

Sığırlarda Bazı *Babesia* Türlerinin Reverse Line Blotting ve İndirek Floresan Antikor Testi ile Karşılaştırmalı Tanısı *

Anıl İÇA

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışma, 2001-2002 tarihleri arasında Ankara yöresinde sığırlardan toplanan kanlarda *Babesia bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens*'in Reverse Line Blotting (RLB), İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) ve mikroskopik bakı (MB) ile karşılaştırmalı tanısı amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, çalışma dönemini kapsayan yıllarda, Ankara iline bağlı köylerden mera-ya çıkan bir yaştın üzerinde rastgele seçilen 300 sığırdan kan alınmıştır. Sonuç olarak, kan frotilerinin mikroskopik bakısında %2.7, IFAT'de %9 ve RLB yönteminde ise %10'luk pozitiflik tespit edilmiştir. Sonuçların χ^2 ile yapılan istatistiksel analizi MB'nın IFAT ve RLB'ye göre anlamlı derecede düşük ($p<0.01$) olduğunu, IFAT ve RLB arasında ise fark olmadığını ($p>0.05$) göstermiştir. Öte yandan, RLB referans test (gold test) kabul edilerek IFAT ve MB'nın duyarlılığı, özgülüğü, uyumluluğu ve *Kappa* değerleri saptanmıştır. Buna göre IFAT'ın duyarlılığı %23.33, özgülüğü %92.59, uyumluluğu %85.66, *Kappa*=0.167 ($p<0.01$); MB'nın duyarlılığı %26.66, özgülüğü %100, uyumluluğu %92.66, *Kappa*=0.396 ($p<0.001$); IFAT ve MB'nın her ikisinin pozitif ve en az birinin negatifliği esas alındığında duyarlılığın %6.66, özgülüğün %100, uyumluluğun %90.66, *Kappa*=0.114 ($p<0.001$); IFAT ve MB'dan en az birinin pozitif ve her ikisinin negatifliği esas alındığında ise duyarlılık %43.3, özgülük %92.59, uyumluluk %87.66, *Kappa*=0.344 ($p<0.001$) olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Babesia* türleri, IFAT, mikroskopik muayene, RLB, sığır

Comparative Diagnosis of Some Bovine *Babesia* Species by Reverse Line Blotting and Indirect Fluorescent Antibody Test

Summary: This study was performed for the comparative diagnosis of *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* by microscopic examination (ME), Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and Reverse Line Blotting (RLB) in blood samples collected from the cattle around Ankara between 2000-2001. For this purpose, blood samples were collected from 300 randomly selected cattle that were over 1 year old and also grazed in the tick active season. Of the 300 cattle blood and sera samples analyzed, 2.7%, 9%, 10% were found to be positive by ME, IFAT and RLB respectively. The statistical analysis by χ^2 has shown that ME was lower than IFAT and RLB ($p<0.01$), but there was no significant differences between IFAT and RLB ($p>0.05$). On the other hand, the sensitivity, specificity, correspondence and *Kappa* value of IFAT and ME were also compared RLB which served as the reference or gold test for definition of the infection. According to the results, the sensitivity, the specificity, the correspondence and the *Kappa* value of IFAT were 23.33%, 92.59%, 85.66% and 0.167 ($p<0.01$) respectively. The sensitivity, the specificity, the correspondence and the *Kappa* value of ME were 26.66%, 100%, 92.66%, 0.396 ($p<0.001$) respectively. The sensitivity, the specificity, the correspondence and the *Kappa* value of both IFAT and ME (based on the positives for both methods and the negative at least for one of the two methods) were 6.66%, 100%, 90.66%, and 0.114 ($p<0.001$) respectively. The sensitivity, the specificity, the correspondence and the *Kappa* value of both IFAT and ME (based on the positivity at least for one of the two methods and the negativities for the two methods) were 43.33%, 92.59%, 87.66%, 0.344 ($p<0.001$) respectively.

Key Words: *Babesia* species, cattle, IFAT, microscopic examination, RLB

Giriş

Babesiosis, tropik ve subtropik bölgelerde evcil ve yabani hayvanlarda yaygın olarak görülen ve *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial nakledilen protozoer bir hastalıktır (12,20). Babesiosis'in teşhisi klinik belirtilerin yanında, parazitin kendisinin saptanması veya parazite karşı oluşan özgül antikorların tespit edilme-

si ile yapılmaktadır (3,25). *Babesia* türlerinin saptanması, perifer kan frotilerinin mikroskopik bakışı ile olduğu gibi son yıllarda nükleik asit tabanlı moleküler biyolojik yöntemler ile nükleotid tespiti şeklinde de yapılmaktadır (3). Kanda görülen protozoer ve riketsiyal etkenlerin karakteristik özelliği olarak, hastalık atlatıldıktan sonra iyileşen hayvanlar taşıyıcı hale gelirler (22). Böyle taşıyıcı hayvanlar, vektör keneler için enfeksiyon kaynağı olup, klinik görünüm olarak enfekte olmayan hayvanlardan ayırt edilemezler. Bu tür hayvanların, tüm sığır popülasyonu içindeki oranı hastalığın epidemiyolojisi açısından belirleyicidir. Bu nedenle,

Geliş Tarihi/Submission Date : 12.11.2003
Kabul Tarihi/Accepted Date : 20.01.2004

* Doktora tezinden özetlenmiştir.

portör hayvanların ortaya konması hastalığın kontrolü ve epidemiyolojisinin belirlenmesinde en önemli kriterlerden biridir. Ancak, taşıyıcı hayvanların kanında, genellikle çok az miktarda parazit bulunur ve bunlar, frotilerde her zaman tespit edilemezler (10).

Kan protozoonlarının meydana getirdiği hastalıkların tanısında İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) gibi spesifik serolojik testlerden de yararlanılır. Ancak bu testler genellikle indirek uygulamalar olduğu için etkenin direk kendi varlığını göstermezler. Ayrıca *Theileria-Babesia*, *Babesia-Plasmodium* türleri arasında ve *Babesia* türleri arasında çapraz reaksiyonların olması, testin dezavantajlarından biridir. Bunun yanında, uzun süreli portörlük durumlarında, kanda piroplazmik formlar bulunmasına rağmen, antikorlar her zaman tespit edilemeyebilir (4,18,21). Bu tür hastalıkların teşhisinde ortaya çıkan bu ve bu gibi dezavantajlar, teşhiste daha özgül ve duyarlı metotların gerekliliğini ortaya koymuş, moleküler biyolojik teşhis yöntemlerinin gelişmesine sebep olmuştur (10,26).

Son yıllarda, parazit DNA'sının ortaya konması ilkesine dayanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği, çeşitli *Babesia* türlerinin duyarlı ve özgül biçimde teşhisini olanaklı kılmıştır (1,5,9,11,24). PZR ile ilgili çalışmaların yaygınlaşan kullanımının yanı sıra, hayvanlarda bulunabilecek tüm kan parazitlerini bir defada ortaya koyabilecek kombine bir test olan Reverse Line Blotting (RLB) geliştirilmiştir. RLB yöntemi, PZR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgül problara hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Bu yöntemin kan protozoonlarının saptanmasında kullanılması, Gubbels ve ark. (15) tarafından gerçekleştirilmiştir. Günümüzde özellikle kene kaynaklı hastalıklarla ilgili çalışmalarda, RLB kullanımının arttığı ve teşhiste standart bir test haline geldiği bildirilmektedir (2,3,19,27-29).

Bu çalışma ile, sığırlarda görülen *Babesia* türlerinden *B. bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens*'in RLB ile eş zamanlı teşhisinin yapılması ve bu yöntemin mikroskopik muayene, IFAT yöntemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma için gerekli materyali toplamak amacıyla, 2001-2002 yıllarına ait çeşitli dönemlerde Ankara çevresinde 10 ilçeye ait köylere gidilmiş ve meraya çıkan 1 yaşın üstündeki hayvanlardan rastgele 300 sığır seçilmiştir. Bu sığırlardan PZR için EDTA'lı, IFAT için silika jelli tüplere vena jugularis'den tek-

niğine uygun olarak kan alınmıştır. Ayrıca aynı hayvanların kuyruk uçlarından perifer kan frotileri hazırlanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu: DNA ekstraksiyonu genel olarak Gubbels ve ark. (15)'nin bildirdiği şekilde yapılmıştır. Kısaca 200µl kan 500µl Lysis buffer (0.22% NaCl, 1mM EDTA ve 0.015% saponin) ile 4 defa (3300 rpm'de 5 dak.) yıkanmış ve elde edilen çökelti üzerine 100µl PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris pH 8.0, 0.5% Tween 20, 100 µg/ml Proteinase K) ilave edilerek 55°C'de 12 saat tutulmuştur. Bunu takiben örnekler 90°C'de 10 dk. tutulmuş ve 13000 rpm'de 2 dakika çevrilip üste kalan sıvı PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Polimeraz Zincir Reaksiyonu için TGradient (Whatmann, Biometra) PZR makinesi kullanılmıştır. Reaksiyonda primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S ssu rRNA (Small subunit ribosomal RNA) geninin V4 değişken bölgesinden büyüklüğü 460 ile 520 bp (base pairs=baz çifti) arasında değişen bir parça amplifiye eden genel primerler (RLB-F2 5' GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G'3 ve RLB-R2 5'-biotin-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT'3) kullanılmıştır (18,20). Reaksiyon, toplam 50µl reaksiyon sıvısında {(1x PCR buffer (Sigma ve Fermentas), 1.5mM MgCl₂ (Sigma ve Fermentas), her bir deoksiniükleotid (dATP, dCTP, dGTP)'den 200µM (Sigma ve Fermentas), (dUTP, dTTP)'den 100µM, 1,25U Taq DNA polymerase (Sigma ve Fermentas), 1,25U Uracil DNA Glycosylase (UDG) (Fermentas), 50pmol primer ve 5µl DNA örneği)} 200 µl'ik PZR tüplerinde (TrefLab) yapılmıştır. PZR reaksiyonu, 37°C'de 3 dakika UDG inkübasyonu ve 94°C'de 10 dakika UDG denatürasyonunu takiben, 94°C'de 20 sn., 67°C'de 30 sn. ve 72°C'de 30 sn. olmak üzere başlatılan iki sikluslu touch down PZR programı 40 döngü üzerinden yapılmıştır. Son döngüyü takiben 65°C'de bekleme yapılmıştır. Elde edilen ürünler RLB'de kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır. Testin bilinen *Babesia* türlerinin DNA'larını amplifiye ettiğini ve *Theileria* türleri ile çapraz reaksiyonlar görülmediğini göstermek amacıyla pozitif kontrol olarak, *B. bovis* (Meksika izolatu), *B. divergens* (Hollanda izolatu), *B. bigemina* (Kayseri izolatu) *T. annulata* (Ankara izolatu), *T. orientalis* (ILRI, Kenya) ve negatif kontrol olarak da sığır DNA'sı kullanılmıştır.

Reverse Line Blotting (RLB): Bu aşamada kullanılan problemlerin tamamı (tablo 1), negatif yüklü Biotin C membrana (Pall Biosupport group, Ann Arbor, MI)

kovalent olarak bağlanabilmeleri amacıyla, 5'-terminallerinde amino grubu (N-terminal *N*-(trifluoracetamido)hexyl-cyanoethyl, *N*, *N*-diisopropyl phosphoramidite [TFA]-C6 amino linker) (Isogen) ihtiva edecek şekilde sentezletirilmiştir.

Membran ve RLB hibridizasyonu Georges ve ark. (13) ile Gubbels ve ark. (15)'nin bildirdiği şekilde hazırlanmıştır. Problar 500mM NaHCO₃ (pH 8.4) içinde 50-400 pmol/150µl konsantrasyonlarda sulandırılmıştır. Kullanılacak olan Biodyne C membran oda ısısında 10 dk %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) (Sigma) solusyonu ile aktive edilmiş, su ile yıkanmış ve

dk. 10 ml Horseradish Peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin solusyonunda (Serotec) (2xSSPE/%0.5 SDS ile 1:4000 oranında sulandırılmış) bekletilmiştir. İnkübasyonu takiben membran 2xSSPE/%0.5 SDS ile 42°C'de 10 dk. daha sonra da 2xSSPE ile oda ısısında 5 dk. yıkanmıştır. Son olarak membran 1 dk. 10 ml ECL tespit sıvısında (Amersham Biotech) bekletilmiştir. Bütün bu işlemleri takiben, membran karanlık odada ECL hyperfilm (Amersham Biotech) altında sinyal yoğunluğuna göre 30 sn. ile 1 saat arasında tutulmuştur. Daha sonra film banyo edilerek geliştirilmiştir. Filmler üzerinde prob ve PZR sıralarının kesiştiği yerlerde siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir.

Tablo 1. Biodyne C membrane tutturulan aminolinkerli problemlerin 5'-3' dizilişi

Özgül Olduğu Tür	Dizilişi (5'-3')	Kaynak
<i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> Türleri (Catch All)	TAA TGG TTA ATA GGA RCR GTT G	Gubbels ve ark., 1999
<i>Babesia bovis</i>	CAG GT TTC GCC TGT ATA ATT GAG	Georges ve ark., 2001
<i>Babesia bigemina</i>	CGT TTT TTC CCT TTT GTT GG	Gubbels ve ark., 1999
<i>Babesia divergens</i>	GTT AAT ATT GAC TAA TGT CGA G	Gubbels ve ark., 1999

T: thymine; A: adenine; C: cytosine; G: guanine; R: A veya G

MN45 miniblottera (Immunetics, Cambridge, Mass.) yerleştirilmiştir. Membran üzerindeki kalıntı sıvılar iyice aspire edildikten sonra, her bir probtan 150 µl miniblotterin ayrı kanallarına dökülmüş ve oda ısısında 1-2 dk. inkübe edilmiştir. Kanallarda bulunan prob solusyonları aspire edilerek membran miniblotterden çıkarılmış ve 100mM NaOH içinde 10 dk. inkübe edildikten sonra inaktive edilmiştir. Son olarak membran 2xSSPE/%0.1 SDS karışımı ile 60°C'de 5 dk. yıkanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hibridizasyon için membran bu defa önceden dökülen prob sıraları ile miniblotterin kanalları 90° açı yapacak şekilde miniblottera yerleştirilmiştir. Önceden elde edilmiş olan PZR ürünlerinden 30'ar µl alınıp 2xSSPE/%0.1 SDS karışımı ile 150 µl'ye tamamlanarak 100°C'de 10 dk. denatüre edilerek buz üstünde aniden soğutulmuştur. Denatüre edilen PZR ürünleri ayrı sıralara dökülmüş ve 42 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilerek (çalkalama olmaksızın) problemler ile hibridize olmaları sağlanmıştır. Bu sürecin sonunda kanallar aspire edilmiş ve membran alınarak 52°C'de 10 dk. 2xSSPE/%0.5 SDS (Sigma) ile yıkanmıştır. Bu işlemi takiben membran 42°C'de 30

İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT): Toplanan serumlar, Çakmak (7)'nin bildirdiği şekilde IFAT ile test edilmiştir. Bu test için gerekli *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* antijenleri, Hannover Veteriner Yüksek Okulu Parazitoloji Enstitüsü'nden elde edilmiştir. Testin değerlendirilmesinde temel titre *B. bigemina* için 1:80, *B. bovis* için 1:40, *B. divergens* için ise 1:20 olarak tespit edilmiştir. Temel titrenin altındaki değerler negatif, temel titre ve üstü değerler pozitif kabul edilmiştir.

Kan Frotillerinin Mikroskopik Muayenesi: Perifer kan frotilleri %5'lik Giemsa boya solusyonu ile boyanmıştır. Mikroskopik muayenede *Babesia* türleri soy düzeyinde tespit edilmiş, tür teşhisine gidilmemiştir.

İstatistiksel Değerlendirmeler: Testlerin sonuçları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliği χ^2 testiyle, uyumlulukları ise *Kappa* testiyle incelenmiştir. Bu istatistiksel testler için SPSS 10.0 programından yararlanılmıştır.

Bulgular

Ankara yöresinde 300 sığırdaki mikroskopik bakı, IFAT ve RLB ile saptanan babesiosis pozitiflikleri tablo 2'de gösterilmiştir. Tablo 2'de gösterildiği gibi, babesiosis'in prevalansı, mikroskopik bakıyla %2,7 (8/300), IFAT'la %9 (27/300) ve RLB ile de %10 (30/300) olarak saptanmıştır.

Sonuçların χ^2 ile yapılan istatistiksel analizi tablo 4'de verilmiştir. Tablo 4'de gösterildiği gibi, χ^2 ile yapılan analiz sonucu, MB'nın IFAT ve RLB'ye göre istatistiksel bakımdan anlamlı derecede düşük ($p<0.01$) olduğu, IFAT ve RLB arasındaki farkın ise istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Tablo 2. Mikroskopik bakı, IFAT ve RLB sonuçlarının çalışma merkezlerine göre dağılımı.

Çalışma Merkezi	Hayvan Sayısı	Mikroskopik Bakı		IFAT		RLB	
		Pozitif	%	Pozitif	%	Pozitif	%
Bala	32	1	3,12	4	12,5	1	3,12
Beyazarı	8	0	0	1	12,5	2	25
Çubuk	60	0	0	10	16,6	5	8,3
Elmadağ	52	2	3,84	6	11,5	10	19,23
Gölbaşı	3	0	0	0	0	0	0
Haymana	31	0	0	0	0	0	0
Kazan	7	1	14,2	1	14,2	1	14,29
Kızılcahamam	10	0	0	2	20	3	30
Merkez İlçe	57	1	1,75	2	3,5	1	1,75
Polatlı	40	3	7,5	1	2,5	7	17,5
TOPLAM	300	8	2,7	27	9	30	10

IFAT ve RLB ile araştırma merkezlerinde tespit edilen *Babesia* türleri ve pozitiflikleri tablo 3'de gösterilmiştir. Tablo 3'de gösterildiği gibi, IFAT ile 27 (% 9) sığırdaki seropozitiflik saptanmış, bunların 22'sinde *B. bigemina*'ya, 4'ünde *B. bovis*'e ve 1'inde *B. bigemina+B. bovis*'e karşı spesifik antikorlar bulunmuş, *B. divergens*'e karşı ise antikor tespit edilmiştir. RLB ile 30 (%10) sığırdaki *Babesia* türlerini taşıdığı, bunlardan 24'ünün tek bir türle (12'sinde *B. bigemina*, 7'sinde *B. bovis*, 5'inde *B. divergens*) 6'sının iki türle (3'ünün *B. bigemina+B. divergens*, 3'ünün *B. bigemina+B. bovis*) enfekte olduğu tespit edilmiştir.

RLB referans (gold) test kabul edilerek, IFAT ve MB'nın ayrı ayrı ve IFAT/MB'nın müşterek gücünü gösteren, duyarlılık, özgüllük, uyumluluk ve *Kappa* değerleri tablo 5'de gösterilmiştir. Tablo 5'de gösterildiği gibi, IFAT'ın duyarlılığı %23.33, özgüllüğü %92.59, uyumluluğu %85.66, *Kappa*=0.167, $p<0.01$; MB'nın duyarlılığı %26.66, özgüllüğü %100, uyumluluğu %92.66, *Kappa*=0.396, $p<0.001$; IFAT ve MB'nın her ikisinin pozitif ve en az birinin negatifliği esas alındığında duyarlılığın %6.66, özgüllüğün %100, uyumluluğun %90.66, *Kappa*=0.114, $p<0.001$; IFAT ve MB'dan en az birinin pozitif ve her ikisinin negatifliği esas alındığında ise duyarlılığın %43.3, özgüllüğün %92.59, uyumluluğun %87.66, *Kappa*=0.344, $p<0.001$ olduğu saptanmıştır.

Tablo 3. RLB ve IFAT ile saptanan *Babesia* türleri.

Çalışma Merkezi	Hayvan Sayısı	Pozitif		<i>B. bigemina</i>		<i>B. bovis</i>		<i>B. divergens</i>		<i>B. bigemina</i> +		<i>B. bigemina</i> +	
										<i>B. bovis</i>		<i>B. divergens</i>	
		IFAT	RLB	IFAT	RLB	IFAT	RLB	IFAT	RLB	IFAT	RLB	IFAT	RLB
Bala	32	4	1	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Beyazarı	8	1	2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Çubuk	60	10	5	8	3	1	1	0	0	1	1	0	0
Elmadağ	52	6	10	6	5	0	0	0	3	0	0	0	2
Gölbasi	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haymana	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kazan	7	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Kızılcahamam	10	2	2	2	0	0	1	0	1	0	0	0	1
Merkez İlçe	57	2	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Polatlı	40	1	1	1	1	0	5	0	1	0	0	0	0
TOPLAM	300	27	30	22	12	4	7	0	5	1	3	0	3

Tablo 4. İstatiksel analiz.

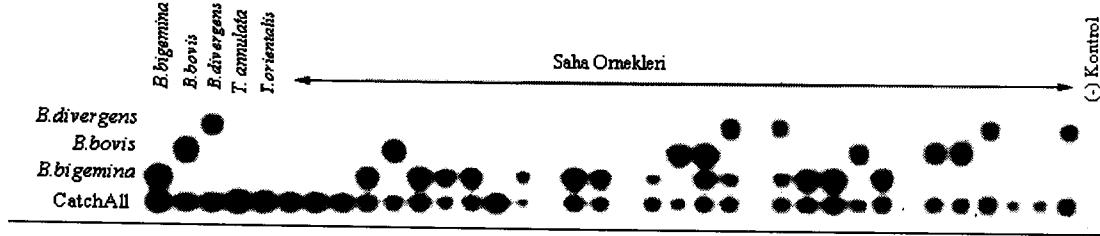
Yöntem	Negatif		Pozitif		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
RLB	270	90	30	10	300	100
IFAT	273	91	27	9	300	100
MB*	292	97.3	8	2.7	300	100

RLB ile IFAT karşılaştırıldığında $X^2=0.174$, $P>0.05$;
 RLB ile MB karşılaştırıldığında $X^2=13.59$, $P<0.01$;
 IFAT ile MB karşılaştırıldığında $X^2=10.95$, $P<0.01$

*: Mikroskopik bakı

Tablo 5. RLB referans kabul edilerek, IFAT ve MB'nin duyarlılık, özgüllük, uyumluluk ve *Kappa* değerleri.

	RLB		Toplam
	Pozitif	Negatif	
MB* - / IFAT -	17	250	267
MB - / IFAT +	5	20	25
MB + / IFAT-	6	0	6
MB + / IFAT+	2	0	2
Toplam	30	270	300
<i>*Mikroskopik bakı</i>			
IFAT	RLB		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	7	20	27
Negatif	23	250	273
Toplam	30	270	300
Duyarlılık=%23.33, Özgüllük=%92.59, Uyumluluk=%85.66, <i>Kappa</i> =0.167, P<0.01			
MB	RLB		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	8	0	8
Negatif	22	270	292
Toplam	30	270	300
Duyarlılık=%26.66, Özgüllük=%100, Uyumluluk=%92.66, <i>Kappa</i> =0.396, P<0.001			
MB/IFAT	RLB		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Her ikisi Pozitif	2	0	2
En az biri Negatif	28	270	298
Toplam	30	270	300
Duyarlılık=%6.66, Özgüllük=%100, Uyumluluk=%90.66, <i>Kappa</i> =0.396, P<0.001			
MB/IFAT	RLB		Toplam
	Pozitif	Negatif	
En az biri pozitif	13	20	33
Her ikisi negatif	17	250	267
Toplam	30	270	300
Duyarlılık=%43.33, Özgüllük=%92.59, Uyumluluk=%87.66, <i>Kappa</i> =0.344, P<0.001			



Şekil 1. PZR ürünlerinin RLB testine tabi tutulmasından sonra membranın görüntüsü (Orijinal).

Tartışma ve Sonuç

Sığırlarda babesiosis, tropik ve subtropik bölgelerde, kenelerle nakledilen ve ekonomik kayıplara yol açan önemli bir hastalıktır (17). Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi Türkiye’de de sığır yetiştiriciliğini tehdit etmektedir.

Babesiosis’de, hastalığı atlatan hayvanlar, uzun süre vücutlarında, az miktarda parazit taşıyarak vektör kenelerin enfeksiyon kaynağını oluşturmaktadır ve hastalık için portörlük yapmaktadırlar. Bu durumdaki taşıyıcı hayvanlarda mikroskopik muayene ile etkenleri teşhis etmek güçleşmekte ve yanlışlıklara sebep olmaktadır (1,6,10). Diğer taraftan, parazitin bizzat kendisinin değil de, ona karşı oluşan antikorların tespiti esasına dayandırılarak yapılan IFAT, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Komplemant Fiksasyon Testi (CFT) gibi serolojik yöntemler ve bunlardan özellikle IFAT babesiosis’in teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (31). Ancak bu yöntemlerde, etken bulunmadığı halde antikorların varlığını devam ettirmesine bağlı olarak ortaya çıkan seropozitifliklerin (15) ve çapraz reaksiyonların sebep olduğu yanlış seropozitifliklerin meydana gelebileceği bildirilmiştir (21).

Yukarıda açıklandığı gibi, parazitlerin teşhisinde gerek mikroskopik gerekse serolojik yöntemlerde karşılaşılan olumsuzluklar moleküler biyolojik çalışmalara paralel olarak geliştirilen PZR tekniği ile giderilmeye çalışılmıştır. Bu teknik ile özellikle taşıyıcı hayvanlarda *Babesia* türlerini de içine alan birçok patojen etkenin duyarlı ve özgül şekilde teşhis edilmesine olanak sağlanmıştır (5,9,11). Ancak türe özgü PZR kullanılması durumunda, her hastalık etkeni için ayrı ayrı testlerin yapılması gerektiğinden bu durum hem zaman hem de ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu kayıpların giderilmesi amacıyla bir defada birden fazla parazit türünün teşhisine olanak sağlayan ve aynı zamanda PZR’a göre daha du-

yarlı olan RLB yöntemi geliştirilmiştir (13,15). Geçmişte yapılan çalışmalarda, kan protozoonlarının teşhisinde PZR ve RLB’nin mikroskopik bakı ve IFAT’a göre hem daha duyarlı hem de daha özgül olduğu bildirilmiştir (1,30,32).

Bu çalışmada, RLB referans test kabul edilerek mikroskopik bakı (MB) ve IFAT’ın duyarlılık, özgüllük, uyumluluk ve *Kappa* değerleri bakımından karşılaştırmaları yapılmıştır. Buna göre IFAT ile RLB’de pozitiflerin %23.33’ü, negatiflerin ise %92.59’u tespit edilmiştir. Bu iki yöntemin uyumluluğu %85.66, *Kappa* değeri ise 0.167 bulunmuş ve iki yöntem arasındaki tutarlılık istatistiksel bakımdan anlamlı görülmüştür ($p < 0.01$). MB ile, RLB’de pozitiflerin %26.66’sı, negatiflerin ise %100’ü saptanmıştır. Bu iki metod arasındaki uyumluluk %92.66, *Kappa* değeri ise 0.396 ($p < 0.001$) olarak tespit edilmiştir.

Öte yandan RLB karşısında, IFAT ve MB’nin güçleri birleştirilerek yapılan karşılaştırmada; IFAT ve MB’den her ikisinin pozitif ve en az birinin negatifliği esas alınarak, RLB pozitiflerin %6.66’sı, negatiflerin ise %100’ü tespit edilmiş, uyumluluğun %90.66, *Kappa* değerinin ise 0.114 ($p < 0.001$) olduğu görülmüştür. Buna karşılık, IFAT ve MB’den en az birinin pozitif, her ikisinin negatifliği temel alındığında ise, RLB pozitiflerin %43.3’ü, negatiflerin ise %92.59’u tespit edilmiş, tutarlılık %87.66, *Kappa* değeri ise 0.344 ($p < 0.001$) olarak bulunmuştur.

Tür bazında, IFAT ve RLB pozitiflikleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemde de pozitif olan 13 örneğin 11’inde aynı türlerin görülmesine karşın, IFAT’da *B. bigemina* pozitif olan 2 örneğin RLB’de *B. bigemina*+*B. bovis* miks halde saptanması, bunun yanında IFAT’da tespit edilemeyen *B. divergens*’in RLB’de pozitif sonuç vermesi, Papadopoulos ve ark. (21)’nin da bildirdiği gibi IFAT’da *B. bigemina*, *B. bovis* ve *B. divergens* türleri arasında görülen çapraz reaksiyonlara bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Ankara bölgesinde mikroskopik bakıya dayanan çalışmalarda prevalansın %0,8-%27,2 arasında olduğu bildirilmiştir (8,14,16). Bu çalışmada ise mikroskopik bakı sonucunda bu oran %2,7 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde geçmişte IFAT ile yapılan serolojik çalışmalarda babesiosis'in seroprevalansının %4,8-%100 arasında değiştiği bildirilirken (7,8,16,23) bu çalışmada %9 olarak tespit edilmiştir. Türkiye'de babesiosis'in teşhisine yönelik PZR testi ise ilk defa Tanyüksel ve ark. (30) tarafından yapılmış bu çalışmada *Babesia* türlerinin yaygınlığı %8,45-%12,68 olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada Türkiye'de ilk defa kan protozoonlarının tanısında PZR testini hibridizasyonla birleştiren RLB testi kullanılmıştır. Mikroskopik bakı ve IFAT ile yapılan karşılaştırmalarda daha duyarlı ve özgül olduğu ortaya konmuştur. RLB'de bir örnekte aynı anda birden fazla *Babesia* türünün bulunabileceği ve bunların miksoenfeksiyonlar meydana getirebileceği tespit edilmiştir. Bu metot direk olarak etkenin tespitine yönelik olduğundan, bir bölgede hastalığın yayılmasında vektör keneler için hastalığın kaynağını oluşturan taşıyıcı hayvanların tespit edilmesi açısından da yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- Almeria S, Castellà J, Ferrer D, Ortuño A, Estrada-Peña A, Gutiérrez JF, 2001. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): A comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet Parasitol.*, 99:249-259.
- Bekker C, de Vos S, Taoufik A, Sparagano O, Jongejan F, 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantum* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridisation. *Vet Microbiol.*, 89:223-238.
- Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ, 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol.*, 57:61-74.
- Burridge MJ, Brown CG, Kimber CD, 1974. *Theileria annulata*: cross-reactions between cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. *Exp Parasitol.*, 35: 374-380.
- Calder JAM, Reedy GR, Chieves L, Coutney CH, Littel R, Livengood JR, Norval RAI, Smith C, Dame JB, 1996. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J Clin Microbiol.*, 34 (11):2748-2755.
- Ceci L, Jongejan F, Carelli G, Tassi P, Sparagano O, 1999. Identification of *Theileria buffeli/orientalis* and *Babesia bigemina* in Apulian cattle using molecular techniques and study of changes in blood parameters. *Parasitologia.*, 41 (Suppl. 1):31-32.
- Çakmak A, 1987. Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara. *Tierarztl. Hochsch. Diss.*, Hannover.
- Eren H, 1993. Ankara yöresinde sığır babesiosisinin sero-prevalansı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, 40 (1):23-37.
- Fahrimal Y, Goff WL, Jasmer DP, 1992. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J Clin Microbiol.*, 30(6):1374-1379.
- Figuroa JV, Buening GM, 1995. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Vet Parasitol.*, 75:75-92.
- Figuroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM, 1992. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol.*, 30(10):2576-2582.
- Friedhoff KT, 1988. Transmission of *Babesia*. Ristic M. eds., *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. Boca Raton, Florida, CRC Press, p:23-52.
- Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, Sparagano O, 2001. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol.*, 99: 273-286.
- Göksu K, 1959. Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. *Ank. Üni. Vet. Fak.Yay. No:115/60, Yeni Matbaa, Ankara.*
- Gubbels MJ, de Vos S, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F, 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blotting hybridization. *J Clin Microbiol.*, 37:1782-1789.

16. İnci A, 1992. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, 39(1-2):153-167.
17. Kuttler KL, 1988. World-Wide Impact of Babesiosis. Ristic M. eds., *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. Boca Raton, Florida, CRC Press, p:1-22.
18. Ludford CG, Hall WTK, Sulzer AJ, Wilson M, 1972. *Babesia argentina*, *Plasmodium vivax* and *P.falciparum*:Antigenic cross reactions. *Exp Parasitol.*, 24:327-335.
19. Lunemann JD, Zarmas S, Priem S, Franz J, Zschenderlein R, Aberer E, Klein R, Schouls L, Burmester GR, Krause A, 2001. Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol.*, 39:1130-1133.
20. McCosker JP, 1981. The global importance of babesiosis. Ristic M, Kreier JP, eds., *Babesiosis*. New York, Academic Press, p:1-24.
21. Papadopoulos B, Perie NM, Uilenberg G, 1996. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece 1. Serological cross-reactions. *Vet Parasitol.*, 63:41-56.
22. Purnell RE, 1981. Babesiosis in various hosts. Ristic M, Kreier JP, eds., *Babesiosis*, New York, Academic Press, p:25-64.
23. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, 1989. Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin seroinsidensi üzerine araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. Tebliğ No:103, İstanbul.
24. Smeenk I, Kelly PJ, Wray K, Musuka G, Trees AJ, Jongejan F, 2000. *Babesia bovis* and *B. bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. *J S Afr Vet Ass.*, 71(1):21-24.
25. Sonenshine DE, 1993. *Biology of Ticks*. Vol. II. Newyork, Oxford, Oxford University Press. Chapter V.
26. Sparagano O, 1999. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. *J Vet Parasitol.*, 13(2):83-92.
27. Sparagano O, Carelli G, Ceci L, Shkap V, Molad T, Vitale F, Loria GR, Reale S, Caracappa S, Bouattour A, Almeria S, Castella J, Corchero E, Habela M, 2002. Pan-Mediterranean comparison for the molecular detection of *Theileria annulata*. *Ann N Y Acad Sci.*, 969:73-77.
28. Sparagano O, Jongejan F, 1999. Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens. *Parassitologia.*, 41(Suppl.1):101-105.
29. Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, De Vos AP, Caracappa S, Jongejan F, 2000. Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. *Ann N Y Acad Sci.*, 916:533-539.
30. Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, Araz E, Haznedaroğlu T, Yukarı BA, Açıcı M, 2002. Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. *T Parazitol Derg.*, 26(1):42-47.
31. Todorovic RA, Carson CA. 1981. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. Ristic M, Kreier JP, eds., *Babesiosis*. New York, Academic Press, p:381-409.
32. Vatansever Z, Nalbantoğlu S, 2002. Sahada *Theileria annulata* ile enfekte sığırların Nested PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), IFA (İndirekt Floresan Antikor) testi ve kan frotisi bakışı ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci.*, 26: 1465-1469.

Yazışma Adresi:

Araş. Gör. Dr. Anıl İÇA
 Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 Parazitoloji Anabilim Dalı
 38090 Kocasinan / KAYSERİ
 E-mail: anilica@erciyes.edu.tr