

ANKARA YÖRESİNDEN ELDE EDİLEN THEILERIA ANNULATA (Dschunkowsky and Luhs, 1904) İZOLATLARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR¹

5. *Theileria annulata* kan stabilatları ile enfekte edilen danalar üzerinde antikor yanıtı ve serolojik çapraz reaksiyon çalışmaları

Fahri SAYIN²

Şükran DİNÇER²

Zafer KARAER²

Ayşe ÇAKMAK²

Abdullah İNCİ³

Bayram Ali YUKARI⁴

Hasan EREN⁵

Investigation on the Theileria annulata (Dschunkowsky and Luhs, 1904) stocks isolated around Ankara.

5. *Antibody response and serological cross-reaction studies on experimentally infected calves with Theileria annulata*

Summary: *In this study 7 susceptible Holstein calves, 2 to 3 months of age, were infected with T.annulata blood stabilates obtained from diseased cattle in 7 different villages of Ankara. In addition one calf contracted T.annulata infection in field was included in the experiment. Antisera were collected from the infected calves and tested with Indirect Fluorescence Antibody Test (IFAT) for antibodies to schizont and piroplasm antigens. In the absence of rechallenge occurrence and duration of antibody responses were observed and reactivity between the different isolates of T.annulata were investigated.*

The results showed that duration of antibody response to the theilerial infection was more than one year. There was serological cross-reactivity at high level titres between all the isolates of T.annulata. Antibody to piroplasm antigen was detectable for earlier and longer than antibody to schizont antigen. In general antibodies which were detectable by IFA test appeared about 2-4 weeks after infection and continued to rise for a further 2-4 weeks. Following this, they stabilized and then declined at a variable rate. In the absence of rechallenge schizont IFA antibodies have generally declined to 1:10 while piroplasm IFA antibodies have generally declined to 1:320 by one year after infection. The infected calves tested were in carrier state. Baseline titres were taken at 1:40 for schizont antigen and 1:20 for piroplasm antigen.

Key words: *T. annulata, blood stabilates, antibody response, serological cross-reactions, experimental infection.*

1. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 87-10-00-01 no'lu proje olarak desteklenmiştir.
2. Ank.Üniv. Veteriner Fakültesi, Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı, Ankara
3. Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri
4. Akdeniz Üniv. Burdur Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı
5. Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı

Özet: Bu çalışmada, 2-3 aylık duyarlı 7 Holstein danası, Ankara'nın 7 değişik köyünde tropikal theileriosis'e yakalanmış 7 sığırdan alınan *Theileria annulata* kan stabilatı ile enfekte edilmiş; ayrıca doğal enfekte (Bala-TİGEM) bir dana da çalışmaya dahil edilmiştir. Enfekte danaların herbirinden belirli zamanlarda toplanan antiserumlar, piroplazm ve şizont antijenleri kullanılarak, İndirek Floresan Antikor (IFA) yöntemiyle test edilmişlerdir. Böylece mevcut antiserumlarda antikor yanıtının varlığı, görüldüğü gün ve süre gözlenmiş, değişik orijinli *Theileria annulata* izolatları arasındaki serolojik çapraz reaksiyonlar incelenmiştir.

Hastalığı geçiren bütün danalarda *T.annulata*'ya karşı pozitif reaksiyon görülmüştür. Genellikle enfeksiyondan 2-4 hafta sonra danaların kanında antikor saptanmıştır. Bunu izleyen 2-4'üncü hafta içinde antikor titreleri yükselmiş ve daha sonra giderek azalmıştır. Enfeksiyondan yaklaşık 1 yıl sonra danalardan alınan kanda şizont antijeni ile 1:10, piroplazm antijeni ile 1:320 titrede antikora rastlanmıştır. Değişik orijinli *T.annulata* izolatları arasında yüksek titrede serolojik çapraz reaksiyon oluşmuştur. Kanda piroplazm antijenine karşı oluşan antikorlar, şizont antijenine karşı oluşan antikorlara nazaran, daha erken dönemde ve daha yüksek titrede bulunmuşlardır. Şizont antijenlerine karşı oluşan antikorlar için 1:40, piroplazm antijenlerine karşı oluşan antikorlar için 1:20 baz titre olarak kullanılmıştır.

Anahtar sözcükler: *T. annulata*, kan stabilatları, antikor yanıtı, serolojik çapraz reaksiyon, deneysel enfeksiyon

Giriş

Bazı araştırmacılar (1,6-9,12) sahadan izole edilen *T.annulata* stoklarını immunolojik açıdan farklı bulmuşlardır. Sergent ve ark. (12), homolog bir suşa karşı oluşan premünisyonun heterolog bir suşa karşı oluşan premünisyonun daha kuvvetli olduğunu bildirmişler, Pipano ve Hadani (6), Rafyi ve ark. (8) bağışık bir sığırı heterolog bir suşla eprüve ettikten sonra hayvanda zayıf bir reaksiyonun görüldüğünü belirtmişlerdir. Adler ve Ellenbogen (1) ile Sergent ve ark. (12) ise, Cezayir'den izole edilen bir suş ile İsrail'den izole edilen bir suşun birbirine karşı koruyucu bir etki oluşturmadıklarını saptamışlardır. Buna karşılık Rasulov (9), Özbekistan ve Azerbaycan'dan izole edilen *T.annulata* suşlarının birbirine karşı bağışıklık oluşturduklarını tespit etmiştir. Pipano ve ark. (7) bu durumun çeşitli bölgelerden izole edilmiş olan *T.annulata* stoklarının antijenik yapılarının farklı olmasından kaynaklandığını ileri sürmüştür. Aynı araştırmacılara (7) göre, kültürasyon ve pasajlarla atenuye edilmiş *T.annulata* Ankara suşu ile aşılanan duyarlı da-

nalar, patojen *T.annulata* İsrail suşunun kene stabilatı ile eprüve edildikleri zaman hastalanmışlardır. Danaların ateşi yükselmiş, karaciğerde parazitin şizontları, perifer kanda piroplazmik şekilleri bulunmuştur. Bunlara karşılık Subramanian ve ark. (14), Hindistan'ın değişik bölgelerinden izole edilen *T.annulata* stokları arasında yaptıkları çapraz bağışıklık deneyleri sonunda suş farklılığı görmediklerini bildirmişlerdir. Pipano ve ark. (7) göre, Askarov, Dağıstan, Özbekistan ve Azerbaycan'dan izole edilen *T.annulata* stoklarının antijenik bakımından birbirine benzediğini, bu durumun İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) ile saptandığını belirtmiştir.

Bu araştırma Ankara'nın değişik köylerinde tropikal theileriosis'e yakalanmış sığırlardan elde edilen *T.annulata* kan stabilatları ile enfekte edilen danalardan ve doğal enfekte 1 danadan (Bala- TİGEM) hazırlanan şizont ve piroplazm antijenleri ile bu danalardan değişik zamanlarda alınan antiserumlar arasındaki reaksiyonlar, seropozitif olgularda görülen antikor titreleri ve bu olgularda seropozitiflik sürelerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

1) Kullanılan Malzemeler:

a) Fosfat Buffer Salin (PBS) Potasyumsuz:

Alkali kısım 17.44 g NaCl
7.16 g Na₂HPO₄ X 12 H₂O
24.60 gr 2000 ml distile
suda eritildi.

Asit kısım 8.72 g NaCl
1.38 g NaH₂PO₄ X H₂O
10.10 gr 1000 ml distile
suda eritildi.

Alkali kısım üzerine pH= 7.2 oluncaya
kadar asit kısım ilave edildi.

b) Evans Blue: Merck, cat. no. 3169

c) Gliserin: Merck, cat. no. 4095

d) Tech Pen Marker: Neolab 2-5050.

e) Tech Pen İnk: Neolab 2-5051

f) PS mikroplattle U-Form 96K: Greiner
650101

g) Osram: HBO 50W/ac super pressure
Mercury lamp: 119003 0004

h) Standarttips 101-1000µl Eppendorf:
0030 015. 002

i) Standarttips 0.5-10µl Eppendorf: 0030
001. 168

k) Standarttips 1-100µl Eppendorf: 0030
003. 004

l) Eppendorf: 4710 38003 M, 100-1000µl
pipet.

m) Eppendorf: 4710 28330 M, 10-100µl
pipet.

n) Eppendorf: 4710 51249 M, 0.5-10µl
pipet.

o) Bround, Transferpette-12, 50-200µl;
cat.No.04174126.

p) Titertek, 8 kanallı: Cat.No.79088.

2) Dency hayvanları:

Bu çalışmada *T.annulata*'ya duyarlı, Hols-
tein ırkı, 2-3 aylık 8 erkek dana kullanılmıştır.

3) İnokülasyondan önce danaların mu-
ayenesi ve *Theileria annulata* kan stabilatının
elde edilmesi:

Bu çalışmanın ilk bölümünde belirtildiği
gibi yapılmıştır (10).

4) Enfekte danalardan kan alınması ve se-
rumun ayrılması:

Ankara'nın Gülseren, Emirler, Balcıkhisar,
Eryaman (2 kan stabilatı, Eryaman-1 ve Er-
yaman-2) ve Hıdırşih köylerinde tropikal the-
ileriosis'e yakalanmış sığırlardan alınan
T.annulata kan stabilatları ile enfekte edilen sı-
rasıyla 87-75, 88-101, 88-102, 88-103, 88-104,
86-101, 86-115 numaralı 7 dana ile doğal en-
fekte 87-77 (Bala -TİGEM) numaralı danadan
enfeksiyonu izleyen ilk 2 ayda haftada bir,
sonra daha uzun aralarla, heparinsiz steril tüp-
lere (Vacutainer, Brand SST tubes, Becton Dic-
kinson, Lot/chB 6Y086) alınan yaklaşık 9.5ml
kan, 2000-2500 devirde 10 dakika santrifüj edi-
lerek çıkan antiserumlar 1.5ml'lik mikrotüplere
(Kartell Part No.000298-00 Micro T tubes
Neut., FSA. Tul-645-0306, Supplier code
460200) konmuş ve IFA (İndirek Floresan An-
tikor Testi) testinde kullanılmaya kadar -20°C
de saklanmıştır.

5) *Theileria annulata* kan stabilatı ile en-
fekte edilen danalarda tropikal theileriosis'in iz-
lenmesi:

Bu araştırmanın 1'inci makalesinde bil-
dirildiği şekilde uygulanmıştır (10).

6) Teste kullanılan pozitif ve negatif kontrol
serumları:

Rd.144890 *T.annulata* (+); Rd.10
T.annulata (-), Hannover.

7) IFAT için antijen hazırlanması Çak-
mak'a (2) göre yapılmıştır.

a) Piroplazm antijeni:

Theileria annulata ile inoküle edilen dency
danalarından, paraziteminin %7'ye çıktığı dö-
nemde, 20cm³ heparinli kan alınmış, bu kan 3
misli 4°C de steril PBS ile sulandırılmış ve
2100 devirle, +4°C de, 10 dakika santrifüj edil-
miştir. Tüpte yüzeye çıkan sıvı pipetle çekilip
atılmış, dipte toplanan eritrositler üzerine, crit-
rosit seviyesini 3 misli, +4°C'de PBS ilave edil-
miştir. Pipetlecnerek suspansiyon haline getirilen

eritrositler 2100 devirle +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpte yüzeye çıkan sıvı bir pipetle çekilerek atılmış ve dipteki eritrosit tortusu, bir önceki gibi, PBS ile sulandırılıp süspansiyon haline getirilip santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi 3-5 defa tekrarlanmıştır. Antijen preparatındaki parazit yoğunluğunu tespit etmek amacıyla yıkanmış eritrositten az bir kısım, 1:2- 1:4096'ya kadar PBS ile sulandırılmıştır. Bu şekilde seri halde sulandırılmış olan eritrosit süspansiyonlarından, önceden aseton- alkol karışımı ile temizlenmiş bir lam üzerine, özel renkli bir kalemle çizilmiş, 2 sıralı 8'er dairenin her birine 5µl kadar damlatılmıştır. Daha sonra lam havada kurutulmuş, 100°C'de etüvde 15 dakika tespit edilmiş ve Giemsa boyası ile boyandıktan (% 5 Giemsa solüsyonu ile 30 dakika) sonra, bir mikroskop sahasında 20 parazitin görülmesi esas alınarak sulandırma basamağı saptanmıştır. Tespit edilmiş olan sulandırma basamağı dilüsyonunda yıkanmış eritrosit üzerine, PBS ilave edilmiştir. Bundan sonra yukarıda belirtilen çizilmiş hazır lamlara elde edilen yıkanmış ve dilüye edilmiş eritrositlerden 5µl damlatılmış, 37°C'lik etüvde bir gece bekletilmiştir. Kuruyan antijen preparatları, 5'er adedi bir arada olmak üzere, selpak kağıdına sarılmış, üzeri alüminyum folye ile kapatıldıktan sonra bir kutu içine konarak -70°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

b) Şizont antijeni:

Şizont antijeni, bu çalışmanın 2'inci bölümünde (11) ayrıntılı olarak açıklanan yöntemler kullanılarak, *T.annulata* ile enfekte deney danasından elde edilmiş enfekte kandan yapılan hücre kültürünün seri olarak yapılan 8'inci ve 11'inci pasajlarından hazırlanmıştır. Bu pasajlardan elde edilen hücre süspansiyonu 1000 devirde, 15°C de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpte yüzeye çıkan sıvı steril bir pipetle çekilerek atılmış, dipteki hücre tortusunun üzerine +4°C de, steril PBS ilave edilmiş, karışım pipetlenerak süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon hücre 1500 devirde 15°C de 5 dakika santrifüj edilmiş, tüpte yüzeye çıkan sıvı bir pipetle çekilerek atılmıştır. Bu yıkama işlemi 3 defa tekrarlanmıştır. Sulandırma basamağını tespit amacıyla yıkanmış hücre tortusu 1:5-

1:640'a kadar +4°C de steril PBS ile sulandırılıp süspansiyon haline getirilmiştir. Böyle seri halde sulandırılmış hücre süspansiyonlarının herbirinden, piroplazm antijeni hazırlanmasında bildirilen işlemler aynen uygulanmış, önceden aseton-alkol karışımı ile temizlenmiş bir lamın üzerine, özel kalemle çizilmiş iki sıralı 8'er dairenin her birine, 5µl kadar damlatılmıştır. Lam havada kurutulmuş, 100°C de etüvde tesbit edilmiş, Giemsa boyası ile boyanmıştır (%5 Giemsa solüsyonu ile 30 dakika). Bir mikroskop sahasında 20 parazitin görülmesi esas alınarak sulandırma basamağı saptanmıştır. Tespit edilmiş olan sulandırma basamağı dilüsyonunda yıkanmış hücre üzerine PBS ilave edilmiştir. Bundan sonra yukarıda belirtilen çizilmiş hazır lamlardaki dairelere, elde edilen yıkanmış ve dilüye edilmiş hücrelerden 5µl kadar damlatılmış, 27°C lik etüvde bir gece bekletilmiş, kuruyan şizont antijen preparatları selpak kağıdına sarılarak, 5'i bir arada, alüminyum folye ile sarılmıştır. Daha sonra bunlar bir kutu içine konarak -70°C deki derin dondurucuda saklanmıştır.

8) İndirek Floresan Antikor Testi'nin uygulanması:

a) Önceden hazırlanmış antijen preparatları derin dondurucudan (-70°C) çıkarılarak, nem çekici(CaCl₂ v.b.) kapalı bir kaba konmuş ve 2 saat tutulmuştur.

b) İşlenecek olan serumlar bir gün önceden derin dondurucudan (-20°C) çıkarılıp buzdolabına (+4°C) konmuştur.

c) Bu serumlar usulüne uygun şekilde mikrotiter plate'de sulandırılmıştır(1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280).

d) Nem çekici ortamda 2 saat bekleyen antijen preparatları numaralandırılarak nemli ortama konduktan sonra, üzerlerine sulandırılmış serumlar damlatılmıştır (Nemli ortam, kapaklı bir küvetin içine süzgeç kağıdı serilerek, üzerine distile su dökülmek suretiyle hazırlanmıştır).

e) Nemli ortam, küvetin kapağı kapatılarak, etüvde (37°C) tutulmuştur.

f) Bu süre sonunda preparatlar PBS ile bir defa elde yıkanmış, her biri 5'er dakika olmak üzere 2 defa da magnetik karıştırıcıda yıkanmıştır. Bunu takiben distile suda 2-3 dakika yıkanarak fön makinesi ile kurutulmuştur.

g) Kurutulan preparatlar yeniden küvet içindeki nemli ortama bırakılmış ve üzerlerine sulandırılmış konjugat damlatılmıştır. Sonra 37°C'de 30 dakika tutulmuştur.

h) Madde 6'daki yıkama ve kurutma işlemleri tekrarlanmıştır.

i) Kurutulan preparatlar üzerine gliserinli buffer damlatılarak lamel kapatıldıktan sonra kapaklı kutularına konmuştur.

j) Karanlık odada floresan mikroskopta preparatlara bakılmıştır (Neofluar 40'lık objektif kullanılmıştır).

9) Konjugatın Sulandırılması:

İndirek floresan antikor testinde kullanılacak konjugat (Sigma antibovine rabbit IgG, Cat No. F-7509) iyi floresan titresini tespit edildikten sonra 10 ve 20µl'lik porsiyonlara ayrılarak -20°C'ye kaldırılmıştır. Konjugat sulandırma sıvısı olarak 1 kısım Evans blue, 3 kısım PBS kullanılmıştır. Şizont antijeni ve piroplazm antijeni için 1:32 nispetinde sulandırmanın, en iyi floresan veren titre olduğu saptanmıştır. Yapılan indirek floresan antikor testinde (IFAT) yukarıda belirtilen oranda sulandırılan konjugat kullanılmıştır.

Bulgular

Ankara'nın Gülseren, Balçıkhisar, Emirler, Eryaman ve Hıdırsih köylerinde tropikal theileriosis'e yakalanmış sığırlardan alınan *T.annulata* kan stabilatları kullanılarak enfekte edilen danaların 2'si (87-75, , 88-103) ve *T.annulata* (Bala-TİGEM) ile doğal olarak enfekte 87-77 numaralı danadan hazırlanan şizont ve piroplazm antijenleri ile enfekte edilen danaların 2'sinden (88-101, 88-102) hazırlanan yalnız piroplazm antijeni, değişik zamanlarda 3 dana'dan (87-75, 88-102 ve 88-104) elde edilen antiserumlarla reaksiyona sokulmuş ve aşağıda belirtilen sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Tablo 1'de görüldüğü gibi *T.annulata*- Gülseren kan stabilatı ile enfekte 87-75 numaralı danadan, enfeksiyonu izleyen, 17'inci günde alınan antiserum, aynı danadan hazırlanan homolog şizont antijeni ve homolog piroplazm antijeni ile yüksek titrede (sırasıyla 1:1280-1:2560) reaksiyonlar vermiştir. Ondan sonra antiserumda mevcut antikor titresini giderek yükselmiş, 50'inci günde şizont ve piroplazm antijenlerinin her ikisiyle de 1:10240 olarak saptanmıştır. Daha sonra antikor titresini tedricen düşmeye başlamış, enfeksiyondan 311 gün sonra, şizont antijeni ile 1:10, piroplazm antijeni ile 1:320 olarak tespit edilmiştir.

Theileria annulata- Gülseren kan stabilatı ile enfekte 87-75 numaralı danadan, enfeksiyonu izleyen 17'inci günde alınan antiserum, *T.annulata* (Bala-TİGEM) ile doğal enfekte 87-77 numaralı danadan hazırlanan heterolog şizont antijeni ve heterolog piroplazm antijeni ile test edildiğinde, kısmen düşük titrede (sırasıyla 1:320- 1:640) reaksiyonlar vermiştir. Her iki heterolog antijenle test edilen bu örnekteki antikor titresini, birinci örnekte olduğu gibi, 17'inci günden sonra giderek yükselmiş, 50'inci günde zirveye çıkmış (şizont antijeni ile 1:1280; piroplazm antijeni ile 1:2560), daha sonra tedricen azalmıştır. Enfeksiyondan 347 gün sonra antiserumdaki antikor titresini, şizont antijeni ile 1:10, piroplazm antijeni ile 1:80 olarak saptanmıştır.

Aynı danadan (87-75 numaralı), enfeksiyonu izleyen 17'inci günde alınan antiserum, *T.annulata*- Emirler kan stabilatı ile enfekte 88-103 numaralı danadan hazırlanan heterolog şizont antijeni ve heterolog piroplazm antijeni ile teste tabi tutulduğu zaman ise kısmen yüksek titreli (sırasıyla 1:640 ve 1:2560) reaksiyon vermiştir. Onyedinci günden itibaren antiserumda mevcut antikor titrelerinde, her iki heterolog antijenle de, tedrici bir yükselme tespit edilmiştir. Enfeksiyonun 50'inci gününde antikor titrelerinin, şizont antijeni ile 1:5120'ye, piroplazm antijeni ile 1:10240'a çıktığı saptanmıştır. Bundan sonra tekrar düşüşe geçen antikor titresini, enfeksiyondan 347 gün sonra şizont antijeni ile 1:5, piroplazm antijeni ile 1:1280 olarak bulunmuştur..

Tablo 1: Ankara'nın değişik köylerinden elde edilen *Theileria annulata* izolatlarına ait şizont ve piroplazm antijenleri ve *T.annulata*- Gülseren anti- serumu kullanılarak, IFAT ile yapılan çapraz serolojik reaksiyon testlerinin sonuçları
 Table 1: The results of serological cross reaction tests performed between the antigens of *T.annulata* isolates from different villages of Ankara and the antisera against *T.annulata* Gülseren stock.

Anti-serum	Günler	87-75 (Gülseren)		87-77* (Bala-TİGEM)		88-103 (Emirler)	
		S.Ag.	P.Ag.	S.Ag.	P.Ag.	S.Ag.	P.Ag.
87-75 Gülseren	0	-	-	-	-	-	-
	17	1:1280	1:2560	1:320	1:640	1:640	1:2560
	28	1:5120	1:5120	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
	35	1:5120	1:5120	1:640	1:1280	1:5120	1:10240
	42	1:5120	1:5120	1:640	1:1280	1:5120	1:10240
	50	1:10240	1:10240	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
	68	1:10240	1:5120	1:2560	1:1280	1:2560	1:5120
	115	1:5120	1:2560	1:1280	1:640	1:2560	1:5120
	176	1:640	1:2560	1:640	1:640	1:320	1:5120
	216	1:320	1:2560	1:640	1:640	1:160	1:5120
	236	1:160	1:2560	1:320	1:640	1:160	1:5120
	270	1:160	1:1280	1:320	1:640	1:160	1:1280
	311	1:20	1:320	1:20	1:320	1:20	1:1280
	325	1:10	1:320	1:10	1:320	1:10	1:1280
	347	1:10	1:320	1:10	1:180	1:5	1:1280

S.Ag.: Şizont antijen, P.Ag.: Piroplazm antijen, -: Negatif reaksiyon, *: Doğal olarak enfekte oldu, IFAT: İndirek Floresan Antikor Testi S.Ag.: Schizont antigen, P.Ag.: Piroplasm antigens, -: Negative reaction, *:It was infected in field, IFAT: Indirect fluorescent antibody test.

Tablo 2: Ankara'nın değişik köylerinden elde edilen *Theileria annulata* izolatlarına ait şizont ve piroplazm antijenleri ve *T.annulata*- Balçıkhisar anti- serumu kullanılarak, IFAT ile yapılan çapraz serolojik reaksiyon testlerinin sonuçları
 Table 2: The results of serological cross reaction tests performed between the antigens of *T.annulata* isolates from different villages of Ankara and the antisera against *T.annulata* Balçıkhisar stock

Anti-serum	Günler	87-75 (Gülseren)		87-77* (Bala-TİGEM)		88-103 (Emirler)	
		S.Ag.	P.Ag.	S.Ag.	P.Ag.	S.Ag.	P.Ag.
88-102 Balçıkhisar	0	-	-	-	-	-	-
	17	-	1:640	-	1:320	1:40	1:5120
	28	1:5120	1:2560	1:2560	1:1280	1:2560	1:10240
	35	1:5120	1:10240	1:5120	1:2560	1:2560	1:10240
	42	1:10240	1:10240	1:5120	1:2560	1:5120	1:10240
	50	1:10240	1:10240	1:1280	1:5120	1:2560	1:10240
	63	1:5120	1:5120	1:1280	1:5120	1:1280	1:2560
	73	1:2560	1:2560	1:640	1:5120	1:640	1:2560
	91	1:2560	1:2560	1:640	1:5120	1:640	1:2560
	104	1:2560	1:1280	1:640	1:5120	1:320	1:1280
	119	1:2560	1:1280	1:640	1:2560	1:320	1:1280
	133	1:1280	1:1280	1:640	1:1280	1:320	1:640
	145	1:320	1:1280	1:320	1:1280	1:320	1:640
	161	1:80	1:1280	1:320	1:1280	1:320	1:640
	180	-	1:1280	1:320	1:1280	1:320	1:320

S.Ag.: Şizont antijen, P.Ag.: Piroplazm antijen, -: Negatif reaksiyon, *: Doğal olarak enfekte oldu, IFAT: İndirek Floresan Antikor Testi S.Ag.: Schizont antigen, P.Ag.: Piroplasm antigens, -: Negative reaction, *:It was infected in field, IFAT: Indirect fluorescent antibody test.

Sonuçları Tablo 1'de de özetlenen deneyde, *T.annulata*- Gülseren kan stabilatı ile enfekte danadan alınan antiserumun, homolog *T.annulata*- Gülseren şizont ve piroplazm antijenleri, heterolog *T.annulata*- Bala (TİGEM) şizont ve piroplazm antijenleri ve heterolog *T.annulata*- Emirler şizont ve piroplazm antijenleri ile test edildiğinde, hepsiyle reaksiyon verdiği anlaşılmıştır. Homolog ve heterolog antijenlerle meydana gelen antikor titreleri arasında çok önemli bir fark görülmemiştir. Bununla beraber şizont antijeniyle oluşan antikor titresinin, piroplazm antijenine kıyasla, daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Deneysel olarak enfekte edilen danalarda *T.annulata*'ya karşı oluşan antikor, azalmakla beraber, bir yıldan fazla kandaki varlığını sürdürmüştür. Enfeksiyondan en erken 17 gün sonra kanda antikor bulunmuş, genellikle enfeksiyonun 28'inci gününden 42'inci gününe kadar kandaki antikor miktarında artış olmuş, daha sonra tedricen azalmıştır. Genellikle enfeksiyonun 35-42'inci günleri arasında kandaki antikor maksimum seviyeye ulaşmıştır.

Tablo 2'de görüldüğü gibi, *T.annulata*- Balçıkhisar kan stabilatı ile enfekte edilen 88-102 numaralı danadan enfeksiyonu izleyen 17'inci günde alınan antiserum, *T.annulata*- Gülseren kan stabilatı ile enfekte 87-75 numaralı danadan hazırlanan heterolog şizont antijeni ile test edildiğinde reaksiyon vermemiş, fakat piroplazm antijeni ile 1:640 titrede reaksiyon vermiştir. Enfeksiyonun 28'inci gününden itibaren antikor titresini tedricen yükselmeye başlamış, 42'inci günde zirveye çıkmış (1:10240- 1:10240), 50'inci günden itibaren tedricen azalmaya başlamış ve 180'inci günde şizont antijeni ile negatif reaksiyon saptanırken, piroplazm antijeni ile antikor titresinin 1:1280 olduğu tespit edilmiştir.

Theileria annulata (Bala-TİGEM) ile doğal olarak enfekte olan 87-77 numaralı danadan hazırlanan heterolog şizont antijeni, 88-102 numaralı danadan enfeksiyonu izleyen 17'inci günde alınan antiserum ile test edildiğinde reaksiyon vermemiş, piroplazm antijeni ile 1:320 titre'de reaksiyon vermiştir. Enfeksiyonun 28'inci gününden sonra alınan antiserumlar, aynı danadan hazırlanan heterolog

şizont ve piroplazm antijenleri ile, giderek artan titrelerde reaksiyon vermişlerdir. Enfeksiyondan sonra 35'inci günde antiserumda mevcut antikor titreleri, şizont antijeni ile 1:5120, piroplazm antijeni ile 1:2560 olarak bulunmuştur. Enfeksiyonu 35'inci gününden sonra şizont antijeni ile saptanan antikor titrelerinde düşüş görülürken; piroplazm antijeni ile saptanan antikor titrelerinde 50'inci güne kadar yükselme ve 104'üncü günden sonra düşme görülmüştür. Nihayet enfeksiyondan 180 gün sonra alınan antiserumdaki antikor titresini şizont antijeni ile 1:320, piroplazm antijeni ile 1:1280 olarak saptanmıştır.

Aynı (88-102) numaralı danadan enfeksiyondan 17 gün sonra alınan antiserum, *T.annulata*- Emirler kan stabilatı ile enfekte 88-103 numaralı danadan hazırlanan heterolog şizont antijeni ile 1:40, heterolog piroplazm antijeni ile 1:5120 titrede reaksiyon vermiştir. Bundan sonra anti-serumda antikor titreleri yükselmeye başlamış, 28'inci günde piroplazm antijenleriyle 1:10240, 42'inci günde şizont antijeni ile 1:5120 olarak saptanmıştır. Ellinci günden sonra antikor titreleri düşmeye başlamış, enfeksiyondan 180 gün sonra gerek şizont ve gerekse piroplazm antijenleriyle saptanan antikor titresinin 1:320 olduğu görülmüştür.

Sonuçları Tablo 2'de özetlenen deneyde *Theileria annulata*- Balçıkhisar kan stabilatı ile enfekte danadan elde edilen anti-serum *T.annulata*- Gülseren ve *T.annulata*- Emirler kan stabilatı ile enfekte danalarla, doğal olarak *T.annulata* (Bala-TİGEM) ile enfekte danadan hazırlanan heterolog şizont ve heterolog piroplazm antijenleri ile test edildiğinde, hepsiyle, oldukça yüksek titrede reaksiyon vermiştir. Orijinleri farklı heterolog antijenlerle oluşan reaksiyon titreleri arasında çok önemli bir fark görülmemiştir. Bu deneyde de piroplazm antijenleri ile yapılan testlerde, şizont antijenine kıyasla, antikor titreleri yüksek bulunmuştur. En erken, enfeksiyonun 17'inci gününde, kanda antikora rastlanmıştır. Kandaki antikor miktarı enfeksiyonun 28'inci gününden itibaren artmaya başlamış, 35-42'inci günler arasında maksimum düzeye çıkmış ve sonra azalmaya başlamıştır. Enfeksiyondan yaklaşık 6

ay sonra yapılan testlerde bütün antiserum örneklerinde oldukça yüksek titrede antikor bulunmuştur.

Tablo 3'de görüldüğü üzere, *T.annulata* Eryaman-2 kan stabilatı ile enfekte 88-104 numaralı danadan enfeksiyondan 17 gün sonra alınan antiserum, *T.annulata*-Gülseren kan stabilatı ile enfekte 87-75 numaralı danadan hazırlanan heterolog şizont antijeni ile reaksiyon vermemiş, heterolog piroplazm antijeni ile 1:40 titrede reaksiyon vermiştir. Enfeksiyondan sonra 62'inci güne kadar yapılan yoklamalarda antiserum, heterolog şizont antijeni ile reaksiyon vermediği halde, heterolog piroplazm antijeni ile yüksek titrelerde (1:40- 1:5120) reaksiyon vermiştir. Altmışikinci günden sonra şizont antijeni ile çok düşük titrelerde (1:10-1:40) reaksiyon vermiştir. Fakat piroplazm antijeni ile yüksek titrelerde reaksiyon vermeye devam etmiş, 132'inci günden sonra titre düşmüştür. Enfeksiyondan 193 gün sonra alınan antiserumda, şizont antijeni ile 1:10 titrede, piroplazm antijeni ile 1:320 titrede antikor bulunabilmiştir.

Aynı (88-104) numaralı danadan, enfeksiyondan 17 gün sonra alınan antiserumda, *T.annulata* (Bala-TİGEM) ile doğal enfekte 87-77 numaralı danadan hazırlanan heterolog piroplazm antijeni ile 1:320 titrede antikor bulunduğu halde, heterolog şizont antijeni ile ancak enfeksiyondan 75 gün sonra alınan antiserumda 1:10 titrede, antikor tespit edilmiş, enfeksiyonun 28-117'inci günleri arasında alınan antiserum örneklerinde ise heterolog piroplazm antijeni ile oldukça yüksek titrelerde (1:2560) antikor saptanmıştır. Fakat heterolog şizont antijeni ile ancak enfeksiyonun 75'inci gününden sonra alınan antiserumlarda çok düşük titrede (1:10-1:160) antikor tespit edilebilmiştir. Enfeksiyondan 193 gün sonra alınan serumda antikor titresini, heterolog şizont antijeni ile 1:10, heterolog piroplazm antijeni ile 1:640 olarak saptanmıştır.

Aynı danadan (88-104 numaralı) enfeksiyondan 17 gün sonra alınan antiserum, *T.annulata*-Emirler kan stabilatı ile enfekte 88-103 numaralı danadan hazırlanan heterolog piroplazm antijeni ile 1:80 titrede reaksiyon ve-

Tablo 3: Ankara'nın çeşili köylerinden elde edilen *Theileria annulata* izolatlarına ait şizont ve piroplazm antijenleri ile *T.annulata* Eryaman-2 antiserumunu kullanarak IFAT ile yapılan çapraz serolojik reaksiyon testlerinin sonuçları
Table 3: The results of serological cross reaction tests performed between the antigens of *T.annulata* isolates from different villages of Ankara and the antisera against *T.annulata* Eryaman-2 stock

Anti-serum	Günler	87-75 (Gülseren)		87-77* (Bala-TİGEM)		88-103 (Emirler)	
		S.Ag.	P.Ag.	S.Ag	P.Ag	S.Ag	P.Ag
88-104 Eryaman-2	0	-	-	-	-	-	-
	17	-	1:40	-	1:320	-	1:80
	28	-	1:5120	-	1:2560	-	1:1280
	35	-	1:5120	-	1:2560	-	1:2560
	42	-	1:2560	-	1:2560	-	1:2560
	50	-	1:1280	-	1:2560	-	1:2560
	62	1:10	1:1280	-	1:2560	-	1:2560
	75	1:10	1:1280	1:10	1:2560	-	1:2560
	89	1:20	1:1280	1:160	1:2560	1:160	1:2560
	103	1:20	1:1280	1:160	1:2560	1:640	1:2560
	117	1:40	1:640	1:160	1:2560	1:160	1:2560
	132	1:80	1:640	1:40	1:1280	1:160	1:1280
	146	1:80	1:640	1:40	1:640	1:80	1:1280
	158	1:40	1:640	1:40	1:640	1:40	1:640
	173	1:40	1:640	1:20	1:640	1:40	1:320
193	1:10	1:320	1:10	1:640	1:40	1:320	

S.Ag.: Şizont antijen, P.Ag.: Piroplazm antijeni, -: Negatif reaksiyon, *: Doğal olarak enfekte oldu, IFAT: İndirek Floresan Antikor Testi

riken, heterolog şizont antijeni ile reaksiyon vermemiştir. Enfeksiyonun 28-117 günleri arasında alınan antiserumlarda heterolog piroplazm antijeni ile tedricen yükselen titrelere (1:1280-1:2560) antikor tespit edilmiştir. Halbuki heterolog şizont antijeni ile enfeksiyonun 89'uncu gününden sonra alınan antiserumlarda ancak, düşük titrelere (1:160) antikor saptanabilmiştir. Enfeksiyondan 193 gün sonra alınan antiserumda, heterolog şizont antijeni ile 1:40, heterolog piroplazm antijeni ile 1:320 titrelere antikor bulunmuştur.

Tablo 3'de özetlenen verilerin değerlendirilmeleri de ilk iki tablodan çıkarılan sonuçları doğrular niteliktedir. Ayrıca antiserumun piroplazm antijeni ile, şizont antijenine kıyasla, daha erken zamanda daha yüksek titrede reaksiyon verdiği, bu deneyde daha belirgin şekilde ortaya çıkmıştır.

Bunlara ilaveten, Tablo 4'de görüldüğü gibi, *T.annulata*- Gülseren kan stabilatı ile enfekte 87-75 numaralı danadan enfeksiyonu takiben 17'inci günde alınan antiserum,

T.annulata- Balçıkhisar ve *T.annulata*- Köseli kan stabilatları ile enfekte edilen 88-102 ve 88-101 numaralı danalardan hazırlanan heterolog piroplazm antijenleri ile reaksiyona sokulmuş ve bu serumda heterolog her iki antijenle yüksek titrede (1:2560) antikor saptanmıştır. Enfeksiyonun 28 ve 35'inci günlerinde alınan antiserumlarda, her iki antijenle yapılan testlerde, antikor titresinin tedricen yükseldiği (1:5120-1:10240) görülmüştür. Enfeksiyondan sonra 68 ve daha sonraki günlerde alınan antiserumlarda, yine her iki antijenle yapılan testlerle, antikor titresinin tedricen azaldığı saptanmıştır. Enfeksiyondan 347 gün sonra alınan antiserumda antikor titresinin, testte kullanılan antijene bağlı olarak, 1:640 ve 1:320 olduğu anlaşılmıştır. Neticce olarak, bu testte antiserum, heterolog piroplazm antijenlerinin her ikisi ile de pozitif reaksiyon vermiştir. Her iki heterolog antijenle elde edilen reaksiyon titrelerinin birbirine yakın ancak, her ikisinin de düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

T.annulata- Balçıkhisar kan stabilatı ile enfekte 88-102 numaralı danadan, enfeksiyondan

Tablo 4: Ankara'nın değişik köylerinden elde edilen *Theileria annulata* kan stabilatları ile enfekte edilen danalardan alınan antiserum ile aynı veya farklı danalardan hazırlanan homolog veya heterolog *T.annulata* piroplazm antijenleri arasında IFAT ile yapılan çapraz reaksiyonların sonuçları

Table 4: The results of serological cross reaction tests performed between homologous or heterologous *T.annulata* piroplasm antigens and the antisera obtained from calves with *T.annulata* blood stabilates which were collected from diseased cattle in different villages of Ankara

Anti-serum	Günler	88-102	88-101	Antiserum	Günler	88-102	88-101
		Balçıkhisar	Köseli			Balçıkhisar	Köseli
		Piroplazm (Antijeni)	Piroplazm (Antijeni)			Piroplazm (Antijeni)	Piroplazm (Antijeni)
87-75 Gülseren	0	Negatif	Negatif	88-102 Balçıkhisar	0	Negatif	Negatif
	17	1:2560	1:2560		17	1:5120	1:320
	28	1:5120	1:10240		28	1:10240	1:2560
	35	1:10240	1:5120		35	1:10240	1:2560
	42	1:10240	1:2560		42	1:10240	1:2560
	50	1:10240	1:2560		50	1:20480	1:2560
	68	1:5120	1:2560		63	1:20480	1:1280
	115	1:5120	1:2560		77	1:10240	1:2560
	176	1:5120	1:2560		91	1:10240	1:2560
	216	1:5120	1:1280		104	1:10240	1:2560
	236	1:5120	1:1280		119	1:10240	1:2560
	270	1:2560	1:1280		113	1:5120	1:1280
	311	1:1280	1:640		145	1:5120	1:640
	325	1:1280	1:320		161	1:5120	1:640
	347	1:640	1:320		180	1:2560	1:320

17 gün sonra alınan antiserum, aynı danadan hazırlanan homolog piroplazm antijeni ve *T.annulata*- Köseli kan stabilatı ile enfekte 88-101 numaralı danadan hazırlanan heterolog piroplazm antijeni ile sırasıyla 1:5120 ve 1:320 titrelerinde reaksiyon vermiştir. Enfeksiyonu izleyen 28-63'üncü günler arasında alınan antiserum örneklerinde, homolog ve heterolog piroplazm antijenleriyle yapılan testler, antiserumlar antikor titresinin tedrici olarak yükseldiğini göstermiştir. Altmışüçüncü günden sonra alınan antiserum örneklerinde, yine homolog ve heterolog piroplazm antijenleri yardımıyla yapılan saptamalara göre, antikor titreri başlangıçta bir süre aynı düzeyde kalmış, daha sonra tedricen azalmıştır. Enfeksiyondan 180 gün sonra alınan antiserum örneğinde antikor titresi homolog antijenle 1:2560, heterolog antijenle 1:320 olarak tespit edilmiştir.

Bu testte antiserumlar hem homolog ve hem de heterolog piroplazm antijeni ile pozitif reaksiyon vermiştir. Bununla beraber homolog antijenle meydana gelen reaksiyonların titreleri, heterolog antijenle oluşan titrele göre kısmen daha yüksek bulunmuştur.

Diğer taraftan Tablo 5 'te belirtildiği şekilde *T.annulata*- Gülseren, *T.annulata*- Emirler, *T.annulata*- Balçıkhisar, *T.annulata*- Er-

yaman-2, *T.annulata*- Eryaman-1 ve *T.annulata*- Hıdırsih kan stabilatları ile enfekte edilmiş sırasıyla 87-75, 88-103, 88-102, 88-104, 86-101 ve 86-115 numaralı danalardan enfeksiyondan 28 gün sonra alınan antiserumlarla, *T.annulata*- Gülseren, *T.annulata*- Emirler, *T.annulata*- Balçıkhisar ve *T.annulata*- Köseli kan stabilatları ile enfekte edilmiş sırasıyla 87-75, 88-103, 88-102, 88-101 numaralı danalarla, *T.annulata* (Bala-TİGEM) ile doğal enfekte 87-77 numaralı danadan hazırlanan piroplazm antijenleri IFA testiyle çapraz reaksiyona sokulmuşlar, neticede yukarıda sıralanan bütün antiserumların yine yukarıda belirtilen bütün antijenlerle oldukça yüksek titrelerde reaksiyon verdikleri görülmüştür. Homolog olan antiserum ve antijenlerin birbiriyle test edilmeleriyle meydana gelen antikor titreleri (altı çizili olanlar) ile heterolog olan antiserum ve antijenlerin test edilmesiyle ortaya çıkan antikor titreleri arasında (altı çizilmemiş olanlar) önemli bir fark görülmemiştir. Bu durum testte kullanılan antijenler arasında da bir suş farklılığının olmadığı şeklinde algılanmıştır.

Tartışma

Theileria annulata enfeksiyonunda, serumda *T.annulata* antijeni ile reaksiyon veren, özgül antikorların oluştuğunu, İndirek Floresan

Tablo 5: Ankara'nın değişik köylerinden elde edilen *Theileria annulata* kan stabilatları ile enfekte danalardan alınan antiserumlar ve hazırlanan piroplazm antijenleri arasında IFAT ile yapılan çapraz serolojik reaksiyonların sonuçları
Table 5: The results of serological cross reaction tests performed between the piroplazm antigens and the antisera obtained from the infected calves with *T.annulata* blood stabilates from different villages of Ankara

Antiserum	Çeşitli piroplazm antijenleri ile çapraz IFA testleri				
	87-75 Ta-Gülseren PAG	87-77** Ta-Bala (TİGEM) PAG	88-103 Ta-Emirler Pag	88-102 Ta-Balçıkhisar PAG	88-101 Ta-Köseli Pag
87-75 (Gülseren)*	<u>1:5120</u>	1:1280	1:5120	1:5120	1:5120
88-103 (Emirler)	1:1280	1:2560	<u>1:2560</u>	1:2560	1:2560
88-102 (Balçıkhisar)	1:2560	1:1280	1:10240	<u>1:10240</u>	1:10240
88-104 (Eryaman-2)	1:5120	1:2560	1:1280	1:2560	1:2560
86-101 (Eryaman-1)	1:2560	1:640	1:5120	1:10240	1:10240
86-115 (Hıdırsih)	1:1280	1:1280	1:5120	1:5120	1:5120

Ta: *Theileria annulata*. PAG: Piroplazm antijeni, IFA: İndirek Floresan Antikor Testi *: Danaların inokülasyonundan 28 gün sonra elde edilen antiserumlar, **: Doğal olarak enfekte oldu, Ta: *T.annulata*, PAG: Piroplazm antigens, IFA: Indirect Fluorescent Antibody Test, *: The antisera which were obtained 28 days after inoculation of the calves with *T.annulata* blood stabilate **: The calf which became infected with *T.annulata* in field

Antikor Testi (IFAT) ile kanıtlayan bir çok araştırmacı (3,5) mevcuttur. Pipano ve Cahana (5) bu metodu kullanarak *T.annulata* ile aşılardan danaların serumunda, aşılandıktan 10-18 gün sonra, antikor saptamışlardır. Dhar ve Gautam (3) şizont ve piroplazm antijenlerini kullanarak IFA testi ile yaptıkları çalışmalarda *T.annulata* inokülasyonundan 23-43 gün sonra danaların serumunda antikor bulmuşlardır. Diğer taraftan Pipano ve Cahana (5) *T.annulata* ile inoküle edilen danalarda, inokülasyondan sonra, 32-52'inci günlerde antikor titresinin zirveye çıktığını belirlemişler, alınan antiserumlarda antikor titresini 1:1000 olarak saptamışlardır. Halbuki Dhar ve Guatam (3) inokülasyondan 23-43 gün sonra titreyi 1:640-1:1280 olarak bulmuşlardır.

Bu çalışmada yapılan deneylerde, piroplazm antijeni kullanılarak, genellikle inokülasyondan en erken 17 gün sonra antiserumlarda antikora rastlanmıştır. İnokülasyondan 28-42 gün sonra antikor titresinin artarak zirveye ulaştığı görülmüştür. Bu süre içinde antikor titresini en fazla 1:10240 olmuştur. Fakat çoğunlukla titreler 1:5120 düzeyinde kalmıştır.

Löhr ve Ross (4) IFA testini *Theileria parva* enfeksiyonunun saptanmasında kullanmışlardır. Bu araştırmacılar (4) bu parazite karşı duyarlı 180 danada antikor bulamadıkları halde aynı parazitle enfekte ettikleri 70 dananın serumunda, inokülasyondan 1-4 ay sonra yüksek titrede antikora rastlamışlardır. Testte kullanılan piroplazm ve şizont antijenlerinden birincisini, ikincisine göre, sonuçların doğruluğu ve sabitliği açısından, üstün bulmuşlar, *T.parva* enfeksiyonuna yakalanmış sığırlardan toplanan antiserumlarla yaptıkları testlerde çapraz reaksiyona rastlamışlardır. Yani *T.parva* antijeni kullanarak, *T.lawrancei* ve *T.parva* ile enfekte sığırlardan aldıkları antiserumlarla testler yapmışlar ve bu antiserumların antikor titreleri arasında herhangi bir fark görmemişlerdir. Fakat *T.mutans* ile enfekte sığırlardan topladıkları serumlarda antikor titrelerinin daha düşük olduğunu tesbit etmişlerdir. Schindler ve Mehliz (13) IFA testi ile *T.parva* ve *T.mutans*'a ait antiserumlar arasında çapraz reaksiyonun varlığını saptamışlardır.

Bu çalışmada da yukardaki bulgulara benzer sonuçlar alınmıştır. Değişik orijinli *T.annulata* kan stabilatlarıyla enfekte danalardan hazırlanan şizont ve piroplazm antijenleri ile bu danalardan alınan antiserumlar test edildiğinde: Antiserumlarda antikorların varlığı piroplazm antijeni ile, şizont antijenine kıyasla, daha erken safhada anlaşılmış ve antikor titreleri daha yüksek seviyede bulunmuştur. Genellikle *T.annulata* enfeksiyonu geçiren danaların antiserumunda bir yılı aşkın bir süre içinde antikorların varlığı kanıtlanmıştır. Bununla beraber zaman geçtikçe antikor titrelerinin tedricen azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan değişik orijinli *T.annulata* enfeksiyonu geçirmiş danalardan alınan antiserumlar homolog ve heterolog antijenlerle çapraz teste tabi tutulduklarında hep pozitif reaksiyon meydana gelmiştir; bu reaksiyonlarda saptanan antikor titreleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Böylece değişik kökenli *T.annulata* kan stabilatlarının antijenik yapılarının benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Adler, E., Ellenbogen, V. (1935) Observation on the theileriosis in Palestine. Arch Inst Pasteur. XIII, 451-470, Alger.
2. Çakmak, A. (1987) Untersuchungen zur inzidenz von Hämoparasiten in einer Rinderherde in der provinz Ankara. Vet Med Diss Hannover. Tierärztl Hochschule, pp. 133.
3. Dhar, S., Gautam, O.P. (1977) Indirect fluorescent antibody test for serodiagnosis in cattle infected with *T.annulata*. Indian J Anim Sci. 47.11, 720-723.
4. Löhr, K.F., Ross, J.P.J. (1969) Serological response in cattle to East Coast Fever (*Theileria parva* infection) as measured by the indirect fluorescent antibody test. Res Vet Sci. 10, 453-460.
5. Pipano, E., Cahana, M. (1968) Measurement of the immune response to vaccine from tissue cultures of *Theileria annulata* by the fluorescent antibody test. J Protozool 15, Suppl p. 45.
6. Pipano, E., Hadani, A. (1974) Epidemiological and immunological aspects of *T.annulata* infection. Proceedings of the third international congress on parasitology, München, I, 140-141.
7. Pipano, E., Goldman, M., Samish, M., Friedhoff, K.T. (1977) Immunisation of cattle against *T.annulata* using kill schizont vaccine. Vet Parasitol. 3, 1, 11-22.
8. Rafyi, A., Maghami, G., Hooshmand, P. (1965) The virulence of *Theileria annulata* and premunition against bovine theileriosis in Iran. Bull off Int Epizoot 64, 431-446.

9. **Rasulov,I.K.** (1963) Immunobiological properties of strains of *T.annulata*. Vet Moscow, 6, 52-53 (Ref Vet Bull 3. 1, 17, 1964).
10. **Sayın,F., Dinçer,Ş., Karaer,Z., Çakmak,A., İnci,A.,Yukarı, B.A., Eren,H., Ünsüren,H.** (1999) Ankara yöresinden elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar. 1. Duyarlı danalarda enfekte kanla oluşturulan tropikal theileriosis'den ileri gelen morbidite ve mortalite olayları. T Parasitol Derg, 23, 2, 178-184.
11. **Sayın, F., Dinçer,Ş.,Karaer,Z., Çakmak,A., İnci,A.,Yukarı, B.A., Eren,H., Ünsüren,H.** (1999). Ankara yöresinden elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar. 2. Ankara yöresinden *T.annulata*'nın izolasyonu ve hücre kültürünün yapılması. T Parasitol Derg (4/99 Baskıda).
12. **Sergent,E., Donatien,A., Parrot,L., Lestoquard.F.** (1945) Etudes sur les Piroplasmoses Bovines. Inst Pasteur d'Algeric. Alger.
13. **Schindler, R., Mehlitz, D.** (1969) Serological studies on *Theileria mutans* infection in cattle. Z. Tropenmed Parasit, 20, 459-473.
14. **Subramanian,G., Naithani,R.C., Ray,D.** (1987) Cross-reaction among four isolates of *Theileria annulata* from India. Vet Parasitol. 25, 75-77.

Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Şükran Dinçer

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı

06110 Dışkapı/ANKARA