

Erzincan Yöresinde Sığırlarda *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli/orientalis*'in Reverse Line Blotting Yöntemi ile Araştırılması

Kürşat ALTAY, Münir AKTAŞ, Nazir DUMANLI

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ

ÖZET: Bu çalışmada reverse line blotting (RLB) ve mikroskopik muayene metotları kullanılarak, Erzincan yöresinde sığırlarda *Theileria annulata* ve *T. buffeli/orientalis*'in araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, değişik odaklardan toplam 123 sığırdan EDTA'lı tüplere kan örneği alınmış ve her hayvanın perifer kan frotisi hazırlanmıştır. Hazırlanan frotiler mikroskopta *Theileria* spp. piroplazmaları yönünden incelenmiştir. Alınan kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lardan *Theileria* türlerinin 18 S rRNA geni amplifiye edilerek RLB testinde kullanılmıştır. Bu amaçla, PCR ürünleri catch all (*Theileria* spp, *Babesia* spp.), *Theileria* spp., *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis* türleri için spesifik proplarla hibridizasyona tabi tutulmuştur. Sonuç olarak, mikroskopik incelemede 14 (%11,38) sığırdan *Theileria* spp. piroplazmalarına rastlanırken, RLB testi ile 19 (%15,45) sığırdan *T. annulata*, 12 (%9,76) sığırdan ise *T. buffeli/orientalis* saptanmıştır. Üç örnekte ise miks enfeksiyon tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Theileria annulata*, *T. buffeli/orientalis*, mikroskopi, RLB, Erzincan.

Survey of *T. annulata* and *T. buffeli/orientalis* in Cattle in the Region of Erzincan Using Reverse Line Blotting

SUMMARY: This study was carried out to investigate *Theileria annulata* and *T. buffeli/orientalis* in cattle in the region of Erzincan using reverse line blotting (RLB) and microscopical examination. A total of 123 blood samples and thin blood smears were collected from cattle in distinct locations. Thin blood smears were microscopically examined for *Theileria* piroplazmaları. The 18S SSU rRNA gene in the DNA of *Theileria* spp extracted from blood was amplified and used in RLB. For this purpose, PCR products were hybridized with specific probes for over-all *Theileria* spp., *T. annulata* and *T. buffeli/orientalis* as well as *Babesia* spp. While *Theileria* spp. were observed in 14 out of 123 cattle, (11.38 %) during microscopical examination, *T. annulata* was detected in 19 (15.45%) cattle and *T. buffeli/orientalis*, in 12 (9.76%) by RLB, respectively. Mixed infection was also detected in three samples.

Key Words: *Theileria annulata*, *T. buffeli/orientalis*, microscopy, RLB, Erzincan.

GİRİŞ

Theileria türleri, evcil ve yabani hayvanların kene ile taşınan parazitleridir. Sığırlarda *T. annulata*, *T. parva*, *T. sergenti/buffeli/orientalis* grup, *T. mutans*, *T. taurotragi* ve *T. velifera* türleri enfeksiyon oluşturur. Bunlardan, *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* Türkiye'de sığırlarda bulunan *Theileria* türleri olup, *T. annulata* yüksek morbidite ve mortaliteye sahip bir hastalık olan tropikal theileriosisin etkenidir. *T. buffeli/orientalis*'in ise apatojen ya da düşük patojeniteli bir tür olduğu ifade edilmektedir (1, 15).

Theileriosisin teşhisi, akut vakalarda klinik bulgular ve

Giemsa ile boyanmış kan ve lenf yumrusu frotilerinin mikroskopik muayenesiyle yapılırken, latent enfeksiyonların saptanmasında uzun süre serolojik yöntemler kullanılmıştır. Son yıllarda direk parazit DNA'sının saptanmasına yönelik yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler teşhis metotları geliştirilmiştir. PCR metodu çeşitli *Theileria* türlerinin duyarlı ve özgül biçimde teşhisini mümkün kılmıştır (2, 5, 11, 14). PCR ile hibridizasyonun birlikte kullanıldığı reverse line blotting (RLB) metodu da yakın zamanda parazitolojide uygulama alanı bulmuştur. Bu metot ile bir defada tüm kan parazitlerini teşhis etmek mümkündür (7, 8, 9, 13).

Bu çalışmada, RLB testi kullanılarak Erzincan yöresinde sığırlarda *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis*'in araştırılması ve bu yöntemin mikroskopik muayene ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Geliş tarihi/Submission date: 25 Ocak/25 January 2007
Düzeltilme tarihi/Revision date: 22 Şubat/22 February 2007
Kabul tarihi/Accepted date: 20 Mart/ 20 March 2007
Yazışma /Corresponding Author: Kürşat Altay
Tel: (+90) (424) 237 00 00 Fax: (+90) (424) 238 81 73
E-mail: kaltay@firat.edu.tr.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Nisan – Ekim 2003 tarihleri arasında Erzincan merkez, Üzümlü ve Kemaliye ilçeleri ve bu ilçelere bağlı köylerde, meraya çıkan 1 yaşından büyük 123 sığır üzerinde yürütülmüştür. Bu sığırlardan total DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere tekniğine uygun olarak EDTA'lı vakumlu tüplere 3 ml kan alınmıştır. Ayrıca aynı hayvanların kuyruk uçlarından perifer kan frotileri hazırlanmıştır.

Kan Frotilerinin Mikroskopik Muayenesi: Perifer kan frotileri Giemsa boyama metodu ile boyanmış, immersion objektifte, en az 100 mikroskop sahası taranarak, *Theileria spp.* piroplazmaları yönünden incelenmiş ve bir piroplazmik formun görülmesi durumunda dahi froti pozitif olarak değerlendirilmiştir.

DNA Ekstraksiyonu: Sığırlardan EDTA'lı tüplere alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirilen kanlardan, Clausen ve ark. (4)'nın bildirdiği şekilde DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Reverse Line Blotting: PCR testi, Georges ve ark. (7) tarafından geliştirilen, *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S SSU rRNA (Small subunit ribosomal RNA) geninin V4 değişken bölgesini amplifiye eden primerler (RLB-F; 5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG – 3' ve RLB-R; 5'-biotin-CTAAGAATTTCACCTCTGACAGT – 3') (The Midland Certified Reagent Co., Inc., USA) kullanılarak yapılmıştır (7). Reaksiyon 25 µl toplam hacimde [2,5 µl 10 x PCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH 9), 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 2,5 mM MgCl₂, 125 µM her bir deoxynucleotide triphosphates, 1,25 U Taq DNA polymerase (MBI Fermentas, Lithuania), 1,25 µl (20 pm/µl) her bir primerden, ve 2,5 µl template DNA] gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şartları 94 °C 'de 5 dk ön denaturasyonu takiben 40 siklus 94 °C'de 30 sn, 54 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 2 dk'dan oluşmuştur. Ayrıca 72 °C'de 10 dk'lık bir son uzatma eklenmiştir.

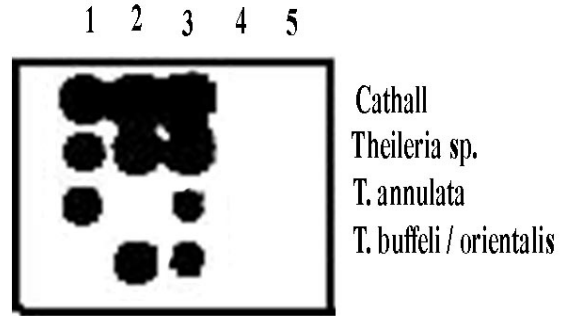
Reverse line blotting testinde kullanılacak proplar (Tablo 1) 5' uçlarında amino grubu (N-terminal N-trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl, N, N- diisopropyl phosphoramidite [TFA] – C6 amino linker) (The Midland Certified Reagent Co., Inc., USA) içerecek şekilde sentezletirilmiştir.

Tablo 1. RLB testinde kullanılan aminolinkerli propların 5'-3' dizilişi

Prop	Nukleotid Dizilimi	Kaynak
Catchall (<i>Theileria spp.</i> + <i>Babesia spp.</i>)	TAATGGTTAATAGGAACAGTTG	8
<i>Theileria spp.</i>	TGATGGGAATTAAACCTCTTCCA	8
<i>T. annulata</i>	CCTCTGGGGTCTGTGCA	8
<i>T. buffeli/orientalis</i>	GGCTTATTTCGGWTTGATTTT	8

W: A/T

Membranın hazırlanması ve RLB hibridizasyonu küçük bir modifikasyon dışında Gubbels ve ark. (8)'nın bildirdiği şekilde yapılmıştır. Gubbels ve ark (8)'dan farklı olarak 20 µl PCR amplifikasyon ürünü 2 x SSPE-%0,1 SDS ile 160 µl'ye tamamlanmıştır. Değerlendirmede filmler üzerinde prob ve PCR ürünlerinin keşiştiği noktadaki siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. PCR ürünlerinin RLB testine tabi tutulmasından sonra membran görüntüsü. 1. *T. annulata*, 2. *T. buffeli/orientalis*, 3. Miks (*T. annulata* + *T. buffeli/orientalis*), 4. Distile su, 5. *Theileria* negatif sığır kanı

İstatistiksel Analiz: Sonuçlar arasındaki farklılıklar, ChiSquare testi kullanılarak karşılaştırılmış ve %5 (0.05) düzeyindeki bir farklılık istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Erzincan yöresinde 123 sığırın mikroskopik bakı ve RLB sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü gibi mikroskopik bakı ile 123 sığırın 14'ünde (%11,38) *Theileria* piroplazm formlarına rastlanmıştır. Aynı hayvanların RLB ile 28'inin (%22,76) *Theileria* türlerini taşıdığı belirlenmiştir. Sığırlarda *Theileria* enfeksiyonlarının belirlenmesinde RLB metodunun mikroskopik bakıdan daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır (P<0,05).

Tablo 2. Erzincan yöresinde theileriosis yönünden incelen sığırların mikroskopik bakı ve RLB sonuçları

Yöntem	Hayvan Sayısı	Pozitif	%
RLB	123	28	22,76
MB	123	14	11,38

MB: mikroskopik bakı

Reverse line blotting metodu ile pozitiflik saptanan 28 sığırın 16'sının *T. annulata*, 9'unun *T. buffeli/orientalis*, 3'ünün de her iki türle enfekte olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak *T. annulata* toplam 19 (%15,45), *T. buffeli/orientalis* 12 (%9,76) sığırdan tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Erzincan yöresinden RLB ile sığırlarda belirlenen *Theileria* türleri.

n	<i>Theileria</i> spp.	<i>T. annulata</i>	<i>T. buffeli/orientalis</i>
16	+	+	-
9	+	-	+
3	+	+	+
Toplam	28	19	12

TARTIŞMA

Türkiye’de sığırlarda *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türleri bulunmakta olup, bunlardan *T. annulata*’nın sebep olduğu tropikal theileriosis sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (1, 15)

Theileriosis’de, hastalığı atlatan hayvanlar uzun süre kanlarında az miktarda etkeni taşırlar. Bu hayvanlar vektör keneler için enfeksiyon kaynağıdır. Taşıyıcı hayvanların mikroskopik bakı ile belirlenmesi oldukça zordur. Diğer taraftan özellikle latent enfeksiyonların tespitinde kullanılan serolojik testlerde, çapraz reaksiyonların görülebilmesi, spesifik immün yanıtların zayıf olabilmesi ve uzun süreli portörlük durumunda antikörlerin her zaman tespit edilememesi gibi sebeplerden dolayı yanlış pozitif ve negatif sonuçların söz konusu olabileceği ileri sürülmüştür (3, 12).

Theileriosisin teşhisinde gerek mikroskopik ve gerekse serolojik metotlarda karşılaşılan olumsuzluklar moleküler biyolojik metotlarla aşılmaya çalışılmıştır. PCR, hastalıkların teşhisi ve türlerin identifikasyonunu da içeren birçok alanda uygulanmıştır. PCR metodu kullanılarak, özellikle taşıyıcı hayvanlarda *Theileria* türlerinin duyarlı ve özgül biçimde teşhisi sağlanmıştır (2, 5, 11, 14). Ancak tür spesifik PCR’in her tür için ayrı yapılması, zaman ve ekonomik kayba sebep olmaktadır. Bu kayıplar PCR ve hibridizasyonun birlikte kullanıldığı RLB metodu ile giderilebilmektedir. Çünkü RLB metodu ile birden çok parazitin eş zamanlı olarak teşhisi yapılabilmektedir (7-9, 13, 16). Bu çalışmada, mikroskopik bakı ve RLB metotları kullanılarak Erzincan yöresinde sığırlarda bulunan *Theileria* enfeksiyonları araştırılmıştır. 123 sığırın mikroskopik bakı ile 14’ünde (%11,38), RLB ile 28’inde (%22,76) *Theileria* spp. tespit edilmiştir. Böylece, sığırlarda *Theileria* enfeksiyonlarının belirlenmesinde RLB’nin mikroskopik bakıdan daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Son yıllarda moleküler metotlarla yapılan çalışmalarda, Türkiye’nin değişik bölgelerinde sığırlarda *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türlerinin bulunduğu belirlenmiştir (1, 6, 10, 16). Dumanlı ve ark. (6), PCR ile Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde ki 11 ilde (Elazığ, Malatya, Bingöl, Muş, Van, Erzincan, Erzurum, Kars, Adıyaman, Diyarbakır, Şanlıurfa) *T. annulata*’nın prevalansının %1,4-74,6 olduğunu belirlemişlerdir. Aktaş ve ark. (1) Doğu Anadolu bölgesinde bazı illerde (Elazığ, Bingöl, Muş, Erzincan, Erzurum) yine PCR ile sığır-

larda *T. annulata*’nın %39,28, *T. sergenti/buffeli/orientalis*’in %7,14 oranında bulunduğunu belirlemişlerdir. İnci ve ark. (10) Kayseri yöresinde RLB metodunu kullanarak inceledikleri 100 sığırın 44’ünde *T. annulata*, 12’sinde *T. buffeli/orientalis*’i tespit etmişlerdir. Aynı metotla, Vatanserver ve ark. (16) Ankara yöresinde sığırlarda *T. annulata*’nın %41,6, *T. buffeli/orientalis*’in %13,6 oranında bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışma’da RLB ile Erzincan yöresinde incelenen 123 sığırın 19’unda (%15,45) *T. annulata*, 12’sinde (%9,76) *T. buffeli/orientalis* tespit edilmiştir. Üç sığırdan da miks enfeksiyona rastlanmıştır. Bütün bu sonuçlar, farklı endemik özelliklere sahip bölgelerde hastalığın prevalansında değişkenlik olmakla beraber, sığırlarda *Theileria* enfeksiyonlarının Türkiye’nin hemen her bölgesinde yaygın olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, RLB metodu kullanılarak Erzincan yöresinde sığırlarda *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türlerinin varlığı ve yayılışı ortaya konmuş, sığırlarda *Theileria* enfeksiyonlarının belirlenmesinde RLB metodunun mikroskopik bakıdan daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis*’in miks enfeksiyon oluşturabileceği, miks enfeksiyonların da RLB metodu ile belirlenebileceği tespit edilmiştir. Bu metotla direk etken tespit edildiğinden ve metot yüksek bir duyarlılığa sahip olduğundan taşıyıcı hayvanların belirlenmesinde kullanılmasının yararlı olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aktas M, Altay K, Dumanli N, 2006. A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Vet Parasitol*, 138: 179-185.
2. Altay K, Dumanli N, Holman PJ, Aktas M, 2005. Detection of *Theileria ovis* infected sheep by nested PCR. *Vet Parasitol*, 127: 99-104.
3. Burridge MJ, Brown CG, Kimber CD, 1974. *Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. *Exp Parasitol*, 35: 374-80.
4. Clausen PH, Wiemann A, Patzelt R, Kakaire D, Pötzsch C, Peregrine A, Mehlitz D, 1999. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. in naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. *Ann NY Acad Sci*, 29: 21-31.
5. d’Oliveira C, Van der Weide M, Habela MA, Jacquiet P, Jongejan F, 1995. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J Clin Microbiol*, 33: 2665-2669.
6. Dumanli N, Aktas M, Cetinkaya B, Cakmak A, Koroglu E, Saki CE, Erdogmus Z, Nalbantoglu S, Ongor H, Simsek S, Karahan M, Altay K, 2005. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Vet Parasitol*, 127: 15-21.

7. **Georges K, Loria GR, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, Sparagano O**, 2001. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol*, 99: 273-286.
8. **Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F**, 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol*, 37: 1782-1789.
9. **İça A**, 2004. Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin reverse line blotting ve indirek floresan antikör testi ile karşılaştırmalı tanısı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 1(2): 77-85.
10. **İnci A, Karaer Z, Çakmak A, Günay O, Atasever A, Nalbantoğlu S, Vatansver Z, Çam Y, İça A, Yıldırım A**, 2003. Kayseri Yöresinde sığırlarda tropikal theileriosisin epidemiyoloji üzerine araştırmalar. Kayseri. DPT 98-K12139 nolu projenin final raporu.
11. **Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Wilkie G, Hooshmand-Rad P, Zwegarth E, Gestenberg C, Phipps P, Brown CGD**, 2000. Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitology*, 120: 245-254.
12. **Leemans I, Brown D, Hooshmand-Rad P, Kirvar E, Uggla A**, 1999. Infectivity and cross-immunity studies of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle I. In vivo response. *Vet Parasitol*, 82: 179-192.
13. **Oura CA, Bishop RP, Wampande EM, Lubega GW, Tait A**, 2004. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. *Int J Parasitol*, 34: 603-613.
14. **Schnittger L, Yin H, Jianxun L, Lugwing W, Shayan P, Rahbari S, Voss-Holtmann A, Ahmed JS**, 2000. Ribosomal small-subunit RNA gene-sequence analysis of *Theileria lestoquardi* and a *Theileria* species highly pathogenic for small ruminants in China. *Parasitol Res*, 86 (2): 352-358.
15. **Uilenberg G**, 1981. *Theileria* species of domestic livestock. In: *Advances in the Control of Theileriosis*. Irvin AD, Cunningham MP, Young AS. (Eds.). Martinus Nijhoff, The Hague, p.4-37.
16. **Vatansver Z, İça A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Sparagano O**, 2003. Ankara Yöresinde kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikör testi (IFAT) ile saptanması. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi. Konya. s.94.