

# TÜRKİYE'DE TROPİKAL THEİLERİOSIS ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR<sup>1</sup>

## 2. *Theileria annulata*'nın Değişik Yöntemlerle Kültivasyonu ve İzolasyonu

Fahri SAYIN<sup>2</sup> Şükran DİNÇER<sup>2</sup> Zafer KARAER<sup>2</sup> Ayşe ÇAKMAK<sup>2</sup>  
Abdullah İNCİ<sup>3</sup> Bayram Ali YUKARI<sup>4</sup> Hasan EREN<sup>5</sup>  
Serpil NALBANTOĞLU<sup>6</sup> Zati VATANSEVER<sup>6</sup>

### *Studies on tropical theileriosis in Turkey*

#### *2. Isolation and cultivation of Theileria annulata using different methods*

**Summary:** An attempt was made to realise the development of cell culture of *Theileria annulata* isolates obtained from 7 different sites (Hüseyingazi, Mamak, Sarioba, Eryaman, Akdere, Girmeç, Alacaören) of Ankara county using different methods. The sources of *Theileria* infected material were peripheral blood collected from 7 living diseased calves each infected experimentally with different *Theileria annulata* blood stabilates and from 12 living diseased calves infected experimentally with 3 different *Theileria annulata* tick stabilates. Mononuclear cells infected with *Theileria macroschizonts* were separated in large numbers from the calf blood as using density gradient method. The infected mononuclear cells were cultivated in complete RPMI-1640 medium (RPMI-1640 supplemented with 20% foetal calf serum, 25 mμ HEPES, 2.0mμ L-glutamine, penicillin 100 IU ml<sup>-1</sup>, streptomycine 100 mg ml<sup>-1</sup>). Cultures were maintained at 37°C. Bovine cell lines developed from the isolates of Mamak, Sarioba, Eryaman, Akdere, Girmeç and Alacaören but it did not develop from the isolate of Huseyingazi. Bovine cell lines did not develop from the peripheral blood of the 3 calves infected with tick stabilates of the Sarioba isolate as well. Passages of the cell lines at different steps were made and cryopreserved in liquid nitrogen. On the other hand, whole peripheral blood collected from 7 living diseased cattle infected with *T.annulata* in Sarioba, Hasköy, Girmeç, Altındağ, Önder, Kalecik villages were cultivated in the complete RPMI-1640 medium. Cultures were maintained at 37°C. Bovine cell lines developed from all of the isolates. Passages of cell lines at different steps were made and they were cryopreserved in liquid nitrogen.

1. VHAG 799 nolu proje ile TÜBİTAK ve EEC TS2 0170 UK (JR) nolu proje ile Avrupa Topluluğu tarafından desteklenmiştir.
2. Prof.Dr., Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi, Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı, Ankara
3. Doç.Dr., Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri
4. Doç.Dr., Akdeniz Üniv. Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Burdur
5. Doç.Dr., Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın
6. Dr.Arş.Gör., Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi, Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı, Ankara

*In addition to these, an attempt was made for invitro infection of PBM (peripheral blood mononuclear cell) with theilerial sporozoites. The sporozoites harvested from ticks, each infected with one of T.annulata Sarioba, T.annulata Akdere, T.annulata Kalecik, and T.annulata Anayurt were introduced invitro to uninfected lymphocytes from different susceptible calves. The two components (lymphocytes and sporozoites) were cultivated in the complete RPMI-1640 medium in wells of open plates maintained in a gassed (5%CO<sub>2</sub>), humidified incubator. Bovine cell lines developed from the isolates of Sarioba, Kalecik, and Anayurt but it did not develop from the isolate of Akdere. Passages of the cell lines at different steps were made and cryopreserved in liquid nitrogen.*

**Key words:** Cultivation, isolation, *Theileria annulata*

**Özet:** Bu çalışmada 19 duyarlı deney buzağı kullanılmış, bunlardan 7'sine Ankara'nın değişik yörelerinde (Hüseyingazi, Mamak, Sarioba, Eryaman, Akdere, Girmeç, Alacaören) tropikal theileriosis'e yakalanmış 7 sığırdan alınan enfekte kan ayrı ayrı inoküle edilmiş ve bu buzağuların hepsi tropikal theileriosis'e yakalanmıştır. Bu buzağuların herbirinden steril şartlarda alınan enfekte kandan densite gradient yöntemiyle *Theileria annulata*'nın makroşizontlarıyla enfekte lenfositler izole edilip komple RPMI-1640 vasatına ekilmiştir. Hüseyingazi hariç diğer yerlere ait stabilatlardan *T.annulata*'nın süspanse hücre kültürü oluşmuştur. Bütün kültürlerin pasajı yapılmış, bunlar 9'ıla 34'üncü basamağa kadar ilerletilip dondurulmuştur.

Diğer taraftan *T.annulata* Sarioba kene stabilatı ile 4, *T.annulata* Akdere kene stabilatı ile 6, *T.annulata* AK-SA kene stabilatı ile 2 duyarlı buzağı inoküle edilmiş ve bu buzağuların hepsi tropikal theileriosis'e yakalanmışlardır. Bu buzağuların herbirinden alınan enfekte kandan densite gradient yöntemiyle izole edilen *T.annulata* makroşizontlarıyla enfekte lenfositler komple RPMI-1640 vasatına ekilmişlerdir. *Theileria annulata* Sarioba kene stabilatı ile enfekte 3 buzağıdan alınan kanlar dışında, diğer bütün buzağılardan alınan kanlardan süspanse hücre kültürü oluşmuştur. Bunların pasajları yapılmış, bu pasajlar 13-39'uncu basamağa kadar ilerletilip dondurulmuştur.

Ayrıca beş Sarioba, bir Akdere, bir Kalecik, bir Anayurt *T.annulata* kene stabilatının steril buzağılardan izole edilen lenfositlerle ayrı ayrı mikroplateelerde kültürleri yapılmıştır. Bunlardan *T.annulata* Sarioba, *T.annulata* Kalecik ve *T.annulata* Anayurt kene stabilatlarının hücre kültürleri oluşturulmuştur. Bunların pasajları yapılmış ve bu pasajlar 14-31'inci basamağa kadar ilerletilmiş ve likit nitrojende dondurulmuştur.

Bunlara ilaveten Sarioba-2, Hasköy, Girmeç, Altındağ, Önder-1, Kalecik, Önder-2 *T.annulata* kan stabilatlarından, densite gradient yöntemiyle şizontla enfekte lenfositler izole edilmeksizin, kan stabilatları doğrudan komple RPMI-1640 vasatına ekilmiştir. Bunların hepsinden kültür gelişmiş, bu kültürlerin pasajları yapılmış ve bu pasajlar 8-13'üncü basamağa kadar ilerletilmiş ve dondurulmuşlardır.

**Anahtar sözcükler:** İzolasyon, kültürasyon, *Theileria annulata*

## Giriş

*Theileria annulata*'nın hücre kültürü ilk defa Tsur ve Tchernomoretz (21) tarafından başlatılmıştır. Fakat kültürde üreyen hücreler sadece 1-3 hafta canlı kalabilmişlerdir. Bunu Brocklesby ve Hawking'in (3) çalışmaları izlemiştir. Bu araştırmacılar (3) kültürde hücrelerin canlı kalma süresini 2 aya kadar uzatmayı başarmışlardır. Daha sonra Tsur ve Adler (19,20) theileriosis'li bir sığırın karaciğer, dalak, lenf yumrusu ve perifer kanından ayırdıkları *T.annulata* şizontları ile enfekte lenfoid hücrelerin, invitro olarak kültürünü yapmışlardır. Bunu takiben çeşitli araştırmacılar (8,9,13,15,26) *T.annulata* şizontunun kültürü üzerinde çalışmışlar, *T.annulata* ile enfekte lenfoid hücrelerin monolayer (19,20,26) ve süspanse (8,13) kültürlerinde başarılı olmuşlardır. Bu çalışmaları, enfekte kenelerden *T.annulata* sporozoitlerinin izole edilmesi, bu sporozoitlerle steril sığır lenfositlerinin enfekte edilmesi ve süspanse *T.annulata* kültürünün oluşturulması izlemiştir (11). Daha sonra hastalığın akut döneminde sığırdan alınan steril heparinli kanın doğrudan RPMI-1640 vasatına ekilmesiyle de *T.annulata*'nın süspanse kültürü yapılmıştır (5). Pipano (16) ve Brown (4) *Theileria annulata*, Hooshmand-Rad ve Hawa (10) *Theileria lestoquardi*, Kutti ve ark. (12) *Theileria parva*'nın kültürü ile ilgili teknikler hakkında ayrıntılı bilgi vermişlerdir. Türkiye'de *T.annulata*'nın doku kültürü üzerinde ayrıntılı bir çalışma yapılmamıştır. Sadece doğal veya deneysel olarak tropikal theileriosis'e yakalanmış sığır veya buzağıdan, hastalığın akut döneminde alınmış steril heparinli kandan izole edilen enfekte lenfositler kullanılarak *T.annulata*'nın süspanse (18) ve monolayer kültürü (14) yapılmıştır. Fakat diğer kültür yöntemleri denenmemiştir.

Bu çalışmada, doğal olarak veya deneysel şartlar altında, tropikal theileriosis'e yakalanmış sığır ve buzağılardan sağlanan *T.annulata* kan stabilatları ile doğal olarak veya deneysel şartlarda *T.annulata* ile enfekte olmuş vektör kenelerden elde edilen *T.annulata* kene sta-

bilatları (Ground up tick stabilize: GUTS) kullanılarak *T.annulata*'nın hücre kültürünün yapılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada, 2-2.5 aylık, 19 erkek Holstein buzağı dency hayvanı olarak kullanılmıştır. Buzağular Tarım Bakanlığı Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü Bala Tarım İşletmesi'nden satın alınmış, deney süresince Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi deney hayvanları binasında, zemini beton kaplı bir odada barındırılmışlardır. *Theileria annulata* kan ve kene stabilatları ile inoküle edilmeden önce bu buzağular gerektiği şekilde muayene edilmişlerdir (17). Bu muayenelerde *T.annulata* yönünden steril olduğu saptanan buzağular deneyde kullanılmışlardır.

### *Theileria annulata* kan stabilatının elde edilmesi ve deney hayvanlarının inokülasyonu

Bu çalışmada kullanılan *T.annulata* kan stabilatları, Ankara'nın Sarıoba, Mamak, Akdere, Girmeç, Alacaören, Hüseyingazi, Eryaman, Hasköy, Altındağ, Kalecik, Önder ilçe ve köylerinde tropikal theileriosis'den şüpheli sığırlardan elde edilmiştir. Bunun için önce bu sığırların perifer kanından ve prescapular lenf yumrusu punksiyon materyalinden sürme froti hazırlanmıştır (1). Metil alkolde tespit edilip Giemsa boyası ile boyanan bu frotilerde *T.annulata*'nın piroplasm ve makroşizontları araştırılmıştır. Makroşizont görülen ilk 7 sığırın herbirinden heparinli steril (50 unite heparin/1 ml kan) 20 ml'lik 2 enjektöre 40 ml kan çekilmiştir. Bu kanların 20 ml'si bir deney buzağıya inoküle edilmiş; 20 ml'si %10 dimetilsulfoksit ile karıştırılıp, -80°C de derin dondurucuda saklanmıştır. Enjeksiyon sağ prescapular lenf yumrusunun bulunduğu bölgenin kılları kazandıktan sonra, lenf yumrusunun yukarısına, deri altına yapılmıştır. 89-10 nolu buzağı Hüseyingazi, 89-15 nolu buzağı Mamak, 89-16 nolu buzağı Sarıoba-1, 89-78 nolu buzağı Eryaman, 89-86 nolu buzağı Akdere-1, 90-69 nolu buzağı Girmeç ve 90-70 nolu buzağı Alacaören kökenli ve derin dondurucudan çıkarılan

*T.annulata* kan stabilatı ile değişik zamanlarda inoküle edilmişlerdir. İnokülasyondan sonra gün aşırı olarak hazırlanan prescapular lenf yumrusu punksiyon materyali veya perifer kan frotilerinin muayenesinde bol makroşizont görülen buzağuların herbirinden steril heparinli 10 ml'lik enjektöre kan alınmış, bu kanlardan bafı kot (buffy coat) ayrılarak hücre kültürü yapılmıştır. Ayrıca, bu buzağulardan heparinli steril 10 ml'lik 3 enjektöre 30'ar ml kan alınmış, bu kanların 20 ml'si %10 dimetilsulfoksit ile karıştırılıp -80°C'de saklanmış, 10 ml'sinin kültürü yapılmıştır. Burada kültür için kanın bafı kotu ayrılmamış, kan olduğu gibi hücre kültürü vasatına aktarılmıştır.

#### ***Theileria annulata* kene stabilatının elde edilmesi ve deney buzağularının inokülasyonu**

*Theileria annulata* kene stabilatı, deneysel olarak yetiştirilip, *T.annulata* ile enfekte edilen *Hyalomma a.anatolicum* kenesinden ve *Theileria annulata*'nın endemik olduğu yerlerde sığırların üzerinden veya ahırlarda duvar çatlaklarından toplanan, doğal enfekte *H.a.anatolicum* kenesinden sağlanmıştır. Deneysel olarak laboratuvarında yetiştirilen *H.a.anatolicum*'un aç nimfleri, *T.annulata* ile enfekte deney buzağuları üzerinde beslenerek enfekte edilmiş (22), gömlek değiştirip olgunlaştıktan sonra enfekte olup olmadıklarına bakılmıştır (25). Diğer taraftan sığırlar üzerinden ve ahırlardan toplanan *H.a.anatolicum* keneleri *T.annulata* enfeksiyonu bakımından muayene edilmiş (24), enfekte oldukları anlaşılan keneler ayrılmıştır. Gerek deneysel olarak *T.annulata* ile enfekte edilen ve gerekse doğal olarak enfekte olup sığırların üzerinden veya ahırlardan toplanan *H.a.anatolicum*'dan kene stabilatı hazırlanmıştır (4). 4 kene / 1 ml dozda Sarıoba-1 kökenli *T.annulata* kene stabilatı ile 89-159, 89-160, 89-170, 89-172 numaralı 4 buzağı, Akdere-1 kökenli *T.annulata* kene stabilatı ile 91-52, 91-53, 91-85, 91-91, 91-144, 91-144 numaralı 6 buzağı, Akdere-Sarıoba kökenli *T.annulata* kene stabilatı ile 2 buzağı inoküle edilmiştir. İnokülasyon buzağuların sağ prescapular lenf yumrusunun yuvarısına, kıllar kazandıktan sonra, deri altına ya-

pılmıştır. İnokülasyondan sonra gün aşırı, prescapular lenf yumrusu punksiyon materyali veya perifer kandan frotiler hazırlanmıştır. Frotilerde bol makroşizont görülen bu 12 buzağıdan, heparinli steril 10 ml'lik bir enjektöre 10'ar ml kan alınmıştır. Bu kanların herbirinden bafı kot ayrılmış ve bunlardan hücre kültürü yapılmıştır.

Diğer taraftan Sarıoba-1 ve Akdere-1 kökenli *T.annulata* ile enfekte edilmiş iki deney buzağı üzerinde beslenen aç *H.a.anatolicum* nimfleri kanla doyararak gömlek değiştirip aç olgun hale geldikten sonra yapılan muayenede (22,23) *T.annulata* ile %100 enfekte oldukları saptanmış ve enfekte kenelerden *T.annulata* kene stabilatı hazırlanmıştır (4). Ayrıca Ankara'nın Kalecik ve Anayurt köylerinde tropikal theileriosis'le doğal enfekte buzağular üzerinden toplanan *H.a.anatolicum* kenesinin %35 oranında *T.annulata* ile enfekte olduğu anlaşılmış (24) ve *T.annulata* kene stabilatı hazırlanmıştır (4). Sarıoba-1 kökenli *T.annulata* kene stabilatının, değişik 4 buzağıdan izole edilen steril perifer kan lenfositleriyle (PBL); Akdere-1 kökenli *T.annulata* kene stabilatının, değişik 3 buzağıdan izole edilen steril perifer kan lenfositleriyle (PBL) ayrı ayrı kültürleri yapılmıştır. Ayrıca Kalecik kökenli *T.annulata* kene stabilatı ve Anayurt kökenli *T.annulata* kene stabilatının ayrı birer buzağıdan izole edilen steril kan lenfositleri ile de kültürleri yapılmıştır.

Kan ve lenf yumrusundan hazırlanan frotiler metil alkolde tespit edildikten sonra Giemsa ile boyanmışlar ve mikroskopta *Theileria annulata*'nın şizont ve piroplasmları bakımından incelenmişlerdir.

#### **Perifer kandan makroşizont kültürünün yapılması**

Bunun için iki yöntem kullanılmıştır.

I) Bafı kot'un izolasyonu ve kültürde kullanılması, Sayın ve ark. (18) belirttikleri yöntemle yapılmıştır.

II) Enfekte kanın kültürde kullanılması için ise, *T. annulata* ile enfekte steril heparinli kan-

dan 0.5 ml ve heparinli komple RPMI-1640 vasatından 5 ml steril pipetle çekilerek steril bir tüpe aktarılmış ve pipetlenmiştir. Sonra karışım pipetle çekilerek 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskına nakledilmiş ve kültür flaskı dik olarak ve 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve konup 72 saat bekletilmiştir. Sonra kültür flaskında yüze çıkan 3 ml kadar sıvısı steril pipetle çekilerek atılmış, dipte kalan sedimentin üzerine 3 ml taze komple RPMI-1640 ilave edilmiştir. Bunu takiben 10 gün içinde haftada 2 defa bu vasat değiştirme olayı tekrarlanmıştır. Son vasat değişikliğinden 2 gün sonra, hücrelerin kültür flaskının dibine iyice çökmesini takiben, kültürün yüzeyinde toplanan 3 ml sıvı steril pipetle çekilerek atılmış ve yerine 5 ml taze komple RPMI-1640 ilave edilmiştir. Sonra flask yan yatırılmıştır. Eritrositlerin lize olup kaybolması ve şizontla enfekte lenfositlerin çoğalmasına kadar 3 günde bir rutin vasat değiştirme işlemi sürdürülmüştür (5).

#### Sporozoitlerden *T.annulata* hücre kültürü oluşturulması

1. Duyarlı steril 9 buzağının herbirinden değişik zamanda 10 ml heparinli steril kan alınmış ve bu kanlardan, daha önce belirtilen yöntemle, bafı kot ayrılıp lenfositler izole edilmiştir.

2. Deneysel olarak değişik zamanda değişik kökenli *T.annulata* (Sarıoba, Akdere, Kalecik, Anayurt) ile enfekte edilmiş *Hyalomma a.anatolicum* (%100 enfekte) türü keneden Brown'nın (4) önerdiği yöntemle süzölmüş sporozoit süspansiyonu (süzölmüş kene stabilatı) hazırlanmıştır.

3. Değişik zamanlarda 9 buzağıya ait kanlardan izole edilen steril lenfositlerin herbiri, steril ortamda, komple medium ile (2X10<sup>6</sup> lenfosit/1 ml nispetinde) karıştırılmış, bu lenfosit süspansiyonundan steril bir pipetle 0.5 ml çekilerek plate'in bir çukuruna transfer edilmiştir.

4. 1 kene /1ml nispetinde hazırlanmış sporozoit süspansiyonundan steril 1 pipete 0.5 ml çekilmiş ve içinde 0.5 ml komple medium ve

steril lenfosit bulunan plate'in çukuruna transfer edilmiştir. Böylece 1 ml'lik süspansiyon hücre kültürü hazırlanmıştır.

5. Sonra plate %5 CO<sub>2</sub> ile karışık hava içeren, 37°C'de, nemli etüve konmuş ve 24 saat bekletilmiştir.

6. Aynı çukura 1 ml taze komple medium ilave edilmiş ve plate tekrar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ile karışık hava içeren nemli etüve konmuştur.

7. Bundan sonra haftada 3 defa vasat değiştirilmiştir. Vasat değiştirmek için plate'i hiç sarsmadan ve pipetlemeden çukurun sathına çıkan sıvıdan 1 ml pipetle çekilip atılmış, üzerine 1ml taze komple medium (vasat) ilave edilmiş, hava kabarcığı yapmadan iyice pipetlenmiştir. Bu arada hücre santrifüjü (cytopsin) ile froti yapılmış ve lenfositler, transformasyon ve makroşizont ile enfeksiyon bakımından incelenmişlerdir. Lenfositlerde ileri derecede üreme ve makroşizontlar saptandıktan sonra hücre kültürü plate'inin çukurundan, 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü flaskına transfer edilmiştir (4).

Hücre pasajının yapılması ve enfekte hücrelerin dondurulup saklanması ile hücre kültüründe kullanılan madde ve malzemeler Sayın ve ark. (18) tarafından ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

#### Bulgular

Sırasıyla Hüseyingazi, Mamak, Sarıoba-1, Eryaman, Akdere-1 Girmec ve Alacaören kökenli *T.annulata* kan stabilatları ile inoküle edilen 89-10, 89-15, 89-16, 89-78, 89-86, 90-69 ve 90-70 numaralı duyarlı buzağuların hepsinde tropikal theileriosis meydana gelmiştir. Yapılan günlük muayeneler, hastalığın akut döneminde, prescapular lenf yumrusu punksiyon materyalinden hazırlanan frotillerde çok sayıda makroşizontla enfekte lenfositlerin; perifer kandan hazırlanan frotillerde çok sayıda piroplasma enfekte eritrositlerin bulunduğunu göstermiştir. Bu buzağuların herbirinden alınan enfekte kandan izole edilip komple mediuma ekilen lenfositler çoğunlukla üremiştir. Sadece

Hüseyingazi kökenli kan stabilatı ile enfekte buzağılardan izole edilen lenfositler ürememiştir (Tablo 1).

Mamak kökenli *T.annulata* kan stabilatının kültürü 14, Sarıoba-1 kökenli *T.annulata* kan stabilatının kültürü 34, Eryaman kökenli *T.annulata* kan stabilatının kültürü 9, Akdere-1 kökenli *T.annulata* kan stabilatının kültürü 34, Gırmeç kökenli *T.annulata* kan stabilatının kültürü 10 ve Alacaören kökenli *T.annulata* kan kültürü 9 pasaj basamağına kadar ilerletildikten sonra cryotüpde  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuş ve  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de likit nitrojende muhafaza edildikten bir yıl sonra, Eryaman kökenli *T.annulata* kan stabilatı ile ilgili olan hariç, diğer kültürler çözülerek aynı pasaj basamağına tekrarlanan kültürleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 2'de görüldüğü gibi Sarıoba-1 kökenli *T.annulata* kene stabilatı ile inoküle edilen 4 buzağının (No. 89-159,89-160, 89-170, 89-172) sadece 1'inde (89-170) tropikal theileriosis meydana gelmiştir. Bu buzağının perifer kanından izole edilen enfekte lenfositlerin ekildiği komple mediumda lenfositler üremiştir. Akdere-1 kökenli *T.annulata* kene stabilatı ile inoküle edilen 5, Akdere-Sarıoba (AK-SA) karışımı *T.annulata* kene stabilatı ile inoküle edi-

len 2 buzağının hepsi tropikal theileriosis'e yakalanmıştır. Bu buzağılardan izole edilen lenfositlerin ayrı ayrı ekildiği komple mediumda, bütün buzağılara ait lenfositler üremiştir. Sarıoba-1 kökenli *T.annulata* kene stabilatı ile enfekte bir buzağıdan izole edilen lenfositlerden oluşan hücre kültürü 13, Akdere-1 kökenli *T.annulata* kene stabilatı ile enfekte 5 buzağının 3'ünden izole edilen lenfositlerden meydana gelen hücre kültürleri 17, diğer 2'sinden izole edilen lenfositlerden meydana gelen hücre kültürleri 8, Akdere-Sarıoba kökenli *T.annulata* kene stabilatı ile enfekte 2 buzağıdan izole edilen lenfositlerden oluşan hücre kültürleri 39 ve 18 pasaj basamaklarına kadar ilerletilmiştir. Bunlar cryotüp'de,  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulup,  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de likit nitrojende muhafaza edilmişlerdir. Akdere-1 kökenli kültürlerden biri (No. 91-143) ile Akdere-Sarıoba-1 kültürlerinden biri (No. 92-76) hariç diğer bütün kültürler bir defa çözülmüşler ve yine sonuncu pasaj basamağına dondurulmuşlardır.

Diğer taraftan Sarıoba-1 ve Akdere-1 kökenli *T.annulata* ile enfekte buzağılarda beslenmiş ve *T.annulata* ile %100 oranında enfekte *Hyalomma a.anatolicum* türü kenelerden hazırlanan ezilmiş kene süspansiyonu (GUTS) ile

Tablo 1. *Theileria annulata* kan stabilatları ile enfekte edilen buzağılardan hazırlanan hücre kültürlerinin gelişmeleri, likit nitrojende saklanan ve çözümden sonraki pasaj basamakları

Table 1. Development and passage steps of suspension cell culture established using the buffy coats of periphery blood punctured from the diseased calves each inoculated with different *T.annulata* blood stabilates

Stabilat kökeni*	Inoküle edilen Buzağı No.**	Kültürde gelişme	Likit nitrojende pasaj basamağı(P)	Çözümünden sonra pasaj basamağı(P)
Hüseyingazi	89-10	-	-	-
Mamak	89-15	+	5,7,11,13,14	14
Sarıoba-1	89-16	+	5,8,13,14,24,30,34	34
Eryaman	89-78	+	6,8,9	0
Akdere-1	89-86	+	4,5,8,17,23,30,32,34	34
Gırmeç	90-69	+	5,10	10
Alacaören	90-70	+	5,9	9

+ : Kültür gelişti; - : Kültür gelişmedi (\*: The sites where *T.annulata* blood stabilates came from; \*\*: Eartag numbers of the diseased calves inoculated with the *T.annulata* blood stabilates and the buffy coats were isolated from their periphery blood; P: Passage steps of cell culture; +: Culture developed; -: Culture did not develop)

Tablo 2. *Theileria annulata* kene stabilatı ile enfekte edilmiş buzağılardan izole edilen lenfositlerden meydana gelen kültürlerin gelişmeleri, likit nitrojende saklanan ve çözümünden sonraki pasaj basamakları  
 Table 2. Development and passage steps of suspension cell culture established using the buffy coats of periphery blood punctured from the diseased calves each inoculated with different *T.annulata* tick stabilates

Stabilat kökeni*	İnoküle edilen Buzağı No.**	Kültürde gelişme	Likit nitrojende pasaj basamağı(P)	Çözümünden sonra pasaj basamağı(P)
Sarıoba-1	89-159	-	-	--
Sarıoba-1	89-160	-	-	-
Sarıoba-1	89-170	+	5,6,7,13,13	13
Sarıoba-1	89-172	-	-	-
Akdere-1	91-52	+	3,15,17	17
Akdere-1	91-85	+	16,17	17
Akdere-1	91-91	+	16,17	17
Akdere-1	91-143,	+	4,8	8
Akdere-1	91-144	+	4,8	8
Ak-Sa	91-144	+	7,11,18,20,26,30,35,39	39
Ak-Sa	92-76	+	11,18	18

+ :Kültür gelişti; - : Kültür gelişmedi (\*:The sites where *T.annulata* tick stabilates came from; \*\*: Eartag numbers of the diseased calves inoculated with the *T.annulata* tick stabilates and the buffy coats were isolated from their periphery blood; P: Passage steps of cell culture; +: Culture developed; -: Culture did not develop)

*T.annulata* enfeksiyonu geçirmemiş duyarlı 7 buzağıdan izole edilen steril lenfositlerin invitro kültürlerinden sadece biri gelişmiştir. Bu kültür 9 pasaj basamağına kadar ilerletilmiştir. Diğer 6 kültürde bir gelişme olmamıştır (Tablo 3). Halbuki, aynı tabloda belirtildiği gibi, Kalccik ve Anayurt köylerinde tropikal theileriosis'e yakalanmış 2 sığırdan toplanan ve % 30 oranında *T.annulata* ile enfekte oldukları saptanan *H.a.anatolicum* türü kenelerden hazırlanan *T.annulata* kene stabilatının, *T.annulata* enfeksiyonu geçirmemiş 2 duyarlı buzağıdan izole edilen steril lenfositler ile yapılan 2 kültürün her ikisi de gelişmiştir. Bu kültürlerden biri 14, diğeri 31 pasaj basamağına kadar ilerletilmiştir.

Buna karşılık değişik köylerde tropikal theileriosis'e yakalanmış sığırlardan alınan *T.annulata* kan stabilatlarından, lenfosit izolasyon yapılmadan hazırlanan kültürlerin hepsi gelişmiştir (Tablo 4). Bütün kültürlerde, kandan intikal eden enfekte lenfositlerin mitotik bölünme ile sayıları artarken, eritrositler zamanla lize olarak kültürden kaybolmuşlardır. Böylece lenfosit izolasyonu yapılmadan doğrudan en-

fenkte kandan *T.annulata*'nın süspanse hücre kültürünü hazırlamak ve kültürlerin ileri pasajlarını yapmak mümkün olmuştur.

Süspanse hücre kültüründe ilk 24 saat içinde *T.annulata*'nın şizontları ile enfekte lenfositlerde monolayer bir gelişme başlamıştır. Müteakip günlerde bu hücrelerin değiştikleri ve sitoplazmalarında vakuollerin olduğu görülmüştür (transformasyon). Daha sonraki günlerde *T.annulata* şizontlarının uyarıcı etkisi sonucu enfekte lenfositlerin mitotik yolla bölünerek çoğaldıkları (lenfoblastoid hücreler) saptanmıştır. Bunu takiben oluşan enfekte genç hücreler, süspanse medium içinde kümeler oluşturmuşlardır. Yapılan pasajlar sonucu küçük yuvarlak lenfoblastoid hücreler süspanse medium içinde yüzer vaziyette çoğalmalarını sürdürmüşlerdir. Kültürlerden hücre santrifüjü ile hazırlanıp, Giemsa ile boyanan frotilerde lenfoblastoid hücrelerin hepsinin sitoplazmasında *T.annulata*'nın makroşizontları görülmüştür. Makroşizontların varlığı, hücre kültüründen hazırlanan şizont antijenleri ve homolog anti-serumlar kullanılarak yapılan IFA testi ile de teyit edilmiştir.

Tablo 3. Merada sığırlar üzerinden veya deney buzağısından toplanan kenelerden hazırlanan kene stabilatı ile buzağılardan izole edilen steril lenfosit kültürlerinin gelişmeleri, likit nitrojende saklanan ve çözünden sonraki pasaj basamakları  
 Table 3. Development and passage steps of suspension cell culture established using the sterile lymphocytes (periphery blood mononuclear cells) and *T.annulata* tick stabilates obtained from *Hyalomma* ticks infected in laboratory and field

Kene stabilat kökeni*	Lenfosit alınan buzağı No.**	Kültürde gelişme	Likit nitrojende pasaj basamağı(P)	Çözünden sonra pasaj basamağı(P)
Sarıoba-1	89-186	+	9	0
Sarıoba-1	89-186	-	0	0
Sarıoba-1	91-143	-	0	0
Akdere-1	91-144	-	0	0
Sarıoba-1	91-143	-	0	0
Akdere-1	91-144	-	0	0
Sarıoba-1	Numarasız	-	0	0
Kalecik	Numarasız	+	8,10,14	0
Anayurt	Numarasız	+	31	0

+;Kültür gelişti; -; Kültür gelişmedi (\*:The sites where *T.annulata* tick stabilates came from; \*\*: Eartag numbers of the calves which blood for the sterile lymphocytes collected from; P: Passage steps; +: Cell culture developed; -: Cell culture did not develop)

Tablo 4. Değişik yerlerde tropikal theileriosis'e yakalanmış sığırlardan alınan kanların doğrudan kültürlerinin gelişmeleri, likit nitrojende saklanan ve çözüm sonrası pasaj basamakları  
 Table 4. Development and passage steps of *T.annulata* suspension cell cultures established using whole blood collected from the diseased cattle in fields

Kan stabilat kökeni*	Kültürde gelişme	Nikit nitrojende pasaj basamağı (P)	Çözünden sonra pasaj basamağı (P)
Sarıoba-2	+	7,9,12	0
Hasköy	+	7,10,13	0
Girmeç	+	5,8,10	0
Altındağ	+	6,8	0
Önder 1	+	8,10,13	0
Kalecik	+	6,8,11	0
Önder 2	+	6,8,11	0

+;Kültür gelişti; (\*:The sites where *T.annulata* blood stabilates came from; +: Cell culture developed; P: Passage steps)

### Tartışma ve Sonuç

*Theileria annulata*'nın yaklaşık 54 yıldan beri kültürü yapılmaktadır (21). Yaygın şekilde uygulama imkanı olan yöntemler kullanılarak, başlangıçta sadece parazitin makroözont safhası doku kültürü vasatlarında üretilmiştir (15,21). Böylece bu yöntemle *T.annulata*'yı la-

boratuvarda inceleme ve kullanma fırsatı doğmuştur. *Theileria annulata*'nın gelişme safhalarından piroplasm, zigot ve sporozoitin kültürleriyle ilgili çalışmalar yapılmış (4,15) piroplasmaların doku kültüründe sınırlı derecede bölündüğü (7) ve kene organ kültüründe zigottan hareketli kinetin oluştuğu (2) bildirilmiştir. Diğer taraftan, keneden izole edilen



sporozoitlerle hücre kültüründe invitro olarak steril lenfositlerin inokülasyonu ile makroşizont hücre hatlarını oluşturmak mümkün olmuştur (6). Bununla beraber kültürde, invitro olarak bu şizontlardan çoğalabilir merozoitleri meydana getiren veya enfekte olmayan eritrositlerin istilası için piroplazmaları daimi şekilde bölünmeye teşvik eden bir mekanizma henüz bulunamamıştır (4). *Theileria annulata*'nın izole edilip kültür vasatında üretilmesi ve laboratuvarında saklanması, bu parazitin parazitoloji, moleküler biyoloji, biyokimya ve immunoloji ile ilgili özelliklerinin incelenmesi bakımından çok önemlidir. Tropikal theileriosis'in tedavisi ve bu hastalıktan sığırların korunması açısından da bu bilgilere ihtiyaç vardır.

*Theileria annulata*'nın kültürü ile ilgili yöntemler üzerinde Brown (4) ayrıntılı bilgi vermiştir. *Theileria annulata*'nın izolasyonu ve hücre kültürünün yapılmasında başarıya ulaşmak için izlenecek yöntemlerden birincisi, tropikal theileriosis'e yakalanmış bir sığırdan, makroşizontların bol olduğu bir zamanda, kan alıp bu kanın bir kısmını duyarlı bir buzağıya inoküle etmek, diğer kısmından lenfositleri ayırarak hücre kültürü yapmaktır. Bu, pahalı ve zahmetli bir yöntemdir. Fakat parazit kültürünün gelişme ve izole edilme şansı yüksektir. Zira sahada tropikal theileriosis'e yakalanan sığırlarda hastalığın akut dönemini (şizontların çok olduğu dönem) yakalamak rastlantıya bağlıdır. Bu bakımdan doğrudan sığırdan alınan kandan hazırlanan hücre kültürlerinin gelişme olasılığı azdır. Buna karşılık enfekte kanla inoküle edilen buzağıda tropikal theileriosis'in oluşması ve akut döneminin saptanması olasılığı fazladır. Bu bakımdan merada theileriosis'e yakalanmış bir sığırdan *Theileria annulata*'yı izole etmek için bu sığırdan alınan kanın bir kısmından hücre kültürü hazırlarken bir kısmının da steril bir buzağıya inoküle edilmesi, enfekte olduktan sonra hastalığın akut döneminde buzağıdan alınacak kandan hücre kültürü hazırlanması tercih edilmelidir (4). Nitekim bu araştırmada deneysel olarak enfekte

edilen buzağılarda akut dönemde alınan kandan kültür çalışmaları yapılmış ve kültürlerin devamında başarı sağlanmıştır.

Hücre kültürü oluşturmada izlenecek ikinci yöntem *Theileria annulata* kene stabilatından yararlanmaktır. Bu stabilat enfekte sığırların üzerinden veya ahırların duvarlarındaki çatlaklardan toplanacak enfekte kenelerden hazırlanabileceği gibi, deneysel olarak *T.annulata* ile enfekte edilmiş vektör kenelerden de hazırlanabilir ve duyarlı bir buzağı, elde mevcut kene stabilatı ile enfekte edilir. Hastalığın akut döneminde bu buzağıdan kan alınır ve bu kandan lenfositler ayrılarak, bu lenfositlerden hücre kültürü hazırlanır. Brown'a (4) göre, bu yöntemin başarı oranı yüksektir, fakat pahalı ve zahmetlidir. Buna alternatif olarak *T.annulata* kene stabilatı sporozoitlerin geçebileceği, ince gözenekli özel filtrelerden geçirildikten sonra sporozoitleri içeren süzüntü ile duyarlı bir buzağıdan alınan kandan izole edilecek steril lenfositler kullanılarak, özel bir plate'de, invitro olarak kültür hazırlanır ve neticede şizont kültürü elde edilir. Ancak, ucuz olan bu yöntemin, başarı şansı daha azdır. Bu çalışmada yapılan 9 kültürden ancak 3'nün başarılı olması da bu durumu kanıtlamaktadır.

Hücre kültüründe kullanılacak üçüncü yöntem doğal veya deneysel olarak tropikal theileriosis'e yakalanmış sığır veya buzağıdan enfekte şizontların bol olduğu bir dönemde alınacak enfekte kandan doğrudan hücre kültürü hazırlamaktır (5). Bu kültürün gelişmesi ve eritrositlerden arınması biraz zaman almakla beraber kolay, ucuz ve başarı şansı oldukça yüksek olan bir yöntemdir. Bu çalışmada da, bu yöntemle yapılan bütün kültürlerden başarılı sonuç alınmıştır.

Bu araştırma sonucunda elde edilen verilere göre, theileriosis ile ilgili hücre kültürü çalışmalarında 1 ve 3.cü yöntemin tercih edilmesinin uygun olduğu kanısına varılmıştır.

**Kaynaklar**

1. Anon (1984) *Ticks and Tick-Borne Disease Control, A Practical Field Manual*, Vol II. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
2. Bell L.J (1984) *Tick Tissue Culture Technique in the Study of Arthropod-borne Protozoa: The Development of Theileria annulata in Organ Culture of Hyalomma a.anatolicum*. 1089-1025. In: D.A.Griffiths and C.E.Bowman (Ed.): *Acarology VI* (proceeding of sixth Acarology Congress), Vol 2. Ellis Harwood Chichester.
3. Brocklesby DW, Hawking F (1958) *Growth of Theileria annulata and T.parva in tissue culture*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, **52**, 414-420.
4. Brown CGD (1987) *Theileridae*. In: A.E.R.Taylor and J.R. Baker (Ed.): *In vitro Methods for Parasite Cultivation*. Academic Press, London.
5. Brown CGD (1994) *Kişisel görüşme*
6. Brown CGD, Stagg DA, Purnell RE, Kanhai GK, Payner RC (1973) *Infection and transformation of bovine lymphoid cells in vitro by infective particles of Theileria parva*. Nature, **245**, 101-103.
7. Conrad PA, Kelly BG, Brown CGD (1985) *Intraerythrocytic schizogony of Theileria annulata*. Parasitology, **91**, 67-82.
8. Ende VM, Edlinger E (1971) *Culture de lignees lymphocytaires bovines infectees par Theileria annulata*. Arch Inst Pasteur, Tunis, **1-2**, 45-54.
9. Hooshmand- Rad P (1975) *The growth of Theileria annulata infected cells in suspension culture*. Trop Anim Health Prod, **7**, 24-28.
10. Hooshmand- Rad P, Hawa NJ (1975) *Cultivation of Theileria hirci in sheep lymphoid cells*. Trop Anim Health Prod, **7**, 121-122.
11. Jura WZO (1986) *Invasion and intracellular development of Theileria annulata sporozoites in lymphoblastoid cells already transformed by Theileria annulata (Ankara) and T.parva (mugaga)*. Vet Parasit, **22**, 203-214.
12. Kutti T.J, Munderloh UG, Irvin AD, Busher G (1981) *Theileria parva: Early events in the development of bovine lymphoblastoid cells persistently infected with macroschizonts*. Exp Parasit, **52**, 280-290.
13. Mutuzkina ZP (1975) *Cultivation of Theileria annulata in tissue cultures*. Veterinaria, Moscow, **4**, 56-57. Vet Bul, **45**, 10, 5635, 1975.
14. Özkoç Ü, Onar E (1980) *Yurdumuzun değişik yörelerinden izole edilen Theileria annulata suşlarının doku kültürüne adaptasyonu ve üretilmesi*. Doğa Bilim Derg Seri D, **4**, 36-40.
15. Pipano E (1977) *Basic Principles of Theileria annulata Control*. 55-65. In: J.B.Henson and M.Campbell (Ed.): *Theileriosis. Report of Workshop held in Nairobi, Kenya 7-9 December, 1976*.
16. Pipano E (1984) *Immunization Against Theileria annulata Infection*. 508-563. In: P.J.McCosker and J.R.Tatchel (Ed.): *Ticks and Tick-Borne Disease Control, A Practical Field Manual*. Vol II. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
17. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Ünsüren H (1999a) *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**, 178-184.
18. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Ünsüren H (1999b) *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, **23**, 426-431.
19. Tsur I, Adler S (1962) *Cultivation of T.annulata schizonts in monolayer tissue culture*. Refuah Vet, **19**, 224-225.
20. Tsur I, Adler S (1965) *The cultivation of lymphoid cells and Theileria annulata schizonts from infected blood*. Refuah Vet, **22**, 60-62.
21. Tsur I, Tchernomoretz I (1945) *Multiplication in vitro of Koch bodies of Theileria annulata*. Nature, **156**, 391.
22. Walker R, Fletcher JD, McKeller SB, Bell L.J, Brown CGD (1985) *The maintenance and survival of Theileria annulata in colonies of Hyalomma a.anatolicum*. Ann Trop Med Parasitol, **79**, 119-209.
23. Walker AR, McKeller SB (1983a) *The maturation of T.annulata in H.a.anatolicum stimulated by incubation or feeding to produce sporozoites*. Vet Parasit, **13**, 13-21.
24. Walker AR, McKeller SB (1983b) *Observations of the separation of Theileria sporozoites from ticks*. Inter J Parasitol, **13**, 313-318.
25. Walker AR, McKeller SB, Bell L.J, Brown CGD (1979) *Rapid quantitative assesment of Theileria infection in ticks*. Trop Anim Health Prod, **11**, 21-26.
26. Zablotsky VT (1967) *Use of tissue culture in the study of Theileria annulata*. Veterinaria, **9**, 66.

**Yazışma Adresi:**

Prof.Dr. Şükran DİNÇER  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı  
06110 Dışkapı/ANKARA