

Adana Yöresi Atlarında *Babesia equi* ve *Babesia caballi*'nin Yayılışının Mikroskopik ve Serolojik (cELISA) Yöntemlerle Araştırılması*

Cemal KURT¹ Mehmet YAMAN²

¹Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Parazitoloji Bölümü, Adana, Türkiye

²Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD, Hatay, Türkiye

Geliş Tarihi: 03.08.2011

Kabul Tarihi: 06.10.2011

ÖZET

Bu çalışma ile 2004 yılı Haziran-Ekim ayları arasında Adana'nın 8 ilçesinden (Merkez-Yüreğir, Kozan, Feke, Saimbeyli, Aladağ, Pozantı, Karaisalı ve Ceyhan) rastgele seçilen farklı yaş gruplarındaki 120 erkek ve 100 dişi olmak üzere toplam 220 atta serolojik (cELISA) ve mikroskopik yöntemlerle *Babesia equi* ve *B. caballi*'nin teşhisi ve bu türleri nakleden vektör kene türlerinin tespiti amaçlanmıştır. Çalışmanın materyalini atların kulak uçlarından ve vena jugularislerinden elde edilen kan örneklerinden hazırlanan froti ve serumlar oluşturmuştur. Sahada hazırlanan sürme kan frotileri metil alkolle tespit edildikten sonra Giemsa ile boyanmış ve mikroskopta *B. equi* ve *B. caballi* yönünden incelenmiştir. Ancak incelenen frotilerin hiçbirisinde *B. equi* ve *B. caballi*'nin piroplasm formlarına rastlanmamıştır. cELISA ile yapılan serolojik muayenede, ileri yaş grubundaki atlarda daha fazla olmak üzere %56.8 oranında *B. equi* antikorları saptanmış, *B. caballi* antikorları ise tespit edilememiştir. Muayene edilen atların üzerinden toplanan kenelerin, babesiosisin bilinen vektörleri olan *Hyalomma marginatum* ve *Rhipicephalus turanicus* oldukları anlaşılmıştır. Sonuç olarak Adana yöresinde atlarda subklinik ve kronik *Babesia* enfeksiyonlarının yaygın olduğu ve portör atların belirlenmesinde serolojik testlerin mikroskopik yöntemlerden daha duyarlı olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler

Adana, *Babesia equi*, *Babesia caballi*, Froti, cELISA

The Investigation of the Prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Horses by Microscopic and Serologic (cELISA) Methods in Adana Province

SUMMARY

This study was performed in different parts of Adana provinces (Centrum-Yuregir, Kozan, Feke, Saimbeyli, Aladağ, Pozantı, Karaisalı and Ceyhan) between June and October 2004. Samples were chosen randomly in different age and sexes. The aim of the study was to investigate to detect blood parasites and vector ticks of horses using cELISA and microscopic examinations. Materials of the study were constituted serums and blood smears in the samples taken blood from the horses vena jugularis and ear of the tips. In this study, blood smears were stained with Giemsa stain, and then the samples were identified for *B. equi* and *B. caballi*. But no piroplasm form of *Babesia species* were found in all samples. Serological assessments by cELISA were revealed that *B. equi* antibodies were positive in 56.8 % of the samples analyzed. Most of them the older horses. However, *B. caballi* antibodies were not detected in the samples. It was also found that the ticks which were taken from horses were *Hyalomma marginatum* and *Rhipicephalus turanicus* species. It was concluded that subclinical and chronic *Babesia* infections were common in horses in different parts of Adana. Serologic method was found to be more sensitive than microscopic examination for the investigation of *Babesia* porter horses.

Key Words

Adana, *Babesia equi*, *Babesia caballi*, Blood Smear, cELISA

GİRİŞ

Teknolojik gelişmeler nedeniyle atların hayatımızdaki yerinin azaldığı düşünülse de kırsal bölgelerde atlardan faydalanılmakta, daha yaygın olarak da spor ve turizm amacıyla yetiştiriciliği yapılmakta, insan ve hayvan sağlığı için laboratuvarlarda serum üretiminde kullanılmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu 2009 yılı verilerine göre Türkiye'de 166.753 at bulunduğu bildirilmektedir.

Atların bakteriyel, viral ve paraziter hastalıklarla enfekte olması ciddi performans kayıplarına ve hatta ölümlere neden olmaktadır. Bunlar arasında paraziter hastalıklar büyük yer tutmaktadır. Dünya'nın her yerinde atlarda yaygın görülen ve ciddi problemler oluşturan babesiosis

bu hastalıkların başında gelmektedir. *Babesia equi* ve *B. caballi* tarafından oluşturulan babesiosisin akut seyreden şeklinde yüksek ateş, anemi, hemoglobinüri, sarılık gibi semptomlar görülmektedir. Ancak asemptomatik seyreden çoğu kronik formunda atlar rezervuar olarak rol oynarlar (Rampersad ve ark. 2003; Sevinç ve ark. 2008; Sarı ve ark. 2010).

Babesia etkenlerinin teşhisi; klinik semptomlara, hematolojik bulgulara ve perifer kan frotilerinin mikroskopik muayenesine bakılarak yapılmaktadır (Kaufmann 1996; Bashuriddin ve ark. 1999; Martin 1999; Farah ve ark. 2003; Kumar ve ark. 2003; Boldbaatar ve ark. 2005; Edward ve ark. 2011). Akut enfeksiyonlarda teşhisin kolay olmasına karşın, latent seyirli olgularda hastalığın

teşhisinde serolojik testlerden yararlanılmaktadır (Martin 1999; Xuan ve ark. 2001a; Boldbaatar ve ark. 2005). Komplement Fikzasyon Testi (KFT) ve İndirek Flouresan Antikor Testi (IFAT) gibi serolojik muayeneler *B. equi* ve *B. caballi* enfeksiyonlarının tayininde yaygın olarak kullanılırlar. Çapraz reaksiyonların görülmesi ve antikor düzeyinin sınırlı kalması gibi nedenlerle (Xuan ve ark. 2001b) son zamanlarda, bu testlere alternatif olarak rekombinant antijenlerin kullanıldığı ELİSA metodu önerilmektedir (Tanaka ve ark. 1999; Xuan ve ark. 2001a). Babesiosis'in teşhisinde invitro kültürler, Polimeraz Zincir reaksiyonu (PCR), Nested PCR ve Western Blotting (WB) gibi teknikler de kullanılmaktadır. Fakat seroloji dışında kalan metodlar son derece zahmetli, pahalı ve vakit alıcı olarak değerlendirilmektedir (Baldani ve ark. 2004).

İklim ve mevsim özellikleri dolayısıyla kene aktiviteleri, Adana yöresi atlarında babesiosisin yaygın olduğu kanaatini uyandırmıştır. Türkiye genelini kapsayan bir araştırma dışında (Balkaya 2004) Adana yöresindeki atlarda babesiosis yaygınlığıyla ilgili herhangi bir veriye ulaşılamamıştır. Bu çalışma ile Adana yöresinde babesiosis yaygınlığının mikroskopik ve serolojik (cELISA) yöntemlerle araştırılması, hastalığa neden olan türler ile hastalığın naklinde rol oynayan kene türlerinin tespiti amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışma 2004 yılı Haziran ve Ekim ayları arasında Adana ilinin 8 ilçesine bağlı (Merkez-Yüreğir, Saimbeyli, Aladağ, Feke, Kozan, Pozantı, Karaisalı ve Ceyhan), at varlığı fazla olan köylerden rastgele seçilen 220 at üzerinde gerçekleştirildi. Yaşları 4,5 aylık ile 25 yaş arasında değişen atların 100 tanesi dişi 120 tanesi ise erkekti. Sahiplerine tespit ettirilen atlar önce klinik babesiosis yönünden muayene edildi. Üzerlerinde rastlanan keneler toplanarak %75'lik alkol ve 1 damla gliserin karışımı içeren kaplara aktararak, daha sonra stereo mikroskop altında ilgili literatüre göre teşhisleri yapıldı (Merdivenci 1969; Karaer ve ark. 1997).

Sahada atların kulak uçlarından alınan bir damla kanla hazırlanan ve metil alkolle tespit edilen frotiler laboratuvarında Giemsa ile boyandı. Kurutulduktan sonra *B. equi* ve *B. caballi* yönünden mikroskopta incelendi.

Sahada atların vena jugularis'lerinden vakumlu tüplerle alınan kan örnekleri laboratuvarında 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, elde edilen serumlar ependorf tüplerine alınıp yedeklenerek - 80 °C'de saklandı.

Otomatik ELİSA cihazı (TECAN Minilyser) ve *B. equi*, *B. caballi* antikorlarını tespit etmekte kullanılan cELISA kitleri (WMRD inc., Pullman, WA, USA) yardımıyla test tekniğine uygun olarak uygulandı. Mikroplate'lerdeki koyu renkli kısımlar negatif, açık renkli kalan kısımlar ise pozitif olarak değerlendirildi. Mikroplate incelemesinden ve yazıcıdan elde edilen pozitif veya negatif test sonuçlarının doğruluğu, negatif kontrol optikal dansitesi (O.D.) ve pozitif kontrol inhibisyon oranı (%I) ile kıyaslanarak sağlanması yapıldı. Yazıcıdan alınan değerlerin pozitif kontrol inhibisyon oranı (İnhibisyon yüzdesi, %I= 100 - [(Serum O.D.x 100) : (Ortalama Negatif Kontrol O.D.)] formülü ile hesaplandı. Buna göre; Optikal Dansitesi 0,3 ile 2 değerleri arasında olmalıdır. Kontrol inhibisyon oranı ise % 40 ve üzerinde olan kan serumları pozitif, % 40'dan düşük olan serum örnekleri ise negatif kabul edilerek değerlendirildi.

BULGULAR

Adana ve yöresinde klinik olarak muayene edilen 220 adet atın hiçbirinde, babesiosis semptomlarına rastlanmadı. Yapılan frotilerin mikroskopik incelemelerinde *B. equi* ve *B. caballi*'nin piroplasm formları tespit edilemedi.

Kompetatif ELİSA ile incelenen ve iki defa tekrar edilen test sonuçlarına göre, kan serumlarında *B. equi* antikorlarına yüksek oranda (%56.8) rastlanmasına karşın, *B. caballi* antikorları tespit edilemedi. Adana yöresi atlarında tespit edilen *B. equi*'nin ilçelere ve yaşlara göre dağılımı Tablo 1 ve 2'de verildi.

Tablo 1. *B. equi* yaygınlığının ilçelere göre dağılımı

Table 1. The incidence of *B. equi* according to the distribution of provinces.

İlçe	İncelenen serum sayısı	<i>B. equi</i> seropozitif atlar	
		n	(%)
Saimbeyli	14	9	64.2
Aladağ	28	14	50.0
Feke	16	13	81.2
Kozan	33	14	42.4
Pozantı	16	9	56.2
Karaisalı	42	28	66.6
Ceyhan	34	18	52.9
Yüreğir	37	20	54.0
Toplam	220	125	56.8

Tablo 2. Atların yaş gruplarına göre *B. equi*'nin cELİSA ile görülme oranları

Table 2. The incidence of *B. equi* by cELISA according to age groups of horses

Atların yaş grupları	İncelenen serum sayısı	cELISA pozitif serumlar (%)
4.5 ay-1 yaş arası	6	3 (%50)
2-5 yaş arası	34	14 (%41)
6-10 yaş arası	116	69 (%59)
11-20 yaş arası	58	35 (%60)
21-25 yaş arası	6	4 (%66)

Babesia equi pozitif bulunan atların yaşları incelendiğinde tüm yaş gruplarında *B. equi* enfeksiyonu görüldü, ancak bu oranın 6 yaş ve üzerindeki atlarda daha yüksek olduğu tespit edildi. *Babesia equi* 100 dişi atın 60'ünde, 120 erkek atın ise 63'ünde pozitif bulundu. Buna göre erkek ve dişi atlarda *B. equi* pozitiflik oranı 60/52.5'tir.

Saimbeyli dışındaki ilçelerde kene mücadelesi yapılması nedeniyle atlar üzerinde kene tespit edilemedi. Toplanan 4 dişi ve 7 erkek kenenin yapılan tür teşhislerinde, bunların *Hyalomma marginatum* (2 dişi, 7 erkek) *Rhipicephalus turanicus* (2 dişi) türlerine ait oldukları tespit edildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Babesiosis dünyanın her yerinde atlarda yaygın görülen, yaygınlık oranı bölgeye, ekolojik şartlara, vektör kenelerin bolluğuna ve yapılan testlere göre oldukça değişken sonuçlar gösteren bir protoozoon enfeksiyonudur. Dünya'da babesiosis yaygınlığı, mikroskopik bakıyla *B. equi* %9.5-% 95 (Bashuriddin ve ark. 1999; Farah ve ark. 2003), *B. caballi* %82 (Rampersad ve ark. 2003) oranlarında belirlenmiştir. Serolojik çalışmalarda *B. equi*

İFAT ile %29.4- %50 (Brüning ve ark, 1997; Shkap ve ark. 1998), KFT ile %60, (Brüning ve ark. 1997), ELİSA ile %32-%89 oranlarında (Brüning ve ark. 1997; Shkap ve ark. 1998; Xuan ve ark. 2001b; Xu ve ark. 2003; Baldani ve ark. 2004; Boldbaatar ve ark. 2005), *B. caballi* ise KFT ile %31.6 (Brüning ve ark. 1997), ELİSA ile %32-%73.3 (Brüning ve ark. 1997; Xu ve ark. 2003; Boldbaatar ve ark. 2005) oranlarında tespit edilmiştir.

Türkiye’de atlarda babesiosis yaygınlığına ilişkin çalışmalar Sarı ve ark, (2010) tarafından derlenmiş olup, buna göre *B. equi*’ye %0-%64.5, *B. caballi*’ye %0- %56.9 arasında rastlanmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunluğunu IFAT ve KFT gibi serolojik testler ile mikroskopik muayene yöntemleri oluşturmuştur. Türkiye’de mikroskopik bakıyla %0-%58.2 oranlarında rastlanan *B. equi*’ye, IFAT ile %0-%100, KFT ile %0-%43.5, ELİSA ile %16.2 oranlarında rastlanmıştır. Mikroskopik olarak %0-%56.9 arasında belirlenen *B. caballi*’ye ise IFAT ile %0-% 34.9, KFT ile %0-%20.7, ELİSA ile %0.83 oranında rastlanmıştır (Sarı ve ark. 2010). Adana yöresi atlarında yapılan bu çalışmada, mikroskopik muayeneyle *B. equi* ve *B. caballi*’nin piroplasm formları tespit edilememiş, cELİSA metodu ile %56.8 oranında *B. equi* antikorları tespit edilmiş olup, *B. caballi*’ye rastlanmamıştır.

Atlarda, özellikle akut enfeksiyonlarda, babesiosisin teşhisi için en hızlı ve güvenilir sonucun mikroskopik muayene ile alındığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Farah ve ark. 2003; Kumar ve ark. 2003). Fakat kanda parazit sayısının az olduğu subklinik olaylarda ya da atların portör olduğu durumlarda mikroskopik muayene ile *Babesia* etkenlerini görmenin zor olduğu çok sayıda kaynaktan bildirilmiştir (Kaufmann 1996; Shkap ve ark. 1998; Bashuriddin ve ark. 1999; Farah ve ark. 2003; Kumar ve ark. 2003; Boldbaatar ve ark. 2005). Nitekim atlarda *Babesia* etkenlerini araştırmak için yapılan mikroskopik çalışmaların bazılarında etken tespit edilememiştir (Avarzed ve ark. 1997; Xuan ve ark. 1998; Balkaya 2004). Dünyada gerçekleştirilen yukarıdaki çalışmalardakine benzer şekilde, Adana yöresinde mikroskopik olarak bakışı yapılan 220 ata ait frotilerin hiçbirinde babesiosis etkenlerine rastlanılmamıştır. Bu araştırmanın sonuçları Adana yöresinde subklinik *B. equi* enfeksiyonlarının yaygın olduğunu ve etkenleri taşıyan atların, enfekte olmayan diğer atlar için potansiyel bir tehlike oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Babesia equi enfeksiyonlarının *B. caballi* enfeksiyonlarına göre daha fazla görüldüğü değişik çalışmalarda bildirilmiştir (Kaufmann 1996; Shkap ve ark. 1998; Bashuriddin ve ark. 1999; Xuan ve ark. 2001a; Xu ve ark. 2003; Balkaya 2004; Boldbaatar ve ark. 2005). Bu çalışmada cELİSA ile incelenen kan serumlarında *B. equi* antikorları %56,8 gibi yüksek oranda tespit edilmiş, buna karşın serumların hiçbirisinde *B. caballi* antikorları tespit edilememiştir (Tablo 2). Bunun nedenleri; ELİSA’da çapraz reaksiyonların çok görülmesi ve endemik bölgelerde *B. equi* enfeksiyonlarında iyileşmeden sonra bağışıklığın yıllarca sürmesi (Shkap ve ark. 1998; Martin 1999), buna karşın *B. caballi* enfeksiyonlarında bu sürenin iki yıla sınırlı (Bashuriddin ve ark. 1999) kalmasından kaynaklanmış olabilir.

Kompetitif ELİSA ile *B. equi* pozitif bulgular atların yaşlarıyla kıyaslandığında (Tablo 2) tüm yaş gruplarında *B. equi* enfeksiyonu görüldüğü ve ileri yaştaki atlarda bu oranın daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bu durum *B. equi* antikorlarının dolaşım kanında çok uzun süre kaldığına dair bulguları destekler nitelikte bulunmuştur. Ayrıca, Adana yöresi atlarında *B. equi*’nin tüm yaş gruplarında

yaygın görüldüğünü, yaşla orantılı olarak bağışıklığın arttığı düşünülecek olursa (Shkap ve ark. 1998; Martin 1999) yaşlı atların enfeksiyonun yayılışında portör rolü oynadığına dair kanaati (Bashuriddin ve ark. 1999) pekiştirmiştir. Erkek atlarda *B. equi* oranı dişilere göre bir miktar fazla (60/52.5) bulunmuş olsa da ciddi bir farklılık gözlenmemiştir.

Boophilus, *Hyalomma*, *Dermacentor* ve *Rhipicephalus* soylarına bağlı kene türlerinin *B. equi*’ye vektörlük yaptığı bildirilmiştir (Kaufmann 1996; Bashuriddin ve ark. 1999; Martin 1999; Edward ve ark. 2011). Bu çalışmada sahada muayene edilen atların üzerinden toplanan kene türlerinin (*H. marginatum* ve *R. turanicus*) Afrika’da *B. equi*’nin vektörü olarak bildirilen (Kaufmann 1996; Guimaraes ve ark. 2003; Edward ve ark. 2011), türlerden olduğu anlaşılmıştır. Türkiye’de *R. turanicus*’un atlar üzerinde görüldüğü bildirilmiştir (Merdivenci 19694). Akdeniz havzasında *B. equi*’ye vektörlük yaptığı bildirilen (Kaufmann 1996; Bashuriddin ve ark. 1999) *R. bursa*’ya bu çalışmada rastlanmamıştır. Elde edilen kene türlerinin azlığı nedeniyle, yörede *Babesia* enfeksiyonlarının vektörü olabilecek keneler üzerinde daha fazla araştırma yapmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, Bu çalışma ile; Adana yöresinde mikroskopik olarak bakışı yapılan 220 ata ait frotilerin hiçbirinde babesiosis etkenlerine rastlanmamış, bu sonuçların dünyanın değişik ülkelerinde yapılan benzer çalışmalar ile paralel olduğu gözlenmiştir.

Serolojik olarak çok yüksek oranda çıkan *B. equi* enfeksiyonuna karşın, mikroskopik muayene ile tespit edilemeyen subklinik ve kronik enfeksiyonların Adana yöresinde yaygın olduğu ve portör atların belirlenmesinde serolojik testlerin mikroskopik yöntemlere göre daha duyarlı olduğu anlaşılmıştır. Hastalıkla mücadelede, hastalığın önemi ve kene enfestasyonlarının rolü konusunda hayvan sahiplerinin bilgilendirilmesinin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Avarzed A, De Wall DT, Igarashi I, Saito A, Oyamada T, Toyoda Y et al. (1997). Prevalance of equine piroplasmosis in central Mongolia, Onderstepoort. *J Vet Res*, 64,141-145.
- Baldani CD, Machado RZ, Botteon PTL, Takakura FS, Massard CL (2004). An enzyme linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. *Cienc Rural*, 34, 1525-1529.
- Balkaya İ (2004). Türkiye’nin farklı bölgelerinde atlarda *B. equi* ve *B. caballi*’nin yayılışının mikroskopik ve serolojik yöntemlerle araştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Bashuriddin JB, Cama C, Rebelo E (1999). Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gen. *Vet Parasitol*, 84, 75-83.
- Boldbaatar D, Xuan X, Battsetseg B, Igarashi I, Batur B, Batsukh Z et al. (2005). Epidemiological study of equine piroplasmosis in Mongolia. *Vet Parasitol*, 27, 35-38.
- Brüning A, Phipps P, Posnett E (1997). Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis. *Vet Parasitol*, 68, 11-26.
- Edwards RZ, Moore H, LeRoy BE, Latimer KS (2011). Equine Babesiosis: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/edwards/index.php>
- Farah AW, Hegazy NA, Romany MM, Soliman YA, Daoud AM (2003). Molecular detection of *Babesia equi* in infected and carrier horses by polymerase chain reaction. *Egypt J Immunol*, 10, 73-79.
- Guimaraes AM, Lima JD, Ribeiro MFB (2003). Ultrastructure of *Babesia equi* trophozoites isolated in minas gerais, brazil. *Pesq Vet Bras*, 23,101-104.
- Karaer Z, Yukarı BA, Aydın L (1997). Türkiye Keneleri ve Vektörlükleri İçinde: Parazitoloji’de Artropod Hastalıkları ve Vektörler, Özcel MA, Daldal N (Ed), 363-433, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Kaufmann J (1996). Parasitic Infections of Domestic Animals: A Diagnostic Manual. Birkhauser Verlag, Berlin.

- Kumar S, Kumar Y, Malhotra DV, Dhar S, Nichani AK (2003).** Standardization and comparison of serial dilution and single dilution elisa using different antigenic preparations of the Babesia equi parasite. *Vet Res*, 34, 71-83.
- Martin R (1999).** Equine piroplasmosis: the temporary importation of seropositive horses into Australia. *Aust Vet J*, 7, 308-309.
- Merdivenci A (1969).** Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak Yayınları, İstanbul.
- Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, Samlali M, Ammons D (2003).** A field evaluation of PCR for the routine detection of Babesia equi in horses. *Vet Parasitol*, 114, 81-87.
- Sarı B, Kırmızıgül AH, Deniz A, Taşçı GT (2010).** Kars ve Ardahan yöresinde kış mevsiminde atlarda Babesia caballi ve Theileria equi 'nin seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 657-661.
- Sevinç F, Maden M, Kumaş C, Sevinç M, Ekici ÖD (2008).** A comparative study on the prevalence of Theileria equi and Babesia caballi infections in horse sub-populations in Turkey. *Vet Parasitol*; 156, 173-177.
- Shkap V, Cohen I, Leibovitz B, Savitsky, Pipano E, Avni G et al (1998).** Seroprevalance of Babesia equi among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Vet Parasitol*, 76, 251-259.
- Tanaka T, Xuan X, Ikadai H, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T et al (1999).** Expression of Babesia equi merozoite antigen- 2 by recombinant Baculovirus and its use in the ELISA. *Int J Parasitol*, 29, 1803-1808.
- Xu Y, Zhang S, Huang X, Bayin C, Xuan X, Igarashi I et al (2003).** Seroepidemiologic studies on Babesia equi and Babesia caballi infections in horses in jilin province of China. *J Vet Med Sci*, 65, 1015-1017.
- Xuan X, Igarashi I, Avarzed A, Ikadai N, Inoue N, Nagasawa H et al (1998).** Diagnosis of Babesia caballi infection in horses by polymerase chain reaction. *J Protozool Res*, 8, 85-89.
- Xuan X, Nagai A, Battsetseg B, Fukumoto S, Makala LH, Inoue N et al (2001a).** Diagnosis of equine piroplasmosis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens. *J Vet Med Sci*, 63, 1159-1160.
- Xuan X, Larsen A, Ikadai H, Tanaka T, Igarashi I, Nagasawa H et al (2001b).** Expression of Babesia equi merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant Baculovirus and evaluation of its diagnostic potential ELISA. *J Clin Microb*, 39, 705-709.