

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı

KAYSERİ YÖRESİNDEKİ SIĞIRLARDAN TOPLANMIŞ KENE
TÜRLERİNDE *BABESIA BOVIS* VE *BABESIA BIGEMINA*’NIN REAL
TIME PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Tuğba MEYİLLİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2014
KAYSERİ

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı

KAYSERİ YÖRESİNDEKİ SIĞIRLARDAN TOPLANMIŞ KENE
TÜRLERİNDE *BABESIA BOVIS* VE *BABESIA BIGEMINA*’NIN REAL
TIME PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan
Tuğba MEYİLLİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2013-4305 kodlu projeye desteklenmiştir.

Haziran 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Tuğba MEYİLLİ

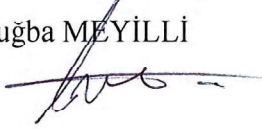
İmza : 

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kayseri Yöresindeki Sığırlardan Toplanmış Kene Türlerinde *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*’nın Real Time PCR Yöntemi ile Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

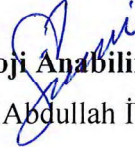
Tuğba MEYİLLİ

**Danışman**

Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

**Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Prof. Dr. Abdullah İNCİ



Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ Danışmanlığında **Vet. Hek. Tuğba MEYİLLİ** tarafından hazırlanan “**Kayseri Yöresindeki Sığırlardan Toplanmış Kene Türlerinde *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*’nın Real Time PCR Yöntemi ile Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

05/06/2014

JÜRİ**İmza**

Danışman : **Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ** (ERÜ Veteriner Fak. Parazitoloji Anabilim Dalı)

Üye : **Prof. Dr. Abdullah İNCİ** (ERÜ Veteriner Fak. Parazitoloji Anabilim Dalı)

Üye : **Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY** (ERÜ Veteriner Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında bilgi birikimiyle bana her zaman yol gösteren, ilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ'ye, her türlü bilgi birikimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Abdullah İNCİ ve Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a, tez izleme komitesi üyesi Sayın Hocalarıma ve laboratuvar çalışmalarında her zaman desteğini aldığım Öğr. Gör. Dr. Zuhale ÖNDER ve Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan yüksek lisans öğrencileri Vet. Hek. Gamze YETİŞMİŞ, Biyolog Gözde ŞAHİNGÖZ ile Biyolog Zekiye KOÇER'e ve yüksek lisans tezimi maddi yönden destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürü borç bilirim.

Tuğba MEYİLLİ
Kayseri, Haziran 2014

**KAYSERİ YÖRESİNDEKİ SIĞIRLARDAN TOPLANMIŞ KENE TÜRLERİNDE
BABESIA BOVIS VE BABESIA BIGEMINA’NIN REAL TIME PCR YÖNTEMİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Tuğba MEYİLLİ

T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2014

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

KISA ÖZET

Bu çalışma, Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış ergin ixodid kenelerden oluşturulan DNA havuzlarında *Babesia bovis* ve *B. bigemina*’nın Real Time PCR ile araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, daha önce Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından “Sığırlarda Görülen *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Vektör Kenelerde Moleküler Biyolojik Teşhisi” isim ve 2824 koduyla desteklenmiş araştırma projesi kapsamında sığırlardan toplanmış toplam 1115 ergin ixodid keneden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarının nanodrop spektrofotometre ile konsantrasyonları belirlenmiş ve moleküler analizler için optimal konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Genomik DNA ekstraktlarının *B. bovis* ve *B. bigemina* için sırasıyla msa2c ve rap-1 gen bölgelerini amplifiye eden spesifik primerlerle Sybergreen ve TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. İncelemesi yapılan 38 adet genomik DNA havuzunun 8’inde (%21,0) *B. bigemina*, 2’sinde (%5,2) *B. bovis* pozitifliği saptanmıştır. İncelenen örneklerde miks enfeksiyona rastlanmamıştır. *B. bigemina* pozitif örneklerin 4’ü *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, 1’i *Hyalomma marginatum marginatum*, 2’si *Rhipicephalus turanicus* ve 1’i *H. anatolicum anatolicum* havuzlarında saptanırken, *B. bovis* pozitif örneklerin her ikisi de *H. m. marginatum* havuzunda tespit edilmiştir. Ct (dR) değerleri *B. bovis* pozitif örneklerde ortalama 37,71, *B. bigemina* pozitif örneklerde ise 35,75 saptanmıştır. Moleküler karakterizasyon amacıyla pozitif belirlenen örneklerde *B. bovis* ve *B. bigemina* için sırasıyla msa2c ve rap-1a gen bölgelerini amplifiye eden spesifik primerler ile

konvansiyonel PCR ve nested PCR analizleri yapılmıştır. *B. bovis* pozitif izolatlarda parazitemi çok düşük olduğundan dolayı uygun DNA bant profilleri belirlenemezken, *B. bigemina* pozitif 8 örnekten ise sadece 2'sinin agaroz jel üzerinde sekans analizleri için uygun DNA bant profilleri gösterdiği saptanmıştır. Söz konusu izolatların pürifiye edildikten sonra rap-1a gen bölgesi filogenetik analizler için sekanslanmıştır. *B. bigemina* izolatlarının (BbigrapKys1-BbigrapKys2) rap-1a gen bölgesinin filogenetik analizi sonucunda kendi aralarında %100 identiklik, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında %1,0±0,5 ve Türkiye'den daha önce girilmiş izolatlarla aralarında %0,7±0,4 genetik farklılık belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kayseri yöresindeki sığırlarından toplanmış kenelerden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın varlığı ve yaygınlığı, diğer moleküler tabanlı teşhis yöntemlerine göre sensitivite ve spesifitesi oldukça yüksek olan Real Time PCR tekniği ile ortaya konmuştur. Elde edilen Ct (dR) değerlerine göre enfekte sığırlarda her iki türün de düşük parazitemiye sahip olduğu görülmüştür. Bu açıdan özellikle rezervuar hayvanların ortaya konmasında Real Time PCR'ın oldukça avantajlı ve güvenilir bir yöntem olduğu dikkati çekmiştir. Ayrıca bu çalışma, Türkiye ve dünyada *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın kenelerde Real Time PCR ile araştırıldığı ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, kene, Real Time PCR, moleküler karakterizasyon, Kayseri

INVESTIGATION OF *BABESIA BOVIS* AND *BABESIA BIGEMINA* IN TICK SPECIES COLLECTED FROM CATTLE IN KAYSERI PROVINCE BY REAL TIME PCR

Tugba MEYILLI

Erciyes University, Graduate School of Health Science

Department of Veterinary Parasitology

M. Sc. Thesis, June 2014

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Onder DUZLU

ABSTRACT

This study was carried out to investigate *Babesia bovis* and *B. bigemina* in genomic DNA pools consisted from adult ixodid ticks collected from cattle in Kayseri region by Real Time PCR and to determine the molecular characterization of the isolates. For this aim, the concentrations of the obtained DNA pools consisted from totally 1115 adult ixodid ticks collected from cattle with a previous project called “Molecular Biological Diagnosis of Cattle *Theileria* and *Babesia* species in Vector Ticks” financially supported by Erciyes University Research Fund (EUBAP-Project Number 2824) were analyzed by nanodrop spectrophotometry and optimal concentrations were prepared for the molecular analyses. Sybergreen and TaqMan probe based real time PCR analyses were carried out with *B. bovis* and *B. bigemina* specific primer pairs which amplify msa-2c and rap-1a gene regions, respectively. Totally 8 (21.0%) and 2 (5.2%) of the 38 genomic DNA pools were found to be infected with *B. bigemina* and *B. bovis*, respectively. No mix infection was detected in the examined samples. Of the *B. bigemina* positive samples four, one, two and one were determined in *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Rh. turanicus* and *H. anatolicum anatolicum* pools whereas both two positive *B. bovis* samples were detected in *H. m. marginatum* pools. The Ct (dR) values were determined as average 37.71 and 35.75 in *B. bovis* and *B. bigemina* positive samples, respectively. For the molecular analyses, conventional and nested PCR analyses were performed with *B. bovis* and *B. bigemina* specific primer pairs which amplify msa-2c and rap-1 gene regions in positive samples. It was detected that 2 of 8 for *B. bigemina* positive samples exhibited

suitable DNA band profiles in the agarose gel for sequence analyses and no *B. bovis* positive samples showed suitable DNA bands because of the weak parasitemia level. These isolates were sequenced with respect to rap-1a gene region for phylogenetical analyses after gel purification. According to the phylogenetic analyses of rap-1a gene region of *B. bigemina* isolates (BbigrapKys1-BbigrapKys2), 100.0% identity with each other and average $1,0\pm0,5\%$, and $0,7\pm0,4\%$ genetic distance were detected with some other isolates in the world and in Turkey, respectively.

In conclusion, the presence and prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina* in genomic DNA pools consisted from ticks collected from cattle from Kayseri province were exhibited by Real Time PCR, which is more sensitive and more specific than the other molecular based diagnostic techniques, in this study. According to the Ct (dR) values, it was seen that both *B. bovis* and *B. bigemina* species have low parasitemia in cattle. Real Time PCR technique was found to be quite advantageous and reliable in the diagnosis of reservoir animals. In addition, this was the first study in Turkey and in the world about the molecular investigation of *B. bovis* and *B. bigemina* in ticks by Real Time PCR.

Keywords: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, tick, Real Time PCR, molecular characterization, Kayseri

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	I
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	II
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	III
KABUL VE ONAY	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VIII
İÇİNDEKİLER	X
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	XII
 1. GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. BABESİOSIS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ.....	4
2.2. <i>BABESIA</i> TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ.....	6
2.3. <i>BABESIA</i> TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU.....	8
2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme	8
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim	9
2.4. SİĞİRLARDAKİ <i>BABESIA</i> TÜRLERİ.....	11
2.4.1. <i>Babesia bigemina</i> (Smith ve Kilborne, 1893).....	11
2.4.1.1. Yayılış ve Epidemiyoloji.....	11
2.4.1.2. Gelişme.....	13
2.4.1.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler	14
2.4.2. <i>Babesia bovis</i> (Babes 1888, Starcovici, 1893).....	15
2.4.2.1. Yayılış ve Epidemiyoloji.....	15
2.4.2.2. Gelişme.....	16
2.4.2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler	17
2.4.2.4. Zoonotik Önemi	17
2.5. BABESİOSIS'TE BAĞIŞIKLIK	17
2.5.1. Kazanılmış Bağışıklık.....	19
2.5.1.1. Humoral İmmun Yanıt	19
2.5.1.2. Hücresel İmmun Yanıt	19

2.5.2. Doğal Bağışıklık (Nonspesifik İmmun Yanıt)	21
2.6. BABESIOSIS'TE TEŞHİS	22
2.6.1. Mikroskopik Muayene.....	23
2.6.2. Serolojik Testler.....	24
2.6.3. Moleküler Teknikler	24
2.7. BABESIOSIS'TE TEDAVİ.....	26
2.8. BABESIOSIS'TE KORUNMA VE KONTROL	28
2.8.1. Kene Kontrolü.....	28
2.8.2. Premunisyon.....	28
2.8.3. Aşılama.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Genomik DNA Havuzu ve Kene Materyali.....	30
3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI	32
3.2.1. Real Time-PCR Analizleri.....	32
3.2.2. <i>B. bovis</i> Msa2c geninin amplifikasyonu	34
3.2.3. <i>B. bigemina</i> Rap-1a geninin amplifikasyonu	35
3.2.4. <i>B. bovis</i> Msa2c ve <i>B. bigemina</i> Rap-1a Genlerinin Sekansı ve Filogenetik Analizi	35
4. BULGULAR	37
4.1. Real Time-PCR Sonuçları ve Babesiosis Prevalansı	37
4.2. Sekans ve Filogenetik Analizler	40
4.3. Msa2c ve RAP-1a genlerinin amplifikasyon sonuçları.....	40
4.4. <i>B. bigemina</i> Rap-1a Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6. KAYNAKLAR	57
ETİK KURUL KARARI	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1. Türkiye'de sığırlarda babesiosis tedavisinde kullanılan ruhsatlı preparatlar	27
Tablo 3.1. Kayseri’de sığır ve barınaklardan toplanan ergin kenelerden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında türlerinin dağılımı	31
Tablo 3.2. Real Time PCR'da Kullanılan Primer ve Problar	34
Tablo 4.1. Kene türlerine göre Real Time PCR sonuçları	38
Tablo 4.2. Kayseri yöresinde kene havuzlarında belirlenen <i>B. bigemina</i> izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak ve izolasyon kaynağı	41
Tablo 4.3. Dünyadan ve Türkiye’den filogenetik kıyaslaması yapılan diğer bazı <i>B. bigemina</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler	43
Tablo 4.4. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan ve Türkiye’den diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları	44

Sayfa no

Şekil 2.1.	<i>Babesia</i> ve <i>Theileria</i> türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	7
Şekil 2.2.	<i>Babesia</i> türlerinin yaşam siklusu	10
Şekil 4.1.	Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu <i>B. bovis</i> pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri.	39
Şekil 4.2	Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu <i>B. bovis</i> pozitif örneklerin erime eğrileri	39
Şekil 4.3.	TaqMan Prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu <i>B. bigemina</i> pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri	40
Şekil 4.4.	<i>Babesia bigemina</i> rap-1a gen bölgesini amplifiye eden primerler ile Nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü.....	41
Şekil 4.5.	<i>Babesia bigemina</i> BbigrapKys1 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları.....	42
Şekil 4.6.	<i>Babesia bigemina</i> BbigrapKys2 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları.....	42
Şekil 4.7.	Kayseri <i>B. bigemina</i> izolatları ile Dünyadan ve Türkiye’den analizleri yapılan diğer bazı izolatların Rap-1 gen dizilimlerinin pairwise analizleri.....	45
Şekil 4.8.	Kayseri yöresinde sığırlardan toplanmış kenelerden oluşturulmuş DNA havuzlarında belirlenen <i>B. bigemina</i> izolatları ile Dünyadaki ve Türkiye’deki diğer bazı <i>B. bigemina</i> izolatlarının partial rap-1 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları .	48
Şekil 4.9.	Kayseri yöresinde kene havuzlarında saptanan <i>B. bigemina</i> izolatları ile GenBank’a kayıtlı diğer <i>B. bigemina</i> izolatlarının rap-1 gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları.	50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye'de hayvancılığın gelişmesini olumsuz yönde etkileyen barınak, bakım ve besleme gibi yetiştiricilik hatalarının yanında, bakteriyel, viral ve paraziter orijinli hastalıklar halen daha hüküm sürmektedir. Paraziter hastalıklar arasında coğrafi konumu itibarıyla subtropik iklim kuşağında yer alan Türkiye'de yaygın olarak görülen kene kaynaklı enfeksiyonlar büyük önem taşımaktadır. Kene kaynaklı enfeksiyonlar hayvan sağlığını tehdit etmesi, ölümlere ve verim kayıplarına sebep olması yanında, hayvanlardan insanlara taşıdığı enfeksiyon etkenleri ile insan sağlığını da ciddi ölçüde tehdit etmektedir. 2000'li yılların başında ülkemizde tespit edilen ve son dönemlerde ciddi epidemilerle seyreden Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığı insan sağlığını tehdit eden kene kaynaklı enfeksiyonların çok önemli ve ölümcül bir örneğini teşkil etmektedir.

Kene kaynaklı enfeksiyonların yayılmasında esas rol oynayan ixodid keneler Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir. Uzun yıllardır, birçok araştırmacı Türkiye'deki kene türleri ve coğrafi dağılımları üzerinde çalışmalar yürütmüşlerdir. Bu çalışmalara göre İç Anadolu bölgesinde, *Ixodes ricinus* (%0,2), *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus* (%9-42,4), *Dermacentor marginatus* (%0,5-3), *D. niveus* (%0,8-15,4), *Haemaphysalis concinna* (%3,1), *Hae. inermis* (%0,1-0,6), *Hae. numidiana* (%0,1), *Hae. otophila* (%1,7-59,8), *Hae. parva* (%0,6-20,5), *Hae. punctata* (%1,4-4,2), *Hae. sulcata* (%0,6-11,8), *Hyalomma anatolicum anatolicum* (%0,4-19,6), *H. a. excavatum* (%0,2-24,7), *H. detritum detritum* (%0,6), *H. m. marginatum* (%0,2-18,5), *Rhipicephalus bursa* (%4,5-93,1), *Rh. sanguineus* (%2,3-55,3), *Rh. turanicus*

(%4,8-52) oranlarında tespit edilmiştir. Tespit edilen bu türler arasında hayvanlarda ciddi kayıplara yol açan *Babesia* türlerinin vektörleri de bulunmaktadır (1-4).

Sığırlarda babesiosis'e özellikle *Babesia bigemina* ve *B. bovis* türleri sebep olmaktadır. Bu etkenlerden, *B. bigemina*; *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*, *B. decoloratus*, *B. annulatus* ve *Rhipicephalus evertsi*, *B. bovis* ise *B. calcaratus*, *B. microplus*, *B. geiye* ve *Ixodes ricinus* kene türleri tarafından nakledilmektedir (1-4).

Babesiosis'in epidemiyolojisinde, bölgenin iklim özellikleri, vejetasyon durumu, coğrafik konumu, bölgede bulunan vektör kene türleri, bunların mevsimsel aktiviteleri, spesifik konaklarının varlığı, kene enfestasyon ve enfeksiyon oranları, önceki yıllarda, o bölgedeki hastalıkların durumu, bunların yayılışları ve mevsimlere göre dağılımları değerlendirilmektedir. Hastalık vektör kenelerin ekolojik özelliklerinden dolayı, mevsimsel olarak seyretmektedir. Bu nedenle hastalık, bölge özelliklerine göre kenelerin aktif olduğu dönemlerde görülmektedir. Türkiye için bu dönemler özellikle ilkbahar ve yaz aylarıdır (1-4).

Kayseri, 38 derece 18 dakika ile 37 derece 45 dakika kuzey enlemleri; 36 derece 58 dakika ile 34 derece 56 dakika doğu boylamları arasında; İç Anadolu bölgesinin güneydoğusunda, Orta Kızılırmak bölümünde yer alır. Kuzeyden Yozgat, kuzeydoğudan Sivas, güneyden Adana, güneydoğudan Kahramanmaraş, batıdan Nevşehir ve güneybatıdan Niğde ileri ile çevrilmiştir. İl merkezinin deniz seviyesinden yüksekliği (rakımı) 1050 m'dir. İlin sınırları içerisinde yükseklikleri 1640 m ile 3916 m arasında değişen dağlar mevcuttur. Bu dağların en önemlisi, il merkezinin güneyinde yer alan, yıl boyu üzerinden kar eksik olmayan, Türkiye'nin önemli volkanlarından, 3916 m ile İç Anadolu'nun en yükseği Erciyes dağıdır. Kayseri'nin önemli bir bölümünü platolar, yaylalar ve ovalar oluşturmaktadır. Platoların en önemlisi, Pınarbaşı hudutlarında, dağlarla çevrili ve yüksekliği 1500-1600 m arasında değişen çok geniş bir alana sahip Uzunyayla'dır. Ovaların en önemlileri Kayseri ve Develi ovalarıdır. Kayseri Ovası, Erciyes Dağı'nın kuzeyinde, yaklaşık 890 km²'lik yüz ölçümü ile yukarı Kızılırmak bölgesinin en geniş ovalarındandır. Develi Ovası ise, Erciyes Dağının güney batısında yer alır. Yaklaşık 1000 km²'lik yüz ölçümü ile Kayseri'nin en geniş ovasıdır. Develi, Yahyalı ve Yeşilhisar ilçeleri arasında uzanan ovada, Sultan Sazlığı, Kurbağı, Deve ve Yay gölleri gibi bataklık ve gölcükler mevcuttur. Kayseri yöresi, esasen ormanlık alandan yoksundur. Bununla birlikte 75.374 hektar orman ve 60.443 hektar fundalık

arazi bulunmaktadır. Yöre, bitki çeşidi bakımından oldukça zengin olup, adını Erciyes Dağı'ndan alan endemik bitkilere sahiptir. Kayseri'de çayır ve mera alanlarının toplamı 694.028 hektardır. Çok geniş alana sahip meraların durumu çoğunlukla çok kötüdür. Bu arazilerin yönetimi düzensiz, bilgidен yoksun ve adeta kaynakların sömürülmesi şeklindedir. Dolayısıyla nitelikli çayır ve mera yok denecek kadar azdır.

Babesiosis'in epidemiyolojisinde en önemli rolü oynayan kenelerin bölgede yayılımlarının, türlerinin tespit edilmesi yanında moleküler biyolojik yöntemlerle kenelerde enfeksiyon etkenlerinin araştırılması hastalığın yöredeki durumu ve potansiyel riskleri ortaya koymak açısından büyük önem taşımaktadır. Yörede bulunan kene türlerinde sığırlarda görülen *Babesia* türlerinin varlığının araştırılması ile hem hastalığın yayılımı hakkında veriler elde edilmekte hem de kenelerin vektör potansiyelleri hakkında fikir sahibi olunmaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'den ve Dünya'dan daha önce GenBank'a girilmiş *B. bovis* ve *B. bigemina* sığır izolatlarıyla, vektör kenelerden elde edilen *B. bovis* ve *B. bigemina* izolatları arasında filogenetik olarak ne gibi farklılıkların olabileceği hipotez edilmiş ve bu hipotez doğrultusunda daha önce Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "Sığırlarda Görülen *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Vektör Kenelerde Moleküler Biyolojik Teşhisi" isim ve 2824 koduyla desteklenmiş araştırma projesi kapsamında sığırlardan toplanmış kenelerden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında *B. bovis* ve *B. bigemina* varlığının Sybergreen ve TaqMan prob tabanlı Real Time PCR tekniği ile kantitatif olarak araştırılması ve elde edilen pozitif izolatların moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BABESIOSIS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ

Babesiosis; Apicomplexa anaç altındaki *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerdeki evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda da görülen, *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir protozoer hastalıktır. Hastalıkla ilgili ilk bilgiler, 19. yüzyılın sonlarında ortaya çıkmıştır. İlk defa 1888 yılında Romanya’da, sığırlarda görülen ve hızla yayılan bir hastalığın sebebinin ne olduğunun araştırılması amacıyla Romanya Hükümeti tarafından görevlendirilen Victor Babes sığır eritrositleri içerisinde birtakım mikroorganizmler keşfetmiş ve bunların “sığır hemaglobinürisi” ile bağlantısı olduğunu ileri sürmüştür. Babes, daha sonra aynı mikroorganizmleri koyun eritrositlerinde de gözlemlemiştir. Diğer yandan Amerika Birleşik Devletleri’nde 1893’de Smith ve Kilborne “Texas Fever” olarak adlandırılan hastalıkta, eritrositler içindeki etkeni, *Pyrosoma bigeminum* olarak isimlendirmişler ve bunun bir kene tarafından nakledildiğini de keşfetmişlerdir. Aynı yıl Starcovici, bu parazitlere sırasıyla *Babesia bovis*, *B. ovis* ve *B. bigemina* isimlerini vermiştir (1, 2). Diğer yandan “Texas Fever” (babesiosis) etkeni *Pyrosoma bigeminum* (*Babesia bigemina*)’un vektör kene *Boophilus annulatus* tarafından sığırlara nakledildiğinin yayınlanmasından sonra babesiosis, dünyanın çeşitli bölgelerinde de keşfedilmiştir. Avustralya’da Dr. Sidney Hunt

babesiosis'i (bovine redwater), "Texas fever"ın identiği olarak konfirme etmiştir. Arjantin'de, 1903'te Lignieres sığır babesiosisi (Tristeza) için form A ve form C olmak üzere iki form tarif etmiş olup bunlardan birinin Smith ve Kilborne'un tanımladığına benzer şekilde büyük, diğerinin ise daha küçük intraeritrositik etkenler olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı, küçük olan etkenin, genellikle kan frotilerinde zor görülmesine karşın, böbrek ve merkezi sinir sisteminin meningeslerindeki kapillarlardan yapılan frotilerde daha kolay tespit edilebildiğini bildirmiş, 1910 yılında bu küçük organizmaları önce *Piroplasma argentina* daha sonra *Babesia argentina* olarak isimlendirmiştir. *Babesia argentina* ismi Avusturalya ile Güney ve Orta Amerika'da uzun yıllar kullanılmıştır. Bu durum 1970'li yılların ortalarına kadar sürmüş, *B. argentina* ile *B. bovis*'in aynı özelliklere sahip olduğu anlaşılmış ve isimlendirmede *B. bovis*'in kullanımının daha uygun olacağı kabul edilmiştir (1, 2). M'Fadyean ve Stockman 1911'de İngiltere'de yine sığırlarda genellikle eritrositin periferinde yer alan etkenler tespit etmişler ve bunları önce *Piroplasma divergens* daha sonra *Babesia divergens* olarak isimlendirmişlerdir (1, 2). Yine aynı araştırmacılar 1911 yılında *B. bigemina*'ya benzer büyük bir etkenin bulunduğunu bildirmişler, daha sonra Sergent ve arkadaşları 1926 yılında bu etkeni *B. major* olarak adlandırmışlardır (1, 2). Brocklesby 1976 yılında sığırlarda babesiosis etkenlerinden *B. bigemina*, *B. major*, *B. bovis* ve *B. divergens*'in önemli olduğunu bildirmiştir. Sığırlardaki *Babesia* türlerinin 1960'lı yılların sonlarında Hoyte ve 1976 yılında Brocklesby tarafından gözden geçirilmesini takiben, *B. bovis* (*B. argentina*; *B. berbara*; *B. colchica*), *B. bigemina*, *B. divergens* (*B. caucasica*; *B. occidentalis*; *B. karelica*) ve *B. major*'ün sığırlarda babesiosise yol açan başlıca türler oldukları kabul edilmiştir (3, 4).

Türkiye'de ilk babesiosis olgusu, Nicoll ve Adil Bey tarafından 1890'da sığırlarda tarif edilmiş, bunu Samuel ve Raif, İbrahim Ekrem, Lestoquard, Gören ve Yetkin, Aysoy'un çalışmaları izlemiştir. Takiben 1950- 1980 arasında mikroskopik; 1980'li yılların sonunda mikroskopik bakının yanında serolojik; 2000'li yılların başlarında ise bunlara ilave nükleik asit tabanlı moleküler araştırmalar yapılmıştır (5).

2.2. *BABESIA* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ

Babesia türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir (6).

Biota (Canlılar)

Domain: ***Eukaryota*** Chatton, 1925

Kingdom: ***Protozoa*** (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858

Subkingdom: ***Bicilialata***

İnfrakingdom: ***Alveolata*** Cavalier-Smith, 1991

Phylum: ***Myxozoa*** Cavalier-Smith ve Chao, 2004

Subphylum: ***Apicomplexa*** Levine, 1970

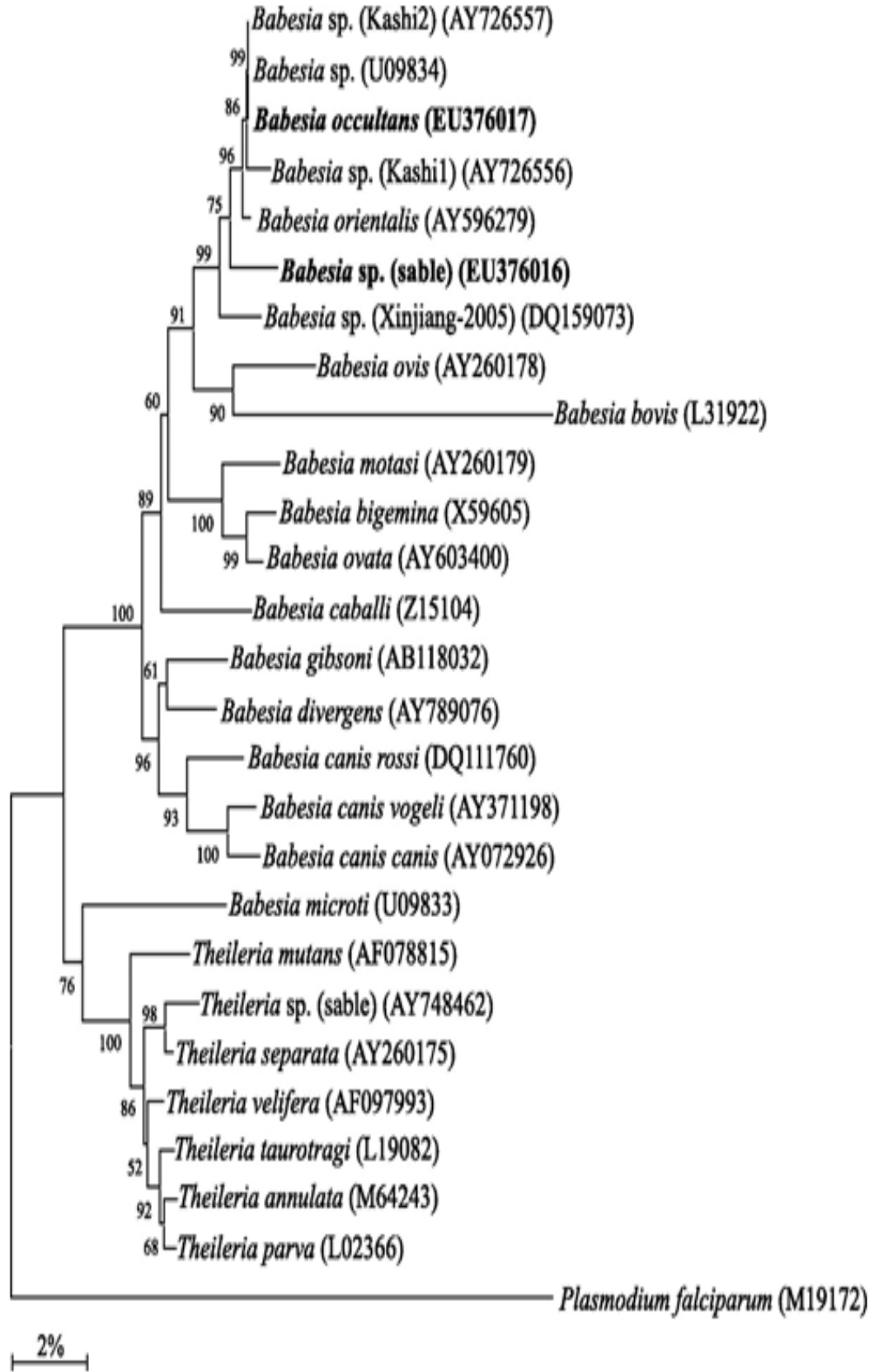
Class: ***Aconoidasida*** Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

Order: ***Piroplasmorida*** Wenyon, 1926

Family: ***Babesiidae*** Poche, 1913

Genus: ***Babesia*** Starcovici, 1893

Son yıllarda moleküler olarak *Babesia* ve *Theileria* türlerinin sınıflandırılmasında 18S rRNA gen bölgelerine göre filogenetik akrabalık dereceleri esas alınarak da sınıflandırmalar yapılmaktadır (7) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (7).

2.3. *BABESIA* TÜRLERİNİN HAYAT SIKLUSU

Babesia türleri heteroksen gelişme gösteren protozoonlardır. Bu gelişme omurgalı konaklar ile *Ixodidae* ailesine bağlı kenelerde olmak üzere iki safhada gerçekleşir. *Babesia* türlerinin yaşam döngüleri genel olarak birbirine benzemektedir. Bütün *Babesia* türleri doğal olarak enfekte kenelerin konaklarından kan emmeleriyle nakledilirler. Hayat sikluslarındaki başlıca farklılıklar, bazı *Babesia* türlerinde [gerçek (true) (=sensu stricto) *Babesia* spp.] ve gerçek olmayan (=sensu lato) *Babesia* (*B. microti*-benzeri, örn. *Theileria annae*)] transovaryal naklin varlığı ile ilgilidir (8-10).

2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme

Enfekte kene kan emmek için konağını soktuğunda sporozoitler, konağa enjekte olurlar ve doğrudan eritrositlere girerler. Bu sporozoitler ön kısımlarında polar halka, mikronemler ve roptriden oluşan apikal kompleksi ihtiva etmektedirler. *Babesia* sporozoitlerinin konak eritrositlerine giriş fenomeni, *Babesia* türlerini *Theileria* türlerinden ayırır. *Theileria* sporozoitleri, başlangıçta lenfositlere veya monositlere girerler ve orada şizogoni gelişimini tamamladıktan sonra merozoit olarak eritrositlere penetre olurlar (4). Konakta, enfekte eritrositler içerisindeki *Babesia* sporozoitleri, piroplazm (trofozoit) haline gelişirler. Trofozoitin olgunlaşması ile, sitoplazmada meydana gelen değişimler sonucunda, mikronem, roptri, subpelliküler mikrotubuller ve polar halka gibi apikal kompleks'i oluşturan yapılar tekrar meydana gelir. Olgunlaşan trofozoit, şizogoniye benzer şekilde ikiye bölünerek çoğalır (11-13). Bu bölünme sırasında parazitin yuvarlak, oval formdan, ameoboid ve armut formlarına kadar değişen şekilleri görülür ki, bunlara piroplasmik formlar da denilmektedir. Trofozoit ikiye veya dörde bölünerek kız hücreleri (merozoitler) meydana getirir. Mackenstedt ve ark. (14) *B. bigemina*'da, diploid DNA seviyesine sahip piroplaslardan farklı olarak "gamont prekürsörleri" adı verilen oval şekilli bir merozoit tanımlamışlardır. Bu gamont prekürsörleri, vektör kene tarafından alınıncaya kadar gelişmezler. Diğer yandan enfekte eritrositin parçalanması sonucu serbest kalan merozoitler, diğer sağlam eritrositlere girerek onları da enfekte ederler. Bu şekilde enfeksiyon ya konağın ölümüyle veya konağın direnç (immunité) kazanıp parazitleri temizlemesiyle sonuçlanır (15, 16) (Şekil 2.2).

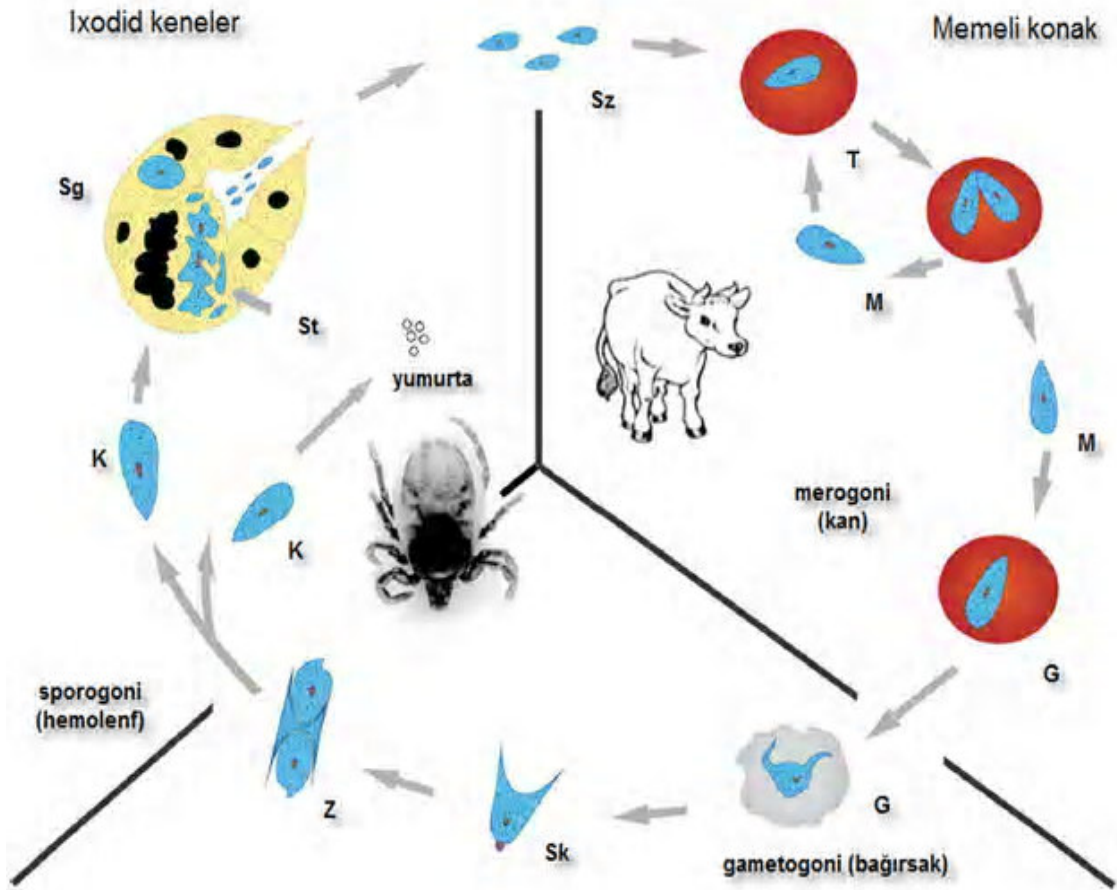
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim

Babesia türlerinin enfekte konaktan kan emen vektör kenede ve vertikal (transovarial) olarak enfekte doğan larvalarda çeşitli gelişim evreleri geçer. Vektör kenenin enfekte konağından emdiği kanın kenenin orta bağırsağına geçmesiyle değişiklikler başlar. Enfekte eritrositlerle alınan gamontlardan “strahlenkörper” adı verilen, çıkıntılı formda ışınsal-cisimciklerinin (ray-bodies) iki popülasyonu oluşur (17). Daha sonra bunlar eritrosit içerisinde çoğalmalarını sürdürür ve çoğalma, bunlar ortaya çıktıktan sonra da devam eder. Çok çekirdekli ışınsal cisimciklerin bir araya gelmesiyle büyük topluluklar oluşur. Bir kez bölünme olduğunda haploid sayıda tek çekirdekli ışınsal cisimcikler meydana gelir (14). Daha sonra bu yapıların bir çifti bir araya gelerek singami (17) yolu ile küresel hücre olarak da adlandırılan zigotu (13) oluştururlar. Oluşan zigot, kene bağırsağında tercihen sindirim hücrelerini enfekte eder. Muhtemelen burada çoğaldıktan sonra, vitellojen sentezleyen bazofilik hücrelere yerleşir. Burada daha fazla bölünmeyle hareket kabiliyetli ookinetler (vermiküller, sporokinetler) meydana gelir. Daha sonra kinetler, buradan kenenin hemolenfine göç ederler (18). *Babesia bigemina*, kene bağırsağındaki gelişiminin bazı safhalarında, haploid sayıda zigot oluşturmak için tek basamaklı bir mayoz geçirir (14, 19). Kene bağırsak hücrelerinde, poliploid kinetlerin şekillenmesiyle şizogoni oluşur (14). Bu çomak şekilli hareketli kinetler kenenin hemolenfine geçerek ovaryumlar dahil olmak üzere değişik tipte hücre ve dokuları enfekte ederler ki, buralarda sekonder şizogoninin tekrarlayan siklusları gerçekleşir. Böylece, enfekte kenenin yumurtalarıyla larval döneme transovarial nakil gerçekleşir. Bu nakil, tek konutluluk özelliğine sahip *Boophilus* gibi vektörler için olduğu kadar, *Babesia* için de önemli bir hayat siklusu adaptasyonudur.

Transovaryal yolla enfekte doğan larvalarda kinetler, tükürük bezi salgı hücrelerine girerler ve çok çekirdekli dönemlere transforme olurlar. Sporogoni yolu ile önce sporoblastlar, sonra sporoblastların parçalanmasıyla küçük, haploid sayıda sporozoitler meydana gelir (14) (Şekil 2.2).

Bütün *Babesia* türlerinde sporozoit gelişimi, her zaman enfekte kene kan emmek için omurgalı konağına tutunduğunda başlar. *Babesia bigemina*'da, sporozoitlerin gelişimi enfekte larvanın konağından kan emmesiyle başlar. Ancak enfektif sporozoitlerin ortaya çıkması yaklaşık 9 günü alır. Dolayısıyla enfektif sporozitler, sadece kenenin nimf ve ergin dönemlerinde ortaya çıkabilirler (20, 21). Nakil, larva döneminin dışında kalan

nimf dönemi ve ergin (erkek ve dişi) gelişme dönemlerinde gerçekleşebilir (22-24). Bu durum, *B. bovis*'te farklılık gösterir. *Babesia bovis*'te enfektif sporozoitlerin oluşumu, enfekte doğan larvanın konağından kan emmeye başlamasını takiben 2-3 günde gerçekleşir (25).



Şekil 2.2. *Babesia* türlerinin yaşam siklusu. *Babesia* türlerinin yaşam siklusu merogoni, gametogoni ve sporogoni evrelerinden oluşur. Enfekte kenenin kan emmesi esnasında sporozoitler (Sz) memeli konağına transfer olur. Sporozoitler daha sonra eritrositlere girer ve trofozoitlere (T) dönüşür. Trofozoitler ikiye bölünerek merozoitleri (M) meydana getirir. Bazı trofozoitler gametositlere (G) dönüşür. Gametositler vektör kenede enfeksiyonu başlatabilir. Kene bağırsağında gametositler "Strahlenkörper" (Sk) cisimciklerine dönüşür. Bu cisimcikler birleşerek zigotu (Z) oluştururlar. Zigottan da kinet (K) meydana gelir. Kinetler kene hemolenfine girer, çoğalır ve kenenin çeşitli organlarına girer. *Babesia* türleri ovaryumları enfekte edebilir ve transovaryal olarak yumurta yoluyla nakledilebilir. Kenelerin bütün yaşam evreleri (larva, nimf, olgun dişi) potansiyel enfektif olabilir. Bunun yanında *B. microti*-benzeri türler yalnızca bir yaşam evresinden diğerine transstadial olarak nakledilebilmektedir. Kinetler kenenin tükürük bezine (Sg) girdiğinde sporogoni evresi başlar. Burada parazit çok çekirdekli sporoblastlara (St) dönüşür. Sporoblastlardan yeni gelişen sporozoitler kenenin kan emmesiyle memeli konağına nakledilir (26).

2.4. SIĞIRLARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİ

Sığırlarda babesiosis'e; *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. major* türleri sebep olmaktadır. Bu türlere ilaveten *B. jakimovi*, *B. occultans* ve *B. ovate* türlerinin de sığırlarda görülebildiği bildirilmiştir (4).

2.4.1. *Babesia bigemina* (Smith ve Kilborne, 1893)

Büyük *Babesia* türlerinden olup eritrositler içerisinde armut, yuvarlak, oval veya düzensiz şekilli olup genellikle çift armut formundadır. Yuvarlak formları 2-3µ çapta, uzamış formları ise 4-5µ uzunluğundadır. Eritrositer formlarda konoid, mikroporlar ve tipik mitokondri yoktur. Buna karşın, anterior ve posterior polar halka ve tipik iki adet roptri bulunur (13, 25, 27, 28).

2.4.1.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Babesia bigemina tropik ve subtropik iklim kuşağında birçok ülkede görülmektedir. Özellikle, Afrika, Avustralya, Avrupa, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika'da yaygın olarak görülür; Amerika Birleşik Devletleri'nde ise eradike edilmiştir.

Türkiye'de ilk olarak 1890'da Nicole ve Adilbey tarafından mikroskopik tarifi yapılan *B. bigemina*'nın yol açtığı sığır babesiosis'i çalışmaları; İbrahim Ekrem (29), Lestoquard (30), Gören ve Yetkin (31), Aysoy (32), Mimioğlu (33), Kurtpınar (34)'ın araştırmaları ile devam etmiştir. Mimioğlu (33) Karadeniz Bölgesi'nde mikroskopik bakısını yaptığı 70 sığırın 5'inde, Göksu (35) Ankara civarında 996 sığırın 6'sında ve takiben Özcan (36) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 194 sığırın 2'sinde *B. bigemina*'yı pozitif bulmuşlardır. Diğer yandan Erkut (37) Ege Bölgesi'nde incelediği 141 sığırın 7'sinde piroplasmosis görüldüğünü; Göksu (38) Karadeniz Bölgesi'nin bazı illerinde 37'si babesiosisten şüpheli, 43'ü sağlıklı toplam 80 sığırın 3'ünde, yine aynı araştırmacının Doğu Anadolu sığırları (39) ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında (40) Ege ve Marmara Bölgelerinde *B. bigemina*'nın bulunduğu rapor edilmiştir. Takiben Hoffman ve ark. (41) Türkiye'nin Asya bölümünde sığırlarda piroplasmosis vakalarının yaygın olduğunu ve muayenesi yapılan sığırların %3,5'inde hastalığın *B. bigemina*'dan kaynaklandığını; Mimioğlu ve ark. (42) Türkiye'de *B. bigemina*'nın diğer *Babesia* türlerine göre daha yaygın olduğunu ileri sürmüştür.

Türkiye’de sığır ve koyunlarda görülen anaplozmozis, piroplazmozis ve theileriosis olguları uluslararası epizootiyoloji bülteninde yer aldıktan sonra mikroskopik olarak *B. bigemina*; İstanbul ve çevresinde piroplazmozis semptomu gösteren 112 sığırın 13’ünde (43), Elazığ yöresinde 69 piroplazmozis şüpheli sığırın 4’ünde (44), Ankara’nın Beytepe köyünde 185 sığırın 3’ünde (45) görülmüştür. Öte yandan *B. bigemina*’nın Van Bölgesi sığırlarında bulunduğu (46), Karadeniz Bölgesi’nde 76 sığırın 72’sinde *Babesia* sp. saptandığı rapor edilmiştir (47). Aynı dönemde Ankara’nın Çubuk ilçesinde *B. bigemina*’nın mikroskopik insidensi %18,8 olarak bulunmuştur (48). Diğer yandan *B. bigemina*’nın mikroskopik prevalansı, Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1 arasında (49), Samsun yöresi sığırlarında %32,21 (50); Kayseri yöresinde %6,8 (51) olarak rapor edilmiştir. Takiben *Babesia* spp. prevalansı, Konya yöresinde %11,46 (52), Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde %0,6-1,4 arasında (53), Adana yöresinde ise %31,8 (54) oranında bildirilmiştir. Diğer yandan Konya’da Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 11 günlük bir buzağıda *B. bigemina*’dan ileri gelen akut babesiosis olgusu tespit edilmiştir (55).

Türkiye’de sığırlarda babesiosis’in serolojik teşhisi, IFAT ile seroinsidens şeklinde ilk kez Ankara’da yapılmış ve 185 sığırın 9’unda *B. bigemina*’ya karşı antikor saptanmıştır (56). Takiben bir kısım araştırmacı (45, 47, 48, 51-53, 57-63) IFAT ile *B. bigemina*’ya karşı antikor araştırmıştır.

Sığırlarda babesiosis’in seroinsidensi üzerine yapılan çalışmalarda *B. bigemina*; Karadeniz Bölgesi’nde 76 sığırın 47’sinde (%61,84) (47), Ankara’nın Çubuk ilçesinde ise %100 bulunmuştur (48). Takiben *B. bigemina* seropozitifliği; Ankara civarında %49 (58), %80 (59), %7,3 (62) ve %8,8 (61); Adana yöresinde %55 (64) ve %75 (60); Elazığ’da %31,9, Malatya’da %7,1 ve Tunceli’de %7,3 (53); Konya yöresinde %53,07 (52); Kayseri yöresinde %23,03 (51) ve Antakya yöresinde %0,9 (63) olarak bildirilmiştir. Türkiye genelinde *B. bigemina* seropozitifliği, Karadeniz Bölgesi’nde %61,8, Doğu Anadolu Bölgesi’nde %42,9, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde %48,8, Akdeniz Bölgesi’nde %50,8, Marmara Bölgesi’nde %48,9 ve Ege Bölgesi’nde %68,5 olarak rapor edilmiştir (59). Öte yandan Türkiye’de sığır babesiosis’inin mevsimsel seroinsidensi ve hastalık insidensi, ilk kez Çukurova bölgesinde araştırılmış ve yapılan seroepidemiolojik yoklamayla mevsimsel seroinsidens *B. bigemina* için 0,600, hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (60).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, hastalık etkenlerinin DNA'sını ortaya koymaya yönelik moleküler yöntemler (PCR, RLB vb.) ortaya çıkmış ve kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde bu yöntemler, hastalık etkenlerinin teşhisinde tercih edilir olmuşlardır. Bu gelişmelere paralel olarak, revers line blotting (RLB) tekniği geliştirilmiş ve ilk defa aynı kenede bulunabilen 4 *Borrelia* türünün ayrılması için kullanılmıştır (65). Bu test PCR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Teknik, birçok etkenin aynı anda birçok prob ile karşılaştırılmasına olanak sağladığından, oldukça pratik ve kullanışlıdır. Nitekim Gubbels ve ark. (66) bu tekniği sığırlardaki, Schnittger ve ark. (67) ise koyun ve keçilerdeki *Theileria* ve *Babesia* türlerinin eş zamanlı teşhisinde kullanmışlardır.

Türkiye'de PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (68) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bulunmuştur. Bunu takiben Türkiye'de ilk defa RLB ile yapılan çalışmada, Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır (62). Kayseri yöresinde sığırlarda *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %0,6 (69) ve yine Kayseri'de sığır barınaklarından toplanan kenelerde Türkiye'de ilk defa RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %14 olarak tespit edilmiştir (70). Diğer yandan Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bigemina* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (71, 72). Ayrıca Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonucu *Babesia* sp. saptanmış ve bu suş *Babesia* sp. (*Kayseri 1*) olarak Genbanka kayıt ettirilmiştir (70). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sığırlar üzerinde yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında tespit edilmiştir (73).

2.4.1.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus*, *B. microplus*, *B. australis*, *B. calcaratus*, *B. decoloratus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. evertsi*, *R. bursa* keneleri yapmaktadır (13, 27, 28). Türkiye'de *B. annulatus*, *Hae. punctata* ve *R. bursa* türleri bulunmaktadır. Bu türün gelişim safhaları, genel kısımda anlatıldığı gibidir. İntrauterin bulaşma görülebilir ancak bu, hastalığın epidemiyolojisinde önemli olacak seviyede değildir.

2.4.1.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Babesiosis'de klinik belirtiler etkenin vektör kene tarafından konaklara verilmesini takiben 9-12 gün içerisinde ortaya çıkar. Hasta hayvanlarda klinik belirtiler farklılık gösterebilmektedir. Bunun sebebi olarak da farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bigemina* izolatlarının patojenitelerindeki farklılıklar gösterilebilir. Yapılan bir çalışmada; Avustralya'daki sığırlarda tespit edilen *B. bigemina* suşunun hayvanlarda nadiren enfeksiyona sebep olduğu, buna karşın Afrika'da tespit edilen suşun ise çok daha patojenik olduğu rapor edilmiştir (74). Babesiosis'li hayvanlardaki ilk klinik semptom eritrositlerdeki yıkımlara bağlı olarak ortaya çıkan ve 41,5-42 °C'ye ulaşan yüksek ateştir. Hayvanlarda anoreksi ve ruminal atoni görülür. Tedirginlik, gölgelik alanlara sığınmaya çalışma ve sürekli yerde yatma isteği hasta hayvanlarda gözle görülebilen ilk şüphe uyandırıcı gözlemlerdir. Hayvanlar bulundukları yerde kendi etraflarında kavis çizerler, tüyleri karışmış ve kabarmış olup nefes alışverişlerinde güçlük ve taşikardi görülür. Başlangıçta müköz membranlar kırmızıdır fakat eritrositik yıkımı takiben anemiye bağlı müköz membranlarda soluklaşma oluşur. Anemi çok hızlı bir şekilde meydana gelir ve yaklaşık olarak eritrositlerin %75'i birkaç gün içerisinde yıkımlanır. Buna bağlı olarak da hemoglobinüri ve hemoglobinemide şekillenir. Hemoglobininüri, çoğunlukla olmasına karşın bazı olgularda görülmeyebilir. Hasta hayvanlarda kilo kaybı ve süt veriminde azalmalar görülür. Hemoglobininüriyi takiben ikterus ortaya çıkar. Kan suludur. Akut olgularda, 4-8 gün içinde ölüm görülür. Tedavi edilmeyen hayvanlarda mortalite, %50-90 arasında değişir. Kronik durumlarda ise ateş çok yüksek değildir ve genellikle hemoglobininüri görülmez (27, 75-77).

Akut babesiosis'de konağın plazma bileşiminde değişimler olur. Kinin ve aktif kallikrein düzeyi artar, kininojen seviyesi azalır. Bunlara bağlı olarak damarlarda dilatasyon, kan akışında yavaşlama, kılcal damar duvarlarında bozulmalar olur ve damar duvarlarının geçirgenliği artar. Konglutinin ve fibronektin düzeylerinin azalması sonucu eritrositlerde kümelenme ve kapiller damarlarda tıkanmalar şekillenir. Fibrinojen ile ilgili ürünler artar, plazminojen azalır ve buna bağlı olarak koagülasyon bozuklukları ve eritrosit birikimi görülür. Bu tip patogenez, daha çok parazitli eritrositlerin kümelenerek damarları tıkadığı *B. bovis*'de görülür (28, 76). Bu kapiller blokajın olmadığı *B. bigemina* ve *B. divergens* enfeksiyonlarında ise en önemli patolojik etki, eritrosit hasarıdır (78). Kinin ve benzeri maddelerin eritrosit yüzeyinin ozmotik geçirgenliğini

bozmasıyla eritrositler kolayca lize olur (19). Bunun yanında şiddetli patogenezis; kısmen immunité, özellikle genç danaların dirençli olmasında etkili olan ve birçok hücre içi patojene karşı koruyucu immunitéde rol oynayan interferon gama (IFN- γ), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve nitrik oksit (NO)'i içeren mediatörlerle ilgilidir (79).

Patogenezinin temeli, eritrositlerdeki devamlı ve şiddetli parazitemi sonucu meydana gelen anemi ve anemik anoksidir. Anemi rejeneratif tipte olup, kan tablosuna bakıldığında retikülositler ve çekirdekli eritrositler görülür. Meydana gelen vazodilatasyon ve azalan kan dolaşımı sebebiyle, non-spesifik genel bir yangı tablosu oluşur (76, 78, 80). Azalan kan dolaşım hızı sebebiyle, bazı hayati organlarda anoksi meydana gelir ve parazitin toksik ürünleri ya da organlardan kaynaklanan metabolik ürünlerle genel bir organ tahribatı oluşur. Retiküloendotelyal sistem hücrelerinin özellikle de histiyositlerin; ölü, anormal eritrositleri ve çözünmüş fibrini uzaklaştırması yanında enfekte eritrositleri uzaklaştırmada da rolü vardır. Histiyositler, dalak ve lenf nodüllerinin sinüsleri ile karaciğerin sinüzoidlerini doldurarak bu organlarda hipertrofi ve hiperplazilere yol açarlar. Dalak ve lenf yumruları, ödem ve hemoglobineye bağlı olarak büyümüş ve siyah renklidir. Hemolitik olaylara oldukça duyarlı olan böbreklerde, glomeruluslar ve renal tubuller hemoglobin ile doludur. Normal şartlarda renal tubullerden geri emilebilen hemoglobin, miktarın fazla olduğu durumlarda emilemeyerek idrara geçer. Böbrekteki hasar, hemolizin şiddetine bağlıdır. Akut olaylarda, böbrek büyümüş ve siyah renklidir. İdrar kesesi, kırmızı renkli idrarla doludur. Koagülasyon mekanizmasında meydana gelen bozukluklar da hastalığın patogenezinde önemlidir (19, 78).

2.4.2. *Babesia bovis* (Babes 1888, Starcovici, 1893)

Küçük *Babesia* türlerindendir. Eritrositler içerisindeki merozoitler; armut, yuvarlak veya düzensiz şekillidirler. Vakuollü taşlı yüzük formları bu tür de yaygın olarak görülür. *Babesia bovis* merozoitleri, 1,5-2,4 μ m büyüklüğünde olup genellikle eritrositlerin ortasına yerleşirler (13, 25, 28).

2.4.2.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada dışında tüm dünyada görülen bu tür, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya'da yaygın olarak görülmektedir. Güney Amerika'da *B. bigemina*'dan daha büyük önem taşımaktadır.

Türkiye’de *B. bovis*, ilk kez Mimioğlu (33) tarafından Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde sığırlarda “*Haemataurai vesicalis bovis*” araştırması ile gündeme gelmiş; Göksu (35) Ankara’da incelediği 996 sığırın 2’sinde, takiben aynı araştırmacı (38) bazı Karadeniz illerinde mikroskopik bakısı yapılan 80 sığırın 3’ünde *B. bovis*’i bulmuştur. Göksu (40) Türkiye’nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında *B. bovis*’in Marmara ve Güney Doğu Anadolu’da görüldüğünü; Mimioğlu ve ark. (42) *B. bovis* (*Babesia berbera*) Karadeniz bölgesinde daha fazla bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Öte yandan mikroskopik bakıyla, Elazığ yöresinde iç organlarından froti yapılan 4 sığırın 1’inde (44) ve Ankara’da 185 sığırın 1’inde (56) *B. bovis* saptanmıştır. *Babesia bovis*’in mikroskopik pozitifliği; Marmara bölgesinde %34,8 (43), Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1,5 arasında (49); Samsun yöresinde %29,53 (50), Kayseri yöresinde %1,04 (51) bulunmuş ve mikroskopik insidensi Ankara’nın Çubuk ilçesinde %9 olarak saptanmıştır (81).

Babesia bovis seroinsidensi; IFAT ile Ankara’nın Beytepe köyünde 185 sığırın 18’inde (45, 56), Ankara yöresinde 46 sığırın 22’sinde (57), Karadeniz bölgesinde 76 sığırın 34’ünde (%44,73) (47), Ankara’nın Çubuk ilçesinde %59 (81) bulunmuştur. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis’inin mevsimsel seroinsidensi *B. bovis* için 0,292 ve hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (60). *Babesia bovis* seropozitifliği; Türkiye genelinde ELISA ile %51,2 (82); IFAT ile Ankara civarında %10,4 (58), %41,6 (59), %1,3 (62) ve %2,4 (61); Elazığ’da %1,4 ve Tunceli’de %0,6 (53); Kayseri yöresinde %1,04 (51); Doğu Anadolu’da %5,6, Güneydoğu Anadolu’da %6,4, Akdeniz’de %31,6, Ege’de %51,4 ve Marmara’da %41,8 (59) olarak saptanmıştır.

Diğer yandan Türkiye’de *B. bovis*’in moleküler prevalansı; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (68); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (62), Trakya bölgesinde %1,3 (83) olarak saptanmıştır. Diğer yandan Türkiye’nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bovis* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (71, 72).

2.4.2.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus calcaratus*, *B. microplus*, *B. australis*, *Rhipicephalus bursa* ve *Ixodes persulcatus* keneleri yapmaktadır (13, 25, 28). Türkiye’de *R. bursa* türü bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Babesia bigemina ile benzerdir. İnkübasyon periyodu 2-10 gündür. Yüksek ateş 2-3 gün sürer. *Babesia bigemina*'ya göre daha patojen bir türdür. Anemi, ikterus ve ishal görülür. *Babesia bigemina*'dan farklı olarak hemoglobiniüri ve hemoglobinemi oluşabilir fakat her zaman görülmeyebilir. Koagülasyon mekanizmasındaki bozukluklara bağlı klinik belirtiler, *B. bigemina*'dan daha şiddetlidir. Özellikle kapillar damarlarda görülen stazis ve tıkanmalar daha yaygındır. Bu lezyonlar, özellikle beyin kapillarlarında yaygın olarak görülür. Hastalığın akut formunda, hipertansif şok tablosu görülür. Ölüm *B. bigemina*'ya göre daha yaygındır. *Babesia bigemina* ile enfekte hayvanlarda ölüm genellikle hemotokrit değer %10'nun altına düştüğünde görülürken, *B. bovis* ile enfekte hayvanlarda bu oran %12 veya daha yüksek iken ölümler görülür (23, 74).

2.4.2.4. Zoonotik Önemi

Splenektomili insanlarda, bu türe bağlı babesiosis vakaları rapor edilmiştir (26, 84).

2.5. BABESIOSIS'TE BAĞIŞIKLIK

Babesiosis'e karşı immunitede, hem sıvısal (humoral) ve hem de hücrel (cellular) faktörler görev alırlar. Parazite konaklık yapan bütün memelilerde ya enfeksiyona maruz kalıp iyileştikten ya da profilaktik bir immunizasyondan sonra (aşılama gibi) *Babesia* türlerine karşı immunité gelişebilir (85, 86). Bununla birlikte bazı *Babesia* türleri, sığırlar için immun baskılayıcıdır. Örneğin, *B. bovis* ile enfekte sığırlarda vektör kene *Boophilus microplus* daha iyi kan emebilir. Böylece enfekte sığırlar, enfekte olmayanlara göre daha fazla kene taşır ve dolayısıyla *B. bovis*' in naklindeki etkinlikleri de artar (87). Diğer yandan *Trypanosoma* türlerinde sıklıkla görülen yüzey antijenlerindeki varyasyon, *Babesia* türlerinde de görülür (88, 89). *Babesia* türleri, hayat sikluslarının ilk basamağı olan eritrositlere invazyon aşamasında, konak hücrelerine tutunmak için yüzey kısımlarında bulunan antijenleri kullanır. Bu yüzey antijenlerine karşı meydana gelen antikorlar ise parazitin konak eritrositlerine girişine engel olur (90). *Babesia bovis*, VMSA ailesine bağlı beş [(*msa-1*, *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b* ve *msa-2c*)]; *B. bigemina* iki (*gp45* ve *gp55*); her iki *Babesia* türü ise ortak bir [rhoptry-associated protein-1 (*rap-1a*, *rap1b*, *rap-1c*)] protein ihtiva eder. Bunların dışında *B. divergens*'de *Bd37*, *B. canis*'de *Bc28* (91, 92) ve *B. gibsoni*'de *P50* (93, 94) genleri bulunur. Merozoit yüzey antijeni tespiti için yapılan tüm çalışmalar aşı geliştirilmesine yöneliktir. Keneler, akarisitlere karşı direnç gösterdiklerinden ilaçlama ile yeterli başarı

sağlanamaz (95). Bu yüzden babesiosis'e karşı mücadelede aşılama çalışmaları, çok büyük önem kazanmıştır. Bununla birlikte apicomplexan parazitlerden *Babesia*, *Theileria* ve *Plasmodium* gibi patojenlere karşı etkili rekombinant aşıların geliştirilmesi oldukça zordur. Babesial patojenlerin genomik sekansları, yeni aşı antijenlerinin hızlı identifikasyonuna yardımcı olur. Bu amaçla saha ve laboratuvar çalışmaları yapılmıştır (96-98). Diğer taraftan babesiosis tedavisi gören (örneğin imidocarb dipropionate ile) sığırlarda, aynı parazitin homolog suşlarına karşı yıllarca süren direnç görülürken, heterolog suşlara karşı korunmada enfeksiyon zorunludur (87, 99). *Babesia* taşıyıcı hayvanların dalağının çıkarılması, hastalığın klinik görülmesi ile sonuçlanır. Bu hastalıkta dalak, sadece antikör üretmez, enfekte olmuş eritrositleri de yok eder (100, 101).

Babesiosis'e karşı dirençte, genetik (örneğin, *B. bigemina*'ya karşı *Bos indicus*, *Bos taurus* sığırlarına göre daha dirençli) (98) ve yaş (80, 102) gibi birçok faktör etkilidir. Yaş direnci antikordan bağımsızdır (19, 103,104). Genç danalarda, interleukin 18 (IL-18) ve IL-12 veya *B. bovis* tarafından stimule olmuş ve IL-12 ihtiva eden makrofajları içeren süpernatantlar vasıtasıyla uyarılan splenik doğal öldürücü (NK) hücreler, IFN- γ 'yı üretirler (105-107). *Babesia bovis*'e karşı oluşan erken immun yanıtta, IL-12 aracılığıyla NK'lerin uyarılması ve bu hücreler tarafından üretilen IFN- γ ile makrofajların aktive olması, bunların NO üretimi, NO'nun da hücre içi paraziti öldürmesi enfeksiyonu engeller. Böylece kazanılmış immunité gelişir (108-110). Öte yandan babesiosis'e karşı immunitéde, patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs) olarak adlandırılan motifleri tanıyan ve bunlarla bağlanabilen, doğal immunitenin uyarılmasını ve takiben kazanılmış yanıtın başlatılmasını sağlayan Toll-like reseptörler (TLR)'den TLR9 ve TLR11 sorumludurlar (111,112).

Hem sıvısal ve hem de hücrel faktörler babesiosise karşı bağışıklıkta önemli rol oynar (113). Başlangıçta immun sistem, etkili bir "primed" (güçlü immun aktivasyon) kazanır (101). Enfeksiyon konağa bulaştırıldığında sporozoitler, kısa bir müddet dolaşımda plazma içerisinde serbesttirler. Bu aşamada, immunoglobulin G (IgG), sporozoitlerin hedef hücrelere girmesinden önce onlara bağlanıp nötralize ederek enfeksiyonu engelleyebilir. Sporozoitler eritrositlere girdikten sonra ise yeni bir dönem başlar. Bu evrede parazitemi yükselir ve akut babesiosis görülebilir. Doğal immun sistem hücreleri, parazitin gelişme hızını kontrol ederek paraziteminin süresini belirler.

Makrofajların ve NK hücrelerin yokluğunda, kısa süre içerisinde yüksek bir parazitemi gelişir. Paraziteminin engellenmesi, çözünebilir faktörlerin üretimiyle gerçekleşir. Bu faktörler; NK hücreler tarafından salınan IFN- γ ve makrofajlar tarafından üretilen TNF- α , NO ve reaktif oksijen türleri (ROSs)'dir. Parazitemideki düşme, parazitlerin dejenerasyonu ve bunların dalak tarafından temizlenmesi ile sağlanır. Bu sırada enfeksiyon çözülme evresine girer ve hastalık şiddetliden sakin döneme geçer. Hastalığın gerileme evresinde, parazitlerin ölümü için T lenfositleri, özellikle de CD4+ (Cluster Designation 4+) ve IFN- γ subpopulasyonları gereklidir (113).

2.5.1.Kazanılmış Bağışıklık

2.5.1.1. Humoral İmmun Yanıt

Babesia enfeksiyonlarında humoral bağışıklığın önemi sınırlıdır (113). Antikorların plazmada serbest haldeki parazitler üzerine olan etkileri, eritrosit içerisindeki parazitlere göre daha fazladır. Bu yüzden, antikorların koruyucu rolleri, parazitlerin kan dolaşımına ulaştıkları zaman ile hedef hücrelere girdikleri zaman arasında geçen süreyle sınırlıdır. Bu evrede IgG'ler sporozoitlere bağlanarak hedef hücrelere girmelerini engellerler. Sporozoitlerin eritrositlere penetrasyonu, alternatif komplement sistemin aktivasyonunu sağlarken, eritrositlerdeki *Babesia* antijenleri de antikor üretimini teşvik ederler. Antikorlar, eritrositleri opsonize ederek fagositik hücreler (dalak orijinli makrofajlar) tarafından yok edilmelerini kolaylaştırır (114). Fagositoz, başlangıçta nonspesifikken ileri dönemde opsonizasyona bağlı olarak spesifik hale geçer (115,116). *Babesia* türleri, humoral immün yanıtı alt edebilir ve onu kendi yararına göre değiştirebilirler. *Babesia bigemina* enfeksiyonunda, konak eritrosit yüzeyinde bulunan bir parazit proteini IgM'yi bağlar ve bu bağlanma parazitin gelişmesi ve hayatta kalmasında yararlı olur (117). Komplement sistem ile olan ilişkilerde de benzer bir taktik söz konusudur. Komplement ile *Babesia* türlerinin lize edildiği tespit edilememişse de *B. rodhaini*'nin eritrositlere invazyonunda, komplement sistemin çeşitli unsurlarının esas olduğu görülmüştür (118). Ayrıca *B. rodhaini* merozoitlerinin fagositozisini artırmak için komplement kullanılan bir çalışmada komplementin, umulmadık şekilde patojenin fagositozisini inhibe ettiği görülmüştür (119).

2.5.1.2. Hücresel İmmun Yanıt

Babesiosis'e karşı dirençte hücresel immunitenin rolü (113), konağın savunma

sisteminde dalağın öneminin fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır (100). Dalak; T, B ve NK hücreleri ile makrofajların yer aldığı büyük bir lenfoid organdır. Bu hücre popülasyonlarının bazıları koruyucu etkiden sorumludurlar. Bağışık hayvanların dalak hücrelerinin, *Babesia* ile enfekte farelere transfer edilmesiyle fareleri enfeksiyona karşı korumak mümkündür (120). Bundan başka, iyi seviyelerdeki korumanın lenf yumrusu hücreleriyle değil de, özellikle dalak hücreleri tarafından sağlanması, sistemik olarak antijenlerin muhtemelen perifer lenf yumruları yerine tercihen dalağa yönlendirildiğini yansıtır (121). T hücrelerinin spesifik rolü, timus-yetersiz hayvanlar kullanılarak araştırılmıştır. Timussuz farelerin *B. microti* ile konjenital enfeksiyonunda, yüksek inatçı bir parazitemiye karşılık normal farelerde geçici parazitemi saptanmıştır (122,123). Bu veriler, T hücrelerin babesiosis'e karşı dirençte kritik öneme sahip olduğunu ve ayrıca enfeksiyonun çözülme döneminde de T hücre aracılı mekanizmaların rol aldığını gösterir (121). Keza T hücreleri, öldürücü *Babesia* türlerine karşı korunmadan da sorumludurlar. *Babesia rodhaini*'ye karşı bağışık farelerde, antitimusit serum verildiğinde parazitemide yükselme ve yüksek mortalite görülür (123). Öte yandan immun hayvanlardan elde edilen saflaştırılmış T lenfositlerinin enfeksiyonla karşılaşmamış (naive) farelere nakli, *B. microti*'ye karşı immunité oluşturmada (121); immun yetersiz farelere immun timusitlerin edinsel transferi ise *B. microti* enfeksiyonunu ortadan kaldırma kabiliyeti kazandırmada yeterlidir (124). *Babesia microti* antijenleri, T hücrelerinin spesifik aktivasyonunu tetikleyebilir. Serbest merozoitlerde olduğu gibi enfekte eritrositler de, fareleri gecikmiş hipersensitiviteye duyarlı hale getirirler (125). CD4+ T hücreleri azalmış farelerin, *B. microti* enfeksiyonuna karşı normal farelerden daha duyarlı oldukları; CD8+ sitotoksik T'lerin azaldığı farelerde ise bu duyarlılığın artmadığı, tersine azaldığı ve bu yüzden *B. microti* enfeksiyonuna karşı korumada başlıca sorumlu subpopülasyonun CD4+ T hücreler olduğu ileri sürülmektedir (126,127). Buna karşın A.B.D.'de hasta bir insandan izole edilen (128), patojenitesi ve öldürme gücü (%100) itibarıyla *B. bovis*'e iyi bir model kabul edilen WA1 *Babesia* suşu ile farelerde oluşturulan enfeksiyon, CD8+ T hücrelerince üretilen IFN- γ ve $\gamma\delta$ T hücrelerince üretilen TNF- α ile karakterize bulunmuştur (129). Öte yandan TNF reseptör yetersiz farelerde WA1 *Babesia* enfeksiyonunun daha hafif seyrettiği ve farelerin %90'nın hayatta kaldığı gözlenmiştir. Takiben genetiği değiştirilmiş farelerde (knockout mice) yapılan deneyde, akut WA1 *Babesia* enfeksiyonu gözlenmiş; IL-12, IFN- γ ve NO'nin koruyucu rol üstlendikleri; bu

enfeksiyonda ne B hücreleri ne de CD4+ T hücreleri immuniteye katkı sağlamazken, NK hücreler ve makrofajlar önemli bulunmuştur. Bu veriler, WA1 *Babesia* suşuna karşı doğal immunitenin, kazanılmış bağışıklığın gelişimi ve enfeksiyonun kontrolünde kritik öneme sahip olan IL-12 ve IFN- γ aracılığı ile makrofaj aktivasyonunu ve NO üretimini kapsadığını gösterir (130).

Genelde immun hücre aktivasyonunun babesiosis'e karşı koruyucu olduğunun görülmesine karşın, bazı güçlü immun hücre populasyonlarının hastalığın patogenezesinde de görev alma olasılığı vardır. Bu olasılık, öldürücü *B. rodhaini* suşu ile challenge edilen immun sistemi baskılanmış farelerin, tedavi edilmeyen immun yeterli (immunocompetent) farelere göre hayatta daha fazla kalmalarıyla desteklenmiştir (131).

2.5.2. Doğal Bağışıklık (Nonspesifik İmmun Yanıt)

Babesiosis'e karşı doğal immunité, spesifik olmayan (nonspesifik) komponentler ile sağlanır. Bunun yanında doğal bağışıklıkta, çeşitli spesifik moleküllerin sorumlu olduğu ve özellikle NK hücrelerin ve makrofajların antibabesial aktivitede yer aldığı ortaya konmuştur (132). Makrofaj inhibisyonu (123) veya kaybı (133) *Babesia* türlerine karşı bağışık farelerin korunmasını tümüyle ortadan kaldırır ve yüksek oranda ölümlere yol açar. Tersine, immun hayvanlardan alınan makrofajların transferiyle, önceden patojenle karşılaşmamış (naive) fareleri *B. microti*'ye karşı korumak da mümkündür. Bu koruma, immun T hücrelerin transferiyle sağlanandan çok daha iyidir (120). Spesifik olmayan çeşitli enfeksiyon uyarımlarına cevaben, makrofajların ve NK hücrelerin çözünebilir mediatör üretmeleri, belirleyici özellikleridir. Çözünebilir mediatör üretimi, babesiosis için primer öneme sahiptir. Akut enfeksiyona yol açan WA1 *Babesia* suşuna karşı doğal bağışıklık mekanizmasında, IL-12 ve IFN- γ aracılığı ile makrofaj aktivasyonu ve NO üretimi çok önemlidir (110, 130). Enfekte farelerde makrofajların NO üretimi, parazitin gelişimini durdurur (134). Babesiosis'de bir diğer makrofaj çözünebilir faktör olan TNF- α da paraziti öldürür (135). Ayrıca, *B. bovis*'in eritrosit içi ölümünde ROSs'ın da rolü vardır.

Babesiosis'e karşı doğal immunitéde, TLR'lerden CpG (TLR9) ve profilin (TLR11)'nin rolü ortaya konmuştur (113, 110). *Babesia bovis* merozoit ekstraktlarının sığır PBMC (peripheral blood mononuclear cells) proliferasyonunu non-spesifik olarak aktive etmesi TLR9'un varlığından ileri gelir (111). Ayrıca *E. coli*'de olduğu gibi, *T. cruzi*, *T. brucei* ve *B. bovis*'te de aktive makrofajların IL-1 β , IL-12, TNF α ve NO üretiminden sorumlu

DNA, *B. bovis* lipid ve *Babesia* merozoit ektratlarında da gösterilmiştir (109,110,136). Hem sığırlarda TLR9'nin varlığını ortaya koyan çalışmada (112) hem de yukarıda bahsi geçen çalışmalarda (109,111,136) TLR9'un fonksiyonel olduğu gösterilmiştir. *T. gondii* ve diğer protozoonlarda identifiye edilen TLR11, IL-12 üretimini sağlayan bir proteindir (137). *Babesia bovis* Texas suşu (T₂Bo)'nun genomik sekansının homolog genleri için yapılan parçalamada, 17.5 kDa'luk profilin benzeri bir protein identifiye edilmiş ve bunun *P. falciparum*, *T. gondii* ve *T. parva* profilleri ile %34-64 identik olduğu saptanmıştır. Ancak, aynı şartlarda ne *Cryptosporidium parvum* ne de recombinant *B. bovis* TLR11'leri, sığır APC (activated protein C)'siyle IL-12 üretimini stimule etmezken; *B. bovis* DNA ve *E. coli* DNA TLR11'leri IL-12 üretimini stimule etmiştir (110,136). Bugüne kadar sığır genomunda TLR11'in homologları identifiye edilememiştir (110). İlginç olarak TLR11, insan hücrelerinde bulunmadığı gibi (138), kedi, köpek ve şempazenin de aralarında bulunduğu çeşitli memelilerde de (139) exprese edilememiştir. Bu sebeple, protozoon enfeksiyonlarında non-murine memeli immun yanıtında apicomlexal TLR11'lerin rolü halen bilinmemektedir (110).

2.6. BABESIOSIS'TE TEŞHİS

Bütün hayvan türlerinde akut babesiosis'te yüksek ateş (40- 41,5°C), anemi, ikterus ve hemoglobunüri gibi klinik belirtiler görülür. Bunun yanında kırgınlık, depresyon ve zayıflık gibi genel semptomlar da görülebilir. İnsanlarda ise semptomlar, malarya'ya benzemekle beraber aniden ortaya çıkar ve intravasküler hemoliz, hemoglobunüri, sarılık, kaslarda ağrı, titreme, solunum güçlüğü ve sürekli ateşle seyreder (140,141). Teşhiste; mevsim, kene enfestasyonu, unstabil bölge gibi epidemiyolojik veriler şüpheleri artırabilir. Ancak hastalığın teşhisi perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskopik incelenmesinde eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle olur. Hastalığa hangi türün yol açtığını belirlemek için ise, parazite karşı oluşan spesifik antikorların serolojik yöntemlerle (IFAT, ELISA vb.) saptanması veya parazit DNA'sının moleküler yöntemlerle (PCR, RLB, Nested-PCR vb.) tespit edilmesi gerekir (78, 142). Bu testler için konusunda uzman kişilere ihtiyaç duyulması, uzun zaman alması, laboratuvar malzemelerine ihtiyaç duyulması ve saha şartlarında uygulanamaması gibi dezavantajlar olduğundan son zamanlarda Japonya'da immunochromatographic test (ICT) adı verilen hızlı ve basit bir strip serodiyagnostik test geliştirilmiştir. Uzman olmayan kişilerin dahi kolaylıkla kullanabileceği bu test

nitroselüloz membran tabanlı olup, membran üzerine *B. bovis* (rap-1), *B. bigemina* (rap-1), *T. equi* (EMA-2t) ve *B. caballi* (Bc48)'ye ait rekombinant proteinler emdirilmiş ve bu membran üzerine şüpheli hayvana ait bir damla kan (antikör) damlatılarak kolaylıkla teşhis yapılabilir (143).

2.6.1. Mikroskopik Muayene

Bu yöntem, tekniğine uygun olarak hasta hayvanlardan alınmış kan örneklerinden ince yayma veya kalın yayma preparatlar hazırlanması suretiyle ince yayma frotiler metil alkolde 5 dakika, kalın yayma frotiler ise 100 °C'de 15 dakika tutularak tespit edildikten sonra Giemsa ile boyanarak mikroskop altında incelenmesi ve etkenlerin görülmesiyle yapılmaktadır. Yöntem kolaylıkla uygulanabilmekte olup deneyimli personel gerektirmektedir (28, 77, 144,145). Mikroskopik muayene için alınan kanın vena jugularis yerine, kapillar damarların geçtiği kuyruk ucu veya kulak ucundan alınması tercih edilmelidir. Çünkü *Babesia* etkenlerini içeren eritrositler kapillar damarlarda birikme eğilimindedirler. Ölüm sonrası yapılan muayenelerde de kandan veya dalak, karaciğer, kemik iliği gibi organlardan hazırlanan sürme preparatlarla da teşhis yapılabilir (28, 77, 144,145).

Mikroskopik muayene, ince yayma froti veya kalın yayma froti yöntemleriyle yapılmaktadır. Paraziteminin çok yoğun olduğu durumlarda etkenlerin morfolojilerinin daha sağlıklı teşhis edilebilmesi amacıyla ince yayma froti yöntemi kullanılmaktadır. Bunun için çok az miktarda kan temiz bir lam üzerine damlatılarak froti hazırlanır. Kalın yayma froti yöntemi ise paraziteminin düşük olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Kalın damla kan preparatlarıyla daha fazla hacimde kan incelenir (28, 77, 144,145). Her iki yöntemle yapılan frotilerde de lam ve lamellerin temiz olmasına, boyama solusyonun dikkatli hazırlanmasına özen gösterilmelidir. Çünkü deneyimli olmayan personel tarafından yapılan incelemelerde toz partikülleri ile etkenler bazen karıştırılabilmektedir. İnceleme esnasında tüm saha dikkatle incelenmelidir. Asgari 200 mikroskop sahasının incelenmesi esasına dayanan bu durum çok sayıda inceleme yapılmasını gerektiren durumlarda oldukça zaman almaktadır. Her iki yöntemle de yapılan mikroskopik incelemelerde etkenlerin görülmesi enfeksiyonun varlığının göstergesidir. Fakat bazı durumlarda (hastalığın çok erken dönemi veya kronik dönem) frotilerde etkenler görülemeyebilir. Etkenin frotilerde görülememesi enfeksiyonun hayvanda kesinlikle olmadığı manasına gelmez (145,146). Mikroskopik bakıda pozitif

bulunan hayvanlarda paraziteminin hesaplanmasında; en az 50 mikroskop sahasındaki enfekte olan ve enfekte olmayan eritrositler sayılır. Bulunan rakamların ortalaması 4 ile çarpılarak 200 mikroskop sahasındaki sayılar bulunur. Parazitemi;

Parazitemi (%)=Enfekte eritrosit sayısı/Enfekte olan+enfekte olmayan eritrosit sayısı x100 formülü ile hesaplanır.

2.6.2. Serolojik Testler

Babesiosis'in tanısında, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test), sELISA (Slide Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IHAT (Indirect Hemagglutination Test), CFT (Complement Fixation Test), LAT (Latex Agglutination Test) ve RIA (Radioimmunoassay) gibi serolojik testler kullanılmaktadır (27, 28, 144,147). Akut babesiosisli hayvanların eritrosit, serum veya dokularından hazırlanan antijenlerin kullanıldığı bu testler subklinik seyirli hayvanların serumlarında antikor aranması tekniğine dayanmaktadır. Bu testlerle parazit antijenlerine karşı antikor aranmasının yanında parazit antikorlarına karşı antijen aranması da mümkündür. Serolojik testler, kronik enfeksiyonların teşhisinde kullanışlı değildir. Çünkü hayvanın kanında etken olmasa bile antikorların varlığı devam etmekte olduğundan serolojik testlerin yanlış pozitiflikler verdiği ve bazı *Babesia* türleri arasında çapraz reaksiyonların şekillenebildiği bildirilmiştir (27, 28, 144,147).

Babesiosis'in serolojik olarak teşhisinde ilk olarak kullanılan test CFT testidir. Fakat bu testin duyarlılığı düşüktür (148,149). Bu teste göre duyarlılığı ve güvenilirliği daha fazla olan IFAT tekniği babesiosis'in teşhisinde en sık kullanılan serolojik testlerdendir. Ancak bu testte *Babesia* türleri kendi aralarında çapraz reaksiyonlar verebilmektedir (150-152). Serolojik yöntemlerden ELISA testi de oldukça duyarlı ve etkili bir testtir. Bu test ile bir seferde çok miktarda örnek incelenebilmektedir. Bununla birlikte, testte antijen kalitesi testin duyarlılığını etkilemektedir. Enfekte eritrositlerden hazırlanan antijenler, konak eritrositleri ile kontamine olduklarından, anti-eritrositik antikorlar sebebiyle yanlış sonuçlara sebep olmaktadır. Bu sorunun önüne geçebilmek için saflaştırılmış rekombinant antijenler kullanılmaktadır (153-155).

2.6.3. Moleküler Teknikler

Son yıllarda, mikroskopik incelemeler ve serolojik yöntemlerden farklı olarak parazite ait DNA veya RNA'nın varlığını ortaya koymaya yarayan PCR (Polymerase Chain

Reaction), Multiplex PCR, Nested PCR, Reverse Transcriptase PCR, Real-Time PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR, RLB (Reverse Line Blotting) gibi moleküler testler babesiosisin teşhisinde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır (144, 145, 156, 157).

Elbetteki her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Doğrudan etkeni görmeye yönelik yapılan mikroskopik muayenenin; basit olması, parazitlerin morfolojik olarak ayrımlarının yapılabilmesi, parazitin direkt araştırılması gibi avantajlarının yanında; zaman alması, zahmetli ve yorucu olması, parazit sayısının düşük olduğu durumlarda yanıltıcı olabilmesi, parazitlerin morfolojik olarak ayrımlarında karışıklıkların olabilmesi ve deneyimli personel gereksinimi gibi dezavantajları da mevcuttur (144, 145, 156, 157). Yine serolojik yöntemlerin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Basit ve hızlı olması, otomasyona olanak vermesi, çok sayıda örneğin eş zamanlı olarak teşhis edilebilmesi serolojik testlerin avantajlarından olup; düşük özgüllük, aktif ile atlatılmış veya latent enfeksiyonların ayırt edilememesi, parazitler arasında çapraz reaksiyonların şekillenmesi bu testlerin olumsuz yanlarını yansıtmaktadır (144, 145, 156, 157). Bu yöntemlere alternatif olarak geliştirilen nükleik asit tabanlı moleküler teknikler ile immun sistemden bağımsız veya atlatılmış enfeksiyonlardan etkilenmeksizin konak vücudunda çok az miktarda etken olsa dahi direkt hastalığa neden olan türlerin teşhisleri yapılabilmektedir. Bu moleküler yöntemlerle hastalığa neden olan parazit türlerinin eş zamanlı olarak teşhisleri de yapılabilmektedir. Tabi ki her yöntem gibi bu moleküler yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemler ekonomik olarak pahalı ve çok aşamalı yöntemler olup, inhibitörleri nedeniyle yanlış negatiflikler verebilmekte ve kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflikler de gösterebilmektedir (144, 145, 156, 157).

Bu moleküler yöntemlerin hemen hepsinde PCR aşaması mevcuttur. PCR kullanılmaya başlandığından bu yana sürekli geliştirilmekte ve daha duyarlı ve güvenilir sonuçlar için çeşitli varyasyonları ortaya konulmaktadır. Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, binlerce kez çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. PCR'ın modifiye edilmesiyle birlikte; PCR ürününün daha spesifik primerlerle ikinci kez PCR'ını kapsayan Nested PCR (158), birden fazla primer çifti kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılmasını sağlayan Multiplex PCR (159,160), kantitatif olarak parazit

DNA'sının miktarını tespit eden ve dolayısıyla varlığını ortaya koyan Real-Time PCR (161), bir testte eş zamanlı olarak çok sayıda hastalık etkeninin tespit edilmesine olanak sağlayan RLB (69, 162,163), parazitin RNA'sının tespitine yönelik yapılan Reverse Transcriptase PCR (164,165) testi gibi testler geliştirilmiştir. Bu testler babesiosis'in teşhisinde son yıllarda Türkiye'de ve Dünya'da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'de bu yöntemlerle yapılan çalışmalarda genellikle *Babesia* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmış ve bunların sekans dizilimleri ortaya konmuştur (69, 162,163). Dünya'da da bu gen bölgesi sıklıkla kullanılmakta (66, 156, 166-173), bunun yanında özellikle sığır babesiosis'i üzerine yapılan aşı çalışmalarında VMSA genleri (*msa-1*, *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b*, *msa-2c*) ve *rap-1* geninin amplifikasyonu yapılmakta ve bu gen bölgelerini içeren suşların sekans dizilimleri ortaya konmaktadır (89, 91, 174-187).

2.7. BABESIOSIS'TE TEDAVİ

Babesiosis'in tedavisinde sığırlarda yıllarca quinuronium sulphate, amicarbalide isothionate ve diminazene aceturate kullanılmış; 1970'ten sonra dördüncü bir ürün olarak da imidocarb dipropionate kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde de tedavi bu ürün ile yapılmaktadır (78, 142). Tek tırnaklıların (188,189) ve karnivorların (190) tedavisinde de imidocarb grubu ilaçlar ve diminazene aceturate kullanılmakta olup köpeklerde ayrıca trypan blue enjeksiyonu da başarılı olmaktadır. Yine köpeklerde atovaquone ve azithromycin kombinasyonunun da istenilen tedaviyi gerçekleştirdiği belirtilmiştir (191). Bunların yanında son zamanlarda yapılan çalışmalarda babesiosis'in tedavisinde epoxomicin'in başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (192). İnsanlarda ise tedavi amacıyla atovaquone, chloroquine, quinine, clindamycin ve azithromycin kombinasyonları kullanılmaktadır. Bunun yanında destek tedavisi de uygulanmaktadır (78, 141, 193,194). Bugün Türkiye'de sığırlarda babesiosis'in tedavisinde kullanılan ruhsatlı preparatlar T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nden alınan bilgilere göre Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Türkiye'de sigarlarda tabesiosis tedavisinde kullanılan ruhsatlı preparatlar

Farmakolojik Grup/Antibesial		Uygulama Şekli	Farmakolojik Şekli	Firma Adı	Ambalaj	Etken Madde Adı	Etken Madde Miktarı
Sıra No	İlaç Adı*						
1	Acaprin %12	Enjektable/IM	Çözelti	Bayer	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
2	Aknizol	Enjektable/IM	Çözelti	Aksu Ecz.	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
3	Babedif	Enjektable/IM	Çözelti	Ceva-Dif	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
4	Babesit	Enjektable/IM	Çözelti	Bavet	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
5	Carbak	Enjektable/IM	Çözelti	Ak-Tıp	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
6	E-Carbol	Enjektable/IM	Çözelti	Hektaş	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
7	Imidoparadecto	Enjektable/IM	Çözelti	Vetaş	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
8	Imozan	Enjektable/IM, SC	Çözelti	Provet	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
9	Imicarp	Enjektable/IM	Çözelti	Tekrovet	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
10	Imidovil	Enjektable/IM	Çözelti	Vilsan	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
11	Imizol	Enjektable/IM, SC	Çözelti	Ceva-Dif	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
12	Imocel	Enjektable/IM	Çözelti	Çelikler	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
13	Kanaprim	Enjektable/IM	Çözelti	Alke	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg
14	Pirovet-F	Enjektable/IM, SC	Çözelti	Topkim	1 ml	Imidocarb dipropiyonat	120 mg

* Alfabetik sıra, IM: Intramuscular, SC: Subcutan

2.8. BABESIOSIS'TE KORUNMA VE KONTROL

Babesiosis'te esas olan, hastalığın sağaltımından ziyade karşı koruyucu önlemlerin alınmasıdır. Koruyucu önlemler vektör kenelerle mücadele, premünizasyon ve aşılamadır (27, 28).

2.8.1. Kene Kontrolü

Kene mücadelesi çeşitli akarisitlerle yapılabileceği gibi virus, bakteri, protozoon, nematod, mantar gibi çeşitli biyolojik ajanlar ve kene aşlarıyla da yapılmaktadır (99, 195,196). Özellikle kene aşlarıyla yapılan çalışmalar sonucu, *B. microplus*'un *Bm86* geninden elde edilen ticari aşların (GavacTM, TickGARD^{PLUS}), kenelerin sayısında, doyma ağırlıklarında ve fertilité oranlarında önemli derecede azalma sağladığı tespit edilmiştir (197,198). Bu ticari aşların *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus*, *B. decoloratus*, *Hyalomma a. anatolicum* ve *H. dromedarii*'ye karşı koruyuculuk sağlarken, *Amblyomma variegatum*, *A. cajennense* ve *R. appendiculatus*'a karşı koruyuculuk sağlamadığı bildirilmiştir (196). Bunun yanında *Ixodes scapularis*'in subolesin olarak adlandırılan *4D8* geniyle yapılan immunizasyon çalışmalarında bu genin RNA interferens (RNAi) etkisiyle kenelerin beslenme ve yumurtlamalarında önemli azalmalara yol açtığı saptanmıştır. RNAi, kenelerde ve çoğu ökaryotlarda bulunan ve koruyucu özeliği olan post-transkripsiyonel bir gen-silencing mekanizmasıdır (95).

2.8.2. Premünisyon

Homolog suşlara karşı premünisyon amacıyla duyarlı hayvanlara, babesiosis'li sığırın enfekte kanı verilip klinik belirtilerin oluşması ile birlikte küratif dozun altında diminazen aceturat veya imidocarb preparatları uygulanarak hastalığın ortaya çıkışı önlenir. Böylece belirli bir miktar parazitin canlı kalmasına müsaade edilerek homolog suşlara karşı duyarlı sığırların preimmun duruma getirilmesi sağlanır (99).

2.8.3. Aşılama

Dünyanın muhtelif yerlerinde sığır ve köpek babesiosis'ine karşı aşı uygulamaları yapılmaktadır. Sığır babesiosisi'ne karşı aşılamada başlangıçta homolog suşlara karşı cansız aşlarla kısmen koruma sağlanmış (199,200) ise de son yıllarda aşılamada daha çok canlı aşlar kullanılmaktadır. Fakat canlı aşların bazı dezavantajları içermesi sebebiyle rekombinant aşı çalışmalarına hız verilmiştir (99, 180). Bu amaçla özellikle

Avustralya, Arjantin, Güney Afrika, İsrail ve Uruguay'da rekombinant aşı çalışmaları devam etmektedir (19). 1990'dan beri Avustralya'da *B. bovis*'in 3 suşu ve *B. bigemina*'nın bir suşu (G suşu) aşı üretiminde kullanılmaktadır (201). Özellikle canlı aşı olarak Güney Afrika, İsrail ve Avustralya'da *frozen* (dondurulmuş) aşılar kullanılmakta ve bu aşılar *chilled* (soğutulmuş) aşılara göre daha fazla dayanıklılık göstermektedir. Bu aşıların soğukta muhafaza edilmesi amacıyla gliserol kullanılmaktadır. Nakil esnasında N₂ (nitrojen) veya sıvı CO₂ kullanılması gerekmektedir. Avustralya'da üretilen monovalent *B. bovis* ve *B. bigemina* aşıları (Combovac) ticari olarak 2001'den beri satılmaktadır (19). Bunun yanında soğutulmuş formda aşılar sadece Avustralya'da 1966-2003 yılları arasında 35 milyon doz uygulanmıştır. Bu aşının dondurulmuş formlara göre avantajları; kısıtlı kaynaklarla daha kolay üretilmesi, naklinin ve kullanımının daha kolay olmasıdır. Halen Avustralya'da kullanılan bu aşılar 2 ml doz içerisinde 1×10^7 *B. bovis*, 25×10^6 *B. bigemina* ve 1×10^7 *Anaplasma centrale* içermektedir. Bu aşıların raf ömrü oldukça kısa olup yaklaşık 4 gündür (202). Bunun yanında rekombinant aşı çalışmaları genellikle, doğal immun sığırlarda fonksiyonel olarak immunodominant olan merozoit yüzey antijenleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla genellikle *B. bovis* *msa-2c* antijenleri ile *B. bovis* ve *B. bigemina*'da ortak olarak bulunan *rap1* geni kullanılmaktadır. *msa-1* ve *msa-2c* antijenlerinin merozoitlerin eritrositlere invazyonunu nötralize ettiği fakat bu antijenlerin sığırlarda koruma sağlamadığı bildirilmiştir (174). *rap-1* antijeninin ise sadece homolog suşlara karşı kısmi bir koruma sağladığı saptanmıştır (203). Bu çalışmaların yanında alternatif olarak DNA aşı adjuvantları geliştirilmeye başlanılmıştır. *Babesia bovis*'in B hücrelerinden elde edilen DNA içerisindeki CpG motifleri IgG üretimini teşvik etmektedir. Aktive olmuş makrofajlar da IL-12, TNF- α ve NO salgılayarak parazitlerin replikasyonun kontrolü için önemli bir doğal immunité sağlamaktadır (136).

Köpek babesiosis'ine karşı aşılamada etkili bir koruma amacıyla *B. canis* soluble parazit antijenleri (SPA) kullanılmaktadır. Ancak bu antijenlerle yalnızca homolog suşlara karşı koruma sağlanmaktadır. Bu dar spektrumlu korumayı genişletmek amacıyla *B. canis* ve *B. rossi* SPA'larının kombinasyonları ile yapılan bir aşı (Nobivac piro) ile heterolog suşlara karşı da koruma sağlanmıştır (204).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Genomik DNA Havuzu ve Kene Materyali

Bu çalışmanın materyalini Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen EÜBAP VA-05-05 kodlu ve “Sığırlarda Görülen *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Vektör Kenelerde Moleküler Biyolojik Teşhisi” konulu araştırma projesi kapsamında toplama bölgesi ve türe göre kategorize edilen ve Mayıs-Ağustos ayları arasında toplanmış toplam 1115 ergin ixodid keneden oluşturulmuş DNA havuzları (Tablo 3.1) oluşturmaktadır. Havuzlar aynı türe ait ergin dişi ve erkek kenelerden oluşturulmuştur. Örnek sayısı 10’un üzerinde olan havuzlar bölünerek DNA ekstrakte edilmiş ve elde edilen genomik DNA ekstraktları aynı havuzda birleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Kayseri’de sığır ve barınaklardan toplanan ergin kenelerden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında kene türlerinin dağılımı

Havuzlar	Alındığı Yer	Kene Türü	Kene Sayısı
1	Dadaloğlu/Tomarza	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	26
2	Kadılı/Pınarbaşı	<i>H. m. marginatum</i>	66
3	Kadılı/Pınarbaşı	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	66
4	Kadılı/Pınarbaşı	<i>Hae. parva</i>	96
5	Kadılı/Pınarbaşı	<i>D. marginatus</i>	20
6	Tekmen/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	33
7	Tekmen/Gemerek	<i>Rh. turanicus</i>	88
8	Tekmen/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	59
9	Burhan/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	35
10	Burhan/Gemerek	<i>Rh. turanicus</i>	71
11	Burhan/Gemerek	<i>H. d. detritum</i>	1
12	Burhan/Gemerek	<i>Rh. bursa</i>	3
13	Burhan/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	2
14	Yeniçubuk/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	4
15	Yeniçubuk/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	78
16	Büyükkünye/Develi	<i>H. m. marginatum</i>	66
17	Büyükkünye/Develi	<i>Rh. turanicus</i>	42
18	Çamrak/Yeşilhisar	<i>H. a. excavatum</i>	50
19	Çamrak/Yeşilhisar	<i>Rh. turanicus</i>	15
20	Çamrak/Yeşilhisar	<i>H. a. anatolicum</i>	76
21	Bakırdağı/Develi	<i>H. m. marginatum</i>	1
22	Bakırdağı/Develi	<i>Rh. turanicus</i>	2
23	Yaylacı/Sarız	<i>H. m. marginatum</i>	6
24	Kurtini/Sarız	<i>H. m. marginatum</i>	30
25	Kurtini/Sarız	<i>Rh. bursa</i>	20
26	Kurtini/Sarız	<i>Hae. sulcata</i>	2
27	Kurtini/Sarız	<i>Hae. parva</i>	10
28	Palas/Sarıoğlu	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	5
29	Palas/Sarıoğlu	<i>Rh. sanguineus</i>	1
30	Palas/Sarıoğlu	<i>H. a. excavatum</i>	3
31	Palas/Sarıoğlu	<i>H. m. marginatum</i>	4
32	Palas/Sarıoğlu	<i>Rh. turanicus</i>	1
33	Palas/Sarıoğlu	<i>Rh. bursa</i>	5
34	Şeyhşaban/İncesu	<i>H. a. anatolicum</i>	24
35	Şeyhşaban/İncesu	<i>H. d. detritum</i>	66
36	Dokuzpınar/İncesu	<i>H. a. anatolicum</i>	5
37	Dokuzpınar/İncesu	<i>H. d. detritum</i>	2
38	Dokuzpınar/İncesu	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	31
TOPLAM			1115

3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Real Time PCR Analizleri

Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış ergin dişi ve erkek kenelerden oluşan DNA havuzlarında *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin Real Time PCR ile araştırılmasında sırası ile Sybergreen ve TaqMan prob bazlı qPCR kullanılmıştır. Sybergreen tabanlı qPCR’da FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak *B. bovis*’in msa2c gen bölgesinden 97-bp bölgeyi amplifiye eden msa2c2F, msa2c2R primerleri ile örneklerin Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (205). Pozitif kontrol olarak anabilim dalındaki referans *B. bovis* izolatu, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır. PCR master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 25 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

FastStart Universal SYBR Green Master Mix	12,5 µl
msa2c2F (10 pmol)	1,0 µl
msa2c2R (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	9,5 µl

Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. *B. bovis* için kullanılan termal profil aşağıda gösterilmiştir (205).

1. 50°C 2dk } 1 siklus [uracil N-deglycosylase digest]
2. 95 °C 2dk } 1 siklus
3. 95 °C 30s } 40 siklus
4. 60 °C 15s }
5. 95 °C 15s } 1 siklus [Melting Curve
6. 60 °C 1dk } Analizi]
7. 95 °C 15s }

TaqMan prob bazlı qPCR’da Brilliant II qPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) kullanılarak *B. bigemina*’nın rap-1 gen bölgesinden 95-bp bölgeyi amplifiye eden rap1F ve rap1R primerleri ve aynı gen bölgesinden dizayn edilen rap1P probu ile örneklerin Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak anabilim dalındaki referans *B. bigemina* izolatu, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır. PCR master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 25 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Brilliant II qPCR Master Mix	12,5 µl
rap1 F (10 pmol)	1,0 µl
rap1 R (10 pmol)	1,0 µl
rap1 P (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	8,5 µl

Babesia bigemina için kullanılan termal profil aşağıda gösterilmiştir (206).

1. 50 °C 2dk } 1 siklus [uracil N-deglycosylase digest]
2. 95 °C 10dk } 1 siklus
3. 95 °C 20s } 45 siklus
4. 55 °C 1dk }

Real Time PCR analizinde kullanılan primer, prob dizileri ile reporter ve quencher boyalar Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Real Time PCR’da Kullanılan Primer ve Problar

	Primer/Prob		Dizilimi (5'---3')	Referans
<i>B. bigemina</i>	Primer	rap1 F	TCAGCGACTACGTCCATTTG	207
		rap1 R	AATCAACTTGGCAGGGTCAG	207
	Prob	rap1 P	HEX- CCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAA- BHQ1	207
<i>B. bovis</i>	Primer	msa2c 2F	GGACAAATTAAGCAACCTATACAAA	205
		msa2c 2R	AGCTTTCCTTGTTTCGAATTTTATAA	205

3.2.2. *Babesia bovis* msa2c geninin amplifikasyonu

Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif belirlenen tüm örnekler msa2c genini (complete 798 bp) amplifiye eden msa-2cF (5’-ATGGTGTCTTTTAACAT AATA-3’) ve msa-2cR (5’-AAATGCAGAGAGAACGAAGTAGCAGAGAGT-3’) spesifik primerleriyle PCR analizine tabii tutulmuştur (177). Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 1,5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 °C’de 30 s; 35 siklus, denaturation: 95 °C’de 30 s, annealing: 60 °C’de 1dk, extension: 72 °C’de 1 dk; final extension: 72 °C’de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR analizinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında mevcut olan çeşitli *B. bovis* izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5’luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.3. *Babesia bigemina* rap-1a geninin amplifikasyonu

Real Time PCR analizleri sonucu *B. bigemina* pozitif belirlenen tüm örnekler rap-1a geninin yaklaşık 412 bp parsiyel kısmını amplifiye eden spesifik primerlerle Nested-PCR analizine tabii tutulmuştur. Nested PCR analizinin ilk PCR basamağında (5'-G AGTCTGCCAAATCCTTAC-3') forward ve (5'-TCCTCTACAGCTGCTTCG-3') reverse primerleri (208), ikinci PCR basamağında ise (5'-AGCTTGCTTTTACAAC TCGCC-3') forward ve (5'-TTGGTGCTTTGACCGACGACAT-3') reverse primerleri kullanılmıştır (209). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 3mM MgCl₂, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 50 ng/µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR için de initial denaturation: 94 °C'de 5 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 1dk, annealing: (55 °C'de 1 dk 1. PCR; 58 °C'de 1 dk nPCR), extension: 72 °C'de 1 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (208, 210). Nested PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında mevcut olan çeşitli *B. bigemina* izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.4. *Babesia bovis* msa2c ve *B. bigemina* rap-1a Genlerinin Sekansı ve Filogenetik Analizi

PCR analizleri sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen *B. bigemina* için 2 izolata ait amplikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler ilgili gen bölgelerinin analizi için amplifikasyonda kullanılan primerlerle (rap-1a için nested primeri) Genoks (Çankaya, Ankara, Türkiye) firmasına çift yönlü olarak sekanslatılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (211) ve Geneious

5.5.5 (212) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (213) ve Geneious 5.5.5 (212) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Real Time PCR Sonuçları ve Babesiosis Prevalansı

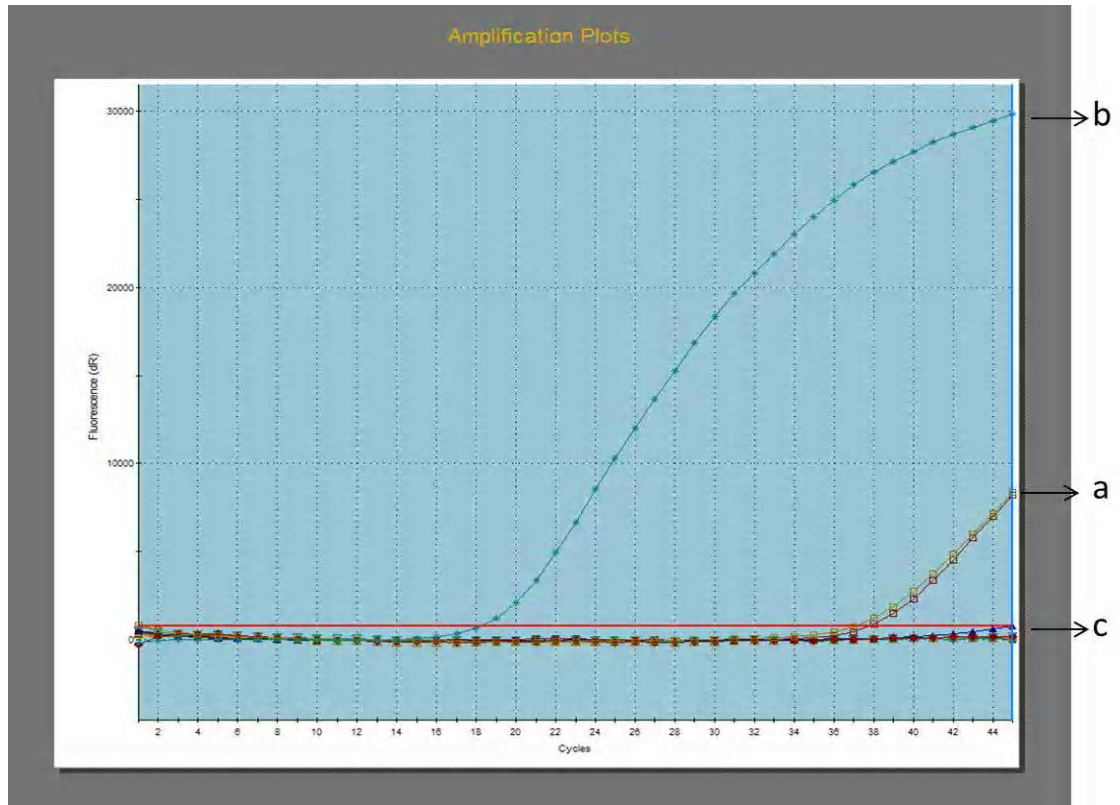
Real Time PCR ile incelemesi yapılan toplam 38 genomik DNA havuzundan 8'i (%21,0) *B. bigemina*, 2'si (%5,2) *B. bovis* ile enfekte bulunmuştur. İncelenen örneklerde miks enfeksiyona rastlanılmamıştır. Pozitif belirlenen örneklerin araştırma merkezlerine ve kene türlerine göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir. Tablo 4.1'e göre *B. bigemina* pozitif belirlenen 8 örneğin 4'ü *Rh. (Boophilus) annulatus*, 1'i *H. m. marginatum*, 2'si *Rh. turanicus* ve 1'i *H. a. anatolicum* havuzlarında saptanırken, *B. bovis* pozitif 2 örneğin her ikisi de *H. m. marginatum* havuzunda tespit edilmiştir.

Sybergreen tabanlı qPCR'da FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak *B. bovis*'in msa2c gen bölgesinden 97-bp bölgeyi amlifiye eden msa2c 2F, msa2c 2R primerleri ile Real Time PCR analizleri sonucu pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon ve melting eğrileri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Pozitif örneklerde ortalama çözünme sıcaklığı (T_m) 78,1 °C ($\pm 0,2$ °C) belirlenmiştir.

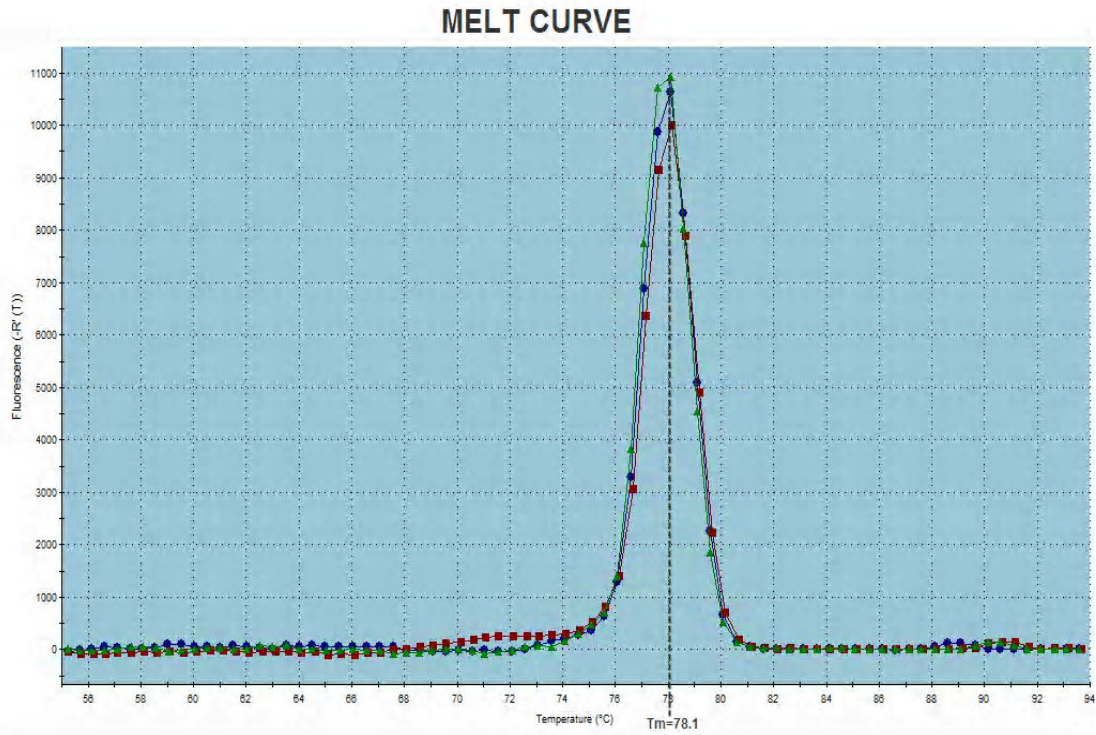
TaqMan prob tabanlı qPCR'da Brilliant II qPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) kullanılarak *B. bigemina*'nın rap-1 gen bölgesinden 95-bp bölgeyi amlifiye eden rap1 F ve rap1 R primerleri ve aynı gen bölgesinden dizayn edilen rap1 P probu ile pozitif belirlenen bazı örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Kene türlerine göre Real Time PCR sonuçları

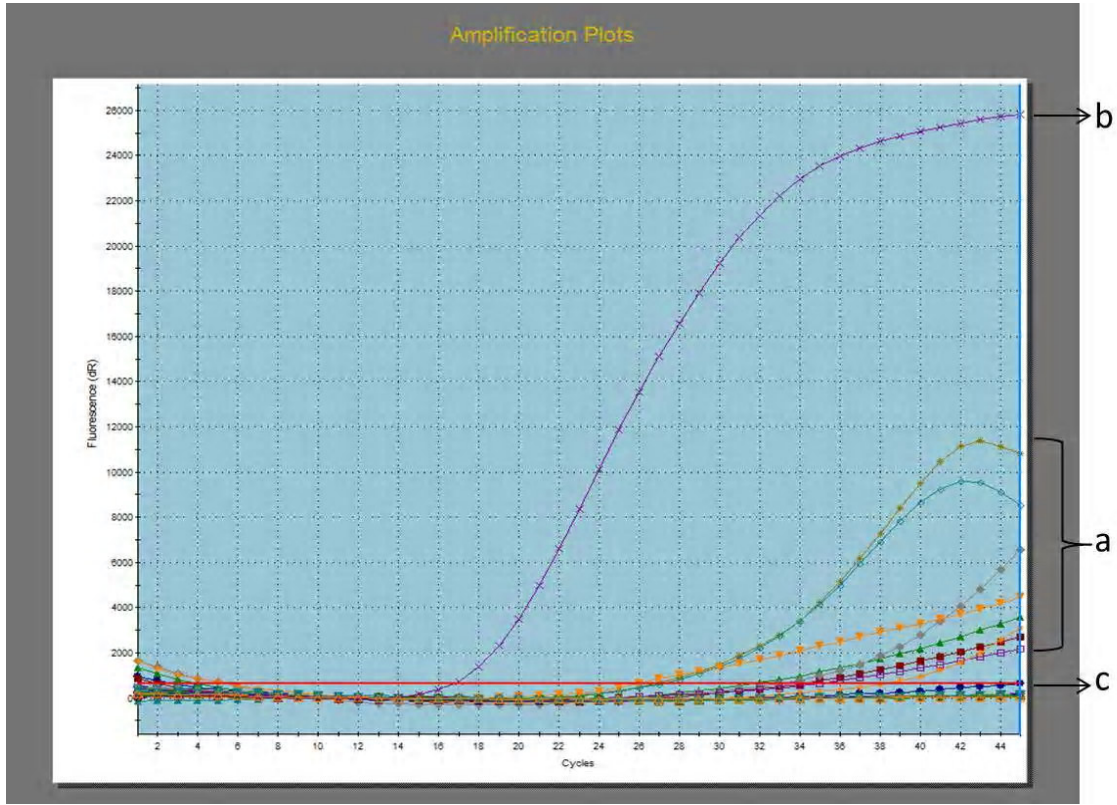
Havuz Numarası	Alındığı Yer	Kene Türü	Real Time PCR Sonuçları
1	Dadaloğlu/Tomarza	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	<i>Babesia bigemina</i>
2	Kadılı/Pınarbaşı	<i>H. m. marginatum</i>	
3	Kadılı/Pınarbaşı	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	<i>Babesia bigemina</i>
4	Kadılı/Pınarbaşı	<i>Hae. parva</i>	
5	Kadılı/Pınarbaşı	<i>D. marginatus</i>	
6	Tekmen/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	
7	Tekmen/Gemerek	<i>Rh. turanicus</i>	
8	Tekmen/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	<i>Babesia bigemina</i>
9	Burhan/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	<i>Babesia bovis</i>
10	Burhan/Gemerek	<i>Rh. turanicus</i>	
11	Burhan/Gemerek	<i>H. d. detritum</i>	
12	Burhan/Gemerek	<i>Rh. bursa</i>	
13	Burhan/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	
14	Yeniçubuk/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	
15	Yeniçubuk/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	
16	Büyükkünye/Develi	<i>H. m. marginatum</i>	<i>Babesia bigemina</i>
17	Büyükkünye/Develi	<i>Rh. turanicus</i>	<i>Babesia bigemina</i>
18	Çamrak/Yeşilhisar	<i>H. a. excavatum</i>	
19	Çamrak/Yeşilhisar	<i>Rh. turanicus</i>	
20	Çamrak/Yeşilhisar	<i>H. a. anatolicum</i>	
21	Bakırdağı/Develi	<i>H. m. marginatum</i>	
22	Bakırdağı/Develi	<i>Rh. turanicus</i>	<i>Babesia bigemina</i>
23	Yaylacı/Sarız	<i>H. m. marginatum</i>	<i>Babesia bovis</i>
24	Kurtini/Sarız	<i>H. m. marginatum</i>	
25	Kurtini/Sarız	<i>Rh. bursa</i>	
26	Kurtini/Sarız	<i>Hae. sulcata</i>	
27	Kurtini/Sarız	<i>Hae. parva</i>	
28	Palas/Sarioğlu	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	
29	Palas/Sarioğlu	<i>Rh. sanguineus</i>	
30	Palas/Sarioğlu	<i>H. a. excavatum</i>	
31	Palas/Sarioğlu	<i>H. m. marginatum</i>	
32	Palas/Sarioğlu	<i>Rh. turanicus</i>	
33	Palas/Sarioğlu	<i>Rh. bursa</i>	
34	Şeyhşaban/İncesu	<i>H. a. anatolicum</i>	<i>Babesia bigemina</i>
35	Şeyhşaban/İncesu	<i>H. d. detritum</i>	
36	Dokuzpınar/İncesu	<i>H. a. anatolicum</i>	
37	Dokuzpınar/İncesu	<i>H. d. detritum</i>	
38	Dokuzpınar/İncesu	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	<i>Babesia bigemina</i>



Şekil 4.1. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri. a: *B. bovis* pozitif örnekler; b: *B. bovis* pozitif kontrol; c: No DNA ve negatif örnekler



Şekil 4.2. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif örneklerin erime eğrileri (melting curve); $T_m=78,1$



Şekil 4.3. TaqMan Prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri. a: *B. bigemina* pozitif örnekler; b: *B. bigemina* pozitif kontrol; c: No DNA ve negatif örnekler

Babesia bovis pozitif örneklerde ortalama Ct (dR) değeri 37,71 (min:37,23; max:38,2), *B. bigemina* pozitif örneklerde ise 35,75 (min:28,32; max:41,12) olarak belirlenmiştir.

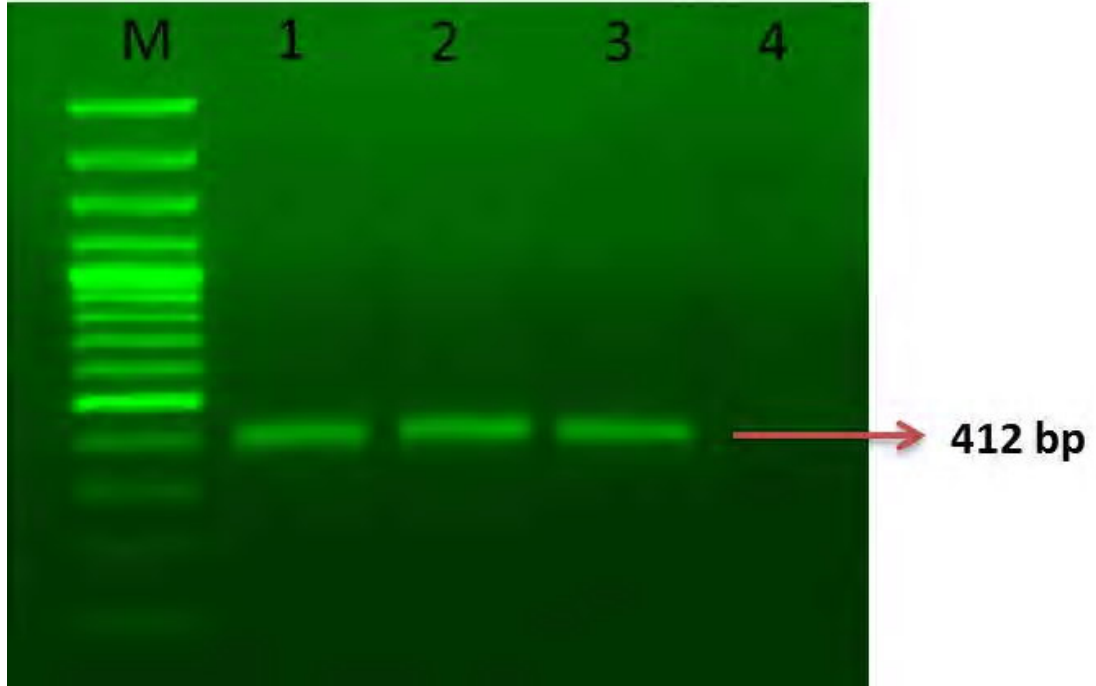
4.2. Sekans ve Filogenetik Analizler

4.2.1. Msa2c ve rap-1a genlerinin amplifikasyon sonuçları

Sybergreen tabanlı Real Time PCR analizlerinde *B. bovis* pozitif belirlenen iki örneğin msa2c gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile PCR analizleri sonucunda Ct (dR) değerlerinin çok yüksek, dolayısıyla parazitemi seviyesinin çok düşük olması nedeniyle agaroz jel üzerinde amplifikasyon elde edilememiştir.

TaqMan prob tabanlı Real Time PCR analizlerinde *B. bigemina* pozitif belirlenen örneklerin rap-1a gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile Nested PCR analizleri sonucunda 2 örneğin agaroz jel üzerinde 412 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bazı pozitif izolatlarda rap-1a gen bölgesinin Nested PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen ampikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.4'de verilmiştir. PCR analizleri sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda

belirlenen *B. bigemina* izolatlarına ait ampliconlar, jel pürifiye edildikten sonra sekans analizlerine tabii tutulmuştur.



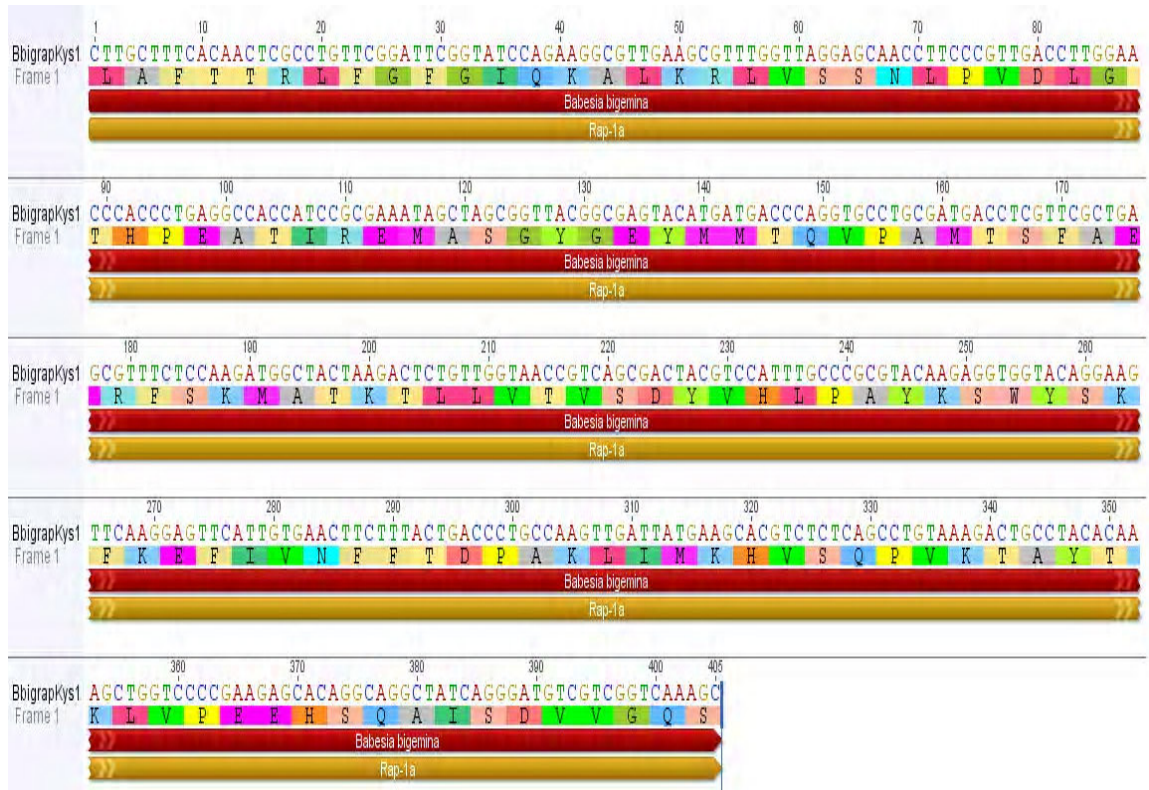
Şekil 4.4. *Babesia bigemina* rap-1a gen bölgesini amplifiye eden primerler ile Nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1,2: Pozitif örnekler; 3: *B. bigemina* pozitif kontrol; 4: No DNA

4.2.2. *Babesia bigemina* Rap-1a Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi

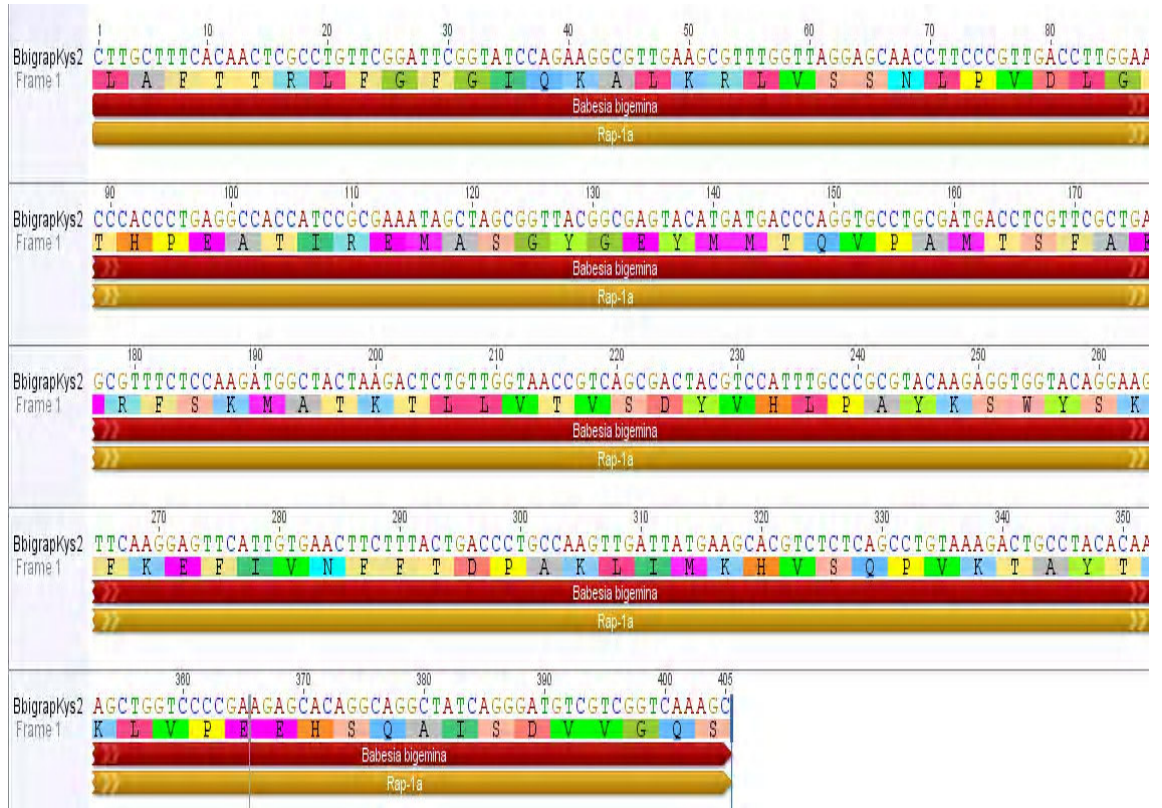
Babesia bigemina rap-1a geni yönünden izolatlara ait DNA dizilerinin, konak ve izolasyon kaynağı Tablo 4.2'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.2. Kayseri yöresinde kene havuzlarında belirlenen *B. bigemina* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak ve izolasyon kaynağı

İzolat	Gen bölgesi	Konak ve izolasyon kaynağı
BbigrapKys1	<i>rap-1a</i>	Kene
BbigrapKys1	<i>rap-1a</i>	Kene



Şekil 4.5. *Babesia bigemina* BbigrapKys1 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları



Şekil 4.6. *Babesia bigemina* BbigrapKys2 izolatının nükleotid ve aminoasit sekansları

Kayseri yöresinde sığırlardan toplanmış kenelerden oluşturulan genomik DNA havuzlarından elde edilen *B. bigemina* izolatlarıyla rap-1 gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer *B. bigemina* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Dünyadan ve Türkiye'den filogenetik kıyaslaması yapılan diğer bazı *B. bigemina* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Gen Bölgesi	Aksesyon Numarası
-	Tayland	Sığır	<i>rap-1</i>	AB586126
-	Tayland	Sığır	<i>rap-1</i>	AB594816
-	Tayland	Sığır	<i>rap-1</i>	AB594817
-	Tayland	Sığır	<i>rap-1</i>	JN974300
-	Filipinler	Sığır	<i>rap-1</i>	JX648554
Syrian isolate 1	Suriye	Sığır	<i>rap-1</i>	AB617642
Syrian isolate 2	Suriye	Sığır	<i>rap-1</i>	AB617643
Syrian isolate 3	Suriye	Sığır	<i>rap-1</i>	AB617644
CGA	ABD	Sığır	<i>rap-1</i>	AF017284
CGP	ABD	Sığır	<i>rap-1</i>	AF017285
S1A	ABD	Sığır	<i>rap-1</i>	AF017286
S2P	ABD	Sığır	<i>rap-1</i>	AF017287
Texcoco	ABD	Sığır	<i>rap-1</i>	AF017288
UYA	ABD	Sığır	<i>rap-1</i>	AF017289
BbigE1	Türkiye	Sığır	<i>rap-1</i>	KC515386
BbigE2	Türkiye	Sığır	<i>rap-1</i>	KC515387
BbigE3	Türkiye	Sığır	<i>rap-1</i>	KC515388

Kayseri yöresinde kene havuzlarında pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan *B. bigemina* izolatları ile Dünya'dan ve Türkiye'den multiple alignmentta dahil edilen diğer izolatların rap-1 gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.4'de, pairwise alignmentları ise Şekil 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan ve Türkiye’den diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
BbigrapKys1	24,0	26,9	23,2	25,9	47,2	52,8	405,0
BbigrapKys2	24,0	26,9	23,2	25,9	47,2	52,8	405,0
BbigE1	24,4	26,9	22,7	25,9	47,2	52,8	405,0
BbigE2	24,2	27,1	22,7	25,9	46,9	53,1	409,0
BbigE3	23,9	27,1	23,2	25,9	47,1	52,9	410,0
AB586126	25,4	23,8	24,9	25,8	50,3	49,7	1011,0
AB594816	25,8	24,1	24,3	25,7	50,2	49,8	937,0
AB594817	25,1	23,4	25,3	26,1	50,5	49,5	1046,0
JN974300	24,0	27,5	23,3	25,2	47,3	52,7	408,0
JX648554	24,0	26,9	23,5	25,5	47,6	52,4	412,0
Syrian isolate 1	24,7	24,4	25,6	25,3	50,2	49,8	880,0
Syrian isolate 2	24,5	24,7	25,5	25,3	50,0	50,0	880,0
Syrian isolate 3	24,5	24,7	25,3	25,5	49,9	50,1	880,0
CGA	25,5	24,0	26,3	24,3	51,8	48,2	1051,0
CGP	25,5	24,0	26,3	24,3	51,8	48,2	1051,0
S1A	25,3	23,9	26,4	24,5	51,7	48,3	1051,0
S2P	25,2	23,8	26,3	24,7	51,5	48,5	1042,0
Texcoco	25,4	24,1	26,3	24,3	51,7	48,3	1051,0
UYA	25,5	24,0	26,4	24,2	51,9	48,1	1051,0
Ortalama	25,0	24,6	25,2	25,1	50,2	49,8	778,2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. AB586126 Tayland																		
2. AB594816 Tayland	0.010																	
3. AB594817 Tayland	0.010	0.009																
4. AB617642 Syrian isolate 1 Suriye	0.009	0.010	0.018															
5. AB617643 Syrian isolate 2 Suriye	0.007	0.007	0.015	0.002														
6. AB617644 Syrian isolate 3 Suriye	0.008	0.008	0.016	0.003	0.001													
7. AF017284 CGA ABD	0.014	0.013	0.023	0.007	0.004	0.006												
8. AF017285 CGP ABD	0.011	0.009	0.020	0.004	0.001	0.003	0.002											
9. AF017286 S1A ABD	0.012	0.011	0.021	0.007	0.004	0.006	0.006	0.004										
10. AF017287 S2P ABD	0.012	0.011	0.021	0.006	0.003	0.004	0.008	0.006	0.008									
11. AF017288 Texcoco ABD	0.012	0.011	0.021	0.006	0.003	0.004	0.003	0.001	0.003	0.005								
12. AF017289 UYA ABD	0.014	0.013	0.023	0.009	0.006	0.007	0.009	0.007	0.011	0.009	0.008							
13. BbigrapKys1 Kayseri Türkiye	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.012	0.015	0.010	0.007	0.007	0.007	0.012						
14. BbigrapKys2 Kayseri Türkiye	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.012	0.015	0.010	0.007	0.007	0.007	0.012	0.000					
15. JN974300 Tayland	0.005	0.005	0.005	0.010	0.005	0.007	0.010	0.005	0.002	0.002	0.002	0.002	0.010	0.010				
16. JX648554 Filipinler	0.002	0.002	0.002	0.007	0.002	0.005	0.007	0.002	0.005	0.005	0.005	0.000	0.012	0.012	0.002			
17. KC515386 BbigE1 Erzurum Türkiye	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.007	0.010	0.005	0.002	0.002	0.002	0.007	0.005	0.005	0.005	0.007		
18. KC515387 BbigE2 Erzurum Türkiye	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.007	0.010	0.005	0.002	0.002	0.002	0.007	0.005	0.005	0.005	0.007	0.000	
19. KC515388 BbigE3 Erzurum Türkiye	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.007	0.010	0.005	0.002	0.002	0.002	0.007	0.010	0.010	0.005	0.007	0.005	0.005

Şekil 4.7. Kayseri *B. bigemina* izolatları ile Dünya'dan ve Türkiye'den analizleri yapılan diğer bazı izolatların rap-1 gen dizilimlerinin pairwise analizleri

Kayseri yöresinde kene havuzlarından elde edilen *B. bigemina* izolatları ile Dünya'da ve Türkiye'de GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, partial rap-1 gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

	470	480	490	500	510	520	530	540
1. AB586126	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
2. AB594816	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
3. AB594817	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
4. AB617642	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
5. AB617643	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
6. AB617644	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
7. AF017284	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
8. AF017285	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
9. AF017286	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
10. AF017287	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
11. AF017288	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
12. AF017289	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
13. BbigrapKys1	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
14. BbigrapKys2	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
15. JN974300 (m...	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
16. JX648554	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
17. KC515386 B...	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
18. KC515387 B...	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
19. KC515388 B...	GCTTTTCAAACTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGAC							
	550	560	570	580	590	600	610	620
1. AB586126	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
2. AB594816	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
3. AB594817	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
4. AB617642	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
5. AB617643	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
6. AB617644	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
7. AF017284	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
8. AF017285	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
9. AF017286	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
10. AF017287	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
11. AF017288	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
12. AF017289	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
13. BbigrapKys1	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
14. BbigrapKys2	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
15. JN974300 (m...	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
16. JX648554	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
17. KC515386 B...	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
18. KC515387 B...	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							
19. KC515388 B...	CTTGGAACCCACCCCTGAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCG							

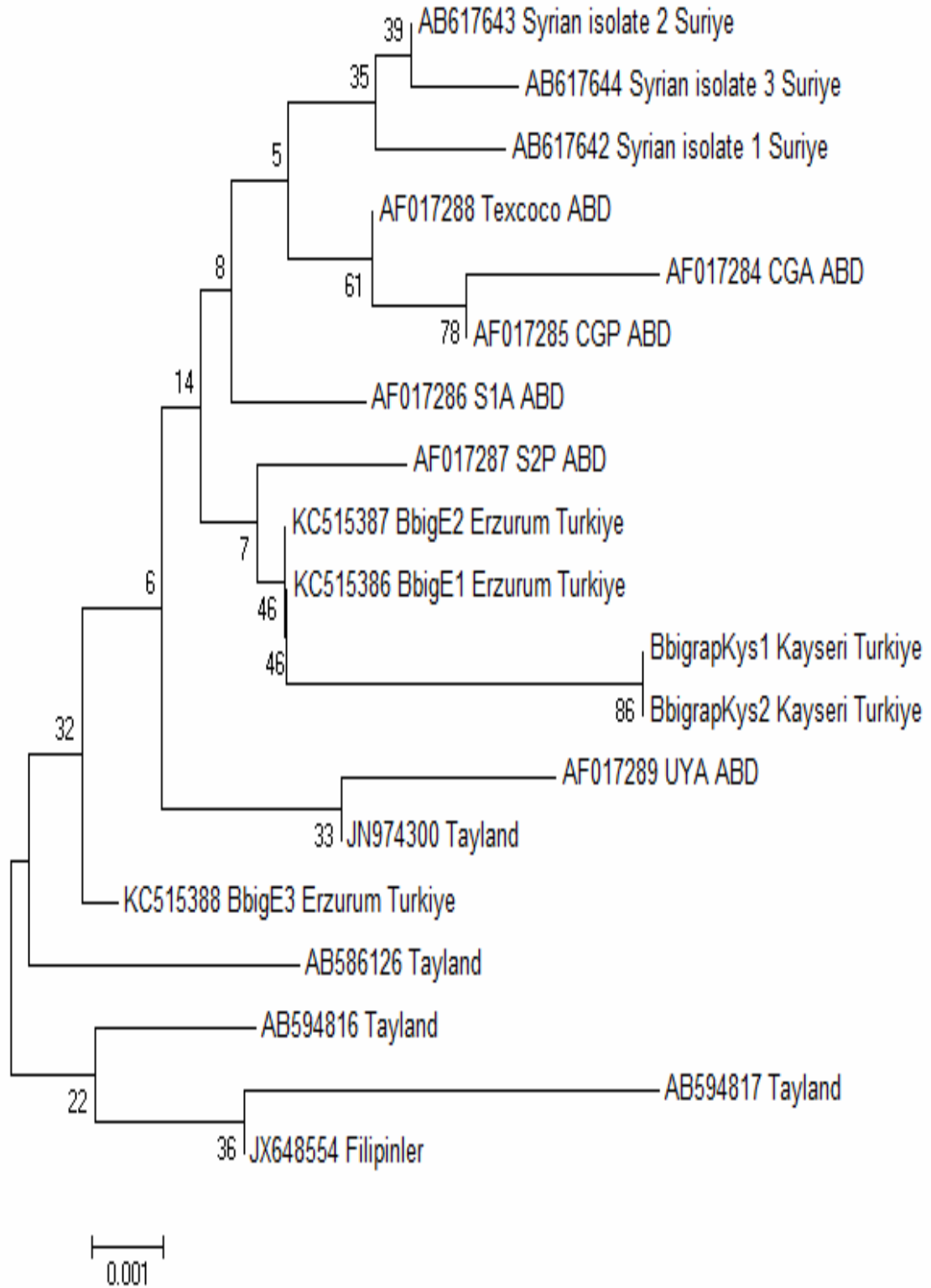
		630	640	650	660	670	680	690	700
1. AB586126		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
2. AB594816		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
3. AB594817		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
4. AB617642		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
5. AB617643		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
6. AB617644		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
7. AF017284		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
8. AF017285		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
9. AF017286		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
10. AF017287		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
11. AF017288		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
12. AF017289		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
13. BtigrapKys1		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
14. BtigrapKys2		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
15. JN974300 (m...		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
16. JX648554		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
17. KC515386 B...		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
18. KC515387 B...		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
19. KC515388 B...		ATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACCGTCAGCGACTACGTCCATTG							
		710	720	730	740	750	760	770	780
1. AB586126		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
2. AB594816		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
3. AB594817		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
4. AB617642		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
5. AB617643		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
6. AB617644		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
7. AF017284		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
8. AF017285		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
9. AF017286		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
10. AF017287		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
11. AF017288		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
12. AF017289		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
13. BtigrapKys1		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
14. BtigrapKys2		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
15. JN974300 (m...		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
16. JX648554		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
17. KC515386 B...		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
18. KC515387 B...		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							
19. KC515388 B...		CCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTCATTGTGAACCTCTTTACTGACCTGCCAAGTTGATTATG							

	760	800	810	820	830	840	850
1. AB586126	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
2. AB594816	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
3. AB594817	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
4. AB617642	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
5. AB617643	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
6. AB617644	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
7. AF017284	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
8. AF017285	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
9. AF017286	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
10. AF017287	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
11. AF017288	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
12. AF017289	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGATATGTC						
13. Bbigrapkys1	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
14. Bbigrapkys2	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
15. JN974300 (m...	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGATATGTC						
16. JX648554	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGATATGTC						
17. KC515386 B...	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
18. KC515387 B...	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						
19. KC515388 B...	AAGCACGTCTCTCAGCCTGTAAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCTGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTC						

	860	870	880	890	900	910	920	930
1. AB586126	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
2. AB594816	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
3. AB594817	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAA							
4. AB617642	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
5. AB617643	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
6. AB617644	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
7. AF017284	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
8. AF017285	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
9. AF017286	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
10. AF017287	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
11. AF017288	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
12. AF017289	GTCCGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGACGTGATTGGCAAGGATGATTAAGGAGCCTAGCCAACAAATA							
13. Bbigrapkys1	GTCCGTCAAAGC							
14. Bbigrapkys2	GTCCGTCAAAGC							
15. JN974300 (m...	GTCCGTCAAAGCAC							
16. JX648554	GTCCGTCAAAGCACCA							
17. KC515386 B...	GTCCGTCAAAGC							
18. KC515387 B...	GTCCGTCAAAGCAC							
19. KC515388 B...	GTCCGTCAAAGCAC							

Şekil 4.8. Kayseri yöresinde sığırlardan toplanmış kenelerden oluşturulmuş DNA havuzlarında belirlenen *B. bigemina* izolatları ile Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer bazı *B. bigemina* izolatlarının partial rap-1 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi rap-1 gen bölgesine göre saptanan *B. bigemina* izolatları arasında çeşitli nükleotid değişimleri belirlenmiştir. *B. bigemina* belirlenen izolatların (BbigrapKys1-BbigrapKys2) pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identiklik, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında $1,0 \pm 0,5$ ve Türkiye’den daha önce girilmiş izolatlarla aralarında $0,7 \pm 0,4$ genetik farklılık belirlenmiştir. Kayseri yöresinde kene havuzlarında belirlenen *B. bigemina* izolatları ile Dünyadan ve Türkiye’den kıyaslamaya dahil edilen diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.9’da verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere BbigrapKys1 ve BbigrapKys2 izolatlarının Türkiye’den BbigE1 ve BbigE2 izolatlarıyla, Dünya’dan ise Amerika Birleşik Devletleri’nden S2P izolatıyla yakın oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Kayseri yöresinde kene havuzlarında saptanan *B. bigemina* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *B. bigemina* izolatlarının rap-1 gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parametre modeli). Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Keneler insanlarda ve hayvanlarda görölen ve zoonotik öneme sahip birçok paraziter, bakteriyel ve viral patojenlerin en önemli vektörlerindendir. Keneler ve kene kaynaklı patojenler özellikle son yıllarda tüm dünyada artış göstermektedir. Kenelerin dağılımı ve yaygınlığı direkt olarak halk sağlığı problemi olup özellikle çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerde keneler insan enfeksiyonlarının rezervuar konakları olabilmekte veya direkt olarak enfeksiyonları nakledebilmektedir. Konaklarından veya sahadan toplanan kenelerin ve bu kenelerde kene kaynaklı patojenlerin moleküler olarak belirlenmesi, coğrafik bir bölgede yeni ortaya çıkan (emerging) kene kaynaklı hastalıkların risk faktörlerinin değerlendirilmesinde kullanışlı olmaktadır (214, 215).

Sığırlarda kenelerle nakledilen en önemli paraziter hastalıklardan birisi babesiosis'tir. Sığır yetiştiriciliğinde babesiosis'in epizootiyolojisi, özellikle stabil ve unstabil bölgelerin bilinmesinde kritik öneme sahiptir. Günümüzde bu epidemiyolojik verilerin doğru şekilde elde edilebilmesi için ileri teknolojik moleküler tekniklerin kullanılmasına ihtiyaç vardır. Bu çerçevede sığır babesiosisi'nin moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesinde DNA tabanlı teknikler kullanılmıştır (66, 67, 156). Bunlardan Real-Time PCR tekniğinin; hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliğı, hedef patojenin kantitatif

belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle avantajlı olduğu belirtilmiştir (161, 216). Dünya’da sığır babesiosisi’nin sığır kanında Real Time PCR’la teşhisinde sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (161, 205, 216, 217, 218). Shebish ve ark. (217) Real Time PCR’la sığırlarda %1,34 *B. bigemina* ve %0,45 *B. bovis* pozitifliği rapor etmişlerdir. Kim ve ark. (161), *B. bovis* ve *B. bigemina*’nın 18S rRNA bölgesini hedef alan primer ve problemlerle TaqMan tabanlı Real-Time PCR araştırmasında, *B. bovis* için sensitiviteyi %96,9, spesifiteyi %100; *B. bigemina* için hem sensitivite hem de spesifiteyi %100 saptamışlardır. Criado-Fornelio ve ark. (216), iki farklı qPCR yönteminin sığır babesiosisi’nin teşhisindeki etkinliğini araştırmışlar, TaqMan prob ve FRET prob bazlı qPCR denemelerinde iki tekniğin spesifitelerini %100 bulmalarına karşın sensitiviteyi TaqMan prob bazlı qPCR yönteminde daha yüksek belirlediklerini kaydetmişlerdir. Ramos ve ark. (205), *B. bovis*’in msa-2c gen bölgesini hedef alarak dizayn ettikleri sybergreen tabanlı qPCR tekniğinin sensitivitesini konvansiyonel PCR’a göre yüksek belirlemişler ve ortalama çözünme sıcaklığını (T_m) 77,41°C ($\pm 0,25^\circ\text{C}$) bulmuşlardır. Yıldırım ve ark. (218), *B. bovis* için Sybergreen tabanlı, *B. bigemina* için de TaqMan prob tabanlı Real Time PCR tekniklerinin Nested PCR ve RLB tekniklerine oranla daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde Düzlü ve ark. (219) Erzurum yöresinde sığır babesiosisi’nin araştırılmasında Real Time PCR tekniğini kullanmışlardır. Mevcut çalışmada kenelerde sığır babesiosisi’nin araştırılmasında Real Time PCR tercih edilmiş olup *B. bovis* ve *B. bigemina* pozitiflikleri ortaya konmuştur. Bu çalışmada *B. bovis* için melting curve analizinde belirlenen 78,1 °C ($\pm 0,2$ °C) T_m değerinin Ramos ve ark. (205), Yıldırım ve ark. (218) ve Düzlü ve ark. (219) tarafından bildirilen T_m değeri ile uyum gösterdiği belirlenmiştir. Real Time PCR ile pozitiflerden *B. bigemina* için sadece 2 örneğin PCR analizlerinde jelde DNA bant profili göstermesi, *B. bovis* için ise hiçbir örnekten bant elde edilememesi yukarıdaki araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir.

Türkiye’de direkt PCR ile sığırlarda babesiosisi’nin teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (68) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bildirilmiştir. Bunu takiben ilk kez RLB tekniği ile yapılan bir saha çalışmasında (61), Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır. Kayseri yöresinde sığırlarda RLB ile *B. bigemina*’nın moleküler prevalansı %0,6 olarak tespit edilmiştir (69). Doğu Karadeniz Bölgesi’nde sığırlar üzerinde RLB tekniği ile yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında

tespit edilmiştir (73). Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan diğer bir saha çalışmasında ise *B. bigemina* prevalansı %2,2 olarak bildirilmiştir (220). Diğer yandan Yıldırım ve ark. (218), Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş olan 400 adet kan örneğinde, RLB ile %14,75, Nested PCR ile %17,75 ve Real Time PCR ile %18,75 oranında *B. bigemina* pozitifliği belirlemişlerdir. Ayrıca RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 5'inin Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bigemina* 2'sinin ise *B. bigemina*+*B. bovis* miks olduğu aynı çalışmada (218) ortaya konmuştur. Düzlü ve ark. (219) Erzurum yöresi sığırlarında Real Time PCR analizleriyle yaptıkları çalışmada *B. bigemina* moleküler prevalansını %5,7 olarak saptamışlardır.

Türkiye'de *B. bovis*'in moleküler prevalansı üzerine Türkiye'de sınırlı sayıda çalışma (221) olup; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (68); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (61) ve %3,6 (60), Trakya Bölgesi'nde %1,3 (83), Ege Bölgesi'nde %1,02 (222) *B. bovis* tespit edilmiştir. Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan diğer bir çalışmada (220) *B. bovis*'in moleküler prevalansı; Amasya'da %4; Bartın'da %2,3, Bolu'da %4,2, Giresun'da %1,6, Karabük'te %1,4, Kastamonu'da %5,6, Samsun'da %3,8 ve Trabzon'da %2,2 olarak belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada (220) genel olarak Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in moleküler prevalansı %1,8 olarak tespit edilmiştir. Diğer yandan Yıldırım ve ark. (218), Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş 400 adet kan örneğinde, RLB ile %4,50, Nested PCR ve Real Time PCR ile %5,75 oranında *B. bovis* pozitifliği bildirmişlerdir. Ayrıca söz konusu çalışmada (218) RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 9'unun Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bovis* olduğu ortaya konmuştur. Düzlü ve ark. (219) Erzurum'daki sığırlardan toplanmış 300 kan örneğinin Real Time PCR analizlerinde 28'inde (%9,3) *B. bovis* pozitifliği rapor etmişlerdir.

Türkiye'de bugüne kadar *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın kenelerde moleküler olarak araştırılmasıyla ilgili oldukça sınırlı çalışma bulunmakta olup bu çalışmaların konvansiyonel PCR, RLB gibi moleküler teşhis yöntemleriyle yapıldığı dikkati çekmiştir. Mevcut çalışma kenelerde *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın dünyada Real Time PCR ile araştırıldığı ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir. İça ve ark. (70) Kayseri yöresindeki sığırlardan ve barınaklardan toplanan kenelerden oluşturulmuş DNA havuzlarında RLB metodu ile inceleme yapmışlar ve %14 *B. bigemina*, %2,3 *Babesia* sp. ve %2,3 *T. annulata* + *B. bigemina* miks pozitifliği rapor etmişlerdir. Bu

çalışmada saptanan *Babesia* sp. (Kayseri 1) izolatının sekans analizlerinde Çin'den identifiye edilmemiş *Babesia* türleri ile aynı clade'te yer aldığı tespit edilmiştir. Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada Aktaş ve ark. (223) Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan toplanmış toplam 2160 ergin keneden oluşturdukları 224 DNA havuzunda RLB ile *Babesia* türlerini araştırmış ve %3,33'lük *Babesia* sp. pozitifliği belirlemişlerdir. Elde ettikleri *Babesia* sp. pozitif örneklerin sekans analizlerinde bu örneklerin İça ve ark. (70)'nın çalışmasında buldukları *Babesia* sp. pozitiflerde olduğu gibi isimlendirilmemiş *Babesia* türleriyle yüksek homoloji gösterdiğini saptamışlardır. Mevcut çalışmada ise İça ve ark. (70)'nın araştırdığı aynı kene havuzlarında *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın varlığı RLB metoduna göre daha duyarlı olan Real Time PCR metodu ile incelenmiş ve incelemesi yapılan 38 adet genomik DNA havuzunun 8'inde (%21,0) *B. bigemina*, 2'sinde (%5,2) ise *B. bovis* pozitifliği saptanmıştır. Mevcut çalışmada *B. bigemina* varlığı İça ve ark. (70)'nın bulduğu prevalans oranına göre daha yüksek bulunmuş ve ayrıca 2 örnekte de *B. bovis* pozitifliği belirlenmiştir. Dolayısıyla aynı kene havuzlarında farklı yöntemlerle yapılan çalışmalarda Real Time PCR tekniğinin RLB yöntemine göre daha duyarlı olduğu teyit edilmiştir. Türkiye'de sığırlardan toplanan kenelerden oluşturulmuş DNA havuzlarında yapılan araştırmalarda İça ve ark. (70) *B. bigemina* pozitifliğini *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ve *R. turanicus* kenelerinde, Aktaş ve ark. (223) ise *Babesia* spp. pozitifliğini *H. marginatum marginatum*, *H. anaticum excavatum* ve *R. (Boophilus) annulatus* kenelerinde saptamışlardır. Mevcut çalışmada ise *B. bigemina* pozitiflikleri *Rh. annulatus*, *H. marginatum marginatum*, *Rh. turanicus* ve *H. anaticum anaticum* havuzlarında saptanırken, *B. bovis* pozitif örneklerin her ikisi de *H. m. marginatum* havuzunda tespit edilmiş ve böylelikle kenelerin sığır babesiosis'i yönünden vektörlük potansiyelleri ortaya konulmuştur.

Dünyada sığır babesiosisi'nin kenelerde moleküler olarak araştırılmasına dair çalışmalar sınırlıdır. Tsai ve ark. (224) Tayvan'da konvansiyonel PCR ile yaptıkları bir çalışmada sığırlardan toplanan toplam 254 kenenin hiçbirinde *Babesia* pozitifliği saptayamamışlardır. Mısır'da sığırlardan toplanmış 5243 ixodid ve argasid kenede PCR ile %55 *B. bovis* ve %66 *B. bigemina* pozitifliği saptanmış olup saptanan pozitiflerin hepsi de *Rh. annulatus* kenelerinden izole edilmiştir (225). Nijerya'da sığırlardan toplanan toplam 198 kenede (*Amblyomma variegatum* (n= 153), *R. decoloratus* (n = 45)) RLB ile yapılan bir çalışmada *Amblyomma variegatum* kenelerinde %3,9 *Babesia*

spp., %1,3 *B. bigemina* ve %0,6 *B. divergens* pozitifliği saptanmıştır (226). Brezilya’da konavansiyonel PCR ve Nested PCR ile yapılan bir çalışmada 27 buzağıdan toplanan toplam 258 *Rh. microplus* kenesinin 145’i *B. bigemina* ve 12’si *B. bovis* ve 25 sığırdan toplanan toplam 245 *Rh. microplus* kenesinin 43’ü *B. bovis* ve 39’u *B. bigemina* ile enfekte bulunmuştur (227). Etiyopya’da sığırlardan toplanan *Amblyomma*, *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* soylarındaki toplam 1246 kenede standard PCR ile yapılan bir çalışmada *Babesia* türlerine rastlanılmamıştır (228).

Apicomplexan protozoonların apikal organellerinden salgılanan proteinlerin, parazitin konak hücresine invazyonunda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (229). Bugüne kadarki çalışmalarda parazitin eritrositlere invazyonunda VMSA’nın önemli olduğu bildirilmiş olup *B. bovis*’e özgü msa-2c geninin, diğer VMSA gen bölgelerine göre *B. bovis* suşları arasında yüksek oranda korunmuş olduğu ve aşı çalışmalarında tercih edildiği rapor edilmiştir (175). *B. bigemina* için rap-1 gen familyasının; sahip olduğu çeşitli immünolojik epitoplarla spesifik antikorların oluşumuna yol açarak merozoitlerin sağlam eritrositlere invaze olmasını engellediği, *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde ve aşı çalışmalarında önemli olduğu bildirilmiştir (217, 230). *B. bovis*’in VMSA gen bölgeleriyle ilgili Türkiye’de bugüne kadar üç çalışma rapor edilmiştir (219, 220, 231). Mevcut çalışmamızda ise Real Time PCR ile 2 izolat *B. bovis* yönünden pozitif bulunmuş fakat Ct değerleri çok yüksek olduğundan agaroz jel üzerinde DNA bant profili elde edilememiştir. *Babesia bigemina* için ise Real Time PCR ile pozitif belirlenen 8 örnekten sadece 2’si agaroz jel üzerinde DNA bant profili göstermiş olup bu izolatların (BbigrapKys1-BbigrapKys2) kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında %1,0±0,5 ve Türkiye’den daha önce girilmiş izolatlarla aralarında %0,7±0,4 genetik farklılık bulunduğu belirlenmiştir. Kayseri BbigrapKys1-BbigrapKys2 izolatlarının dünyadan en yüksek identikliği %99,93 ile Amerika’dan S1A (AF017286), S2P (AF017287) ve Texcoco (AF017288) izolatlarıyla gösterdikleri tespit edilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere *B. bigemina* Kayseri BbigrapKys1-BbigrapKys2 izolatlarının Erzurum BbigE1 ve BbigE2 izolatları ve A.B.D S2P izolatıyla birlikte aynı branşta yer aldığı görülmüştür. Rap-1 gen bölgesinin, msa-2c gen bölgesiyle kıyaslandığında Dünyadaki benzer izolatlar arasında identiklik oranlarının daha yüksek olduğu ve daha yüksek oranda korunmuş bölgeye sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte araştırma yöresinde belirlenen *B. bigemina* izolatlarının rap-1 gen bölgesine ait

aminoasit sekanslarının analizi sonucu BbigrapKys1-BbigrapKys2 izolatlarının protein profilleri bakımından %100 identik oldukları saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kayseri yöresindeki sığırlarından toplanmış kenelerden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın varlığı ve yaygınlığı, diğer moleküler tabanlı teşhis yöntemlerine göre sensitivite ve spesifitesi oldukça yüksek olan Real Time PCR tekniği ile dünyada ilk kez ortaya konmuştur. *B. bigemina* rap-1 gen bölgesi moleküler olarak karakterize edilerek GenBank'ta kayıtlı Türkiye'deki ve Dünyadaki benzer izolatlarla filogenetik kıyaslamaları yapılarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Ct (dR) değerlerine göre enfekte kenelerde her iki türün de düşük parazitemiye sahip olduğu görülmüştür. Bu açıdan özellikle rezervuar vektörlerin ve hayvanların ortaya konmasında Real Time PCR'ın oldukça avantajlı ve güvenilir bir yöntem olduğu dikkati çekmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. McCosker JP. The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 1-24.
2. Kuttler KL, Clifford DJ, Touray BN. Prevalance of anaplasmosis and babesiosis in N'Dama cattle of the Gambia. Trop Anim Hlth Prod 1988; 20(1): 37-41.
3. Angus B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasitol 1996; 26: 1341-1355.
4. Uilenberg G. *Babesia* – A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138: 3-10.
5. İnci A. Orta Anadolu Bölgesinde Sığır Babesiosisi, XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp 18-23 Kasım 2007, ss 77-78.
6. Systema Naturae 2000, The Taxonomicon, Universal Taxonomic Services, Amsterdam. Erişim: [<http://sn2000.taxonomy.nl/>], Erişim Tarihi: 08.01.2010
7. Oosthuizen MC, Zwegarth E, Collins NE, et al. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2247-2251.
8. Purnell RE. Babesiosis in various hosts. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 25-64.
9. Allsopp MT, Cavalier-Smith T, De Waal DT, et al. Phylogeny and evolution of the piroplasms. Parasitology 1994; 108: 147-152.

10. Allsopp MT, Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1081: 509-517.
11. Rudzinska MA. Host-cell-parasite relationships. In: Ristic M, Kreier JP (eds), *Babesiosis*. New York, Academic Press 1981; pp 88-135.
12. Mehlhorn H, Schein E. The piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. In: Baker JR, Muller R (eds), *Advances in Parasitology*. Academic Press 1984; pp 69-89.
13. Friedhoff KT. Transmission of *Babesia*. In: Ristic M (ed), *Babesiosis of Domestic Animals and Man*, Boca Raton, Florida, CRC Press 1988; pp 23-52.
14. Mackenstedt U, Gauer M, Fuchs P, et al. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol Res* 1995; 81: 595-604.
15. De Vos AJ, Dalglish RJ, Callow LL. *Babesia*. In: Soulsby EJJ (ed), *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*, Vol. III Boca Raton, CRC Press Inc 1987.
16. Gray JS, Weiss LM. *Babesia microti*. In: Khan N (ed.), *Emerging Protozoan Pathogens*. Taylor and Francis, Abingdon, UK 2008; pp 303-349.
17. Gough JM, Jorgensen WK, Kemp DH. Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* in vitro. *J Eukaryot Microbiol* 1998; 45: 298-306.
18. Agbede RIS, Kemp DH, Hoyte HMD. Secretory and digest cells of female *Boophilus microplus*: invasion and development of *Babesia bovis*; light and electron microscope studies. In: Sauer JR, Hair AJ (eds), *Morphology, Physiology and Behavioural Biology of Ticks*. New York, Wiley and Sons 1986; pp 457-471.
19. Bock R, Jackson L, de Vos A, et al. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 2004; 129: 247-269.
20. Hoyte HM. Initial development of infectious *Babesia bigemina*. *Aust Vet J* 1961; 8: 462-466.
21. Potgieter FT, Els HJ. Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. *Onderstepoort J Vet* 1977; 44: 213-231.

22. Callow LL, Hoyte HMD. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the tick cattle *Boophilus microplus*. Aust Vet J 1961; 37: 381-390.
23. Riek RF. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agr Res 1964; 15: 802-821.
24. Dalgliesh RJ, Stewart NP, Callow LL. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus* [letter]. Aust Vet J 1978; 54: 205-206.
25. Riek RF. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignie`res, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agr Res 1966; 17: 247-254.
26. Hunfeld KP, Hildebrant A, Gray JS. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. Int J Parasitol 2008; 38: 1219-1237.
27. Levine ND. Veterinary Protozoology. Iowa State University Press Ames, 1th Edition 1985; pp 291-312.
28. Soulsby EJJ. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall. 1986, London.
29. Ekrem İ. Piroplasmoslar hakkında en yeni malumat. Türk Baytarlar Mecmuası 1931; 6: 65-73.
30. Lestoquard M. Piroplasmoslar. Baytari Mecmua 1931; 9: 8-9.
31. Gören S, Yetkin R. Tek tırnaklılarda, sığırdada, koyunda, keçide ve köpekte piroplazmoz. Milli Müd Baytar Bakt Serum ve Aşı Evi Yay 1935.
32. Aysoy S. Piroplasmos (Piroplasmose). Tıbbi Klinik Kılavuzu, Talebe Ders Kılavuzu, Sayı 24, Yüksek Ziraat Enstitüsü Matbaası, Ankara 1941.
33. Mimioğlu M. Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu Vilayetlerinde “Haematurai vesicalis bovis”li sığırlarda parasitolojik araştırmalar, Ankara Üniv Vet Fak Derg 1955, 11: 183-192.
34. Kurtpınar H. Erzurum, Kars, Ağrı vilayetlerinde sığır, koyun ve keçilerin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurduğu hastalıklar. Türk Vet Hek Dern Derg 1956; 26: 3226-3232.

35. Göksu K. Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1959; 115: 60.
36. Özcan CH. Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen Piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Basımevi 1961; ss 10-106.
37. Erkut HM. Ege bölgesindeki sığırlarda piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. Bornova Vet Araş Enst Derg 1967; 8: 120-130.
38. Göksu K. Batı Karadeniz bölgesi illerinin sığırlarında gözlenen *Babesidae* (Sporozoa: Piroplasmida) enfeksiyonları. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1968; 15: 46-57.
39. Göksu K. Doğu Anadolu Bölgesinde hayvanlarda görülen başlıca paraziter hastalıklar ve bunlarla savaşta göz önüne alınacak hususlar. Türk Vet Hek Dern Derg 1969; 39 (4): 13-22.
40. Göksu K. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları (piroplasmosis, babesiosis, theileriosis ve anaplasmosis'in yayılış durumları). Türk Vet Hek Dern Derg 1970; 40 (4): 29-39.
41. Hoffman G, Hörchner F, Schein E, et al. Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in des asiatischen provinzen der Turkei. Berl Münch Tierarztl Wschr 1971; 84: 152-156.
42. Mimioğlu M, Güler S, Ulutaş M. Untersuchungen über die Blutparasiten bei rindem in der Türkei. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1972; 2: 183-192.
43. Tüzer E. İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 1981; 8 (1): 97-110.
44. Dumanlı N, Özer E. Elazığ yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniv Vet Fak Derg 1987; 3(1): 159-166.
45. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, ve ark. Beytepe köyünde sığır babesiosisi üzerinde seroepidemiolojik araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ No:104, İstanbul 1989.
46. Taşçı S. Van bölgesinde sığır ve koyunlarda görülen kene türleri ile bunların taşıdığı kan parazitleri arasındaki ilişkiler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1989; 36(1): 53-63.

47. Dinçer Ş, Sayın F, Karaer Z, ve ark. Karadeniz bölgesi sığırlarında, bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1991; 38 (1-2): 206-226.
48. İnci A. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1991.
49. Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E, ve ark. Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. Turk J Vet Am Sci 1993; 17 (3): 209-215.
50. Açıcı M. Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. Etlik Vet Mik Derg 1995; 8 (1-2): 271-277.
51. İnci A, Çakmak A, Karaer Z, ve ark. Kayseri yöresinde sığırlarda babesiosisin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1345-1350.
52. Sevinc F, Sevinc M, Birdane MF, et al. Prevalence of *Babesia bigemina* in cattle. Revue de Méd Vét 2001; 152(5): 395-398.
53. Aktaş M, Dumanlı N, Karaer Z, ve ark. Elazığ, Malatya, ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25 (4): 447-451.
54. Nalbantoğlu S, Vatansever Z, Karaer Z, ve ark.. The epidemiology of cattle babesiosis in Adana region. Babesia World Summit, December 1-3, Buenos Aires, Argentina 2005.
55. Sevinç F, Özdemir Ö, Coşkun A. Onbir günlük bir buzağıda akut Babesiosis. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2005; 2: 131-135.
56. Çakmak A. Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara. Tierarztl Hochsch Diss Hannover 1987.
57. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, ve ark. Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. Tebliğ No:103, İstanbul 1989.
58. Eren H. Ankara yöresinde sığır babesiosisinin sero-prevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993; 40 (1): 23-37.

59. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, ve ark. Studies on seroprevalence of *Babesia* infection of cattle in Turkey. In: Özcel MA (ed), New dimensions in parasitology, 1996; 20(1):505-516.
60. Vatansever Z, Nalbantoğlu S, Çakmak A. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'nin epidemiyolojisi. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Elazığ 2001.
61. Vatansever Z, İça A, Deniz A, ve ark. Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. 194, Konya 2003.
62. İça A. Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin indirek floresan antikor ve reverse line blotting yöntemi ile karşılaştırmalı tanısı. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2004; 1(2): 77-85.
63. Kaya G, Cakmak A, Karaer Z. Seroprevalance of theileriosis and babesiosis of cattle. Medycyna Wet 2006; 62 (2): 156-158.
64. Çakmak A, Öz İ. Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993;40 (1): 70-77.
65. Rijpkema SG, Molkonboer MJ, Schouls LM, et al. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* Sensulato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterisation of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. J Clin Microbiol 1995; 33: 3091-3095.
66. Gubbels MJ, De Vos S, Van Der Weide M, et al. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blotting hybridization. J Clin Microbiol 1999; 37: 1782-1789.
67. Schnittger L, Yin H, Qi B, et al. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res 2004; 92: 189-196.
68. Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, ve ark. Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. T Parazitol Derg 2002; 26 (1): 42-47.

69. İa A, İnci A, Yıldırım A. Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. Turk J Vet Anim Sci 2007; 31: 33-38.
70. İa A, Vatansever Z, Yıldırım A, et al. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. Vet Parasitol 2007; 148(2): 156-160.
71. İnci A, İa A, Florin-Christensen M, ve ark. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın moleküler karakterizasyonu. XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp, 18-23 Kasım 2007, ss 163-164.
72. İa A, İnci A, Yıldırım A, ve ark. Türkiye'de sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin moleküler prevalansı. XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Adana, 1-7 Kasım 2009, s 215.
73. Altay K, Aydın MF, Dumanlı N, et al. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158: 295-301.
74. Mahoney DF. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier JP (ed), Parasitic Protozoa. New York, Academic Press 1977; pp 1-52.
75. Jack RM, Ward PA. Organ and vascular pathology of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 459-470.
76. Wright IG, Goodger BV. Pathogenesis of Babesiosis. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, Florida, CRC Press 1988; pp 99-118.
77. Sonenshine DE. Biology of Ticks. Newyork, Oxford, Oxford University Press Vol. II, Chapter V 1993.
78. Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, et al. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev 2003; 16(4): 622-636.
79. Clark IA, Jacobson LS. Do babesiosis and malaria share a common disease process? Ann Trop Med Parasitol 2005; 92 (4): 483-488.
80. Zintl A, Gray JS, Skerrett HE, et al. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. Parasite Immunol 2005; 27 (4): 115-120.
81. İnci A. Ankara'nın çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1992; 39(1-2): 153-167.

82. Düzgün A, Alabay M, Çerçi H, ve ark. A serological study for babesiosis in cattle in Turkey using the ELISA test. IAEA-TECDOC-657 1991; pp 175-177.
83. Bilgin Z. Trakya’da sığırlarda bulunan Theileria ve Babesia türlerinin ve bunların sığırlarda yaygınlığının reverse line blooting (RLB) tekniği ile araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2007.
84. Gün H, Tanyüksel M, Yukarı BA, ve ark. Türkiye’de babesiosisin ilk insan serodiyagnozu. T Parazitol Derg 1996; 20 (1): 1-7.
85. Homer MJ, Bruinsma ES, Lodes MJ, et al. A polymorphic multigene family encoding an immunodominant protein from *Babesia microti*. J Clin Microbiol 2000; 38: 362-368.
86. İnci A, İça A, Albasan H. *Babesia* Enfeksiyonlarında İmmunité. In: Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E (eds), Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 2007, No:21, ss 508-515.
87. Tizard IR. Veterinary immunolgy: An Introduction. 8th Edition, Saunders 2009; pp 312-329.
88. Allred DR, Al-Khedery B. Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 50-60.
89. Mosqueda J, McElwain TF, Palmer GH. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. Infect Immun 2002; 70 (11): 6448-6455.
90. James MA. Application of exoantigens of *Babesia* and *Plasmodium* in vaccine development. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989; 83: 67-72.
91. Suarez CE, Florin-Christensen M, Hines SA, et al. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. Infect Immun 2000; 68 (12): 6865-6870.
92. Carcy B, Précigout E, Schetters T, et al. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 33-49.

93. Fukumoto S, Tamaki Y, Shirafuji H, et al. Immunization with recombinant surface antigen P50 of *Babesia gibsoni* expressed in insect cells induced parasite growth inhibition in dogs. Clin Diagn Lab Immunol 2005;12 (4): 557-559.
94. Terkawi MA, Jia H, Zhou J, et al. *Babesia gibsoni* ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against *B. microti* infection in mice. Vaccine 2007; 25 (11): 2027-2035.
95. De la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol 2006; 28 (7): 275-283.
96. De Vos AJ, Bock RE. Vaccination against bovine babesiosis. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 540-545.
97. Edelhofer R, Müller A, Schuh M, et al. Differentiation of *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* and *B. major* by western blotting--first report of *B. bovis* in Austrian cattle. Parasitol Res 2004; 92 (5): 433-435.
98. Shkap V, Leibovitz B, Krigel Y, et al. Vaccination of older Bos taurus bulls against bovine babesiosis. Vet Parasitol 2005; 129 (3-4): 235-242.
99. De Waal DT, Combrink MP. Live vaccines against bovine babesiosis. Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 88-96.
100. Zwart D, Brocklesby DW. Babesiosis: non-specific resistance, immunological factors and pathogenesis. Adv Parasitol 1979; 17: 49-113.
101. Levy MG, Clabaugh G, Ristic M. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. Infect Immun 1982; 37 (3): 1127-1131.
102. Goff WL, Johnson WC, Parish SM, et al. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. Parasite Immunol 2001; 23 (9): 463-471. 102
103. Joyner LP, Donnelly J, Payne R, et al. The indirect fluorescent antibody test for the differentiation of infections with *Babesia divergens* or *Babesia major*. Res Vet Sci 1972; 13 (6): 515-518.
104. Christensson DA. Inverse age resistance to experimental *Babesia divergens* infection in cattle. Acta Vet Scand 1989; 30 (4): 453-464.

105. Johnson WC, Cluff CW, Goff WL, et al. Reactive oxygen and nitrogen intermediates and products from polyamine degradation are Babesiicidal in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 791: 136-147.
106. Goff WL, Johnson WC, Horn RH, et al. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunol* 2003; 25 (4): 185-188.
107. Goff WL, Storset AK, Johnson WC, et al. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol* 2006; 28 (5): 221-228.
108. Stich RW, Shoda LK, Dreewes M, et al. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect Immun* 1998; 66 (9): 4130-4136.
109. Shoda LK, Palmer GH, Florin-Christensen J, et al. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect Immun* 2000; 68 (9): 5139-5145.
110. Brown GK, Canfield PJ, Dunstan RH, et al. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. *Aust Vet J* 2006; 84 (9): 321-325.
111. Brown WC, Estes DM, Chantler SE, et al. DNA and a CpG oligonucleotide derived from *Babesia bovis* are mitogenic for bovine B cells. *Infect Immun* 1998; 66 (11): 5423-5432.
112. Werling D, Hope JC, Howard CJ, et al. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 2004; 111 (1): 41-52.
113. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, et al. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(3): 451-469.
114. McGuire TC, Musoke AJ, Kurtii T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. *Immunology* 1979; 38: 249-256.

115. Dalglish RJ. Babesiosis. In: Warren KS (ed), Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. Oxford, Blackwell 1993, pp 352-383.
116. Estes DM, Closser NM, Allen GK. IFN- γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. Cell Immunol 1994; 154: 287-295.
117. Echaide IE, Hines SA, McElwain TF, et al. In vivo binding of immunoglobulin M to the surfaces of *Babesia bigemina*-infected erythrocytes. Infect Immun 1998; 66: 2922-2927.
118. Chapman WE, Ward PA. *Babesia rodhaini*: requirement of complement for penetration of human erythrocytes. Science 1977; 196 (4285): 67-70.
119. Parrodi F, Jacobson RH, Wright IG, et al.. The effect of immune serum and complement on the in vitro phagocytosis of *Babesia rodhaini*. Parasite Immunol 1991; 13: 457-471.
120. Meeusen E, Lloyd S, Soulsby EJ. *Babesia microti* in mice: adoptive transfer of immunity with serum and cells. Aust J Exp Biol Med Sci 1984; 62: 551-566.
121. Ruebush MJ, Hanson WL. Transfer of immunity to *Babesia microti* of human origin using T lymphocytes in mice. Cell Immunol 1980; 52: 255-265.
122. Clark IA, Allison AC. *Babesia microti* and *Plasmodium berghei yoelii* infections in nude mice. Nature 1974; 252: 328-329.
123. Zivkovic D, Speksnijder JE, Kuil H, et al. Immunity to *Babesia* in mice. III. The effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum on mice immune to *Babesia rodhaini*. Vet Immunol 1985; 9: 131-142.
124. Matsubara J, Koura M, Kamiyama T. Infection of immunodeficient mice with a mouse-adapted substrain of the gray strain of *Babesia microti*. J Parasitol 1993; 79: 783-786.
125. Ruebush MJ, Troutman EH, Kennedy DA. Delayed-type hypersensitivity to *Babesia microti*-infected erythrocytes in mice. Cell Immunol 1986; 98: 289-299.
126. Igarashi I, Waki S, Ito M, et al. Role of CD4⁺ T cells in the control of primary infection with *Babesia microti* in mice. J Protozool Res 1994; 4: 164-171.

127. Shimada T, Shikano S, Hashiguchi R, et al. Effects of depletion of T cell subpopulations on the course of infection and anti-parasite delayed type hypersensitivity response in mice infected with *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. J Vet Med Sci 1996; 58: 343-347.
128. Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW. Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? Ann Int Med 1993; 119: 284-290.
129. Hemmer RM, Ferrick DA, Conrad PA. Role of T cells and cytokines in fatal and resolving experimental babesiosis: protection in TNFR p55 $-/-$ mice infected with the human *Babesia* WA1 parasite. J Parasitol 2000; 86: 736-742.
130. Aguilar-Delfin I, Homer MJ, Wettstein PJ, et al. Innate resistance to *Babesia* infection is influenced by genetic background and gender. Infect Immun 2001; 69: 7955-7958.
131. Zivkovic D, Seinen W, Kuil H, et al. Immunity to *Babesia* in mice. I. adoptive transfer of immunity to *Babesia rodhaini* with immune spleen cells and the effect of irradiation on the protection of immune mice. Vet Immunol 1984; 5: 343-357.
132. Eugui EM, Allison AC. Differences in susceptibility of various mouse strains to haemoprotozoan infections: possible correlation with natural killer activity. Parasitol Immunol 1980; 2: 277-292.
133. Saeki H, Ishii T. Effect of silica treatment on resistance to *Babesia rodhaini* infection in immunized mice. Vet Parasitol 1996; 61: 201-210.
134. Rosenblatt-Bin H, Klein A, Sredni B. Antibabesial effect of the immunomodulator AS101 in mice: role of increased production of nitric oxide. Parasite Immunol 1996; 18: 297-306.
135. Clark IA. Does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? Lancet 1978; 75-77.
136. Shoda LKM, Kegerreis KA, Suarez CE, et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor-alpha, and nitric oxide. Infect Immun 2001; 69: 2162-2171.
137. Yarovinski F, Zhang D, Andersen JF. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. Science 2005; 308: 1626-1629.

138. Zhang D, Zhang G, Hayden MS. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-1526.
139. Lauw FN, Caffrey DR , Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 2005; 26: 509-511.
140. Vial HJ, Eldin P, Tielens AG, et al. Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 126 (2):143-154.
141. Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, et al. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol* 2007; 297 (3): 197-204.
142. Skotarczak B. Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics. *Wiad Parazytol* 2007; 53 (4): 271-280.
143. Kim C, Alhassan A, Verdida RA, et al. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. *Vet Parasitol* 2007; 148 (2): 137-143.
144. Böse R, Jorgensen WK, Dalglish RJ, et al. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol* 1995; 57: 61-74.
145. Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. *Clin Infect Dis* 2009; 49(7):1103-1108.
146. Todorovic RA, Carson CA. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In: Ristic M, Kreier JP (eds), *Babesiosis*. New York, Academic Press 1981; pp 381-409.
147. Bakheit MA, Seitzer U, Mbatia PA, et al. Serological diagnostic tools for the major tick-borne protozoan diseases of livestock. *Parassitologia* 2007; 49 Suppl 1: 53-62.
148. Rehbein G, Heidrich-Joswig S. Use of schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody and complement fixation tests. *Vet Parasitol* 1983; 12(2):135-144.
149. Weiland G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Parasitol* 1986; 20(1-3):43-48.

150. Singh H, Mishra AK, Rao JR, et al. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. Trop Anim Health Prod 2009; 41(2):153-9.
151. Urdaz-Rodríguez JH, Fosgate GT, Waghela SD, et al. Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for *Babesia bovis* in commercial dairy farms of Puerto Rico. Trop Anim Health Prod 2009; 41(7):1465-1473.
152. Cantu CA, Ortega-S JA, García-Vázquez Z, et al. Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico. J Parasitol 2009; 95(3):536-542.
153. Ferreri L, Benitez D, Dominguez M, et al. Water buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149:149-151.
154. Silva MG, Henriques G, Sánchez C, et al. First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. Vet Parasitol 2009; 166(1-2):66-72.
155. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, et al. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. Parasitol Res 2009;105(1):249-254.
156. Criado-Fornelio A. A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. Parassitologia 2007; 49 Suppl 1:39-44.
157. Lau AO, Tibbals DL, McElwain TF. *Babesia bovis*: the development of an expression oligonucleotide microarray. Exp Parasitol 2007; 117(1):93-98.
158. Liu Q, Zhou YQ, Zhou DN, et al. Semi-nested PCR detection of *Babesia orientalis* in its natural hosts *Rhipicephalus haemaphysaloides* and buffalo. Vet Parasitol 2007; 143(3-4): 260-266.
159. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. J Microbiol Methods 2007; 71(3):281-287.

160. Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40(1):35-39.
161. Kim C, Iseki H, Herbas MS, et al. Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(5):837-841.
162. Ica A, Vatansever Z, Yildirim A, et al. Investigation of ovine blood protozoa by reverse line blotting in the Kayseri region. 2. *Babesia* World Summit, Palermo, Italy, *Parassitologia* 2007a; 49 (1): 90.
163. Altay K, Aktas M, Dumanli N, et al.. Evaluation of a PCR and comparison with RLB for detection and differentiation of *Theileria* sp. MK and other *Theileria* and *Babesia* species of small ruminants. *Parasitol Res* 2008; 103: 319-323.
164. Laughery JM, Lau AO, White SN, et al. *Babesia bovis*: transcriptional analysis of rRNA gene unit expression. *Exp Parasitol* 2009; 123(1):45-50.
165. Suarez CE, McElwain TF. Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites. *Int J Parasitol* 2009; 39(3): 289-297.
166. Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, et al. Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 533-539.
167. Georges K, Loria GR, Riili S, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet. Parasitol* 2001; 99: 273-286.
168. García-Sanmartín J, Nagore D, García-Pérez AL, et al. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet Res* 2006; 9: 2-16.
169. Almeria S, Castella J, Ferrer D, et al. Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 969: 78-82.
170. Almería S, Delgado-Neira Y, Adelantado C, et al. Mediterranean theileriosis and other tick transmitted piroplasmoses in cattle in Minorca (Balearic Islands, Spain): the

- effect of tick control on prevalence levels analyzed by reverse line blot (RLB) macroarrays. *J Parasitol* 2009; 95(3): 598-603.
171. Luo J, Yin H, Liu Z, et al. Molecular phylogenetic studies on an unnamed bovine *Babesia* sp. based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Vet Parasitol* 2005; 133(1):1-6.
 172. Liu Q, Zhao JL, Zhou YQ, et al. Study on some molecular characterization of *Babesia orientalis*. *Vet Parasitol* 2005; 130(3-4):191-198.
 173. Martins TM, Neves L, Pedro OC, et al. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. *Parasitology* 2010; 4:1-8.
 174. Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, et al. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 127(2):133-141.
 175. Wilkowsky SE, Farber M, Gil G, et al. Molecular characterization of *Babesia bovis* strains using PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the msa2-a/b genes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:141-144.
 176. Zupańska AK, Drummond PB, Swetnam DM, et al. Universal primers suitable to assess population dynamics reveal apparent mutually exclusive transcription of the *Babesia bovis* ves1alpha gene. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 166(1):47-53.
 177. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, et al. *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:145-148.
 178. Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, et al. Phylogenetic analysis of Mexican *Babesia bovis* isolates using msa and ssrRNA gene sequences. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1149: 121-125.
 179. Genis AD, Perez J, Mosqueda JJ, et al. Using msa-2b as a molecular marker for genotyping Mexican isolates of *Babesia bovis*. *Infect Genet Evol* 2009; 9(6):1102-1107.

180. Brown WC, Norimine J, Goff WL, et al. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunol* 2006; 28(7): 315-327.
181. Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, et al. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect Immun* 2002; 70(3):1599-1603.
182. Suarez CE, McElwain TF. Transfection systems for *Babesia bovis*: a review of methods for the transient and stable expression of exogenous genes. *Vet Parasitol* 2010; 167(2-4): 205-215.
183. Dominguez M, Echaide I, Echaide ST, et al. In silico predicted conserved B-cell epitopes in the merozoite surface antigen-2 family of *B. bovis* are neutralization sensitive. *Vet Parasitol* 2010; 167(2-4):216-226.
184. Leroith T, Brayton KA, Molloy JB, et al. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. *Infect Immun* 2005; 73(9):5388-5394.
185. Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, et al. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. *Infect Immun* 2005; 73(11):7180-7189.
186. Bono MF, Mangold AJ, Baravalle ME, et al. Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 2008; 157(3-4):203-210.
187. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, et al. Sequence and functional analysis of the intergenic regions separating babesial rhoptry-associated protein-1 (rap-1) genes. *Exp Parasitol* 1998; 90 (2): 189-194.
188. Kuttler KL, Gipson CA, Goff WL, et al. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *Am J Vet Res* 1986; 47 (8): 1668-1670.
189. Rashid HB, Chaudhry M, Rashid H, et al. Comparative efficacy of diminazene diacetate and diminazene acetate for the treatment of babesiosis in horses. *Trop Anim Health Prod* 2008; 40(6):463-467.
190. Aryeetey R, Jimenez-Lucho V. Babesiosis. *Curr Treat Options Infect Dis* 2002; 4: 319-326.

191. Sakuma M, Setoguchi A, Endo Y. Possible emergence of drug-resistant variants of *Babesia gibsoni* in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. J Vet Intern Med 2009; 23(3): 493-498.
192. Aboulaila M, Nakamura K, Govind Y, et al. Evaluation of the in vitro growth-inhibitory effect of epoxomicin on *Babesia* parasites. Vet Parasitol 2010; 167(1): 19-27.
193. Wijaya A, Wulansari R, Ano H, et al. Effect of clindamycin therapy on phagocytic and oxidative activity profiles of spleen mononuclear cells in *Babesia rodhaini*-infected mice. J Vet Med Sci/Jpn Soc Vet Sci 2001; 63: 563-566.
194. Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. The treatment of babesiosis. N Engl J Med 2001; 344: 773.
195. Rodríguez M, Penichet ML, Mouris AE, et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with recombinant Bm86 antigen preparation. Vet Parasitol 1995; 57: 339-349.
196. Pipano E, Alekceev E, Galker F, et al. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. Exp Appl Acarol 2003; 29 (1-2): 141-149.
197. Lodos J, Boue O, De la Fuente J. A model to stimulate the effect of vaccination against *Boophilus* ticks on cattle. Vet Parasitol 2000; 87: 315-326.
198. Odongo D, Kamau L, Skilton R, et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. Vaccine 2007; 25 (7): 1287-1296.
199. Mahoney DF. Bovine babesiosis: the immunization of cattle with killed *Babesia argentina*. Exp Parasitol 1967; 20: 125-129.
200. Edelhofer R, Kanout A, Schuh M, et al. Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination. Parasitol Res 1998; 84: 181-187.
201. Bock RE, De Vos AJ, Lew AE, et al. Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine. Aust Vet J 1995; 72: 296-300.
202. Standfast NF, Bock RE, Wiecek MM, et al. Overcoming constraints to meeting increased demand for *Babesia bigemina* vaccine in Australia. Vet Parasitol 2003; 115: 213-222.

203. Wright IG, Casu R, Commins MA, et al. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet Parasitol* 1992; 44: 3-13.
204. Schetters TP, Kleuskens J, Carcy B, et al. Vaccination against large *Babesia* species from dogs. *Parassitologia* 2007; 49: 13-17.
205. Ramos CA, Araújo FR, Souza II, et al. Real-time polymerase chain reaction based on *msa2c* gene for detection of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 2011; 176(1):79-83.
206. Kim C, Iseki H, Herbas MS, et al. Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(5):837-841.
207. Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö, ve ark. Sığırlarda *Babesia* Türlerinin Reverse Line Blotting, Nested PCR ve Real Time PCR Teknikleri ile Karşılaştırmalı Tanısı. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 5-10 Eylül 2011, Kars, p.186.
208. Cao S, Aboge GO, Terkawi MA, et al. Molecular detection and identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in northern Thailand. *Parasitol Res* 2012; 111(3):1259-1266.
209. Pettrigh R, Ruybal P, Thompson C, et al. Improved molecular tools for detection of *Babesia bigemina*. *Animal biodiversity and emerging diseases. Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:155-157.
210. Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, et al. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet Parasitol* 2011;178(3-4):201-207.
211. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999; 41:95-98.
212. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S. (2010). Geneious v5.5. Available at <http://www.geneious.com>. (last accessed 31 January 2013).
213. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol Evol* 2011; 28(10): 2731-2739.
214. Dantas-Torres F, Chomel B, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a OneHealth perspective. *Trends Parasitol* 2012; 28, 437-446.

215. Ionita M, Mitrea I, Pfister K, et al. Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania. *Vet Parasitol* 2013;196, 71-76.
216. Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, et al. Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet Parasitol* 2009; 162, 200-206.
217. Shebish E, Vemulapalli R, Oseto C. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. *Vet Parasitol* 2012; 188, 164-167.
218. Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A, ve ark. Sığırlarda *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın Reverse Line Blotting, Nested PCR ve Real Time PCR Teknikleri ile Karşılaştırmalı Tanısı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2013; 19, 895-902.
219. Düzlü Ö, Yıldırım A, İnci A, ve ark, Erzurum yöresi sığırlarında *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın Real-Time PCR ile araştırılması ve izolatların moleküler karakterizasyonu, *Ankara Üniv vet Fak Derg*, Baskıda (2014).
220. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen *Babesia bovis* suşlarının moleküler karakterizasyonu. *ERÜ Sağ Bil Derg* 2011; 20, 18-28.
221. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Türkiye'de evcil ruminantlarda babesiosis. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci* 2012; 2, 27-34.
222. Yavuz A, İnci A, Düzlü Ö, ve ark. Molecular characterization of *Babesia bovis* msa-2c gene. *Türkiye Parazitol Derg* 2011; 35, 140-144.
223. Aktas M, Altay K, Ozubek S, et al. A survey of ixodid ticks feeding on cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea region of Turkey. *Vet Parasitol* 2012; 187(3-4):567-571.
224. Tsai YL, Chomel BB, Chang CC, et al. *Bartonella* and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011;34(2):179-187.
225. Adham FK, Abd-el-Samie EM, Gabre RM, et al. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I--*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Parasitol Res* 2009 ; 105(3):721-730.
226. Ogo NI, de Mera IG, Galindo RC, et al. Molecular identification of tick-borne pathogens in Nigerian ticks. *Vet Parasitol* 2012;187(3-4):572-577.

227. Oliveira-Sequeira TC, Oliveira MC, Araujo JP Jr, et al. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol* 2005; 35(1):105-111.
228. Kumsa B, Signorini M, Teshale S, et al. Molecular detection of piroplasms in ixodid ticks infesting cattle and sheep in western Oromia, Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 2014; 46(1):27-31.
229. Sam-Yellowe TY. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today* 1996; 12, 308-316.
230. Machado RZ, McElwain TF, Pancraccio HP, et al. *Babesia bigemina*: immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia. *Exp Parasitol* 1999; 93, 105-108.
231. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet Parasitol* 2006; 138, 22-32.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 12.12.2012

Toplantı Sayısı: 12

Karar No: 12/121

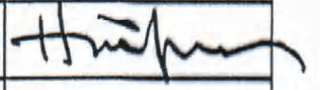
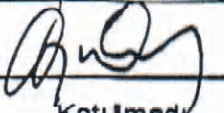
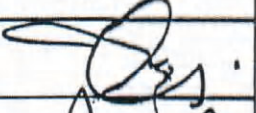
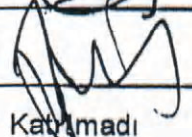
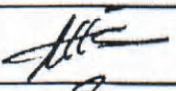
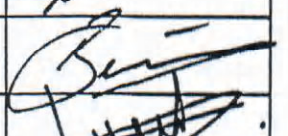
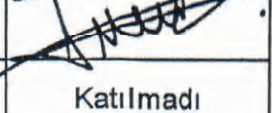
Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

12.12.2012

tarhinde

Prof. Dr. Harun ÜLGER

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

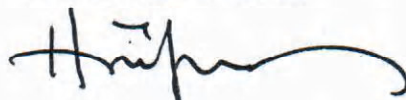
Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Hatice Özblge	Prof. Dr.	Ecz. Fakültesi	Katılmadı
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Fusun F. Erdoğan	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Serpil Sarıözkan	Doç. Dr.	Vet. Fakültesi	Katılmadı
Ahmet Öztürk	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül Aycan.	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı

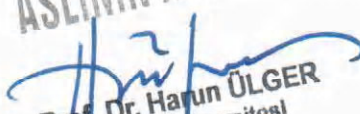
Üniversitemiz Veteriner Fakültesinden Yrd.Doç. Dr. Önder DÜZLÜ tarafından sunulan "Kayseri Yöresindeki Sığırlardan Toplanmış Kene Türlerinde Babesia bovis ve Babesia bigemina'nın Real Time PCR Yöntemi ile Araştırılması" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

Tarih : 12.12.2012

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmzası :



ASLININ AYNIĞIDIR

Prof. Dr. Harun ÜLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Tuğba MEYİLLİ

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 28 Ekim 1987, Kocasinan/Kayseri

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 554 507 88 07

e-mail: tugba_meyilli@hotmail.com

Yazışma Adresi: ERU Sağlık Bilimleri Ens. Veteriner Parazitoloji ABD/ KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet
Tarihi		
Lisans	Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi	2011
Lise	Mustafa Eminoğlu Anadolu Lisesi	2006

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011-2012	Kayseri Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği	Veteriner Hekim
2013-	Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce, Orta