

**KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ SIĞIRLARDAN ELDE EDİLEN *BABESIA BOVIS* SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU\***

**Molecular Characterization of *Babesia bovis* Isolates Collected from Cattle in Black Sea Region**

**Önder DÜZLÜ<sup>1</sup>, Abdullah İNCİ<sup>2</sup>, Alparslan YILDIRIM<sup>3</sup>**

**Özet :** Bu çalışma, Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen *Babesia bovis* izolatlarının msa-2c gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonunun ortaya konulması ve Dünya'daki diğer benzer suşlarla benzerliklerinin kıyaslanması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, 2008-2010 tarihleri arasında Karadeniz Bölgesi'ndeki 13 ildeki, meraya çıkmış ve rastgele seçilmiş 542 sığırdan kan örnekleri toplanmıştır. Kan örneklerinden mikroskopik muayene için frotiller hazırlanırken bir yandan da kan örneklerinin ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar RLB testiyle *Babesia* ve *Theileria* türleri yönünden incelenmiştir. *Babesia bovis* olduğu saptanan 10 örneğin, msa-2c gen bölgesine spesifik primerlerle PCR'ı yapılmıştır. PCR sonucunda 798 bp'lik spesifik bantlar jelden ekstrakte edilerek sekansa gönderilmiştir. Sekans sonuçlarına göre 10 örneğin nükleotid dizilimleri saptanmış ve Dünya'daki diğer benzer suşlarla identiklik dereceleri kıyaslanmıştır. *Babesia bovis* izolatları GenBank'a kaydedilerek aksesyon numaraları alınmıştır. Sığırlardan toplanan kan örneklerinin mikroskopik incelemesinde babesiosis'in %1.7, theileriosis'in ise %9.2 oranında yaygınlık gösterdiği tespit edilmiştir. RLB sonuçlarına göre, *B. bovis*'in %1.8, *B. bigemina*'nın %2.2, *T. annulata*'nın %2, *T. buffeli/orientalis*'in de %20.6 oranlarında prevalans gösterdiği belirlenmiştir. *Babesia bovis* izolatlarının msa-2c gen bölgesine göre kendi aralarındaki identiklik oranının %94-99, Dünya'daki benzer suşlarla yakınlık derecelerinin ise %89-99 arasında değiştiği saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma ile, Türkiye'de ilk defa *B. bovis*'in msa-2c gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma sonucunun, gelecekte Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşı çalışmalarına temel teşkil edeceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Babesia bovis*, Karadeniz Bölgesi, moleküler karakterizasyon, msa-2c, sığır

**Summary:** This study was carried out to exhibit the molecular characterization of msa-2c gene region of *Babesia bovis* isolates collected from the cattle in Black Sea Region and to compare the similarity with the other similar isolates in the world. For this aim, the blood samples were collected from totally 542 cattle which were gone to pasture and selected randomly in different periods between 2008-2010 in 13 provinces of Black Sea Region in Turkey. While the blood smears were being prepared from the blood samples, the samples were extracted and the DNA was investigated for *Babesia* and *Theileria* species by RLB at the same time. PCR of 10 samples was performed with specific primers of msa-2c gene region. 798 bp bands obtained with PCR were extracted from the gel and sent for the sequencing. According to the sequence results, nucleotide sequences of 10 samples were exhibited and compared the similarity with other similar isolates in the world. *Babesia bovis* isolates were deposited to GenBank and the accession numbers were taken. In the microscopic examination of the blood samples collected from the cattle, the prevalence of babesiosis and theileriosis was determined as 1.7% and 9.2%, respectively. According to RLB results, the prevalence of *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. annulata* and *T. buffeli/orientalis* was detected as 1.8%, 2.2%, 2% and 20.6%, respectively. It was also established that the similarity of *B. bovis* isolates deposited to GenBank varied between 94-99% in each other and between 89-99% in the other similar isolates in the world. As a result, it was firstly characterized of msa-2c gene region of *B. bovis* with molecular methods in Turkey. It is thought that the results of this study will provide a basis for the vaccination studies with the characteristic Turkey isolates.

**Keywords:** *Babesia bovis*, Black Sea Region, molecular characterization, msa-2c, cattle

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr.Erciyes Ün.Vet.Fak.Parazitoloji AD, Kayseri  
<sup>2</sup> Prof.Dr.Erciyes Ün.Vet.Fak.Parazitoloji AD, Kayseri  
<sup>3</sup> Doç.Dr.Erciyes Ün.Vet.Fak.Parazitoloji AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 22.07.2010 Kabul Tarihi : 15.10.2010

\*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-08-346 nolu projeye ve Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı kapsamında MEDLABAB INCO-003691 kodlu projeye desteklenmiş olup, aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

Babesiosis; Apicomplexa anaç altındaki *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerdeki evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda da görülen, vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir protozoer hastalıktır. Hastalık özellikle yaz aylarında vektör kenelerin aktifleşmesiyle birlikte yüksek ateş, anemi, anoreksi, kaşeksi, hemoglobininüri, hipotansif şok ile seyretmekte ve ölümlere neden olmaktadır (1).

Sığırlarda bu hastalığa *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. major* ve *B. divergens* türleri yol açmaktadır (1). Sığırlarda en sık görülen türlerden biri olan ve zoonotik öneme de sahip olan *B. bovis*'in eritrositler içerisindeki merozoitleri; armut, yuvarlak veya düzensiz şekillidirler. *Babesia bovis* merozoitleri, 1.5-2.4 µm büyüklüğünde olup genellikle eritrositlerin ortasına yerleşirler (2). Bu merozoitler elektron mikroskopta incelendiğinde bunların yüzeyinde bir membran bulunduğu görülmüş ve bunun merozoit yüzey antijenleri olduğu ortaya konulmuştur. *Babesia* türleri, hayat sikluslarının ilk basamağı olan eritrositlere invazyon aşamasında, konak hücrelerine tutunmak için yüzey kısımlarında bulunan antijenleri kullanır. Bu yüzey antijenlerine karşı meydana gelen antikorlar ise parazitin konak eritrositlerine girişine engel olur (3). *Babesia bovis*'te; *msa-1*, *msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2a<sub>2</sub>*, *msa-2b* ve *msa-2c* olmak üzere beş adet merozoit yüzey antijeni bulunmaktadır. Dünyada *B. bovis*'e karşı aşı geliştirilmesi konusunda öncelikle parazitin merozoitlerinin eritrositlere tutunmasının engellenmesi amaçlanmıştır. Yüzey antijenleri arasında en yüksek korunmuşluğa sahip olan *msa-2c* antijeni aşı çalışmalarında daha çok tercih edilmektedir (4-9).

Bu çalışma ile Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan *B. bovis* DNA izolatlarının elde edilmesi, *msa-2c* gen bölgelerinin moleküler yöntemlerle teşhis edilmesi, bu bölgenin sekanslanması ve GenBank'a

kayıtlarının yapılması ile dünyadaki benzer suşlarla filogenetik olarak akrabalık derecelerinin tespit edilmesi ve *B. bovis*'e karşı aşı geliştirme çalışmalarında çok önemli olan yüzey antijenlerinin moleküler olarak karakterizasyonlarının net olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Saha Çalışmaları

#### *Hayvan Materyali (Sığırlar)*

Bu çalışmanın materyalini, 2008-2010 yıllarının çeşitli dönemlerinde Karadeniz Bölgesi'ndeki 13 vilayete (Amasya, Artvin, Bartın, Bolu, Çorum, Giresun, Karabük, Kastamonu, Ordu, Samsun, Tokat, Trabzon, Zonguldak) bizzat gidilerek veya Tarım İl Müdürlük'lerindeki Veteriner Hekimler ve serbest çalışan Veteriner Hekimlerle temasa geçilerek, meraya çıkmış ve rastgele seçilmiş toplam 542 sığırdan alınan kan örnekleri oluşturmuştur. Hayvanlara ait bilgiler (yaş, cinsiyet, ırk) hayvan sahiplerinden alınmış (Tablo I) ve genel sağlık durumları kaydedilmiştir.

#### *Kan Örnekleri*

Rastgele seçilen toplam 542 sığırın *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 Laboratuvarı'na getirilmiştir. Laboratuara getirilen kan örneklerinin her birine protokol numarası verilmiştir. Kan örneklerinden mikroskopik inceleme için preparatlar hazırlanmış ve analizleri yapılmaya kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

#### **Laboratuvar Çalışmaları**

**Tablo I.** Karadeniz Bölgesi'nde incelenen sığırların yerleşim yerine, yaş, cinsiyet ve ırkına göre dağılımı

Yerleşim Yeri	İncelenen Sığır Sayısı										
	*İrk				Yaş (yıl)			Cinsiyet		Toplam	
	Smntl	Hlstn	Mntfn	Jrsy	Yrl	≤2	3-5	≥6	Dişi		Erkek
Amasya	6	7	5	3	4	5	9	11	20	5	25
Artvin	3	5	2	1	1	1	6	5	10	2	12
Bartın	7	18	5	5	8	7	21	15	35	8	43
Bolu	3	8	5	4	4	6	11	7	19	5	24
Çorum	8	10	6	3	5	8	14	10	26	6	32
Giresun	13	22	9	8	12	14	22	28	51	13	64
Karabük	20	53	21	17	37	32	65	51	121	27	148
Kastamonu	4	7	3	2	2	4	8	6	15	3	18
Ordu	7	7	4	3	5	7	10	9	21	5	26
Samsun	10	13	7	11	12	18	16	19	40	13	53
Tokat	8	12	4	5	7	9	10	17	25	11	36
Trabzon	9	18	5	8	6	18	17	11	34	12	46
Zonguldak	2	5	3	2	3	3	5	7	14	1	15
<b>Toplam</b>	100	185	79	72	106	132	214	196	431	111	542

\*Smntl: Simental, Hlstn: Holstein, Mntfn: Montafon, Jrsy: Jersey, Yrl: Yerli

### **Mikroskopik İnceleme**

Sığırların vena jugularis'den alınarak EDTA'lı tüpler içerisinde laboratuara getirilen kan örneklerinden her bir hayvan için sürme preparatlar hazırlanmıştır. Frotiller 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 *Babesia* ve *Theileria* türleri yönünden incelenmiştir.

### **DNA Ekstraksiyonu**

Sığır kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Protozooloji-Entomoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'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.

### **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Reverse Line Blotting (RLB) testinde kullanılacak ampliconların elde edilmesi amacıyla yapılan PCR'da primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA (ribosomal RNA) geninin değişken V4 bölgesinden, büyüklüğü yak-

laşık 390 ile 430 bp (base pair) arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler (10) kullanılmıştır.

### **Reverse Line Blotting (RLB)**

RLB'de kullanılan proplar, negatif yüklü olan Biondine 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<sub>6</sub> aminolinker) içerecek şekilde Genset (Fransa), Isogen (Hollanda) ve MWG (Almanya) firmalarına sentezletirilmiştir. Propların sekans dizilimleri, Gubbels ve ark. (11) ve Georges ve ark. (10)'na göre alınmıştır. PCR ile elde edilen amplikonlar, önceden propların yüklendiği RLB membranına yüklenmiş ve hibridizasyona tabi tutulmuştur. RLB sonuçlarının değerlendirilmesinde hiper filmler üzerinde prob ve PCR ürünlerinin döküldüğü sıraların keşiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir.

### **Babesia bovis'e Ait msa-2c Gen Primerleri ile Yapılan PCR ve Jelden Ekstraksiyon**

*Babesia bovis* olduğu kesin olarak tespit edilen DNA örnekleri, *B. bovis*'in yüzey antijeni olan ve aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir gen bölgesi olan *msa-2c* antijenini amplifiye eden primerler kullanılarak tekrar PCR'a tabi tutulmuş ve PCR sonucunda jel elektroforezde görüntülenen yaklaşık 798 bp'lik bant, jel ekstraksiyon yöntemiyle kesilerek sekanslama için İontek firmasına gönderilmiştir. Bu gen bölgesini amplifiye eden primerler Borgonio ve ark. (6)'nın bildirdiği şekilde kullanılmıştır.

### **Sekans Analizleri**

Sekans analizi için; *Babesia bovis* yönünden pozitif bulunan; Amasya, Bartın, Bolu, Kastamonu, Trabzon ve Giresun'dan birer örnek, Karabük ve Samsun'dan ise ikişer örnek olmak üzere 8 farklı ilden

toplam 10 örneğin 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 aynı suşlarla identiklik yüzdeleri belirlenmiştir. Örnekler Genbank'a kayıt ettirilmiştir ve aksesyon numaraları alınmıştır. Örneklerin filogenetik analizleri ise Mega 4.1 programı ile yapılmıştır.

## **BULGULAR**

### **Mikroskopik Bulgular**

Mikroskopik inceleme sonucunda; Karadeniz Bölgesi'nde babesiosis prevalansı %1.7 (9/542), theileriosis prevalansı ise %9.2 (50/542) olarak tespit edilmiştir. Yerleşim yerlerine göre mikroskopik sonuçlar değerlendirildiğinde; babesiosis Bartın, Çorum, Giresun, Ordu, Tokat, Trabzon ve Zonguldak'ta, theileriosis ise Amasya, Artvin ve Kastamonu'da tespit edilememiştir. Bunun yanında Amasya, Artvin, Bolu, Karabük, Kastamonu ve Samsun'da babesiosis prevalansının %2-8.3 arasında değiştiği, theileriosis prevalansının ise Bartın, Bolu, Çorum, Giresun, Karabük, Ordu, Samsun, Tokat, Trabzon ve Zonguldak'ta %3.8-15.5 arasında olduğu tespit edilmiştir (Tablo II).

### **RLB Sonuçları**

RLB sonuçları değerlendirildiğinde; Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis* prevalansı %1.8, *B. bigemina* %2.2, *T. annulata* %2 ve *T. buffeli/orientalis* prevalansı da %20.6 olarak tespit edilmiştir. *Babesia divergens* ise tespit edilememiştir. Sonuçların yerleşim yerlerine göre dağılımı incelendiğinde ise; *B. bovis* prevalansının %1.4-5.6, *B. bigemina*'nın %1.9-16.7, *T. annulata*'nın %1.6-4.2 ve *T. buffeli/orientalis* prevalansının da %4-33.1 arasında değiştiği görülmüştür (Tablo II).

### **Sekans Analizi Sonuçları**

Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen ve

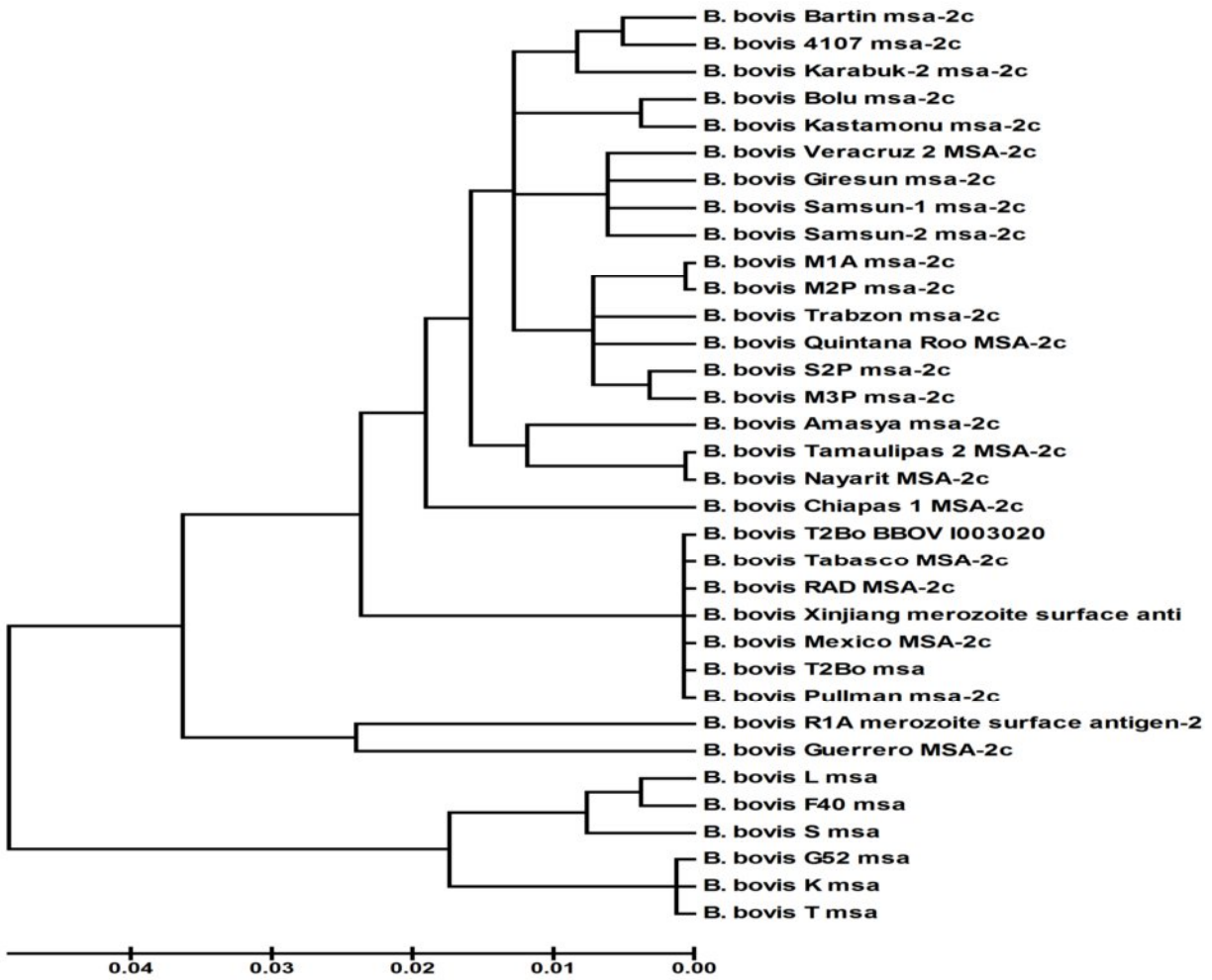
**Tablo II.** RLB sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı ve mikroskopik baki ile kıyaslanması

Yerleşim Yeri	Sığır Sayısı	Mikroskopik baki										RLB									
		<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>		<i>T. annulata</i>		<i>T. orientalis</i>		<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>		<i>B. divergens</i>		<i>T. annulata</i>		<i>T. orientalis</i>			
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
Amasya	25	-	-	1	4.0	-	-	-	-	1	4.0	1	4.0	-	-	-	-	1	4.0		
Artvin	12	-	-	1	8.3	-	-	-	-	-	-	2	16.7	-	-	-	-	-	-		
Bartın	43	-	-	-	-	-	-	3	7.0	1	2.3	-	-	-	-	1	2.3	8	18.6		
Bolu	24	1	4.2	-	-	1	4.2	1	4.2	1	4.2	-	-	-	-	1	4.2	6	25.0		
Çorum	32	-	-	-	-	-	-	2	6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	7	21.9		
Giresun	64	-	-	-	-	1	1.6	4	6.3	1	1.6	-	-	-	-	1	1.6	10	15.6		
Karabük	148	1	0.7	2	1.4	3	2.0	20	13.5	2	1.4	6	4.1	-	-	5	3.4	49	33.1		
Kastamonu	18	-	-	1	5.6	-	-	-	-	1	5.6	1	5.6	-	-	-	-	-	-		
Ordu	26	-	-	-	-	1	3.8	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3.8	1	3.8		
Samsun	53	1	1.9	1	1.9	-	-	6	11.3	2	3.8	1	1.9	-	-	1	1.9	11	20.8		
Tokat	36	-	-	-	-	-	-	2	5.6	-	-	1	2.8	-	-	-	-	5	13.9		
Trabzon	46	-	-	-	-	-	-	5	10.9	1	2.2	-	-	-	-	1	2.2	12	26.1		
Zonguldak	15	-	-	-	-	-	-	1	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	2	13.3		
<b>Toplam</b>	<b>542</b>	<b>3</b>	<b>0.6</b>	<b>6</b>	<b>1.1</b>	<b>6</b>	<b>1.1</b>	<b>44</b>	<b>8.1</b>	<b>10</b>	<b>1.8</b>	<b>12</b>	<b>2.2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>11</b>	<b>2.0</b>	<b>112</b>	<b>20.6</b>		

*Babesia bovis* olduğu tespit edilen toplam 10 örnek sekans analizleri sonucu GenBank'a kayıtları yapılan ve aksesyon numaraları alınan Amasya (GU647150), Bartın (GU647149), Bolu (GU357634), Giresun (GU647154), Karabuk (4107) (GU004533), Karabuk-2 (GU647147), Kastamonu (GU647148), Samsun-1 (GU647152), Samsun-2 (GU647153) ve Trabzon (GU647151) suşlarının *msa-2c* gen dizilimleri Dünya'daki kayıt-

lı diğer sekanslarla kıyaslanmış ve filogenetik ağaç şeklinde gösterilmiştir (Şekil 1). Kıyaslama sonucunda 10 örneğin kendi aralarında %94-99 oranında identik oldukları belirlenmiştir. Bu örneklerin Dünya'daki diğer örneklerle kıyaslaması yapıldığında ise *msa-2c* grubundaki sekanslarla %89-99 oranında benzerlik gösterdikleri görülmüştür.

## TARTIŞMA



Şekil 1. İzolatların *msa-2c* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbor-joining)

Babesiosisin teşhisinde eskiden beri mikroskopik 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.) babesiosisin teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (12, 13).

Türkiye'de *B. bovis*, ilk kez Mimioğlu (14) tarafından Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde sığırlarda "*Haemataurais vesicalis bovis*" araştırması ile gündeme gelmiş; Göksu (15) Ankara'da incelediği 996 sığırın 2'sinde (%0.2), takiben aynı araştırmacı (16) bazı Karadeniz illerinde mikroskopik bakışı yapılan 80 sığırın 3'ünde *B. bovis*'i (%3.75) bulmuştur. Göksu (17), Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında *B. bovis*'in Marmara ve Güney Doğu Anadolu'da görüldüğünü; Mimioğlu ve ark. (18) *B. bovis* (*Babesia berbera*) Karadeniz Bölgesi'nde daha fazla bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Diğer bir çalışmada ise Karadeniz Bölgesi'nde 76 sığırın 72'sinde *Babesia* sp. saptandığı rapor edilmiştir (19). Öte yandan mikroskopik bakıyla, Elazığ yöresinde iç organlarından froti yapılan 4 sığırın 1'inde (20) ve Ankara'da 185 sığırın 1'inde (%0.54) (21) *B. bovis* saptanmıştır. *Babesia bovis*'in mikroskopik pozitifliği; Marmara bölgesinde %34.8 (22), Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0.5-1.5 arasında (23); Samsun yöresinde %29.53 (24), Kayseri yöresinde %1.04 (25) bulunmuş ve mikroskopik insidensi Ankara'nın Çubuk ilçesinde %9 olarak saptanmıştır (26). Bunun yanında *Babesia* spp. prevalansı, Konya yöresinde %11.46 (27), Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde %0.6-1.4 arasında (28), Adana yöresinde ise %31.8 (29) oranında bildirilmiştir.

Bu çalışmada, sığırlarda *Babesia* türlerinin mikroskopik prevalansı; Amasya'da %4, Artvin'de %8.3, Bolu'da %4.2, Karabük'te %2, Kastamonu'da %5.6 ve Samsun'da %3.8 olarak tespit edilirken; Bartın, Çorum, Giresun, Ordu, Tokat, Trabzon ve Zonguldak'ta mikroskopik bakıda *Babesia* spp. saptanamamıştır. Genel olarak incelendiğinde ise Karadeniz Bölgesi'nde babesiosisin mikroskopik prevalansı %1.7 olarak bulunmuştur. Daha önce

yapılan çalışmalarla kıyaslandığında babesiosisin mikroskopik prevalansının Karadeniz Bölgesi'nde daha düşük çıkmasının sebebinin, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı'nın son yıllarda artış göstermesine bağlı olarak Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın son birkaç yıldır hayvanları kenelere karşı yoğun bir şekilde ilaçlama programını uygulamasının olabileceği düşünülmektedir. Bu husus kayıtlarda yer almamakla beraber Veteriner Hekimlerle bizzat yapılan görüşmelerde hemen hepsi bu konuya değinmiş ve ilaçlama programı sonrasında babesiosis ve theileriosis olgularının azaldığını gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Türkiye'de *B. bovis*'in moleküler prevalansı incelendiğinde; PCR ile sığırlarda babesiosisin teşhisinin ilk defa Tanyüksel ve ark. (30) tarafından yapıldığı görülmektedir. *Babesia bovis*'in moleküler prevalansı konusunda Türkiye'de sınırlı sayıda çalışma olup; PCR ile Ankara yöresinde %12.68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3.85 (30); RLB ile Ankara yöresinde %2.3 (31) ve %3.6 (32), Trakya Bölgesi'nde %1.3 (33) *B. bovis* tespit edilmiştir. Ayrıca Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonucu *Babesia* sp. saptanmış ve bu suş *Babesia* sp. (*Kayseri 1*) olarak GenBank'a kayıt ettirilmiştir (34).

Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan bu çalışmada *B. bovis*'in moleküler prevalansı; Amasya'da %4; Bartın'da %2.3, Bolu'da %4.2, Giresun'da %1.6, Karabük'te %1.4, Kastamonu'da %5.6, Samsun'da %3.8 ve Trabzon'da %2.2 olarak belirlenmiştir. Artvin, Çorum, Ordu, Tokat ve Zonguldak'tan temin edilen kan örneklerinde ise etken saptanamamıştır. Genel olarak Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in moleküler prevalansı %1.8 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları daha önce Samsun yöresinde PCR ile yapılan moleküler çalışma (30) sonuçlarını doğrulamıştır.

Son yıllarda babeiosisise karşı kullanılan attenüe canlı aşuların yerine subunit aşuların geliştirilmesi konusunda çalışmalar hız kazanmıştır. Bu noktada özellikle parazitlerin eritrositlere invazyonunun engellenmesi ve böylece patogeneze esas teşkil eden intraeritrositik aseksüel çoğalma fazının durdurulması hedeflenmiştir. Söz konusu çalışmalar-

da, subunit aşılarda kullanılacak olan aşı adayları antijenleri kodlayan gen bölgelerinin araştırılması, bu bölgelerin değişken ve konservatif özelliklerinin saptanması ve bu özelliklerin dünyanın farklı bölgelerindeki suşlarda farklılıklar gösterip göstermediğinin araştırılması konuları öne çıkmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda parazitin eritrositlere invazyonunda Variable Merozoit Surface Antijenleri (VMSA)'nin önemli olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de ise babesiosis'e karşı aşılama yapılmamaktadır. Ayrıca sığırlarda yaygın olarak görülen *B. bovis*'in *msa-1*, *msa2a1*, *msa2a2*, *msa-2b* ve *msa-2c* gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu ile ilgili olarak Türkiye'de bugüne kadar hiçbir çalışma yapılmamıştır. *msa-2c* gen bölgesi ile ilgili çalışmalar Dünya'da da kısıtlı sayıdadır (4-9).

*msa-2c* gen bölgesi ile yapılan bir çalışmada (5) bu gen bölgesinin yüksek oranda immunojenik olduğu, sığırlarda B hücre epitoplarını yüksek oranda muhafaza ettiği saptanmıştır. Hem heterelog R1A ve S2P suşları arasında hem de farklı ülkelerden elde edilen Avustralya orijinli S izolatı ile Amerika orijinli R1A suşları arasında yüksek oranda B hücre epitopları bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca doğal yolla veya deneysel olarak *B. bovis*'in Arjantin kaynaklı R1A suşu ile enfekte sığırların kanlarından elde edilen serumun, immunoblot çalışmalarında diğer saha suşlarının *msa-2c* proteinini spesifik olarak tanıdığını saptamışlardır. Bunun sebebi *B. bovis*'in saha suşları arasında *msa-2c* gen bölgesinin çok yüksek oranda B hücre epitoplarını ihtiva etmesinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Wilkowsky ve ark. (5) tarafından yapılan bu çalışmada *msa-2c* gen bölgesinin farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bovis* suşları arasında antijenik yapısının yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve dolayısıyla bu gen bölgesinin aşı çalışmalarında çok önemli role sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Diğer yandan Berens ve ark. (9), *B. bovis*'e ait *msa-2* proteinleri üzerine yaptıkları bir çalışmada Avustralya orijinli 12 izolat ile Amerika orijinli 3 izolatin antijenik farklılıklarını kıyaslamıştır. *msa-2* protein ailesindeki *msa-2a* ve *msa-2b* genlerini *msa-2a/b* olarak bir arada değerlendirmişlerdir. *msa-2a/b* genlerinin farklı izolatlar arasındaki identikliklerinin çok değişken olduğunu ve *msa-2c* ge-

ninin ise farklı bölgelere ait izolatlar arasında dahi %92-100 oranında identik olduğunu belirlemişlerdir. Dolayısıyla *msa-2c* geninin, *msa2a/b* genlerine oranla çok daha iyi bir aşı adaylığı olduğunu göstermişlerdir.

Benzer bir çalışmada Dominguez ve ark. (8), nötralizasyona duyarlı B hücre epitoplarını içeren *msa-2* proteinlerinden *msa-2a1*, *msa-2b* ve *msa-2c* genlerinin amino asit sekanslarını karşılaştırmışlardır. Arjantin kaynaklı R1A suşu ile Arjantin, Amerika Birleşik Devletleri ve Meksika'dan elde edilen izolatların *msa-2a1*, *msa-2b* ve *msa-2c* gen bölgeleri arasında kıyaslama yapmışlardır. Buna göre; *msa-2a1* gen bölgesi ile yapılan karşılaştırmada izolatların protein sekansları arasında %68-92, *msa-2b* ile %70-84 ve *msa-2c* ile %86-94 oranında identiklik tespit etmişlerdir. Bunun yanında nötralizasyona duyarlı olan B hücrelerinin de en yüksek oranda *msa-2c* proteinlerinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Farklı izolatlar arasındaki en tutarlı identikliğin de *msa-2c* gen bölgesinde saptandığını rapor etmişlerdir.

Florin-Christensen ve ark. (4) Arjantin R1A ve Meksika Mo7 suşlarını; *msa-2a1*, *msa-2a2*, *msa-2b* ve *msa-2c* gen bölgelerinin amino asit sekans dizimlerine göre kıyaslamış ve bu iki suş arasında gen bölgelerine göre sırasıyla %83.6, %69.4, %79.1 ve %88.7 oranında identiklik tespit etmişlerdir. Bu gen bölgelerinden *msa-2a1*, *msa-2b* ve *msa-2c*'de B hücre epitoplarının varlığını gösterirken, *msa-2a2*'de bu hücre epitoplarına rastlayamamışlardır.

Borgonio ve ark. (6) Meksika, Arjantin ve Avustralya suşlarını *msa-1* ve *msa-2c* gen bölgeleri açısından moleküler olarak karşılaştırmışlar ve *msa-1* geni ile yapılan kıyaslamada Meksika suşlarının kendi aralarında %51-99.7 identiklik gösterdiğini; Bu suşların Arjantin suşları ile %22-51 oranında; Avustralya suşları ile ise %23-81 oranında identik olduğunu saptamışlardır. Diğer yandan aynı araştırmacılar *msa-2c* geni ile yaptıkları kıyaslamada ise Meksika suşlarının kendi aralarında %90-100 identik olduğunu; Arjantin ve Avustralya izolatları ile ise %88-95 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmişler ve *msa-2c* geninin en ideal aşı adaylığı olduğunu göstermişlerdir.



Öte yandan benzer şekilde Genis ve ark. (7) farklı bölgelerden elde edilen *B. bovis* Meksika izolatlarının; *msa-1*, *msa-2b*, *msa-2c* ve *ssrRNA* gen bölgelerine göre benzerliklerini karşılaştırmışlar ve izolatlar arasındaki benzerlik oranlarını gen bölgelerine göre sırasıyla %47.7, %72.3, %87.7 ve %94 olarak belirlemişlerdir. *ssrRNA* gen bölgesinin izolatlar arasında, yüzey antijenlerine göre daha yüksek oranda antijenik benzerlik gösterdiğini, yüzey antijenleri arasında ise *msa-2c* geninin identiklik oranının diğerlerine göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada da konservatif karakterli *B. bovis msa-2c* gen bölgesinin Karadeniz Bölgesi'nden izole edilen *B. bovis* izolatlarında moleküler karakteri net olarak ortaya konmuş ve Dünya'daki diğer benzer izolatlarla karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre 10 örneğin kendi aralarında %94-99 oranında identik oldukları, Dünya'daki benzer diğer izolatlarla ise %89-99 oranında benzerlik gösterdikleri görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Türkiye'de ilk defa *B. bovis*'in *msa-2c* gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Karadeniz Bölgesi'nden elde edilen DNA'larda moleküler yöntemlerle *B. bovis* suşları tespit edilmiş ve bu izolatların *msa-2c* gen bölgesine spesifik primerlerle PCR'ları yapılmıştır. PCR sonucu *msa-2c* gen bölgesine spesifik DNA bantları jelden ekstrakte edilerek sekans analizleri yapılmıştır. Sekans sonuçları GenBank'a kaydedilmiştir. GenBank'a kayıtları yapılan bu suşların kendi aralarındaki ve Dünya'da yapılmış diğer çalışmalardan elde edilen izolatlarla identiklik oranları tespit edilmiştir. Sekans dizilimindeki benzerlikleri incelenen bütün suşların filogenetik akrabalıkları filogenetik ağaç oluşturularak gösterilmiştir. Elde edilen izolatlar ile Dünya'daki benzer diğer izolatların nükleotit dizilimindeki benzerlik ve farklılıklar da clustal consensus ile incelenmiştir. Bu sonuçlara göre Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nden izole edilen *B. bovis* suşlarının hem kendi aralarındaki hem de Dünya'dan bildirilen ve yukarıda isimleri verilen *B. bovis* izolatları ile olan yüksek benzerlikleri daha önce bildirilen literatür bilgilerle (4-9) uyumlu bulunmuştur. İzolatlar arasındaki bu yüksek benzerliklerin, *msa-2c* gen bölgesinin

korunmuş bir bölge olduğunu göstermenin yanında geçmişteki tarihi süreçte hayvan hareketleriyle de ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın, gelecekte Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşı çalışmalarına temel teşkil edeceği düşünülmektedir. Türkiye'de babesiosis'e karşı henüz aşılama yapılmamaktadır. 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 aşular, 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 oluşturmada yanında, model bir araştırma olarak daha sonra yapılacak çalışmalara temel oluşturacak ve araştırmacılara farklı perspektifler sunacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Uilenberg G. *Babesia* -A historical overview. *Vet Parasitol* 2006, 138: 3-10.
2. Friedhoff KT. *Transmission of Babesia*. In: Ristic M (ed), *Babesiosis of Domestic Animals and Man*, Boca Raton, Florida, CRC Press 1988, pp 23-52.
3. James MA. *Application of exoantigens of Babesia and Plasmodium in vaccine development*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989, 83: 67-72.
4. 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.
5. Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, et al. *Babesia bovis merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved*

- B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. Mol Biochem Parasitol* 2003, 127(2):133-141.
6. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, et al. *msa-1 and msa-2c gene analysis and common epitopes assessment in Mexican Babesia bovis isolates. Ann N Y Acad Sci* 2008, 1149:145-148.
  7. Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, et al. *Phylogenetic analysis of Mexican Babesia bovis isolates using msa and ssrRNA gene sequences. Ann N Y Acad Sci* 2008, 1149: 121-125.
  8. Dominguez M, Echaide I, Echaide ST, et al. *In silico predicted conserved B-cell epitopes in the merozoite surface antigen-2 family of B. bovis are neutralization sensitive. Vet Parasitol* 2010, 167(2-4): 216-226.
  9. Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, et al. *Merozoite surface antigen 2 proteins of Babesia bovis vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. Infect Immun* 2005, 73(11): 7180-7189.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, et al. *Babesia divergens, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev* 2003; 16(4): 622-636.
  13. Skotarczak B. *Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics . Wiad Parazytol* 2007, 53 (4): 271-280.
  14. Mimioglu M. *Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu Vilayetlerinde "Haematurai vesicalis bovis"li sığırlarda parasitolojik araştırmalar, Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1955, 11: 183-192.
  15. Göksu K. *Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1959, 115: 60.
  16. Göksu K. *Batı Karadeniz bölgesi illerinin sığırlarında gözlenen Babesidae (Sporozoa: Piroplasmida) enfeksiyonları. Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1968, 15: 46-57.
  17. Göksu K. *Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları (piroplasmossis, babesiosis, theileriosis ve anaplasmosis'in yayılış durumları). Türk Vet Hek Dern Derg* 1970, 40 (4): 29-39.
  18. Mimioglu M, Güler S, Ulutař M. *Untersuchungen über die Blutparasiten bei rindem in der Türkei. Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1972, 2: 183-192.
  19. Dinçer ř, Sayın F, Karaer Z, ve ark. *Karadeniz bölgesi sığırlarında, bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1991, 38 (1-2): 206-226.
  20. Dumanlı N, Özer E. *Elazığ yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniv Vet Fak Derg* 1987, 3(1): 159-166.
  21. Çakmak A. *Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara. Tierärztl Hochsch Diss Hannover* 1987.
  22. Tüzer E. *İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen Babesia, Theileria ve Anaplasma türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 1981; 8 (1): 97-110.
  23. Özer E, Erdoğan ř SZ, Körođlu 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.
24. Açıcı M. Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. *Etlik Vet Mik Derg* 1995, 8 (1-2): 271-277.
  25. İnci A, Çakmak A, Karaer Z, ve ark. Kayseri yöresinde sığırlarda babesiosisin seroprevalansı. *Turk J Vet Anim Sci* 2002, 26: 1345-1350.
  26. İnci A. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1992, 39(1-2): 153-167.
  27. Sevinc F, Sevinc M, Birdane MF, et al. Prevalence of *Babesia bigemina* in cattle. *Revue de Méd Vét* 2001, 152(5): 395-398.
  28. Aktaş M, Dumanlı N, Karaer Z, ve ark. Elazığ, Malatya, ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansı. *Turk J Vet Anim Sci* 2001, 25 (4): 447-451.
  29. Nalbantoğlu S, Vatansever Z, Karaer Z, Çakmak A. The epidemiology of cattle babesiosis in Adana region. *Babesia World Summit, December 1-3, Buenos Aires, Argentina* 2005.
  30. Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, ve ark. Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. *T Parazitol Derg* 2002, 26 (1): 42-47.
  31. İça A. Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin indirek floresan antikor ve reverse line blotting yöntemi ile karşılaştırmalı tanısı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2004, 1(2): 77-85.
  32. Vatansever Z, İça A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Sparagano O. Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. 194, Konya 2003.
  33. Bilgin Z. Trakya'da sığırlarda bulunan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin ve bunların sığırlarda yaygınlığının reverse line blotting (RLB) tekniği ile araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2007.
  34. İca A, Vatansever Z, Yildirim A, et al. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. *Vet Parasitol* 2007, 148 (2): 156-160.

