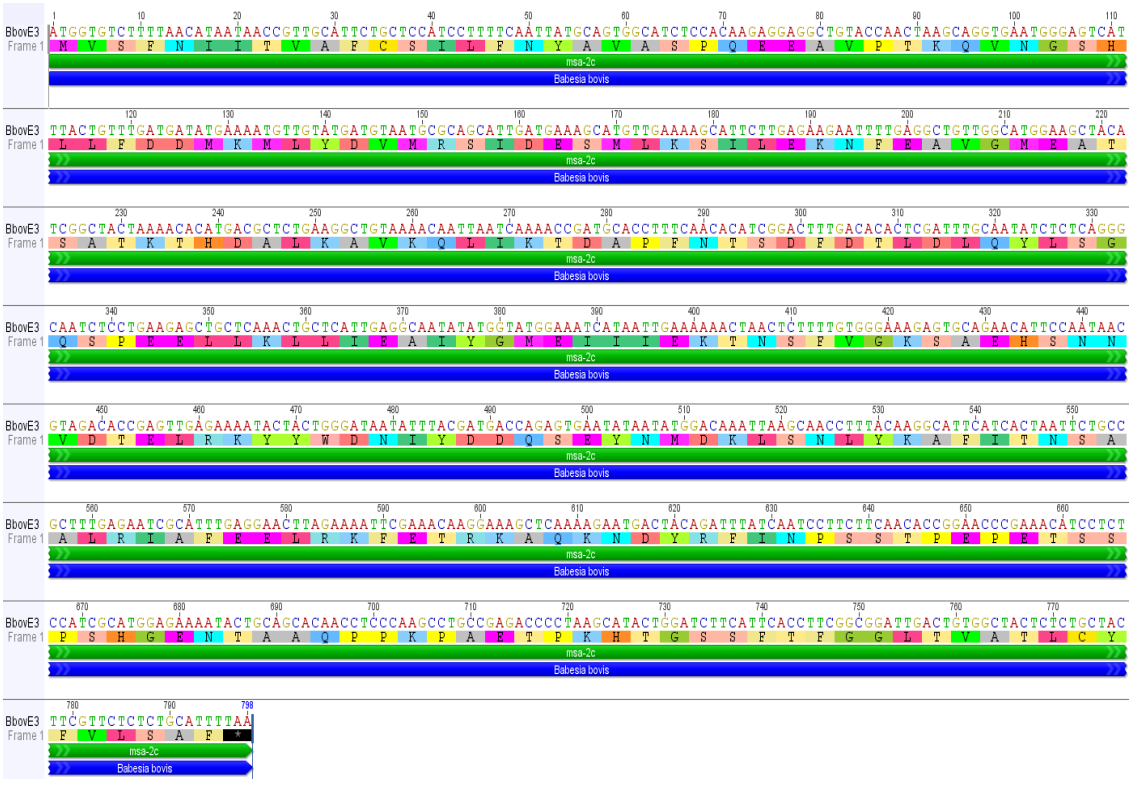
İzolat	***Gen bölgesi***	**Konak ve izolasyon kaynağı**	**Aksesyon Numarası**
BbovE1	*Msa2c*	Sığır/ tam kan	KC515389
BbovE2	*Msa2c*	Sığır/ tam kan	KC515390
BbovE3	*Msa2c*	Sığır/ tam kan	KC515391
BbovE4	*Msa2c*	Sığır/ tam kan	KC515392



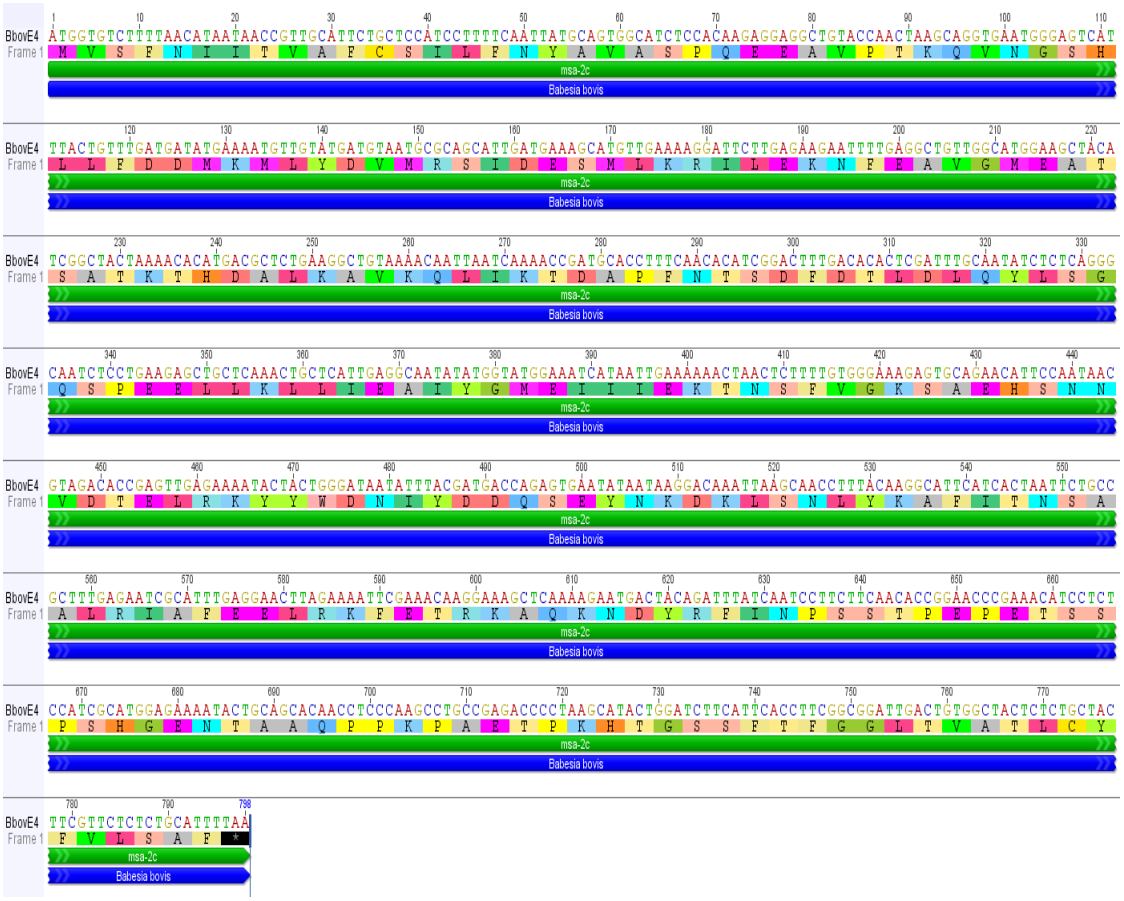
Şekil 4.8. *B. bovis* BbovE1 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515389)



Şekil 4.9. *B. bovis* BbovE2 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515390)



Şekil 4.10. *B. bovis* BbovE3 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515391)



Şekil 4.11. *B. bovis* BbovE4 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515392)

Erzurum yöresinde sığırlardan elde edilen *B. bovis* izolatlarıyla msa-2c gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Türkiye ve Dünya'daki diğer *B. bovis* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Türkiye ve dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *B. bovis* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	**Orijin**	**İzolasyon kaynağı**	**Gen Bölgesi**	**Aksesyon Numarası**
BI-6	Moğolistan	Sığır	*Msa2c*	AB612252
BI-46	Moğolistan	Sığır	*Msa2c*	AB612256
R1A	Arjantin	Sığır	*Msa2c*	AY052542
S2P	Arjantin	Sığır	*Msa2c*	FJ422796
F28	ABD	Sığır	*Msa2c*	DQ173962
F40	ABD	Sığır	*Msa2c*	DQ173965
G51	ABD	Sığır	*Msa2c*	DQ173968
L	ABD	Sığır	*Msa2c*	DQ173971
T2Bo	ABD	Sığır	*Msa2c*	DQ173974
RAD	Meksika	Sığır	*Msa2c*	EF640955
Mexico	Meksika	Sığır	*Msa2c*	EF640956
Chiapas 1	Meksika	Sığır	*Msa2c*	EF640957
Veracruz 2	Meksika	Sığır	*Msa2c*	EF640963
Xinjiang	Çin	Sığır	*Msa2c*	EU328267
Brazilian/CO	Brezilya	Sığır	*Msa2c*	HM352731
Brazilian/NE	Brezilya	Sığır	*Msa2c*	HM352732
Brazilian/NO	Brezilya	Sığır	*Msa2c*	HM352733
Amasya	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU647150
Bartin	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU647149
Bolu	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU357634
Giresun	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU647154
Karabuk (4107)	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU004533
Karabuk-2	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU647147
Kastamonu	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU647148
Samsun-1	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU647152
Samsun-2	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU647153
Trabzon	Türkiye	Sığır	*Msa2c*	GU647151

Erzurum yöresinde sığırlarda pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan *B. bovis* izolatları ile Türkiye ve Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmenta dahil edilen diğer izolatların msa-2c gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.7'de, pairwise alignmentları ise Şekil 4.12'de verilmiştir.

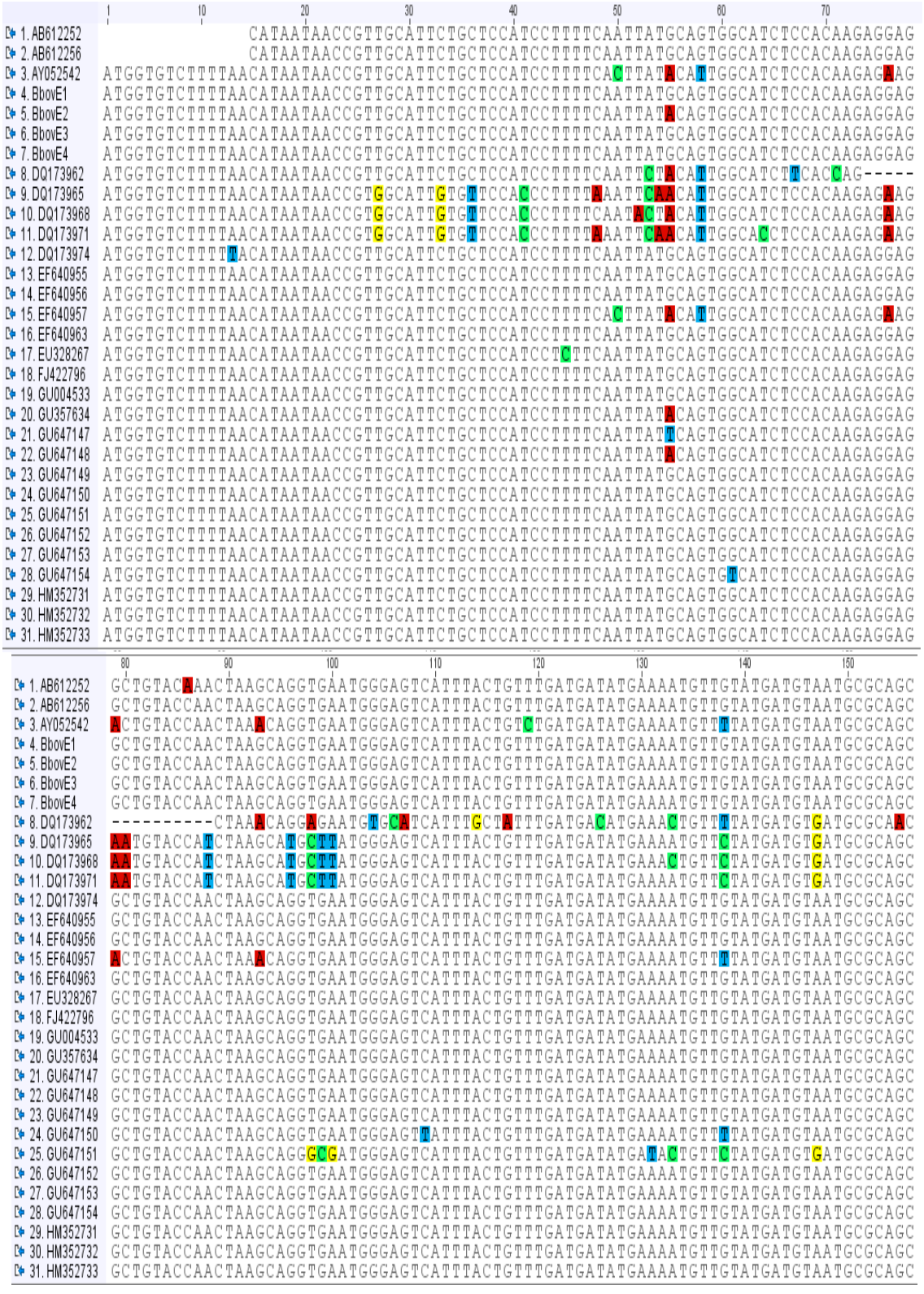
Tablo 4.7. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ile Türkiye ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

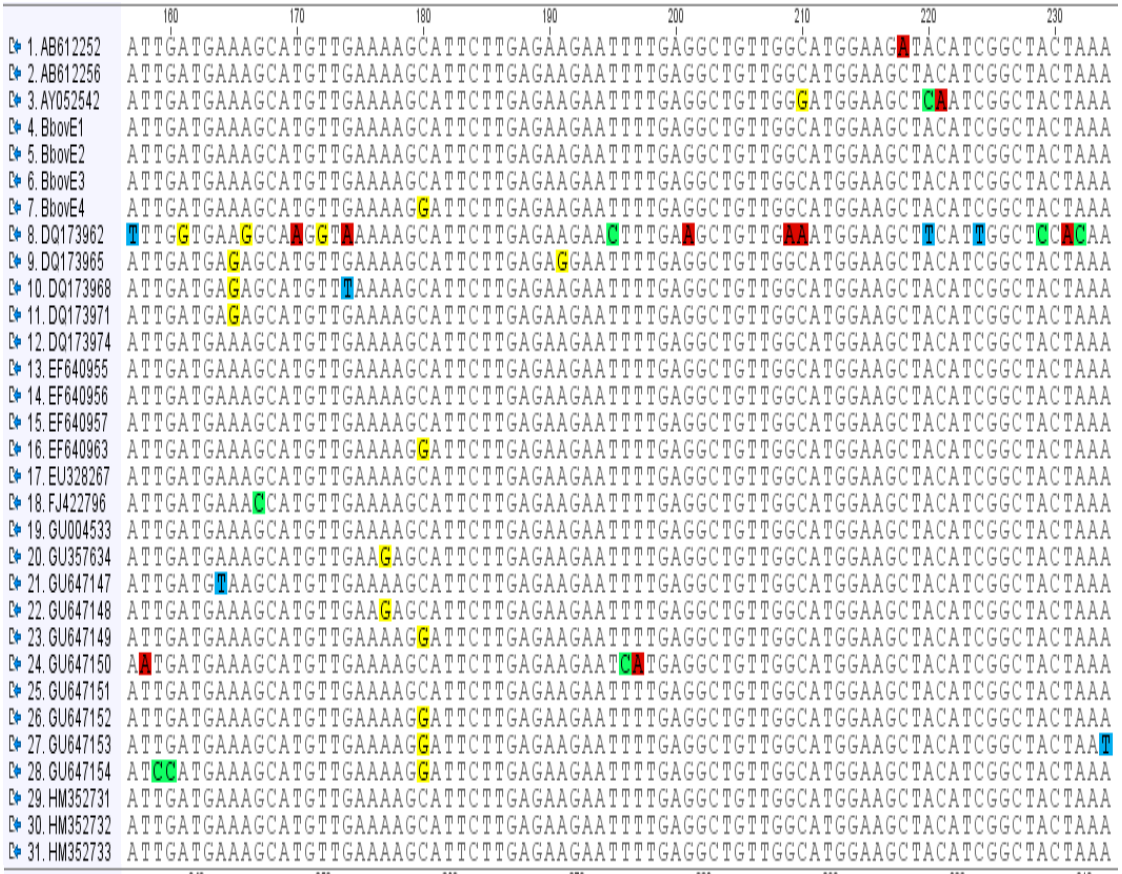
İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
BbovE1	27,3	21,2	32,1	19,4	59,4	40,6	798,0
BbovE2	27,3	21,1	32,3	19,3	59,6	40,4	798,0
BbovE3	27,1	21,4	32,2	19,3	59,3	40,7	798,0
BbovE4	26,9	21,3	32,3	19,4	59,3	40,7	798,0
BI-6	26,6	21,0	32,0	20,3	58,7	41,3	777,0
BI-46	26,5	21,2	31,9	20,3	58,4	41,6	777,0
R1A	27,3	21,2	32,1	19,4	59,4	40,6	798,0
S2P	26,5	21,9	32,1	19,5	58,6	41,4	795,0
F28	28,9	19,7	31,4	20,1	60,2	39,8	762,0
F40	27,9	20,7	31,7	19,7	59,6	40,4	798,0
G51	28,6	20,8	31,3	19,3	59,9	40,1	798,0
L	27,9	20,8	31,8	19,4	59,8	40,2	798,0
T2Bo	27,3	20,9	31,7	20,1	59,0	41,0	798,0
RAD	27,3	20,8	31,8	20,1	59,1	40,9	798,0
Mexico	27,3	20,8	31,7	20,2	59,0	41,0	798,0
Chiapas 1	27,2	21,3	32,3	19,2	59,5	40,5	798,0
Veracruz 2	26,8	21,2	32,5	19,5	59,3	40,7	798,0
Xinjiang	27,2	20,9	31,8	20,1	59,0	41,0	798,0
Brazilian/CO	27,1	20,9	31,9	20,1	59,0	41,0	796,0
Brazilian/NE	27,0	21,0	31,9	20,1	58,9	41,1	796,0
Brazilian/NO	27,1	20,9	31,9	20,1	59,0	41,0	796,0
Amasya	26,7	21,3	32,2	19,8	58,9	41,1	798,0
Bartin	27,4	21,2	32,0	19,4	59,4	40,6	798,0
Bolu	27,6	21,2	32,3	18,9	59,9	40,1	798,0
Giresun	26,9	21,7	32,2	19,2	59,1	40,9	798,0
Karabuk (4107)	26,9	21,6	32,0	19,5	58,9	41,1	798,0
Karabuk-2	27,7	21,1	31,8	19,4	59,5	40,5	798,0
Kastamonu	27,9	20,9	31,8	19,3	59,8	40,2	798,0
Samsun-1	26,8	21,4	32,0	19,8	58,8	41,2	798,0
Samsun-2	27,3	21,2	31,6	19,9	58,9	41,1	798,0
Trabzon	26,3	21,6	32,0	20,2	58,3	41,7	798,0
Ortalama	27,3	21,1	32,0	19,7	59,2	40,8	795,2

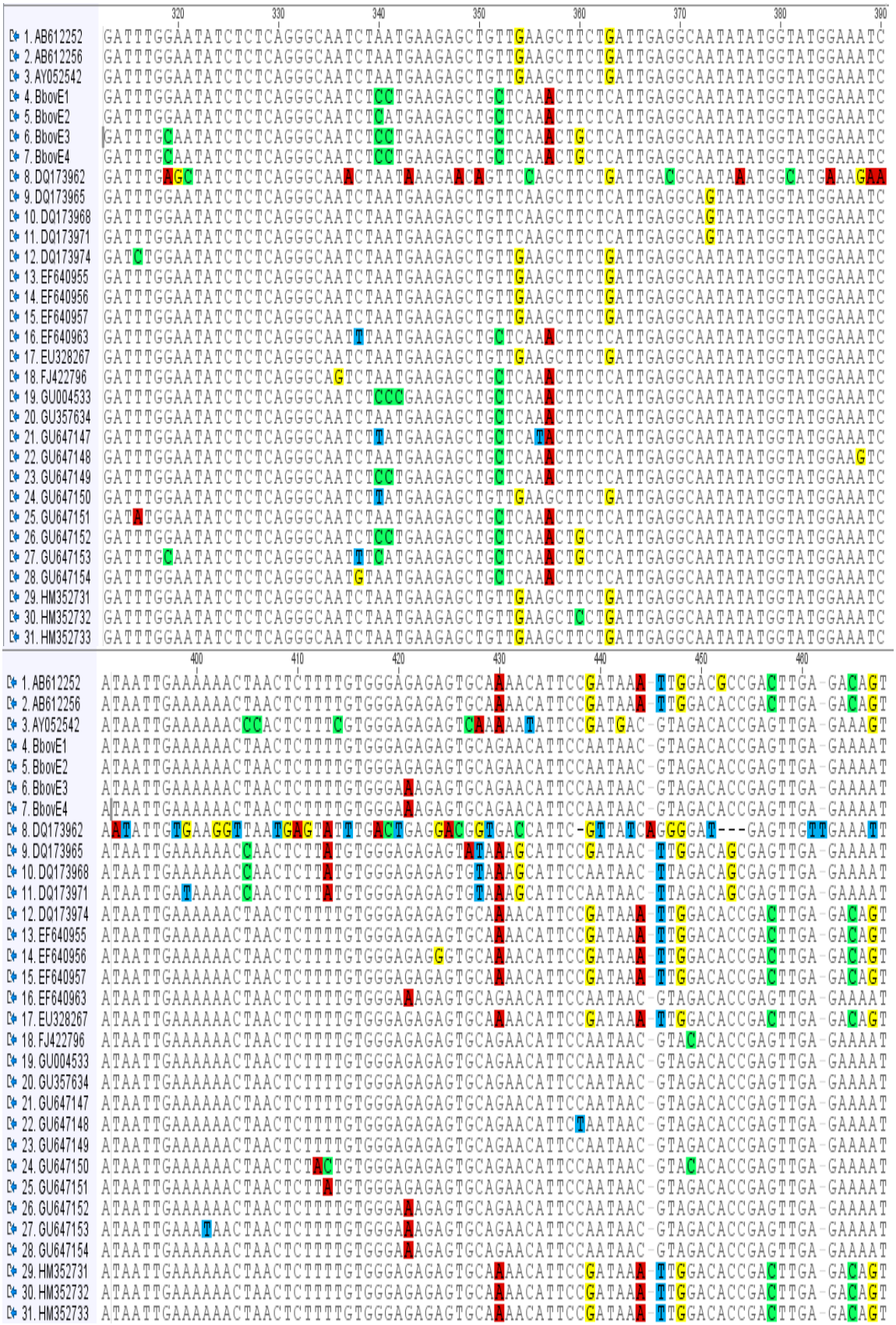
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	BbovE1																														
2	BbovE2	0,003																													
3	BbovE3	0,005	0,008																												
4	BbovE4	0,008	0,010	0,003																											
5	AB612252	0,052	0,052	0,055	0,055																										
6	AB612256	0,051	0,051	0,053	0,053	0,006																									
7	AY052542	0,064	0,061	0,067	0,067	0,051	0,049																								
8	DQ173962	0,387	0,382	0,391	0,391	0,402	0,404	0,400																							
9	DQ173965	0,095	0,092	0,101	0,101	0,093	0,092	0,098	0,397																						
10	DQ173968	0,098	0,095	0,104	0,104	0,096	0,095	0,098	0,398	0,026																					
11	DQ173971	0,092	0,089	0,098	0,098	0,096	0,095	0,099	0,397	0,008	0,023																				
12	DQ173974	0,049	0,049	0,052	0,052	0,005	0,004	0,049	0,392	0,089	0,092	0,092																			
13	EF640955	0,047	0,047	0,049	0,049	0,004	0,003	0,047	0,387	0,086	0,089	0,089	0,003																		
14	EF640956	0,048	0,048	0,051	0,051	0,005	0,004	0,048	0,385	0,088	0,091	0,091	0,004	0,001																	
15	EF640957	0,039	0,036	0,041	0,041	0,034	0,033	0,045	0,367	0,089	0,095	0,092	0,032	0,029	0,031																
16	EF640963	0,014	0,014	0,014	0,011	0,045	0,044	0,060	0,387	0,095	0,097	0,092	0,043	0,040	0,041	0,032															
17	EU328267	0,048	0,048	0,051	0,051	0,005	0,004	0,048	0,389	0,088	0,091	0,091	0,004	0,001	0,003	0,031	0,041														
18	FJ422796	0,018	0,018	0,020	0,020	0,047	0,045	0,060	0,385	0,097	0,095	0,094	0,044	0,041	0,043	0,030	0,011	0,043													
19	GU004533	0,005	0,008	0,010	0,013	0,049	0,048	0,061	0,387	0,094	0,095	0,091	0,047	0,044	0,045	0,036	0,011	0,045	0,015												
20	GU357634	0,023	0,020	0,026	0,026	0,055	0,054	0,064	0,390	0,102	0,102	0,099	0,052	0,049	0,051	0,039	0,019	0,051	0,022	0,020											
21	GU647147	0,015	0,014	0,020	0,023	0,053	0,052	0,066	0,391	0,099	0,099	0,096	0,051	0,048	0,049	0,039	0,018	0,049	0,020	0,013	0,020										
22	GU647148	0,031	0,028	0,033	0,033	0,063	0,062	0,073	0,390	0,110	0,110	0,107	0,060	0,057	0,059	0,047	0,027	0,059	0,030	0,028	0,008	0,028									
23	GU647149	0,005	0,008	0,010	0,010	0,058	0,056	0,070	0,389	0,101	0,104	0,098	0,055	0,052	0,053	0,044	0,016	0,053	0,023	0,010	0,028	0,020	0,036								
24	GU647150	0,043	0,043	0,045	0,045	0,060	0,059	0,078	0,404	0,114	0,115	0,111	0,057	0,055	0,056	0,049	0,037	0,056	0,039	0,040	0,049	0,045	0,056	0,048							
25	GU647151	0,039	0,039	0,041	0,041	0,067	0,066	0,082	0,392	0,107	0,104	0,104	0,063	0,061	0,063	0,048	0,032	0,063	0,030	0,036	0,041	0,040	0,049	0,044	0,060						
26	GU647152	0,015	0,018	0,013	0,010	0,051	0,049	0,066	0,394	0,101	0,102	0,098	0,048	0,045	0,047	0,039	0,009	0,047	0,018	0,013	0,026	0,023	0,031	0,018	0,043	0,039					
27	GU647153	0,025	0,025	0,020	0,018	0,059	0,057	0,074	0,402	0,109	0,111	0,106	0,056	0,053	0,055	0,047	0,014	0,055	0,026	0,023	0,033	0,031	0,039	0,028	0,049	0,047	0,013				
28	GU647154	0,024	0,024	0,024	0,024	0,059	0,058	0,074	0,407	0,109	0,111	0,106	0,056	0,053	0,055	0,045	0,014	0,055	0,024	0,022	0,032	0,028	0,037	0,024	0,051	0,045	0,019	0,025			
29	HM352731	0,049	0,049	0,052	0,052	0,004	0,003	0,048	0,389	0,089	0,092	0,092	0,005	0,003	0,004	0,032	0,043	0,004	0,043	0,047	0,052	0,051	0,060	0,055	0,057	0,064	0,048	0,056	0,056		
30	HM352732	0,051	0,051	0,052	0,052	0,005	0,004	0,049	0,392	0,091	0,094	0,094	0,006	0,004	0,005	0,033	0,044	0,005	0,044	0,048	0,054	0,052	0,062	0,056	0,059	0,066	0,048	0,056	0,057	0,001	
31	HM352733	0,049	0,049	0,052	0,052	0,004	0,003	0,048	0,389	0,089	0,092	0,092	0,005	0,003	0,004	0,032	0,043	0,004	0,043	0,047	0,052	0,051	0,060	0,055	0,057	0,064	0,048	0,056	0,056	0,000	0,001

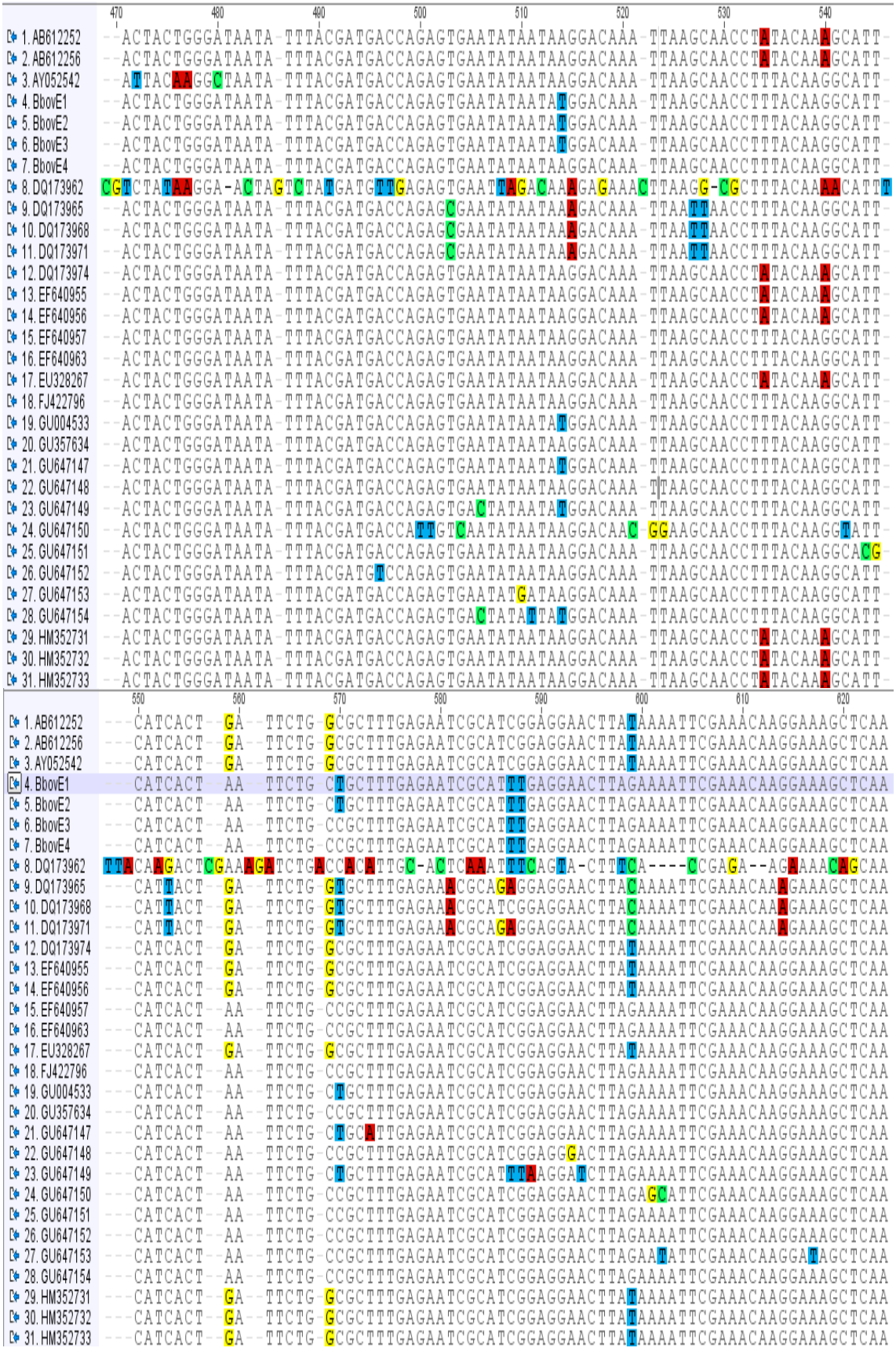
Şekil 4.12. GenBank'a kayıtları yapılan Erzurum *B. bovis* izolatları ile Türkiye ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların msa-2c gen dizilimlerinin pairwise analizleri

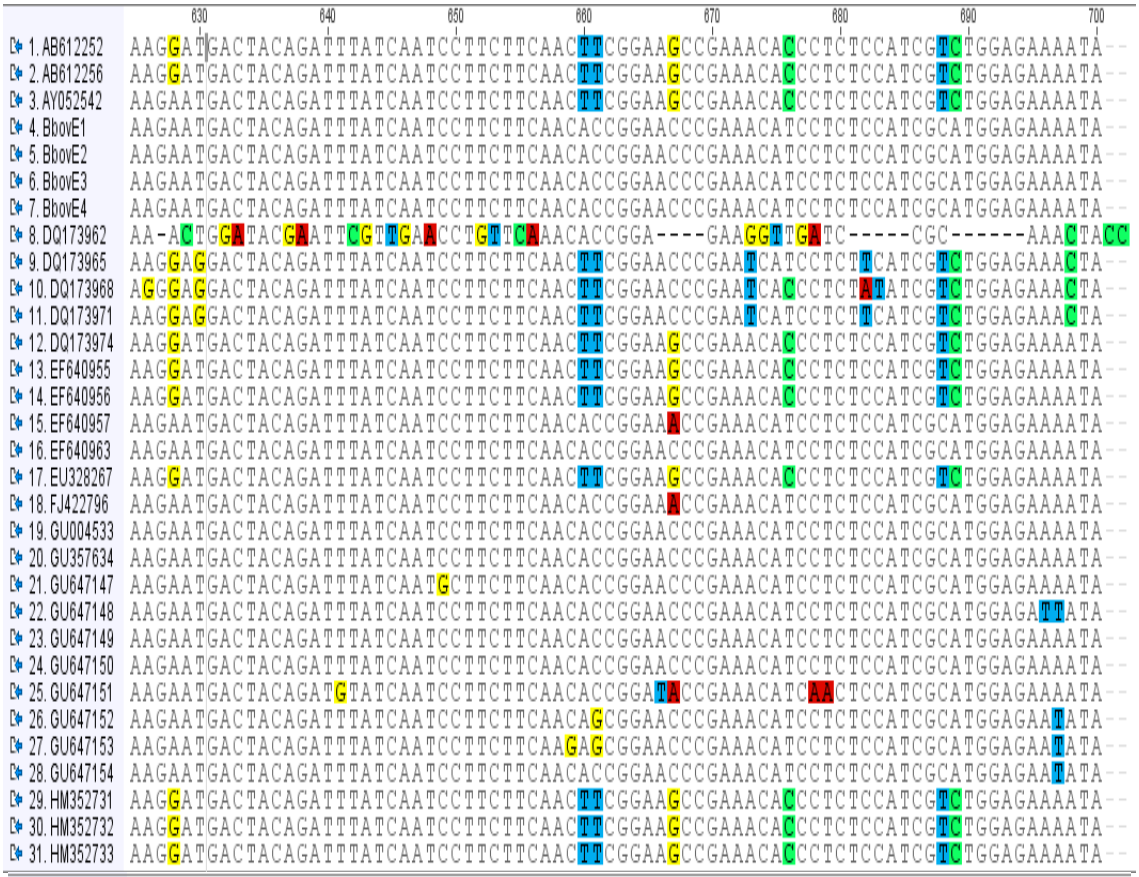
Erzurum yöresinden elde edilen *B. bovis* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, complete msa-2c gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.13'da gösterilmiştir.

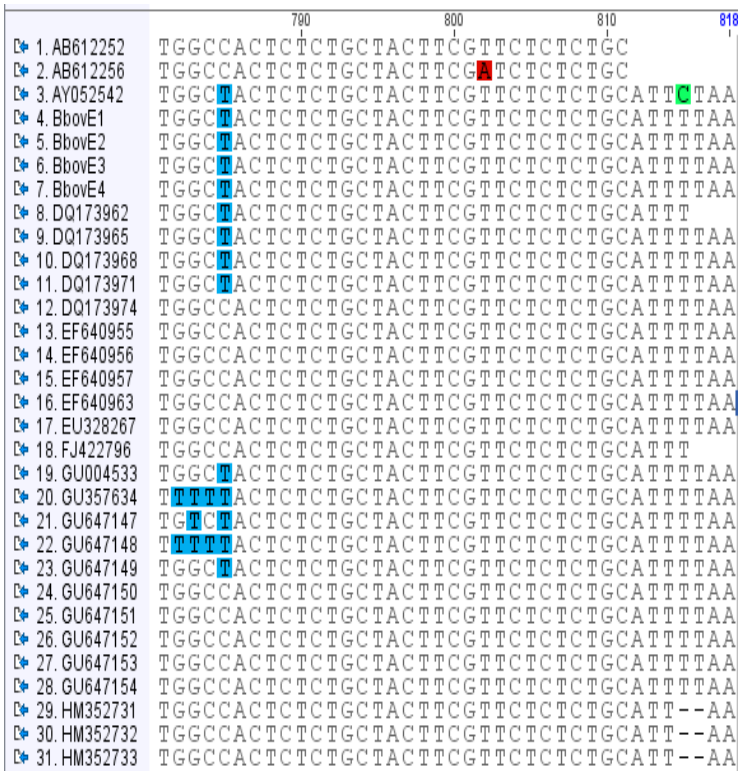



160 170 180 190 200 210 220 230
1. AB612252 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGATACATCGGCTACTAAA
2. AB612256 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
3. AY052542 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGGATGGAAGCTCAATCGGCTACTAAA
4. BbovE1 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
5. BbovE2 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
6. BbovE3 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
7. BbovE4 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
8. DQ173962 TTTGGTGAAGGCAAGGTAAAAAGCATTCTTGAGAAGAACTTTGAAGCTGTTGAAATGGAAGCTTCATTGGCTCCACAA
9. DQ173965 ATTGATGAGAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAGGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
10. DQ173968 ATTGATGAGAGCATGTTTAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
11. DQ173971 ATTGATGAGAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
12. DQ173974 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
13. EF640955 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
14. EF640956 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
15. EF640957 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
16. EF640963 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
17. EU328267 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
18. FJ422796 ATTGATGAAACCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
19. GU004533 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
20. GU357634 ATTGATGAAAGCATGTTGAAGAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
21. GU647147 ATTGATGTAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
22. GU647148 ATTGATGAAAGCATGTTGAAGAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
23. GU647149 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
24. GU647150 AATGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATCATGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
25. GU647151 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
26. GU647152 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
27. GU647153 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAT
28. GU647154 ATCCATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
29. HM352731 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
30. HM352732 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
31. HM352733 ATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCGGCTACTAAA
240 250 260 270 280 290 300 310
1. AB612252 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
2. AB612256 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAGTCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
3. AY052542 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
4. BbovE1 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
5. BbovE2 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
6. BbovE3 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
7. BbovE4 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
8. DQ173962 ACTTCTTGATGCTATGAAGGCTGTGAGACAATTAATCAAAACCAATACACCTTTTAAAACGTCCGACTTTGATACACTC
9. DQ173965 ACACATGACGCTCTCAAGGCTGTGAAACAATTAATCAAAACCGATGCGCCTTTTAACACATCCGACTTTGACACACTC
10. DQ173968 ACACATGACGCTCTCAAGGCTGTGAAACAATTAATCAAAACCGATGCGCCTTTTAACACATCCGACTTTGACACACTC
11. DQ173971 ACACATGACGCTCTCAAGGCTGTGAAACAATTAATCAAAACCGATGCGCCTTTTAACACATCCGACTTTGACACACTC
12. DQ173974 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
13. EF640955 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
14. EF640956 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
15. EF640957 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
16. EF640963 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
17. EU328267 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
18. FJ422796 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
19. GU004533 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
20. GU357634 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
21. GU647147 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
22. GU647148 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
23. GU647149 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
24. GU647150 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTATGACACACTC
25. GU647151 ACACATGACGCTCTGGAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAATGTATCGGACTTTGACACACTC
26. GU647152 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
27. GU647153 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
28. GU647154 ACACATGACGCTCTGAAAACTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
29. HM352731 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
30. HM352732 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC
31. HM352733 ACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTC


320 330 340 350 360 370 380 390
1. AB612252 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
2. AB612256 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
3. AY052542 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
4. BbovE1 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTCCTGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
5. BbovE2 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTCATGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
6. BbovE3 GATTTGCAATATCTCTCAGGGCAATCTCCTGAAGAGCTGCTCAAACTGCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
7. BbovE4 GATTTGCAATATCTCTCAGGGCAATCTCCTGAAGAGCTGCTCAAACTGCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
8. DQ173962 GATTTGAGCTATCTCTCAGGGCAAACTAATAAAGAACAGTTCCAGCTTCTGATTGACGCAATAAATGGCATGAAAGAA
9. DQ173965 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTCAAGCTTCTCATTGAGGCAGTATATGGTATGGAAATC
10. DQ173968 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTCAAGCTTCTCATTGAGGCAGTATATGGTATGGAAATC
11. DQ173971 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTCAAGCTTCTCATTGAGGCAGTATATGGTATGGAAATC
12. DQ173974 GATCTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
13. EF640955 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
14. EF640956 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
15. EF640957 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
16. EF640963 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATTTAATGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
17. EU328267 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
18. FJ422796 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAGTCTAATGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
19. GU004533 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTCCCGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
20. GU357634 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
21. GU647147 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTTATGAAGAGCTGCTCATTACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
22. GU647148 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAGTC
23. GU647149 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTCCTGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
24. GU647150 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTTATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
25. GU647151 GATATGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
26. GU647152 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTCCTGAAGAGCTGCTCAAACTGCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
27. GU647153 GATTTGCAATATCTCTCAGGGCAATTTCATGAAGAGCTGCTCAAACTGCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
28. GU647154 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATGTAATGAAGAGCTGCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
29. HM352731 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
30. HM352732 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTCCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
31. HM352733 GATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCTGTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATC
400 410 420 430 440 450 460
1. AB612252 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACGCCGACTTGA-GACAGT
2. AB612256 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT
3. AY052542 ATAATTGAAAAAACCCACTCTTTCGTGGGAGAGAGTCAAAAATATTCCGATGAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAGT
4. BbovE1 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
5. BbovE2 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
6. BbovE3 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAAAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
7. BbovE4 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAAAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
8. DQ173962 AATATTGTGAAGGTTAATGAGTATTTGACTGAGGACGGTGACCATTC-GTTATCAGGGGAT---GAGTTGTTGAAATT
9. DQ173965 ATAATTGAAAAAACCAACTCTTATGTGGGAGAGAGTATAAAGCATTCCGATAAC-TTGGACAGCGAGTTGA-GAAAAT
10. DQ173968 ATAATTGAAAAAACCAACTCTTATGTGGGAGAGAGTGTAAAGCATTCCAATAAC-TTAGACAGCGAGTTGA-GAAAAT
11. DQ173971 ATAATTGATAAAACCAACTCTTATGTGGGAGAGAGTGTAAAGCATTCCAATAAC-TTAGACAGCGAGTTGA-GAAAAT
12. DQ173974 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT
13. EF640955 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT
14. EF640956 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGGGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT
15. EF640957 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT
16. EF640963 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAAAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
17. EU328267 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT
18. FJ422796 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTACACCCGAGTTGA-GAAAAT
19. GU004533 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
20. GU357634 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
21. GU647147 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
22. GU647148 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCTAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
23. GU647149 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
24. GU647150 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTACTGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTACACCCGAGTTGA-GAAAAT
25. GU647151 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTATGTGGGAGAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
26. GU647152 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAAAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
27. GU647153 ATAATTGAAATAACTAACTCTTTTGTGGGAAAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
28. GU647154 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAAAGAGTGCAGAACATTCCAATAAC-GTAGACACCGAGTTGA-GAAAAT
29. HM352731 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT
30. HM352732 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT
31. HM352733 ATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGAGAGAGTGCAAAACATTCCGATAAA-TTGGACACCGACTTGA-GACAGT

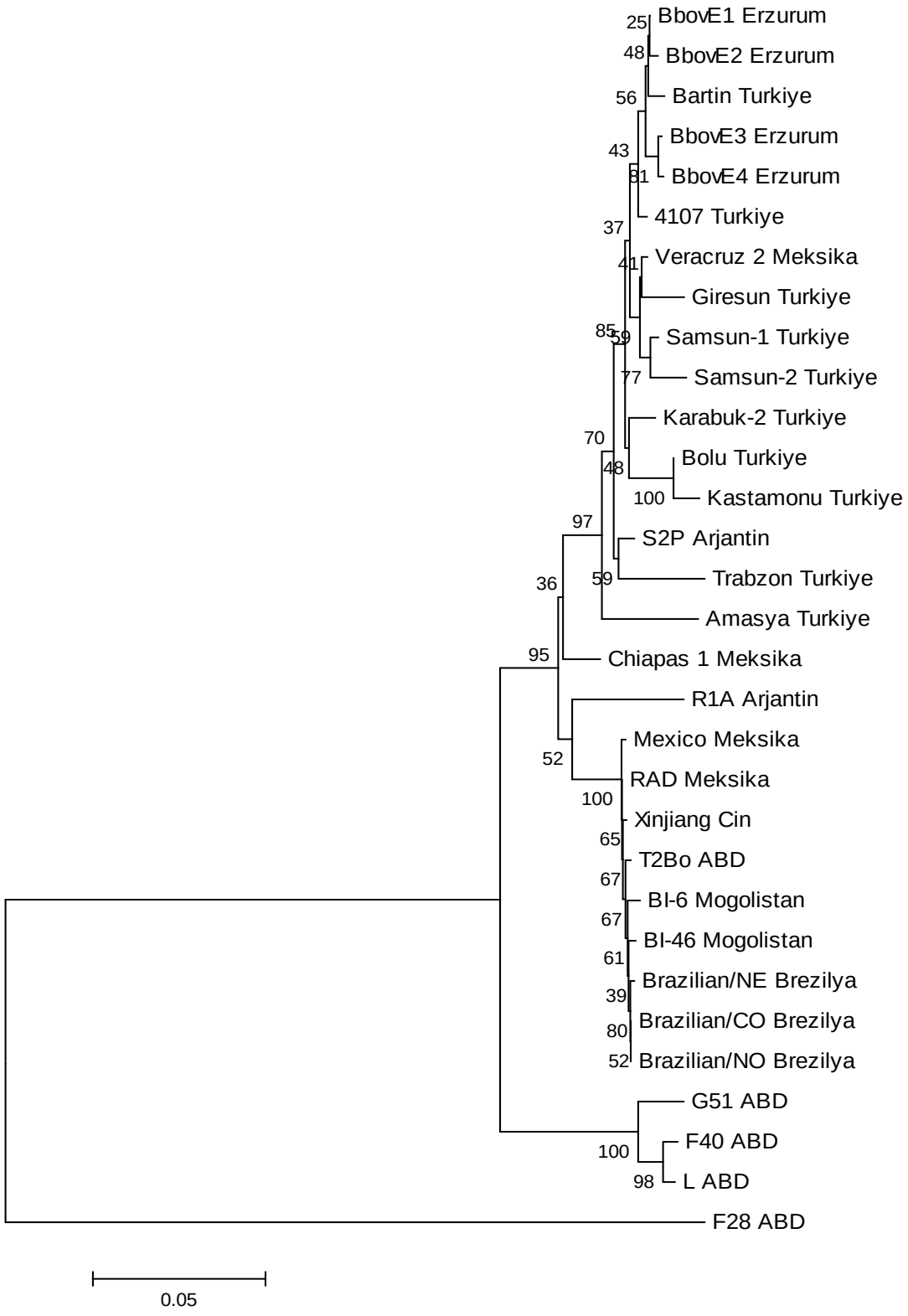

470 480 490 500 510 520 530 540
1. AB612252 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
2. AB612256 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
3. AY052542 ATTACAAGGCTAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
4. BbovE1 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATATGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
5. BbovE2 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATATGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
6. BbovE3 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATATGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
7. BbovE4 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
8. DQ173962 CGTCTATTAAGGA-ACTAGTCTATGATGTTGAGAGTGAATTAGACAAAGAGAAACTTAAGG-CGCTTTACAAAACATTT
9. DQ173965 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGCGAATATAATAAGACAAA TTAATTAACCTTTACAAGGCATT
10. DQ173968 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGCGAATATAATAAGACAAA TTAATTAACCTTTACAAGGCATT
11. DQ173971 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGCGAATATAATAAGACAAA TTAATTAACCTTTACAAGGCATT
12. DQ173974 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
13. EF640955 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
14. EF640956 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
15. EF640957 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
16. EF640963 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
17. EU328267 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
18. FJ422796 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
19. GU004533 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATATGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
20. GU357634 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
21. GU647147 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATATGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
22. GU647148 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
23. GU647149 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGACTATAATATGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
24. GU647150 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCATTGTCAATATAATAAGGACAAC GGAAGCAACCTTTACAAGGTATT
25. GU647151 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCACG
26. GU647152 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGTCCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
27. GU647153 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATGATAAGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
28. GU647154 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGACTATATTATGGACAAA TTAAGCAACCTTTACAAGGCATT
29. HM352731 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
30. HM352732 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
31. HM352733 ACTACTGGGATAATA TTTACGATGACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAA TTAAGCAACCTATACAAAGCATT
550 560 570 580 590 600 610 620
1. AB612252 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
2. AB612256 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
3. AY052542 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
4. BbovE1 CATCACT AA TTCTG CTGCTTTGAGAATCGCATTTGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
5. BbovE2 CATCACT AA TTCTG CTGCTTTGAGAATCGCATTTGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
6. BbovE3 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATTTGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
7. BbovE4 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATTTGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
8. DQ173962 TTACAAGACTCGAAAGATCTGACCACATTGC-ACTCAAATTTCAGTA-CTTTCA----CCGAGA--AGAAAACAGCAA
9. DQ173965 CATTACT GA TTCTG GTGCTTTGAGAAACGCAGAGGAGGAACTTACAAAATTCGAAACAAAGAAAGCTCAA
10. DQ173968 CATTACT GA TTCTG GTGCTTTGAGAAACGCATCGGAGGAACTTACAAAATTCGAAACAAAGAAAGCTCAA
11. DQ173971 CATTACT GA TTCTG GTGCTTTGAGAAACGCAGAGGAGGAACTTACAAAATTCGAAACAAAGAAAGCTCAA
12. DQ173974 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
13. EF640955 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
14. EF640956 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
15. EF640957 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
16. EF640963 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
17. EU328267 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
18. FJ422796 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
19. GU004533 CATCACT AA TTCTG CTGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
20. GU357634 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
21. GU647147 CATCACT AA TTCTG CTGCATTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
22. GU647148 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
23. GU647149 CATCACT AA TTCTG CTGCTTTGAGAATCGCATTTAAGGATCTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
24. GU647150 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAGCATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
25. GU647151 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
26. GU647152 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
27. GU647153 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAATATTCGAAACAAGGATAGCTCAA
28. GU647154 CATCACT AA TTCTG CCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
29. HM352731 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
30. HM352732 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA
31. HM352733 CATCACT GA TTCTG GCGCTTTGAGAATCGCATCGGAGGAACTTATAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAA


630 640 650 660 670 680 690 700
1. AB612252 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
2. AB612256 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
3. AY052542 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
4. BbovE1 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
5. BbovE2 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
6. BbovE3 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
7. BbovE4 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
8. DQ173962 AA-ACTGGATACGAATTCGTTGAACCTGTTCAAACACCGGA----GAAGGTTGATC-----CGC------AAACTACC
9. DQ173965 AAGGAGGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAACCCGAATCATCCTCTTCATCGTCTGGAGAAACTA
10. DQ173968 AGGGAGGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAACCCGAATCACCCTCTATATCGTCTGGAGAAACTA
11. DQ173971 AAGGAGGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAACCCGAATCATCCTCTTCATCGTCTGGAGAAACTA
12. DQ173974 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
13. EF640955 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
14. EF640956 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
15. EF640957 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAAACCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
16. EF640963 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
17. EU328267 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
18. FJ422796 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAAACCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
19. GU004533 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
20. GU357634 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
21. GU647147 AAGAATGACTACAGATTTATCAATGCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
22. GU647148 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGATTATA
23. GU647149 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
24. GU647150 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATA
25. GU647151 AAGAATGACTACAGATGTATCAATCCTTCTTCAACACCGGATACCGAAACATCAACTCCATCGCATGGAGAAAATA
26. GU647152 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACAGCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAATTATA
27. GU647153 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAAGAGCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAATTATA
28. GU647154 AAGAATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAATTATA
29. HM352731 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
30. HM352732 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
31. HM352733 AAGGATGACTACAGATTTATCAATCCTTCTTCAACTTCGGAAGCCGAAACACCCTCTCCATCGTCTGGAGAAAATA
710 720 730 740 750 760 770 780
1. AB612252 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
2. AB612256 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
3. AY052542 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTTCTTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
4. BbovE1 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCATACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
5. BbovE2 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCATACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
6. BbovE3 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCATACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
7. BbovE4 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCATACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
8. DQ173962 TCTACAGGA-AACCTCAATGGACAGCAGGGTTCATCAAAGCCTGCC------TCTTTCACCTTTG-GCGGATTGACTG
9. DQ173965 -CAGCAGCCCAACCTCCCAAACCTGCTGAG-ACCCCTAAGCCTACCGGATCTTCATTCACCTTTG-GCGGATTGACTG
10. DQ173968 -CTGCAGCCCAACCTCCTAAACCTGCTGAG-ACTTCTAAGCCTACCGGATCTTCCTTCACCTTTG-GCGGATTGACTG
11. DQ173971 -CAGCAGCCCAACCTCCCAAACCTGCTGAG-ACCCCTAAGCCTACCGGATCTTCATTCACCTTTG-GCGGATTGACTG
12. DQ173974 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
13. EF640955 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
14. EF640956 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
15. EF640957 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACCGGATCTTCTTTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
16. EF640963 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
17. EU328267 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
18. FJ422796 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACCGGATCTTCCTTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
19. GU004533 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
20. GU357634 -CTACAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTT-TTTCACCTTCGTCCGGTTTATACTG
21. GU647147 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
22. GU647148 -CTACAGCACAACCTCCCAAGCCTGCGGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTT-TTTCACCTTCGTCCGGTTTATACTG
23. GU647149 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCATACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
24. GU647150 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCTGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
25. GU647151 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACCGGATCTTCTTTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
26. GU647152 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
27. GU647153 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
28. GU647154 -CTGCAGCACAACCTCCCAAGCCCGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCG-GCGGATTGACTG
29. HM352731 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
30. HM352732 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG
31. HM352733 -CTGCAGCACAACCTCCCAAACCTGCCGAG-ACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTATG-GCGGATTGACTG



Şekil 4.13. Erzurum yöresinde sığırlarda belirlenen *B. bovis* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *B. bovis* izolatlarının complete msa-2c gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.13'de görüldüğü gibi msa-2c gen bölgesine göre saptanan *B. bovis* izolatları arasında çeşitli nükleotid değişimleri, delesyonları ve insertionları belirlenmiştir. *B. bovis* belirlenen izolatların (BbovE1-BbovE4) pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında ortalama %0,6, Türkiye izolatları ile %2,3 ve dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise %7,5 farklılık saptanmıştır. Erzurum yöresinde sığırlarda saptanan *B. bovis* izolatları ile Dünyadan kıyaslamaya dahil edilen diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.14'de verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere Erzurum izolatların Türkiye'den daha önece girilmiş izolatlarla ayrı filogenetik grupta yer aldığı belirlenmiştir.



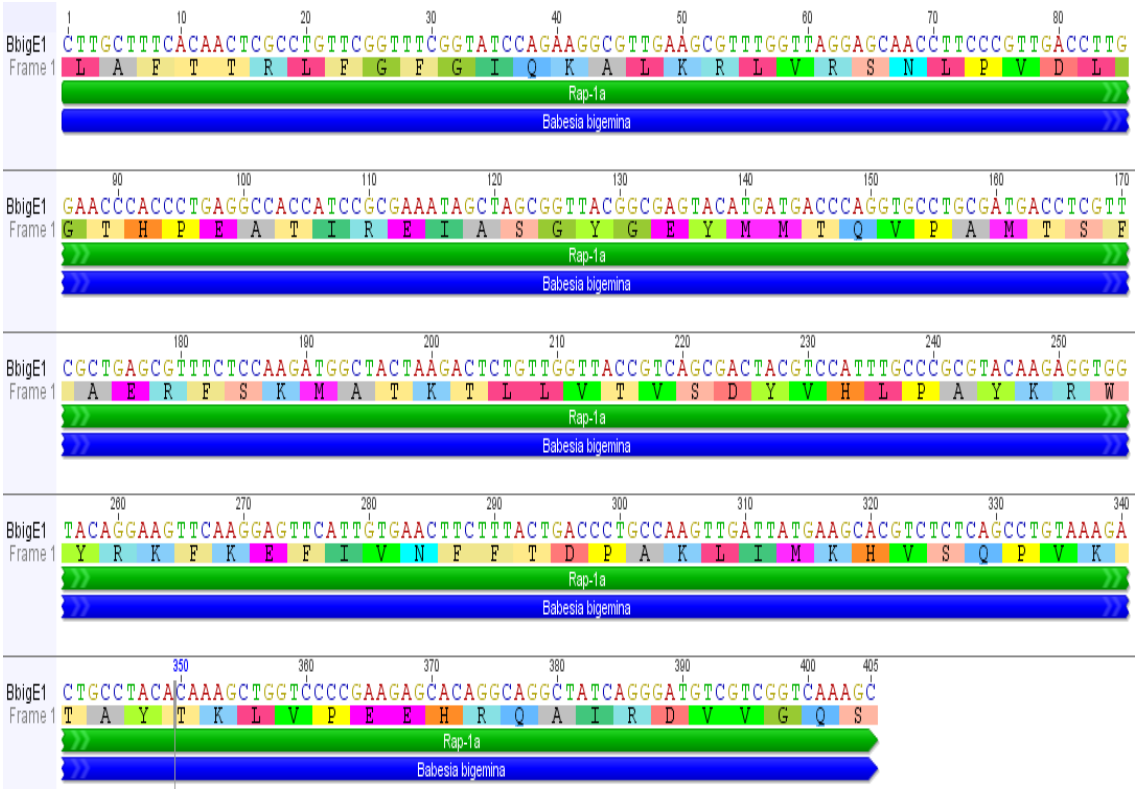
Şekil 4.14. Erzurum yöresinde sığırlarda saptanan *B. bovis* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *B. bovis* izolatlarının msa-2c gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

4.3.3. *B. bigemina* Rap-1a Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi

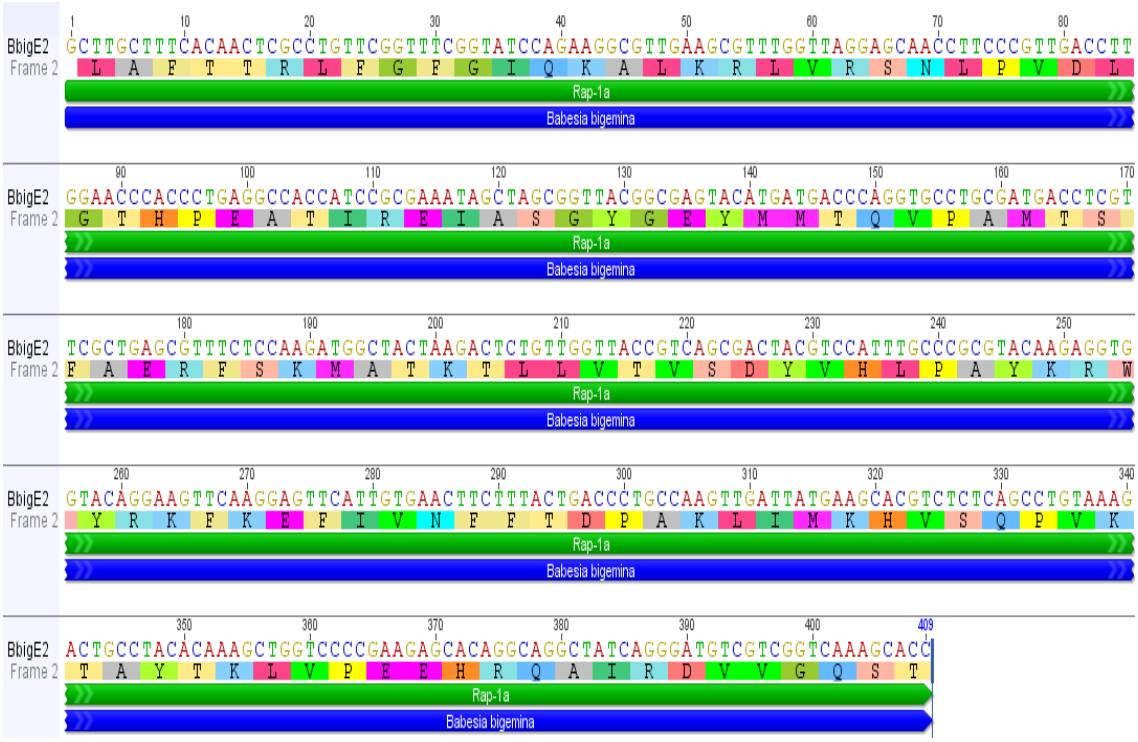
B. bigemina Rap-1a geni yönünden izolatlara ait DNA dizilerinin, konak, izolasyon kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.8'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.15-4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Erzurum yöresinde sığırlarda belirlenen *B. bigemina* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları

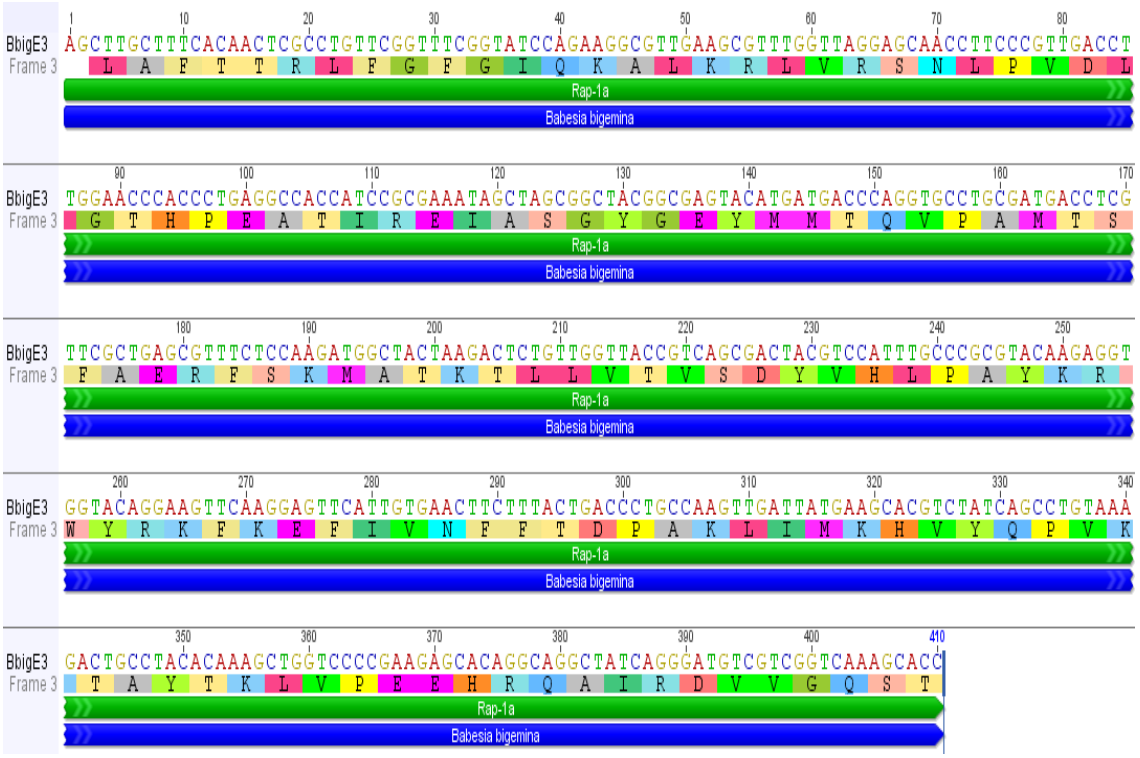
İzolat	***Gen bölgesi***	**Konak ve izolasyon kaynağı**	**Aksesyon Numarası**
BbigE1	*Rap-1a*	Sığır/ tam kan	KC515386
BbigE2	*Rap-1a*	Sığır/ tam kan	KC515387
BbigE3	*Rap-1a*	Sığır/ tam kan	KC515388



Şekil 4.15. *B. bigemina* BbigE1 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515386)



Şekil 4.16. *B. bigemina* BbigE2 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515387)



Şekil 4.17. *B. bigemina* BbigE3 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları (KC515388)

Erzurum yöresinde sığırlardan elde edilen *B. bigemina* izolatlarıyla Rap-1 gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Dünya'daki diğer *B. bigemina* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer bazı *B. bigemina* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	**Orijin**	**İzolasyon kaynağı**	**Gen Bölgesi**	**Aksesyon Numarası**
-	Tayland	Sığır	*Rap-1*	AB586126
-	Tayland	Sığır	*Rap-1*	AB594816
-	Tayland	Sığır	*Rap-1*	AB594817
-	Tayland	Sığır	*Rap-1*	JN974300
-	Filipinler	Sığır	*Rap-1*	JX648554
Syrian isolate 1	Suriye	Sığır	*Rap-1*	AB617642
Syrian isolate 2	Suriye	Sığır	*Rap-1*	AB617643
Syrian isolate 3	Suriye	Sığır	*Rap-1*	AB617644
CGA	ABD	Sığır	*Rap-1*	AF017284
CGP	ABD	Sığır	*Rap-1*	AF017285
S1A	ABD	Sığır	*Rap-1*	AF017286
S2P	ABD	Sığır	*Rap-1*	AF017287
Texcoco	ABD	Sığır	*Rap-1*	AF017288
UYA	ABD	Sığır	*Rap-1*	AF017289

Erzurum yöresinde sığırlarda pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan *B. bigemina* izolatları ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmenta dahil edilen diğer izolatların Rap-1 gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.10'da, pairwise alignmentları ise Şekil 4.18'de verilmiştir.

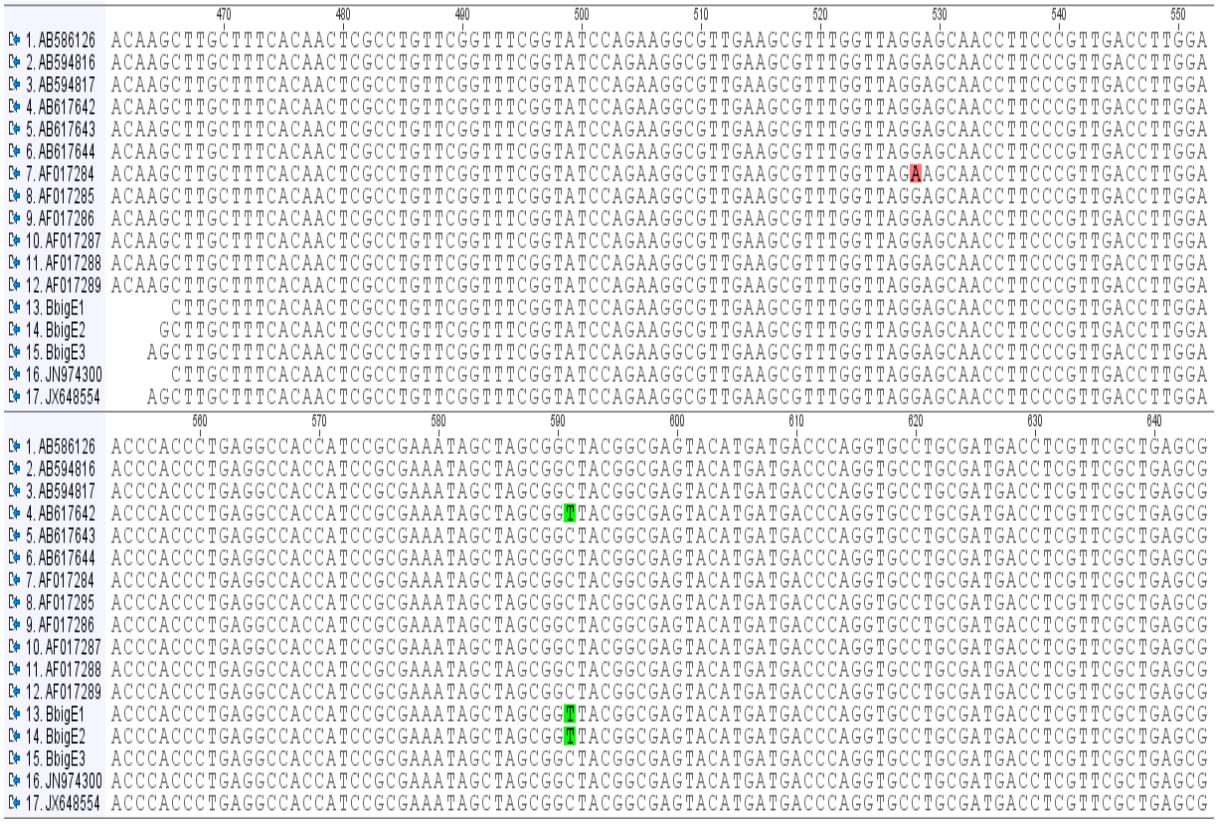
Tablo 4.10. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

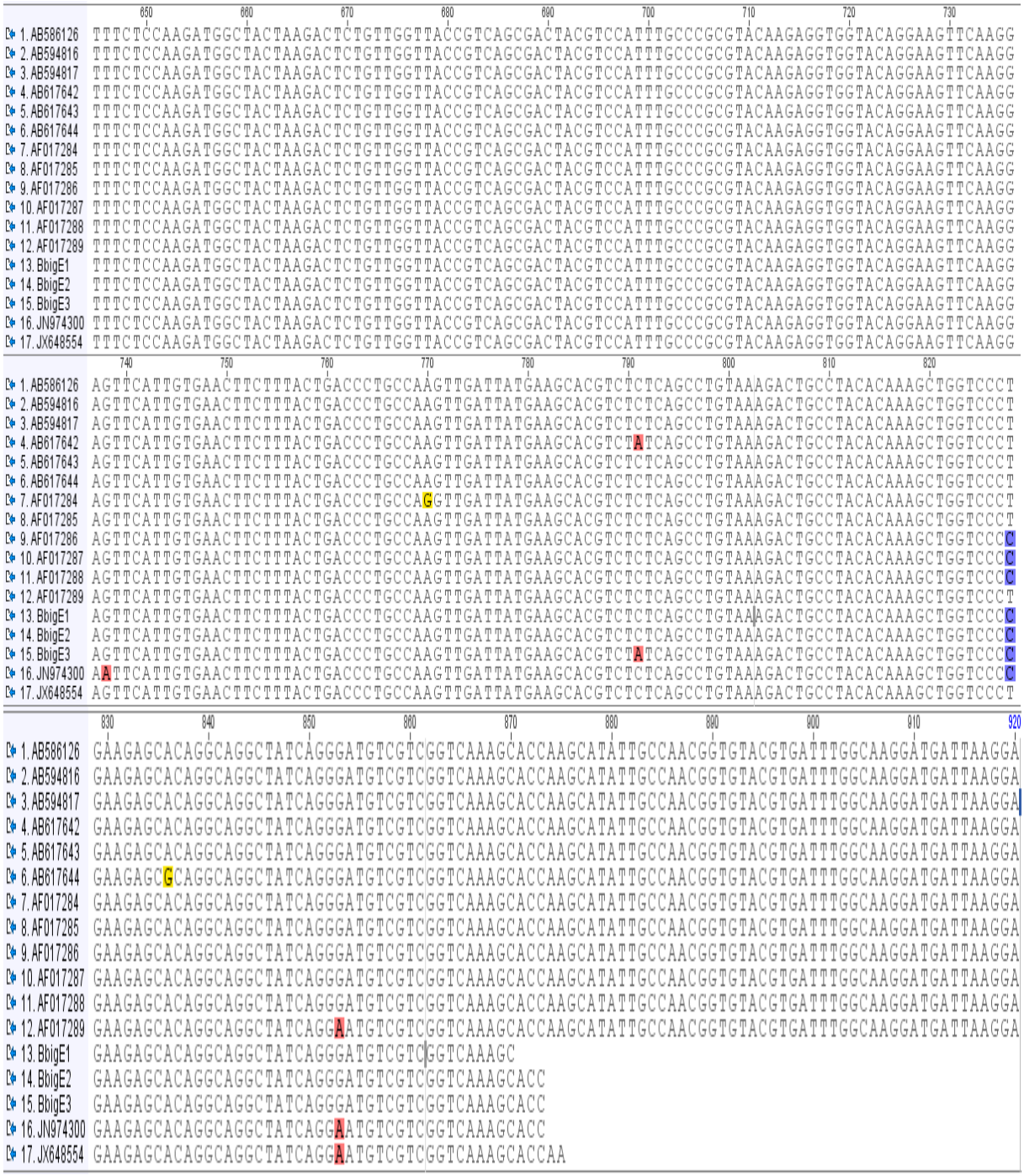
İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
BbigE1	24,4	26,9	22,7	25,9	47,2	52,8	405,0
BbigE2	24,2	27,1	22,7	25,9	46,9	53,1	409,0
BbigE3	23,9	27,1	23,2	25,9	47,1	52,9	410,0
AB586126	25,4	23,8	24,9	25,8	50,3	49,7	1011,0
AB594816	25,8	24,1	24,3	25,7	50,2	49,8	937,0
AB594817	25,1	23,4	25,3	26,1	50,5	49,5	1046,0
JN974300	24,0	27,5	23,3	25,2	47,3	52,7	408,0
JX648554	24,0	26,9	23,5	25,5	47,6	52,4	412,0
Syrian isolate 1	24,7	24,4	25,6	25,3	50,2	49,8	880,0
Syrian isolate 2	24,5	24,7	25,5	25,3	50,0	50,0	880,0
Syrian isolate 3	24,5	24,7	25,3	25,5	49,9	50,1	880,0
CGA	25,5	24,0	26,3	24,3	51,8	48,2	1051,0
CGP	25,5	24,0	26,3	24,3	51,8	48,2	1051,0
S1A	25,3	23,9	26,4	24,5	51,7	48,3	1051,0
S2P	25,2	23,8	26,3	24,7	51,5	48,5	1042,0
Texcoco	25,4	24,1	26,3	24,3	51,7	48,3	1051,0
UYA	25,5	24,0	26,4	24,2	51,9	48,1	1051,0
Ortalama	25,1	24,5	25,4	25,1	50,4	49,6	822,1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	BbigE1																
2	BbigE2	0,000															
3	BbigE3	0,005	0,005														
4	AB586126_	0,005	0,005	0,005													
5	AB594816_	0,005	0,005	0,005	0,010												
6	AB594817_	0,005	0,005	0,005	0,010	0,009											
7	AB617642_	0,005	0,005	0,005	0,009	0,010	0,018										
8	AB617643_	0,005	0,005	0,005	0,007	0,007	0,015	0,002									
9	AB617644_	0,007	0,007	0,007	0,008	0,008	0,016	0,003	0,001								
10	AF017284_	0,010	0,010	0,010	0,014	0,013	0,023	0,007	0,004	0,006							
11	AF017285_	0,005	0,005	0,005	0,011	0,009	0,020	0,004	0,001	0,003	0,002						
12	AF017286_	0,002	0,002	0,002	0,012	0,011	0,021	0,007	0,004	0,006	0,006	0,004					
13	AF017287_	0,002	0,002	0,002	0,012	0,011	0,021	0,006	0,003	0,004	0,008	0,006	0,008				
14	AF017288_	0,002	0,002	0,002	0,012	0,011	0,021	0,006	0,003	0,004	0,003	0,001	0,003	0,005			
15	AF017289_	0,007	0,007	0,007	0,014	0,013	0,023	0,009	0,006	0,007	0,009	0,007	0,011	0,009	0,008		
16	JN974300_	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,012	0,007	0,010	0,012	0,007	0,005	0,005	0,005	0,005	
17	JX648554_	0,007	0,007	0,007	0,002	0,002	0,002	0,007	0,002	0,005	0,007	0,002	0,005	0,005	0,005	0,000	0,005

Şekil 4.18. GenBank'a kayıtları yapılan Erzurum *B. bigemina* izolatları ile Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların Rap-1 gen dizilimlerinin pairwise analizleri

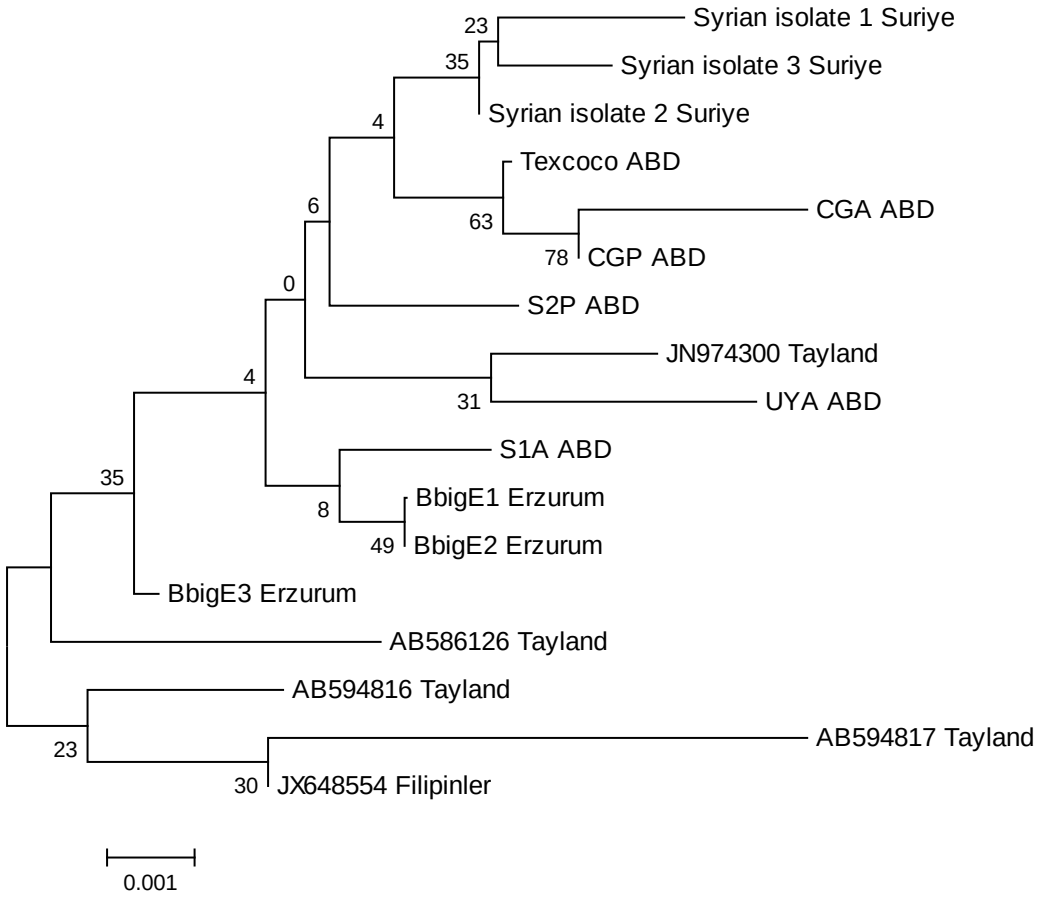
Erzurum yöresinden elde edilen *B. bigemina* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, partial Rap-1 gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.19'da gösterilmiştir.





Şekil 4.19. Erzurum yöresinde sığırlarda belirlenen *B. bigemina* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *B. bigemina* izolatlarının partial Rap-1 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.19'da görüldüğü gibi Rap-1 gen bölgesine göre saptanan *B. bigemina* izolatları arasında çeşitli nükleotid değişimleri belirlenmiştir. *B. bigemina* belirlenen izolatların (BbigE1-BbigE3) pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında ortalama %0,3, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise %0,5 farklılık saptanmıştır. Erzurum yöresinde sığırlarda saptanan *B. bigemina* izolatları ile Dünyadan kıyaslamaya dahil edilen diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.20'de verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere BbigE1 ve BbigE2 izolatlarının S1A ABD izolatına yakın olduğu, BbigE3 izolatının ise aynı filogenetik grupta bulunmasına karşın diğer iki izolattan farklı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Erzurum yöresinde sığırlarda saptanan *B. bigemina* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *B. bigemina* izolatlarının Rap-1 gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Babesiosis'in teşhisinde mikroskobik muayene ve serolojik teşhis yöntemleri (IFAT, ELISA vb.) geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak hızla ilerleyen teknolojiyle birlikte son yıllarda nükleik asit tabanlı teşhis yöntemleri (PCR, RLB, Real-Time PCR vb.) bir çok enfeksiyözün spesifik teşhisinde olduğu gibi babesiosis'in teşhisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (77, 92). *Babesia* türlerinin tespit edilmesinde mikroskobik 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 mikroskobik muayene için deneyimli personele ihtiyaç bulunmaktadır (95, 146). 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 (64, 105).

Son yıllarda mikroskobik 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 (67, 73, 122, 123, 130, 132, 137).

Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciligi, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Son yıllarda sığır babesiosis'inin spesifik teşhisinde de kullanılmaya başlayan *Babesia* türlerinin 18S rRNA, mitokondrial cytochrome b, Rap-1 ve msa2c gibi farklı gen bölgeleri hedef alınarak spesifik primer ve problar ile araştırmaların yapıldığı görülmektedir (109, 144, 145, 147).

Kim ve ark., (109), *B. bovis* ve *B. bigemina'*nın 18S rRNA bölgesinden dizayn ettikleri primer ve problar ile TaqMan tabanlı Real-time PCR araştırmasında, her iki etken için saptama limitini 2,5 parazit/µl belirlemişler, *B. bovis* için Nested PCR kıyaslamasında sensitiviteyi %96,9, spesifiteyi %100; *B. bigemina* için ise hem sensitivite hem de spesifiteyi %100 saptamışlardır. Criado-Fornelio ve ark. (144), iki farklı qPCR yönteminin sığır babesiosis'inin teşhisindeki etkinliğini araştırmışlar, hem TaqMan prob hem de FRET prob bazlı qPCR denemelerinde yüksek sensitivite ve spesifite belirlemişlerdir. Her iki teknik için de saptama limitini (linear kalibrasyon eğrileri) 0,1fg/µl-0,01ng/µl olarak saptamışlardır. Saha örnekleri üzerinde iki tekniğin uygulanması sonucu, spesifitelerinin %100 olmasına karşın sensitivitenin TaqMan prob bazlı qPCR yönteminde daha yüksek belirlediklerini kaydetmişlerdir. Ramos ve ark. (145), *B. bovis*'in msa2c gen bölgesini hedef alarak dizayn ettikleri sybergreen tabanlı qPCR tekniğinin teşhisteki etkinliğini ortaya koyma amacı ile yaptıkları çalışmada blastn analizi sonucu ve *B. bigemina, A. marginale* ve *Bos taurus* referans DNA'larını kontrol olarak kullanarak dizayn ettikleri primerlerin tür spesifik olduğunu belirlemişlerdir. Msa2c qPCR tekniğinin saptama limitini, msa2c kopya sayısı ve eşik değer siklusu arasındaki linear korelasyona göre ml kanda 1000 kopya olarak saptamışlardır. Çalışmada ortalama çözünme sıcaklığı (Tm) 77,41ºC (±0,25ºC) saptanmıştır. Araştırıcılar qPCR'ın sensitivitesini konvansiyonel PCR'a göre yüksek belirlemişler ve iki teknik arasındaki uyumu %88,8 (Kappa indeks=0,75) bulmuşlardır. Yıldırım ve ark. (147), *B. bovis* için sybergreen tabanlı, *B. bigemina* için de TaqMan prob tabanlı Real Time PCR tekniklerinin Nested PCR ve RLB tekniklerine oranla daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunun yanında araştırıcılar her üç tekniğin de bu enfeksiyonların teşhisinde oldukça spesifik olduğunu bildirmiş ve teşhiste güvenli bir

şekilde kullanılabileceklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da araştırma yöresinde sığır babesiosis'inin araştırılmasında teşhis yöntemi olarak araştırıcıların spesifitesini diğer moleküler tekniklere oranla yüksek belirttiği (145, 147) Real Time PCR tekniği tercih edilmiştir. Bu şekilde örneklerde *B. bovis* ve *B. bigemina* pozitiflikleri spesifik bir şekilde ortaya konmuş, Ct (dR) değerleri belirlenerek örneklerdeki parazitemi hakkında veriler elde edilmiştir. Bunun yanında çalışmada *B. bovis* için Sybergreen Real Time PCR melting curve analizinde belirlenen 78,1 ºC (±0,2 ºC) Tm değeri Ramos ve ark. (145) ve Yıldırım ve ark. (147) tarafından bildirilen Tm değeri ile uyum göstermiştir. Real Time PCR tekniği ile pozitif belirlenen örneklerden yalnızca *B. bovis* için 4, *B. bigemina* için ise 3 örneğin PCR ve Nested PCR analizlerinde jel üzerinde uygun konsantrasyonda DNA bant profili göstermiş olması yukarıdaki araştırıcıların bulgularını destekler niteliktedir.

Sığırlarda babesiosis'e yol açan türlerin en önemlilerinden olan *B. bovis* ve *B. bigemina*, Dünya'da Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya, Güney Amerika ve Afrika'da yaygın olarak görülmektedir (2, 8, 155).

Türkiye'de direkt PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (66) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bildirilmiştir. Bunu takiben ilk kez RLB tekniği ile yapılan bir saha çalışmasında (60), Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır. Kayseri yöresinde sığırlarda RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %0,6 (67) ve yine Kayseri'de sığır barınaklarından toplanan kenelerde RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %14 olarak tespit edilmiştir (68). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sığırlar üzerinde RLB tekniği ile yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında tespit edilmiştir (71). Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan diğer bir saha çalışmasında ise *B. bigemina* prevalansı %2,2 olarak bildirilmiştir (83). Diğer yandan Yıldırım ve ark. (147), Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş olan 400 adet kan örneğinde, RLB ile %14,75, Nested PCR ile %17,75 ve Real Time PCR ile %18,75 oranında *B. bigemina* pozitifliği belirlemişlerdir. Ayrıca RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 5'inin Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bigemina* 2'sinin ise *B. bigemina+B. bovis miks* olduğu aynı çalışmada (147) ortaya konmuştur. Bu çalışmada Erzurum yöresi sığırlarında *B.*

bigemina moleküler prevalansı %5,7 olarak saptanmıştır. Bu oran Ankara ve Burdur yöresinden bildirilen (66) prevalans oranlarınan düşük bulunurken, Kayseri ve yine Ankara yöresinden bildirilen (60,66) oranlara yakın, Karadeniz Bölgesi'nden bildirilen oranlardan (71,83) ise yüksek belirlenmiştir.

Türkiye'de *B. bovis*'in moleküler prevalansı incelendiğinde; PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisinin ilk defa Tanyüksel ve ark. (66) tarafından yapıldığı görülmektedir. *Babesia bovis*'in moleküler prevalansı konusunda Türkiye'de sınırlı sayıda çalışma olup; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (66); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (60) ve %3,6 (59), Trakya Bölgesi'nde %1,3 (82), Ege Bölgesi'nde %1,02 (84) *B. bovis* tespit edilmiştir. Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan diğer bir çalışmada (83) *B. bovis*'in moleküler prevalansı; Amasya'da %4; Bartın'da %2,3, Bolu'da %4,2, Giresun'da %1,6, Karabük'te %1,4, Kastamonu'da %5,6, Samsun'da %3,8 ve Trabzon'da %2,2 olarak belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada (83) genel olarak Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in moleküler prevalansı %1,8 olarak tespit edilmiştir. Diğer yandan Yıldırım ve ark. (147), Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş 400 adet kan örneğinde, RLB ile %4,50, Nested PCR ve Real Time PCR ile %5,75 oranında *B. bovis* pozitifliği bildirmişlerdir. Ayrıca söz konusu çalışmada (147) RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 9'unun Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bovis* olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada toplam 300 sığırdan 28'i (%9,3) *B. bovis* ile enfekte bulunmuştur. Elde edilen bu prevalans oranın Ankara yöresinden bildirilen prevalans oranından (66) düşük ve Burdur yöresindeki orana (66) paralel bulunurken diğer illerinden bildirilen prevalans oranlarından (59, 60, 66, 82-84) yüksek olduğu dikkati çekmiştir.

B. bovis ve *B. bigemina* yönünden pozitif belirlenen örneklerin parazit türü temel alınarak sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımları ve istatistiksel verileri değerlendirildiğinde sığırların yaş gruplarına göre *B. bovis* prevalansının en yüksek ≤2 yaş grubunda, *B. bigemina* prevalansının ise en yüksek ≥6 yaş grubunda görüldüğü tespit edilmiştir. Ancak her iki türe bağlı enfeksiyonlarda yaşa bağlı istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). *B. bovis* ve *B. bigemina* prevalansına cinsiyetin etkisi incelendiğinde her iki tür için de enfeksiyon oranının erkeklerde daha

yüksek tespit edildiği görülmektedir. Bu farklılık *B. bigemina*'da istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunurken *B. bovis* için önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. Irka bağlı istatistiksel analizlerde Simental ve Holstein ırkı sığırlarda örnek sayısının azlığı ve pozitiflik bulunmaması sebebiyle istatistiksel analizlerde değerlendirmeye alınmamıştır. Enfeksiyon oranı her iki tür için de melez ırkta Montofon ırkına oranla daha yüksek belirlenmiş ancak iki ırk arasındaki istatistiksel farklılık her iki tür için de önemsiz bulunmuştur. Bunun yanında parazitemiyi gösteren Ct (dR) değerlerine göre *B. bovis* pozitif örneklerde yaş gruplarına bağlı bir farklılık görülmezken, *B. bigemina* pozitif örneklerde ≤2 yaş grubunda diğer yaş gruplarına göre daha yüksek paraziteminin olduğu belirlenmiştir. *B. bigemina* pozitif örneklerde cinsiyete göre parazitemi, dişilerde erkeklere oranla daha yüksek ve önemli bulunmuştur. *B. bovis* pozitif örneklerde ise cinsiyete bağlı parazitemi düzeylerinde istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. Irka bağlı olarak *B. bovis* pozitif örneklerde parazitemi, melez ırkta daha yüksek ve önemli bulunmuş olup *B. bigemina* pozitif örneklerde ise istatistiksel bir farklılık görülmemiştir. Ortaya çıkan yukarıdaki farklılıkların örnekleme bölgesinde biyolojik döngüde önem arz eden başta duyarlı kene türlerinin daha yoğun veya az bulunduğu meralara çıkma, hayvan hareketleri ve doğal direnç gibi çeşitli epidemiyolojik faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. İncelemesi yapılan sığırlarda *B. bovis* prevalansı *B. bigemina*'ya oranla daha yüksek belirlenmesine karşın iki türün prevalansları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuş olup bu sonuçların Türkiye'de yapılmış diğer bazı çalışmaların (60, 66, 83) sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

Apicomplexan protozoonların apikal organellerinden salgılanan proteinler, parazitin konak hücresi içerisine invaze olmasında ve ve hücre içinde kalmasında çok önemli rol oynar (156). Son yıllarda babeisosis'e karşı kullanılan attenüe canlı aşıların yerine subunit aşıların geliştirilmesi konusunda çalışmalar hız kazanmıştır. Bu noktada özellikle parazitlerin eritrositlere invazyonunun engellenmesi ve böylece patogeneze esas teşkil eden intraeritrositik aseksüel çoğalma fazının durdurulması hedeflenmiştir. Söz konusu çalışmalarda, subunit aşılarda kullanılacak olan aşı adayı antijenleri kodlayan gen bölgelerinin araştırılması, bu bölgelerin değişken ve konservatif özelliklerinin saptanması ve bu özelliklerin dünyanın farklı bölgelerindeki suşlarda farklılıklar gösterip göstermediğinin araştırılması konuları öne çıkmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda parazitin eritrositlere invazyonunda Variable Merozoit

Surface Antijenleri (VMSA)'nin önemli olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de ise babesiosis'e karşı aşılama yapılmamaktadır. Ayrıca sığırlarda yaygın olarak görülen *B. bovis*'in msa-1, msa2a$_1$, msa2a$_2$, msa-2b ve msa-2c gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu ile ilgili olarak Türkiye'de bugüne kadar tek bir çalışma yapılmıştır (83). *Babesia bovis*'e özgü bu merozoit yüzey antijenleri arasında msa-2c geni, diğer gen bölgelerine göre *B. bovis* suşları arasında daha yüksek oranda korunmuşluğunu muhafaza etmiştir. Dolayısıyla farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bovis* izolatları arasında bu gen bölgesinin antijenik benzerliği daha yüksektir. Ayrıca yapısında, yüksek oranda nötralizasyon-duyarlı antikorların ortaya çıkmasını sağlayan B hücre epitoplarını içermektedir. Bu özelliğinden dolayı aşı çalışmalarında diğer yüzey antijenlerine göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir (157). Benzer şekilde özellikle *B. bigemina*'da Rhoptry-associated protein-1 (*rap-1*) gen familyasının karakteri tam olarak ortaya konmuş olmakla birlikte, diğer tüm *Babesia* türlerinde de bulunduğu kaydedilmiştir (158-161). Rap-1 gen familyası proteinlerinin de VMSA proteinlerinde olduğu gibi, sahip olduğu çeşitli immünolojik epitoplarla spesifik antikorların oluşumuna yol açtığı ve oluşan spesifik antikorların da merazoitlerin sağlam eritrositlere invaze olmasını engellediği gösterilmiştir (162-164). Bu yüzden söz konusu proteine ait Rap-1 gen bölgesi *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde ve çeşitli aşı çalışmalarında temel teşkil etmiştir (162-164).

Bu çalışmada Erzurum yöresinde sığırlarda karakterize edilen *B. bovis* izolatları ile dünyadan diğer *B. bovis* izolatları arasında msa-2c gen bölgesine göre çeşitli nükleotid değişimleri, delesyonları ve insertionları belirlenmiştir. *B. bovis* belirlenen izolatların (BbovE1-BbovE4) kendi aralarında ortalama %99,4 identik oldukları belirlenmiştir. Ayrıca Erzurum izolatlarının Türkiye'den bildirilmiş (83) diğer izolatlar ile ortalama %97,7 ve dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla ise ortalama %92,5 identiklik gösterdikleri saptanmıştır. Erzurum BbovE1-BbovE4 izolatlarının Türkiyeden en yüksek identikliği %99,0-%99,5 ile Karadeniz Bölgesi sığırlarından izole edilmiş Bartin (GU647149) ve %98,7-%99,5 ile Karabuk (GU004533) izolatlarıyla gösterdiği tespit edilmiştir. Dünyadan en yüksek identikliği ise %98,6-%98,9 ile Meksika Veracruz2 (EF640963) ve %98,0-%98,2 ile Arjantin S2P (FJ422796) izolatlarıyla gösterdikleri belirlenmiştir. *B. bovis* suşları arasında diğer VMSA gen bölgelerine göre daha yüksek oranda korunmuş olarak nitelenen msa-2c geninin (266,275,277) şimdiye

kadar Türkiye'deki sığırlarda karakterize edilen izolatlar ve dünyadaki diğer izolatlarla genetik kıyaslamaları göz önüne alındığında, söz konusu gen bölgesinin çok yüksek düzeyde korunmuş olmadığı ve genetik farklılığın var olduğu görülmektedir. Bu açıdan özellikle bu gen tabanlı aşı çalışmalarında izolatlar arasındaki antijenik farklılıklardan dolayı yöreye özgü *B. bovis* suşlarının gen haritalarının tam olarak ortaya konulması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Aynı şekilde Erzurum yöresinde sığırlarda karakterize edilen *B. bigemina* izolatları ile dünyadan diğer *B. bigemina* izolatları arasında Rap-1 gen bölgesine göre çeşitli nükleotid değişimleri saptanmıştır. *B. bigemina* Erzurum izolatlarının (BbigE1-BbigE3) kendi aralarında ortalama %99,7 oranında benzerlik gösterdikleri ortaya konmuştur. Ayrıca Erzurum izolatlarının dünyadan alignmenta dahil edilen diğer *B. bigemina* izolatlarıyla da ortalama %99,5 identiklik gösterdikleri saptanmıştır. Erzurum BbigE1-BbigE3 izolatlarının Dünyadan en yüksek identikliği %99,8 ile Amerika'dan S1A (AF017286), S2P (AF017287) ve Texcoco (AF017288) izolatlarıyla gösterdikleri tespit edilmiştir. Dolayısıyla söz konusu Rap-1 gen bölgesinin, msa-2c gen bölgesiyle kıyaslandığında Dünyadaki benzer izolatlar arasında identiklik oranlarının daha yüksek olduğu ve dolayısıyla daha yüksek oranda korunmuş bölgeye sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile Erzurum yöresi sığırlarında *B. bovis* ve *B. bigemina'*nın moleküler prevalansı ortaya konmuştur. Ayrıca bu çalışmada Real Time PCR tekniğinin, sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında, eş zamanlı hızlı teşhise ve kantitasyona olanak sağlaması ve paraziteminin belirlenebilmesi, dolayısıyla tedavi etkinliğinin takibi ve kontaminasyon riskinin minimize olması gibi avantajlarıyla sığır babesiosis'inin teşhisinde yüksek etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Real Time PCR tekniğinin sahip olduğu bu avantajlarıyla özellikle moleküler epidemiyolojik çalışmalarda ve düşük parazitemili rezervuarların belirlenmesinde öne çıktığı dikkati çekmiştir. *B. bovis* msa-2c gen bölgesinin yanında bu çalışma ileTürkiye'de ilk defa *B. bigemina*'nın Rap-1a bölgesinin moleküler karakteri ortaya konulmuştur. Elde edilen bu sonuçların DNA tabanlı rekombinant aşı çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışma ayrıca Türkiye'de sığır babesiosis'inin moleküler epidemiyolojisi ve hastalıktan sorumlu türler ve genotiplerin ortaya konması yönünde daha sonra yapılacak araştırmalara model olma niteliğindedir.

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, Clıfford 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, Zweygarth 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, Dalgliesh RJ, Callow LL. Babesia. In: Soulsby EJL (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. Soulsby EJL. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall. 1986, London.

27. Ekrem İ. Piroplasmoslar hakkında en yeni malumat. Türk Baytarlar Mecmuası 1931; 6: 65-73.

28. Lestoquard M. Piroplasmoslar. Baytari Mecmua 1931; 9: 8-9.

29. Gören S, Yetkin R. Tek tırnaklılarda, sığırda, koyunda, keçide ve köpekte piroplazmoz. Milli Müd Baytar Bakt Serum ve Aşı Evi Yay 1935.

30. Aysoy S. Piroplasmos (Piroplasmose). Tıbbi Klinik Kılavuzu, Talebe Ders Kılavuzu, Sayı 24, Yüksek Ziraat Enstitüsü Matbaası, Ankara 1941.

31. Mimioğlu M. Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu Vilayetlerinde "Haematurai vesicalis bovis"li sığırlarda parasitolojik araştırmalar, Ankara Üniv Vet Fak Derg 1955, 11: 183-192.

32. Kurtpınar H. Erzurum, Kars, Ağrı vilayetlerinde sığır, koyun ve keçilerin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurduğu hastalıklar. Türk Vet Hek Dern Derg 1956; 26: 3226-3232.

33. Göksu K. Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1959; 115: 60.

34. Özcan CH. Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen Piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Basımevi 1961; ss 10-106.

35. Erkut HM. Ege bölgesindeki sığırlarda piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. Bornova Vet Araş Enst Derg 1967; 8: 120-130.

36. Göksu K. Batı Karadeniz bölgesi illerinin sığırlarında gözlenen *Babesidae* (Sporozoa: Piroplasmida) enfeksiyonları. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1968; 15: 46-57.

37. Göksu K. Doğu Anadolu Bölgesinde hayvanlarda görülen başlıca paraziter hastalıklar ve bunlarla savaşta göz önüne alınacak hususlar. Türk Vet Hek Dern Derg 1969; 39 (4): 13-22.

38. Göksu K. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları (piroplasmossis, babesiosis, theileriosis ve anaplasmosis'in yayılış durumları). Türk Vet Hek Dern Derg 1970; 40 (4): 29-39.

39. Hoffman G, Hörchner F, Scheın E, et al. Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in des asiatischen provinzen der Turkei. Berl Münch Tierarztl Wschr 1971; 84: 152-156.

40. Mimioğlu M, Güler S, Ulutaş M. Untersuchungen über die Blutparasiten bie rindem in der Türkei. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1972; 2: 183-192.

41. Tüzer E. İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia, Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 1981; 8 (1): 97-110.

42. Dumanlı N, Özer E. Elazığ yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniv Vet Fak Derg 1987; 3(1): 159-166.

43. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A. Beytepe köyünde sığır babesiosisi üzerinde seroepidemiyolojik araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ No:104, İstanbul 1989.

44. Taşçı S. Van bölgesinde sığır ve koyunlarda görülen kene türleri ile bunların taşıdığı kan parazitleri arasındaki ilişkiler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1989; 36(1): 53-63.

45. Dinçer Ş, Sayın F, Karaer Z, ve ark. Karadeniz bölgesi sığırlarında, bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1991; 38 (1-2): 206-226.

46. İnci A. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1991.

47. Özer E, Erdoğmuş SZ, Köroğlu E, ve ark. Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. Turk J Vet Am Sci 1993; 17 (3): 209-215.

48. Açıcı M. Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. Etlik Vet Mik Derg 1995; 8 (1-2): 271-277.

49. İnci A, Çakmak A, Karaer Z, ve ark. Kayseri yöresinde sığırlarda babesiosisin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1345-1350.

50. Sevinc F, Sevinc M, Birdane MF, et al. Prevalence of *Babesia bigemina* in cattle. Revue de Méd Vét 2001; 152(5): 395-398.

51. Aktaş M, Dumanlı N, Karaer Z, ve ark. Elazığ, Malatya, ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25 (4): 447-451.

52. Nalbantoğlu S, Vatansever Z, Karaer Z, Cakmak A. The epidemiology of cattle babesiosis in Adana region. Babesia World Summit, December 1-3, Buenos Aires, Argentina 2005.

53. Sevinç F, Özdemir Ö, Coşkun A. Onbir günlük bir buzağıda akut Babesiosis. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2005; 2: 131-135.

54. Çakmak A. Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara. Tierarztl Hochsch Diss Hannover 1987.

55. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H. Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. Tebliğ No:103, İstanbul 1989.

56. Eren H. Ankara yöresinde sığır babesiosisinin sero-prevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993; 40 (1): 23-37.

57. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Friedhoff KT, Müler I. Studies on seroprevalence of *Babesia* infection of cattle in Turkey. In: Özcel MA (ed), New dimensions in parasitology, 1996; 20(1):505-516.

58. Vatansever, Z., Nalbantoğlu, S., Çakmak, A. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'nin epidemiyolojisi. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Elazığ 2001.

59. Vatansever Z, İça A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Sparagano O. Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB)ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. 194, Konya 2003.

60. İça A. Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin indirek floresan antikor ve reverse line blotting yöntemi ile karşılaştırmalı tanısı. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2004; 1(2): 77-85.

61. Kaya G, Cakmak A, Karaer Z. Seroprevalance of theileriosis and babesiosis of cattle. Medycyna Wet 2006; 62 (2): 156-158.

62. Çakmak A, Öz İ. Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993;40 (1): 70-77.

63. Rijpkema SG, Molkonboer MJ, Schouls LM, et al. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burdgoferi* Sensulato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterisation of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. J Clin Microbiol 1995; 33: 3091-3095.

64. 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.

65. Schnittger L, Yin H, Qi B, et al. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res 2004; 92: 189-196.

66. Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, ve ark. Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. T Parazitol Derg 2002; 26 (1): 42-47.

67. 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.

68. İca A, Vatansever Z, Yildirim A, et al. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. Vet Parasitol 2007; 148(2): 156-160.

69. İnci A, İça A, Florin-Christensen M, Vatansever Z, Yıldırım A, Düzlü Ö, Mosqueda J, Yavuz A. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın moleküler karakterizasyonu. XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp, 18-23 Kasım 2007, ss 163-164.

70. Altay K, Aydin MF, Dumanli N, et al. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158: 295-301.

71. Mahoney DF. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier JP (ed), Parasitic Protozoa. New York, Academic Press 1977; pp 1-52.

72. Levine ND. Veterinary Protozoology. Iowa State University Press Ames, 1th Edition 1985; pp 291-312.

73. Jack RM, Ward PA. Organ and vascular pathology of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 459-470.

74. Wright IG, Goodger BV. Pathogenesis of Babesiosis. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, Florida, CRC Press 1988; pp 99-118.

75. Sonenshine DE. Biology of Ticks. Newyork, Oxford, Oxford University Press Vol. II, Chapter V 1993.

76. 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.

77. Clark IA, Jacobson LS. Do babesiosis and malaria share a common disease process? Ann Trop Med Parasitol 2005; 92 (4): 483-488.

78. Zintl A, Gray JS, Skerrett HE, et al. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. Parasite Immunol 2005; 27 (4): 115-120.

79. İnci A. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1992; 39(1-2): 153-167.

80. Düzgün A, Alabay M, Çerçi H, ve ark. A serological study for babesiosis in cattle in Turkey using the ELISA test. IAEA-TECDOC-657 1991; pp 175-177.

81. Bilgin Z. Trakya'da sığırlarda bulunan Theileria ve Babesia türlerinin ve bunların sığırlarda yaygınlığının reverse line blooting (RLB) tekniği ile araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2007.

82. Gün H, Tanyüksel M, Yukarı BA, ve ark. Türkiye'de babesiosisin ilk insan serodiyagnozu. T Parazitol Derg 1996; 20 (1): 1-7.

83. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Karadeniz Bölgesi'ndeki Sığırlardan Elde Edilen Babesia bovis Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu. Kayseri: ERÜ Sağ Bil Derg 2011; 20(1): 18-28.

84. Yavuz A. Marmara ve Ege Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen *Babesia bovis* suşlarının moleküler karakterizasyonu, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2010.

85. Hunfeld KP, Hildebrant A, Gray JS. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. Int J Parasitol 2008; 38: 1219-1237.

86. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, et al. Babesiosis. Clin Microbiol Rev 2000; 13(3): 451-469.

87. Mimioğlu M, Ulutaş M, Güler S. Yurdumuz sığırlarında theileriosis etkenleri ve diğer kan parazitleri. Ajans-Türk Matbaacılık Sanayi, Ankara 1971.

88. Minami T, Ishira T. *Babesia ovate* sp. n. isolated from cattle in Japan. Nat Inst of Anim Hlth Quarterly 1980; 20: 101-113.

89. Beyer TV, Svezhova NV, Radchenko AI, et al. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). Cell Biol Int 2002; 26 (10): 861-871.

90. Crawford MJ, Fraunholaz MJ, Roos DS. Energy Metabolism in the Apicomplexa. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW (eds), Molecular Medical Parasitology. Academic Press, London, UK 2003; pp 154-171.

91. Skotarczak B. Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics. Wiad Parazytol 2007; 53 (4): 271-280.

92. 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.

93. Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, De Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet. Parasitol 1995; 57: 61-74.

94. Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. Clin Infect Dis 2009; 49(7):1103-1108.

95. 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.

96. 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.

97. 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.

98. 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.

99. 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.

100. 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.

101. 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.

102. 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.

103. 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.

104. 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.

105. Lau AO, Tibbals DL, McElwain TF. *Babesia bovis*: the development of an expression oligonucleotide microarray. Exp Parasitol 2007; 117(1):93-98.

106. 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.

107. 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.

108. 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.

109. 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.

110. 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.

111. 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.

112. Laughery JM, Lau AO, White SN, et al. *Babesia bovis*: transcriptional analysis of rRNA gene unit expression. Exp Parasitol 2009; 123(1):45-50.

113. Suarez CE, McElwain TF. Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites. Int J Parasitol 2009; 39(3): 289-297.

114. 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.

115. 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.

116. 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.

117. 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.

118. Almerìa 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.

119. 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.

120. Liu Q, Zhao JL, Zhou YQ, et al. Study on some molecular characterization of *Babesia orientalis*. Vet Parasitol 2005; 130(3-4):191-198.

121. 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.

122. 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.

123. Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. Mol Biochem Parasitol 2001; 117: 11-25.

124. Ruef BJ, Dowling SC, Conley PG, et al. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. Mol Biochem Parasitol 2000; 105: 1-12.

125. Cowman AF, Bernard O, Stewart N, et al. Genes of the protozoan parasite *Babesia bovis* that rearrange to produce RNA species with different sequences. Cell 1984; 37 (2): 653-660.

126. Mishra VS, McElwain TF, Dame JB, et al. Isolation, sequence and differential expression of the p58 gene family of *Babesia bigemina*. Mol Biochem Parasitol 1992; 53 (1-2): 149-158.

127. James MA. Application of exoantigens of *Babesia* and *Plasmodium* in vaccine development. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989; 83: 67-72.

128. 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.

129. Fleige T, Fischer K, Ferguson DJ, et al. Carbohydrate metabolism in the Toxoplasma gondii apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. Eukaryot Cell 2007; 6 (6): 984-996.

130. 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.

131. 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.

132. 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.

133. 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.

134. 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.

135. 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.

136. 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.

137. 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.

138. 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.

139. 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.

140. 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.

141. 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.

142. Kuttler KL, Gipson CA, Goff WL, et al. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. Am J Vet Res 1986; 47 (8): 1668-1670.

143. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 2006; 27: 95-125.

144. Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, Benitez D, Florin-Christensen M, Gonzalez-Oliva A, Henriques G, Silva M, Alongi A, Agnone A, Torina A, Madruga CR. Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. Vet Parasitol 2009; 162:200-206.

145. Ramos CA, Araújo FR, Souza II, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, Oliveira RH, Soares CO, Rosinha GM, Alves LC. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. Vet Parasitol 2011; 176(1):79-83.

146. Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. Vet Parasitol 1995; 57: 153-165.

147. Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö, Bişkin Z, Çiloğlu A. Sığırlarda Babesia Türlerinin Reverse Line Blotting, Nested PCR ve Real Time PCR Teknikleri ile Karşılaştırmalı Tanısı. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 5-10 Eylül 2011, Kars, p.186.

148. 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.

149. Cao S, Aboge GO, Terkawi MA, Yu L, Kamyingkird K, Luo Y, Li Y, Goo YK, Yamagishi J, Nishikawa Y, Yokoyama N, Suzuki H, Igarashi I, Maeda R,

Inpankaew T, Jittapalapong S, Xuan X. Molecular detection and identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in northern Thailand. Parasitol Res 2012; 111(3):1259-1266.

150. Petrigh R, Ruybal P, Thompson C, Neumann R, Moretta R,Wilkowsky S, Draghi G, Echaide I, de Echaide ST, Farbera M. Improved molecular tools for detection of *Babesia bigemina*. Animal biodiversity and emerging diseases. Ann N YAcad Sci 2008; 1149:155-157.

151. Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Jittapalapong S, Xuan X, Igarashi I. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. Vet Parasitol 2011;178(3-4):201-207.

152. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series, 41:95-98, (1999).

153. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S. Geneious v5.5, Available from http://www.geneious.com.

154. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Mol. Biol Evol 2011; 28(10): 2731-2739.

155. Oura CA, Bishop RP, Wampande EM, et al. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. Int J Parasitol 2004; 34(5):603-613.

156. Sam-Yellowe T.Y. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. Parasitol Today 1996; 12(8): 308-316.

157. 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.

158. Dalrymple B.P., Casu R.E., Peters,J.M., Dimmock C.M., Gale K.R., Boese R. Wright IG. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis, Babesia ovis* and *Babesia canis*. Mol Biochem Parasitol 1993; 57 (2): 181-192.

159. Kappmeyer LS, Perryman LE. Hines SA., Baszler TV, Katz JB, Hennager SG. Knowles DP. Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2285-2290.

160. Skuce PJ, Mallon TR, Taylor SB. Molecular cloning of a putative rhoptry protein homologue from *Babesia divergens*. Mol Biochem Parasitol 1996; 77 (1): 99–102.

161. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, McElwain TF. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. Mol Biochem Parasitol 1998; 93 (2): 215-222.

162. Ikadai H, Xuan X, Igarashi I, Tanaka S, Kanemaru T, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T. Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3475-3480.

163. Machado RZ, McElwain TF, Pancracio HP, Freschi CR, Palmer GH. *Babesia bigemina*: immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia. Exp Parasitol 1999; 93 (2): 105-108.

164. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 22-32.