

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELAZIĞ YÖRESİNDE TROPİKAL  
THEİLERİOSİSE KARŞI AŞILANAN  
SIĞIRLARDA SAHA ÇALIŞMALARI

DOKTORA TEZİ

Münir AKTAŞ

F.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman  
Prof.Dr. Nazir DUMANLI

Firat Üniversitesi Merkez Kütüphanesi



\*0067883\*

255.07.02.03.00.00/08/0067883

VE D/64

#0084879

Kütüphane	
Denetim	84.370

ELAZIĞ - 1997

84  
D.Ü.  
SAĞ. BİL.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1- ÖNSÖZ	1
2- GİRİŞ	1
3- MATERYAL VE METOT	23
4- BULGULAR	32
5- TARTIŞMA VE SONUÇ	47
6- ÖZET	55
7- SUMMARY	57
8- KAYNAKLAR	59
9- ÖZGEÇMİŞ	74
10- TEŞEKKÜR	75

## 2. GİRİŞ

**Theileria annulata**'nın (Dschunkowsky ve Luhs, 1904) sebep olduğu tropikal theileriosis veya Akdeniz sahil humması, sığırların protozoer bir hastalığı olup, **Hyalomma** soyuna bağlı kene türleri tarafından transtadial (safhadan safhaya) nakledilir (4, 13, 26, 35, 70, 97, 113, 125).

Tropikal theileriosis, Güney Avrupa, Orta Doğu, Orta Asya, Güney Rusya, Hindistan, Çin, Afrika ve Türkiye'de yaygın olarak bulunan (26, 39, 68, 70, 103) , sığırlar başta olmak üzere manda, zebu, ve bizonlarda görülen ve özellikle sığırlarda morbidite ve mortalite oranı yüksek, tedavisi güç bir hastalıktır (4, 13, 28, 35, 61, 68, 82, 97, 113, 125). Hastalık özellikle kültür ırkı sığırlarda etkili olup, bu hayvanlarda % 40-60 oranında ölümlere neden olurken, endemik bölgelerde hastalığı hafif klinik reaksiyonlar ile atlatan yerli ırk sığırlar portör duruma geçerler (13). Kültür ırkı hayvanlara ve bunlarla yapılan melezlemelere talebin artması hastalığın önemini artırmaktadır (4, 13, 35, 68, 70).

Küçük Piroplasma olarak isimlendirilen parazitler ilk kez Robert Koch tarafından Doğu Afrika'da sığırların kanında eritrositler içinde tespit edilmiştir (30). 1903 yılında Dschunkowsky ve Luhs tarafından Kafkasya sığırlarında keşfedilen hastalığa Tropical piroplasmose, kanda görülen etkenlerin çoğunun yuvarlak olmasından dolayı da **Piroplasma annulatum** ismi verilmiştir. Daha sonra eritrositler içerisinde bulunan bu etkenlere **Theileria annulata** adı verilmiştir (67, 70). Du Toit (30)'a göre Portekizli araştırmacılar Borges, Bettencourt ve França 1907 yılında bu paraziti, **Piroplasma bigeminum** ile mukayese etmişler ve iç organlarda **Piroplasma annulatum**'da şizontları görürken, **Piroplasma bigeminum**'da şizontlara raslayamamışlardır. Bu farklılıktan yola çıkarak **Piroplasma**'ları tasnif edip, **Piroplasma annulatum** denen küçük organizmaları yeni bir soy içerisine almışlar ve bu soya **Theileria** adını

vermişlerdir. **Theileria** ile diğerleri arasındaki fark 1918'de Du Toit tarafından açıklanmış ve ortaya **Theileridae** ismi altında yeni bir aile çıkmıştır (30, 67, 70). Elektron mikroskoptaki ince yapılarına göre birçok araştırmacı tarafından sistematığı yapılan **Theileria** parazitleri Soulsby tarafından şu şekilde sınıflandırılmıştır (113).

Alt Alem: Protozoa

Bölüm: Apicomplexa

Sınıf: Sporozoea

Alt Sınıf: Piroplasmia

Takım: Piroplasmida

Aile: Theileriidae

Soy: **Theileria**

Tür: **Theileria annulata**

**T.annulata**'nın siğir eritrositlerinde bulunan piroplasm formları oval, yuvarlak veya virgül şeklindedir. Bu şekillerin %70-80'ini yuvarlak veya halka, %20-30'unu ise virgül veya anaplasmod formlar oluşturur (35, 61). Yuvarlak formlar  $0.5-2.7 \mu$ , oval formlar  $2.0 \times 0.6 \mu$ , virgül formlar  $1.2 \times 0.5 \mu$  ve anaplasmod formlar ise  $0.5 \mu$  büyüklüktedir (61). Giemsa boyası ile piroplasmaların sitoplazması açık maviye, çekirdekleri kırmızıya boyanır ve ortada vakuol bulunur (35, 61, 70, 108). Parazit kene ve siğirda geçirmiş olduğu hayat siklusuna göre farklı gelişme şekillerine sahiptir. **T.annulata**'nın hayat siklusunda sporozoit, şizont ve piroplasm olmak üzere üç gelişme formu vardır. Şizontları kesin konakçı siğirda lenfoid doku hücrelerinde, piroplasm formları eritrositlerde, sporozoit formları ise vektör kenelerin tükürük bezinde gelişmelerini sürdürürler (11, 85). Parazitin her gelişme döneminin morfolojik şekilleri birbirinden farklıdır (24).

Keneler enfekte siğirlardan kan emmeleri sırasında eritrositlerle birlikte parazitin piroplasm formlarını alırlar ve genellikle bunlardan halka formları kene

bağırsağında gelişir. Virgül formlar ise eritrositlerle beraber sindirilirler (59, 61, 64). Kenenin doyup konakçıyı terk etmesini takiben 2-4'üncü günlerde, halka formlarından 9-12  $\mu$  uzunluğunda ve ortasında yuvarlak çekirdeği bulunan mikrogametler ile, 3-4  $\mu$  çapında yuvarlak makrogametler meydana gelir. Beşinci günde makrogamet in mikrogamet tarafından döllenmesiyle merkezi vakuolu bulunan 8-11  $\mu$  çapında zigota raslanır (59, 61, 64, 113, 117). Zigotun invaginasyonu sonucu 12-14'üncü günlerde imbik formundaki kinetlerden ortalama 5.4  $\mu$  genişliğinde 18  $\mu$  uzunluğunda, ön kısım arkaya göre daha geniş tek çekirdekli serbest kinetler oluşur (59). Daha sonra kinetler hemolenfte bir gelişme dönemi geçirilmeden tükürük bezlerine ulaşır ve tip iki ve üç asinilerine girerek önce 10  $\mu$  çapında sporantları daha sonra da 1-2  $\mu$  çapında sporozoitleri oluştururlar (35, 59). Bu sporozoitlere tükürük bezi kanallarında da rastlanabilir (7).

**Theileria annulata**'nın sığırlarda birbirini izleyen iki gelişme safhasından ilki, enfekte keneler kan emmek üzere sığırlara tutunduklarında tükürük bezlerindeki sporozoitleri inokule etmeleri ile başlar. Bu sporozoitler retikulo-endotelial sistemin mononükleer hücreleri içinde şizogoni yoluyla çoğalarak şizont formlarını oluştururlar. Bunu eritrositik piroplasm formları takip eder (4, 13, 83). Enfekte kenenin sığıra tutunmasını takiben tükürük salgısı ile birlikte konakçıya inokule edilen sporozoitler, lenf sıvısı ile en yakın bölgesel lenf yumrusuna intikal eder. Daha sonra bu etkenler kan yolu ile retikulo-endotelial sistemin diğer organ ve dokularına giderek lenfoid hücrelere girerler. Bu sırada etkenler lenfosit sitoplazması içerisinde yuvarlak nükleusa sahip bir cisimcik halindedirler. Bu cisimcikler şizogoni ile çoğalarak önce 3-15 adet çekirdeğe sahip makroşizontları oluştururlar (4, 35, 61, 68, 113). Bunu takiben nükleer partiküllerin birkaç bölünme siklusundan sonra ortalama 100 nükleuslu mikroşizontlar meydana gelir (35, 61, 113, 117). Meydana gelen mikroşizontlardan merozoitler oluşur ve daha sonra eritrositlere giren bu

merozoitler gametosit adını alırlar. Eritrositlerde basit ikiye bölünme ile çoğalır ve iki kız hücre oluştururlar. Bunlara **T.annulata**'nın eritrositer veya piroplasm formları denir (4).

**Theileria annulata**, enfekte hayvandan alınan kan, lenfoid doku emülsiyonu ve enfekte doku kültürü hücrelerinin inokulasyonu ile mekanik (27, 35, 58, 60), **Hyalomma** soyuna bağlı kene türleri ile de biyolojik olarak nakledilir (7, 17, 68, 101). Ayrıca **T.annulata**'nın intrauterin bulaştığı da belirlenmiştir (58).

**Theileria annulata**'yı **Hyalomma** soyunda bulunan yaklaşık 15 kene türünün doğal veya deneysel olarak naklettiği bildirilmiştir (35, 125). **T.annulata** doğal şartlarda bir hayvandan diğerine **Hyalomma** soyunda bulunan kene türleri ile transtadial (safhadan safhaya) nakledilir. Arakonakçı kene enfekte hayvandan gelişme döneminin bir safhasında aldığı etkeni, diğer safhada kan emdiği duyarlı hayvana nakleder (7, 27, 68, 99, 100, 37). Etkenin kenelerde nesilden nesile geçmesi, yani transovarial nakil söz konusu değildir (7, 35, 61, 82).

**Theileria annulata**'yı nakleden **Hyalomma** soyunda bulunan kenelerden **Hyalomma scupense** bir (85), **Hyalomma detritum** iki (57, 84, 85, 98), **Hyalomma anatolicum anatolicum** ve **Hyalomma anatolicum excavatum** üç (7, 8, 26, 98, 100) konakçılıdır. Bir konakçılı kene olan **H.scupense** ergin dönemde **T.annulata** ile enfekte bir konakçıdan kan emerken aldığı etkenleri, tam olarak doymadan bu konakçıdan ayrılıp başka bir konakçıya tutunması halinde, tutunduğu ikinci konakçıya nakledebilir (85). İki konakçılı kene olan **H.detritum** larva ve nimf döneminde enfekte bir konakçıda beslendiğinde bu konakçıdan aldığı etkenleri ergin dönemde duyarlı hayvana nakletmektedir. **H.detritum**'un enfekte larvalarından meydana gelen aç nimfler sunî olarak duyarlı bir konakçıya bırakıldığında etkenleri bu konakçıya verebilir. Ancak doğal şartlarda böyle bir nakil söz konusu değildir (37). **H.detritum** ergin dönemde tam olarak doymadan kan emdiği konakçıdan ayrılıp ikinci konakçıya

geçmesi halinde etkenleri bu konakçıya nakledebilir (37). **Hyalomma anatolicum excavatum** gibi üç konakçılı keneler larva döneminde aldığı **T.annulata** etkenlerini nimf döneminde nakledebildiği gibi, erişkin dönemde de nakledebilir (7, 17, 61, 98). **Hyalomma anatolicum excavatum**'un enfekte larvaları nimf dönemini sığırdan başka bir konakçıda geçirmesi halinde erişkin dönemde duyarlı hayvana etkenleri verebilirken, nimf dönemini sığırdan geçirmesi durumunda, bu safhada etkeni sığıra verip olgun dönemde steril duruma geçerler (7, 8).

**Theileria annulata**'nın neden olduğu hastalığın seyri ve dolayısı ile Tropikal theileriosisde klinik belirtiler parazit suşunun virulansına, kene tarafından verilen parazit miktarına ve konakçının duyarlılığına bağlı olarak gelişir (35). Buna göre hastalık perakut , akut, subakut, hafif ve kronik seyirli olabilir. Perakut ve akut enfeksiyonların çoğu ölümlerle sonuçlanırken subakut, hafif ve kronik enfeksiyonlarda iyileşme görülür (39, 61, 70, 97, 113). Ölüm oranı sığır ırklarına bağlı olarak %10-100 arasında değişir (38, 70). Hastalığın inkubasyon süresi 9-25 gündür (113). Klinik belirtilerin ortaya çıkmasından itibaren 3-4 gün içerisinde ölümler görülebilir. Hastalığa yakalanmış hayvanlarda ilk klinik belirti yüzeysel lenf yumrularında asimetrik büyümedir. Bunu ateş (41-42 °C), iştahsızlık, depresyon, göz ve burun akıntısı, kalp atışlarında hızlanma, solunum sayısında artma, süt veriminde azalma ve kilo kaybı izler (38-40, 61, 70, 97, 113, 122, 123). Konjunktiva ve mukozalarda önce hiperemi, sonra anemi ve peteşiyel kanamalarla birlikte ikter görülür (48, 61). Hemoglobüri, bilirubinüri ve bilirubinemi görülebilir (48, 61, 70). Gebe hayvanlarda abort görülür (38, 112). Hastalığın başlangıcında görülen konstipasyon yerini kanlı ve müküslü bir dışkıya bırakır (38, 61, 112, 113, 122,123). Hastalığın ilerlemesi ile birlikte beden ısısı normalin altına düşer hayvan ayakta duramaz, çene aşağı düşer ve boynunu geriye doğru atarak uzanır . Karaciğer , sindirim sistemi, akciğer, böbrek ve adrenal bezlerde yaygın hücrel infiltrasyon ve küçük nekroz sahaları meydana

gelir. Akut enfeksiyonların çoğunda ateşin yükselmesinden 1-2 hafta sonra ölüm görülür (112).

**Theileria annulata**'nın vektörlerinin Hindistan'da **H.marginatum** (syn., **H.savignyi**, **H.aegyptium**), USSR'de **H.detrutum** ve **H.excavatum** (syn., **H.anatolicum**), Asya'da **H.excavatum**, **H.turanicum** (syn., **H.rufipes glabrum**) ve **H.marginatum**, Afrika'nın bir bölümünde **H.turanicum**, Orta Asya'da **H.dromedarii**, Sibirya ve Uzak Doğu'da **H.longicornis** (syn.,**H.bispinosa**, **H.neamanni**) ve Kuzey Afrika'da **H.detrutum** (syn.,**H.mauritanicum**) olduğu bildirilmiştir (61).

Türkiye'de **T.annulata**'yı nakleden kenelerden, **H.a.anatolicum**, **H.a.excavatum**, **H.detrutum**, **H.plumbeum**, **H.marginatum** ve **H.dromedarii** türlerinin varlığı araştırmacılar (26, 27, 60, 106) tarafından ortaya konmuş olup, bu vektör kenelerden **H.excevatum**'un deneysel olarak hastalığı naklettiği tespit edilmiştir (27).

Tropical thileriosis ve bu hastalığın vektör keneleri Güney Avrupa, Rusya, Türk Cumhuriyetleri, Hindistan, Fas, Tunus, Sudan, İran, ve Çin gibi tropikal ve subtropikal iklim kuşağında bulunan ülkelerde yaygın olarak görülür (6, 9, 35, 46, 52, 74, 97,116, 125, 134).

Çin'de **T.annulata**'nın vektörünün **H.detrutum** olduğu, enfeksiyonun yerli sığırlarda %11.9, ithal sığırlarda %61 oranında seyrettiği saptanmıştır. Hastalığın mayıs, haziran ve temmuz aylarında görülmeye başladığı, temmuzda en yüksek seviyeye ulaştığı ve eylül ortalarına kadar görülebildiği belirtilmiştir (132, 134).

Tropikal theileriosisin endemik olduğu Sudan'da **T.annulata**'nın vektörünün **H.a.anatolicum** olduğu, **H.impeltatum** ve **H.marginatum rufipes**'in ise deneysel olarak hastalığı naklettiği bildirilmiştir (52).

Tunus'ta Tropikal theileriosisin vektörünün **H.detrutum** olduğu, hastalığın kültür ırkı sığırlarda %76 oranında seyrettiği, mortalite oranının ise %50'ye kadar çıkabildiği belirtilmiştir (9).

Fas'ta **T.annulata**'nın doğal vektörünün **H.detrutum** olduğu, diğer **Hyalomma** türlerinin ise deneysel olarak hastalığı naklettikleri, ancak bu türlerle doğal nakle rastlanmadığı bildirilmiştir. (33, 74, 75). Fas'ın Doukkala bölgesinde yapılan çalışmada hastalığın mart-eylül ayları arasında görüldüğü, hastalık mevsiminden önce kan frotilerinde **T.annulata**'nın piroplasm formlarını taşıyan sığırların prevalansının %48.5 olduğu saptanmıştır (33).

Hindistan'da **T.annulata**'nın vektörlerinin, **Hyalomma** soyuna bağlı **H.a.anatolicum**, **H.detrutum**, **H.marginatum isaaci** ve **H.dromedarii** olduğu, hastalığın nisan-ekim ayları arasında seyrettiği belirtilmiştir (6, 110-112, 116). Kan frotilerinin mikroskopik bakısına dayanan çalışmada bir yıl boyunca muayene edilen hasta hayvanların %65'inde **T.annulata**'nın varlığı saptanmıştır (111). Diğer bir araştırmada ise muayene edilen 5454 kan frotilerinin %14.94'ünde **T.annulata**'nın piroplasmalarına rastlandığı, %30-60 oranında da seropozitiflik elde edildiği belirtilmiştir (112).

Tropikal theileriosis vektörlerinin Rusya'da, **H.detrutum**, **H.anatolicum**, **H.plumbeum** ve **H.scupense** (114, 133), Kazakistan'da **H.detrutum**, **H.anatolicum**, **H.scupense** ve **H.plumbeum** olduğu, özellikle Güney Kazakistan'da hastalığın prevalansının oldukça yüksek bulunduğu, her yıl 10-15 bin hayvanın enfekte olduğu, ölüm oranının %30-50, tedavi edilmeyenlerde bu oranın %98'e kadar çıkabildiği, hastalığın mayısın ortalarında görülmeye başladığı ve eylüle kadar devam ettiği bildirilmiştir (107).

İran'da tropikal theileriosis **H.schulzei**, **H.savigny**, **H.rufipes glabrum** ve **H.dromedarii** ile taşınabilmesine rağmen hastalığın taşınmasında esas rolü **H.excavatum** ve **H.detrutum**'un oynadığı bildirilmiştir. Hastalığın mortalitesinin kültür ırkı sığırlarda %70, melezlerde %45 ve yerli ırklarda %15-20 oranında olduğu belirtilmiştir (46, 49).

Türkiye'de tropikal theileriosise bütün iklim bölgelerinde rastlanmış, kan frotilerinin mikroskopik bakısına dayanan çalışmalarda, diğer kan parazitlerine

göre daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (38, 39, 66, 69, 122, 123). Bu oran Ege bölgesinde %43.2 (32), İstanbul ili ve çevresinde %20.7 (124), Ankara ve civarında %17.87 (38), Karadeniz bölgesinde %22.85 (65) ve %34 (25), Elazığ bölgesinde %28.98 (29), Orta Anadolu bölgesinde %67 (126), Adana ili Çukurova Tarım işletmesinde %9.3 (72) olarak belirlenmiştir. Enfekte hayvanlarda ölüm oranının yerli ırklarda %43, kültür ırkı sığırlarda %100 olduğu bildirilmiştir (38, 70).

Türkiye'de değişik bölgelerde seroepidemiolojik çalışmalar yapılmıştır (15, 16, 25, 31, 72, 104, 105). İlk seroepidemiolojik çalışma Çakmak (15) tarafından Ankara'nın Beytepe köyünde yapılmış ve **T.annulata**'ya karşı %6.4 oranında antikor tespit edilmiştir. Dinçer ve arkadaşları (25) Samsun ili sığırlarında %63'lük bir seropozitiflik elde ederken, Çakmak ve Öz (16) Adana yöresinde IFA testi ile **T.annulata**'nın prevalansını %10.7 olarak tespit etmişlerdir. Sayın ve arkadaşları (104) Ankara yöresinde **T.annulata**'nın yıllık prevalansını 1990 yılında %31.7, 1991 yılında %19 olarak saptamışlardır. Yine Sayın ve arkadaşları (105) hastalık sezonundan önce kan aldıkları sığırlardan, IFA testi ile Elazığ'da %41, Adana'da %14, Bursa'da %10 oranında seropozitiflik elde etmişlerdir. Eren ve arkadaşları (31) **T.annulata** enfeksiyonunun seroprevalansını Ege bölgesinde %40, Karadeniz bölgesinde %46.8, İç Anadolu bölgesinde %29, Marmara bölgesinde %33.3 ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde %91.4 olarak saptamışlardır. Nalbantoğlu (72) Çukurova Tarım İşletmesinden seçtiği farklı yaş guruplarına ait 75 sığırı IFA testi ve mikroskopik muayene yöntemleri ile **T.annulata** yönünden incelemiş; 15 sığırın enfekte olduğunu (%20), bu enfekte sığırların 7'sinin (%9.3) eritrositlerinde **T.annulata**'nın piroplasm şekillerinin bulunduğunu, 12'sinin (%16) serumunda ise IFA testi ile bu parazite karşı antikor şekillendiğini, bu sığırların 4'ünün serumlarında antikor ve eritrositlerinde piroplasmaların birlikte bulunduğunu tespit etmiştir. Böylece 75 sığırdaki **T.annulata**'ya bağlı seroprevalansın %16 olduğunu

saptamıştır. Geri kalan 60 negatif sığırı bir yıl boyunca izlemiş ve yeni **T.annulata** enfeksiyonlarının seroinsidensini %28.33 olarak bulmuştur.

Angın (1) **Hyalomma** türlerinde **T.annulata** enfeksiyonunu araştırmak için topladığı keneleri diseke etmiş ve **H.a.anatolicum** ve **H.detrutum**'un tükürük bezlerinde **T.annulata**'nın sporoblastlarını saptamıştır. Bu kenelerden , hayvan barınaklarından toplanan **H.a.anatolicum**'ların %53.74, sığırlardan toplanan **H.a.anatolicum**'ların %22.56 ve **H.detrutum**'ların %4.65'inin paraziti taşıdığını tespit etmiş, buna karşılık sığırlardan toplanan **H.a.excavatum**'ların hiç birinde etkenlere rastlamadığını belirtmiştir.

Tropikal theileriosisin teşhisi; epidemiyolojik bilgilerin değerlendirilmesi, klinik bulgular, laboratuvarda mikroskopik ve serolojik teşhis yöntemleri ile yapılır (13, 41, 70, 73, 102).

Tropikal theileriosisin klinik bulguları babesiosis ve anaplasmosis ile karıştırılabilir. Bu nedenle kesin teşhis için bir yandan klinik bulgular kaydedilirken, diğer yandan kandan ince ve kalın damla froti ile lenf yumrusu punksiyonundan yapılan preparatların mikroskopik muayenesinden yararlanılır. Kandan ve lenf yumrusundan yapılan preparatlar Giemsa ile boyanarak mikroskopik muayenelerinde eritrositlerde piroplazmlar ve lenfositlerde şizontlar aranır (41). Latent enfeksiyonlarda mikroskopta etkenlerin görülmesi güç olduğundan serolojik teşhis metotlarından yararlanılır (41, 102).

**Theileria annulata** enfeksiyonunun serolojik muayenesinde spesifik antikörler aranır. Bu antikörler in vitro ortamlarda **T.annulata**'nın sporozoit, şizont ve piroplasm antijenleri ile reaksiyon verirler (19, 22, 90-92). Latent enfeksiyonların teşhisinde ve şizont aşısı ile aşılanan sığırlarda immun cevabın değerlendirilmesinde serolojik testlerden yararlanılır (83). Dolaşımdaki antikörlerin belirlenmesinde Indirect Fluorescent Antibody (IFA) (22, 92), Complement-fixation (19, 23, 34, 83), Microcytotoxicity (55), Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) (54-56), Improved Serum Antibody (14),

Capillary-Tubeagglutination (20), Haemagglutination-Inhibition, Indirect Haemagglutination ve Agar-Gel-Precipitation (21) testlerinden yararlanılır.

**Theileria annulata**'ya karşı oluşan dolaşım antikorları hastalığın akut döneminde görülmeye başlar, bir süre sonra antikor seviyesi en yüksek noktaya erişir ve hastalığı atlatan hayvanlarda antikor seviyesi zamanla düşer. Ancak, düşük seviyede de olsa uzun bir süre devam eder (80, 90).

Tropikal theileriosise karşı uygulanan **T.annulata** şizont aşısının değerlendirilmesi serolojik yöntemlerden IFA testi ile yapılabilir. Aşı tam attenüe şizontlardan oluştuğu için inokule edilen sığırlarda klinikal ve parazitolojik semptomları oluşturmaz (80, 86, 93).

Dhar ve Gautam (22) deneysel **T.annulata** enfeksiyonundan sonra antikorların ilk olarak 6-10'uncu günlerde belirlendiğini, 32'inci günde en yüksek seviyeye ulaştığını, hastalığı atlatan hayvanlarda ise antikor seviyesinin zamanla düştüğünü ancak, düşük seviyede de olsa 284'üncü günde dahi antikorları tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (19) başka bir çalışmada enfeksiyondan sonra 9'uncu günde ilk antikorların belirlendiğini, 21'inci günde en yüksek seviyeye ulaştığını ve 260'ıncı güne kadar devam ettiğini bildirmişlerdir.

Hindistan'da buzağların aşılmasını takiben, IFA testi ile antikorların ilk olarak 21'inci günde belirlendiği, 45'inci günde en yüksek seviyeye eriştiği ve en yüksek titrenin 1:640 - 1:2560 arasında olduğu belirtilmiştir (2).

Raghav ve arkadaşları (96) **T.annulata** şizont aşısı uygulanan hayvanlarda, IFA testi yoklaması sonucu antikor titresinin 21'inci günde yükselmeye başladığını, 45-90'ıncı günde en yüksek titreye ulaştığını (1:640 - 1:2560), 6 ay sonra gerilediğini ve 12'inci ayda aşılama öncesi titreden daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (96).

Özkoç ve Pipano (80)'ya göre **T.annulata** şizont aşısı uygulanan buzağlarda, aşıya karşı reaksiyon olarak meydana gelen antikorlar 35 ile 49'uncu günlerde ortaya çıkar.

Pipano ve Cahana (90) aşı inokulasyonu yaptıkları danalarda IFA testi ile **T.annulata**'ya karşı ilk antikörleri 10-18'inci günlerde belirlemişler, 23-45'inci günlerde en yüksek noktaya ulaştığını kaydetmişlerdir. Aynı araştırmacılar (91) başka bir araştırmada 87 danayı aşıladıktan sonra IFA testi ile , 39-48'inci günlerde pozitif sonuçlar elde etmişler, aşılanan danaların hiç birinde klinik belirtilere ve parazitin piroplazmlarına rastlamadıklarını belirtmişlerdir.

Nalbantoğlu (72) şizont aşısı uyguladığı sığırlarda 30 gün sonra IFA testi ile pozitif sonuç almıştır. En yüksek piroplasm antikör titresinin 1:5120, şizont antikör titresinin ise 1:2560 olduğunu saptamıştır.

Tropikal theileriosisin zararlarını sınırlamak için alınan önlemlerin, keneye taşınan hastalıkları kontrol etmede olduğu gibi, beş başlık altında toplanabileceği bildirilmiştir (13).

**a- Bakım şartları** : Hayvan hassas, dirençli veya bağışık olsa da, sürüyle hastalık arasındaki ilişkiyi sınırlamak için bakım şartlarına azami ölçüde dikkat edilmelidir. Bu konuda en çok üzerinde durulması gereken husus, hayvan hareketlerinin kontrol edilmesidir. Burada ana hedef sığır popülasyonunu hastalığa karşı tamamen korumak olmalıdır (13).

**b- Vektör kontrolü** : Tropikal theileriosisin vektörü olan **Hyalomma**'lar aktif olarak konakçılarını arayan ve hayvan barınaklarında da yaşayan keneler oldukları için akarisit ilaç uygulamaları hem hayvanlar üzerinde hem de barınaklarda yapılmalıdır (88). Vektörlerin değişik safhalarının sığırlar üzerinde bulunma zamanı ve süresinin iyi bilinmesi büyük önem taşımaktadır. **H. detritum** gibi iki konakçılı kenelerin larva ve nimfi aynı konakçı üzerinde 16 gün kadar kalabilir. Her 10-12 günde bir akarisitlerle mücadele yapmak suretiyle nimfin doymuş hale gelmesi önlenir. Öte yandan üç konakçılı kenelerle mücadele daha zordur. Bu kenelerin larvaları bir hayvan üzerinde 3-5 gün beslenirler, toprakta gömlek değiştirdikten sonra başka bir hayvana çıkıp tekrar 6-9 gün beslenirler (85, 130). Konakçılarında tutunduktan sonra bir kaç saat ile iki günlük

kısa bir sürede etkenleri naklettiklerinden akarısíd ilaç uygulamaları sık aralıklarla yapılmalıdır (85, 87). Bu esnada ilaçların doğru uygulanmaması, yüksek konsantrasyonlarda kullanılması halinde toksik olabileceği, hayvanların süt ve etlerinde kalabileceği unutulmamalıdır (130).

**c- Direnç** : Sığır populasyonunun direnci tropikal theileriosisin etkisini sınırlamada önemli bir role sahiptir. Dünyanın bir çok yerinde yerli sığırlar, hem **Hyalomma**'lara hem de genetik direnç kombinasyonu ile pasif ve aktif olarak şekillenen bağışıklık sayesinde **T.annulata**'nın etkilerine karşı kuvvetli bir direnç gösterirler (13). Ancak, yerli sığırların büyük bir kısmının düşük verimli olması nedeniyle ya yüksek verimli kültür ırkı sığırlar ithal edilmekte ya da melezleme yapılmaktadır. Bu da tropikal theileriosise hassas sığır sürülerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı verimi yüksek yerli populasyon içinde seleksiyon yapmak suretiyle hem yüksek verimli hem de hastalıklara dayanıklı yeni ırklar elde etmek amaçlanmalıdır (13).

**d- İlaçla tedavi** : Tropikal theileriosisin ilaçla tedavisi konusunda yapılan çalışmalar, (3, 42-44, 62, 109, 126) hastalığı tedavi edecek etkili bir ilacın henüz olmadığını göstermektedir (3, 42-44, 62, 109, 126). Ülkemizde theileriosisli sığırları tedavi etmek amacıyla Halofuginone, Parvaquone (44), Primaquine diphosphate (126), Buparvaquone (62, 63, 127 ), Nagonal, Antrycide prosalt ve Pyrimetamine (43) kullanılmıştır. Doğal enfekte sığırlarda kullanılan bu ilaçlardan, hastalığın erken veya geç dönemde olmasına, enfeksiyonu oluşturan suşun patojenitesine, diğer hastalıkların tabloya iştirak edip etmemesine göre değişik sonuçlar elde edilmiştir (42, 43). Deneysel çalışmalarda Halofuginone, Parvaquone ve Buparvaquone gibi ilaçların belirli zamanlarda enfekte hayvanlara uygulanmasıyla olumlu neticeler elde edilmiştir (3, 44, 62, 127). Ancak saha enfeksiyonlarında hastalığı tam olarak tedavi etmede yeterli olmadıkları (109), bunlardan en etkili olanın Buparvaquone olduğu (62, 63, 127) ve bu ilaçla theileriosisli sığırların %92 oranında tedavi edildiği belirtilmiştir (63).

**e- Bağışıklık (aşılama) :** Aşılama ilk olarak 1924 yılında **T.annulata** ile akut enfekte sığırdan alınan kanın hassas sığırlara inokulasyonu ile sağlanmıştır (13, 86). Enfekte kan ile aşılanan sığırlar enfekte kene çelinçine karşı dayanıklılık göstermişler, ancak bu şekilde meydana gelen koruma kene enfeksiyonuyla oluşan korumadan daha az olmuştur (86).

Tropikal theileriosisde enfeksiyondan sorumlu parazit safhası, **Babesia**'larda olduğu gibi eritrositler içindeki piroplasm formları olmayıp, mononükleer hücreler içerisindeki şizont formlarıdır. Bu şizontların sığırlar arasında yapılan devamlı pasajıyla, piroplasmaları oluşturma kapasitesi ortadan kalkmakta ve böylece keneler için enfektif piroplasmik formlar oluşmamaktadır (13). Ancak hayvan pasajları ile **T.annulata** virulansını kaybetmemekle birlikte, parazitin doğal olarak daha az öldürücü suşları seçilmek suretiyle geniş spektrumlu suşlara karşı koruma sağlayan kan aşısı geliştirilmiştir. Böylece 1932'de Cezayir'deki araştırmacılar, parazitin çok virulans suşları ile yapılan çelinçlerde sığırları koruyan, hassas sığırların sadece %0.6-3'ünü öldüren avirulent bir aşı olarak, **T.annulata**'nın Kauba suşunu önermişlerdir (13). Daha sonra İsrail'de iki adımlı bir aşılama programı uygulanmıştır (87). Sığırlar önce **T.annulata**'nın düşük virulanslı ekzotik bir suşunun inokulasyonunu takiben iki ay sonra lokal virulent bir suşla tekrar inokule edilmişlerdir. Sığırlarda bu şekilde yapılan seri inokulasyonlar suşların attenüasyonuna ve virulanlarının azalmasına neden olmamıştır. Ancak doğal olmayan bu taşınma, şizontların piroplasm oluşturma kapasitelerinde bir azalmayla sonuçlanmıştır. Bu şekilde aşılanan sığırlarda virulent şizontların neden olduğu şiddetli reaksiyonlardan dolayı %1.8'lik bir mortalite oluşmuştur (87). Aşılamada daha çarpıcı bir ilerleme, 1945 ile 1965 yılları arasında, sığır lenfoid hücrelerinde **T.annulata**'nın şizont formlarının in vitro kültürünün geliştirilmesiyle kaydedilmiştir (10, 13, 88, 118).

**Theileria annulata** şizontlarının in vitro geliştirilmesi ilk defa 1945 yılında gerçekleştirilmiştir. **T.annulata**'nın lenfoid gelişme dönemi kültive edilmiş

ve şizontların canlılığı 1-3 hafta sürdürülebilmiştir. Ancak, ilk bir kaç pasaj subkültürü yapılamamıştır (118). Daha sonra kültür iki ay süreyle canlı tutulabilmiştir (10).

Şizontla enfekte hücreleri içeren monolayer kültürler, ilk defa 1960 yılında Bet Degon Veteriner Enstitüsünde A. Kimron tarafından yapılmıştır (85). Bu araştırmacı tropikal theileriosisden ölmek üzere olan bir danadan alınan böbreği tripsinize ettikten sonra hücreleri %01'lik Lactalbumine hydrolysate , bira mayası extractı ve %30 buzağı serumu içinde kùltive etmiştir (85).

Tsur ve Adler (119) 1962'de **T.annulata** ile enfekte danaların karaciğer, dalak ve lenf yumrularından elde edilen şizontla enfekte lenfoid hücreleri kùltive etmişlerdir. Aynı araştırmacılar (120) tropikal theileriosisli danadan hastalığın akut döneminde alınan kandan buffy coat (beyaz kan hücreleri)'ı ayırmışlar ve doku kùltüründe şizontla enfekte lenfoid hücreleri kùltive etmişlerdir.

**Theileria annulata** şizontları, daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından (47, 50, 51, 71, 85) kùltive edilmiş ve enfekte lenfoid hücreler hem monolayer (51, 119) hem de süspanse kùltür yöntemleriyle üretilmiştir(47,50).

Hücre kùltürlerinden alınan süpernatant sıvılar veya süspanse hücreler inokule edildikleri hassas sığırlarda hafif klinik reaksiyonlar oluştururlar. Tsur ve arkadaşları (121) hücre kùltüründe geliştirilen şizontları duyarlı sığırlara inokule etmişler, bir kaç ay boyunca klinik reaksiyonlar ile karaciğer ve lenf yumrularından yapılan frotilerde parazitin şizontlarına rastladıklarını belirtmişlerdir. Buna karşın Pipano ve Tsur doku kùltüründe geliştirilen ve virulansın tamamen attenüe olduğu şizontlarla inokule ettikleri duyarlı sığırlarda klinik semptomlar ile lenf yumrusu ve karaciğerden yapılan frotilerde şizontların görülmediğini belirtmişlerdir (95).

Brown (13) in vitro olarak subkùltivasyon uzadığında parazitin enfeksiyon oluşturma kabiliyetini zamanla kaybettiğini, daha sonra sığıra inokule edildiğinde merezoit ve piroplasmaları oluşturmadığını bildirmiştir. Aşının gelişimi ile ilgili

önemli bir olay, uzun süreli kültürlerde parazitin virulansını kaybetmesidir. Bu virulans kaybı attenüe hücre kültürü aşılarının kullanılmasını sağlamıştır. Aşı Türkiye de dahil bir çok ülkede Tropikal theileriosisin önlenmesinde kullanılmaktadır (6, 13, 46, 74, 116, 133, 134)

Tropikal theileriosise karşı kullanılan **T.annulata** attenüe şizont aşısının üretilmesi ve kullanılması dört ana devreyi kapsar (77, 86).

1-**Theileria annulata** şizontlarının doku kültüründe izolasyonu, kültürün başlatılması ve sürdürülmesi.

2- Şizontların virulensinin attenüasyonu, zararsızlık ve koruyucu etkinin ölçülmesi.

3- Yoğun ve sürekli doku kültürü, aşı hazırlanması, sterilite testleri ve kontrolü.

4- Üretilen aşının muhafaza ve depolama yöntemi, sahaya taşınması ve hayvanlara uygulanması (77, 86).

1- **Theileria annulata**'nın kültürü ilk olarak akut theileriosisli siğirdan elde edilen şizontla enfekte lenfositlerle başlatılmıştır (119). **T.annulata**'nın doku kültüründe üretilmesi için gerekli olan enfekte lenfosit hücrelerinin izolasyonu, akut theileriosisli danaların kanından, karaciğer ve lenf yumrusu biopsi materyalinden elde edilmiştir (73, 78, 94, 119). Son zamanlarda doku kültürleri hastaliksız siğirlardan elde edilen lenfositlerin keneden elde edilen sporozoitlerle in vitro olarak enfekte edilmesi suretiyle yapılmıştır (11, 12, 53, 86).

İzole edilen lenfositler doku kültürünün ilk 24 saati içinde monolayer (yalınkat hücre) oluşmaya başlamış, daha sonraki günlerde hücrelerin çoğu büyümüş ve vakuoller teşekkül etmiştir. Küçük, yuvarlak hücre kolonileri 6-10 gün sonra oluşmuştur (81). Hücrelerin bir kısmı ise tabana yapışmadan kalmıştır. Bir kaç pasaj sonunda yalnız enfekte, küçük ve yuvarlak lenfositler üremeye devam etmiş, diğer hücreler ise ölmüştür (73, 78, 81).

Doku kültürü besi yeri olarak Eagle Minumum Essential Medium (MEM) (78, 81, 86, 94), siğir serumu, antibiyotik ve yeast içeren Earle solüsyonu (119),

Lactalbumin hydrolysate ve yeast extract (47), Medium 199 (78), RPMI-1640 ve Hapes Buffer (11) kullanılmaktadır. Kùltùrlerde kullanılan vasatlar %10-20 fòtal dana serumu ile takviye edilmektedir (2, 77, 78, 81).

2- **Theileria annulata** Şizontlarının virulansının attenüasyonu, bunların doku kùltüründe uzun süre üretilmesi ve haftada 2-3 defa pasajlanması esasına dayanır (77, 86). Attenüasyonun derecesi kùltùrlerdeki Şizontların duyarlı sığırllara belli aralıklarla inokulasyonları yapıp alınan reaksiyonlara göre saptanır. Doku kùltürünün başlangıç dönemlerinde, **T.annulata** Şizontları inokule edildiği sığırllarda klinik theileriosis oluşturmakta, hatta bazı sığırlların ölümüne de neden olmaktadır. Daha uzun süren kùltùrlerden elde edilen **T.annulata** Şizontları , inokule edildikleri duyarlı sığırllarda daha hafif klinik semptomlar ve daha az parazitemi oluşturmaktadır (76, 81, 88, 89, 93). İleri dönemlerde ise duyarlı sığırllarda klinik semptom oluşturmadığı gibi, bu hayvanlarda ne Şizontları, ne de eritrositik parazitleri oluşturmaktadır (93, 95).

Pipano ve Tsur (95) üç aylık doku kùltüründe geliştirdikleri Şizontları inokule ettikleri sekiz buzağının yedisinde tipik theileriosisin Şekillendiğini, yedi aylık kùltürden elde ettikleri Şizontları inokule ettikleri dokuz buzağıda hafif ateş yükselmesi ve parazitik reaksiyonların oluştuğunu, ancak ölümü görölmediğini, 12 aylık kùltürden izole ettikleri Şizontları inokule ettikleri buzağılarda ise hiç bir klinik semptom görölmediğini tespit etmişlerdir. **T.annulata** Şizontlarının tam olarak attenüasyonu için kùltivasyon periyodu **T.annulata** suşlarına göre bir kaç ay ile üç yıldan fazla bir zaman arasında değişmektedir (77, 95). Attenüasyon mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Fakat farklı **T.annulata** suşlarının doku kùltüründe tam olarak attenüasyonu için gerekli zaman dilimi, o suşun başlangıçtaki virulansının Őiddeti ile ilişkili değildir (77, 86). Bir defa attenüe edilen Şizont ileriki pasajlarda virulans kazanmamaktadır (77, 85, 87). Attenüasyonun tam olarak ölçüsü, Şizontların duyarlı danalara enjeksiyonundan sonra, bu hayvanlarda klinik semptom ve parazitemi oluşturmamasıdır (78, 80,

81, 86, 87, 93, 95). Bu noktada şizontların tam olarak attenüe oldukları kabul edilmektedir (76, 87, 89, 93). Ancak şizontların immunizasyon amacıyla rutin olarak kullanılmadan önce, attenüe şizontların zararsızlık ve koruyucu etkilerinin ölçülmesi gerekmektedir. Zararsız ve koruyucu etkisi olan tam attenüe şizontlar, deney danalarına inokule edilmelerinden sonra theileriosise ilişkin hiç bir klinik semptom ve parazitemiye neden olmayacak, bunun yanında kene ve kan eprüvasyonlarına karşı danaları koruyacaktır (77).

Özkoç ve Pipano (80) **T.annulata** şizontlarının attenüasyonunun belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, 250-325'inci pasajlar arasında elde ettikleri şizontları bir grup danaya inokule etmek suretiyle test ettiklerinde, bu hayvanların karaciğerinde şizontlara, kanlarında ise eritrositer formlara rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Ancak bir kaç danada hafif ateş yükselmesi tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar (80), bu sonuca göre attenüasyon basamağının 250'den sonraki basamak olduğu kararına varmışlardır. Brown (13) **T.annulata** şizontlarının attenüasyonu için in vitro olarak 50 ile 300 arasında pasaj edilmesi gerektiğini ve bunun için de altı ay ile üç yıl arasında bir süreye ihtiyaç duyulduğunu bildirmiştir.

Attenüe şizontların zararsızlık ve koruyucu etkilerinin ölçülmesi amacıyla laboratuvarda 5-6 adet duyarlı danaya  $5 \times 10^6$  şizontla enfekte hücre inokule edilir (77, 86). İnokulasyondan iki hafta sonra hayvanlar klinik ve parazitolojik yönden 10 gün boyunca kontrol edilir. Her gün beden ısıları ölçülür, perifer kan frotileri yapıp Giemsa ile boyanarak muayene edilir. İnokulasyondan altı hafta sonra, aşılanan hayvanlar ve bunlara ilaveten aşılammamış 2-4 aylık duyarlı kontrol danası enfekte kenelerden hazırlanmış ezme kene süspansiyonu (her hayvana 10 kene tekabül edecek miktarda) veya enfekte kanın (heterolog veya homolog virulent şizontlar) inokulasyonu ile çelinç yapılır. Zararsız ve koruyucu etkisi olan şizontlar, tatbikinden sonra theileriosise ilişkin hiç bir klinik semptom ve parazitemiye neden olmayacak, bunun yanında kene ve kan çelinçine karşı

hayvanları koruyacaktır. İnokulasyondan sonra değişik zamanlarda hayvanlardan kan alınarak klinik, serolojik ve mikroskopik olarak muayene edilir (77, 86).

3- Aşı üretimi için tam attenüe olmuş hücrelerin devamlı kültürü yapılmaktadır. Böylece aşı üretiminin sürekliliği sağlanmakta ve kültür çok yüksek pasajlara kadar sürdürülebilmektedir (73, 77, 88). Monolayer olarak üreyen attenüe şizontla enfekte lenfoid hücreler iki defa PBS (fosfat buffer solüsyonu) ile yıkanır, sonra her şişeye 10 cc versene (%025 E.D.T.A - Ethylene - diamin - tetracetic - acid) konarak hücreler çözdürülür. Çözdürülen hücrelerin 2/3'ü plastik kaplarda toplanır. Roller kültür şişelerinde geriye kalan 1/3 miktarındaki hücrelerin üzerine taze vasat konarak yeniden kültürde üretimlerine devam edilmek suretiyle kültürün sürekliliği sağlanır (73, 77). Plastik kaplarda toplanan attenüe hücreler soğutuculu santrifüjde 2000 devirde 20 dakika, +4°C'de santrifüj edilir. Üst kısım atılarak dipte toplanan hücreler sayılır ve bir ml Eagle-MEM içinde  $5 \times 10^7$  hücre olacak şekilde ayarlanır. Üzerine hücre koruyucu olarak %7'lik DMSO (Diethyle sulfhoxide) katılıp beş cc'lik cam ampullere porsiyonlanarak -70 °C'ye ayarlı derin dondurucuda 24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tanklarına nakledilir ve kullanılıncaya kadar bu tanklarda saklanır (13, 73, 77) . Doku kültürleri steril kabinlerde ve steril şartlarda yapılır. Her aşı serisi de yine steril şartlarda hazırlanır ve uygun bakteriyolojik yöntemlerle bakteriyel kontaminasyonlardan temiz oldukları belirlenir (77).

4- Aşı sahadaki kullanımı göz önüne alınarak taze aşı ve dondurulmuş aşı olmak üzere iki şekilde hazırlanır. Her iki şekilde de aynı attenüe hücrelerden yararlanılır (73, 77, 86, 88). Eğer aşının kullanılması uzun zaman sonra olacaksa ve çok fazla üretim yapılacaksa dondurulmuş olarak muhafaza edilir (77).

**a- Taze aşı (Liquid - sıvı aşı) :** Aşı taze olarak hazırlandıktan sonra +4 °C'de veya +20 °C'de tutulur, sahaya buz çantaları içinde nakledilir ve her dozda  $3 \times 10^6$  ila  $5 \times 10^6$  şizont olacak şekilde hazırlanır (73, 86).

**b- Dondurulmuş aşı (Likit Nitrojende)** : Aşı uzun zaman sonra kullanılacaksa dondurulmuş olarak muhafaza edilmesi gerekir (86). Bunun için hücreler üzerine koruyucu olarak DMSO veya gliserol ilave edilir ve -70 °C ile -196 °C'ler arasında dondurularak saklanabilir (13). Dondurulmuş aşı sahaya sıvı azot içinde taşınır. Kullanılmadan önce sıvı azot içinden çıkarılan aşı ampulu önce dışarda 10-15 saniye bekletilir. Daha sonra aşı ampulu 37-40 °C'deki ılık suda çabuk çözdürülür ve  $10^7$  şizontla enfekte lenfoid hücre bir doz olacak şekilde PBS içinde sulandırılır ve hemen kullanılır (13, 77).

Tropikal theileriosise karşı aşılama çalışmaları Çin'de 1975 yılında başlatılmış olup, 1990 yılına kadar endemik bölgelerde 1.8 milyon sığır aşılanmış ve aşılanan sığırlarda %99.58 oranında koruyucu etkinin elde edildiği belirtilmiştir(132, 134). Ayrıca aşının sığırları tropikal theileriosise karşı bir yıldan fazla bir süre koruduğu, uygulamadan iki hafta sonra hafif ateş yükselmesi dışında hayvanlarda her hangi bir klinik belirti oluşturmadığı, gebe hayvanlarda atık yapmadığı ve süt verimini de azaltmadığı bildirilmiştir (132, 134).

Rusya'da tropikal theileriosise karşı doku kültüründe **T.annulata** şizontlarının attünüasyonu yoluyla standart aşı hazırlanmıştır. Bu aşıyla sahada iki aylıktan iki yaşına kadarki üç milyonun üzerinde hassas sığır aşılanmıştır. Tek doz aşı uygulaması yapılan sığırlar %99 oranında hastalıktan korunmuşlar ve uzun süre bağışık durumlarını devam ettirmişlerdir (133). Yine Rusya'da Stepanova ve Zablotsky (114) **T.annulata** ile enfekte kenelerin bulunduğu bölgelerde aşılanmış sığırların sekiz yıl, enfekte kenelerin bulunmadığı bölgelerde dört yıl bağışık durumlarının devam ettiğini bildirmişlerdir (114).

İran'da tropikal theileriosise karşı aşılama çalışmalarında ilk uygulama, klinik reaksiyonların en fazla görüldüğü bölgelerde hasta hayvanlardan alınan kanın sağlıklı hayvanlara verilmesiyle başlatılmıştır (45). 1973 yılından itibaren, şizontla enfekte lenfositlerin kültive edilmesi ile hazırlanan canlı attenüe **T.annulata** aşısının iki aylık veya daha yaşlı hayvanlara uygulandığı belirtilmiştir

(45, 46). Standart attenüe aşı dozunun  $3-4 \times 10^6$  hücre içerdiği ve bu dozla aşılanan hayvanlarda hiç bir klinik reaksiyon oluşmadığı bildirilmiştir (45, 46). Bu güne kadar kültür ırkı ve melez sığırlara 200.000 doz aşının uygulandığı, aşı uygulanan hayvanlarda **T.annulata**'ya bağlı mortalite oranının %0.04, aşı uygulanmayan sığırlarda ise %80 olduğu bildirilmiştir (45).

Hindistan'da tropikal theileriosise karşı aşılama çalışmalarında ilk uygulama enfeksiyon tedavi metoduyla yapılmıştır. 1985'den beri attenüe şizontla enfekte sığır lenfoid hücrelerini kapsayan aşı uygulanmaktadır (36, 112). Tropikal theileriosise karşı kullanılan bu aşı, hücre kültürünün 150'inci pasajından elde edilmiş ve bir dozunda  $5 \times 10^6$  hücre içerecek şekilde hazırlanmıştır (96, 112, 128). Aşı üç aylık buzağılarda bir yıldan fazla sürede koruyucu bağışıklık oluşturmuştur (128). Raghav ve arkadaşları (96) aşının standart dozunu belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, en yüksek antikor titresinin hücre kültürünün 150-250'inci pasajları arasında elde edilen ve  $5 \times 10^6$  hücre içeren aşı dozunun hassas sığırlara inokule edilmesiyle sağlandığını bildirmişlerdir.

Fas'ta tropikal theileriosise karşı koruyucu olarak canlı attenüe şizont aşısı kullanılmaktadır. Attenüe  $10^2$  hücrenin sığırları hastalığa karşı koruduğu, ancak aşılama da kullanılan aşı dozunun  $10^4$  hücre içerecek şekilde hazırlandığı bildirilmiştir (75). 1500 sığır üzerinde yapılan saha denemesinde aşının, bir ay sonra yapılan suni çelinçlere ve doğal enfeksiyonlara karşı sığırları koruduğu belirtilmiştir. Aşılamadan sonra hayvanlarda morbidite ve mortalite görülmemiş ve aşı güvenilir bulunmuştur. Ayrıca aşıtlı hayvanlar üzerinde beslenen kenelerde enfeksiyonun olmadığı bildirilmiştir (75).

Türkiye'de değişik iklim bölgelerinden **T.annulata** izolatları ile aşı hazırlama çalışmaları başlatılmıştır (78, 79, 81, 129). Bu izolatlar Ankara, Diyarbakır, Gebze, Hatay ve Kırklareli yöresinden theileriosisli sığırlardan, hastalığın akut döneminde alınan kandan izole edilmişlerdir (78, 79, 81). Kanlar hasta hayvanlardan heparinli tüpler içine alınmış, daha sonra bunlara %10

gliserol ilave edilerek  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot içinde muhafaza edilmiştir. Aynı amaçla izole edilen diğer bir suşta Diyarbakır yöresinden toplanan enfekte kenelerin kullanılması suretiyle oluşturulan hastalıklı sığırlardan elde edilmiştir. Sıvı azotta saklanan kanlar izolasyon çalışmaları için  $37^{\circ}\text{C}$ 'de benmari içerisinde çözdürülmüş, 2.5-3 aylık her danaya 20 ml deri altı yolla verilerek **T.annulata** enfeksiyonları oluşturulmuştur (73, 78, 81). Türkiye'nin değişik iklim bölgelerinden izole edilen bu beş izolatla çapraz bağışıklık denemeleri de yapılmış olup, bu denemeler ile Ankara, Kırklareli, Diyarbakır Gebze ve Hatay **T.annulata** saha suşları arasında tam bir çapraz bağışıklığın varlığı ortaya konmuştur (79).

Türkiye'de tropikal theileriosise karşı aşı olarak kullanılan suş, Ankara yöresinden izole edilmiş olan Ankara suşudur (73). Bu suştan hazırlanan attenüe **T.annulata** aşısı Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsünde 1982 yılından beri üretilmektedir (73). Doku kültüründe üretilen **T.annulata** şizontlarının virulansı, bunların uzun süre kültürde üretilmesi ve pasajlanması ile giderilmiştir (73). Bu attenüasyon sırasında haftada iki veya üç pasaj yapılmıştır. Kültürlerdeki şizontlar her 20-30 pasajda bir, hassas hayvanlara inokule edilerek attenüasyonun derecesi ölçülmüştür (73). Tam attenüasyon 250'inci pasaj civarında elde edilmiştir (80). Aşı 250'inci pasajın üstündeki pasajlardan tam attenüe olmuş hücrelerin devamlı kültürü ile hazırlanmıştır (73). **T.annulata** aşı üretimine statik monolayer kültür şeklinde başlanmış, daha sonra ise döner (roling) monolayer kültür şeklindeki üretime geçilmiştir. Monolayer olarak üreyen attenüe şizontlarla enfekte lenfoid hücreler haftada üç gün çözdürülerek plastik kaplarda toplanmıştır. Toplanan attenüe hücreler santrifuj edilerek sayılıp, bir doz aşıda  $10^7$  adet şizontla enfekte hücre olacak şekilde 5 ml'lik cam şişelerde sıvı azot içinde saklanmıştır (73).

Attenüe şizontlarla enfekte  $1.2 \times 10^5$  lenfoid hücre, koruyucu immuniteyi oluşturmak için yeterlidir. Ancak aşının dondurularak muhafazası, sahaya nakli,

çözdürülmesi ve hayvanlara tatbiki esnasındaki bütün riskleri hesaba katarak bir dozu  $10^7$  hücre olacak şekilde hazırlanmaktadır (73, 77). Aşının süspansiyon olarak kullanılması halinde  $5 \times 10^6$  hücre kullanılmakta ve yeterli immuniteyi vermektedir (77). Pipano (87) sığırlarda bağışıklık oluşturmak için  $10^5$  adet şizontla enfekte lenfoid hücreye ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir.

Attenüe **T.annulata** şizont aşısı bu güne kadar Türkiye'nin değişik iklim bölgelerinde 400.000 dozdan fazla kullanılmıştır . Yapılan bir saha çalışmasında (73) 5254 baş hayvan aşılanmış, 73 baş hayvan da kontrol olarak bırakılmıştır. Aşılı hayvanların hiç birinde klinik semptom görülmezken, 73 kontrol hayvanın 18'i akut theileriosisden ölmüştür.

Nalbantoğlu (72) 58 sığira attenüe  $10^7$  **T.annulata** şizont aşısı uygulamış ve bu sığırları bir yıl boyunca takip ederek titre tespiti yapmıştır. Şizont aşısı uyguladığı 58 sığırdan 45'inin (%77.5) **T.annulata** piroplasm ve şizont antijenine karşı 4-12 ay süreyle antikor taşıdığını, altı sığırın da (%10.3) piroplasm taşıyıcısı olduğunu saptamıştır.

### 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, 1995 yılı Şubat ayından, 1996 yılı Mart ayına kadar Elazığ Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliği, Hankendi kasabası, Merkez Erpinik, Perçenç ve Sürsürü köyü ile Palu ilçesinde yürütülmüştür.

Başlangıçta değişik yaşlarda ve ırklarda 120 sığır seçilmiş ve kanları alınarak **T.annulata**'ya karşı antikor yönünden IFA testi ile serolojik yoklamaları ve mikroskopik muayeneleri yapılmıştır. Negatif oldukları saptanan sığırlardan 66 hayvan seçilerek iki çalışma grubu oluşturulmuştur. Her iki grupta bulunan hayvanlar 0-1, 1-2 ve 2 yaş üstü gruplara ayrılmıştır. 0-1 yaş grubunda 13, 1-2 yaş grubunda 10, 2 yaş üstü grupta 23 olmak üzere toplam 46 baş sığıra tropikal theileriosise karşı attenüe  $10^7$  **T.annulata** şizont aşısı uygulanmıştır. Yine 0-1 yaş grubunda 7, 1-2 yaş grubunda 7 ve 2 yaş üstü grupta 6 olmak üzere toplam 20 baş sığır kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Aşılamadan sonra nisan ayında aşılı 0-1 yaş grubundan 2, 1-2 yaş grubundan 4 olmak üzere toplam 6, kontrol hayvanlarının 0-1 yaş grubundan 2, 1-2 yaş grubundan 1 ve 2 yaş üstü gruptan 2 olmak üzere toplam 5 sığır çeşitli nedenlerle çıkartılmış olup, çalışmaya aşılı grupta 40, kontrol grubunda 15 sığır ile devam edilmiştir.

Aşılı grubu oluşturan odaklardan F.Ü.Çiftliği, Erpinik, Palu ve Hankendi'ne sırasıyla 09.03.1995, 14.03.1995 ve 23.03.1995 tarihlerinde **T.annulata** şizont aşısı yapılmıştır. Bunun için, Tarım Bakanlığı Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilen aşı sıvı nitrojen tankı içinde belirlenen odaklara nakledilerek tarafımızdan uygulanmıştır.

Bir aşı şişesindeki 3 ml Eagle-MEM içinde 15 dozluk aşı çözdürüldükten sonra 37.5 ml sulandırma sıvısı ile sulandırılarak her sığırın prescapular bölgesine deri altı 2.5 ml ( $10^7$ ) **T.annulata** şizontları ile enfekte lenfoid hücre) verilmiştir.

Bu sığırlardan Mart 1995'den Mart 1996'ya kadar ayda bir defa olmak üzere her ay kan örnekleri alınmış, aşıllı hayvanlarda **T.annulata** aşısına karşı oluşan antikorların, kontrol grubu hayvanlarda da tropikal theileriosise karşı şekillenen antikorların varlığı aranmıştır. Böylece 13 ay süresince 715 serum toplanarak değerlendirilmiştir. Araştırma saha ve laboratuvarında yürütülmüştür.

### **Saha Çalışmaları**

Belirlenen odaklara her gidişte, önceden tespit edilmiş ve kulak numarası verilmiş sığırlardan steril heparinsiz vakumlu tüplere 10'ar cc kan alınmıştır. Yine her sığırın kuyruk ucundan yayma froti yapılmıştır. Ayrıca hematokrit değerleri belirlemek için mikrohematokrit tüplere kan çekilmiştir. Kan örneği alınan sığırlar ile bu sığırların barınakları kene enfestasyonu yönünden muayene edilmiştir. Sığırlar üzerinden ve barınaklarından toplanan keneler üzeri numaralandırılmış şişelere konarak laboratuvara getirilmiştir. Bu şişelerin üzerine kenelerin toplandığı sığırın kulak numarası ile alındığı tarih ve yer kaydedilmiştir.

### **Laboratuvar Çalışmaları**

Sığırlar üzerinden toplanan ergin kenelerin stereo mikroskop altında morfolojik özellikleri incelenmiş, **Hyalomma** soyuna bağlı keneler ayrılarak tür tayinleri yapılmıştır. Teşhis edilen türler ile bu türlerin cinsiyetleri ve sayıları ilgili protokole kaydedilmiş, daha sonra tükürük bezleri çıkartılmıştır.

Barınaklardan toplanan aç olgun **Hyalomma**'lar ile bunların nimflerinin gömlek değiştirmesi ile elde edilen aç olgun **Hyalomma**'lar, 37 C° ısı ve %85 nisbi neme ayarlı etüve yerleştirilerek beş gün süre ile bekletildikten sonra tükürük bezleri çıkartılmıştır.

Tükürük bezleri çıkartılacak kene makasla iki eşit parçaya ayrılmıştır. Daha sonra bu parçalardan herbiri, içerisinde fizyolojik tuzlu su bulunan petri kutusuna alınarak tükürük bezleri çıkartılmış, lam üzerine yayılarak preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar methyle green pyronin boyama metoduyla boyanmış ve

enfekte asini sayıları tespit edilmiştir.

### **Metil Green-Pyronin boyasının Hazırlanması**

%2 lik methyle green boyasından 500 ml hazırlanır. Bu amaçla ayrıştırıcı fanusa 10 gr methyle green konarak distile su ile 500 ml'ye tamamlanmış daha sonra kloroform ilave edilerek fanusun musluğu açılmış ve kloroform berraklaşınca kadar ilave edilmiştir. Böylece %2'lik methyle green stok solüsyonu elde edilmiştir. Beş gram toz pyronin 100 ml distile suda çözdürülerek %5 lik pyronin boyası hazırlanır (131). Hazırlanan %2 lik methyle green'den 40 ml, %5 lik pyronin'den sekiz ml alınarak 452 ml distile su ile karıştırılmış ve birinci stok solüsyonu elde edilmiştir.

Konsantre glasiyal asetik asit solüsyonundan 1-2 ml alınarak 200 ml distile su ile sulandırılmış, sodyum asetat trihidrat'tan 4.08 gr alınarak 300 ml distile suda çözdürülmüş ve birbiri ile karıştırılarak ikinci stok solüsyonu elde edilmiştir. Birinci ve ikinci stok solüsyonlarından eşit oranda karıştırılarak boya solüsyonu hazırlanmıştır.

### **Kene Tükürük Bezi Preparatlarının Boyanması**

Hazırlanan preparatlar havada kurutulmuş, %99.9 etil alkolde iki dakika bekletilmiş, buradan alınan preparatlar methyle green pyronin boya solüsyonunda altı, tekrar %99.9'luk etil alkolde dört ve ksilol içerisinde iki dakika tutulmuş ve ışık mikroskopunda **T. annulata** enfeksiyonu yönünden muayene edilmiştir.

### **Kan frotilerinin boyanması ve Hemotokrit Değerlerin Belirlenmesi**

Hayvanların kuyruk ucundan yapılan yayma frotiler metil alkol ile beş dakika tespit edilmiştir. Tespit edilen frotiler %5 oranında distile su ile (PH: 7.2) sulandırılmış Giemsa boyasıyla 30 dakika boyanmış ve immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta (x100 büyütme) incelenmişlerdir. Her preparatta 200

mikroskop sahası içinde bulunan piroplasmli eritrositler sayılmış ve bulunan sayı enfekte eritrosit sayısı (n/200) olarak değerlendirilmiştir.

Mikro hematokrit tüplere alınan kanlar, hemotokrit santrifüjünde beş dakika santrifüj edilerek kandaki mikro hemotokrit değerler belirlenmiştir.

### **İndirek Floresan Antikor Testi**

İndirek floresan antikor testi, Burrige ve Kimber ile Çakmak'ın bildirdiğine göre yapılmıştır. Steril heparinsiz vakumlu tüplere alınan kanlar 2500 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmış, çıkartılan serumlar iki ml'lik mikrotüplere konmuş ve IFA testinde kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplanan 715 serumda **T.annulata**'ya karşı oluşan antikorlar indirek floresan antikor (IFA) testi ile araştırılmıştır.

Aşılardan sonra 35'inci günde ilk kan numunesi alınmış ve Mart 1996'ya kadar her ay düzenli bir şekilde devam edilmiştir. Toplanan serumlar iki aylık periyotlarla Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalında IFA testi ile **T.annulata** antikorları yönünden yoklanmıştır. Test edilmek üzere -20 °C'de bekletilen bu serumlar Ankara'ya içerisinde buz kalıpları bulunan özel termoslarla götürülmüş ve test yapılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında bekletilmiştir.

### **Antijen Preparatlarının Hazırlanması**

İndirek floresan antikor (IFA) testi için gerekli olan antijenler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji laboratuvarında hazırlanmıştır.

**Piroplasm antijeni:** Bu amaçla Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı'nda yürütülen bir projede elde edilmiş olan **T. annulata** Sarioba GUTS materyali kullanılmış ve deneysel olarak üç aylık steril duyarlı danaya inokule edilmiştir. Parazitemi oranı %24'e yükselince

antijen yapımı için 10 cc heparinli kan alınarak üç kısım PBS (PH 7.2) ilave edilip 2100 devirde, +4 °C'de 10 dakika santrifuj edilmiştir. Daha sonra üstteki sıvı kısım atılmış ve alttaki pellet tekrar steril PBS ile sulandırılarak sanrifuj edilmiş ve bu işlem 3-5 kez tekrarlanmıştır. Yıkamış sedimentten bir kısım alınarak antijen sulandırma basamağı tespit edilmiştir. Bunun için 1:2 ile 1:4096 deneme sulandırma basamakları yapılmış ve bunlar antijen lamlarına damlatılmıştır. Antijen lamları önce havada kurutulmuş daha sonra 100 °C'de 15 dakika tutulmuş ve %5'lik Giemsa ile 30 dakika boyama yapılmıştır. Bu preparatlara 100'lük objektifle bakılarak bir mikroskop sahasında 20 parazitin görülmesi ile sulandırma basamağı tespit edilmiştir. Eritrosit sedimenti sulandırma basamağına göre steril PBS ile sulandırılıp antijen lamlarına damlatılmıştır. Bir gece oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra beşer adetlik seriler halinde filtre kağıtlara daha sonra alüminyum kağıtlara sarılarak üzerleri yazılmış ve karton kutularda IFA testinde kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-70 °C) saklanmışlardır (15).

**Şizont antijeni:** Şizont antijeni Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı Doku kültürü laboratuvarında üretilen **T.annulata** hücre kültüründen hazırlanmıştır. **T.anulata** GUTS stabilatı ile enfekte edilen deney danasından enfeksiyonun 15'inci günü alınan kandan usulüne göre ayırt edilen enfekte lenfositler, RPMI-1640 vasatına ekim yapılarak üretilmiştir. Doku kültürünün 26'ıncı pasajından elde edilen süspansiyon 1000 devirde beş dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj işlemi steril PBS ilave edilerek üç kez tekrarlanmıştır. Hücre tortusunun sulandırılması 1:10 ile 1:640'a kadar steril PBS ile yapılmış ve antijen lamlarına damlatılmıştır. Havada kurutulan lamlar, 100 °C'de 15 dakika kurutulduktan sonra %5'lik Giemsa ile 30 dakika boyanmıştır. Sulandırma basamağı mikroskop sahasında 20 parazitin görülmesi esas alınarak belirlenmiştir. Şizont antijen preparatları, piroplasm antijen preparatlarının hazırlanmasında olduğu gibi hazırlanmıştır (15).

**Konjugat:**

IFA testinde kullanılan konjugatın (Sigma, Anti-Bovine IgG, FITC, Cat. No. F-7509) en iyi floresan veren sulandırma basamağı Schachbrett-titrasyon testi ile belirlenmiştir (5, 15, 115). Schachbrett-titrasyon testi için gerekli olan negatif referens serum 1:2'den 1:64'e, pozitif referens serum ise 1:2'den 1:4096'ya kadar PBS ile sulandırılmıştır. En iyi floresan veren sulandırma basamağı tespit edilecek konjugatın, bir kısım Evans Blue, üç kısım PBS'den ibaret konjugat sulandırma sıvısı ile 1:2'den 1:4096'ya kadar dilusyonu yapılmıştır.

Antijen preparatlarının birincisi PBS ve konjugat kontrol olarak ayrılmış, diğer preparatlara ise negatif ve pozitif serum dilusyonu damlatılmıştır. İnkube edildikten sonra PBS kontrol grubuna PBS, konjugat kontrol grubu dahil pozitif ve negatif referens serumları damlatılan antijen lamlarına ise, konjugat dilusyonlarından 1:2'den 1:4096'ya kadar basamaklar damlatılarak tekrar inkube edilmiştir. Preparatlar gliserinli buffer (1 kısım PBS+ 9 kısım gliserin) ile kapatılarak karanlık odada floresan mikroskopta 40'luk neoflor objektif ile en iyi floresan veren sulandırma basamağı saptanmıştır.

Optimal sulandırma basamağı olarak iki ile dört kez konsantre olan basamak tercih edilmiştir (115). Buna göre de indirek floresan antikor (IFA) testinde kullanılan konjugatın en iyi floresan veren sulandırma basamağı Schachbrett-titrasyon testi ile 1:32 olarak belirlenmiştir.

Schachbrett-titrasyon testi ile sulandırma basamağı 1:32 olarak belirlenen konjugatın hepsi 20 mikrolitrelik porsiyonlara ayrılarak -20 °C'ye kaldırılmıştır. Konjugat test yapılırken sulandırma solüsyonu (üç kısım PBS + bir kısım Evans Blue) ile 1:32 oranında sulandırılmıştır.

**İndirek Floresan Antikor Testinde Kullanılan Kontrol Maddeleri**

**Buffer kontrol:** Buffer kontrol olarak PBS (PH: 7.2) kullanılmıştır. Bu kontrol maddesi lamlardaki ilk iki göze damlatılarak floresan mikroskopta incelenmiştir.

**Konjugat kontrol:** Sulandırma basamağı tespit edilmiş konjugattan (üç kısım PBS + bir kısım Evans Blue) kontrol lamlarından üçüncü ve dördüncü gözlere damlatılarak mikroskopta incelenmiştir.

**Negatif kontrol:** Negatif kontrol serumları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı tarafından yürütülen projelerde deney hayvanı olarak alınan ve **T.annulata** yönünden steril olan 2.5-3 aylık buzağılardan temin edilmiştir. Negatif kontrol serumları mikrotiter plate'lerde 1:10 ile 1:80 arasında sulandırıldıktan sonra kontrol lamlarındaki beşinci, altıncı, yedinci ve sekizinci gözlere damlatılmıştır.

**Pozitif kontrol:** Pozitif kontrol serumları da Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı'nın yürüttüğü projelerde **T.annulata** ile deneysel olarak enfekte edilmiş deney danalardan inkubasyondan 35 gün sonra alınan serumlardan elde edilmiştir. Pozitif kontrol serumları mikrotiter plate'lerde 1:10'dan 1:1280'e kadar yapılan sulandırma basamaklarından kontrol lamlarının alt sırasındaki 1:10'dan 1:1280'e kadar olan bütün gözlere damlatılmıştır.

#### IFA testinde kullanılan kimyasal maddeler

- |  |  |
|--|--|
| 1- Evans Blue                              | : Merck, cat. No: 3169   |
| 2- Giemsa solüsyonu                        | : Merck, cat. No: 9204   |
| 3- İmmersiyon yağı                         | : Merck, cat. No: 4095   |
| 4- Konjugat                                | : Sigma, Anti-bovine IgG, FITC<br>Conjugate, cat.NF- 7509                      |
| 5- Floresan mikroskop için gliserin        | : Merck, cat.No: 4095  |
| 6- Fosfat Buffer Salin (PBS) Potasyumsuz : |  |
| Alkali kısım :                             | 17.44 gr NaCl<br>7.16 gr Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> X12 H <sub>2</sub> O |

---

24.60 gr 2000 ml distile suya tamamlanır

Asidik kısım :	8.72 gr	NaCl
	1.38 gr	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O

---

10.10 gr 1000 ml distile suya tamamlanır

Bu iki karışım birbiri ile karıştırılarak PH : 7.2' ye ayarlanır.

### **İndirek Floresan Antikor Testinin (IFA) Uygulanışı**

- 1- İşlenecek serumlar bir gün önceden -20 °C'den + 4 °C'ye alınmıştır.
- 2- Antijen preparatları, muhafaza edilen derin dondurucudan (-70 °C) çıkartılarak içerisinde nem çekiçi (CaCl<sub>2</sub>) bulunan kapalı bir kap içerisine konmuş ve iki saat bekletilmiştir.
- 3- İşlenecek serumlar usulüne uygun olarak 1:10'dan 1:10240'a kadar PBS ile sulandırılmıştır. Piroplasm için temel titre 1:20, Şizont için temel titre 1:40 olarak alınmıştır.
- 4- Nem çekici ortamda iki saat bekleyen antijen preparatları numara verilerek rutubetli bir ortama (Kapalı bir küvet içine süzgeç kağıdı serilip üzerine distile su dökülerek hazırlanmış) alınmış, kontrol olarak kullanılan antijen preparatlarından ilk iki göz PBS, sonraki iki göz ise konjugat kontrol olarak ayrılmış, diğer gözlere sulandırılmış serumlar damlatılmıştır.
- 5- Serum damlatma işlemi bittikten sonra rutubetli ortam küvetinin kapağı kapatılıp, 37 °C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir.
- 6- 37 °C'deki etüvde 30 dakika bekletilen preparatlar buradan alınarak, bir kez elde, beşer dakika iki kez manyetik karıştırıcıda PBS ile yıkanmış, daha sonra 2-3 dakika distile suda yıkanıp, fön makinası ile kurutulmuşlardır.
- 7- Kurutulan preparatlar tekrar rutubetli küvet içine dizilmiş ve kontrol preparatlarındaki buffer kontrol (PBS) gözleri hariç bütün gözlere sulandırılmış konjugat (üç kısım PBS + bir kısım Evans Blue) damlatılarak rutubetli ortam küvetinin kapağı kapatılıp, 37 °C'deki etüvde tekrar 30 dakika bekletilmiştir.

8- Etüvden alınan preparatlar, tekrar altıncı bölümdeki yıkama ve kurutma işlemlerine tabii tutulmuşlardır.

9- Kurutulan preparatlar kapalı lam kutularına dizilmişler ve üzerlerine gliserinli buffer (bir kısım PBS + dokuz kısım Gliserin) damlatılarak lamelle kapatılmıştır.

10- Bu preparatlar karanlık odada floresan mikroskopta 40'lık neofluar objektifle muayene edilerek sonuçlar belirlenmiştir.

#### IFA testi sonuçlarının değerlendirilmesi

+++	: Çok iyi pozitif	(3)
++	: İyi pozitif	(2)
+	: Pozitif	(1)
t	: Treys	( Pozitif negatif arası)
-	: Negatif	(Floresan vermeyen)

Testin değerlendirilmesinde kullanılan artı (+) değerler floresan mikroskopta parlamamanın net ve fazla oluşuna göre tespit edilmiştir.

Oranlar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için Fisher exact testi kullanılmış ve %5 (0.05) düzeyindeki bir farklılık istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Bu testler Epi-Info istatistik programı vasıtası ile yapılmıştır (18).

#### 4. BULGULAR

Araştırmada aşılanacak ve kontrol bırakılacak hayvanların tespiti amacıyla araştırma merkezlerinden seçilen çeşitli yaş gruplarına ait 120 siğırda **T.annulata**'ya karşı yapılan IFA testi ve mikroskopik muayene sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hastalık mevsiminden önce kanları alınan 120 siğırda IFA testi ve kan frotisi sonuçları

Odak	Hayvan sayısı	Seronegatif hayvan sayısı	Seropozitif hayvan sayısı	Piroplasm taşıyan hayvan sayısı
F..illiği	34	34	0	0
Hankendi	16	11	5	1
Palu	45	19	26	18
Erpinik	12	12	0	0
Sürsürü	4	4	0	0
Peręen	9	7	2	1
Toplamı	120	87	33	20

Buradan anlaşılacağı gibi 120 siğırdan 33' (%27.5) enfekte bulunmuş ve prevalans değerinin 0.27 olduğu tespit edilmiştir. Bu siğırların 20'sinin (%16.6) eritrositlerinde **T.annulata**'nın piroplasm Şekilleri görülmüştür. Piroplasm formları taşıyan siğırların hepsinde IFA testi ile parazite karşı antikor bulunmuştur. Böylece 120 siğırda **T.annulata**'ya bağlı parazit prevalansının 0.166, seroprevalansın ise 0.275 olduğu saptanmıştır.

Serolojik ve mikroskopik negatif olduğu tespit edilen hayvanlardan **T.annulata** Şizont aşısı uygulanan 40 siğir ile aşı yapılmadan kontrol olarak tutulan 15 siğırdan bir yıl boyunca elde edilen toplam 715 serumun IFA testi ve aynı sayıda kan frotisinin mikroskopik muayene sonuçları Tablo 3 ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Mart 1995-Mart1996 tarihleri arasında tropical theileriosis'e karşı aşılanan sığırların IFA testi ve kan frotisi sonuçları

Yaş grupları	Hayvan sayısı	Serum sayısı	Froti sayısı	Seropozitif	Piroplasm taşıyan
0-1 yaş	11	143	143	10	1
1-2 yaş	6	78	78	6	2
2 yaş üstü	23	299	299	18	6
Toplam	40	520	520	34	9

Tablo 3. Mart 1995-Mart 1996 tarihleri arasında kontrol grubu sığırların IFA testi ve kan frotisi sonuçları

Yaş grupları	Hayvan sayısı	Serum sayısı	Froti sayısı	Seropozitif	Piroplasm taşıyan
0-1 yaş	5	65	65	1	1
1-2 yaş	6	78	78	5	5
2 yaş üstü	4	52	52	2	2
Toplam	15	195	195	8	8

Tablo 2'den anlaşılacağı gibi **T.annulata**'ya karşı aşılanan farklı yaş gruplarına ait 40 sığırdan 34'ünün (%85), **T.annulata** piroplasm ve şizont antijenine karşı antikor taşıdığı ve bunlardan 9 (%22.5) sığırın da piroplasm taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Yine 0-1 yaş grubunda 11 sığırın 10'u (%90.9), 1-2 yaş grubunda 6 sığırın 6'sı (%100), 2 yaş üstü 23 sığırın 18'i (%78.2) seropozitif bulunmuştur. Ayrıca 0-1 yaş grubunda 1 (%9), 1-2 yaş grubunda 2 (%33.3), 2 yaş üstü grupta 6 (%26) sığırın piroplasm taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Bu yaş grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. (Seropozitiflik için P=0.3, Piroplasm taşıyıcılığı için P=0.7)

Tablo 3'den anlaşılacağı gibi kontrol grubu olarak bırakılan 15 sığırdan

8'inin (%53.3), *T.annulata* piroplasm ve şizont antijenine karşı antikor taşıdığı ve bu 8 hayvanın aynı zamanda piroplasm taşıyıcısı da olduğu tespit edilmiştir. Yine kontrol grubu hayvanlardan, 0-1 yaş grubunda 5 sığırın 1'i (%20), 1-2 yaş grubunda 6 sığırın 5'i (%83.3), 2 yaş üstü 4 sığırın 2'si (%50) seropozitif bulunmuştur. Seropozitif bulunan bu sığırların aynı zamanda piroplasm taşıyıcısı da oldukları belirlenmiştir. Bu yaş grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. (Seropozitiflik ve Piroplasm taşıyıcılığı için  $P=0.1$ ).

Aşılı grupta seropozitifliğin (%85) kontrol grubuna göre (%53) daha yüksek olduğu ortaya çıkmış, bu farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. ( $P=0.03$ ). Yine piroplasm taşıyıcılığında görülen fark da istatistiksel öneme sahiptir ( $P=0.047$ ).

Yaş gruplarına göre piroplasm taşıyıcılığı yönünden karşılaştırılan aşılı ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel öneme sahip değildir (0-1 yaş grubu için  $P= 1.0$ , 1-2 yaş grubu için  $P=0.2$ , 2 yaş üstü grup için  $P=0.6$ ).

Tropikal theileriosise karşı aşılanan farklı yaş gruplarına ait hayvanların, IFA testi ile seropozitifliğinin aylara göre dağılımı Tablo 4'te verilmiştir. Tablodan da anlaşılacağı gibi aşı uygulamasından 35 gün sonra 0-1 yaş grubunda 11 hayvandan 10'unda (%90.9) tropikal theileriosise karşı antikor oluştuğu, bu durumun mayıs ayında da aynı şekilde devam ettiği ve haziran, temmuz ve ağustosta 9'a (%81.8), eylülde 1'e (%9) düştüğü, ekimde sıfırlandığı görülmüştür.

1-2 yaş grubunda nisan, mayıs ve haziranda 6 hayvanın 6'sının (%100) seropozitif olduğu, bu durumun temmuz ve ağustosta 5'e (%83.3), eylül ve ekimde 4'e (%66.6), kasımda 3'e (%50), aralık ve ocakta 2'ye (%33.3), şubat ve martta 1'e (%16.6) düştüğü görülmüştür.

Yine aynı tabloda görüldüğü gibi 2 yaş üstünde nisan ve mayıs ayında 23 hayvandan 18'inin (%78.2) seropozitif olduğu, bu durumun haziranda 19'a çıktığı (%82.6), temmuz ve ağustosta aynı şekilde devam ettiği, eylülde 14'e (%60.8), ekimde 13'e (%56.5), kasımda 8'e (%34.7), aralıkta 6'ya (%26), ocak, şubat ve

martta ise 4'e (%17.3) düştüğü tespit edilmiştir. 2 yaş üstünde bir hayvanda aşidan sonra seropozitiflik durumunun haziranda görüldüğü; ancak bu seropozitifliğin aşıya cevap olarak mı oluştuğu, yoksa kene enfestasyonundan mı kaynaklandığı belirlenememiştir. Seropozitiflik 0-1 yaş grubunda %90.9, 1-2 yaş grubunda %100, 2 yaş üstü grupta %78.2 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca seropozitiflik her 3 yaş grubunda da 6'ncı aydan itibaren azalarak 0-1 yaş grubunda 7, 1-2 ve 2 yaş üstü grupta 12 ay devam etmektedir. Böylece aşının hayvanları uzun süre koruduğu, seropozitifliğin 1-2 yaş grubunda 1, 2 yaş üstü grupta ise 4 hayvanda 12 ay devam ettiği tespit edilmiştir.

Yine Tablo 4'den anlaşılacağı gibi 40 hayvanın nisan, mayıs ve haziran aylarında toplam 34'ü (%85), temmuz ve ağustosta 33'ü (%82.5), eylülde 19'u (%47.5), ekimde 17'si (%42.5), kasımda 11'i (%27.5), aralıkta 8'i (%20), ocakta 6'sı (%15), şubat ve martta ise 5'i (%12.5) seropozitif olarak belirlenmiştir.

Tablo 5'da ise tropikal theileriosise karşı aşılanan 40 hayvanın perifer kanlarından hazırlanan sürme frotilerin mikroskopik muayenelerinin aylara göre dağılımı gösterilmiştir. Buna göre aşılamaı takiben piroplasm formları 0-1 yaş grubunda temmuzda 1, 1-2 yaş grubunda temmuz-aralıkta 2, ocak-martta 1, 2 yaş üstünde ise nisan ve mayısta 2, haziranda 3, temmuz ve ağustosta 4, eylül-kasımda 5, aralık ve ocakta 3, şubat ve martta 2 hayvanda parazitin piroplasm formlarına rastlanmıştır.

Tablo 4. Tropikal theileriosis'e karşı aşılanan sığırlarda, aşılama sonrası bir yıl içinde aylara göre seropozitiflik durumları

	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
0-1 yaş	0/11*	10/11	10/11	9/11	9/11	9/11	1/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
1-2 yaş	0/6	6/6	6/6	6/6	5/6	5/6	4/6	4/6	5/6	2/6	2/6	1/6	1/6
2 yaş üstü	0/23	18/23	18/23	19/23	19/23	19/23	14/23	13/23	8/23	6/23	4/23	4/23	4/23
Toplam	0/40	34/40	34/40	34/40	33/40	33/40	19/40	17/40	11/40	8/40	6/40	5/40	5/40

\* x/y : Antikor bulunan hayvan sayısı, muayene edilen hayvan sayısı

Tablo 5. Tropikal theileriosis'e karşı aşılanan sığırlarda, aşılama sonrası bir yıl içinde kan frotilerinin mikroskopik bakı sonuçlarının aylara göre dağılımı

	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
0-1 yaş	0/11*	0/17	0/11	0/11	1/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
1-2 yaş	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	1/6	1/6	1/6
2 yaş üstü	0/23	2/23	2/23	3/23	4/23	4/23	5/23	5/23	5/23	3/23	3/23	2/23	2/23
Toplam	0/40	2/40	2/40	3/40	7/40	6/40	7/40	7/40	7/40	5/40	4/40	3/40	3/40

Tablo 6'da kontrol grubu sığırlarda seropozitiflik durumu verilmiştir. Buradan izlenebileceği gibi 0-1 yaş grubunda bulunan 5 sığırdan 1'i (%20) mayıs-mart aylarında; 1-2 yaş grubunda 6 sığırdan 3'ü (%50) haziranda, 4'ü (%66.6) temmuzda, 5'i (%83.3) ağustos-ocakta, 3'ü (%50) şubatta, 2'si (%33.3) martta; 2 yaş üstü grupta 4 sığırdan 2'si (%50) haziran-mart aylarında seropozitif olarak tespit edilmiştir. Yine 15 sığırdan mayısta 1'i (%6.6), haziranda 6'sı (%40); temmuzda 7'si (%46.6); ağustos-ocakta 8'i (%53.3); şubatta 6'sı (%40) martta ise 5'i (%33.3) IFA testi ile seropozitif bulunmuştur.

Tablo 7'den anlaşılacağı gibi seropozitif olan sığırların aynı zamanda piroplasm taşıyıcısı da oldukları tespit edilmiştir. Yine Tablo 7'den anlaşılacağı gibi kontrol grubunda bulunan 15 sığırın nisanda hiç birinde piroplasm belirlenemezken, mayısta 1, haziranda 5, temmuzda 7, ağustos-ocakta 8, şubatta 6, martta 5 hayvanda piroplasm belirlenmiştir. böylece kontrol grubu 15 sığırın 8'inin (%53.3) piroplasm taşıyıcısı olduğu ortaya çıkmıştır.

Tablo 6. Mart 1995-1996 tarihleri arasında kontrol gurubu sığırlarda bir yıl boyunca seropozitiflik durumu

	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
0-1 yaş	0/5*	0/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
1-2 yaş	0/6	0/6	0/6	3/6	4/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	3/6	2/6
2 yaş üstü	0/4	0/4	0/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4
Toplam	0/15	0/15	1/15	6/15	7/15	8/15	8/15	8/15	8/15	8/15	8/15	6/15	5/15

\* x/y : Antikor bulunan hayvan sayısı, muayene edilen hayvan sayısı

Tablo 7. Kontrol gurubu sığırlarda bir yıl boyunca kan frotilerinin mikroskopik bakı sonuçlarının aylara göre dağılımı

	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
0-1 yaş	0/5*	0/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
1-2 yaş	0/6	0/6	0/6	2/6	4/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	3/6	2/6
2 yaş üstü	0/4	0/4	0/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4
Toplam	0/15	0/15	1/15	5/15	7/15	8/15	8/15	8/15	8/15	8/15	8/15	6/15	5/15

\*x:y : Enfekte hayvan sayısı, muayene edilen hayvan sayısı

Tropikal theileriosise karşı aşılandıktan sonra, **T.annulata'** nın piroplasm antijenlerine karşı bir yıl içinde oluşan antikörlerin IFA testi ile belirlenen titrelerinin yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 8' de gösterilmiştir. Buradan anlaşılacağı gibi, piroplasm antikör titreleri 0-1 yaş grubunda nisan ayında en düşük 1:40, en yüksek 1:2560; mayıs ve haziranda en düşük 1:40, en yüksek 1:640; temmuzda en düşük 1:40, en yüksek 1:160; ağustosta en düşük 1:20, en yüksek 1:40; eylülde piroplasm için temel titre kabul edilen 1:20 olup, ekimde sıfırlanmıştır. 1-2 yaş grubunda nisanda en düşük 1:160, en yüksek 1:2560; mayıs ve haziranda en düşük 1:40, en yüksek 1:640; temmuzda en düşük 1:40, en yüksek 1:320; ağustosta en düşük 1:40, en yüksek 1:160; eylül-ocakta en düşük 1:20, en yüksek 1:40; şubat ve martta ise 1:20 olarak tespit edilmiştir. 2 yaş üstünde nisanda en düşük 1:40, en yüksek 1:2560; mayısta en düşük 1:80, en yüksek 1:640; haziranda en düşük 1:40, en yüksek 1:640; temmuzda en düşük 1:20, en yüksek 1:640; ağustosta en düşük 1:20, en yüksek 1:80; eylül-martta ise en düşük 1:20, en yüksek 1:40 düzeyinde saptanmıştır.

Tropikal theileriosise karşı aşılanan hayvanlarda, **T.annulata** şizont antijenine karşı IFA testi ile belirlenen antikör titreleri ise Tablo 9' da verilmiştir. Bu tabloya göre, 0-1 yaş grubunda aşılamaadan sonraki nisan ve mayıs aylarında en düşük 1:80, en yüksek 1:640; haziranda en düşük 1:40, en yüksek 1:640; temmuzda en düşük 1:40, en yüksek 1:80; ağustosta 1:40 olup, eylülde sıfırlanmıştır. 1-2 yaş grubunda nisanda en düşük 1:160, en yüksek 1:640; mayıs ve haziranda en düşük 1:40, en yüksek 1:640; temmuz ve ağustosta en düşük 1:40, en yüksek 1:80; eylül ve ekimde ise temel titre olarak kabul edilen 1:40 düzeyinde olup, kasımda sıfırlanmıştır. 2 yaş üstündeki hayvanlarda ise nisan ayında en düşük 1:80, en yüksek 1:2560; mayısta en düşük 1:40, en yüksek 1:2560; haziranda en düşük 1:40, en yüksek 1:640; temmuzda en düşük 1:40, en yüksek 1:160; ağustos, eylül ve ekimde en düşük 1:40, en yüksek 1:80 olarak belirlenmiştir. kasım ayında 1:80 olup, aralık ayında sıfırlanmıştır.

Tablo 8 ve 9' dan anlaşılacağı üzere 0-1 yaş grubundaki hayvanların antikor düzeyinin seyri, **T.annulata** piroplasma 6, şizontta 5 ay devam etmiştir. 1-2 yaş grubunda **T.annulata** piroplasma 12 , şizontta 7 ay, 2 yaş üstünde ise **T.annulata** piroplasma 12 ay, şizontta ise 8 ay devam etmiştir. **T.annulata** piroplasm antikor titresini en düşük 1:20, en yüksek 1:2560, şizont antikor titresini ise en düşük 1:40, en yüksek 1:2560 olarak belirlenmiştir.

Tablo 10'da kontrol hayvanlarında, IFA testi ile belirlenen en yüksek ve en düşük **T.annulata** piroplasm antikor titrelerinin aylara göre dağılımı verilmiştir. Buradan 0-1 yaş grubundaki hayvanlarda ilk antikor mayısta 1:640 olarak tespit edilmiş, bu titrenin haziranda devam ettiği, temmuz ve ağustosta 1:80' e; eylül ve ekimde 1:40' a düştüğü görülmüş, kasım-martta ise 1:20 olarak belirlenmiştir. 1-2 yaş grubunda ilk titre haziranda en düşük 1:80, en yüksek 1:640 olarak belirlenmiş olup, bu titrenin temmuzda en düşük 1:80, en yüksek 1:320; ağustos-kasımda en düşük 1:40, en yüksek 1:320; aralık ve ocakta en düşük 1:20, en yüksek 1:320; şubat ve martta ise en düşük 1:20, en yüksek 1:640 olarak belirlenmiştir. 2 yaş üstü grupta ilk titre 1:640 olarak haziranda görülmüş olup, bu titrenin temmuz-eylülde en düşük 1:80, en yüksek 1:320; ekimde en düşük 1:160, en yüksek 1:320; kasımda en düşük 1:80, en yüksek 1:160; aralık ve ocakta 1:80; şubat ve martta ise en düşük 1:40, en yüksek 1:80 olarak belirlenmiştir.

Tablo 11' de ise kontrol grubu hayvanlarda, IFA testi ile belirlenen en yüksek ve en düşük **T.annulata** şizont antikor titrelerinin aylara göre dağılımı verilmiştir. Burada görüldüğü gibi 0-1 yaş grubunda ilk antikor titresini eylülde 1:80 olarak belirlenmiş, ekimde temel titre olan 1:40' a düşerek kasımda sıfırlanmıştır. 1-2 yaş grubunda ilk titre haziranda 1:80 olarak tespit edilmiş olup, temmuz-ocakta en düşük 1:40, en yüksek 1:80; şubat ve martta ise 1:80 olarak belirlenmiştir. 2 yaş üstünde ilk titre 1:80 olarak haziranda tespit edilmiş olup, temmuz ve ağustosta aynı şekilde devam etmiş, eylül-mart aylarında ise 1:40 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 8. Tropikal theileriosis'e karşı aşılanan hayvanlarda, IFA testi ile belirlenen en yüksek ve en düşük T. annulata piroplam antikor titrelerinin aylara göre dağılımı

	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
0-1 yaş	0	1:40> 1:2560<	1:40> 1:640<	1:40> 1:640<	1:40> 1:160<	1:20> 1:40<	1:20<	0	0	0	0	0	0
1-2 yaş	0	1:160> 1:2560<	1:40> 1:640<	1:40> 1:640<	1:40> 1:320<	1:40> 1:160<	1:20 1:40<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<	1:20<	1:20<
2 yaş üstü	0	1:40> 1:2560<	1:80< 1:640<	1:40> 1:640<	1:20> 1:640<	1:20> 1:80<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<	1:20> 1:40<

0 : Seronegatif

Tablo 9. Tropikal theileriosis'e karşı aşılanan hayvanlarda, IFA testi ile belirlenen en yüksek ve en düşük T. annulata şizont antikor titrelerinin aylara göre dağılımı

	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
0-1 yaş	0	1:80> 1:640<	1:80> 1:640<	1:40> 1:640<	1:40> 1:80<	1:40<	0	0	0	0	0	0	0
1-2 yaş	0	1:160> 1:640<	1:40> 1:640<	1:40> 1:640<	1:40> 1:80<	1:40> 1:80<	1:40<	1:40<	0	0	0	0	0
2 yaş üstü	0	1:80> 1:2560<	1:40> 1:2560<	1:40> 1:640<	1:40> 1:160<	1:40> 1:80<	1:40> 1:80<	1:40> 1:80<	1:80<	0	0	0	0

0 : Seronegatif

Tablo 10. Kontrol gurubu hayvanlarda IFA testi ile belirlenen en yüksek ve en düşük T. annulata piroplazm antikor titrelerinin aylara göre dağılımı

	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
0-1 yaş	0	0	1:640<	1:640<	1:80<	1:80<	1:40<	1:40<	1:20<	1:20<	1:20<	1:20<	1:20<
1-2 yaş	0	0	0	1:80>	1:80>	1:40>	1:40>	1:40>	1:40>	1:20>	1:20>	1:20>	1:20>
				1:640<	1:320<	1:320<	1:320<	1:320<	1:320<	1:320<	1:320<	1:640<	1:640<
2 yaş üstü	0	0	0		1:80>	1:80>	1:80>	1:160>	1:80>			1:40>	1:40>
				1:640<	1:320<	1:320<	1:320<	1:320<	1:160<	1:80<	1:80<	1:80<	1:80<

0 : Seronegatif

Tablo 11. Kontrol gurubu hayvanlarda IFA testi ile belirlenen en yüksek ve en düşük T. annulata şizont antikor titrelerinin aylara göre dağılımı

	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
0-1 yaş	0	0	0	0	0	0	1:80<	1:40<	0	0	0	0	0
1-2 yaş	0	0	0		1:40>	1:40>	1:40>	1:40>	1:40>	1:40>	1:40>		
				1:80<	1:80<	1:80<	1:80<	1:80<	1:80<	1:80<	1:80<	1:80<	1:80<
2 yaş üstü	0	0	0		1:80<	1:80<	1:80<	1:40<	1:40<	1:40<	1:40<	1:40<	1:40<

Araştırma süresince gerek aşılarmış ve gerekse kontrol olarak tutulmuş olan toplam 55 siğır ile bunlara ait 18 barınak kene enfestasyonu yönünden muayene edilmiş ve bunlardan 8 siğır ve 2 barınakta **Hyalomma** soyuna bağılı türlere rastlanmıştır. Bu soya bağılı siğırlarda **H.a.anatolicum** ve **H.detrıtum**, hayvan barınaklarında ise sadece **H.a.anatolicum** bulunmuştur.

Siğırlar üzerinden 11 nimf, 125 erkek ve 127 dişi olmak üzere toplam 263 **H.a.anatolicum** ile; 6 erkek ve 12 dişi olmak üzere toplam 18 **H.detrıtum**, hayvan barınaklarından ise 2 dişi ve 80 nimf olmak üzere toplam 82 **H.a.anatolicum** toplanmıştır. Hayvan barınakları ve siğırlardan toplanan kene türlerinden Hankendi'de bir siğırdan alınan bir adet **H.a.anatolicum** hariç; diğırlarının tümü Palu ilçesi siğır ve barınaklarından toplanmıştır. Diğırlar odaklarda **Hyalomma** türlerine rastlanmamıştır.

Gerek siğırlar ve gerek se hayvan barınaklarından toplanan **Hyalomma** türlerinin aylara göre dağılımı Tablo 12, 13 ve 14te verilmiştir.

Tablo 12. **H.a.anatolicum**'un siğırlardaki enfestasyon oranları ile erkek, dişi ve nimflerinin aylara dağılımı.

Aylar	M.E.	E.B.	%	E	D	N	T.K.	E.H.D.
Şubat	120	-	-	-	-	-	-	-
Mart	66	-	-	-	-	-	-	-
Nisan	55	1	1.81	1	2	-	3	3.00
Mayıs	55	3	5.45	51	53	-	104	34.66
Haziran	55	4	7.27	39	50	-	89	22.25
Temmuz	55	2	3.63	25	13	-	38	19.00
Ağustos	55	-	-	-	-	-	-	-
Eylül	55	3	5.45	9	9	11	29	9.66
Ekim	55	-	-	-	-	-	-	-
Kasım	55	-	-	-	-	-	-	-
Aralık	55	-	-	-	-	-	-	-
Ocak	55	-	-	-	-	-	-	-
Şubat	55	-	-	-	-	-	-	-
Mart	55	-	-	-	-	-	-	-

M.E : Muayene edilen siğır sayısı, E.B. : Enfeste bulunan siğır sayısı, E. : Erkek, D. : Dişi, N. : Nimf, T.K. : Toplam kene sayısı, E.H.D. : Enfekte hayvan başına düşen kene sayısı.

Tablo 13. **H.detrutum**'un sığırlardaki enfestasyon oranları ile erkek ve dişilerin aylara dağılımı.

Aylar	M.E.	E.B.	%	E	D	N	T.K.	E.H.D.
Şubat	120	-	-	-	-	-	-	-
Mart	66	-	-	-	-	-	-	-
Nisan	55	1	1.81	6	4	-	10	10.00
Mayıs	55	-	-	-	-	-	-	-
Haziran	55	1	1.81	-	5	-	5	5.00
Temmuz	55	1	1.81	-	3	-	3	3.00
Ağustos	55	-	-	-	-	-	-	-
Eylül	55	-	-	-	-	-	-	-
Ekim	55	-	-	-	-	-	-	-
Kasım	55	-	-	-	-	-	-	-
Aralık	55	-	-	-	-	-	-	-
Ocak	55	-	-	-	-	-	-	-
Şubat	55	-	-	-	-	-	-	-
Mart	55	-	-	-	-	-	-	-

M.E. : Muayene edilen siğir sayısı, E.B. : Enfeste bulunan siğir sayısı, E. : Erkek, D. : Dişi, N. : Nimf, T.K. : Toplam kene sayısı, E.H.D. : Enfekte hayvan başına düşen kene sayısı.

Tablo 14. Hayvan barınaklarından toplanan **H.a.anatolicum**'un olgun erkek ve dişileri ile nimflerinin aylara göre dağılımı.

Aylar	K.A.	E	D	N	T.K.
Şubat	-	-	-	-	-
Mart	-	-	-	-	-
Nisan	-	-	-	-	-
Mayıs	-	-	-	-	-
Haziran	-	-	-	-	-
Temmuz	-	-	-	-	-
Ağustos	-	-	-	-	-
Eylül	-	-	-	-	-
Ekim	2	-	-	23	23
Kasım	1	-	2	45	47
Aralık	1	-	-	12	12
Ocak	-	-	-	-	-
Şubat	-	-	-	-	-
Mart	-	-	-	-	-

E. : Erkek, D. : Dişi, N. : Nimf, K.A. : Kene bulunan ahır sayısı, T.K. : Toplam kene miktarı.

Tablo 12'ten izlenebileceği gibi **H.a.anatolicum**'un olgun erkek ve dişilerine hastalık mevsimi olan nisan, mayıs, haziran, temmuz ve eylül aylarında, nimflerine ise eylülde rastlanmıştır.

Tablo 13'den izlenebileceği gibi sığırlar üzerinde **H.detrutum**'un erkeklerine nisan, dişilerine ise nisan, haziran ve temmuz aylarında rastlanmış olup, nimflerine rastlanmamıştır.

Tablo 14'de görüldüğü gibi hayvan barınaklarında **H.a.anatolicum**'un olgun erkeklerine rastlanmamış, kasımda 2 olgun dişi bulunmuş, ekim, kasım ve aralıkta ise nimfleri bulunmuştur.

Toplanan **Hyalomma** türlerinden 212 **H.a.anatolicum** ile 16 **H.detrutum** 'un tükürük bezleri çıkarılmak suretiyle **T.annulata** enfeksiyonu yönünden muayene edilmiş ve bu türlerdeki enfeksiyon oranları ile enfekte asini miktarları Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. Hyalomma türlerindeki **T.annulata** enfeksiyon oranları ve enfekte asini miktarları.

Hyalomma türü		A.K.	E.K.	%	E.O.	E.S.
H.anatolicum	E	82	15	18.29	8.40	27
	D	130	8	6.15	10.50	28
	T	212	23	10.84	8.69	-
H.detrutum	E	6	1	16.66	-	84
	D	10	-	-	-	-
	T	16	1	6.25	84	-

A.K. : Açılan kene sayısı, E.K. : Enfekte kene sayısı, E.O. : Enfekte asini ortalaması, E.S. : En yüksek enfekte asini sayısı, E. : Erkek, D. : Dişi, T. : Toplam.

Buradan izlenebileceği gibi **H.a.anatolicum**'un erkeklerinin %18.29'u ve dişilerininin %6.15'i enfekte bulunmuş; ortalama ve enyüksek enfekte asini sayılarının erkeklerde 8.40 ve 27, dişilerde ise 10.50 ve 28 olduğu ortaya çıkmıştır.

Tükürük bezi açılan 16 **H.detrutum**'dan sadece biri enfekte bulunmuş ve bu kenedeki enfekte asini sayısı 84 olarak belirlenmiştir.

Aşılı sığırlardan iki tanesinde enfekte **H.a.anatolicum** ve bir tanesinde de

hem **H.a.anatolicum** ve hem de **H.detrutum** bulunmuş, kontrol sığırlarının birinde de enfekte **H.a.anatolicum** tespit edilmiştir. **Hyalomma** tespit edilen iki barınaktan biri kontrol diğeri ise aşıllı sığırların bulunduğu barınak olup, her iki barınaktan toplanan **H.a.anatolicum**'larda da enfeksiyon tespit edilmiştir.

Enfekte kene tespit edilen aşıllı üç sığır ile kontrol grubu bir sığırdaki araştırma süresi sonuna kadar **T.annulata** şizont ve piroplazm antikörlerinin devam ettiği belirlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

**Theileria annulata**'nın (Dschunkowsky ve Lühs, 1904) sebep olduğu Tropikal theileriosis veya Akdeniz sahil humması, sığırların protozoer bir hastalığı olup, **Hyalomma** soyuna bağlı kene türleri tarafından transtadial (safhadan safhaya) nakledilir (4, 13, 26, 35, 70, 97, 113, 125).

Tropikal theileriosisin teşhisi; epidemiyolojik bilgilerin değerlendirilmesi, klinik bulgular, laboratuvarda mikroskopik ve serolojik teşhis yöntemleri ile yapılır (13, 41, 70, 73, 102). Uzun yıllar hayvanlardan alınan kan frotilerinin mikroskopik bakışı ve klinik bulgular ile yapılmıştır (69, 70, 113). Son yıllarda ise özellikle latent enfeksiyonların saptanmasında serolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır (14, 20-23, 34, 54-56, 83, 92)

**Theileria annulata** enfeksiyonunun serolojik muayenesinde spesifik antikorlar aranır. Bu antikorlar in vitro ortamlarda **T.annulata**'nın sporozoit, şizont ve piroplasm antijenleri ile reaksiyon verirler (19, 22, 90-92). Latent enfeksiyonların teşhisinde ve şizont aşısı ile aşılanan sığırlarda immun cevabın değerlendirilmesinde Indirect Fluorescent Antibody (IFA), Complement-fixation, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Improved Serum Antibody, Capillary-Tubeagglutination, Haemagglutination-Inhibition gibi serolojik testlerden yararlanılmıştır (14, 19-23, 34, 54-56, 83, 92). Bunlardan IFA testinin diğerlerine göre daha hassas ve kolay olması,, toplanan çok sayıda serumun 3-4 saat gibi kısa bir süre içinde işlenmesi gibi avantajları vardır (22). Bu nedenle çalışmamızda IFA testi kullanılmıştır.

Çin'de yapılan epidemiyolojik çalışmada ülkenin bir çok yeri epidemik saha olarak belirlenmiş olup, **T.annulata** enfeksiyonunun insidensinin yerli sığırlarda %11.9, ithal sığırlarda %61 olduğu ve hastalığın Mayıs-Eylül ayları arasında seyrettiği, Temmuz ayında en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (132).

Kazakistan'da tropikal theileriosisin mayısın ortalarında görülmeye başladığı, haziranın sonunda en yüksek seviyeye eriştiği, temmuzun sonunda düştüğü, ağustos sonu ve eylül ayına kadar devam ettiği belirtilmiştir (107). Sudan'da ise hastalığın endemik olduğu bildirilmiştir (52). Bu çalışmada kontrol grubunda elde ettiğimiz %53'lük insidens oranı Çin'de elde edilen sonuç (132) ile benzerlik arz etmektedir.

Fas'ın Doukkala bölgesinde hastalık mevsiminden önce **T.annulata**'nın piroplasm prevalansı %48.5 bulunmuş ve yaşlı hayvanların gençlere oranla daha fazla piroplasm taşıyıcı oldukları belirtilmiştir (33). Hindistan'da yapılan seroepidemiolojik çalışmada kan frotilerinin mikroskopik bakışında **T.annulata**'nın piroplasmalarının %14.94, serolojik yoklamalarda ise %30-60 oranında pozitiflik bulunduğu saptanmış olup, hastalık mevsiminin nisan-ekim ayları olduğu bildirilmiştir (110, 112). Bizim çalışmamızda hastalık mevsiminden önce elde ettiğimiz %16.6'lık **T.annulata**'nın piroplasm prevalansı Fas'ın Doukkala bölgesinde (33) elde edilen **T.annulata**'nın piroplasm prevalansından düşük, Hindistanda (112) elde edilen piroplasm prevalansı ile benzerlik arz etmektedir. Yine bu çalışmada elde edilen %27.5'lik seroprevalansın Hindistanda (112) elde edilen seroprevalans sonucundan düşük olduğu görülmüştür.

Türkiye'de kan frotilerinin mikroskopik bakışına göre **T.annulata** enfeksiyonu, Ege bölgesinde %43.2 (32), İstanbul ili ve çevresinde %20.70 (124), Orta Anadolu'da %17.87 (38), Karadeniz bölgesinde %22.85 (65), Elazığ bölgesinde %28.98 (29) ve Adana ili Çukurova Tarım işletmesinde %9.3 (72) oranında saptanmıştır.

Elazığ yöresinde bu çalışmada elde edilen %16.6'lık **T.annulata** piroplasm sonucun bazı araştırmacıların (29, 32, 65, 124) bulgularına göre daha düşük, Çukurova tarım işletmesinde elde edilen sonuca göre daha yüksek ve Orta Anadolu'da elde edilen sonuçla ise benzerlik göstermekte olup, araştırma

gruplarını oluşturan sığırlarda klinik enfeksiyon görülmemiş, **T.annulata**'nın piroplasmik formlarının yılın her ayında görüldüğü saptanmıştır.

Türkiye'de tropikal theileriosisin teşhisi son yıllarda serolojik yöntemlerle yapılmaktadır (15, 16, 25, 31, 72, 104, 105). Çakmak (15) Ankara'nın Beytepe köyü'nden IFA testi ile **T.annulata**'ya karşı %6.4 oranında antikor tespit etmiştir. Sayın ve arkadaşları (104) Ankara'nın ilçelerinde **T.annulata**'nın yıllık prevalansını 1990 yılında %31.7, 1991 yılında %19 olarak belirlemişler, Dinçer ve arkadaşları (25) Samsun'da %63, Çakmak ve Öz (16) Adana'da %10.7, Sayın ve arkadaşları (105) Elazığ'da %41, Adana'da %14, Bursa'da %10, Eren ve arkadaşları (31) Ege, Karadeniz, İç Anadolu, Marmara ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde sırasıyla %40, %46.8, %29, %33.3, %91.4 oranında seropozitiflik elde etmişlerdir. , Nalbantoğlu (72) Adana Çukurova Tarım işletmesinde %16 oranında yıllık seroprevalans elde etmiştir. Bu çalışmada hastalık mevsiminden önce 120 sığırın IFA testi ile ilk yoklamasında %27.5 oranında bir seropozitiflik elde edilmiş olup, bu sonucun Ankara Beytepe köyü'nde (15), Adana yöresinde (16), Adana ve Bursa'da (105) elde edilen sonuçlardan yüksek, Elazığ (105), Ege, Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde (31) elde edilen sonuçlardan düşük olduğu, İç Anadolu ve Marmara bölgesinde (31) elde edilen sonuçlarla benzerlik arzettiği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın kontrol grubu sığırlarında **T.annulata**'nın yıllık seroprevalansı %53.3 olarak saptanmıştır. Bu sonuç Sayın ve arkadaşları (104) ile Nalbantoğlu'nun (72) yıllık seroprevalans sonucundan yüksek, Dinçer ve arkadaşlarının (25) sonucundan düşük olup, bu durumun araştırmaların ayrı bölgelerde ve farklı yıllarda yapılmış olmasından kaynaklandığı kanaatine varılmıştır.

Bu çalışmada kontrol grubu hayvanlarda seropozitiflik ve piroplasm taşıyıcılığı gençlere oranla yaşlılarda daha fazla görülmüş ve elde edilen sonucun Flach (33) 'ın Fas'ta yapmış olduğu çalışmada elde ettiği sonuçlara benzer olduğu ortaya çıkmıştır. Yaş grupları arasında piroplasm taşıyıcılığındaki farklılık yaşlı

hayvanların daha fazla kene enfestasyonuna maruz kalmalarıyla izah edilebilir.

Tropikal theileriosise karşı uygulanan **T.annulata** şizont aşısının değerlendirilmesi serolojik yöntemlerden IFA testi ile yapılabilir. Aşıya karşı oluşan reaksiyonlar, aşılardan 30-50 gün sonra alınan kan serumlarında IFA ile serolojik olarak ölçülür (80, 90).

Raghav ve arkadaşları (96), Hindistan'da aşı uygulanan sığırlarda, IFA testi ile antikor titresini tespit etmişler, antikorların 21'inci günde yükselmeye başladığını, 45'inci günde 1:640-1:2560 veya 1:10240'ta en yüksek seviyeye eriştiğini, 45-90 günde 1:640-1:2560'ta olduğunu, 6 ay sonra düşmeye başladığını ve 12'inci ayda aşılardan önceki titreden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı ülkede yapılan başka bir çalışmada (2) buzağılarda antikorların 21'inci günde belirlendiği, 45'inci günde en yüksek seviyeye çıktığı ve en yüksek titrenin 1:640 - 1:2560 arasında olduğu saptanmıştır. Özkoç ve Pipano (80) **T.annulata** şizont aşısı uygulanan buzağılarda, antikorların 35 ile 49'uncu günlerde ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Pipano ve Cahana (90) aşı inokulasyonu yapılan 9 danadan ikisinde 10'uncu, üçünde 12'inci, birinde 13'üncü, ikisinde 15'inci ve birinde 18'inci günde antikorların görüldüğünü, 23-45'inci günlerde titrenin yükseldiğini ve en yüksek titrenin 32-52'inci günlerde görüldüğünü, kontrol grubunda antikorların çelinç inokulasyonundan sonra 13-18'inci günler arasında görüldüğünü ve 23-45 günlerde en yüksek noktaya ulaştığını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar (91) 87 danayı aşıladıktan sonra IFA testi ile yaptıkları serolojik yoklamada 39-48'inci günlerde değişik titrelerde pozitif sonuçlar elde etmişler ve aşılanan danaların hiç birinde klinik ve parazitolojik belirtilere rastlamamışlardır. Aşılardan sonra IFA testi ile tespit ettikleri antikorların daha sonraki **T.annulata** enfeksiyonlarına dirençte rollerinin olup olmadığının bilinmediğini belirtmişlerdir. Nalbantoğlu (72) attenüe **T.annulata** şizont aşısı uyguladığı sığırlarda 30 gün sonra IFA testi ile pozitif sonuçlar almıştır. En yüksek piroplasm antikor titresini 1:5120, şizont antikor titresini 1:2560 olarak

elde etmiştir. Aynı araştırmacı (72) seropozitifliğin 0-1 yaş grubunda 4'üncü ayda eksilerek 12 ay, 1-2 yaş grubunda 3'üncü ayda eksilerek 7 ay, 2 yaş üstü grupta 3'üncü ayda eksilerek 4 ay devam ettiğini belirtmiştir. Bu çalışmada aşı uygulamasından 35 gün sonra IFA testi ile pozitif sonuçlar alınmıştır. Bu sonuç birçok araştırmacının (2, 72, 80, 90, 91, 96) aşı uygulamasından sonra antikorları tespit ettikleri süre ile benzerlik göstermektedir. Seropozitiflik her 3 yaş grubunda 6'ncı aydan itibaren azalarak 0-1 yaş grubunda 7, 1-2 ve 2 yaş üstü grupta 12 ay devam etmiştir. Bu çalışmada hem seropozitifliğin azalmaya başladığı hem de devam ettiği süreyle ilgili elde edilen bulgular Raghav ve arkadaşarınkine (96) benzer olup, Nalbantoğlu'nunkinden (72) daha uzundur. Aşılamadan sonra seropozitifliğin uzun süre devam etmesi, hayvanların sahada enfekte kene ile karşılaşmalarına bağlı olduğu şeklinde yorumlanabilir. Zira bu çalışmada aşılanan sığırlar üzerinde enfekte **Hyalomma**'lar tespit edilmiştir. Piroplasm ve şizont antikor en yüksek 1:2560 titrede saptanmıştır. Bu sonuç bazı araştırmacıların (2, 96) sonuçlarıyla benzerdir. Nalbantoğlu'nun (72) şizont antikor titresi sonucuyla aynı, piropasm antikor titresi sonucundan daha düşüktür. Bu çalışmada, tropikal theileriosise karşı aşılanan hayvanlarda **T.annulata** piropasm ve şizont antikor düzeyi yüksek bulunmuş, düşük titrelerde de olsa piropasm antikorları 0-1 yaş grubunda 6, 1-2 ve 2 yaş üstü grupta 12 ay, şizont antikorları 0-1 yaş grubunda 5, 1-2 yaş grubunda 7, 2 yaş üstü grupta 8 ay devam etmiştir.

Tropikal theileriosise karşı geliştirilen **T.annulata** şizont aşısı ilk defa İsrail'de yüksek verimli sütçü ırkların hastalıktan korunmaları için kullanılmıştır (84, 85). Türkiye dahil Çin, Rusya, İran, Fas ve Hindistan'da uygulanmaktadır (2, 103, 114, 116, 128, 132, 134). Aşı Çin'de bütün hassas hayvanlara uygulanmaktadır. 1990 yılına kadar 1.8 milyon sığır aşılanmıştır (132). Rusya'da  $10^6$  hücre dozla aşılanan sığırlar **T.annulata** ile enfekte kenelerin bulunduğu bölgelerde 3.5 yıl, enfekte kenelerin bulunmadığı bölgelerde 1-2 yıldan fazla bağışık durumlarını

devam ettirmiştir (133). Stepanova ve Zablotskii'ye (114) göre ise aşılı hayvanlar enfekte kenelerin bulunduğu bölgelerde 8 yıl, enfekte kenelerin bulunmadığı bölgelerde 4 yıl bağışık durumlarını devam ettirirler. İran'da  $4 \times 10^6$  hücre ile 2 aylık ve üzerindeki bütün sığırlar aşılanmaktadır (45, 46). Hindistan'da aşı dozu  $5 \times 10^6$  dir. Aşılanan 3 aylık buzağuların en az bir yıl korunduğu belirtilmektedir (96, 112, 128). Fas'ta aşının uygulandığı endemik bölgelerde son yıllarda aşılamaya bağlı olarak hastalığın görülme oranı azalmıştır (74, 75). Türkiye'de genellikle kültür ırkı sığırlar ve buzağular yılda bir defa  $10^7$  aşı hücresiyle aşılanmaktadır. **T.annulata** şizont aşısı bu güne kadar Türkiye'nin değişik iklim bölgelerinde 400.000 dozdan fazla kullanılmıştır. Yapılan bir saha çalışmasında (73) 5254 baş hayvan aşılanmış, 73 baş hayvan da kontrol olarak bırakılmıştır. Theileriosisin yoğun olduğu aylarda yakından takip edilen aşılı hayvanların hiç birinde klinik semptom görülmezken, 73 kontrol hayvanın 18'i akut theileriosisten ölmüştür. Onar'a (73) göre bu aşının uygulandığı hayvanlar, **T.annulata**'nın değişik suşlarına karşı yeterli bir bağışıklık kazanmaktadırlar. Fakat Türkiye'de aşının bir yıllık seyirinin izlenmesi ve titre tespiti konusunda yeterli çalışma yapılmamıştır. Bu konuda Nalbantoğlu tarafından yapılan çalışmada, 58 sığıra attenüe  $10^7$  **T.annulata** şizont aşısı uygulanmış ve bu sığırlar bir yıl boyunca takip edilerek titre tespiti yapılmıştır. Şizont aşısı uygulanan 58 sığırdan 45'inin (%77.5) **T.annulata** piroplasm ve şizont antijenine karşı 4-12 ay süreyle antikor taşıdığı, altı (%10.3) sığırın da piroplasm taşıyıcısı olduğu saptanmıştır (72). Elazığ yöresinde yapılan bu çalışmada, tropikal theileriosise karşı attenüe  $10^7$  **T.annulata** şizont aşısı uygulanan hayvanlar bir yıl süre ile izlenmiş, 40 sığırdan 34'ününün (%85) **T.annulata** piroplasm ve şizont antijenine karşı 6-12 ay süreyle antikor taşıdığı ve 9 (%22.5) sığırında piroplasm taşıyıcısı olduğu saptanmıştır. Gerek antikor taşıyan sığır oranı ve gerekse piroplasm taşıyıcıların miktarı, Adana yöresinde yapılan çalışmada (72) elde edilen sonuçlara göre daha yüksek bulunmuştur. Adana yöresinde aşılanan sığırlarda, vektör kene türlerine

rastlanmaması, buna karşılık bu çalışmada **Hyalomma** soyuna bağlı **H.a.anatolicum** ve **H.detrutum**'un tespit edilmiş olması ve bu kenelerde enfeksiyon saptanması ile aşının sahaya intikali ve uygulama esnasındaki şartların elde edilen yüksek antikor taşıma oranı ve bu antikorların devam etme süresi ile ilişkili olduğu kanaatini doğurmuştur.

Angın (1) **Hyalomma** türlerinin **T.annulata** ile enfekte olup olmadıklarını araştırmak için, Elazığ yöresinde topladığı keneleri diseke etmiş ve **H.a.anatolicum** ve **H.detrutum**'un tükürük bezlerinde **T.annulata**'nın sporoblastlarını tespit etmiştir. Bu kenelerden , hayvan barınaklarından toplanan **H.a.anatolicum**'ların %53.74, sığırlar üzerinden toplanan **H.a.anatolicum**'ların %22.56 ve **H.detrutum**'ların %4.65'inin enfekte olduğu tespit edilmiş, buna karşılık **H.a.excavatum**'un hiç birinde enfeksiyona rastlanmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada da hem sığırlar üzerinde hem de barınaklarda olmak üzere toplam 363 **Hyalomma** toplanmıştır. Bunlardan tükürük bezi açılan toplam 212 **H.a.anatolicum**'un 23'ü (%10.84) ve 16 **H.detrutum**'un biri (%6.25) enfekte bulunmuştur. Bu yörede daha önce yapılan çalışmada (1) **H.a.anatolicum**'larda tespit edilen yüksek enfeksiyon oranının (%22.56) o çalışmada incelenen kene sayısının (1427) fazlalığından kaynaklandığı kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak;

1. Elazığ yöresi sığırlarında tespit edilen **T.annulata** enfeksiyonunun yaygınlığı göz önünde bulundurularak bu yörede aşılama yapılmasının gerekli olduğu,

2. Theileriosise karşı aşılanan hayvanlarda tespit edilen 6-12 aylık antikor taşıma süresi göz önünde bulundurulacak olursa, Elazığ yöresinde sığırların yılda en az bir kere aşılması gerektiği,

3. Elazığ yöresi sığırlarında ve hayvan barınaklarında bulunan kene

türlerinden **H.a.anatolicum** ve **H.detrutum**'un **T.annulata** enfeksiyonunu taşıdığı,

4. Üzerinde enfekte kene tespit edilen hayvanlarda antikor taşıma süresinin daha uzun olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur.

## 6. ÖZET

Bu araştırma, Şubat 1995 - Mart 1996 tarihleri arasında Elazığ İli Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliği, Hankendi kasabası, Merkez Erpinik, Perçenç ve Sürsürü köyü ile Palu ilçesinden seçilen kültür ırkı ve melez sığırlar üzerinde yürütülmüştür. Başlangıçta 120 sığır **T.annulata**'ya karşı antikor yönünden IFA testi ile serolojik yoklamaları yapılmış ve kan frotilerinde parazitin piroplasm formları aranmıştır. Bu muayeneler sonucunda 33 sığırın **T.annulata** ile enfekte olduğu ve prevalans değerinin %27.5 olduğu tespit edilmiştir. Seropozitif olan 33 sığırdan 20'sinin (%16.6) eritrositlerinde **T.annulata**'nın piroplasm şekilleri görülmüştür.

Seronegatif oldukları belirlenen 55 hayvan seçilmiş ve bunlardan 40'ına **T.annulata** şizont aşısı uygulanmış, 15 hayvan kontrol olarak bırakılmıştır. Aşılamadan sonra 55 hayvandan her ay kan alınarak bir yıl süreyle materyal toplanmıştır. Tropikal theileriosise karşı aşılanan 40 sığırdan 34'ünün (%85) **T.annulata** piroplasm ve şizont antijenine karşı antikor taşıdığı ve bunlardan 9 (%22.5) sığırın da piroplasm taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda bulunan 15 negatif sığırdan, hastalık sezonu boyunca, 8'inin (%53.3) **T.annulata** piroplasm ve şizont antijenine karşı antikor taşıdığı ve bunların aynı zamanda piroplasm taşıyıcısı da olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma süresince enfekte olan hayvanların hiçbirinde klinik **Theileria** enfeksiyonu görülmemiştir.

Aşılamadan sonra seropozitiflik 6'ncı aydan itibaren azalarak 12 ay kadar devam etmiştir. **T.annulata** piroplasm antijenine karşı antikor titresini 1:20 ve 1:2560, şizont antijenine karşı antikor titresini 1:40 ve 1:2560 arasında saptanmıştır. En yüksek piroplasm ve şizont antikor titreleri nisan ayında görülmüştür. Kontrol grubunda ilk piroplasm antikorları mayıs, şizont antikorları haziran ayında görülmüş ve yıl boyu devam etmiştir. Piroplasm antikor titresinin 1:20 ve 1:640,

şizont antikor titresinin 1:40 ve 1:80 arasında görüldüğü saptanmıştır.

Bir yıl boyunca takip edilen hayvanlar üzerinde ve barınaklarında **Hyalomma** soyuna bağlı **H.a.anatolicum** ve **H.detrutum** türleri bulunmuştur. Sığırlar üzerinde **H.a.anatolicum**'un olgun erkek ve dişilerine nisan, mayıs, haziran ve eylül, nimflerine ise eylül ayında, **H.detrutum**'un olgun erkek ve dişilerine nisan, haziran ve temmuz aylarında rastlanırken, nimfleri görülmemiştir. Hayvan barınaklarında **H.a.anatolicum**'un nimflerine ekim-aralık aylarında rastlanmıştır.

Tükürük bezi açılan 212 adet **H.a.anatolicum**'un %10.84'ü, 16 adet **H.detrutum**'un %6.25'i enfekte bulunmuştur.

Enfekte kene tespit edilen aşıllı ve aşısız sığırlarda **T.annulata** şizont ve piroplasm antikorlarının araştırma süresi sonuna kadar devam ettiği tespit edilmiştir.

## 7. SUMMARY

This study was performed on pure and mix breed cattle from various farms located in around Elazığ Region. The study was conducted between February 1995 and March 1996. Initially, serum antibodies against **Theileria annulata** were searched in immuno fluorescence assays. Furthermore piroplasm forms of **T.annulata** were investigated the prevalence of specific antibodies in blood smears. **T.annulata** in these animals was 27.5% (33 animals out of 120 cattle). Piroplasm forms of **T.annulata** were noticed in 20 animals (16.6%).

At the second stage of the study, 55 seronegative animals were included. In 40 animals, **T.annulata** schizont vaccine were administered, and the remaining 15 animals served as controls, monthly blood samples were collected for a year. In 34 vaccinated animals (85%), antibodies against the antigens of **T.annulata** piroplasm and schizont forms were detected. Nine animals (22.5%) were the carriers of piroplasm forms of **T.annulata** . In control animals, 8 became positive for antibodies against the antigens of **T.annulata** schizont and piroplasm forms. These animals were also positive for the presence of **T.annulata** piroplasms. In all the infected animals, clinical **T.annulata** infection was not detected.

After vaccination, seropositivity reduced from the 6 th month and continued until the 12 th month. Antibody titers ranged between 1:20 and 1:2560 for piroplasm antigens and 1:40 and 1:2560 for schizont antigens. The highest antibody titers were noticed during the month of april in vaccinated animals. In control animals, piroplasm specific antibodies were first detected during the may and schizont antibodies during the june. The antibody titers remained throughout the year. The antibody titers in control animals ranged 1:20 and 1:640 for piroplasm antigens and 1:40 and 1:80 for schizont antigens.

On the animals and in the premises where animals were housed, **H.a.anatolicum** and **H.detrutum** species were detected. On the animals mature male and female **H.a.anatolicum** species were noticed during april, may, june and september and the nymphs of **H.a.anatolicum** were detected during september. Mature male and female **H.detrutum** were found during april, june and july. The nymphs of **H.detrutum** were not detected. In the premises, during the october, november and december, the nymphs of **H.a.anatolicum** were observed.

In the salivary glands of 212 **H.a.anatolicum** , 10.84% were infected. This rate in 16 **H.detrutum** was 6.25%.

It was determined that antibodies against **T.annulata** schizont and piroplasm were present during the research period in vaccinated and non-vaccinated cattle on which infected ticks were detected.

## 8. KAYNAKLAR

1. Angin, M. (1996). Elazığ Yöresi Siğirlerinde **Theileria annulata**'nın Vektörleri. Dok. Tez. Fırat Üniversitesi Sağ.Bil.Ens. Elazığ.
2. Anon. (1988-89). Annual Report, Animal Disease Research Laboratory National Dairy Devalopment Board, Anand, India.
3. Bansal, G.C. and Sharma, S.P. (1986). Efficacy of Parvaquone and Long-Acting Oxtetracycline in **Theileria annulata** İnfection. Vet. Parasitol., 21, 145-149.
4. Barnett, S.F. (1977). **Theileria**. 77-113. Ed. J.P.Kreier. Parasitic Protozoa. Vol.4, Academic Press, INC., New York.
- 5.Beutner, E.H. (1971). Defined Immunofluorescent Staining: Past Progress, Present Status, and Future Prospects for Defined Conjugates. Vol. 177, 506-526. Annals of The New York Academy of Sciences. Published by The New York Academy of Sciences.
6. Bhattacharyulu, Y. (1986). Tropical Theileriosis in India. 25-26. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis (Report of EEC. Sponsored Workshop).
7. Bhattacharyulu, Y., Chaudhri, R.P. and Gill, B.S. (1975). Transstadial Trasmision of **Theileria annulata** Trought Common İxodid Ticks Infesting Indian Cattle. Parasitol., 71:1-7.
8. Bhattacharyulu, Y., Chaudhri, R.P. and Gill, B.S. (1975) Studies on the Devalopment of **Theileria annulata** (Dschunskowsky and Luhs, 1904) in the Tick-**Hyalomma anatolicum anatolicum** (Koch,1844). Ann.Parasitol., 50, 4, 397-408.
- 9 Bouattour, A., Darghouth, M.A. and Ben Miled, L. (1994). Epidemiological İnvestigation on Tropical Theileriosis in the Subhumide

Bioclimatic Area in Tunisia: Study of the **Hyalomma**, Vector Tick in Tunisia. 3-6. Eds. R.Spooner, J.Campbell. European Union third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey.

10. Brocklesby, D.W., and Hawking, F. (1958). Growth of **Theileria annulata** and **T.parva** in Tissue Culture. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 52,5:414-420.

11. Brown, C.G.D. (1981). Application of in vitro Techiques to Vaccination Againts Theileriosis. 104-119. Eds. A.D.Irvin, M.P.Cunningham, A.S.Young. Advances in the Control of Theilriosis. Martinus Nijhoff, The Hague, London..

12. Brown, C.G.D. (1987). **Theileridae**. 230-253. Eds. In: A.E.R.Taylor and J.R.Baker. In vitro Metods for Parasite Cultivation. Academic Press, London.

13. Brown. C.G.D. (1989). Vaccination Against Tropical Theileriosis (**Theileria annulata** infection of cattle). 64-75. Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. 11-13 Ekim, Pendik Hayv. Hast. Merk. Araş. Enst. Yay. No: 10, Pendik, İstanbul.

14. Campbell, J., El-Hasnaoui, M., Ahmet, J and Spooner, R.L. (1994). An Improved Serum Antibody Test for **Theileria annulata**. 55-58. Eds. R.Spooner, J.Campbell. European Union third Coordination Meeting on Tropical Thileriosis, Antalya, Turkey.

15. akmak, A. (1990). Ankara Yöresinde Bir Sığır Sürüsünde Hemoparazitlerin İnsidensinin araştırılması. Fac. Vet. Med. Üniv. Ankara. 37 (3) 632-645.

16. akmak, A ve Öz, İ. (1993). Adana Yöresi Sığırlarında Kan Protozoonlarının Serodiagnozu, A.Ü. Vet. Fak. Derg.,40, 1:70-77.

17. Daubney, R. and Sami Said, M. (1951). Egyptian Fever of Cattle theTransmission of **Theileria annulata** (Dschunkowsky and Lush, 1904) by **Hyalomma excavatum**, Koch, 1844. Parasitol., 41, 249-260.

18. Dean, A.G., Dean, J.A., Coulombier, D., Brendel,K.A., Smith,D.C.,

Burton, A.H., Dicker, R.C., Sullivan, K.M., Fagan, R.F. and Arner, T.G. (1994). Epi-Info, Version 6 : A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, U.S.A.

19. Dhar, S. and Gautam, O.P. (1977). **Theileria annulata** Infection of Cattle, 1. Complement Fixation and Conglutinating-Complement-Obsorbition Test for Serodiagnosis. Indian J. Anim. Sci., 47, 7 :389-394.

20. Dhar, S. and Gautam, O.P (1977). **Theileria annulata** Infection of Cattle. 2. Capillarytubeagglutination Test for Serodiagnosis. Indian J. Anim. Sci., 47, 8:458-462.

21. Dhar, S. and Gautam, O.P.(1977). **Theileria annulata** Infection in Cattle. 3. Haemagglutination-Inhibition, Indirect Haemagglutination and Agar-Gel-Precipitation Tests for Serodiagnosis. Indian J. Anim. Sci., 47, 9:566-570.

22. Dhar, S.and Gautam, O.P.(1977). Indirect Fluorescent-Antibody test for Serodiagnosis in Cattle Infected with **Theileria annulata**. Indian J. Anim. Sci., 47, 11:720-723.

23. Dhar, S. and Gautam, O.P. (1977). Species Differentiation of **Theileria** of Cattle by Means of Complement-Fixation test. Indian Vet. J., 54:21-24.

24. Dinçer, Ş. (1985). Theileriosis Etkenlerinin Taksonomisi ve Morfolojisi. 5-28. Ed. F.Sayın. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No : 5, İzmir.

25. Dinçer, Ş., Sayın, F., Karaer, Z., Çakmak, A.,Friedhoff, K.T., Müller, I., İnci, A., Yukarı, B.A. ve Eren, H. (1991). Karadeniz Bölgesi Sığırlarında Bulunan Kan Parazitlerinin Sero-İnsidensi Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 38, 1-2:206-226.

26. Dumanlı, N. (1983). Elazığ ve Yöresinde **Hyalomma excavatum** (Koch, 1844)'un Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. Doga Tu. Vet. ve Hay. Derg., 7,23-31.

27. Dumanlı, N. (1987). **Theileria annulata**'nın Sebep Olduğu Sığır Theileriosisinin **Hyalomma excavatum** İle Nakli Üzerinde Deneysel Araştırmalar. Doğa Tu. Vet. ve Hay. Derg., 11,1, 14-26.

28. Dumanlı, N. (1989). Türkiye'de Tropikal Theileriosisin Vektörleri.58-61. Uluslararası Mycoplazmosis ve Theileriosis Sempozyumu. 11-13 Ekim, Pendik Hay. Hast. Merk. Arşt. Enst. Yayın no: 10, Pendik, İstanbul.

29. Dumanlı, N. ve Özer, E. (1987). Elazığ Yöresinde Sığırlarda Görülen Kan Parazitleri ve Yayılışları Üzerinde Araştırmalar. S. Ü. Vet. Fak. Derg., 3, 1, 159-166.

30. Du Toit, J.P. (1930). Theileriosis. Rept. Sect. Meeting II. Intern. Vet. Congress. 3, 1-34. (Çeviren: Mimioglu, M. Türk Vet. Hek. Derg. 116-117, 2952-2969, Ankara, 1956).

31. Eren, H., Çakmak, A. ve Yukarı, B.A. (1995). Türkiye'nin Farklı Coğrafik Bölgelerinde **Theileria annulata**'nın Sero-Prevalansı. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. , 42, 1. (Basımda).

32. Erkut, H.M. (1967). Ege Bölgesinde Sığırlarında Piroplasmosis Durumu ve Tedavide Yeni İlaçlamalar. Bornova Vet. Araş. Enst. Derg., 8, 16:120-130.

33. Flach, E.J., and Ouheili, H. (1992). The Epidemology of Tropical Theileriosis (**Theileria annulata**) in An Endemic Area of Morocco. Vet. Parasitol., 44, 51-65.

34. Fujinaga, T. and Minami, T. (1981). Indirect Fluorescent Antibody and Complement Fixation Test in the Diagnosis of Bovine Theileriosis and Babesiosis in Japan. Vet.Parasitol., 8, 115-126.

35. Gautam, O.P. and Dhar, S. (1983). Bovine Tropical Theileriosis -A Review 1. Prevalance, Transmission and Symptoms. Trop. Vet. Anim. Sci. Res., 1, 1:1-18.

36. Gill, B.S., Bhattacharyulu, Y., Kaur, D. and Singh, A. (1976).

Vaccination Against Bovine Tropical Theileriosis (**Theileria annulata**). Nature, 264, 355-356.

37. Gill, B.S., Kaur, D. and Bhattacharyulu, Y. (1974). Transmission of **Theileria annulata** Through the Tick **Hyalomma detritum** (Schulze, 1919). Bull. off. Int. Epiz., 81, 9-10: 805-811.

38. Göksu, K. (1959). Ankara ve Cıvırı Sığırlarında Theileriosis Üzerinde Sistemik Araştırmalar. Tez, Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay. No: 115/60, Yeni Matbaa, Ankara

39. Göksu, K. (1970). Yurdumuzun Çeşitli Bölgelerinde Sığırlarda Piroplazmada Enfeksiyonları (Piroplazmosis, Babesiosis, Theileriosis) ve Anaplazmosis'in Yayılış Durumları. Türk Vet. Hek. Dern. Derg., 40,4:29-39.

40. Göksu, K. (1985). Theileriosisin Klinik Semptomlarıyla İlgili Gelişmeler. 97-109. Ed. F.Sayın. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No : 5, İzmir.

41. Göksu, K. (1985). Theileriosisin teşhisi ile ilgili gelişmeler. In: Sayın, F. Theileriosis. 4. Ulusal Parazitoloji Kongresi.149-163.

42. Güler, S. (1989). Tropikal Theileriosisin Tedavisinde Kullanılan Preparatlar. 111-113. Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. 11-13 Ekim, Pendik Hayv. Hast. Merk. Araş. Enst. Yay. No: 10, Pendik, İstanbul.

43. Güler, S., Ünsüren, H. ve Karaer, Z. (1980). Sığırların Nagonal, Antrycide Pro-Salt ve Pyrimethamine Kullanarak **Theileria annulata**'dan İleri Gelen Theileriosisden Korunmaları Üzerine Araştırmalar. Fırat Üniv. Vet. Fak. Derg., 5, 1:33-42.

44. Güralp, N. (1985). Theileriosisin Sağıtımında Yeni Olanaklar. Vet. Hek. Dern. Derg., 55:52-54.

45. Hashemi-Fersharki, R. (1988). Control of **Theileria annulata** in Iran. Parasitol. Today, 4,2:36-40.

46. Hashemi-Fersharki, R. (1991). Prophylactic Effect of Schizont Tissue Culture Vaccine Againsts **Theileria annulata** Infection in Iran. 15-17. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis. Anand, India.

47. Hooshmand-Rad, P. (1975). The Growth of **Theileria annulata** Infected Cells in Suspension Culture. Trop. Anim. Hlth. Prod., 7:23-28.

48. Hooshmand-Rad, P. (1976). The Pathogenesis of Anaemia in **Theileria annulata** Infection. Res. Vet. Sci., 20: 324-329.

49. Hooshmand-Rad, P. (1977). Theileriosis in Ruminants of Iran. 12-14. Eds. J.B. Henson and M. Campbell. Theileriosis. IDRC, Ottawa.

50. Hooshmand Rad, and Hashemi Fesharki, R. (1968). The Effect of Virulence on Cultivation of **Theileria annulata** Strains in Lymphoid Cells which have been Cultured in Suspension. Arch. Inst., Razi, 20:85-89.

51. Hulliger, L., Wilde, J.K.H., Brown, C.G.D. and Turuner, L. (1964). Mode of Multiplication of **Theileria** in Cultures of Bovine Lymphocytic Cell. Nature, 203:728-730.

52. Jongejan, F. (1986). Tropikal theileriosis in Sudan. 36-37. Orientation and Coordination of Research on Tropikal Theileriosis (Report of EEC-sponsored workshop).

53. Jura, W.G.Z.O. (1986). Invasion and Intracellular Developmend of **Theileria annulata** Sporozoites in Lymphoblastoid Cell Lines Already Transformed by **T.annulata** (Hissar), **T.annulata** (Ankara) and **T.parva** (Muguga). Vet. Parasitol., 22, 202-214.

54. 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. 49-51. Eds. R. Spooner, J. Campbell. European Union third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey.

55. Kachani, M. and Spooner, R.L. (1992). Anti-lymphocyte Antibodies

Generated in Animals Immunised with **Theileria annulata**-Infected Cells. Vet. Immu. and Immunopath., 33, 163-169.

56. Kachani, M., Spooner, R.L., Rae, P., Bell-Sakyi, L., and Brown, C.G.D. (1991). Stage Specific Responses in **Theileria annulata** Evaluated Using an ELISA. 46. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis. Anand, India.

57. Karaer, Z. (1984). **Hyalomma detritum** (Schulze, 1919)'un Biyolojisi Üzerine Araştırmalar. Dağa Bilim Derg., D1, 8,2,139-148.

58. Karaer, Z. (1985). Theileriosis'in Bulaşması İle İlgili Gelişmeler. 47-76. Ed.F.Sayın. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 5, İzmir.

59. Karaer, Z. (1987). Doymuş **Hyalomma dromedarii** (Koch, 1844) Nimfinin Barsağında **Theileria annulata** (Dschunkowsky ve Luhs, 1904)'nın Gelişmesi Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 34,1:1-7.

60. Khan, S.I. (1972). Bursa Civarı Sığırlarında **Theileria annulata**'nın Vektörleri Üzerinde Araştırmalar. Dok. Tez. Şenyuva Matbaası, Ankara.

61. Levine, N.D. (1985). Veterinary Protozoology. Iowa State Universty Press, Ames.

62. McHardy, N. (1989). Multinational Research on the Use of Buparvaquon(Butalex) for the Control of Theileriosis. 114-126. Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. 11-13 Ekim, Pendik Hayv. Hast. Merk. Araş. Nnst. Yay. No: 10, Pehdik, İstanbul.

63. McHardy, N. (1991). Butalex (Buparvaquone) -A New Therapeutic for Theileriosis: With Comments on Its Value in An İntegrated Control Strategy. 133-140. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis. Anand, India.

64. Mehlhorn, H. and Schein, E. (1977). Electron Microscopic Studies of the Development of Kinetes in **Theileria annulata** Dschunkowsky and Luhs, 1904 (Sporozoa, Piroplasma). J. Protozool., 24, 2: 249-257.

65. Mimioğlu, M. (1955). Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu Vilayetlerinde 'Haematuria Vesicalis Bovis'li Siğırlarda Parazitolojik Araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 1-2:183-192.

66. Mimioğlu, M. (1977). Theileriosis in Turkey. 15-16. Eds. J.B.Henson, M.Campbell. Theileriosis. Repord of a Whorkshop Held in Nairobi, Kenya.

67. Mimioğlu, M. (1985). Theileriosisin Tarihçesi.1-4. Ed. F.Sayın. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 5, İzmir.

68. Mimioğlu, M.M., Göksu, K. ve Sayın, F. (1969). Veteriner ve Tıbbi Protozooloji. 2. Cilt, Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay., No: 248, Ankara.

69. Mimioğlu, M., Özcan, C., Keskin-tepe, H., Ulutaş, M. ve Güler, S. (1972). Siğer Theileriosisinin Yayılışı ve Tedavisi Üzerinde Araştırmalar, Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 19:471-487.

70. Mimioğlu, M., Ulutaş, M. ve Güler, S. (1971). Yurdumuz Siğrlarında Theileriosis Etkenleri ve Diğer Kan Parazitleri. Ajans - Türk Matbaacılık Sanayii, Ankara.

71. Mutuzkina, Z.P. (1975). Cultivation of **Theileria annulata** in Tissue Cultures. Veterinariya (Moscow), 4:56-57, (Ref: Vet. Bull., 45,10, 5635).

72. Nalbantoğlu, S. (1996). Çukurova Yöresinde Tropikal theileriosise Karşı Aşılanan Siğırlarda Saha Çalışmaları. Dok. Tez. Ankara Üniversitesi Sağ.Bil.Enst., Ankara.

73. Onar, E. (1989). Türkiye'de Tropical Theileriosise (**Theileria annulata**) Karşı Aşı Hazırlama ve Uygulama Çalışmaları. 47-52. Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. 11-13 Ekim, Pendik Hayv. Hast. Enst. Yay. No: 10, Pendik, İstanbul.

74. Ouhelli, H. (1986). Research on Theileriosis in Morocco.33-35. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis. (Report of EEC- Sponsored Workshop).

75. Ouhelli, H., and Flach, E. (1990). Epidemiology and Control of

Theileriosis In Morocco. 19-20. Ed. T.T. Dolan. Recent Developments in the Research and Control of **Theileria annulata**. Nairobi, Kenya.

76. Özkoç, Ü. (1977). **Theileria annulata** Suşunun Çok Düşük Derecelerde Uzun Süre Saklanabilmeleri ve Suşun Yerli Danalarda Değişik Sürelerle Attenüasyonu Üzerinde Araştırma. Pendik Vet. Bakt. Ser. Enst. Derg., 9, 1:85-92.

77. Özkoç, Ü. (1985). Theileriosiste Immünite- Aşılama ve Son Yenilikler. 114-135. Ed. F.Sayın. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No : 5, İzmir.

78. Özkoç, Ü. ve Onar, E. (1980). Yurdumuzun Değişik Yörelere İzole Edilen **Theileria annulata** Suşlarının Doku Kültürüne Adaptasyonu ve Üretilmesi. Doğa Bilim Derg., D, 4, 1:36-40.

79. Özkoç, Ü., Onar, E. ve Günay, M. (1989). Değişik Bölgelerden İzole Edilen Lokal **Theileria annulata** Suşları Arasında Yapılan Çapraz Immünite Denemeleri. 76-90. Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. 11-13 Ekim, Pendik Hayv. Hast. Merk. Araş. Enst. Yay. No: 10, Pendik, İstanbul.

80. Özkoç, Ü and Pipano, E. (1981). Trials with Cell Culture Vaccine Against Theileriosis in Turkey. 256-258. Eds. A.D.Irvin, M.P.Cunningham, A.S.Young. Advances in the Control of Theileriosis. Martinus Nijhoff, The Hague, London.

81. Özkoç, Ü., Vural, A., Onar, E. ve Pipano, E. (1978). Üç Değişik Lokal **Theileria annulata** Suşunun Doku Kültüründe İzalasyonu ve Üretilmesi. Pendik Vet. Bakt. Ser. Enst. Derg., 10, 2:31-34.

82. Pipano, E. (1965). Piroplasmosis-A Review. Refuah Vet., 22, 181-175.

83. Pipano, E. (1974). Immunological Aspects of **Theileria annulata** Infection. Bull. Off. Int. Epiz., 31, 1-2:139-159.

84. Pipano, E. (1976). Control of Theileriosis and Anaplasmosis in İsrail. Bull. Off. Int. Epiz., 86:55-59.

85. Pipano, E. (1977). Basic Principles of **Theileria annulata** Control. 55-65. Eds. J.B. Henson, M. Campbell. Theileriosis. IDRC, Ottawa.
86. Pipano, E. (1981) Schizont and Tick Stages in Immunization Against **Theileria annulata** Infection. 242-252. Eds. A.D.Irvin, M.P.Cunningham, A.S.Young. Advances in the Control of Theileriosis. Martinus Nijhoff, The Hague, London.
87. Pipano, E. (1989a). Bovine Theileriosis in Israel. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 8, 1:79-87.
88. Pipano, E. (1989b). In Vitro Cultured Hemoparasites as Immunizing Agents Against Tick Borne Diseases of Livestock. 107-110. Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. 11-13 Ekim, Pendik Hayv. Hast. Merk. Araş. Enst. Yay. No: 10, Pendik, İstanbul.
89. Pipano, E. (1990). Vaccination of Cattle Against **Theileria annulata** Using Culture-Derived Schizonts. 47-58. Ed. T.T. Dolan. Recent Developments in the Research and Control of **Theileria annulata**. Nairobi, Kenya.
90. Pipano, E. and Cahana, M. (1968). Measurement of the Immune Response to Vaccine from Tissue Cultures of **Theileria annulata** by the Fluorescent Antibody Test. J. Protozool., 15, Suppl. 45.
91. Pipano, E. and Cahana, M. (1969). A Serological Method for Assessing the Response to **Theileria annulata** Immunization. Refuah Vet. 26:148-145.
92. Pipano, E. and Cahana, M. (1969). Fluorescent Antibody Test for the Serodiagnosis of **Theileria annulata**. J. Parasitol., 55, 765.
93. Pipano, E. and Israel, V. (1971). Absence of Erythrocyte from of **T.annulata** in Calves Inoculated with Schizonts from a Virulent Field Strain Grown in Tissue Culture. J. Protozool., 37. Suppl. 18.
94. Pipano, E., Shkap,V. and Frank, M. (1989). Comparision of Three Methods for Initiating in vitro Cultures of **Theileria annulata** Schizont. Revue

Elev. Med. Vet. Pays Trop., 42, 4:529-533.

95. Pipano, E. and Tsur, I. (1966). Experimental Immunization Against **Theileria annulata** With Tissue Culture Vaccine I. Laboratory Trials. Refuah Vet., 23:194-186.

96. Raghav, P.R.S., Thakur, M., Varshney, B.C. and Singh, D.K. (1991). Antibody Titres in Dairy Animals Vaccinated With Schizontal Tissue Culture Theileriosis Vaccine. 39-44. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis. Anand, India.

97. Robinson, P.M. (1982). **Theileria annulata** and Its Transmission A Review. Trop. Anim. Health, 14, 3-12.

98. Samish, M. and Pipano, E. (1976). Transmission of **Theileria annulata** by Two and Three Host Ticks of the Genus **Hyalomma (Ixodidae)**. Proc. Int. Conf. 371-372. Ed. J.K.H.W. de Tick-Borne Diseases and Their Vectors, Edinburg.

99. Samish, M. and Pipano, E. (1978). Development of Infectivity in **Hyalomma detritum** (Schulze, 1904) Tick Infected With **Theileria annulata** (Dschunkowzky and Luhs, 1904). Parasitol., 77, 375-379.

100. Samish, M. and Pipano, E. (1983). Transmission of **Theileria annulata** (Dschunkowzky and Luhs, 1904) by **Hyalomma excavatum** (Koch, 1844). Parasitol., 86, 269, 274

101. Sangwan, A.K., Chhabra, M.B., and Samantaray, S. (1989). Relative Role of Male and Female **Hyalomma anatolicum** Ticks in **Theileria** Transmission. Vet. Parasitol., 31, 83-87.

102. Sayın, F. (1985). Theileriosisın Kontrolü. 173-175. Ed. F. Sayın. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 5, İzmir.

103. Sayın, F. (1986). Theileriosis in Turkey. 38-39. Orientation and Coordination of Research on Theileriosis, (Report of EEC-Sponsored Workshop).

104. Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H. and Brown, C.G.D. (1992). Epidemiological Study on Tropical Theileriosis Around Ankara. 263-278. Veteriner Hekimliği Öğreniminin 150. Yılı, Ankara, Türkiye.

105. Sayın, F., Dinçer, Ş., Dumanlı, N., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H., Beyazıt, A., Spooner, R.L., and Brown, C.G.D. (1994). Epidemiology of Tropical Theileriosis in Turkey. 1-2. Eds. R.Spooner, J.Campbell. European Union Third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey.

106. Sayın, F., Dumanlı, N. (1982). Elazığ Bölgesinde Evcil Hayvanlarda Görülen Kene (*Ixodidea*) Türleri ile İlgili Epizootiyolojik Araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 29,3-4, 344-362.

107. Sbanshiev, M. (1994). Theileriosis of Cattle in Kazakhstan. European Union third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey, pp. 10-12.

108. Schein, E., Mehlhorn, H. und Warnecke, M. (1977). Zur feinstruktur Der Erythrocytaren Stadien Von **Theileria annulata** (Dschunkowsky und Lush, 1904). Trop. Parasitol., 28, 349-360.

109. Schein, E., and Voigt, W.P. (1979). Chemotherapy of Bovine Theileriosis With Halofuginone. Acta Tropica, 36, 391-394.

110. Sharma, R.D. (1986). Tropikal theileriosis. 27-28. Orientation and Coordination of Research on Tropikal Theileriosis, (Report of EEC- sponsored workshop)

111. Singh, D.K. (1986). Tropikal Theileriosis in India. 29-30. Orientation and Coordination of Research on Tropikal Theileriosis, (Report of EEC-sponsored workshop).

112. Singh, D.K. (1991). Theileriosis in India. 23-28. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation ond Coordination of Research on Tropikal Theileriosis.

104. Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H. and Brown, C.G.D. (1992). Epidemiological Study on Tropical Theileriosis Around Ankara. 263-278. Veteriner Hekimliği Öğreniminin 150. Yılı, Ankara, Türkiye.

105. Sayın, F., Dinçer, Ş., Dumanlı, N., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H., Beyazıt, A., Spooner, R.L., and Brown, C.G.D. (1994). Epidemiology of Tropical Theileriosis in Turkey. 1-2. Eds. R.Spooner, J.Campbell. European Union Third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey.

106. Sayın, F., Dumanlı, N. (1982). Elazığ Bölgesinde Evcil Hayvanlarda Görülen Kene (**Ixodidea**) Türleri ile İlgili Epizootiyolojik Araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 29,3-4, 344-362.

107. Sbanshiev, M. (1994). Theileriosis of Cattle in Kazakhstan. European Union third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya, Turkey, pp. 10-12.

108. Schein, E., Mehlhorn, H. und Warnecke, M. (1977). Zur feinstruktur Der Erythrocytaren Stadien Von **Theileria annulata** (Dschunkowsky und Lush, 1904). Trop. Parasitol., 28, 349-360.

109. Schein, E., and Voigt, W.P. (1979). Chemotherapy of Bovine Theileriosis With Halofuginone. Acta Tropica, 36, 391-394.

110. Sharma, R.D. (1986). Tropikal theileriosis. 27-28. Orientation and Coordination of Research on Tropikal Theileriosis, (Report of EEC- sponsored workshop)

111. Singh, D.K. (1986). Tropikal Theileriosis in India. 29-30. Orientation and Coordination of Research on Tropikal Theileriosis, (Report of EEC-sponsored workshop).

112. Singh, D.K. (1991). Theileriosis in India. 23-28. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation ond Coordination of Research on Tropikal Theileriosis.

Anand, India.

113. Soulsby, E.J.L. (1986). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall, London.

114. Stepanova, N.I. and Zablotskii, V.T. (1989). Bovine Theileriosis in the USSR. Rev. Sci. Tech Off. Int. Epiz., 8, 1:89-92.

115. Storch, W. (1979). Immunfluoreszenzfibel. 1. Auflage, Jena, VEB Gustav, Fisher Verlag, pp. 17-43.

116. Subramanian, G.(1986). Bovine Theileriosis in India. 31-32. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis, (Report of EEC- Sponsored Workshop).

117. Taşçı, S. (1985). **Theileria** Türlerinin Biyolojisi. 29-46. Ed. F.Sayın. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 5, İzmir.

118. Tchernomoretz, I. (1945). Multiplication In Vitro of Koch Bodies of **Theileria annulata**. Nature, 256,391.

119. Tsur, I. and Adler, S. (1962). Cultivation of **Theileria annulata** Schizont In Monolayer Tissue Culture. Refuah Vet., 19:224-225.

120. Tsur, I. and Adler, S. (1965). The Cultivation of Lymphoid Cells and **Theileria annulata** Schizonts from Infected Bovin Blood. Refuah Vet., 22, 60-62.

121. Tsur, I., Adler, S., Pipano, E., and Senft, Z. (1964). Countinous Growth of **Theileria annulata** Schizont In Monolayer Tissue Culture. In: Corradetti, A. Proc. 1st Int. Cong. Parasit. Pergamon Press Rome, Vol. 1,266-267.

122. Tüzdil, A.N. (1946). **Theileria annulata**'nın (sığır theileriosisinin) Memleketimizdeki Durumu ve En Belirgin Tedavi Metodu Hakkında Rapordur. Türk Vet. Cem. Derg., 14,5:1,1-13.

123. Tüzdil A.N. (1954). Memleketimiz Sığırlarında **Theileria annulata**'dan (Dschunkowzky ve Luhs; 1904) Husule Gelen Theileriosis. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 1,2:43-58.

124. Tüzer, E. (1982). İstanbul İli ve Çevresinde Siğırlarda Görülen **Babesia**, **Theileria** ve **Anaplasma** Türleri ve Bunlardan Oluşan Enfeksiyonların Yayılışı Üzerinde Araştırma. İ.Ü. Vet.Fak.Derg.,8, 1, 97,110.

125. Uilenbeng, G. (1981). **Theileria** Species of Dmestic Livestock. 5-37. Eds. A.D.Irvin, M.D.Cunningham and A.S.Young. Advences in the Control of Theileriosis. Martinus Nijhoff, The Hague, London.

126. Ünsüren, H. (1976). **Theileria annulata**'dan İleri Gelen Theileriosisin Bazı Şemoterapötiklerle Tedavisi Üzerinde Araştırmalar.Doç. Tez. Ankara Üniv. Vet. Fak., Ankara.

127. Ünsüren, H. ve Kurtdede, A. (1988). Theileriosisin Sğıltımında Yeni Bir Preparat: Buparvaquon. Vet. Hek. Dern. Derg., 1-2,75-78.

128. Varshney, B.C., Raghav, P.R.S., Thakur, M. and Singh, D.K. (1991). Further Studies on the Live Attenuated Cell Culture Vaccine Againts Tropikal Theileriosis (**Theileria annulata** İnfection). 35-37. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation and Coordination of Research on Tropikal Theileriosis. Anand, India.

129. Vural, A., Özkoç,Ü. ve Onar, E. (1978). Memleketimizde İzole Edilmiş ve Yeni İzole Edilecek Lokal **Theileria annulata** Suşlarının Virulensinin Saptanması ve Laboratuvarda Muhafazasına İlişkin Araştırma. Pendik Vet. Bakt. Ser. Enst. Derg., 10, 1:1-11.

130. Vural, A., Pipano,E., Özkoç, Ü. ve Onar, E.(1979). Türkiye'de Theileriosis'in Kontrol Yolları. Pendik Hayv.. Hast. Merkez. Araş. Enst. Derg., 11,2:44-53.

131. Walker, A.R., Mckellar, B., Bell.,L.J. and Brown, C.G.D. (1979). Rapid Quantitative Assessment of **Theileria** İnfection in Ticks. Trop. Anim. Helth. Prod., 11, 21-26.

132. Wenshun, L. and Hong, Y. (1994). Bovine and Ovine Theileriosis in China and İts İmmune Prophlaxis. 13-17. Eds. R.spooner, J.Campbell. European

Union third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis. Antalya, Turkey.

133. Zablotsky, V.T. (1991). Specific Prevention of Bovine Theileriosis in Soviet Union. 9-10. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis. Anand, India.

134. Zhang, Z.H. (1991). **Theileria annulata** and its control in China. 11-14. Eds. D.K. Singh, B.C. Varshney. Orientation and Coordination of Research on Tropical Theileriosis. Anand, India.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Doğanşehir'de doğdum. İlkokulu Doğanşehir, ortaokulu ve liseyi Elazığ'da tamamladım. 1985 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine girerek 1990 yılında mezun oldum. 1991 yılında askerlik görevimi tamamladım. 1993-1994 Güz döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu doktora sınavını kazandım ve Veteriner Programı Parazitoloji Anabilim Dalında doktora çalışmasına başladım. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

## 10. TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen ve bana ışık tutan değerli hocam sayın Prof.Dr. Nazir DUMANLI'ya, yakın ilgilerini gördüğün sayın Prof.Dr. Sıtkı GÜLER, Sayın Prof.Dr. Erol TAŞAN ve Sayın Prof.Dr. Edip ÖZER ile diğer öğretim üye ve yardımcılara, çalışmalarımın bir bölümünü Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji Bilim Dalı'nda yürütmeme imkan veren Sayın Prof.Dr. Fahri SAYIN'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Doç.Dr. Ayşe ÇAKMAK'a, Sayın Prof.Dr. Zafer KARAER ve Sayın Prof.Dr. Şükran DİNÇER ile diğer öğretim üyesi ve yardımcılara teşekkürlerimi sunarım.