

Clinical and Laboratory Investigations of Besnoitiosis in Cattle

Naci ÖCAL¹, Buğrahan B. YAĞCI¹, Sami GÖKPINAR²

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, TURKEY

²Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, TURKEY

ABSTRACT

Bovine besnoitiosis is an important disease of the integument caused by *Besnoitia besnoiti*, a cyst-forming apicomplexan protozoan. The disease, especially in the chronic form, causes serious economical loss due to its consequences including infertility, low skin quality and its high spread among cattle farms. The aim of this study was to investigate the presence of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. Using a commercial *Besnoitia*-Antibody Detection ELISA test kit, the sera obtained from the blood samples of 360 cattle located in farms in the province of Kırıkkale. In addition, skin biopsy samples were collected from four cattle with lesions resembling those resulting from Besnoitiosis and were examined histopathologically for presence of cysts induced by *Besnoitia besnoiti*. According to the results of the present study, 80 (26.6 %), local breed cattle out of 300 examined and 43 (71,6 %) imported cattle out of 60 examined were seropositive for *Besnoitia besnoiti*. Cysts of the parasite were not determined in the skin biopsy specimens with histopathological examination. In this study, the presence of *B. besnoiti* in domestic and imported cattle in Kırıkkale region and the seroprevalence of imported animals were found to be high and it was determined that imported animals were at risk in the spread of disease.

Key words: Besnoitiosis, Cattle, Turkey

Sığırlarda Besnoitiosis'in Klinik ve Laboratuvar Yönden Araştırılması

ÖZET

Sığır besnoitiosis'i, kist şekillendiren apikompleksan, *Besnoitia besnoiti* protozoan paraziti tarafından oluşturulan önemli bir deri hastalığıdır. Hastalık özellikle kronik formda, oluşturduğu infertilite, deri kalitesinde bozukluklar ve yüksek yayılma eğilimi nedeniyle ekonomik önem taşımaktadır. Bu çalışmada *Besnoitia besnoiti* etkenine karşı antikorların varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, Kırıkkale Yöresindeki yerleşim yerlerinden 360 adet sığır kan örneği toplanarak elde edilen serumlarda, anti-*Besnoitia* antikorları ticari ELISA test kiti ile araştırılmıştır. Klinik olarak Besnoitiosis'e benzer deri lezyonları görülen dört sığırdan deri biyopsi örnekleri alınarak rutin histopatolojik incelemelerle etkenin kistleri yönünden incelenmiştir. İncelenen 300 yerli sığıra ait serum örneklerinden 80'i (%26,6), 60 ithal sığıra ait serum örneklerinden ise 43'ü (%71,6) *B. besnoiti* yönünden seropozitif olarak saptanmıştır. Histopatolojik incelemesi yapılan deri biyopsi örneklerinde etkenin kistleri belirlenmemiştir. Çalışma ile Kırıkkale yöresinde yerli ve ithal sığırlarda *B. besnoiti*'nin varlığı ve özellikle ithal hayvanlarda seroprevalansın yüksek olduğu belirlenmiş olup hastalığın yayılmasında ithal hayvanların risk oluşturduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Besnoitiosis, Sığır, Türkiye

GİRİŞ

Sığır besnoitiosis'i, *Besnoitia besnoiti* paraziti tarafından oluşturulan, deri lezyonları ve sistemik semptomlarla karakterize, önemli bir protozoon hastalığıdır. Etken morfolojik olarak *Toxoplasma* ve *Sarcocystis*'e benzeyen, cyst-forming apicomplexan bir protozoondur (Bigalke 1993; Mehlhorn ve ark. 2009; EFSA 2010; Bigalke ve Prozesky 2004). Hastalık klinik olarak daha çok akut formda yüksek ateş, iştahsızlık, burunda, periorbital ve skrotal bölgelerde kızarıklık ve deri altı yaygın ödem (anasarka); kronik fazda ise kilo kaybı ve deri lezyonları alopesi, kalınlaşma, kıvrımlaşma ile karakterize skleroderma şeklinde kendini göstermektedir (Bigalke 1993; Bigalke ve Prozesky 2004). Hastalık, kronik seyri, oluşturduğu infertilite, deri kalitesinde bozukluklar ve yüksek yayılma eğilimi nedeniyle ekonomik önem taşımaktadır (Cortes ve ark. 2005; Özdek ve ark., 2019). Etkenin sığırlara bulaştırılmasının karnivorlar aracılığı ile olduğu belirtilmekle birlikte, sığırlar arasında nazo-farengial yolla ve mekanik olarak kan emen insektler aracılığı ile de bulaşmanın olduğu vurgulanmaktadır (Gollnick ve ark. 2015). Besnoitiosis 6 aylıktan küçük sığırlarda daha az görülmesine rağmen daha büyük yaştaki her ırk ve cinsiyetteki sığırlar hastalığa daha duyarlıdır. Hastalığın Afrika, İsrail, Fransa, Almanya, Rusya, Güney Kore, Portekiz ve Venezuela dahil olmak üzere dünyada yaygın olduğu belirtilmektedir (Mehlhorn ve ark. 2009; Cortes ve ark. 2005; Alzieu ve ark. 2007; Mutinelli ve ark. 2011; Gollnick ve ark. 2017). Ancak ülkemizde bu hastalıkla ilgili bir bilgi henüz ortaya konmamıştır. Son yıllarda ülkemize ithal hayvan girişleriyle bu tür bir hastalığın önemli bir deri problemi olarak karşımıza çıkma olasılığına dikkat çekmek açısından bu çalışmanın bir başlangıç oluşturacağı düşünülmektedir.

Hastalığın klinik tanısı skleroderma fazında daha kolay olmakla birlikte akut fazda tanıyı koymak laboratuvar incelemelerini gerektirmektedir (Bigalke 1993; Gentile ve ark. 2012). Ayrıca etkenle karşılaşmış hayvanların yaygınlığının belirlenmesinde serolojik testlerden yararlanılmaktadır (Gollnick ve ark. 2017; Gentile ve ark. 2012; Shap ve ark. 1984).

Hastalıktan şüphe edilen deri lezyonlu hayvanlardan alınan deri biyopsilerinin histopatolojik incelemesinde dermis, subkutis ve intermuskuler fascia bölgelerinde kalın duvarlı parazit kistlerinin tespiti ile tanı doğrulanmaktadır (Bigalke

1993; Mehlhorn ve ark. 2009; Alzieu ve ark. 2007; Gollnick ve ark. 2017; Gentile ve ark. 2012).

Yapılan bir deneysel çalışmada, tavşanlara etkenle birlikte oxytetracycline uygulamasının hastalığın ortaya çıkışını yavaşlattığı belirtilmektedir (Bigalke 1993). Ancak bugüne kadar sığırlarda besnoitiosis'in kesin sağaltımı için etkili bir tedavi protokolü ortaya konmamıştır. Ayrıca, hastalığı atlatan ve subklinik hayvanların yaşam boyu portör kalmaları da önemli bir risktir (Gollnick ve ark. 2017; Frey ve ark. 2013). Dolayısıyla hastalığın serolojik taramasının yapılarak koruyucu önlemlerle yayılmasının önüne geçilmesi önemli bir yöntem olarak dikkat çekmektedir.

Alvarez-Garcia ve ark. (2013); Basso ve ark. (2013); Hornok ve ark. (2014)'ünün belirttiği gibi, daha önce çoğu Avrupa ülkelerinde bildirilmiş olan ve son on yılda Orta Avrupa'nın endemik bölgelerinden diğer bölgelere coğrafik yayılım gösteren besnoitiosis'in ülkemizde varlığının araştırılması ve ülkemize giren ithal hayvanların bu hastalığın yayılmasında bir risk faktörü olup olmadığının belirlenmesi ve bu çalışma sonuçlarına göre alınacak önlemlerin hayata geçirilmesi ekonomik açıdan katkı sağlayacaktır.

MATERYAL VE METOT

Kırıkkale Yöresindeki yerleşim yerlerinden farklı ırk ve cinsiyetten 6 aylıktan büyük 300 yerli ve 60 ithal olmak üzere toplam 360 sığırdan kan örneği toplanmıştır. Kan örneklerinden izole edilen serumlarda, *Besnoitia*-Antibody Detection ELISA test kiti (PrioCHECK *Besnoitia* Ab 2.0, Prionics, Zurich, Switzerland) kullanılarak, *B. besnoiti* etkenine karşı antikorların varlığı araştırıldı. Ayrıca, klinik olarak besnoitiosise benzer deri lezyonlarına sahip 4 hayvandan panç biyopsi ile örnekler toplandı (EFSA 2010; Gollnick ve ark. 2015; Gentile ve ark. 2012).

ELISA Test Kiti ile Örneklerin İncelenmesi:

Sığır serumların incelenmesi ELISA test kiti ile üretici ticari firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. İşlem ana hatlarıyla aşağıdaki şekilde yapıldı.

İlk aşamada sulandırma plate kullanılmıştır. Plate'in ikişer kuyucuğuna sırasıyla pozitif kontrol, zayıf pozitif kontrol ve negatif kontrolden 20 µl, kalan kuyucukların her birine test edilecek olan sığır serumlarından 10'ar µl eklendi. Pozitif

ve negatif kontrol konulan kuyucuklardan biri hariç geriye kalan tüm kuyucuklara 90 µl sample diluent eklenerek, plate çalkalayıcıda karışmaları sağlanmıştır.

Test plate'inin her kuyucuğuna 90 µl sample diluent eklendi. Daha sonra sulandırma plate'ndeki kontrol ve örneklerden 10'ar µl alınarak test plate'ne aktarıldı. Plate çalkalayıcıda 1 dk çalkalandı. Plate daha sonra 60 dk oda ısısında inkube edildikten sonra yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl sulandırılmış konjugat eklendi ve 30 dk oda ısısında inkubasyona bırakıldı. Inkubasyon sonunda tekrar yıkama işlemi aynı şekilde yapıldı. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 100 µl kromojen substrate eklendi ve oda ısısında 15 dk inkube edildi. Süre sonunda kuyucuklara stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Plate 300 rpm'de, 10 sn plate çalkalayıcıda çalkalanarak 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutuldu. %PP değeri aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Örnek \%P (PP)} = \frac{OD(\text{örnek}) - OD_{nk}}{OD_{pk} - OD_{nk}} \times 100$$

Cut-off değeri (%P) ≥ 23'ten büyük olan serumlar pozitif olarak değerlendirildi. (*nk: negatif kontrol, *pk:pozitif kontrol)

Deri biyopsilerinin Histopatolojik İncelenmesi:

Deriden alınan biyopsi örnekleri %10 luk formol solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen deri örnekleri rutin patolojik takip prosedürlerinden geçirildi. Daha sonra, Langenmayer ve ark (2015)'nin tarif ettiği gibi, etkenin kistin belirlenmesi için histopatolojik incelemeler yapıldı.

BULGULAR

Klinik Muayene Bulguları:

Çalışmaya alınan yerli hayvanların 279'unun dişi, 21'inin erkek, ithal hayvanların ise tamamının erkek olduğu tespit edildi. Ayrıca, 356 hayvanın sağlıklı olduğu ve yerli hayvanlardan dördünün klinik olarak besnoitosis'in kronik şeklini andıran, kilo kaybı ve deride kepeklenme, alopesi, kalınlaşma, kıvrımlaşma belirtileri gösterdiği saptandı.

Kan örnekleri toplanan hayvanların yerleşim yeri ve ırk özelliklerine göre dağılımları ve diğer bulguları Tablo 1- Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 1. Yerli Hayvanların Yerleşim Yerlerine Göre Dağılımı ve Seropozitiflik Oranları

| Örnek alınan yerleşim yeri | Örnek sayısı (n) | Pozitif örnek sayısı (n) | % Seropozitiflik oranı |
|----------------------------|------------------|--------------------------|------------------------|
| Keskin | 104 | 29 | 27.8 |
| Kırıkkale Merkez | 37 | 4 | 10.8 |
| Bahşılı | 12 | 3 | 25 |
| Balışeyh | 38 | 14 | 36.8 |
| Sulakyurt | 27 | 0 | 0 |
| Delice | 34 | 20 | 58.8 |
| Yahşihan | 15 | 4 | 26.6 |
| Çelebi | 15 | 4 | 26.6 |
| Kalecik | 6 | 0 | 0 |
| Karakeçili | 12 | 2 | 16.6 |
| Toplam | 300 | 80 | Ortalama % 26.6 |

Tablo 2. İthal Hayvanların Yerleşim Yerlerine Göre Dağılımı ve Seropozitiflik Oranı

| Örnek alınan yerleşim yeri | Örnek sayısı (n) | Seropozitif sayısı | %Seropozitiflik oranı |
|----------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|
| Balışeyh | 60 | 43 | %71.6 |
| Toplam | 60 | 43 | %71.6 |

Tablo 3. Yerli Hayvanların Irk Dağılımı ve Seropozitiflik Oranları

| İrklar | Örnek sayısı (n) | Seropozitif sayısı (n) | % Seropozitiflik oranı |
|----------------|------------------|------------------------|------------------------|
| Montofon | 43 | 13 | %30.2 |
| Holstein | 105 | 20 | %19.0 |
| Simental | 36 | 16 | %44.4 |
| Jersey | 3 | 0 | %0 |
| Belçika Mavisi | 1 | 0 | %0 |
| Yerlikara | 8 | 2 | %25 |
| Bozırk | 7 | 0 | %0 |
| Melez | 97 | 29 | %29.9 |
| Toplam | 300 | 80 | Ortalama %26.6 |

Tablo 4. İthal Hayvanların Irk Dağılımı ve Seropozitiflik Oranı

| İrklar | Örnek sayısı (n) | Seropozitif sayısı (n) | %Seropozitiflik oranı |
|----------------|------------------|------------------------|-----------------------|
| Belçika mavisi | 60 | 43 | %71.6 |
| Toplam | 60 | 43 | %71.6 |

Serolojik Bulgular:

ELISA test kiti ile sığır serumların incelenmesi ve ELISA okuyucu sonucuna göre 360 sığır serumundan 123'ünün (%34,1) *B. besnoiti* yönünden seropozitif olduğu saptandı. Seropozitifliğin yerli hayvanlar arasında ortalama %26,6 (Tablo 1), ithal hayvanlar arasında ise %71,6 (Tablo 2), olduğu belirlendi.

Histopatolojik Bulgular:

Histopatolojik olarak incelenen 4 deri biyopsisinde, keratinize katmanın, epidermis ve dermisteki hücresel yapının tamamen normal görünümde olduğu ve parazite ait herhangi bir kist formuna rastlanmadığı gözlemlendi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda, EFSA (2010), sığır besnoitiosisini Avrupa'da ortaya çıkan veya yeniden yayılmaya başlayan bir hastalık olarak tanımlamıştır. Portekiz, İspanya, Fransa'da salgınlar bildirilmiş, bunun yanında İtalya, Almanya, İsviçre ve Yunanistan'da enfeksiyon varlığı bildirilmiştir (Alvarez-Garcia ve ark. 2013; Basso ve ark. 2013; Hornok ve ark. 2014; Langenmayer ve ark. 2015; Schares ve ark. 2009; Gazzonis ve ark. 2014; Papadopoulos ve ark. 2014). Bu çalışmada Türkiye'de

de seropozitifliğin saptanması hastalığın özellikle Akdeniz ülkelerinde hızlı bir yayılım gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Besnoitia besnoiti ile subklinik enfekte sığırların serolojik olarak belirlenmesi enfekte hayvanların hastalıktan arı sürülere girmesinin önlenmesi açısından önemlidir (Papadopoulos ve ark. 2014). Schares ve ark. (2011) çalışmamızda kullandığımız ticari ELISA kitinin duyarlılık ve özgüllüğünü değerlendirmişler ve besnoitiosissten etkilenen sığır sürülerinde *B. besnoiti*'ye özgü antikor taşıyan hayvanları belirlemek amacıyla kullanılabilecek değerli bir teşhis aracı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ilgili kitin *Toxoplasma gondii* ve *Neospora caninum* enfeksiyonları ile çapraz reaksiyon göstermediği sonucuna varmışlardır. Böylece enfekte hayvanların, sağlam hayvanlardan ayrılıp, sığır besnoitiosis salgınlarında ihtiyaç duyulan kontrol önlemlerini destekleyebileceğini ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda seropozitif olarak tespit edilen hayvanların tümü besnoitiosis yönünden subklinik hayvanlardır. Subklinik enfekte hayvanların, etkenle daha önce karşılaşmamış saf sürülere katılması enfeksiyonların sürüler arasında ve ülkeler arasında geçişinde önemli rol oynamaktadır (Papadopoulos ve ark. 2014). Çalışmamızda gerek yerli, gerekse ithal sığırlarda

B. besnoiti yönünden seropozitiflik saptanması, ileride sığır yetiştiriciliğimizi etkileyecek düzeyden salgınların ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları Türkiye’de özellikle ithal edilen sığırlarda *B.besnoiti* serolojik taramalarının düzenli bir şekilde yapılması gerektiğini ortaya koyması açısından önemlidir.

Besnoitiosis 6 aylıktan küçük sığırlarda daha az görülmesine rağmen daha büyük yaştaki her ırk ve cinsiyetteki sığırın hastalığa duyarlı olduğu belirtilmektedir (Cortes ve ark. 2005; Alzieu ve ark. 2007). Yapılan çalışmada da örneklemede 6 aylıktan büyük yaştaki hayvanlar seçilmiştir. Serolojik tarama sonucunda farklı ırktaki ve yaştaki hayvanlarda seropozitifliğin saptanması (Tablo 3, 4) literatür bilgilerini destekler bulunmuştur.

Sığır besnoitiosis’i *B. besnoiti* protozoon paraziti tarafından oluşturulan deri ve sistemik semptomlar oluşturan önemli bir protozoon hastalıktır (EFSA2010). Hastalıktan şüphelenilen deri lezyonlu hayvanlardan alınan deri biyopsilerinin histopatolojik incelemesinde dermis, subkutis ve intermuskuler fascia bölgelerinde kalın duvarlı parazit kistlerinin tespiti ile tanı doğrulanmaktadır (Bigalke 1993; Mehlhorn ve ark. 2009; Alzieu ve ark. 2007). Çalışmamızda besnoitiosis’in kronik seyrine benzeyen deri lezyonuna sahip 4 hayvandan aldığımız biyopsilerin histopatolojik incelemesinde parazitin kistine rastlanmamış ve dolayısıyla lezyonların besnoitiosisten kaynaklanmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, bu hayvanların seronegatif olarak belirlenmesi de, histopatolojik sonucu destekler şekilde bulunmuştur.

Sonuç olarak, serolojik incelemelerde, Kırkkale bölgesinde *B. besnoiti*’ye karşı antikor varlığının, yerli hayvanların ortalama %26.6’sında saptanması, Alvarez-Garcia ve ark. (2013); Basso ve ark. (2013); Hornok ve ark. (2014)’nın belirttiği gibi, daha önce çoğu Avrupa ülkelerinde bildirilmiş olan ve son on yılda Orta Avrupa’nın endemik bölgelerinden diğer bölgelere coğrafik yayılım gösteren besnoitiosis’in ülkemizde de varlığını göstermiştir.

Ayrıca, bölgedeki Litvanya kökenli ithal besi hayvanları arasında seropozitifliğin %71.6 gibi yüksek oluşu da ülkemize giren ithal hayvanların bu hastalığın yayılmasında en önemli risk faktörü olduğunu da çarpıcı bir şekilde ortaya koymuştur. Yine benzer şekilde, yerli hayvanlardan Simental (son 20

yılda ülkemize en çok ithal edilen ırk) ırkı hayvanlar arasında seropozitifliğin diğer ırklara göre daha yüksek (%44.4) olması da bu riske dikkat çekmektedir. Dolayısıyla hayvan ithalatında besnoitiosis’in de dikkate alınmasının gerekliliği kaçınılmazdır.

KAYNAKLAR

- Alvarez-Garcia G, Frey CF, Mora LM, Schares G. (2013). A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends Parasitol*, 29: 407-15.
- Alzieu JP, Cortes H, Gottstein B, Jacquiet P, Dorchies P, Schelcher F, L’Hostis M. (2007). La besnoitiose bovine: actualites epidemiologiques et diagnostiques. *Bull GTV. Horse-serie parasitisme des bovins*. 41-9.
- Basso W, Lesser M, Grimm F, Hilbe M, Sydler T, Trösch L, Braun U, Deplazes P. (2013). Bovine besnoitiosis in Switzerland: Imported cases and local transmission. *Vet Parasitol*, 198: 265-73
- Bigalke RD, Prozesky L. (2004). Besnoitiosis. In: Ceotzer JAV, Tustin RC. (eds), *Infectious diseases of livestock*. 2nd Oxford University Press, p. 351-9.
- Bigalke RD. (1993). Besnoitiosis (Elephant Skin Disease, Olifantsvelsiekte). In: Howard JL, editor. *Current Veterinary Therapy 3, Food Animal Practice*. WB Saunders Company: Philadelphia, p.596-8.
- Cortes H, Leitao A, Vidal R, Vila-Viçosa MJ, Ferreira ML, Caeiro V, Hijerpe CA. (2005). Besnoitiosis in bulls in Portugal. *Vet Rec*, 157: 262-4.
- European Food Safety Authority. (2010). Bovine Besnoitiosis: An emerging disease in Europe. *EFSA Journal*, 8(2): 1499.
- Frey CF, Gutierrez-Exposito D, Ortega -Mora LM, Benavides J, Marcen JM, Castillo JA, Casaus I, Sanz A, Garcia-Lunar P, Esteban-Gil A, Alvarez-Garcia G. (2013). Chronic bovine besnoitiosis: Intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases. *Vet Parasitol*, 197: 95-103.
- Gazzonis AL, Alvarez Garcia G, Zanzani SA, Garippa G, Rossi L, Maggiora M, Dini V, Invernizzi A, Luini M, Tranquillo VM, Ortega Mora L, Manfredi M. (2014). Besnoitia besnoiti among cattle in insular and northwestern Italy: endemic infection or isolated outbreaks. *Parasites & Vectors*, 7:585.
- Gentile A, Militerno G, Schares G, Nanni A, Testoni S, Bassi P, Gollnick NS. (2012). Evidence for bovine besnoitiosis being

- endemic in Italy-First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy. *Vet Parasitol*, 184:108-115.
- Gollnick NS, Scharr JC, Schares S, Schares G, Langenmayer MC. (2015). Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: chronology of disease progression. *BMC Vet Res*, DOI: 10.1186/s12917-015-0344-6.
- Gollnick NS, Scharr JC, Schares S, Barwald A, Schares G, Langenmayer MC. (2017). Naturally acquired bovine besnoitiosis: Disease frequency, risk and outcome in an endemically infected beef herd. DOI: 10.1111/tbed.12810.
- Hornok S, Fedak A, Baska F, Hofmann-Lehmann R, Basso W. (2014). Bovine besnoitiosis emerging in Central-Estern Europe, Hungary. *Parasites and Vectors*, 7:20.
- Langenmayer MC, Gollnick NS, Majzoub-Altweck M, Scharr JC, Schares G, Hermanns W. (2015). Naturally acquired bovine besnoitiosis: Histological and immunohistochemical findings in acute, subacute, and chronic disease. *Vet Pathol*, 52: 476-88.
- Mehlhorn H, Klimpel S, Schein E, Heydorn AO, Al-Quraishy S, Selmaier J. (2009). Another African disease in Central Europa: besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study. *Parasitol Res*, 104: 861-8.
- Mutinelli F, Schiavon E, Ceglie L, Fasolato M, Natale A, Rampin F, Carminato A. (2011). Bovine besnoitiosis in imported cattle in Italy. *Vet Parasitol*, 178 (1-2): 198.
- Özdek ve ark., 2019
- Papadopoulos E, Arsenos G, Ptochos S, Katsoulos P, Oikonomou G, Karatzia MA, Karatzias H. (2014). First report of *Besnoitia besnoiti* seropositive cattle in Greece. *Hellenic Vet Med Soc*, 65(2):115-20.
- Schares G, Basso W, Majzoub M, Cortes HCE, Rostaher A, Selmaier J, Hermanns W, Conraths FJ, Gollnick NS. (2009). First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Vet Parasitol*, 163:315-22.
- Schares G, Basso W, Majzoub M, Rostaher A, Scharr JC, Langenmayer MC, Selmaier J, Dubey JP, Cortes HC, Conraths FJ, Haupt T, Pürro M, Raeber A, Buholzer P, Gollnick NS. (2011). Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Vet Parasitol*, 175:52-9.
- Shap V, Pipano E, Greenblatt C. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. *Trop Anim Health Prod* 16: 233-8.