

# SIĞIRLARDA THEILERIA TÜRLERİNİN REVERSE LINE BLOTTING VE İNDİREK FLORESAN ANTİKOR TESTİ İLE KARŞILAŞTIRMALI TANISI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR\*

"Comparative Studies on Detection of Bovine Theileria Species by Reverse Line Blotting and Indirect Fluorescent Antibody Test"

Ahmet DENİZ\*\* • Zafer KARAER\*\*\*

## ÖZET

Bu çalışma, 2001-2002 tarihleri arasında Ankara bölgesinde RLB (Reverse Line Blotting), IFA (İndirek Floresan Antikor testi) testleri ve mikroskopik bakı ile sığırlarda *Theileria* türlerinin tanısını yapmak, tanı yöntemlerinin karşılaştırmalı geçerliliğini tespit etmek, ayrıca eşzamanlı, yani bir örnekte aynı soya bağlı birden fazla türün saptanabildiği RLB testinin rutin olarak laboratuvarlarda ve özellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilirliğini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, Ankara iline bağlı 9 ilçeye ait köylerde meraya çıkan hayvanlardan, rastgele seçilen 250 sığırdan IFAT ve RLB testlerinde kullanılmak üzere kan alınmıştır. Sonuç olarak, mikroskopik bakıda %29,6; IFA testinde (*T.annulata*) %28,8; RLB yönteminde ise % 47,6 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Kullanılan yöntemler duyarlılık ve özgüllük bakımından karşılaştırıldığında RLB'ye göre, mikroskopik bakının %59,8; IFAT (*T.annulata*)'ın ise %64,6 oranında duyarlı olduğu görülmüştür. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk defa sığırlarda *Theileria buffeli* tespit edilmiştir.

**Summary:** This study was carried out to diagnose *Theileria* species in cattle by using RLB, IFA and microscopic examination; to compare the diagnosis methods; in addition to detect the value of the usage of RLB, that can detect more species belong to the same family, routinely in laboratory and particularly in epidemiological studies in Ankara region between 2001-2002. For this purpose, the blood samples were randomly collected from 250 cattle from the villages of 9 towns of Ankara province. At the end of the examination of the samples, according to the tests, 29,6% positivity was detected by microscopic examination, 28,8% by IFA and 47,6% by RLB. When the tests used were compared according to RLB regarding to their sensitivity and specificity, the sensitivity of microscopic examination was detected to be 59,8% and IFA 64,6%. The differences among the three tests were statistically found to be significant and it is concluded that RLB was more sensitive and specific compared to the other two tests. By this study, *Theileria buffeli* was firstly detected in cattle in Turkey.

**Anahtar Sözcükler:** Ankara, *Theileria annulata*, *Theileria buffeli*, IFAT, RLB, Sığır.

**Key Words:** Ankara, *Theileria annulata*, *Theileria buffeli*, IFAT, RLB, Cattle.

\* Aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2001-08-10-035 proje numarası ile desteklenmiştir.

\*\* Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü. 06020 Etlik / ANKARA

\*\*\* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 06110 Dışkapı/ANKARA

## GİRİŞ

Theileriosis, hayvanlarda *Theileria* türlerinin sebep olduğu, Ixodidae ailesine bağlı vektör keneler ile nakledilen protozoer bir hastalıktır. Tropikal ülkelerde ve Türkiye'nin de içinde bulunduğu subtropikal (iklim kuşağındaki) ülkelerde yaygın olarak görülen bu hastalık özellikle sığır yetiştiriciliğini tehdit etmektedir (11,15,21,24,25,26,29,35,40,41). Sığırlarda theileria etkenlerinden *Theileria annulata* (Tropikal theileriosis'e sebep olur) ve *T.parva* (Doğu sahil hummasına sebep olur) diğer türlere göre daha patojen olup, hastalığın seyrinde ağır ve şiddetli klinik tablo ortaya çıkar. Diğer sığır theileriosis etkenlerinden *T.buffeli* az patojen, *T.mutans*, *T.velifera*, *T.taurotragi* apatojen olarak bilinir, genellikle hastalık seyri semptomsuz subklinik olup bazen şiddetli olmayan klinik belirtiler görülmektedir (43).

Theileriosis'in teşhisi, direkt olarak etkenin belirlenmesi veya parazite karşı oluşan özgün antikorların tespit edilmesi ile yapılmaktadır (14,30,41). *Theileria* etkenlerinin belirlenmesi, ya etkenin bizzat perifer kan ve lenf yumrusu biyopsi frotilerindeki gelişme şekillerinin mikroskopik bakışı, ya da moleküler biyolojik yöntemler ile nükleotid tespiti şeklinde yapılmaktadır (14,41,42,46). Kanda görülen Protozoer ve Riketsial hastalıklarda, akut enfeksiyonları atlaman hayvanlar taşıyıcı hale gelirler (42). Bu taşıyıcı hayvanlar vektör keneler için enfeksiyon kaynağı oluşturmakta ve enfekte olmayan hayvanlardan klinik olarak ayıramamaktadır. Etkenler genellikle kanda az sayıda bulunmakta ve kan frotisi incelemelerinde görülememektedir (14). Diğer taraftan hastalık tanısında kullanılan serolojik yöntemlerde genellikle indirekt yöntemler olduğu için, direkt etken değil etkene ait antikorların saptanması esasına göre değerlendirilmektedir. Her iki durumda da subklinik seyirli olgularda, bilhassa keneler için enfeksiyon kaynağını teşkil eden

taşıyıcı hayvanların tespiti mümkün değildir. Hastalık ile ilgili değerlendirmelerde bu dezavantajlar, teşhiste daha özgül ve duyarlı metotların gerekliliğini ortaya koymuş ve moleküler biyolojik teşhis yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur (14, 36). Moleküler biyolojik yöntem olarak ilk geliştirilen DNA prob yöntemini, PZR ve RLB yöntemleri takip etmiştir (46). Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte, hastalık etkenlerinin DNA'sını ortaya koymaya yönelik yöntemler (DNA Hybridisation, PCR=Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu) de ortaya çıkmış ve kullanılmaya başlanmıştır. Parazit DNA'sının ortaya konması ilkesine dayanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) testi, çeşitli *Theileria* ve *Babesia* türlerinin duyarlı ve özgül biçimde teşhisini olanaklı kılmaktadır (5,8,9,10,12,13,23,36,37). PZR testi ile ilgili çalışmaların yaygınlaşan kullanımının yanı sıra, hayvanlarda bulunabilecek bütün kan parazitlerini bir defada ortaya koyabilecek kombine bir testin arayışları devam etmiştir. Birden fazla türün PZR ile aynı anda teşhis edilebilmesini sağlayan ilk çalışmalar (Multiplex PZR) Figueroa ve ark. (14) tarafından radyoaktif olmayan digoxigenin ile işaretli problemler kullanılarak *Babesia bovis*, *B.bigemina* ve *Anaplasma marginale*'ye yönelik olarak yapılmıştır. Ancak gerçek anlamda ilk gelişme RLB (Reverse Line Blotting) tekniğinin ortaya çıkması ile sağlanmıştır. Bu test PZR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problemlere hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Teknik, bir çok etkenin aynı anda birçok prob ile karşılaştırılmasına olanak sağladığından, oldukça pratik ve kullanışlıdır (17).

Reverse Line Blotting tekniğini, Randall ve ark. (32) ilk defa insanlarda orak hücre anemisi ile  $\beta$  Talasemi hastalıklarının teşhisinde kullanmışlardır. Daha sonra Reverse Line Blotting tekniği aynı kenede bulunabilen 4 *Borrelia*

türünün ayrılması için kullanılmıştır (33). Kamerbeek ve ark. (19) aynı metodu kullanarak *Mycobacterium tuberculosis*'in teşhisini ve tiplendirilmesini yapmışlardır. Gubbels ve ark. (17) 18S ssrRNA genindeki V4 değişken bölgesini çoğaltan primerler kullanarak elde etikleri PZR ürünlerini, RLB tekniğinde kullanmışlar ve sığırlardaki *Theileria annulata*, *T.parva*, *T.mutans*, *T.taurotragi*, *T.velifera*, *T.buffeli*, *Babesia bovis*, *B.bigemina* ve *B.divergens*'in aynı anda spesifik olarak teşhis edilebileceğini göstermişlerdir. Günümüzde RLB kullanımını gittikçe artmakta ve hayvanlarda bulunan bütün kene ile bulaşan hastalıkların teşhisinde kullanılan standart bir test haline geldiği bildirilmektedir (4,16,22,37,38,39).

Bu çalışma, Ankara bölgesinde sığırlarda görülen *Theileria* türlerinin RLB (Reverse Line Blotting), IFA (İndirek Floresan Antikor testi) testleri ve mikroskopik bakı ile tanısını yapmak, tanı yöntemlerinin karşılaştırmalı geçerliliğini tespit etmek, ayrıca RLB testinin rutin olarak laboratuvarlarda ve özellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilirliğini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmanın materyalini Ankara bölgesinde değişik yerleşim merkezlerinden seçilen sağlıklı ve hasta sığırlardan toplanan kan oluşturmuştur. Materyal toplamak amacıyla Temmuz-2001 ile Temmuz-2002 tarihleri arasında Ankara İl'ine bağlı Merkez, Polatlı, Beypazarı, Elmadağ, Gölbaşı, Haymana, Kızılcahamam, Çubuk ve Bala İlçe'lerinin farklı köylerine gidilerek 250 sığır klinik olarak muayene edilmiş, 7 hasta ve 243 sağlıklı sığırların her birinden EDTA'lı ve serum tüplerine kan alınmıştır. Ayrıca her sığırın kuyruk ucundan yayma froti yapılmıştır. Steril serum tüplerine alınan sığır kanları 2500 devirde 10 dakika santrifüj edilerek çıkan serumlar 1,5 ml'lik mikro tüplere konmuş, IFA testinde kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. DNA ekstraksiyonu için

toplanan EDTA'lı kanlar soğutmalı kaplarda laboratuvar'a getirilerek PZR ve RLB testlerinde kullanılmak üzere ya hemen DNA ekstraksiyonu yapılmış ya da daha sonra DNA ekstraksiyonu yapılmak üzere +4°C'de saklanmıştır. Perifer kandan yapılan yayma frotiler ise tekniğine uygun şekilde boyanarak mikroskopta incelemeye hazır hale getirilmiştir.

**DNA Ekstraksiyonu:** DNA ekstraksiyonu genel olarak d' Oliveira ve ark. (8) ile Gubbels ve ark. (17)'nin bildirdiği şekilde yapılmıştır. Ekstraksiyon için 1,5 ml mikro tüplere 200µl kan üzerine 500µl lysis buffer (%0.22 NaCl, 1 mM EDTA, %0.015 Saponin) ilave edilmiş ve bu karışım vorteksle iyice karıştırılarak eritrositlerin parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra tüpler 3300 rpm'de 5 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı atılmış dipteki çöküntü üzerine 500 µl lysis buffer ilave edilerek aynı işlem 3 defa daha tekrarlanmıştır. Son yıkama işleminden sonra elde edilen çökelti üzerine 100 µl PZR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, %0.5 Tween 20, 100 µg/ml Proteinase K) ilave edilerek vortekslenmiştir. Proteinase K, stok halde hazır bulundurulan PZR buffera, kullanılmadan hemen önce 100 µg/ml oranında ilave edilmiştir. PZR bufferla karıştırılan çöküntü, Proteinase K aktivitesini gösterebilmesi için 55°C'deki su banyosunda 12 saat tutulmuştur. Bunu takiben örnekler 90°C'de 10 dk. tutulmuş ve sonra da 13000 rpm'de 2 dak. santrifüj edilerek üste kalan sıvı PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

**Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):** Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Biometra TGradient (Whatmann, Biometra) PZR makinesi kullanılmıştır. Reaksiyonda primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S ssu rRNA (Small subunit ribosomal RNA) geninin V4 değişken bölgesinden büyüklüğü 460 ile 520 bp (base pairs=baz çifti) arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler (RLB-F2 5' GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G'3 ve RLB-R2 5'-biotin- CTA AGA ATT TCA CCT

CTG ACA GT'3) kullanılmıştır (16,17) (Çizelge1). Reaksiyon karışımı (1X PCR buffer (Sigma ve Fermentas), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma ve Fermentas), 200 µM herbir (dATP, dCTP, dGTP), 100 mM (dTTP, dUTP) deoxynucleotiden (Sigma ve Fermentas), 50 pmol herbir primerden, 1,25 U Taq DNA polymerase (Sigma ve Fermentas), 1,25 U Uracil DNA glycosylase (Fermentas), 5 µl DNA örneği) 50 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Karışım herbiri 200 µl'lik ısıya dayanıklı özel PZR reaksiyon tüplerine (Tref Lab) 45 µl reaksiyon karışımı 5 µl DNA olmak üzere porsiyonlanmıştır. Reaksiyon için tüpler otomatik PZR makinesine yerleştirilmiş ve iki sikluslu touch down PZR programı uygulanmıştır. PZR reaksiyonu, 37 °C'de 3 dakika UDG inkübasyonu ve 94 °C'de 10 dakika UDG denaturasyonu, 94 °C'de 20 sn, 67 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn olmak üzere 40 siklus üzerinden yapılmıştır. Son siklusu takiben 65 °C'de bekleme yapılmıştır. Elde edilen ürünler RLB'de kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır. Testin bilinen Theileria türlerinin DNA'larını amplifiye ettiğini göstermek amacıyla pozitif kontrol olarak *T.annulata* (Ankara, Hisar ve AKSA izolatları), *T.buffeli* (ILRI, Kenya), *T.parva* (ILRI, Kenya), *T.mutans* (ILRI, Kenya) ve negatif kontrol olarak da sığır DNA'sı kullanılmıştır.

**Reverse Line Blotting (RLB):** Bu aşamada kullanılan problemlerin tamamı negatif yüklü Biodyne C membrana (Pall Biosupport group, Ann Arbor, MI) kovalent olarak bağlanabilmeleri amacıyla, 5'-terminallerinde amino grubu (N-terminal N-(trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl,N,N-diisopropyl phosphoramidite [TFA])-C6 amino linker) ihtiva edecek şekilde Genset (Fransa), Isogen (Hollanda) ve MWG (Almanya) firmalarına sentezletirilmiştir (Çizelge 2).

Membran Georges ve ark. (16) ile Gubbels ve ark.(17)'nin bildirdiği şekilde hazırlanmıştır. Problemler 500 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.4) içinde 100-800 pmol/150 µl konsantrasyonlarda sulandırılmıştır. Kullanılacak olan membran oda ısısında 10 dakika, 10 ml %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethyl-

lamino-propyl)carbodiimide) (Sigma) ile aktive edilmiş ve sonra su ile yıkanmıştır. Membran yıkama işleminden sonra MN45 miniblottera (Immunitics, Cambridge, Mass) yerleştirilmiştir. Membran üzerindeki kalıntı sıvılar iyice aspire edildikten sonra, ilk ve son kanala 2X SSPE ile %2 oranında sulandırılmış çini mürekkebi, diğer kanallara ise her probtan 150 µl dökülmüş, oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kanallardaki sıvılar aynı şekilde aspire edilerek boşaltılmıştır. Miniblotterdan çıkarılan membran 100 mM NaOH içinde 10 dakika inkübe edilerek inaktive edilmiştir. İnaktivasyon sonunda membran 2X SSPE/0.1 SDS karışımında 60 °C'de 5 dakika yıkanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

**RLB Hibridizasyonu:** Hibridizasyon Georges ve ark. (16) ile Gubbels ve ark. (17)'na göre yapılmıştır. Önceden elde edilen PZR ürünlerinin her birinden 30 µl alınarak, 2X SSPE/0.1 SDS karışımı ile 150 µl'ye tamamlanmış ve 100 °C'de 10 dakika denatüre edilmiştir. Membran önceden dökülen prob sıraları ile miniblotterın kanalları 90° açı yapacak şekilde miniblottera yerleştirilmiştir. Membrandaki fazla sıvı aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.

Denatüre edilen ve sulandırılan PZR ürünleri miniblotterın kanallarına dökülmüş 42°C'de 1 saat boyunca inkübe edilerek, problemlerle hibridizasyonları sağlanmıştır. Bu aşamada miniblotterın çalkalanmamasına dikkat edilmiştir. Hibridizasyon süresinin sonunda kanallardaki sıvı aspire edilmiştir. Miniblotterdan çıkarılan membran, 2X SSPE/0.15 SDS solüsyonu ile 2 defa 52°C'de 10 dakika yavaşça çalkalanarak yıkanmıştır. Bu işlemi takiben membran, 42 °C'de 30 dakika 10 ml Horseradish Peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin solüsyonunda hafif çalkalanarak (2X SSPE/%0.5 SDS ile 1:4000 oranında sulandırılmış) inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben membran 2X SSPE/0.5 SDS ile 2 defa 42°C'de 10 dakika yıkanmıştır. Son olarak, 2X SSPE ile 2 defa oda ısısında 5 dakika yıkanmıştır.

Membran 10 ml ECL sıvısında 1 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben sert bir zemine alınan membranın üzeri asetarla örtülerek, hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra karanlık ortamda üzerine ECL hyperfilm konulmuştur. Sinyal yoğunluğuna göre film 30 sn ile 1 saat arasında tutulmuştur. Daha sonra filmler banyo

edilerek geliştirilmiştir. Değerlendirmede filmler üzerinde prob ve PZR ürünlerinin döküldüğü sıralarının kesiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir. İstendiğinde ECL filmindeki görüntü UVP dokümantasyon sistemi ile fotoğraf haline getirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. PZR ürünlerinin RLB testine tabi tutulmasından sonra membranın görüntüsü. Sıralar 1-43 Sahadan elde edilen örneklerin PZR ürünleri (30 negatif kontrol). Sütunlar: Özgün problemler 1- Catch all, 2- T.annulata, 3- T.buffeli/orientalis, 4- T.mutans, 5- T.velifera, 6- T.taurotragi, 7- NaHCO3 buffer. (Orijinal)

Çizelge 1 PZR'da Kullanılan Primerler

Primerin Adı	Dizilişi	Kaynak
RLBF <sub>2</sub>	5'GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G'3	Gubbels ve ark., 1999
RLBF <sub>2</sub>	Biotinle işaretli 5'TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC'3	Gubbels ve ark., 1999

Çizelge 2 Biodyne C membrana tutturulan aminolinkerli problemlerin 5'-3' dizilişleri \*

Özgün Olduğu Tür	Diziliş (5'-3')	Kaynak
<i>Theileria Babesia Türleri ( CatchAll)</i>	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG	Gubbels ve ark., 1999
<i>T. annulata</i>	CCTCTGGGGTCTGTGCA	Gubbels ve ark., 2001
<i>T. buffeli/orientalis</i>	GGCTTATTTCCGWTTGATTTT	Gubbels ve ark., 1999
<i>T. mutans</i>	CTTGCGTCTCCGAATGTT	Gubbels ve ark., 1999
<i>T. taurotragi</i>	TCTTGGCACGTGGCTTTT	Gubbels ve ark., 1999
<i>T. velifera</i>	CCTATTCTCCTTTACGAGT	Gubbels ve ark., 1999

\* T: thymine; A: adenine; C: cytosine; G: guanine; W: A veya T; R: A veya G.

### İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT):

İndirek floresan antikor (IFA) testi için gerekli *T.annulata* piroplasm ve şizont antijenleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalından temin edilmiştir. *T.annulata* piroplasm antijeni için 1:20, şizont antijeni için ise 1:40 temel titre olarak kabul edilmiştir (7).

**Kan Frotilerinin Tespiti, Boyanması ve Muayenesi:** Her bir hayvandan yapılan ince frotiller laboratuvarında metil alkolde 5 dakika tespit

edildikten sonra %5'lik Giemsa boya solusyonu (PBS ile %5 oranında sulandırılmış Giemsa boyası, pH 7.2) ile oda ısısında 30-45 dakika boyanmıştır. Daha sonra preparatlar mikroskopta immersiyon yağı damlatılarak mikroskobun 100'lük objektifi altında incelenmiş ve her preparatta 200 mikroskop sahası içinde bulunan piroplazmalı eritrositler sayılmış, bulunan sayı 200 sahadaki enfekte eritrosit sayısı (n/200) olarak kaydedilmiştir.

**İstatistiksel Değerlendirmeler:** Testlerin

sonuçları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliği  $\chi^2$  (ki kare), uyumlulukları ise Kappa testi ile incelenmiştir. Bu istatistiksel testler için SPSS 10.0 programı kullanılmıştır.

### Bulgular

Bu çalışma ile çalışma merkezlerindeki 243 sağlıklı sığırın mikroskopik bakı, IFA ve RLB ile theileriosis pozitiflikleri saptanmış ve Çizelge 3'de gösterilmiştir.

sayısı göz önüne alındığında, Ankara bölgesinde sığırlarda *Theileria* türleri prevalansının %50,8 (127/250) olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada uygulanan tanı yöntemlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi, RLB ile mikroskopik bakı, RLB (*T.annulata*, *T.annulata*+*T.buffeli*) ile IFAT (*T.annulata*) ve mikroskopik bakı ile IFAT (*T.annulata*) karşılaştırılarak yapılmıştır. Mikroskopik bakıda *Theileria* türlerinin ayrımı yanlışlıklara sebep olabileceğinden

Çizelge 3. Mikroskopik bakı, IFA ve RLB sonuçlarının çalışma merkezlerine göre dağılımı

Çalışma Merkezleri	Hayvan Sayısı	Mikroskopik Bakı		IFAT		RLB	
		Pozitif	%	Pozitif	%	Pozitif	%
Merkez İlçe	46	2	2,34	0	0	9	19,56
Bala	31	14	45,16	17	54,83	18	58,06
Beyazarı	6	4	66,66	6	100	4	66,66
Çubuk	45	19	42,22	24	53,33	28	62,22
Elmadağ	44	2	4,54	6	13,63	17	38,63
Haymana	22	9	40,90	2	9,09	9	40,90
Kızılcahamam	10	0	0	0	0	6	60
Polatlı	39	17	43,58	15	38,46	21	53,84
<b>Toplam</b>	<b>243</b>	<b>67</b>	<b>27,57</b>	<b>70</b>	<b>28,80</b>	<b>112</b>	<b>46,09</b>

Bu çizelgeden de anlaşılacağı gibi (Çizelge 3) sığırlarda theileriosis prevalans değerlerinin mikroskopik bakıda %27,57, IFA'da %28,80 RLB'de %46,09 olduğu tespit edilmiştir. Çalışma merkezlerine göre, mikroskopik bakıda, prevalans değeri -0- olan Kızılcahamam hariç diğer çalışma merkezlerinde pozitiflik oranının %4,54-%66,66 arasında, IFAT ile seroprevalansı -0- olan Merkez ilçe ve Kızılcahamam hariç diğerlerinde seroprevalans oranının %9,09-%100 arasında, RLB ile çalışma merkezlerinin tamamında pozitiflik saptanmış olup prevalans değerlerinin %19,56-%66,66 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Testlerden herhangi biri ile pozitif bulunan hayvan

sadece soy düzeyinde (*Theileria* sp.) değerlendirilmiştir (Çizelge 4). RLB pozitif 112 örnekten, mikroskopik bakıda 67'sinin pozitif, 45'nin negatif olduğu anlaşılmaktadır. Aynı çizelgede mikroskopik bakı pozitif RLB negatif örnek bulunmadığı görülmektedir. Testler kendi aralarında karşılaştırıldığında RLB ile mikroskopik bakı uyumluluğunun %61,6, mikroskopik bakı duyarlılığının %59,8, özgüllüğünün %100 olduğu görülmüştür.

RLB'de saptanan *T.annulata* ve *T.annulata* + *T.buffeli* pozitiflikleri, IFA testinde saptanan *T.annulata* seropozitifleri (*T.buffeli* antijeni olmadığı için) ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4. RLB ve Mikroskopik bakı sonuçlarının karşılaştırılması

		Mikroskopik Bakı		TOPLAM
		-	+	
RLB	-	131 (%100)	0	131 (%100)
	+	45 (%40,2)	67 (%59,8)	112 (%100)
<b>TOPLAM</b>		<b>176 (%72,4)</b>	<b>67 (%27,6)</b>	<b>243 (%100)</b>

Çizelge 5. RLB (*T.annulata*, *T.annulata*+*T.buffeli*) ile IFAT (*T.annulata*) sonuçlarının karşılaştırması

		IFAT		TOPLAM
		-	+	
RLB	-	139 (%94,6)	8 (%5,4)	147 (%100)
	+	34 (%40,2)	62 (%64,6)	96 (%100)
<b>TOPLAM</b>		<b>173 (%71,2)</b>	<b>70 (%28,8)</b>	<b>243 (%100)</b>

Bu çizelgeye göre (Çizelge 5) RLB pozitif 96 örnekten, IFAT ile 62'sinin seropozitif, 34'ünün seronegatif olduğu anlaşılmaktadır. Aynı çizelgede RLB de negatif bulunan 8 örneğin IFA testi ile seropozitif olduğu görülmektedir. Testler kendi aralarında karşılaştırıldığında RLB ile IFAT 62 (%64,6) örnekte uyumlu sonuç vermiştir. RLB ile

IFA testi uyumluluğunun %62,1, RLB testine göre IFAT'ın duyarlılığının % 64,6, özgüllüğünün %94,6 olduğu görülmüştür.

Mikroskopik bakı ile IFAT (*T.annulata*) sonuçlarının karşılaştırması Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6. Mikroskopik bakı ile IFAT (*T.annulata*) sonuçlarının karşılaştırması

		IFAT		TOPLAM
		-	+	
MB	-	154 (%87,5)	22 (%12,5)	176 (%100)
	+	19 (%28,4)	48 (%71,6)	67 (%100)
<b>TOPLAM</b>		<b>173 (%71,2)</b>	<b>70 (%28,8)</b>	<b>243 (%100)</b>

\* MB: Mikroskopik bakı

Buna göre (Çizelge 3.4) mikroskopik bakıda pozitif bulunan 67 örneğin IFA testi ile 48'inin seropozitif, 19'unun seronegatif olduğu tespit edilmiştir. Mikroskopik bakıda negatif bulunan 22 örneğin IFA testi ile seropozitif olduğu saptanmıştır. Testler kendi aralarında karşılaştırıldığında mikroskopik bakı ile IFAT 48 (%71,6) örnekte uyumlu sonuç vermiştir. Mikroskopik bakı ile IFA testinin uyumluluğunun %58,3; mikroskopik bakıya göre IFA testinin duyarlılığı %71,6, özgül-

lüğü %87,5 olduğu görülmüştür.

Yukarıda değerlendirilen her üç tanı yöntemi sonuçları arasındaki farklılık, istatistiksel olarak önemli bulunmuş ( $p < 0.001$ ), ayrıca RLB'nin diğer iki yöntemle göre *Theileria* türlerinin saptanmasında daha duyarlı olduğu anlaşılmıştır.

Çalışma merkezlerindeki sığırlarda *Theileria annulata* ve *T.buffeli*'nin tespiti RLB ile gerçekleştirilmiş ve türlerin dağılımı Çizelge 7'de gösterilmiştir.

Çizelge 7. RLB ile *Theileria* türlerinin çalışma merkezlerine dağılımı

Çalışma Merkezleri	RLB Pozitif	<i>T.annulata</i>	<i>T. buffeli</i>	<i>T.annulata</i> + <i>T.buffeli</i>
Merkez İlçe	9/48	2	7	0
Bala	18/31	17	0	1
Beypazarı	4/9	2	0	2
Çubuk	28/45	25	0	3
Elmadağ	17/44	13	2	2
Haymana	9/22	6	1	2
Kızılcahamam	6/10	2	2	2
Polatlı	21/39	13	4	4
<b>Toplam</b>	<b>112/243</b>	<b>80</b>	<b>16</b>	<b>16</b>

Bu çizelgeden anlaşılacağı gibi (Çizelge 7) 112 theileriosis olgusundan 80 (%32,92)'inde *T.annulata*, 16 (%6,58)'sında *T.buffeli*, geri kalan 16 (%6,58)'sında ise *T.annulata*+*T.buffeli* bir arada bulunmuş; çalışma merkezlerinin tamamında *T.annulata* ve *T.buffeli* saptanmış, sadece *T.annulata* bütün çalışma merkezlerinde, sadece *T.buffeli*

Bala, Beypazarı ve Çubuk hariç diğer merkezlerde, iki türe birlikte Merkez ilçe hariç diğer çalışma merkezlerinde rastlanmıştır.

Çalışma dönemi içinde rastlanan klinik seyirli 7 theileriosis olgusunda RLB ile *T.annulata* ve *T.buffeli* türlerinin dağılımı Çizelge 8'de gösterilmiştir.

Çizelge 8. Hasta hayvanlarda RLB'ye göre theileria türlerinin dağılımı

Çalışma Merkezleri	Hasta Hayvan Sayısı	RLB		
		<i>T.annulata</i>	<i>T. buffeli</i>	<i>T.annulata</i> + <i>T.buffeli</i>
Merkez İlçe	2	2	0	0
Beypazarı	3	1	0	2
Gölbaşı	2	2	0	0
<b>TOPLAM</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

Bu çizelgeye göre (Çizelge 8) 7 hasta sığırdan 5'inin *T.annulata* ile, 2'sinin *T.annulata*+*T.buffeli* türleri ile enfekte olduğu, sadece *T.buffeli* ile enfeksiyon saptanamadığı görülmektedir.

### Tartışma ve Sonuç

Sığırlarda theileriosis, kenelerle nakledilen, Türkiye'nin de içinde bulunduğu tropik ve subtropik ülkelerde hayvancılığı tehdit eden ve ekonomik kayıplara yol açan önemli bir hastalıktır (26,35,44). Sığırlarda *Theileria* etkenlerinden *Theileria annulata* (Tropikal theileriosis), ülkemizde her bölgede görülmekte ve her yıl büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunun yanında serolojik ve mikroskopik teşhiste yanlışlıklara sebep olan *T.buffeli* az patojen tür olarak kabul edilmektedir (44).

Hastalığı atlatan hayvanlar portör haline gelmekte ve vektör kenelerin enfeksiyon kaynağını oluşturmakta, enfekte olmayan hayvanlardan klinik olarak ayırlanamamaktadır. Bu portör hayvanlarda mikroskopik bakı ile etkenlerin piroplasmik formlarını görmek ve çeşitli *Theileria* türleri arasında ayırım yapmak zor ve yanlışlıklara

sebeptir (6,14). Özellikle saha şartlarında birden fazla türün oluşturduğu enfeksiyonlarda bu durum önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (8). Diğer taraftan hastalık tanısında dolaşımdaki antikorları ortaya koymak amacıyla IFAT, ELISA gibi serolojik yöntemler kullanılmaktadır (18,31). Ancak *Theileria* türleri arasında çapraz reaksiyonların görülmesi, bu testlerin yeterince duyarlı olmasını engellemektedir (2,28). Bunun yanında, uzun süreli portörlük durumlarında kanda piroplasmik formlar bulunmasına rağmen, antikorlar her zaman tespit edilememektedir (31).

Yukarıda belirtildiği gibi, *Theileria* türlerinin teşhisinde gerek mikroskopik gerekse serolojik yöntemlerde karşılaşılan olumsuzluklar teşhiste daha duyarlı metotların gerekliliğini ortaya koymuş ve moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, geliştirilen PZR tekniği veteriner parazitolojide de yer bulmuş ve *theileria* türlerinin teşhisi ile ilgili çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (3,8,9,10,20,37). Ancak tür spesifik PZR yöntemlerinin kullanılması, her hastalık etkeni için ayrı testlerin yapılması gerektiğinden hem zaman hem de ekonomik kayıplara neden olmak-



tadır. Bu nedenle bir defada birden fazla hastalık etkeninin teşhisine olanak sağlayan ve aynı zamanda PZR'a göre daha duyarlı olan bu çalışmada da uygulanan RLB yöntemi geliştirilmiştir (16,17).

Bu çalışma ile aynı zamanda RLB, mikroskopik bakı ve IFAT'ın duyarlılık ve özgüllük bakımından karşılaştırmaları da yapılmıştır. RLB'ye göre mikroskopik bakının duyarlılığı %59,8; IFAT'ın duyarlılığı %64,6 olarak saptanmış ve RLB'nin diğer iki yöntemle göre *Theileria* türlerinin saptanmasında daha duyarlı ve özgül olduğu anlaşılmıştır.

Diğer taraftan bu çalışmada kullanılan teşhis yöntemlerinden mikroskopik bakı ve RLB'de saptanan pozitiflikler karşılaştırıldığında, RLB'de pozitif olan 45 örneğin, mikroskopik bakıda negatif olması RLB'nin daha duyarlı olduğunun bir kanıtıdır. Aynı zamanda d'Oliveira ve ark. (8) ve Martin-Sanchez ve ark. (23)'nin yaptığı çalışmalarla paralellik göstermektedir. Bunun yanında RLB (*T.annulata*, *T.annulata*+*T.buffeli*) ve IFAT (*T.annulata*)'da saptanan pozitiflikler karşılaştırıldığında, IFAT'da pozitif olan 8 örneğin RLB'de negatif olması, Papadopoulos ve ark. (28)'nin da belirttiği gibi IFA testinin başka bir tür ile çapraz reaksiyon verme olasılığına veya kanda etken bulunmadığı halde antikorların varlığını devam ettirmesine (17) bağlanabilir. Bunun aksine RLB'de pozitif olan 34 örneğin, IFAT'da negatif olması, kanda etkenlerin olduğu halde antikorların bulunmadığını göstermektedir ki bu durumun da Pipano (31), d'Oliveira ve ark. (8) ve Martin-Sanchez ve ark. (23)'nin bildirdiği gibi, *Theileria* enfeksiyonlarından sonra uzun süreli portörlük durumlarında kanda piroplozmik formların bulunmasına rağmen, antikorların zamanla azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Orta Anadolu bölgesinde yapılan çalışmalarda mikroskopik bakıda prevalansın %17,87-%94,32

arasında olduğu bildirilmiştir (15,27). Bu çalışmada ise Ankara çevresinde mikroskopik bakıda sığırlarda theileriosis'in prevalansı %29,6 olarak tespit edilmiştir. Ankara çevresinde IFA testi ile yapılan serolojik çalışmalarda *T.annulata*'nın seroprevalansı %19-31,7 (34)- %44,9 (45) oranlarında bulunmuştur. Bu çalışmada ise IFA testine göre Ankara çevresinde *T.annulata*'nın seroprevalansı %28,80 olarak tespit edilmiştir. Bugüne kadar Türkiye'de *Theileria* türlerinin teşhisi konusunda moleküler biyolojik metotlarla yapılan çalışmalar çok az sayıdadır. PZR ile *T.annulata*'nın teşhisi ilk olarak Aktaş ve ark. (1) tarafından yapılmış ve %30,9 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Vatanser ve Nalbantoğlu (45) nested-PZR ile Ankara bölgesinde *T.annulata*'nın prevalansını %61,2 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise Ankara bölgesinde RLB ile *Theileria* türlerinin prevalansı %47,6 (%34 *T.annulata*, %6,4 *T.buffeli*, %7,2 *T.annulata* + *T.buffeli*) olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Türkiye'de sığırlarda *Theileria* türlerinin teşhisinde ilk defa PZR testini hibridizasyonla birleştiren RLB testi kullanılmıştır. Mikroskopik bakı ve IFA testi ile yapılan karşılaştırmalarda RLB'nin daha duyarlı ve özgül olduğu ortaya konmuştur. RLB ile aynı anda çok sayıda örnekte birden fazla *Theileria* türünün teşhisi ve bunların miks enfeksiyonlar meydana getirebileceği tespit edilmiştir. Bu metot ile direkt etken teşhis edildiğinden, hastalığın yayılmasında vektör keneler için kaynak oluşturan portör hayvanların tespit edilmesi açısından da faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır. Testin sağladığı pratik yararlar yanında, Ankara bölgesinde sığırlarda *Theileria* türlerinin yayılışı ile ilgili güncel veriler elde edilmiş ve Türkiye'de ilk defa sığırlarda *Theileria buffeli*'nin varlığı ortaya konmuştur.

## • KAYNAKLAR •

1. AKTAS, M., DUMANLI, N., CETINKAYA, B., ÇAKMAK, A. (2002). Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infection in cattle in eastern Turkey, Vet.Rec., 150: 548-549.
2. BURRIDGE, M. J., BROWN, C.G., KIMBER, C. D.(1974). *Theileria annulata*: crossreactions between cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. Exp. Parasitol., 35: 374-380.
3. BISHOP, R., SOHANPAL, B., KARIUKI, D. P., YOUNG, A.S., NENE, V., BAYLIS, H., ALLSOPP, B.A., SPOONER, P.R., DOLAN, T.T., MORZARIA, S.P. (1992). Detection of a carrier state in *Theileria parva*-infected cattle by the polymerase chain reaction. Parasitol., 104: 215-232.
4. BEKKER, C., de VOS, S., TAOUFİK, A., SPARAGANO, O., JONGEJAN, F. (2002). Simultaneous detection of Anaplasma and Erlichia species in ruminants and detection of *Erlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridisation. Vet. Microbiol., 89: 223-238.
5. CALDER, J.A.M., REDDY, G.R., CHIEVES, L., COUTNEY, C.H., LITTLE, R., LIVENGOOD, J.R., NORVAL, R.A.I., SMITH, C., DAME, J.B. (1996). Monitoring *Babesia bovis* infection in cattle by using PCR-based tests. J. Clin.Microbiol., 34(11): 2748-2755.
6. CECI, L., JONGEJAN, F., CARELLI, G., TASSI, P., SPARAGANO, O. (1999). Identification of *Theileria buffeli/orientalis* and *Babesia bigemina* in Apulian cattle using molecular techniques and study of changes in blood parameters. Parassitologia., 41(Suppl. 1): 31-32.
7. ÇAKMAK, A. (1987). Untersuchungen zur Inzidenz von Hamoparasiten in einer Rinderherde in der Provinz Ankara. Hannover, Tierarztl. Hochschule., Diss., 133p.
8. d'OLIVEIRA, C., VAN DER WEIDE, M., HABELA, M.A., JACQUIET, P., JONGEJAN, F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J.Clin. Microbiol., 33: 2665-2669.
9. d'OLIVEIRA, C., VAN DER WEIDE., JACQUIET, P., JONGEJAN, F. (1997). Detection of *Theileria annulata* by the PCR in ticks (Acari:Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. Exp. Appl. Acarol., 21: 279-291.
10. de KOK, J. B., D'OLIVEIRA, C., JONGEJAN, F. (1993). Detection of the protozoan parasite *Theileria annulata* in Hyalomma ticks by the polymerase chain reaction, Exp.Appl.Acarol., 17:839-846.
11. DOLAN, T.T. (1989). Theileriasis: a comprehensive review. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 8, 1:11-36.
12. FAHRIMAL, Y., GOFF, W.L., JASMER, D.P.(1992). Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. J.Clin. Microbiol., 30(6): 1374-1379.
13. FIGUEROA, J. V., CHIEVES, L. P., JOHNSON, G. S., BUENING, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood, Vet.Parasitol., 50: 69-81.
14. FIGUEROA, J. V., BUENING, G. M. (1995). Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. Vet.Parasitol., 75: 75-92.
15. GÖKSU, K. (1959). Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Tez, Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay. No: 115/60, Yeni Matbaa, Ankara, 73s.
16. GEORGES, K., LORIA, G. R., RIILI, S., GRECO, A., CARACAPPA, S., JONGEJAN, F., SPARAGANO, O. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of

- ticks in Sicily. *Vet. Parasitol.*, 99: 273-286.
- 17. GUBBELS, M. J., deVOS, S., VAN DER WEIDE, M., VISERAS, J., SCHOULS, L.M., de VRIES, E., JONGEJAN, F. (1999).** Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blotting hybridization. *J.Clin. Microbiol.*, 37: 1782-1789.
- 18. KACHANI, M., FLACH, E., WILLIAMSON, S., MCDONALD, F., SHIELS, B., SPOONER, R.L., AND OUHELLI, H. (1994).** The use of ELISA in theileriosis studies in Morocco. European Union third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey, p: 49-51.
- 19. KAMERBEEK, J., SCHOULS, L., KOLK, A., VAN AGTERVELD, M., VAN SOOLINGEN, D., KUIJPER, S., BUNSCHOTEN, A., MOLHUIZEN, H., SHAW, R., GOYAL, M., VAN EMBDEN, J. (1997).** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J.Clin. Microbiol.*, 35 (4): 907-914.
- 20. KIRVAR, E., ILHAN, T., KATZER, F., HOOSHMAND-RAD, P., ZWEYGARTH, E., GERSTENBERG, C., PHIPPS, P., BROWN, C. G. (2000).** Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences, *Parasitology*, 120:245-254.
- 21. LEVINE, N. D. (1985).** *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press, Ames, p: 313-328.
- 22. LUNEMANN, J. D., ZARMAS, S., PRIEM, S., FRANZ, J., ZSCHENDERLEIN, R., ABERER, E., KLEIN, R., SCHOULS, L., BURMESTER, G. R., KRAUSE, A. (2001).** Rapid typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1130-1133.
- 23. MARTÍN-SÁNCHEZ, J., VISERAS, J., ADROHER, F. J., GARCÍA-FERNANDEZ, P. (1999).** Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. *Parasitol. Res.*, 85: 243-245.
- 24. MİMİOĞLU, M., ULUTAŞ, M., GÜLER, S. (1971).** Yurdumuz sığırlarında theileriosis etkenleri ve diğer kan parazitleri. Ajans - Türk Matbaacılık Sanayii, Ankara, 89s.
- 25. NEITZ, W.O. (1957).** Theileriosis, gonderiosis and cytauxoonoses. *Ondestepoort J. Vet. Res.*, 27 (3): 319-346.
- 26. NORVAL, R.A.I., PERRY, B.D. AND YOUNG, A.S (1992)** The Epidemiology of Theileriosis in Africa. Academic Press, London., p: 481.
- 27. ÖZCAN, C. (1961).** Ankara civarında evcil hayvanlarda piroplasmose vak'aları ve tedavileri üzerinde araştırmalar. Doç. Tez. Ankara Üniv.Vet. Fak. Yay., 143, 83.
- 28. PAPADOPOULOS, B., PERIE, N.M., UILENBERG, G. (1996a).** Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece 1. Serological cross-reactions. *Vet.Parasitol.*, 63: 41-56.
- 29. PIPANO, E. (1965).** Piroplasmosis- A review. *Refuah Vet.*, 22, 181-175.
- 30. PIPANO, E. AND CAHANA, M. (1969).** Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Theileria annulata*. *J. Parasitol.*, 55: 765.
- 31. PIPANO, E. (1974).** Immunological aspects of *Theileria annulata* infection. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 31, 1-2:139-159.
- 32. RANDALL, K., SAIKI, B.S., CHU-AN CHAN, P.D., COREY, H., LEVENSON, P.D., TINA, C., WARREN, B.A., CORINNE, D., BOEHM, M.S., HAIG, H., KAZAZIAN, Jr.M.D., HENRY, A., ERLICH, P.D. (1988).** Diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -Thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probs. *N.Engl. J. Med.*, 309 (9): 537-541.

- 33. RIJPKEMA, S. G., MOLKENBOER, M. J., SCHOUL, L. M., JONGEJAN, F., SCHELLEKENS, J. F. (1995).** Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 3091-3095.
- 34. SAYIN, F., DİNÇER, Ş., KARAER, Z., ÇAKMAK, A., İNCİ, A., YUKARI, B.A., EREN, H. AND BROWN, C.G.D. (1992).** Epidemiological study on tropical theileriosis around Ankara. In: Veteriner Hekimliği Öğreniminin 150. Yılı, Ankara, Türkiye, p: 263-278.
- 35. SAYIN, F., DİNÇER, Ş., ÇAKMAK, A., İNCİ, A., YUKARI, B.A., VATANSEVER, Z., NALBANTOĞLU, S., DENİZ, A. (1997).** Tick-borne diseases in Turkey. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 29: 53S.
- 36. SPARAGANO, O. (1999).** Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. *J. Vet. Parasitol.*, 13(2): 83-92.
- 37. SPARAGANO, O., ALLSHOP, M.T., MANK, R.A., RIJPKEMA, S.G., FIGUEROA, J.V., JONGEJAN, F. (1999).** Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae) *Exp. Appl. Acarol.*, 23: 929-960.
- 38. SPARAGANO, O., LORIA, G. R., GUBBELS, M. J., DE VOS, A. P., CARACAPPA, S., JONGEJAN, F. (2000).** Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 916: 533-539.
- 39. SPARAGANO, O., CARELLI, G., CECI, L., SHKAP, V., MOLAD, T., VITALE, F., LORIA, G. R., REALE, S., CARACAPPA, S., BOUATTOR, A., ALMERIA, S., CASTELLA, J., CORCHERO, E., HABELA, M. (2002).** Pan-Mediterranean comparison for the molecular detection of *Theileria annulata*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 969: 73-77.
- 40. TÜZER, E. (1981).** İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. *İst. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 8 (1):97-110.
- 41. UILENBERG, G. (1981a).** *Theilerial* species of domestic livestock. In: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., Young, A.S. *Advances in the Control of Theileriosis. Proceeding of an International Conference Held at ILRAD, Nairobi, 9-13 February 1981.* Martinus Nijhoff, The Hague, p: 4-37.
- 42. UILENBERG, G. (1981b).** *Theilerial* infection other than East Coast Fever. In: *Diseases of Cattle in the Tropics.* Eds. M. Ristic and I. McIntyre, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague p:411-427.
- 43. UILENBERG, G. (1994).** Significance of tick-borne haemoparasitic diseases to animal health in the tropics. p. 7-28. In G. Uilenberg, A. Permin, J. W. Hansen (Eds), *Use of applicable biotechnological methods for diagnosing haemoparasites.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- 44. UILENBERG, G. (1995).** International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet. Parasitol.*, 57: 19-41.
- 45. VATANSEVER, Z., NALBANTOĞLU, S. (2002).** Sahada *Theileria annulata* ile enfekte sığırların Nested PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), IFA (İndirekt Floresan Antikor) testi ve kan frotisi bakışı ile saptanması. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 26: 1465-1469.
- 46. ZARLENGA, D.S., HIGGINS, J. (2001).** PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.*, 101: 215-230.