T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

KAYSERİ YÖRESİNDE RUMİNANTLARDA *THEİLERA* TÜRLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZLERİ

Proje No:**TSA-09-943**

Proje Türü
NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ

SONUÇ RAPORU

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

Kasım 2010

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

"Kayseri Yöresinde Ruminantlarda *Theileria* Türlerinin Filogenetik Analizleri" başlıklı bu çalışmayı TSA-09-943 kod numarası ile finanslal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

TEŞEKKÜR……3
İÇİNDEKİLER 4
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ 6
ÖZET 7
ABSTRACT 8
1. GİRİŞ VE AMAÇ 9
2. GENEL BİLGİLER 11
2.1. THEİLERİOSİS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ 11
2.2. *THEİLERİA* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ 11
2.3. *THEİLERİA* TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU 13
2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme 13
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim 15
2.4. RUMİNANTLARDAKİ *THEİLERİA* TÜRLERİ 18
2.5. THEİLERİOSİS'TE VİRULENS VE PATOLOJİ 18
2.6. THEİLERİOSİS'TE KLİNİK BELİRTİLER 19
2.7. BABESİOSİS'TE BAĞIŞIKLIK 20
2.7.1. Doğal Bağışıklık 22
2.7.2.. Hücresel İmmun Yanıt 23
2.7.3.. Humoral İmmun Yanıt 24
2.8. THEİLERİOSİS'TE TEŞHİS 24
2.8.1. Mikroskobik Muayene 25
2.8.2. Serolojik Testler 26
2.8.3. Moleküler Teknikler 27
2.9. THEİLERİOSİS'TE TEDAVİ VE KONTROL 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
3.1. SAHA ÇALIŞMALARI 29
3.1.1. Hayvan Materyali 29
3.1.2. Kan Örnekleri 29
3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI 30
3.2.1. Mikroskobik İnceleme 30
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu 30
3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) 32

3.2.4. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi 35
3.2.5. Reverse Line Blotting (RLB) 36
3.2.5.1. RLB Problarının Seçimi 36
3.2.5.2. RLB Membranın Hazırlanması 37
3.2.5.3. RLB Hibridizasyonu 38
3.2.5.4. Membranın Temizlenmesi ve Muhafazası 39
3.2.5.5. RLB'de Kullanılan Solusyonların Hazırlanması 39
3.2.6. Jelden Ekstraksiyon İşlemi 40
3.2.7. Sekans Analizleri 42
4. BULGULAR 43
4.1. MİKROSKOBİK BULGULAR 43
4.2. PCR SONUÇLARI 44
4.3. RLB SONUÇLARI 44
4.4. SEKANS ANALİZ SONUÇLARI 45
4.5. SEKANS ANALİZ SONUÇLARININ FİLOGENETİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ 48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 51
6. KAYNAKLAR 56

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Kayseri yöresinde incelenen ruminantların yaş ve cinsiyete göre dağılımı 28
Tablo 3.2. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ticari Kitin İçeriği 29
Tablo 3.3. RLB testi amacıyla yapılan PCR'da kullanılan primerler 31
Tablo 3.4. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları 32
Tablo 3.5. PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar 33
Tablo 3.6. RLB Problarının Sekans Dizilimleri 35
Tablo 3.7. High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) İçeriği 38
Tablo 4.1. Mikroskobik bakı sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı 41
Tablo 4.2. RLB sonuçlarına göre hayvanlardaki *Theileria* türlerinin dağılımı 43
Tablo 4.3. Kayseri yöresindeki sığır ve koyunlardan elde edilen pozitif izolatların GenBank aksesyon numaraları 44
Tablo 4.4. Kıyaslaması yapılan diğer *T. annulata ve T. ovis* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler 48
Şekil 2.1. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları 11
Şekil 2.2. *Theileria* türlerinin hayat siklusu 15
Şekil 4.1. *Theileria* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinden ~390-430 bp'lik bölgenin amplifikasyonunun jel elektroforezde görünümü (Orijinal) 42
Şekil 4.2. *T. annulata* Kayseri-1 izolatının sekans dizilimleri (HQ197730) 44
Şekil 4.3. *T. annulata* Kayseri-2 izolatının sekans dizilimleri (HQ197731) 44
Şekil 4.4. *T. annulata* Kayseri-3 izolatının sekans dizilimleri (HQ197732) 44
Şekil 4.5. *T. ovis* Kayseri-1 izolatının sekans dizilimleri (HM241892) 45
Şekil 4.6. *T. ovis* Kayseri-2 izolatının sekans dizilimleri (HM241893) 45
Şekil 4.7. *T. ovis* Kayseri-3 izolatının sekans dizilimleri (HM241894) 45
Şekil 4.8. *T. annulata* izolatların *18s rRNA* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbor-joining) ... 46
Şekil 4.9. *T. ovis* izolatların *18s rRNA* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbor-joining) 47

KAYSERİ YÖRESİNDE RUMİNANTLARDA *THEİLERİA* TÜRLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZLERİ

ÖZET

Bu çalışma, Kayseri yöresindeki sığır, manda, koyun ve keçilerden elde edilen *Theileria* türlerinin *18s rRNA* gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonunun ortaya konulması ve Dünya'daki diğer benzer suşlarla benzerliklerinin kıyaslanması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, 2009-2010 tarihleri arasında Kayseri yöresindeki 160 sığır, 105 manda, 60 koyun ve 35 keçiden kan örnekleri toplanmıştır. Laboratuarda bir yandan kan örneklerinden mikroskobik muayene için frotiler hazırlanırken bir yandan da kan örneklerinin ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar RLB testiyle *Theileria* türleri yönünden incelenmiştir. Pozitif olarak saptanan üç *T. annulata* (sığır) izolatı ile üç *T.ovis* (koyun) izolatınn *18s rRNA* gen bölgesine göre moleküler karakterinin net olarak ortaya konulması amacıyla spesifik primerlerle PCR'ı yapılmıştır. PCR sonucunda elde edilen yaklaşık spesifik bantlar jelden ekstrakte edilerek sekansa gönderilmiştir. Sekans sonuçlarına göre örneklerin nükleotid dizilimleri ortaya konulmuş ve Dünya'daki diğer benzer suşlarla identiklik dereceleri kıyaslanmıştır. İzolatları GenBank'a kaydettirilerek aksesyon numaraları alınmıştır.

Kayseri yöresinde yapılan bu çalışmada sığırlarda tropikal theileriosis mikroskobik olarak %3,13 belirlenmiş olup, moleküler olarak sadece *T. annulata* (%10,63) türü tespit edilmiştir. Koyunlarda ise mikroskobik olarak theileriosis %6,67 olarak tespit edilmişken, moleküler olarak *T. ovis* koyunlarda %23,33 ve keçilerde %11,43 olarak bulunmuştur. GenBank'a kayıtları yapılan *T. annulata* izolatlarının *18s rRNA* gen bölgesine göre kendi aralarındaki identiklik oranının %99-100, Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer benzer suşlarla yakınlık derecelerinin ise % 98-99 arasında değiştiği saptanmıştır. Aynı şekilde *T. ovis* izolatlarının da kendi aralarında ve Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer benzer suşlarla akrabalık derecelerinin %98-99 oranında değiştiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Kayseri yöresinde sığır ve koyunlardan elde edilen izolatların *18s rRNA* gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma sonucunun, gelecekte Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşı çalışmalarına temel teşkil edeceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kayseri, moleküler karakterizasyon, ruminant, theileriosis, 18s rRNA

PHYLOGENETİC ANALYSES OF *THEILERIA* SPECIES IN RUMINANTS IN KAYSERI

ABSTRACT

This study was carried out to exhibit the molecular characterization of *18s rRNA* gene region of *Theileria* isolates collected from cattle, water buffalos, sheep and goats in Kayseri and to compare the similarity with the other similar isolates in the world. For this aim, the blood samples were collected from totally 160 cattle, 105 water buffalos, 60 sheep and 35 goats which were gone to pasture and selected randomly in different periods between 2009-2010 in Kayseri in Turkey. While the blood smears were being prepared from the blood samples in the laboratory, the samples were extracted and the DNA was investigated for *Theileria* species by RLB at the same time. PCR of three *T. annulata* samples (cattle) and three *T. ovis* samples (sheep) which were detected as positive was performed with specific primers to exhibit the molecular characterization of *18s rRNA* gene region. The spesific bands obtained with PCR were extracted from the gel and sent for the sequencing. According to the sequence results, nucleotide sequences of positive samples were exhibited and compared the similarity with other similar isolates in the world. The isolates were deposited to GenBank and the accession numbers were taken.

In the microscopic examination of the blood samples collected from the cattle in Kayseri, the prevalence of tropical theileriosis was determined as 3.13%. According to RLB results, only *T. annulata* was detected as 10.63%. Microscopic prevalance was determined as 6.67% in sheep, and *T. ovis* was found as 23.33% in sheep and 11.43% in goats molecularly.

It was also established that the similarity of *T. annulata* isolates deposited to GenBank varied between 99-100% in each other and between 98-99% in the other similar isolates in the world and Turkey. Similarly, the similarity of *T. ovis* isolates varied between 98-99% both in eachother and in the other similar isolates in the world and Turkey.

As a result, *18s rRNA* gene region of the isolates obtained form cattle and sheep in Kayseri in Turkey was done with this study. It is thought that the results of this study will provide a basis for the vaccination studies with the characteristic Turkey isolates.

Keywords: Kayseri, molecular characterization, ruminant, theileriosis, 18s rRNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Subtropikal iklim kuşağında bulunan Türkiye'nin ekonomisinde, hayvancılık çok önemli bir yer tutmaktadır. Bununla beraber hayvan başına elde edilen verim miktarı çok düşüktür. Türkiye hayvancılığını olumsuz yönde etkileyen barınak, bakım ve beslenme gibi yetiştiricilik hatalarının yanında; bakteriyel, viral ve paraziter orijinli salgın hastalıklar halen tüm şiddetiyle hüküm sürmektedir. Theiloriosis, Türkiye'de paraziter hastalıkların en yaygınlarındandır.

Theileriosis özellikle Avrupa'nın güneyinde, Kuzey Afrika, Ortadoğu, Orta Asya ve Hindistan'da, Rusya'nın güneyinde yaygın olarak görülür. Türkiye'nin bütün coğrafik bölgelerinde sığırlarda görülen bu hastalık, Kayseri yöresinde de şiddetli bir biçimde hüküm sürmektedir.

Theileriosis; lenfoid hücreler ve eritrositlere yerleşen, ixodid kenelerle nakledilen *Theileria* türleri tarafından oluşturulan protozoer bir hastalıktır. Bu hastalık, tropikal ve subtropikal bölgelerde büyük ve küçük ruminantlarda, ölümlere sebep olmasının yanında, et ve süt verimini düşürerek büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Türkiye'de tropikal theileriosis'in bütün coğrafik bölgelerde en tehlikeli paraziter hastalık olarak hüküm sürdüğü; ixodid kenelerden *Theileria* türlerine vektörlük yapan *Hyalomma* türlerinin de yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir. Sığırlarda görülen tropikal theileriosis etkeni *T. annulata'*nın bütün bölgelerde yaygın olduğu, son yapılan çalışmalarla da *T. orientalis'*in varlığı ortaya konmuştur. Kayseri yöresinin *T. annulata*

için endemik bir bölge olduğu ve bu yörede etkenin oluşturduğu tropikal theileriosis'in önemli ekonomik kayıplar meydana getirdiği saptanmıştır.

Diğer taraftan koyun ve keçilerde *T. lestoquardi*, *T. ovis*, *T. separata* ve *Theileria* sp. (China 1) gibi farklı *Theileria* türleri tespit edilmiştir. Bu türler arasında patojenite, vektör kene, biyolojik ve genetik özellikler yönünden önemli farklılıkların olduğu; *T. lestoquardi* ve *Theileria* sp. (China 1)'in koyun ve keçilerde yüksek morbidite ve mortaliteye yol açtığı, diğer türlerin ise subklinik enfeksiyona sebep oldukları bildirilmiştir.

Türkiye'de koyun ve keçilerde theileriosis üzerine yapılan çalışmalarda, *T. ovis'*in varlığı ortaya konmuştur. Kayseri yöresinde yapılan bazı saha çalışmalarında tespit edilen akut theileriosis vakalarının etkeni, *Theileria ovis* olarak bildirilmiştir. *T. lestoquardi'*nin varlığı ise henüz bildirilmemiştir.

Theileriosis'in teşhisi, geleneksel olarak bölgeye ait epidemiyolojik veriler, hastalığın mevsimsel seyri, kene populasyonu, klinik semptomlar, mikroskobik inceleme ve serolojik testlerle yapılmaktadır. Bununla birlikte bu geleneksel 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 yöntemlerden RLB tekniği, duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması, hızlı ve bir seferde birçok örneğin eş zamanlı olarak birçok parazit yönünden yoklanmasına olanak sağlaması sebebiyle öne çıkmıştır. Bu yöntemle, *Theileria* türleri için spesifik olan 18 S RNA gen bölgesi kullanılarak teşhise gidilmektedir.

Bu çalışma ile, Kayseri yöresinde evcil ruminantlarda görülen *Theileria* türlerinin 18 S RNA gen bölgesini amplifiye eden primerler kullanılarak bu gen bölgesinin çoğaltılıp sekanslanması, elde edilen sekansların Türkiye'de ve dünyada daha önce saptanan benzer sekanslar ile filogenetik akrabalıklarının ortaya konması amaçlanmıştır. Moleküler düzeyde yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, gelecekte yapılması planlanan rekombinant aşı çalışmalarına temel teşkil edecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Theileriosis'in Tanımı ve Tarihçesi

Theileriosis; Apicomplexa anaç altındaki *Theileria* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerdeki evcil ve yabani hayvanlarda görülen, *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından transstadial olarak nakledilen protozoer bir hastalıktır.Theileriosis tropik iklimin hakim olduğu geniş bir coğrafyada yaygın olarak görülmektedir (1,2).

Dschunkowsky ve Lush tarafından ilk defa 1903 yılında Kafkasya sığırlarında tespit edilen hastalığa Tropikal Piroplasmose adı verilmiştir. Theiler 1904 yılında Afrika sığırlarında *Theileria parva*'yı, 1906 yılında ise *Theileria mutans*' ı bulmuştur. 1924 yılında Sergent ve arkadaşları, 1930 yılında Yakimoff ve Dektereff, theileriosis ile ilgili yeni bilgiler ortaya koymuş ve buldukları parazitlerin *Hyalomma* soyuna ait keneler vasıtasıyla nakledildiğini bildirmişlerdir (3).

2.2. *Theileria* Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri

Theileria türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir (4).

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

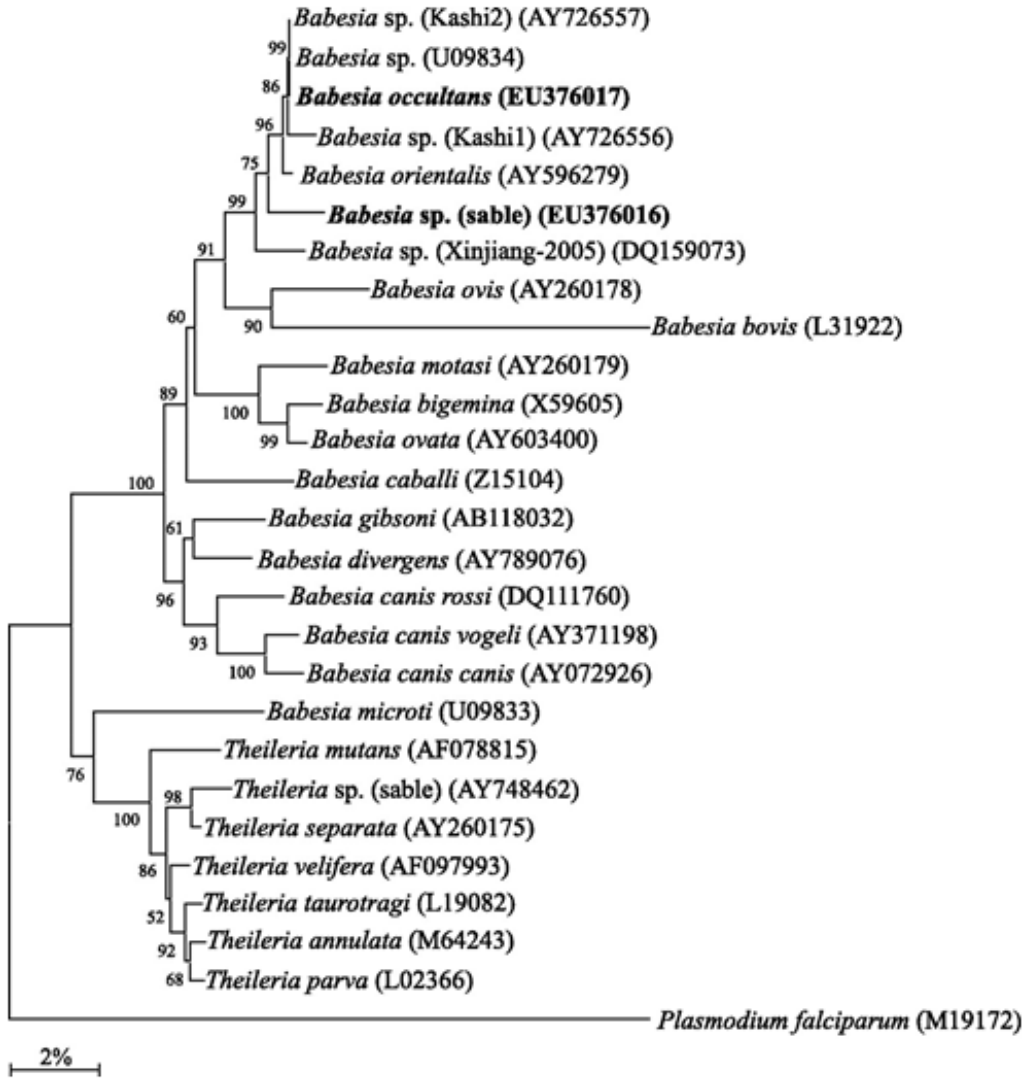
Class: ***Aconoidasida*** Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

Order: ***Piroplasmorida*** Wenyon, 1926

Family: ***Theileriidae*** du Toit, 1918

Genus: ***Theileria*** Bettencourt, 1907

Son yıllarda moleküler olarak *Babesia* ve *Theileria* türlerinin sınıflandırılmasında 18S rRNA gen bölgelerine göre filogenetik akrabalık dereceleri esas alınarak da sınıflandırmalar yapılmaktadır (5) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (5).

2.3. *Theileria* Türlerinin Hayat Siklusu

2.3.1. Omurgalı Konaktaki Gelişme

Taşıyıcı kenenin tükürük bezi içerisindeki sporozoitler kenenin kan emmesi esnasında theileriosise duyarlı bir hayvana geçerek enfeksiyona sebep olurlar. Kenenin konakçıya yapıştığı yerdeki bölgesel lenf yumrusunda inkübasyon süresinin beşinci gününden itibaren sporozoitlere rastlanır (6, 7)

Sporozoitlerin lenfoit hücrelere girmesiyle parazitin biyolojisinde önemli bir safha başlar. Sporozoitin dış yüzeyinde bulunan bağlar lenfosit membranındaki reseptörlere bağlanır. Birkaç dakika bu şekilde kalan sporozoit pasif endositisis yoluyla lenfosit içine alınır. Bu esnada sporozoitte gerek metabolik gerekse hareket yönünden hiçbir faaliyet görülmez (8). Lenfositin içine alınan sporozoitin etrafı üç katlı bir membranla çevrilir. En dıştaki membran konakçı hücreye ait lenfosit membranıdır. Lenfositler normal durumda az sayıda lizozomları ihtiva eder, bazen ise hiç bulunmaz. Fakat sporozoitlerin lenfosite girmesinden sonra sindirim enzimleri ihtiva eden lizozomlar artarak sporozoitin membranı etrafında toplanır. Lizozomlar da bulunan endositosis vakuolünün erimesi ile ihtiva ettikleri enzimler serbest kalırlar. Bu işlem sporozoitin hücreye girişi esnasında olduğu için parazite hiçbir zarar vermez, sadece sporozoitin etrafındaki konakçı hücreye ait olan membranı eritir (8).

Lenfositler içerisinde sporozoitler şizogoni yoluyla çoğalarak makroşizontları meydana getirirler. Lenfoblastoid hücrelerde meydana gelen makroşizontlar 3 ila 15 arasında çekirdek ihtiva ederler (9). Makroşizontlar konakçı hücre lenfositlerini mitoz yoluyla bölünmesini teşvik ederler, bu esnada kendileri de bölünerek yeni lenfositlere dağılırlar ve mikroşizontları oluştururlar (9).

Bazı araştırıcılar merozoitlerin oluşumunu iki yolla açıklamaktadırlar. Birinci tarzda yuvarlak şizontun çekirdekleri hücrenin periferinde yer alırlar ve her bir çekirdek ikiye bölünerek çoğalır. En son bölünmede rozet görünümünde merozoitler meydana gelir. İkinci tarzda ise küçük ebattaki bir şizonta ait tek bir çekirdek aynı anda birçok parçaya bölünmesi ile birçok merozoit meydana gelir. Aynı araştırıcılar ilk çekirdek bölünmesi esnasında görülen şizontlara makroşizontlar, merozoitleri şekillendiren son dönem şizontlara ise mikroşizont adını vermişlerdir (10).

Parazit eritrosit içine girdiği andan itibaren etrafında iki katlı bir membran bulunur. Bu membranın dış katının invaginasyon sonucunda eritrositin zarı tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir. Kısa bir süre sonra ise eritrosit içindeki parazitin tek bir membranla çevrilmiş olduğu gözlenir (11).

Schein ve arkadaşlarına göre eritrosit içindeki virgül formatındaki parazit uzunlamasına ikiye bölünür. Bu safhada ilk olarak görülen çekirdek bölünmesi yanında çekirdek dışında mikrotubul benzeri yapılar oluşur. Çekirdek bölünmesini sitoplazma bölünmesi takip eder.

Böylece bir hücre bölünmesi söz konusudur. Parazitin hızla bölünmesi esnasında "Y" benzeri bir şekil aldığı da bildirilmiştir (12).

2.3.2. Vektör Kenedeki Gelişme

*Theileria lestoquardi'*nin, *Hyalomma anatolicum* ve *Rhipicephalus* spp. ile deneysel olarak nakledildiği bildirilmiştir (13, 14). Bunun yanında, *R. sanguineus, R. evertsi, H. impeltatum, Haemaphysalis rufipes* gibi kene türleri ile nakledilebileceği belirtilmiştir (15). *Theileria ovis'*in vektörü olarak değişik bölgelerde farklı kene türleri rapor edilmiştir. Bu türler arasında, *R. evertsi* (16), *R. bursa* (17), *R. haemaphysaloides* (18), *H. anatolicum* (19), *Hae. punctata* (20), *Dermacentor sylvarum, Hae. sulcata* ve *Ornithodorus* bulunmaktadır (20). Türkiye'de *T. ovis* ile enfekte bir koyun üzerinde beslenen aç olgun *H. anatolicum'*un tükürük bezi asini hücrelerinde Methyle Green Pyronin boyama metodu ile *Theileria* sporoblastları (21), sahadaki koyunlar üzerinden toplanan *R. bursa*'nın tükürük bezi asini hücrelerinde ise PCR ile *T. ovis*'in sporozoitleri tespit edilmiştir (22). *Theileria separata*'nın vektörlüğünü *R. evertsi'*nin yaptığı bildirilmiştir (23). *Theileria luwenshuni* ve *T. uilenbergi*'nin vektörlüğünü ise *Haemaphysalis quinhainesis*'in yaptığı bildirilmiştir (24).

Yukarıdaki kene türlerinin hasta hayvanlardan kan emmesiyle *Theileria* etkenleri eritrositler içerisinde kenenin bağırsağına alınır, kısa bir süre sonra bu eritrositler eriyip parçalanır ve içerisindeki merozoitler serbest hale gelir. Merozoitler kenenin bağırsağında ilk olarak virgül formunda görülür ama kısa sürede kaybolan bu formun yerine yuvarlak ve oval merozoit formları geçer. Bu merozoitlerin farklılaşması ile mikro ve makro gametler oluşur(10).

Mikrogamet formunun kene doyduktan 2 günle 4 gün arasında kenenin bağırsağında iplik şeklinde gözlemlendiği bildirilmiştir. Çekirdeğin bulunduğu orta kısım diğer kısımlara nazaran daha genişlemiştir. Epitel hücreler içerisinde bulunan halka ve yuvarlak formdaki merozoitler kene doyduktan 6 ila 10 gün sonra belirgin bir morfolojik değişim göstererek makrogametleri oluştururlar. Bu parazit formunda çekirdekle etrafındaki plazma arasında koyu bir sınır şeklinde zar fark edilir. Bu halka formları düzenli ve devamlı olarak büyürler (25).

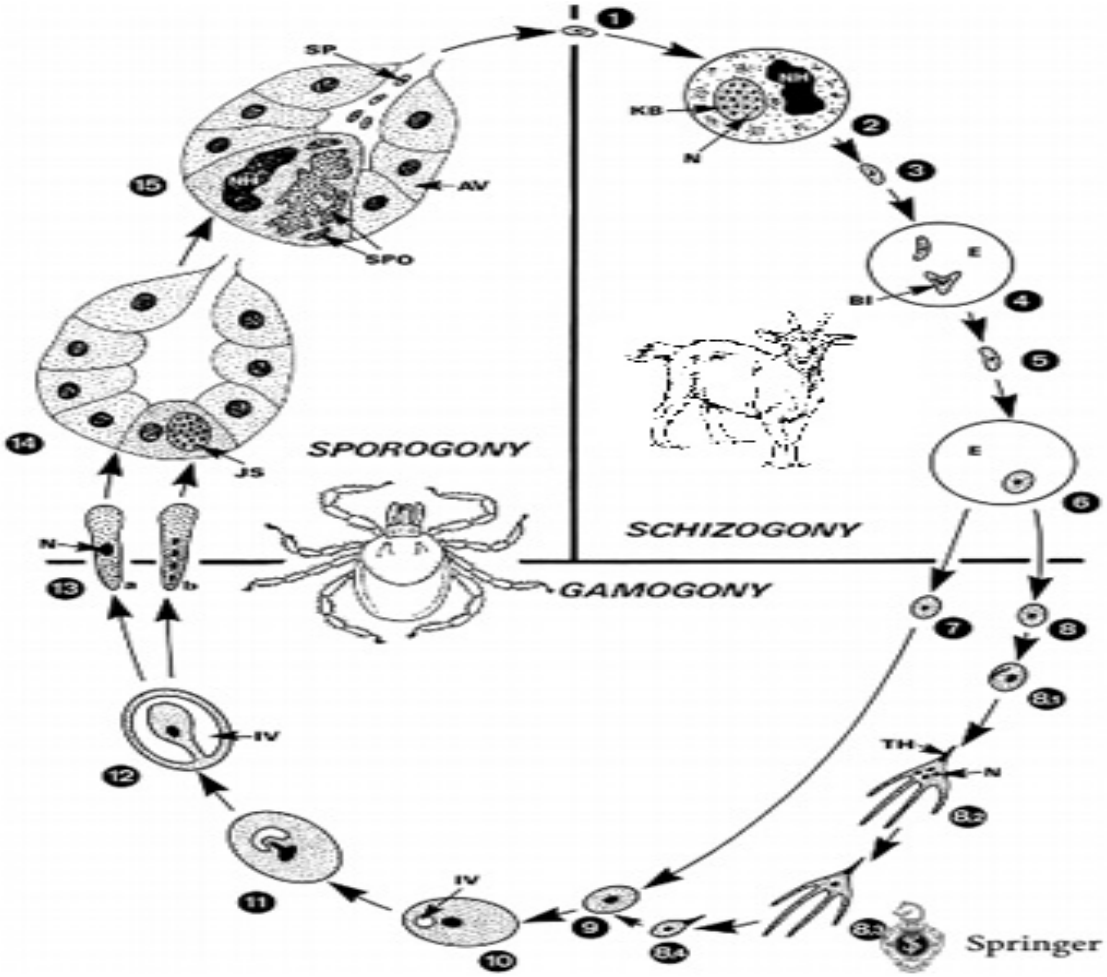
Kenenin doymasından sonraki 2. ve 5. günler arasında bağırsakta görülen parazitlerin büyük bir kısmı bağırsak epitelyum hücreleri tarafından fagosite edilir ve besin granülü olarak depo edilir (26). Döllenmiş makrogametlere kenenin bağırsak hücreleri içerisinde oval veya yuvarlak bir formda rastlanır. Zigotun ebadının büyümesi ile içinde hareketli bir safha gerçekleşir ve buna kinet adı verilir. Kinetlerin bağırsak duvarından haemocole göç ettiği bildirilmiştir. Kene doyduktan sonraki 12. güne kadar etrafında tek bir membran bulunan zigotun bu günden itibaren etrafında ikinci bir membran oluşur ki buna zigot membranı denir. Bu membran üzerinde mikroporlar görülmez. Çekirdeği hücrenin merkezinde yer alır, küresel görünümdedir, çekirdek etrafında bir çekirdek zarı bulunur. Nükleoplazmada kromozomal elementler görülmediğinden homojen bir görünüştedir. Bu safhada sitoplazma içerisinde çok sayıda vakuol bulunur. Bunların etrafı membranlarla çevrilidir (26).

Kenenin hemolenfinde bulunan kinetin büyüklüğü 20 mikron, genişliği de 4-5 mikrondur. Etrafını dışta elementer bir membran sınırlandırır, içteki tabakada 15-21 nm büyüklüğünde mikropora benzeyen aralıklar bulunur. Hücrenin apikal kısmının neredeyse 1/3'ü mikronemlerle doludur ve rhoptriler bulunmaz. Çekirdek merkezde yer alır. Çekirdeğin önünde apikal kutup bölgesinde her zaman görülen helezonik yapı mitokondri benzeri çift membranlı organeller bulunur. Kinetin arka kısmında iyi gelişmiş endoplazmik retikulum gözlemlenir ve kinetin hemolenf içindeki dönemde hiçbir çoğalma safhası göstermeden geliştiği bildirilmiştir (26).

Kinetler aktif hareketleri ile tükürük bezinin asini hücrelerine girerler. Önce küresel bir form olan parazitte, çekirdek bölünmesinin ardından sporogony safhası başlar (27).

Bazı araştırıcılara göre kenenin tükürük bezinde üç formda bulunduğunu bildirmişlerdir. İlk görülen enfektif kabiliyeti olmayan genç formdur. Bunun sitoplazması içinde granülü ribozomlar gelişerek çekirdeğe dahil olur. Oval şeklindeki çekirdek materyali artarak hücrenin kenarına yakın bir yerde bulunur. İkinci formu teşkil eden ara formudur. Bu formda parazitin çekirdeği gelişerek bütün hücreyi doldurur ve sitoplazmayı bir bant şeklinde sarar. Bu dönemde çekirdeğin gelişmesi sona erer. Nihayet çekirdek materyali arasında mitokondriyumlar görülür. Çekirdek birçok parçaya ayrılarak etrafında biraz sitoplazma ile sporozoitler meydana gelir. Üçüncü formu, sporogoni sonu oluşan enfektif karaktere sahip sporozoitler meydana getirir. Bunlar çoğunlukla yuvarlak, içlerinde

kromatin maddeleri ihtiva eder (7). Sporogoni safhasında diğer bir görüşe göre primer sporoblastlarda çekirdek bölünmesi görülür. Bunları stoplasma bölünmesi takip eder ve sekunder sporoblast formu oluşur. Devam eden çekirdek bölünmesini hızlı olmaksızın sitoplazmik bölünme takip eder ve çok çekirdekli tersiyer sporoblastlar veya cytomerler oluşur. Böylece sporogoni aşaması sonuçlanır (7).



Şekil 2.2. *Theileria* türlerinin hayat siklusu (28). **1** Sporozoitler ixodid kenenin kan emmesi esnasında enjekte edilir. **2** yeni bölünmüş lenfositin içinde merozoitler oluşur. **3** Serbest motil motil merozoitler eritrositlerin içine girer. **4** eritrosit içinde (düşük oranda). **5** Az sayıdaki merozoitler diğer eritrositlere girer. **6** Küresel ve ovoid safhaların oluşumu (ör: gamontlar) ***7,8*** Kenenin bağırsağındaki kan kitlesinin içindeki serbest gamontlar. **8.1-8.4** dört çekirdekli form (**8.2***)* tek çekirdeklinin bölünmesi ile **9 10 11-13** Kenenin bağırsak hücrelerinin içinde ovoid hareketsiz zigottan hareketli formun oluşumu. Zigot içinde gelişen kinet genişlemiş vakuolün (*IV)* içine doğru çıkıntı yapar. *Theileria parva* kinetlerinde (**13**) çekirdeğin bölünmesi bağırsak hücresinden ayrılmadan başlar. **14** *Ixodid* kenenin gömlek değiştirmesinden sonra ve yeni bir konağa tutunduğunda, kinetler tükürük bezinin hücrelerinin stoplazmasına girer ve gelişim ve tekrarlanan çekirdek bölünmeleri ile genç sporont oluşur. **15** Parazitizm konak hücresinin ve çekirdeğinin büyümesine sebep olur. Büyümüş konak hücresi içinde sporonttan binlerce sporozoit oluşur. Sporozotiler bir sonraki beslenmede nakledilir. *AV,* tükürük bezinin alveolar hücreleri; *BI, E,* eritrosit; *IV,* iç vakuol; *KB, N,* çekirdek; *NH,* konak hücre çekirdeği; *SP, SPO,* sporont; *TH,* diken benzeri yapı; *YS,* genç sporont.

2.4. Ruminantlardaki *Theileria* Türleri

Sığır ve mandalarda, *Theileria parva, T. annulata, T. mutans, T.taurotragi, T. velifera, T. sergenti/buffeli/orientalis* olmak üzere altı *Theileria* türü bulunmaktadır. Bu türler arasında patojenite, morfolojik, biyolojik ve genetik yönlerden önemli farklılıklar vardır. Bunlardan *T. parva* ve *T. annulata* en patojen iki tür olup, sığırlarda lenfoproliferatif karakterde, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden hastalıklara neden olurlar (29).

Koyun ve keçilerde ise *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. separata* ve bunun yanında *T. uilenbergi, T. luwenshuni* türleri theileriosisi meydana getirmektedir. *T. lestoquardi, T. luwenshuni* ve *T. uilenbergi*'nin yüksek patojeniteye sahip türler olduğu, koyun ve keçilerde ölümcül enfeksiyonlara sebebiyet verdiği bildirilmiştir. *T. ovis* ve *T. separata* ise düşük patojenitede subklinik enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Bunun yanında, *T. sp. MK, T.sp. OT1, T. sp. OT3* gibi genotipleri tespit edilmiştir. Ancak bu genotiplerin patojeniteleri hakkında detaylı bilgiler bulunmamaktadır (30-33).

2.5. Theileriosis'te Virulens ve Patoloji

Theileriosis'in virulensinde bir çok faktörün etkili olduğundan söz edilebilir. *Theileria spp.*, konak makrofajlarına yerleştikten sonra direkt immun saldırılardan korunmaktadır. *Theileria spp.*'nin virulensi, enfekte konak hücresinin immortalize olmasıyla ve proimflamatör sitokinler ve matrix metalloproteinazlar (MMPs) gibi patojenik effektör molekülleri ile daha da artmaktadır. Sitokinler, harabiyet gibi bir dizi etkiye sahip iken MMPs'ler, basal membranları geçerek metastatik fenotipin oluşmasına yol açmaları ve enfekte hücrelerin pasajlanmasını kolaylaştırma gibi bir takım patolojik olaylardan sorumludurlar. MMPs'ler bunun yanında şiddetli enfeksiyonlarda ülseratif lezyonlara da karışırlar. *Theileria* türlerinde attenüasyona, in vitro kültürlerde parazit populasyonlarının genotipindeki azalmanın sebep olduğuna inanılmakta olup bu fenotip, sığırlar aşılandığında parazitle nakledilmektedir (34-37).

Theileriosis'in patolojisi, çeşitli faktörlerin etkilediği kompleks bir olaydır. Virulensin derecesi, konak ve/veya parazitolojik faktörlere bağlıdır. Sporozoitler tarafından başlatılan öldürücü virulent bir enfeksiyon şu tipik bulgularla karakterizedir: Yüksek ateş (> 41 ^{o}C, 5 gün veya daha fazla), yüksek piroplasm parazitemisi (>50%), % 20- % 40 arasında değişen düşük dereceli hematokrit ve lenf nodülerinin biyopsisinde %10'un üzerinde şizontların

görülmesi. Böyle bir hayvanda 3-4 gün içinde ölüm meydana gelebilir. Öldürücü olmayan kronik bir enfeksiyonda ise; ateş yoktur, %10 dan daha az piroplasm parazitemisi, %25 in üzerinde hematokrit değeri ve %10 dan az şizontlar görülmektedir. Eğer enfeksiyon ölümle sonuçlanırsa, parazit virulent, eğer parazitler saptanamaz ve ateş hafif ise avirulenttir (34-37).

İlk semptomların saptanma zamanı 4.-14. gün arasında değişmekte olup, 2-4 haftadan sonra ölüm görülebilmektedir. Başlangıçta lenf nodülü, kene kan emdikten sonra şişer ve birkaç gün sonra şizontların görülmesiyle beraber lenf adenopati gelişir. Hastalığın ilerlemesi sonucu anorexia ve kaşeksi görülür. Ateşin süresi ve şiddeti virulensin tespitinde en önemli belirleyicidir. Hastalığa eşlik eden diğer genel semptomlar; letarji, depresyon, oküler ve nasal mukus üretimi ve pulmoner ödemdir. Birçok vakada gastrointestinal sistemde ülserasyon ve seröz ve müköz membranlarda hemoraji görülmektedir. Hastalığın ilerlemiş veya son dönemlerinde lökopeni, ikterus ve ileri derecede hemolitik anemi görülür. Bazı hayvanlarda uzun bir iyileşme periyodu görülür fakat bu tür vakalarda kalıcı bir zayıflık ve kısırlık gelişebilir (34-37).

2.6. Theileriosis'te Klinik Belirtiler

Theileriosis'in klinik belirtileri enfekte kenenin kan emmesinden, ortalama 5-9 gün sonra ortaya çıkar. Hastalığın seyri, parazit suşunun virulensi ve hayvanın direncine göre perakut, akut, subakut, kronik ve hafif seyirli olabilir (38-40).

Theileriosis'e yakalanmış hasta hayvanlarda en çok görülen akut hastalık formda; ilk beş günde vücut ısısının 41-42 ^{o}C'ye kadar yükseldiği görülür. Ateş devamlı veya geçici olup 15-20 gün devam eder. İştahsızlık, ruminasyonun durması, göz kapakları ve yüzeysel lenf yumrularının asimetrik olarak şişmesi, göz konjiktivasında ve mukozalarda peteşiyel kanamalar, ağız, göz ve burun akıntısı, nabız ve solunumda artış ile zayıflık, güçsüzlük görülür. Birkaç gün içinde ciddi bir anemi oluşur. Bazen hemoglobinüri görülebilir. Bilirubinuri ve bilirubinemi mecuttur. Hasta hayvanlarda laktasyon durur, gebelerde abort görülür. Ateşin başlangıcında gaita katı iken hastalığın ilerlemesiyle ishal başlar. Hastalık uzarsa ishal kanlı ve mukuslu olabilir. Dışkıda kan lekeleri görülebilir. Bu semptom theileriosis'e özgü olup, abomasum ve sindirim sistemindeki kanamaların başlangıcının bir işaretidir. Akciğer, karaciğer, böbrek, sindirim sistemi, adrenal bezlerde hücresel

infiltrasyon ve küçük nekroz odakları meydana gelir. Şiddetli durumlarda ateş yükselmesinden sonra 8-15 gün içinde ölüm görülür (38-40).

Kronik seyirde; değişken ateş, anemi, ikterus ve zayıflama görülür, hayvanlarda süt verimi düşer (38-40).

2.7. Theileriosis'te Bağışıklık

Protozoonlara karşı immun yanıt oluşmasında, konağın türü, ırkı, yaşı, fizyolojik durumu ile parazitin suşu önem taşımaktadır. Kenelerle doğal şekilde bulaşmayı takiben theileriosis'ten kurtulan hayvanlar parazitin reinfeksiyonuna karşı bağışıklık kazanmaktadır. Enfeksiyondan kurtulan hayvanlarda şizont formlar hemen kaybolmaz, dokularda uzun süre kalır. Bu durum, parazite karşı oluşan bağışıklığın, eritrositer formlara karşı değil de şizont formlara karşı oluştuğunu göstermektedir (41).

Sporozoitler, lenfositlerin sinyal iletim mekanizmasını bozarak sürekli IL-2 üretmelerine,bu da lenfositlerin kontrolsüz olarak çoğalmasına neden olur. Ancak bu aşamada, sitotoksik-T lenfosileri, enfekte hücrelerin üzerinde Major Histocompatibility Complex-(Büyük Doku Uyuşum Kompleksi-MHC) sınıf-I molekülleriyle sunulan parazit antijenlerini tanıyarak, infekte hücreleri öldürür. Aktive olan makrofajlardaki en öldürücü mekanizma; L-argininden NO üretimidir. NO ve reaktif oksijen radikallerinin reaksiyonu ile ortaya çıkan nitrojen radikalleri, bir çok protozoon üzerinde çok etkili bulunmuştur (42).

Ruminantlarda sporozoit, trophozoit, makroşizont ve merozoit olmak üzere parazitin bütün formlarına karşılık immun yanıt oluşur. Spesifik olarak şekillenmiş antikorlar sporozoitleri nötralize eder veya fagosite edilmelerini artırır. Bununla beraber theileiosis’e karşı korumada hücresel bağışıklık çok daha önemlidir. Bağışıklıkta asıl etkili olan hücreler NO üreten sitostatik makrofajlardır. Hastalığın üstesinden gelebilmek, makrofaj ve salgılarının etkilerine bağlıdır. Direnç, aktive olmuş makrofaj ürünleriyle ilgilidir (43).

Theileriosise karşı koruyucu bir bağışıklığın oluşabilmesinin, doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık arasındaki işbirliğine bağlı olduğu gösterilmiştir. Doğal bağışıklıkta makrofajlar, sporozoit enfeksiyonu veya sporozoit verilerek oluşturulan bağışıklıktan sonra devamlı olarak anti-makroşizont aktivitesi gösterirler. Primer enfeksiyonun iyileşme döneminde doğal öldürücü hücreler (Natural Killer–NK) şizontlarla enfekte hücreleri lize

ederler. Ruminantlardan primer ve deneysel enfeksiyon sırasında alınan makrofajların TNF-α ve NO ürettikleri saptanmıştır. Bu iki faktörün üretiminin, kültürdeki hücrelerin INF-γ'ya maruz kalmasıyla arttığı tespit edilmiştir (44).

İn vitro olarak, IFN-γ, IFN-α ve IL-1, IL-2 gibi sitokinlerin trophozoitlerle enfekte hücrelerin makroşizontla enfekte hücre hatlarına dönüşmelerini engellediği bildirilmiştir. Buna karşılık şizontla enfekte hücrelerin çoğalmalarına ise etkisiz kaldığı gözlenmiştir. Çoğalmakta olan parazitler muhtemelen NK hücrelerini IFN-γ ve makrofajları da TNF-α üretmek için stimüle etmekte ve böylece primer ve deneysel enfeksiyonun erken döneminde NO sentezini hızlandırmaktadırlar. Çünkü makroşizontlarla enfekte hücreler NK hücre aktivitesinin bir stimülatörü olan IFN-α'yı üretmektedirler (44).

Makrofaj ve NK hücre aktivitesinin primer enfeksiyon sırasında parazit yükünü azaltmasına neden olmakta ve öldürücü olmayan enfeksiyonların stimülasyonla deneysel enfeksiyonlara karşı direnç şekillendirmesini mümkün kılmaktadır. Bütün bu koşullar altında deneysel enfeksiyona karşı oluşan direnç, özgün olmayan etkili mekanizmaların antijene karşı spesifik bir aktivasyon göstermesi sonucu oluşmaktadır (44).

Nitrik oksit'in, in vitro olarak, sporozoitlerin sığır hücrelerine invazyonunu ve trophozoitlerle enfekte hücrelerin, makrofajlarla enfekte hücre hatları haline dönüşmesini ve makroşizontlarla enfekte hücre hatlarının çoğalmasını inhibe ettiği, hücreler içerisindeki makroşizontların yok olduğu ve konak hücrenin apoptopic bir şekil kazandığı bildirilmiştir. Bütün bunların makrofajlara bağımlı doğal bağışıklık mekanizmalarıyla (T helper/yardımcı-1 hücre cevabının IFN-γ'yı üretmesi ve makrofajın aktivasyonunu değiştirmesi) theileriosisin kontrol edebileceği belirtilmiştir (45).

Monositlerde çoğalmakta olan parazitler, muhtemelen NK hücrelerini, IFN-γ'yı ve makrofajları da TNF-α üretmek için stimüle etmekte ve böylece primer veya deneysel enfeksiyonun erken döneminde, NO sentezini hızlandırmaktadırlar. Çünkü makroşizontlarla enfekte hücreler, NK hücre aktivitesinin bir stimülatörü olan IFN-α üretmektedirler. İn vitro olarak uyarılabilen doğal bağışıklık mekanizmalarının hızı (özellikle doğal veya deneysel enfeksiyonlarla T hücrelerince oluşturulan antijene özgü yanıtların şekillenmesi arasındaki dönemde) makrofaj ve NK hücre aktivitesinin primer enfeksiyon sırasında parazit yükünün azalmasına neden olur. Öldürücü olmayan enfeksiyonların stimülasyonuyla, deneysel

enfeksiyonlara karşı direnç geliştirmelerini mümkün kılar. Bütün bu koşullar altında deneysel enfeksiyona karşı oluşan direnç, özgün olmayan etkili mekanizmaların antijene karşı spesifik bir aktivasyon göstermesi sonucu oluşmaktadır (45).

2.7.1. Doğal Bağışıklık

Mukozal yüzeylerden vücuda giren protozoonlara, doğal savunmayı sağlayan mekanizmalar engel olmaktadır. Ancak vektörlerle taşınan çoğu protozoon türü, vücuda direkt olarak kan dolaşımından girmektedir. Dolayısıyla böyle etkenlere karşı mukozal savunma faktörlerinin hiçbir etkisi olmamaktadır. Protozoon enfeksiyonlarıyla ilgili en önemli doğal savunma faktörü, genetik düzeydeki doğal dirençtir (46).

Theileriosise karşı koruyucu bir bağışıklığın oluşabilmesinin doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık sistemlerinin arasındaki işbirliğine bağlıdır. Doğal bağışıklıkta rol oynayan hücrelerden biri de makrofajlardır. Bunlar sporozoit enfeksiyonu ve hücre hatları ve sporozoit verilerek oluşturulan bağışıklıktan sonra devamlı olarak anti-makroşizont aktivitesi göstermektedir. Primer enfeksiyonun iyileşme döneminde doğal öldürücü hücreler (NK) de işe karışmaktadır. Bu hücreler, şizontla enfekte hücreleri lize ederler. Sığırlardan primer ve deneysel enfeksiyon sırasında alınan makrofajlar, TNF-α ve Nitrik Oksit üretmişlerdir. Bu iki faktörün her ikisinin üretimi de, kültürde hücrelerin IFN-γ'ya maruz kalmasıyla artış göstermiştir. IFN-γ, IFN-α, TNF-α ve IL-1, IL-2 gibi sitokinler trofozoitle enfekte hücrelerin, makroşizontla enfekte hücre hatlarına dönüşmelerini in vitro olarak engellemişlerse de şizontla enfekte hücrelerin çoğalmaları üzerine bir etkileri olmamıştır. Nitrit Oksit ise in vitro olarak sporozoitlerin hayvanların hücrelerine invazyonunu ve trofozoitlerle enfekte hücrelerin makrofajlarla enfekte hücre hatları haline dönüşmesini engellemiştir. Nitrik Oksit, aynı zamanda makroşizontlarla enfekte hücre hatlarının çoğalmasını, hücreler içerisindeki şizontların kaybolması ve konakçı hücresinin apoptopik bir şekil kazanmasına da yol açmıştır. Bütün bunlar makrofajlara bağımlı doğal bağışıklık mekanizmalarının theileriosisin kontrol edebileceğini göstermektedir (47, 48).

Çoğalmakta olan parazitler, muhtemelen NK hücrelerini IFN-γ ve makrofajları da TNF-α üretmek için stimüle etmekte ve böylece primer ve deneysel enfeksiyonun erken döneminde Nitrik Oksit sentezini hızlandırmaktadır. Çünkü makroşizontlarla enfekte

hücreler, NK hücre aktivitesinin bir stimülatörü olan IFN-α'yı üretmektedirler. In vitro olarak uyarılabilen doğal bağışık mekanizmalarının hızı, makrofaj ve NK hücre aktivitesinin primer enfeksiyon sırasında parazit yükünü azaltmasına neden olmakta ve öldürücü olmayan enfeksiyonların stimülasyonla deneysel enfeksiyonlara karşı direnç şekillenmesini mümkün kılmaktadır. Bütün bu koşullar altında deneysel enfeksiyona karşı oluşan direnç, özgün olmayan etkili mekanizmaların antijene karşı spesifik bir aktivasyon göstermesi sonucu oluşmaktadır (49).

2.7.2. Hücresel Bağışıklık

Theileria türlerinin makroşizontlarıyla enfekte hücreler, hastalığa maruz kalmamış hayvanların perifer kanından elde edilen T-lenfositlerinin çoğunu aktive etme yeteneğine sahiptirler. Bununla beraber özgün olmayan T-lenfosit aktivasyonunu arttırmak için *Theileria* türlerinin makroşizontlarıyla enfekte hücreler, bağışık hayvanlardan alınan parazite özgü T- hücre hatlarının kurulmasını bloke edecek kadar güçlüdür. Eğer esas T-hücre yanıtını bloke eden ve özgün olmayan bu aktivasyonun engelleyici etkisi esas bağışıklık yanıtının gelişmesi sırasında oluşursa bu durum, gelişmekte olan hastalık etkenleriyle başa çıkmada rol oynayan immün yanıtı ciddi bir şekilde etkileyebilir (41).

Enfekte hücreler tarafından T-hücrelerinin özgün olmayan aktivasyonu normal bağışıklığın gelişmesini bloke edici etkisine ilaveten T-hücrelerince üretilen sitokinleri de çok önemli ölçüde değiştirmiştir. T- hücrelerinin in vitro olarak *Theileria* türlerinin makroşizontlarıyla enfekte edilmiş hücreler tarafından uyarıldıkları zaman ürettikleri sitokinler IL-2 ve IFN-γ'dır. Esas enfeksiyon esnasında, efferent lenfte sitokin yanıtları analiz edildiğinde, IFN-γ üretimi çok yüksek olmasına rağmen IL-2'ye T- hücre yanıtının sadece geçici bir özellikte olduğu görülmüştür. Bağışıklık oluşmuş hayvanlarda, etkili immün yanıt sırasında T-hücrelerinde önemli IL-2 yanıtları görülmektedir. Koruyucu bir özellik taşıyan yanıtta IFN-γ üretimi bağışık hayvanların yanıtları esnasındakinden 20 kattan daha fazla bir miktardadır. IFN-γ, parazitli hücreleri kontrol ediyor görülmekte ve belki de enfekte makrofajların büyümesine yardım etmektedir. Çünkü IFN-γ üretiminin en üst düzeye ulaştığı dönemde çok sayıda makrofaj, hücre siklusuna girmektedir (41).

2.7.3. Humoral Bağışıklık

Theileriosis'ten kurtulan hayvanların kan dolaşımında bulunan bazı *Theileria* antijenlerine (sporozoit, şizont, merozoit, piroplasm gibi) in vitro olarak reaksiyon veren spesifik antikorlar oluşmaktadır. Bu antikorlar kolostrumla yavruya da geçmektedirler. Sporozoitlerle enfeksiyonu takiben şizont antijeni kullanarak *Theileris* türlerine karşı oluşan antikorlar ilk olarak 10.-14. ve piroplasm antijeni kullanarak da 15.-21. günlerde tespit edilmektedirler. Antikor düzeyi, hastalıktan kurtulan hayvanlarda enfeksiyon başlangıcından sonraki 40.-50. günlerde en yüksek titreye ulaşmaktadır. Yüksek antikor titresi, aniden çok düşük düzeylere inmekle beraber bu titrelerde de uzun süre (1 yıldan daha uzun olabilir) pozitif reaksiyonlar alınmaktadır (42).

Virulent olmayan (tam attenue) şizontlar, duyarlı sığırlara inoküle edildiklerinde klinik bir semptom ve parazitemiye neden olmazlar. Enfeksiyon döneminde sporozoitler veya şizont içeren hücrelerin inoküle edilerek uyarılması sonucu sporozoit, şizont ve merozoitlere karşı antikor oluşmuştur. Bununla beraber bu antikorlar, theileriosisin oluşmasını engelleyememiştir. Çünkü eğer çok az sayıda sporozoit dahi antikorların nötralize edici etkilerinden kurtulursa bunlar, takiben konakçı hücrelerini istila edip, makroşizontları oluştururlar. Antikorlar konakçı hücreleri içerisindeki parazitlerin gelişmelerini kontrol etmede önemli bir role sahip değillerdir. Şizont içeren lökositlere ve eritrositlere karşıda her hangi bir antikor oluştuğu tespit edilememiştir (50).

Attenue ve canlı şizontların inokülasyonlarını izleyen 35.-49. günlerde tespit edilen yüksek antikor titresi, attenue şizontların lenf sisteminde lenfositlere girdiğini ve sınırlı bir üreme de göstererek spesifik bağışıklık mekanizmasını stimüle ettiğini göstermektedir *In vitro* ortamda immün serum içerisinde *Theileria* türlerine karşı oluşan ve sporozoitleri nötralize eden antikorlar saptanmıştır. Bu antikorlar, sporozoitlerin lenfositlere girişini engellemekte ve onları nötralize ederek etkisiz hale getirmektedir (42). Öte yandan immun serumun, enfekte eritrositlerden izole edilen serbest merozoitlere karşı da reaksiyon verdiği ve onları opsonize ettiği saptanmıştır (50).

Sonuç olarak, konakçıda trofozoit, sporozoit, makroşizont ve merozoit olmak üzere parazitin bütün formlarına karşı bir immun yanıt oluşur. Spesifik olarak şekillenmiş antikorlar, sporozoitleri nötralize eder veya fagosite edilmelerini arttırır. Bununla beraber

tropikal theileriosis'e karşı korumada hücresel bağışıklık çok daha önemlidir. Hastalığın üstesinden gelmek makrofaj ve salgılarının faydalı ve zararlı etkileri arasındaki dengeye bağlıdır (51).

2.8. Theileriosis'te Teşhis

Theileriosisin teşhisinde; 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 (52, 53).

2.8.1. 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 (54, 55). Mikroskobik muayene için alınan kanın vena jugularis yerine, kapillar damarların geçtiği kuyruk ucu veya kulak ucundan alınması tercih edilmelidir. Çünkü *Theileria* 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 (54, 55).

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 (54, 55). 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 (54, 55). 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.

2.8.2. Serolojik Testler

Theileriosis'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 (54, 56). Akut theileriosisli 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 *Theileria* türleri arasında çapraz reaksiyonların şekillenebildiği bildirilmiştir (54, 56)

Theileriosis'in serolojik olarak teşhisinde ilk olarak kullanılan test CFT testidir. Fakat bu testin duyarlılığı düşüktür (57, 58). Bu teste göre duyarlılığı ve güvenilirliği daha fazla olan IFAT tekniği theileriosis'in teşhisinde en sık kullanılan serolojik testlerdendir. Ancak bu testte *Theileria* türleri kendi aralarında çapraz reaksiyonlar verebilmektedir (59-61).

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 (62-64).

2.8.3. 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 theileriosisin teşhisinde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır (54, 55, 64).

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 (65, 66). 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 (54, 55). 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 (54, 55).

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.

2.9. Theileriosis'te Tedavi ve Kontrol

Theileriosis tedavisinde parvaquon, buparvaquon ve halofuginon gibi etken maddeler sıklıkla kullanılır. Parvaquon; 10 mg/kg dozunda kas içi enjeksiyonla 2 veya 4 gün aralıklarla 2 defa kullanılır. Kalıntı süresi ette 28 gün sütte 14 gündür. Buparvaquon; Türkiye de sıklıkla kullanılan ilaçlar arasındadır. 2,5 mg/kg dozunda kas içi enjeksiyonla tatbik edilir, 2 veya 4 gün ara ile iki kez uygulanır. Parvaquon ve Buparvaquon sadece erken zamanda verildiğinde şizontlara etkilidir. Bir sürüde ilk olgunun ortaya çıkmasında sürünün diğer hayvanlarında da günlük vücut ısı ölçüm takiplerinin yapılması tavsiye edilir ve ateşin ilk ortaya çıkmasında tedavi edilir. Halofuginon' da 1,2 mg/kg 500 ml sıvı ile per-os yolla uygulanır fakat terapötik genişliği çok dar olduğundan pek tavsiye edilmez (2).

Akarisitler kullanılarak kene mücadelesi yapılması ve sıkı kene kontrolü, kemoterapi, immünizasyon ve bakım-besleme şartlarının iyileştirilmesi ile hastalık kontrol altına alınabilir (43).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SAHA ÇALIŞMALARI

3.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmanın materyalini, 2009-2010 yılları arasında Kayseri yöresindeki 160 sığır, 105 manda, 60 koyun ve 35 keçiden alınan alınan kan örnekleri oluşturmuştur. Hayvanlara ait bilgiler (yaş, cinsiyet vb.) hayvan sahiplerinden alınmış ve genel sağlık durumları kaydedilmiştir (Tablo3.1).

3.1.2. Kan Örnekleri

Rastgele seçilen 160 sığır, 105 manda, 60 koyun ve 35 keçinin *vena jugularis*'inden tekniğine uygun olarak 5 ml'lik steril EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) tüplere kan alınmış ve örnekler soğuk zincirde taşınarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Protozooloji-Entomoloji Bilim Dalı Laboratuarı'na getirilmiştir. Laboratuara getirilen kan örneklerinin herbirine protokol numarası verilmiştir. Kan örneklerinden mikroskobik inceleme için preparatlar hazırlanmış ve analizleri yapılıncaya kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1. Kayseri yöresinde incelenen ruminantların yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Hayvan türü	Cinsiyet		Yaş (Yıl)			Toplam
	Dişi	Erkek	≤2	3-5	≥6	
Sığır	142	18	23	96	41	160
Manda	80	25	18	57	30	105
Koyun	52	8	11	34	15	60
Keçi	23	12	7	17	11	35

3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Mikroskobik İnceleme

Hayvanların vena jugularis'inden alınarak EDTA'lı tüpler içerisinde laboratuara getirilen kan örneklerinden her bir hayvan için sürme preparatlar hazırlanmıştır. Frotiler havada kurutulduktan sonra metil alkolde 5 dakika tespit edilmiş ve %5'lik Giemsa boya solusyonu (pH 7.2) içerisinde oda sıcaklığında 40 dakika süreyle boyanmıştır. Süre sonunda boyanan preparatlar hafifçe akan musluk suyu altında yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar, kuruduktan sonra ışık mikroskobu altında immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile *Theileria* türleri yönünden incelenmiştir.

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

Hayvanların kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Protozooloji-Entomoloji Bilim Dalı Laboratuarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Analize tabi tutulana kadar -20°C'de muhafaza edilen örnekler ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden DNA ekstraksiyonu, Axygen Firmasına ait AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit'inin prosedürüne göre yapılmıştır. Kullanılan ticari kitin içeriği Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ticari Kitin İçeriği

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

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

1. İşleme başlamadan önce, kan örnekleri vorteksle homojenize edildi. İşlenecek numune sayısına göre, örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine hayvanlara ait protokol numaraları yazıldı. Kit içerisinde bulunan Buffer TE, önceden ısısı 65 ^{o}C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konuldu.
2. 1.5 ml'lik ependorflara 500 µl Buffer AP1 eklendi.
3. Herbiri farklı sığıra ait kan örneklerinden 200 µl kan, pipetle alınarak protokol numaralarına göre ependorflara ilave edildi. Tüplerin ağızları kapatılarak 10 saniye vortekslendi.
4. İyice vortekslenen örneklerin üzerine 100 µl Buffer AP2 ilave edilerek ependorf tüpleri tekrar vortekslendi.
5. Örnekler oda ısısında 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücresel kısımların dibe çökmesi sağlandı.

6. Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine miniprep kolon yerleştirildi. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınarak miniprep kolonlar içerisine konularak 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifügasyon sonucu, süpernatant içerisinde parazite ait genomik DNA varsa, bunlar DNA'yı tutma özelliğinde olan miniprep column'da kaldı ve geri kalan süpernatant da 2 ml'lik ependorfların dip kısımlarına süzüldü. Dibe çöken süpernatantlar döküldü ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. Miniprep kolonlar içerisine ilk yıkama solusyonu olan 700 µl Buffer W1A ilave edilerek oda ısısında 2 dakika bekletildi. Sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Miniprep kolondan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırıldı. Miniprep kolonlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. İçerisine ikinci yıkama solusyonu olan Buffer W2A'dan 800 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılarak miniprep kolonlar bu tüplere geri yerleştirildi. Bu basamakta ikinci yıkama solusyonu Buffer W2A'dan 500 µl eklenip 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tekrar yıkama işlemi yapıldı. Bu son yıkama opsiyonel olarak yapılan bir işlem olup sekanslama işlemlerinde problem teşkil edebilecek tuz ve enzimlerin tamamen elimine edilmesi amacıyla yapılmıştır.
10. Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirildi. Herhangi bir solusyon eklenmeden boş tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solusyonları içerisindeki ethanolün tamamen uçması sağlandı.
11. Herbir örneğe ait miniprep kolonlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine, önceden 65 ^{o}C'lik su banyosuna konulmuş olan Buffer TE'den 80 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 ^{o}C) muhafaza edildi.

3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reverse Line Blotting testinin yapılabilmesi için gerekli amplikonların elde edilmesi amacıyla PCR işlemi yapılmıştır. PCR solusyonları, herhangi bir kontaminasyonun önüne geçmek amacıyla ultraviyole (UV) sterilizasyon özelliği olan steril laminer kabinde (Biolaf)

hazırlanmıştır. PCR solusyonlarının hazırlanması esnasında sadece PCR amaçlı kullanılan steril pipetler, pipet uçları ve deiyonize su kullanılmıştır. Çalışma esnasında sürekli steril pudrasız eldivenler kullanılmış ve en ufak bir şüphede dahi eldivenler değiştirilmiştir.

PCR reaksiyonunda primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA (ribosomal RNA) geninin değişken V4 bölgesinden, büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp (base pairs= baz çifti) arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler (Tablo 3.3) kullanılmıştır. Bu reaksiyonda kullanılan primerler Georges ve ark. (67)'nın bildirdiği şekilde kullanılmıştır. RLB işlemi için reverse primeri biotinle işaretlettirilmiştir. Primeler, İontek firmasına sentezlettirilmiştir.

Tablo 3.3. RLB testi amacıyla yapılan PCR'da kullanılan primerler

Primer Adı	**Primer Dizilimi (5'---3')**	**TM* (^{o}C)**
RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	56,9
RLB-R2	biotin-CTAAGAATTTCACCTCTGACAGT	52,2

*TM: Melting Temperature

Liyofilize halde firmadan teslim alınan primerler firmanın önerileri doğrultusunda her birinin konsantrasyonu 100 pmol/ µl olacak şekilde steril deiyonize su ile sulandırılmıştır. Yine firmanın önerileri doğrultusunda sulandırılan primerlerin, sürekli dondurulup çözündülerek zarar görmelerinin engellenmesi ve stok primer solusyonunun kontaminasyon riskinin önlenmesi amacıyla 0,5 ml'lik bir ependorf tüpüne stok primer solusyonundan 30 µl miktarında primer solusyonu hazırlanarak ana stok solusyon parsellenmiştir. Bu 30 µl'lik primer solusyonu bittiğinde ise esas primer stoğundan tekrar aynı miktarda hazırlanmıştır.

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

PCR reaksiyonu için karışım hazırlanırken Georges ve ark. (67) ve Gubbels ve ark. (68) tarafından bildirilen miktarlar modifiye edilmiş ve uygun bir optimizasyon sağlanmıştır.

Reaksiyon için 50 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Bu reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	**Miktarları** (µl)
10XTaq buffer (with $(NH_4)_2SO_4$, 1,25 ml)	5
$MgCl_2$ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM each)	1
RLB-F2 primeri (100 pmol/ µl)	0,7
RLB-R2 primeri (100 pmol/ µl)	0,7
Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 u/ µl, 500 u)	1
Deiyonize su	32,6
Genomik DNA	5
TOPLAM HACİM	50

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler thermal cycler cihazına (Thermo Hybaid) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. Amplifikasyon için gerekli PCR şartları Tablo 3.5'da verilmiştir.

Tablo 3.5. PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar

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

3.2.4. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi

PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen amplikonların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (CLP) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 1XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solusyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinin doldurulmasında kullanılmıştır.

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

3.2.5. Reverse Line Blotting (RLB)

3.2.5.1. RLB Problarının Seçimi

RLB'de kullanılacak problar, negatif yüklü olan Biodyne C membrana (Pall Biosupport group, Ann Arbor, MI) kovalent olarak bağlanabilmeleri için, 5'- uçlarında amino grubu (N-terminal N-trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl phosphoramitide (TFA)-C_6 aminolinker) içerecek şekilde Genset (Fransa), Isogen (Hollanda) ve MWG (Almanya) firmalarına sentezlettirilmiştir. Probların sekans dizilimleri, Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. RLB Problarının Sekans Dizilimleri

Özgün Türler	Prob dizilimi (5'---3')	Kaynak
Theileria ve *Babesia* Türleri (Catch All)	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG	67, 68
Theileria spp.	TGATGGGAATTTAAACC(CT)CTTCCA	69
T. annulata	CCTCTGGGGTCTGTGCA	67, 68
T. buffeli/orientalis	GGCTTATTTCGGWTTGATTTT	67, 68
T. ovis	TTTTGCTCCTTTACGAGTCTTTGC	69
T. lestoquardi	ATTGCTTGTGTCCCTCCG	70

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

3.2.5.2. RLB Membranın Hazırlanması

RLB için membranın hazırlanması şu şekilde yapılmıştır:

1. Problar optimum konsantrasyon için 100-500 pmol/150 µl oranlarında sulandırıldı. Sulandırmada pH'sı 8.4 olan 500 mM'lık $NaHCO_3$ kullanıldı.
2. Membran oda ısısında, taze hazırlanmış 10 ml %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) içerisinde 10 dakika aktive edildi ve sonra su ile yıkandı.
3. Membran yıkama işleminden sonra MN45 miniblottera (Immunetics, Cambridge, Mass) yerleştirildi. Miniblotterın vidaları sıkılandı ve fazla su slotlardan vakumla uzaklaştırıldı.
4. Miniblotterın ilk ve son kanalı 2X SSPE ile 1:100 oranında sulandırılmış mürekkep, diğer kanalları ise 150 µl sulandırılmış oligonükleotid solusyonu ile dolduruldu.
5. Tüm örnekler konduktan sonra oda ısısında 2-3 dakika inkübe edildi.
6. İnkubasyondan sonra oligo solusyonları dolduruğu şekilde uzaklaştırıldı.
7. Membran pens yardımıyla miniblotterdan uzaklaştırılarak 100 mM'lık NaOH içinde 10 dakika inkübe edildi. Bu sürenin aşılmamasına dikkat edildi. Çünkü 10 dakikadan fazla süren inkübasyonlarda zayıf sinyal hibridizasyonu meydana gelmektedir.
8. Membran 2X SSPE/0.1 SDS içerisinde 60 °C'de 5 dakika boyunca yıkanarak kullanıma hazır şekle getirildi.

3.2.5.3. RLB Hibridizasyonu

RLB hibridizasyonu şu şekilde yapılmıştır:

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

14. Görüntüleme amacıyla karanlık odada asetatın üzerine ECL filmi koyuldu ve sinyal yoğunluğuna göre 1 dakika ile 10 dakika arasında film asetatın üzerinde tutuldu.
15. ECL film daha sonra banyo edildi.

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

3.2.5.4. Membranın Temizlenmesi ve Muhafazası

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

3.2.5.5. RLB'de Kullanılan Solusyonların Hazırlanması

1. 2 X SSPE/0.5SDS: 100 ml 20X SSPE+50 ml 10 % SDS +2 ml 0,5 M EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır.
2. 2 X SSPE/0.1 SDS: 100 ml 20X SSPE+10 ml 10 % SDS +2 ml 0.5 M EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır.
3. %10 SDS : 10g SDS'in üzeri deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.
4. 20 X SSPE: 175,35 g NaCl+27,6 g $NaH_2PO_4(H_20)$+7.45g EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır. 10 N'lik NaOH ile pH 7.4 olacak şekilde ayarlanır. Kaynatılarak tamamen çözünme sağlanır.
5. %16 EDAC: 1, 6 g EDAC'ın üzeri 10 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.
6. 500 mM $NaHCO_3$: 42 g $NaHCO_3$'ün üzeri deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır. pH'sı 8,4 olarak ayarlanır.
7. 10 N NaOH: 40 g NaOH'ın üzeri deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.2.6. Jelden Ekstraksiyon İşlemi

Pozitif numunelerin *18S rRNA* gen bölgesini amplifiye eden primerle yapılan PCR sonucu ürünler, %1,5'lik agarozda yürütülmüştür. Jelin hazırlanmasında 1XTAE solusyonu kullanılmış ve dökülen jel donup elektroforez tankına yerleştirildikten sonra taraklar çıkarılmıştır. İlk kuyucuğa DNA ladder yüklenmiş diğer kuyucuklara da birer boşluk bırakılarak pozitif örneklere ait amplikonlar yüklenmiştir. Yükleme esnasında 10 µl amplikondan alınmış ve herbir amplikon yaklaşık 1 µl 6X loading dye ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Herbiri ayrı sığıra ait amplikonlar kuyucuklara, kontaminasyonu engellemek amacıyla birer boşluk verilerek uygulanmıştır. Ürünler UV ışın altında jel dökümentasyon sistemi ile görüntülenmiş ve 798 bp'lik bantlar ticari High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)'inin önerileri doğrultusunda jelden ekstrakte edilme aşamasına gelinmiştir. Jelden ekstraksiyon işleminin uygulanacağı ticari kitin içeriği Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) İçeriği

Kitin İçeriği	**Miktarı (50 örneklik)**
Binding buffer [3 M guanidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, %5 ethanol (v/v), pH 6,6 (25 ^{o}C)]	30 ml
Washing buffer [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, ph 7,5 (25 ^{o}C)]	50 ml
Elution buffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (25 ^{o}C)]	40 ml
High pure filter tubes	50 adet
Collection tubes	50 adet

Jelden ekstraksiyon işlemi ticari kitin önerileri doğrultusunda şu şekilde yapılmıştır:

1. 798 bp büyüklüğündeki bant jelden steril bir bistüri ucu yardımıyla kesilerek 1,5 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirmeden önce hassas terazide tüp boşken darası alındı.
2. Daha sonra kesilen jel parçası tüp içerisinde iken tekrar tartıldı ve böylelikle jelin ağırlığı hesaplanmış oldu.

3. Jel parçasının ağırlığına göre 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 300 µl binding buffer olacak şekilde solusyon jel parçasının üzerine eklendi.
4. Ependorf tüpü 30 saniye vortekslendi.
5. Önceden 56 ^{o}C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde tüp 10 dakika inkubasyona bırakıldı. Her 2 dakikada bir ependorf tüpü vortekslendi.
6. Tüp içerisindeki agaroz jel parçası tamamen çözündükten sonra 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 150 µl isopropanol olacak şekilde solusyon ilave edilerek tüp iyice vortekslendi.
7. Ticari kitin içeriğinde bulunan toplama tüpleri içerisine high pure filter tüpleri yerleştirildi. Ependorf tüpünün içerisindeki bütün sıvı pipet yardımıyla tamamen bu filtreli tüpün içerisine boşaltıldı.
8. Sıvıyı içeren tüp oda ısısında 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltıldı ve üstteki filtreli tüp tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
10. Özel filtresi sayesinde DNA'yı içine hapseden filtreli tüpün içerisine DNA'yı yıkama amacıyla 500 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırıldı ve filtreli tüp aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
12. İkinci yıkama amacıyla üzerine tekrar 200 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. İkinci yıkama ile sekanslamada muhtemelen problem teşkil edebilecek tuz ve enzim gibi maddeler uzaklaştırılmış oldu.
13. Alta süzülen sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Filtreli tüp bu kez, yeni 1,5 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirildi.
14. Filtrede hapsolan DNA'yı alttaki ependorfa süzmek amacıyla 50 µl Elution buffer ilave edildi. 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı DNA'yı ihtiva eden PCR ürünü olarak, sekanslamaya gönderilinceye kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.2.7. Sekans Analizleri

Sekans analizi için; RLB ile pozitif olarak saptanan ve PCR'da güçlü bant veren (DNA yoğunluğu optimal) 3 adet *Theileria annulata* (Sığır) ve 3 adet *Theileria ovis* (koyun) örneğinin, *18S rRNA* gen bölgesi amplifiye edilip jelden ekstrakte edildikten sonra, primerlerle birlikte İontek İlaç, Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Araştırma, Geliştirme Sanayi ve Ticaret A.Ş. (İstanbul) firmasına gönderilmiştir. Herbir örnek 50 µl hacimde, primerler ise herbir örnek için en az 10 µl hacimde olacak şekilde firmaya iletilmiştir. Primerlerin konsantrasyonları 5 µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin sekans analizleri çift yönlü olarak yaptırılmıştır. Dizilime sonuçları, BioEdit Sequence Alignment programı ile incelenerek örneklerin sekans dizilimleri ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sekans dizilimlerinin internet ortamında Genbank'ta BLAST analizleri yapılarak Dünya'daki ve Türkiye'deki benzer suşlarla identiklik yüzdeleri belirlenmiştir. Örnekler Genebank'a kayıt ettirilmiş ve aksesyon numaraları alınmıştır. Örneklerin filogenetik analizleri ise Mega 4.1 programı ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MİKROSKOBİK BULGULAR

EDTA'lı kan örneklerinden hazırlanan kan frotileri %5'lik Giemsa solusyonu ile boyanmıştır. Frotiler üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskobun x100'lük objektifinde en az 50 saha incelenmiştir. İnceleme esnasında *Babesia* ve *Theileria* türlerine ait bir piroplasmik formun görülmesi durumunda dahi preparat pozitif olarak değerlendirilmiştir. Mikroskobi sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir.

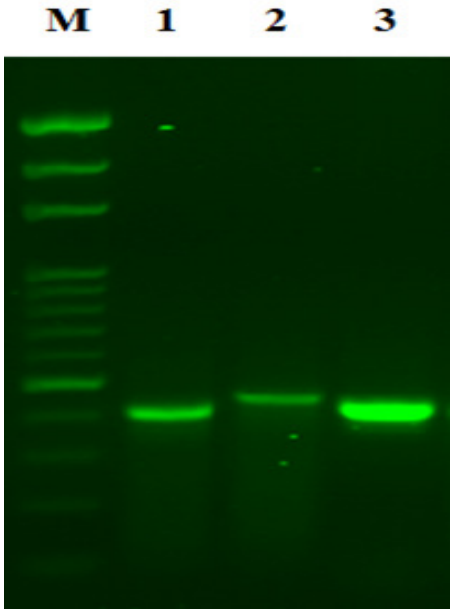
Tablo 4.1. Mikroskobik bakı sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı

Hayvan Türü	**İncelenen Hayvan Sayısı**	***Theileria* spp.**	
		Sayı	**%**
Sığır	160	5	3,13
Manda	105	-	-
Koyun	60	4	6,67
Keçi	35	-	-

Tablo 4.1'deki sonuçlara göre mikroskobik inceleme sonucunda; Kayseri yöresindeki theileriosis prevalansı sığırlarda % 3,13 ve koyunlarda 6,67 olarak tespit edilmiştir.

4.2. PCR SONUÇLARI

Reverse line blotting testinde kullanılacak amplikonları elde etmek amacıyla yapılan PCR reaksiyonunda *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA geninin değişken V4 bölgesinden büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler kullanılarak pozitif bulunan örneklerin %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Theileria* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinden ~390-430 bp'lik bölgenin amplifikasyonunun jel elektroforezde görünümü (Orijinal). M: Marker (100 bp); 1-3: Pozitif örnekler

4.3. RLB SONUÇLARI

RLB testi ile incelenen hayvanların kan numunelerinin sonuçları Tablo 4.2'de gösterilmiştir. RLB sonuçları değerlendirildiğinde; Kayseri yöresinde sığırlarda *T. annulata*'nın prevalansı % 10,63, *T. ovis*'in sırasıyla koyun ve keçilerdeki prevalansı ise % 23,33 ve % 11,43 olarak tespit edilmiştir. Diğer türler ise tespit edilememiştir.

Tablo 4.2. RLB sonuçlarına göre hayvanlardaki *Theileria* türlerinin dağılımı

Hayvan Türü	Hayvan Sayısı	RLB							
		T. annulata		*T. orientalis*		*T. ovis*		*T. lestoquardi*	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Sığır	160	17	10,63	-	-				
Manda	105	-	-	-	-				
Koyun	60					14	23,33	-	-
Keçi	35					4	11,43	-	-

4.4. SEKANS ANALİZİ SONUÇLARI

Sekans analizi için; RLB ile pozitif olarak saptanan ve PCR'da güçlü bant veren (DNA yoğunluğu optimal) 3 adet *Theileria annulata* (Sığır) ve 3 adet *Theileria ovis* (koyun) örneğinin, *18S rRNA* gen bölgesi amplifiye edilip jelden ekstrakte edildikten sonra, primerlerle birlikte İontek İlaç, Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Araştırma, Geliştirme Sanayi ve Ticaret A.Ş. (İstanbul) firmasına gönderilmiştir. Sekans analizleri *18S rRNA* primerleri ile çift yönlü olarak yaptırılmıştır. İontek Firması tarafından kromatogram görüntüleriyle birlikte gönderilen sekans sonuçlarının alignmentları BioEdit programı ile yapılmıştır. Elde edilen sekansların GenBank'a kayıtları yapılmış ve aksesyon numaraları alınmıştır. GenBank'a kayıtları yapılan suşlarının *18S rRNA* gen dizilimleri BLAST programı ile Dünya'daki kayıtlı diğer sekanslarla kıyaslanmıştır. Kıyaslama sonucunda sığırlardan elde edilen 3 *T. annulata* izolatının kendi aralarında %99-100 oranında, dünyadaki benzer diğer izolatlarla ise %98-99 oranında identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Aynı şekilde koyunlardan elde edilen 3 T. ovis izolatının kendi aralarında %98-100 oranında, dünyadaki benzer diğer suşlarla ise %99 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Sekansları elde edilen pozitif örneklerin GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.3'te, nükleotid sekansları ise Şekil 4.2-4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Kayseri yöresindeki sığır ve koyunlardan elde edilen pozitif izolatların GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Gen bölgesi	Konak	Parazit	Aksesyon Numarası
Kayseri-1	*18S rRNA*	Sığır	*Theileria annulata*	HQ197730
Kayseri-2	*18S rRNA*	Sığır	*Theileria annulata*	HQ197731
Kayseri-3	*18S rRNA*	Sığır	*Theileria annulata*	HQ197732
Kayseri-1	*18S rRNA*	Koyun	*Theileria ovis*	HM241892
Kayseri-2	*18S rRNA*	Koyun	*Theileria ovis*	HM241893
Kayseri-3	*18S rRNA*	Koyun	*Theileria ovis*	HM241894

Nükleotid Sekansı

GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAAAGTCTTGTAATTGGAATGATGGGAATTTAAACC
TCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTA
TATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATTGCTTGTGTCCCTCTGGGGTC
TGTGCATGTGGCTTTTTTCGGTCGGAGTTTCTTTGTCCGAATGTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTCA
AAGCAGGCTTTCGCCTTGAATAGTTTAGCATGGAATAATAAAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTTGGTT
TTAGGTACCAAAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCTTTCGTATTTAACTGTCAGAG

Şekil 4.2. *T. annulata* Kayseri-1 izolatının sekans dizilimleri (HQ197730)

Nükleotid Sekansı

GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAAAGTCTTGTAATTGGAATGATGGGAATTTAAACC
TCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTA
TATTAAAATTGTAGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATTGCTTGTGTCCCTCTGGGGTC
TGTGCATGTGGCTTTTTTCGGTCGGAGTTTCTTTGTCCGAATGTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTCA
AAGCAGGCTTTCGCCTTGAATAGTTTAGCATGGAATAATAAAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTTGGTT
TTAGGTACCAAAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCTTTCGTATTTAACTGTCAGAG

Şekil 4.3. *T. annulata* Kayseri-2 izolatının sekans dizilimleri (HQ197731)

Nükleotid Sekansı

GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAAAGTCTTGTAATTGGAATGATGGGAATTTAAACC
TCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTA
TATTAAAATTGTAGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATTGCTTGTGTCCCTCTGGGGTC
TGTGCATGTGGCTTTTTTCGGTCGGAGTTTCTTTGTCCGAATGTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTCA
AAGCAGGCTTTCGCCTTGAATAGTTTAGCATGGAATAATAAAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTTGGTT
TTAGGTACCAAAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCTTTCGTATTTAACTGTCAGAG

Şekil 4.4. *T. annulata* Kayseri-3 izolatının sekans dizilimleri (HQ197732)

Nükleotid Sekansı

GAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGG
AGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCTCT
TCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCAATAGCGTATAT
TAAAAATGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATTGCTTTTGCTCCTTTACGAGTCTT
TGCATTGTGGCTTATTTCGGACTTTGTTTTACAATGTCCGGATGTATACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTC
AAAGCAGGCTTTCGCCTTGAATAGTTTAGCATGGA

Şekil 4.5. *T. ovis* Kayseri-1 izolatının sekans dizilimleri (HM241892)

Nükleotid Sekansı

GAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGG
AGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCTCT
TCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCAATAGCGTATAT
TAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATTGCTTTTGCTCCTTTACGAGTCTT
TGCATTGTGGCTTATTTCGGACTTTGTTTTACAATGTCCGGATGTTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGCTC
AAAGCAGGCTTTCGCCTTGAATAGTTTAGCATGGA

Şekil 4.6. *T. ovis* Kayseri-2 izolatının sekans dizilimleri (HM241893)

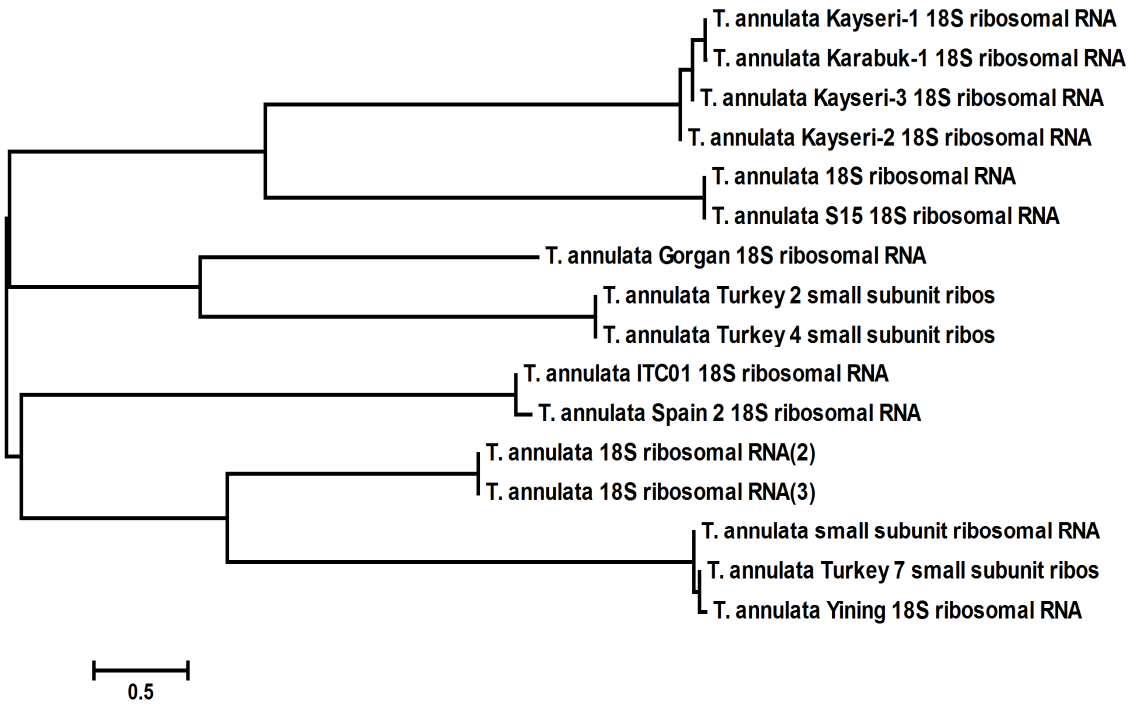
Nükleotid Sekansı

GAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGG
AGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCTCT
TCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTATTTCCAGCTCCAATAGCGTATAT
TAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATTGCTTTTGCTCCTTTACGAGTCTT
TGCATTGTGGCTTATTTCGGACTTTGTTTTACAATGTCCGGATGTTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGCTC
AAAGCAGGCTTTCGCCTTGAATAGTTTAGCATGGA

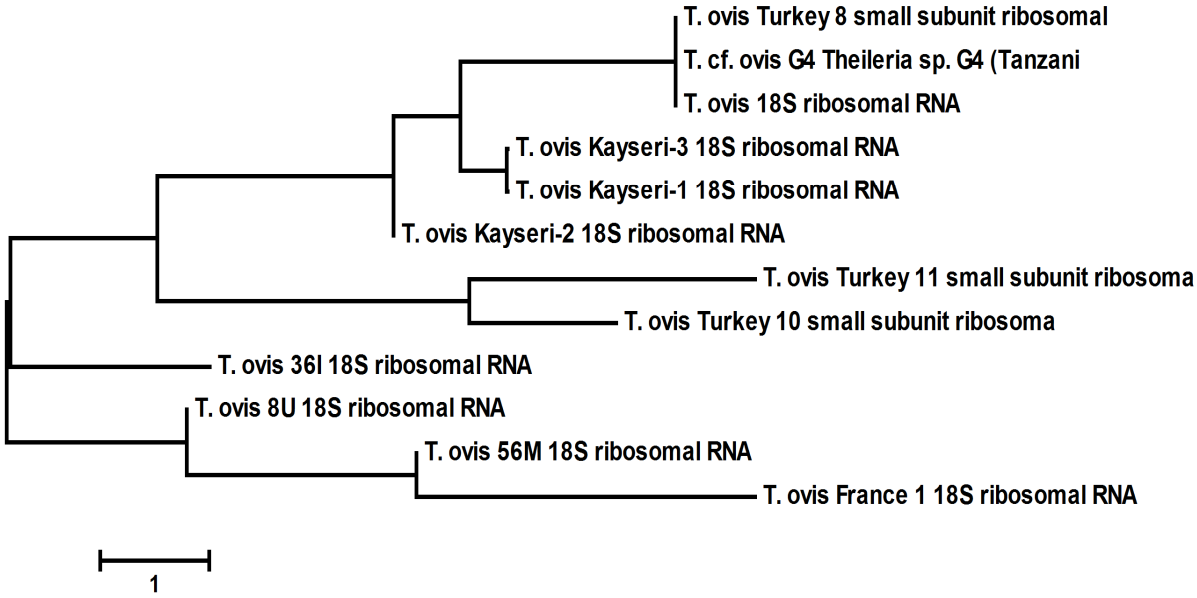
Şekil 4.7. *T. ovis* Kayseri-3 izolatının sekans dizilimleri (HM241894)

4.5. SEKANS ANALİZ SONUÇLARININ FİLOGENETİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Sekans analizleri yapılan izolatların, Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer izolatlarla yakınlıkları Mega 4.1 programı vasıtasıyla filogenetik ağaç şeklinde Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *T. annulata* izolatların *18s rRNA* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbor-joining)



Şekil 4.9. *T. ovis* izolatların *18s rRNA* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbor-joining)

Kayseri yöresindeki sığır ve koyunlardan elde edilen izolatlarla kıyaslaması yapılan Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer *18s rRNA* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Kıyaslaması yapılan diğer *T. annulata ve T. ovis* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	**Orijin**	**Gen**	**Konak**	**Parazit**	**Aksesyon Numarası**
Karabuk-1	Karabük/Türkiye	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	HQ197733
Theileria annulata 18S ribosomal RNA gene	Duhok/Irak	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	HM628582
S15	Tahran/İran	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	HM628581
Gorgan	Tahran/İran	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	HM535613
Turkey 2	Elazığ/Türkiye	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	AY508473
Turkey 4	Malatya/Türkiye	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	AY508464
ITCO1	Madrid/İspanya	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	FJ426369
Spain 2	Madrid/İspanya	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	DQ287944
RNA (2)	Neimeng/Çin	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	EU083801
RNA (3)	Ningxia/Çin	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	EU083800
Theileria annulata small subunit ribosomal RNA	Türkiye	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	AY524666
Turkey 7	Malatya/Türkiye	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	AY508472
Yining	Xinjiang/Çin	*18s rRNA*	Sığır	*T. annulata*	EU073963
Turkey 8	Erzincan/Türkiye	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	AY508455
G4	Tanzanya	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	AY260174
China	Çin	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	FJ603460
Turkey 11	Erzincan/Türkiye	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	AY508461
Turkey 10	Erzincan/Türkiye	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	AY508458
36I	İlam/İran	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	GU726903
8U	Urmia/İran	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	GU726901
56M	Mazandaran/İran	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	GU726904
France 1	Fransa	*18s rRNA*	Koyun	*T. ovis*	EU622911

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Theileriosis'in teşhisinde eskiden beri mikroskobik muayene ve serolojik teşhis yöntemleri (IFAT, ELISA vb.) kullanılmıştır. Ancak hızla ilerleyen teknolojiyle birlikte son yıllarda nükleik asit tabanlı teşhis yöntemleri (PCR, RLB, Real-Time PCR vb.) theileriosis'in teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (71, 72). *Theileria* 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 (73). Theileriosis'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 (74).

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 (75-77).

Türkiye'de sığır, koyun ve keçiler üzerine yapılan çalışmalarda theileriosisin yaygın olduğu görülmüştür. Sığırlarda tropikal theileriosis; mikroskobik olarak Marmara Bölgesi'nde %0-23,4, Ege Bölgesi'nde %9-43,2, Akdeniz Bölgesi'nde %1,8-9,3, İç Anadolu'da %2,3-60,5, Karadeniz'de %2,3-32,8, Doğu Anadolu'da %0-36,7 ve Güneydoğu Anadolu'da %13,3-27,2 olarak tespit edilmiştir. Serolojik olarak Marmara Bölgesi'nde %10-33,3, Ege Bölgesi'nde %31-40, Akdeniz Bölgesi'nde %1,8-16, İç Anadolu'da %6,4-67,5, Karadeniz'de %1,9-63,1, Doğu Anadolu'da %21,9-41 ve Güneydoğu Anadolu'da %65,3-91,4 olarak belirlenmiştir. Moleküler olarak ise İç Anadolu'da *T. annulata* %18,1-61,2, *T. orientalis* %0,9-13,6, Karadeniz'de *T. annulata* %2, *T. orientalis* %20,6, Doğu Anadolu'da *T. annulata* %2,4-39,2, *T. orientalis* %2,4-9,7 ve Güneydoğu Anadolu'da *T. annulata* %58,4 olarak saptanmıştır (78).

Türkiye'de koyun ve keçi theileriosisi ile ilgili çalışmalar ise sınırlı olup, bu çalışmaların çoğu perifer kan frotilerinin mikroskobik muayenesi ile yapılmıştır. Koyun ve keçi theileriosisi mikroskobik olarak Ege Bölgesi'nde %27, İç Anadolu'da %8-38,5, Doğu Anadolu'da %3-19,3 ve Güneydoğu Anadolu'da %3,2-41,3 oranlarında tespit edilmiştir. Serolojik olarak İç Anadolu'da %8,2-63,2, Doğu Anadolu'da %44,7 ve Güneydoğu Anadolu'da %10,7-17,2 olarak saptanmıştır. Moleküler olarak ise *T. ovis* İç Anadolu'da %17-48, Doğu Anadolu'da %41,8-54 ve Güneydoğu Anadolu'da %67,7 olarak belirlenmiştir (78).

Kayseri yöresinde yapılan bu çalışmada ise sığırlarda tropikal theileriosis mikroskobik olarak %3,13 belirlenmiş olup moleküler olarak sadece *T. annulata* (%10,63) türü tespit edilmiştir. Koyunlarda ise mikroskobik olarak theileriosis %6,67 olarak tespit edilmişken moleküler olarak *T. ovis* koyunlarda %23,33 ve keçilerde %11,43 olarak bulunmuştur.

Theileria türlerinin sınıflandırılmasında, uzun süre şizont ve piroplasmların morfolojik yapıları, vektör kene spesifikliği, patojenite, biyolojik karakterler ve serolojik tanımlamalar esas alınmıştır. Ancak bu kriterlerin bir takım dezavantajları vardır. Piroplasmların morfolojisi, enfeksiyonun seyri sırasında değişebileceği için türlerin ayırımında kullanılabilecek iyi bir kriter değildir. Örneğin piroplasm morfolojisi dikkate alınarak yapılan

araştırmalarda, Nijerya'da *T. annulata*, Pakistan ve Suriye'de ise *T. parva'*nın bulunduğu gibi yanıltıcı sonuçlar elde edilmiştir (19). Bununla birlikte enfekte eritrosit sitoplazmasında bulunabilen bar ve veil gibi yapılar patojen türlerle iyi huylu *Theileria* etkenlerinin ayırımında iyi bir kriterdir (79). Bazı türlerde şizontların tanımlanamaması, *T. mutans* şizontlarında çekirdeğin büyük olması gibi özellikler, şizont morfolojisine dayalı tür ayırımına imkan sağlamıştır (19, 80). Bir zamanlar serolojik tanımlamaların tür ayırımında güvenilir bir kriter olduğu ve en iyi sonuçların İndirek Floresan Antikor (İFA) testi ile alındığı belirtilmekle birlikte, türler arasındaki çapraz reaksiyonların tespit edilmesi, serolojik tanımlamalar için önemli bir handikap olmuştur (19). Konak ve vektör kene özgüllüğünün yanında, tür ayrımında önemli bir kriter olan patojenitenin, örneğin düşük patojeniteye sahip *T. mutans'*ın, bazen de öldürücü olması gibi zaman zaman yanıltıcı sonuçlar verebileceği belirtilmiştir (81). Tüm bu kriterlerin yanında *Theileria* türleri arasında, piroplasm taşıyıcılığı, epidemiyoloji, şizont ve piroplasmların morfolojisi yanında sayısı, farklı orfolojik tiplerin yüzde oranları gibi özellikler tür ayrımında yardımcı olabilir (19). Ancak bugün *Theileria* türlerinin ayırımında, tüm bu kriterlerin yeterli olmadığı, parazitteki moleküler ve genetik farklılıkları ortaya koyan filogenetik analizlerin dikkate alınması gerektiği ifade edilmektedir (82). Son zamanlarda *Theileria* türlerinin taksonomideki yerlerinin belirlenmesinde, çeşitli genlerin (small subunit ribosomal RNA ve major piroplasm surface protein) filogenetik analizlerine dayalı çalışmalar ön plana çıkmıştır. Özellikle de small subunit ribosomal RNA genlerinden olan 18s rRNA geni ön plana çıkmaktadır. Dünya'da ve bu gen bölgesi üzerinde yapılan tüm bu çalışmalar ile sığır, koyun ve keçilerdeki *Theileria* türlerinin birbirlerine yakınlık dereceleri ve hangi gruba dahil oldukları tespit edilmektedir. Belirtilen tüm bu farklılıklara rağmen, hala bazı *Theileria* türlerinin taksonomi ve sistemdeki yerleri tartışılabilmektedir (76, 77, 82-94).

Kayseri yöresinde sığır, manda, koyun ve keçiler üzerine yapılan bu çalışmada elde edilen izolatların konservatif karakterli *18s rRNA* gen bölgelerinin moleküler karakteri net olarak ortaya konmuş ve Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer benzer izolatlarla karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre sığırlardan 3 adet *T. annulata* izolatı ve koyunlardan da 3 adet *T. ovis* izolatı sekanslatılarak moleküler karakterleri belirlenmiştir. İzolatlar arasındaki moleküler benzerlikleri en yüksekten en düşüğe doğru sıralanmıştır.

Buna göre sığırlardan elde edilen *T. annulata* Kayseri-1 izolatının; Kayseri-2, Kayseri-3, Karabuk-1, *Theileria annulata* 18S ribosomal RNA gene, S15, Gorgan, Turkey 2, Turkey 4, ITCO1, RNA (2), RNA (3), *Theileria annulata* small subunit ribosomal RNA, Turkey 7 ve Yining izolatlarıyla %99, Spain 2 izolatıyla ise % 98 oranında identik olduğu saptanmıştır.

Aynı şekilde *T. annulata* Kayseri-2 izolatının; Kayseri-3 izolatıyla %100, Kayseri-1, Karabuk-1, *Theileria annulata* 18S ribosomal RNA gene, S15, Gorgan, Turkey 2, Turkey 4, ITCO1, RNA (2), RNA (3), *Theileria annulata* small subunit ribosomal RNA ve Turkey 7 izolatlarıyla %99, Yining ve Spain 2 izolatlarıyla %98 oranında identiklik gösterdiği belirlenmiştir.

T. annulata Kayseri-3 izolatının ise; Kayseri-2 izolatıyla %100, Kayseri-1, Karabuk-1, *Theileria annulata* 18S ribosomal RNA gene, S15, Gorgan, Turkey 2, Turkey 4, ITCO1, RNA (2), RNA (3), *Theileria annulata* small subunit ribosomal RNA ve Turkey 7 izolatlarıyla %99, Yining ve Spain 2 izolatlarıyla %98 oranında benzer olduğu saptanmıştır.

Koyunlardan elde edilen *T. ovis* Kayseri-1 izolatının; Turkey 8, China, Turkey 11, Turkey 10, 36I, 8U, 56M, France 1 izolatlarıyla %99, G4, Kayseri-2 ve Kayseri-3 izolatlarıyla %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Benzer şekilde *T. ovis* Kayseri-2 izolatının; Kayseri-3, Turkey 8, China, Turkey 11, Turkey 10, 36I, 8U, 56M, France 1 izolatlarıyla %99, G4 ve Kayseri-1 izolatlarıyla %98 oranında identik olduğu tespit edilmiştir.

T. ovis Kayseri-3 izolatının; Kayseri-2, Turkey 8, China, Turkey 11, Turkey 10, 36I, 8U, 56M, France 1 izolatlarıyla %99, G4 ve Kayseri-1 izolatlarıyla %98 oranında identiklik gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Kayseri yöresindeki sığır ve koyunlardan elde edilen DNA'larda moleküler yöntemlerle *T. annulata* ve *T. ovis* suşları tespit edilmiş ve bu izolatların *18s rRNA* gen bölgesine spesifik primerlerle PCR'ları yapılmıştır. PCR sonucu *18s rRNA* gen bölgesine spesifik DNA bantları jelden ekstrakte edilerek sekans analizleri yapılmıştır. Sekans sonuçları GenBank'a kaydettirilmiştir. GenBank'a kayıtları yapılan bu suşların kendi aralarındaki ve Dünya'da yapılmış diğer çalışmalardan elde edilen izolatlarla

identiklik oranları tespit edilmiştir. Sekans dizilimlerindeki benzerlikleri incelenen bütün suşların filogenetik akrabalıkları filogenetik ağaç oluşturularak gösterilmiştir. Elde edilen izolatlar ile Dünya'daki ve Türkiye'deki benzer diğer izolatların nükleotit dizilimlerindeki benzerlik ve farklılıklar ortaya konmuştur. İzolatlar arasındaki bu yüksek benzerlikle *18s rRNA* gen bölgesinin korunmuş bir bölge olduğunun göstergesi niteliğini taşımaktadır.

Bu çalışmanın, gelecekte Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşı çalışmalarına temel teşkil edeceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu çalışmadan sağlanan bilimsel alt yapı ile gelecekte yapılacak aşı çalışmaları için önemli bir aşama kaydedilmiştir. Sonuç olarak, Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşılar, hastalığa karşı korunmada etkin rol oynayacak ve hastalığa bağlı ekonomik kayıpların azalmasına yardımcı olacaktır. Bu çalışmada kullanılan yöntemler ve elde edilen sonuçlar söz konusu parazitlere ait bilgi birikimi oluşturmanın yanında, model bir araştırma olarak daha sonra yapılacak çalışmalara temel oluşturacak ve araştırıcılara farklı perspektifler sunacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Karagenç T, Eren H. *Theileria anulata* Enfeksiyonlarında İmmunite. Ed. Özcel M.A, Turgay N, İnci A, Köroğlu E. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji İzmir 2007; ss.516-523
2. Karaer Z, Nalbantoğlu S. Protozoon Hastalıklarında Tedavi. Ed: Burgu A, Karaer Z. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıklarında Tedavi. İzmir 2005; ss 14-18.
3. Mimoğlu M. Theileriosis' in Tarihçesi, 4. Ulusal Parazitoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Uludağ Üniversitesi Bursa 24-26 Eylül 1985; ss. 1-4
4. Systema Naturae 2000, The Taxonomicon, Universal Taxonomic Services, Amsterdam. Erişim: [http://sn2000.taxonomy.nl/], Erişim Tarihi: 12.11.2010
5. 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.
6. *Barnett, S.F.* Theileria*, in Parasitic Protozoa ed. by Kreier, J.P., Vol. IV. Academic press, London 1977.*
7. Mugera GM, Mworia GM, Munyua WK. Treatment of East Coast fever with aureomycin. Bull Epizoot Dis Afr. 1973;21:501-5.
8. Anon. Report. International Laboratory for on Animal Diseases, Ilrad, Nairobi Kenya 1984; pp
9. Friedhoff, K.T. und Liebisch, A. Piroplasma infections of domestic animals. Tieräarztl. Prax. 1978;6:125 -139.
10. Schein, E., Mehlhorn, H, Warnecke M. Protistologica, I. XIV, 1978: 3;337 -348.
11. Sayın F. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. 1985;5
12. Schein, E.,Mehlhorn, H.; Warnecke, M. Fine structural study on the erythrocytic stages of Theileria annulata (Dschunkowsky, Luhs, 1904). Tropenmed. Parasit. 1977; 28: (3), 349-360.

13. Hoosmand-Rad P, Havva NJ. Transmission of Theileria hirci in sheep by Hyalomma anatolicum anatolicum. Trop Anim Health Prod 1973;5:103-109.
14. Sisodia RS, Gautom OP. Experimental cases of Theileri hirci infection in sheep and goats. Ind J Anim Sci 1983;53: 162-166.
15. Salih DA, ElHussein AM, Hayat M, et al. Survey of Theileria lestoquardi antibodies among Sudanese sheep. Vet Parasitol 2003;111(4): 361-7.
16. Jansen BC, Neitz WO. A discussion on the clasification of Theileridae. J Ond Vet Res 1956;27: 7-18.
17. Neitz WO. Theileriosis, Gondriosis and Cytauxozoonoses: A review. Onderstepoort J Vet Res 1957;27: 275-430.
18. Gill HS, Bhattacharyulu Y, Gill BS. Attempts to transmit Theileria ovis through the ticks Haemaphysalis bispinosa and Rhipicephalııs haemaphysalis. Trop Anim Health Prod 1980;12: 61.
19. Uilenberg G.. *Theileria* Species of Domestic Livestock. "Advences in the Control of Theileriosis" AD Irvin, Cunningham MP ve Young AS (Editörler). Martinus Nijhoff Publishers 1981; pp
20. Alani AJ, Herbert IV. Pathogenesis of infection with Theileria recondita (Wales) isolated from Haemaphysalis punctata from North Wales. Vet Parasitol. 1988; 4: 293-301.
21. Sayın F, Yukarı BA, Nalbantoğlu S. ve ark. (1999). Türkiye'de koyun ve keçilerde theileriosisin epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. Tübitak projesi son raporu. Proje no: VHAG-1339.
22. Aktaş M, Altay K, Dumanlı N. PCR-based detection of Theileria ovis in Rhipicephalus bursa adult ticks. Vet Parasitol 2006; 140:259-263.
23. Uilenberg G, Schreuder BEC. Studies on Theileridae (sporozoa) in Tanzania. Tick transmission of Haematoxeneus veliferus. Tropenmedizin and Parasitologic 1976; 25: 207-216.
24. Yin H, Schnittger L, Luo J, et al. Ovine theileriosis in Chine : a new look at old story. Parasitol Res.2007; 101:191-195
25. Mehlhorn, H., Weber, G., Schein, et al. Electron microscope studies on development stages of Theileria annulata (Dschunkowsky, Luhs, 1904) in the intestine and haemolymph of Hyalomma anatolicum excavatum (Koch, 1844). Z. Parasitent . 1975;48: 137-150.
26. Schein, E. On the life cycle of Theileria annulata (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in the midgut and hemolymph of Hyalomma anatolicum excavatum (Koch, 1844). Z. Parasitenk. 1975;47:165-167.

27. Mehlhorn, H. and Schein, E. Electron microscopic studies of the development of kinetes in Theileria annulata Dschunkowsky & Luhs, 1904 (Sporozoa, Piroplasmea).J. Protozool. 1977; 24 (2): 249-257.

28. Mehlhorn H. (2000). Encyclopedic Reeference of Parasitology. Erişim: http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/frame.php, Erişim tarihi: 03 Ağustos 2009.

29. Altay K, Aktaş M, 2004. Sığır theileriosisi. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi 2004, 18(2), 79-86

30. 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.

31. Dumanlı N, Köroğlu E, Düzgün A, ve ark. Elazığ yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in prevalansı. Turk J Vet Anim Sci. 1997;21:183-186.

32. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, ve ark. Status of tick borne diseases in sheep and goats in Turkey. Parassitologia. 1997; 39: 153-156.

33. Aktaş M, Düzgün A, Babür C. Malatya yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci. 2001;25 (3): 241-243.

34. Branco S, Orvalho J, Leitão A, Pereira I, Malta M, Mariano I, Carvalho T, Baptista R, Shiels BR, Peleteiro MC. Fatal cases of Theileria annulata infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. J Vet Sci. 2010;11(1):27-34.

35. Tindih HS, Marcotty T, Naessens J, Goddeeris BM, Geysen D. Demonstration of differences in virulence between two Theileria parva isolates. Vet Parasitol. 2010;168(3-4):223-30.

36. Derakhshanfar A, Mirzaei M. Effect of Peganum harmala (wild rue) extract on experimental ovine malignant theileriosis: pathological and parasitological findings. Onderstepoort J Vet Res. 2008;75(1):67-72.

37. Mbassa GK, Kipanyula MJ, Mellau LS, Mwamakali ED, Bulegeya FR, Kauto-Mboni K. Theileria parva infection in calves causes massive lymphocyte death in the thymus, spleen and lymph nodes without initial proliferation. Vet Parasitol. 2006;142(3-4):260-70.

38. Magona JW, Walubengo J, Olaho-Mukani W, Jonsson NN, Welburn SC, Eisler MC. Clinical features associated with seroconversion to Anaplasma marginale, Babesia bigemina and Theileria parva infections in African cattle under natural tick challenge.Vet Parasitol. 2008;155(3-4):273-80.

39. Osman SA, Al-Gaabary MH. Clinical, haematological and therapeutic studies on tropical theileriosis in water buffaloes (Bubalus bubalis) in Egypt.Vet Parasitol. 2007;146(3-4):337-40.

40. Omer OH, Haroun EM, Mahmoud OM, Abdel-Magied EM, El-Malik KH, Magzoub M.Parasitological and clinico-pathological profiles in friesian cattle naturally infected with Theileria annulata in Saudi Arabia.J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2003;50(4):200-3
41. Moreau MF, Thibaud JL, Miled LB, Chaussepied M, Baumgartner M, Davis WC, Minoprio P, Langsley G. Theileria annulata in CD5(+) macrophages and B1 B cells. Infect Immun. 1999;67(12):6678-82
42. Preston PM, Hall FR, Glass EJ, Campbell JD, Darghouth MA, Ahmed JS, Shiels BR, Spooner RL, Jongejan F, Brown CG. Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against Theileria annulata.Parasitol Today. 1999;15(7):268-74.
43. Campbell JD, Nichani AK, Brown DJ, Howie SE, Spooner RL, Glass EJ. Parasite-mediated steps in immune response failure during primary Theileria annulata infection.Trop Anim Health Prod. 1997;29(4 Suppl):133S-135S
44. Graham SP, Brown DJ, Vatansever Z, Waddington D, Taylor LH, Nichani AK, Campbell JD, Adamson RE, Glass EJ, Spooner RL. Proinflammatory cytokine expression by Theileria annulata infected cell lines correlates with the pathology they cause in vivo. Vaccine. 2001;19(20-22):2932-44
45. Richardson JO, Forsyth LM, Brown CG, Preston PM. Nitric oxide causes the macroschizonts of Theileria annulata to disappear and host cells to become apoptotic. Vet Res Commun. 1998;22(1):31-45.
46. Glass EJ, Preston PM, Springbett A, Craigmile S, Kirvar E, Wilkie G, Brown CG. Bos taurus and Bos indicus (Sahiwal) calves respond differently to infection with Theileria annulata and produce markedly different levels of acute phase proteins.Int J Parasitol. 2005 Mar;35(3):337-47.
47. Preston PM, Jackson LA, Sutherland IA, Brown DJ, Schofield J, Bird T, Sanderson A, Brown CG.Theileria annulata: attenuation of a schizont-infected cell line by prolonged in vitro culture is not caused by the preferential growth of particular host cell types.Exp Parasitol. 2001;98(4):188-205.
48. Visser AE, Abraham A, Sakyi LJ, Brown CG, Preston PM. Nitric oxide inhibits establishment of macroschizont-infected cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine tropical theileriosis or East Coast fever. Parasite Immunol. 1995;17(2):91-102.
49. Preston PM, Jackson LA, Sutherland IA, Bell-Sakyi L, Wilkie G, Brown DJ, Schofield J, Melrose TR, Sanderson A, Brown CG. Theileria annulata: the expression of two novel

macroschizont antigens on the surface of infected mononuclear cells differs during in vitro attenuation of a virulent cell line.Exp Parasitol. 1998 Jun;89(2):228-40.

50. Adamson RE, Ilhan T, Wilkie GF, Preston PM, Brown CG, Hall FR. Theileria annulata: reduced host MMP activity profile of long-term culture is transmitted as a parasite-encoded trait.Exp Parasitol. 2000 Jan;94(1):45-7.

51. Forsyth LM, Minns FC, Kirvar E, Adamson RE, Hall FR, McOrist S, Brown CG, Preston PM. Tissue damage in cattle infected with Theileria annulata accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes.J Comp Pathol. 1999 Jan;120(1):39-57.

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

53. 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.

54. Haldar K, Mohandas N, Samuel BU, et al. Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. Cell Microbiol 2002; 4 (7): 383-395.

55. Baunaure F, Langsley G. Protein traffic in *Plasmodium* infected-red blood cells. Med Sci 2005; 21(5): 523-529.

56. Langsley G, van Noort V, Carret C, et al. Comparative genomics of the Rab protein family in Apicomplexan parasites. Microbes Infect 2008; 10 (5): 462-470.

57. Cooke BM, Mohandas N, Cowman AF, et al. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. Vet Parasitol 2005; 132: 273-295.

58. 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.

59. Chapman WE, Ward PA. *Babesia rodhaini*: requirement of complement for penetration of human erythrocytes. Science 1977; 196 (4285): 67-70.

60. Yamasaki M, Asano H, Otsuka Y, et al. Use of canine red blood cell with high concentrations of potassium, reduced glutathione, and free amino acid as host cells for in vitro cultivation of *Babesia gibsoni*. Am J Vet Res 2000; 61 (12):1520-1524.

61. Murase T, Iwai M, Maede Y. *Direct evidence for preferential multiplication of Babesia gibsoni* in young erythrocytes. Parasitol Res 1993; 79 (4): 269-271.

62. Yamasaki M, Yamato O, Hossain MA, et al. *Babesia gibsoni*: preferential multiplication in reticulocytes is related to the presence of mitochondria and a high concentration of adenosine 5'-triphosphate in the cells. Exp Parasitol 2002; 102 (3-4): 164-169.

63. Florin-Christensen M, Suarez CE, Hines SA, et al. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. Infect Immun 2002; 70: 3566-3575.

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

65. 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.

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

67. 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.

68. 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.

69. Nagora D, Garcia Sammartin J, Garcia Perez AL. et al. İdentifıcation, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in sheep population frorn Northern Spain İnternational Journal for parasitology 2004;34: 1059- 1067

70. Schnittger L, Yin H, Oi B. et al. Simultaneous detection and differention of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line biotting. Parasitol Res 2004;92:189-196Zintl 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.

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

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

73. 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.

74. 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.

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

76. 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.

77. Cicek H, Cicek H, Eser M, Tandogan M. Current status of ruminant theileriosis and its economical impact in Turkey. Turkiye Parazitol Derg. 2009;33(4):273-9.

78. Sugimoto C, Fujisaki K. Non-transforming *Theileria* parasites of ruminants. In: Dirk A.E. Dobbelaere and Declan J. McKeever (Edit.). Word Class Parasites Volume: 3 Theileria. Boston. Dordrecht. London.Kluwer Academic Publishers, 2002; 93-106.

79. Uilenberg G, Perie NM, Spanjer AAM, Franssen FFJ. *Theileria orientalis,* a cosmopolitan blood parasite of cattle; demostration of schizont stage. Res. Vet. Sci. 1985; 38: 352-357.

80. Norvall RAI, Perry BD, Young AS. The epidemiyology of theileriosis in Africa. London. Academic Pres. 1992; 481.

81. Gubbels M-J, Hong Y, Van der Weide M, Oi B, Nijman IJ, Guangyuan L, Jongejan F. Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. Int. J. for Parasitol. 2000; 30: 943-952.

82. Kawazu S, Kamio T, Kakuda T, Terada Y, Sugimoto C, Fujisaki K. Phylogenetic relationships of the benign *Theileria* species in cattle and Asian buffalo based an the major piroplasm surface protein. Int. J. for Parasitol. 1999; 29: 613- 618.

83. Kawazu S, Sugimoto C, Kamio T, Fujisaki K. Antigenic differences between Japanese *Theileria sergenti* and other benign *Theileria* species of cattle from Australia (*T.buffeli*) and Britain (*T.orientalis*). Parasitol. Res. 1992; 78: 130-135.

84. Kim S-J, Tsuji M, Kubota S, Wei Q, Lee J-M, Ishihara C, Onuma M. Sequence analysis of the major piroplasm surface protein gene of benign bovine *Theileria* parasites in East Asia. Int. J. for Parasitol. 1998; 28: 1219-1227.

85. Aktas M, Bendele KG, Altay K, Dumanli N, Tsuji M, Holman PJ. Sequence polymorphism in the ribosomal DNA internal transcribed spacers differs among Theileria speciesVet Parasitol. 2007;147(3-4):221-3
86. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC. Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history.Vet Parasitol. 2003;114(3):173-94.
87. Schnittger L, Hong Y, Jianxun L, Ludwig W, Shayan P, Rahbari S, Voss-Holtmann A, Ahmed JS. Phylogenetic analysis by rRNA comparison of the highly pathogenic sheep-infecting parasites Theileria lestoquardi and a Theileria species identified in China.Ann N Y Acad Sci. 2000;916:271-5.
88. Chansiri K, Kawazu S, Kamio T, Terada Y, Fujisaki K, Philippe H, Sarataphan N. Molecular phylogenetic studies on Theileria parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences.Vet Parasitol. 1999,15;83(2):99-105.
89. Liu Q, Zhou YQ, He GS, Oosthuizen MC, Zhou DN, Zhao JL. Molecular phylogenetic studies on Theileria spp. isolates (China) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences.Trop Anim Health Prod. 2010;42(1):109-14
90. Criado A, Martinez J, Buling A, Barba JC, Merino S, Jefferies R, Irwin PJ. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes.Vet Parasitol. 2006;142(3-4):238-47.
91. Sparagano OA, Spitalska E, Namavari M, Torina A, Cannella V, Caracappa S. Phylogenetics of Theileria species in small ruminants.Ann N Y Acad Sci. 2006;1081:505-8.
92. Spitalska E, Torina A, Cannella V, Caracappa S, Sparagano OA. Discrimination between Theileria lestoquardi and Theileria annulata in their vectors and hosts by RFLP based on the 18S rRNA gene.Parasitol Res. 2004;94(4):318-20.
93. Ahmed JS, Luo J, Schnittger L, Seitzer U, Jongejan F, Yin H. Phylogenetic position of small-ruminant infecting piroplasms.Ann N Y Acad Sci. 2006;1081:498-504.