

## Sığırlarda *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın Real-Time PCR ile araştırılması ve izolatların moleküler karakterizasyonu

Önder DÜZLÜ<sup>1</sup>, Alparslan YILDIRIM<sup>1</sup>, Abdullah İNCİ<sup>1</sup>, Hamza AVCIOĞLU<sup>2</sup>, İbrahim BALKAYA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri; <sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

**Özet:** Bu çalışma, Erzurum yöresi sığırlarında *Babesia bovis* ve *B. bigemina* yaygınlığının Real Time PCR ile araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 2011-2012 tarihleri arasında farklı yaş, cinsiyet ve ırklarda, klinik olarak sağlıklı görümlü toplam 300 sığırdan EDTA'lı tüplere tam kan örnekleri toplanmıştır. DNA ekstraksiyonunu takiben *B. bovis* ve *B. bigemina* için sırasıyla msa-2c ve rap-1 gen bölgelerine özgü primerlerle Sybergreen ve TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. İncelenen 300 kan örneğinin 28'inde (%9,3) *B. bovis*, 17'sinde (%5,7) *B. bigemina* saptanmıştır. Örneklerde mikس enfeksiyona rastlanmamıştır. *B. bovis* pozitiflerden 4'ünün, *B. bigemina* pozitiflerden 3'ünün msa-2c ve rap-1 gen bölgelerine göre sekans analizleri yapılmıştır. *B. bovis* izolatlarının pairwise kıyaslamalarında kendi aralarında, Türkiye'den diğer bazı ve dünyadaki diğer izolatlarla aralarında sırasıyla %0,6, %2,3 ve %7,5 genetik farklılık belirlenmiştir. *B. bigemina* izolatlarının kendi aralarında %0,3 ve dünyadaki diğer izolatlarla aralarında %0,5 genetik farklılık saptanmıştır. *B. bovis* ve *B. bigemina* yönünden pozitif belirlenen örneklerin parazit türü temel alınarak sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre istatistiksel analizlerinde; yaş ve ırk özelliklerine göre istatistiksel bir farklılık belirlenmezken ( $p>0,05$ ), cinsiyete bağlı farklılık *B. bovis* için önemsiz ( $p>0,05$ ), *B. bigemina* için ise önemli ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmayla Erzurum yöresi sığırlarında ilk kez Real Time PCR tekniği ile *B. bovis* ve *B. bigemina* moleküler olarak karakterize edilmiş ve yaygınlıkları ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, Erzurum, moleküler karakterizasyon, Real Time PCR, sığır.

### Investigation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle by Real Time PCR and molecular characterization of the isolates

**Summary:** This study was carried out to investigate the prevalence of *Babesia bovis* and *B. bigemina* in cattle in Erzurum region by Real Time PCR and to characterize the isolates molecularly. Totally 300 whole blood samples from clinically healthy cattle in different ages, sex and breeds were collected into the tubes with EDTA in 2011-2012. Following DNA extraction, Sybergreen and TaqMan probe based Real Time PCR analyses were carried out with *B. bovis* and *B. bigemina* primers amplifying msa-2c and rap-1 gene regions. Out of 300 samples, 28 (9.3%) and 17 (5.7%) were found to be infected with *B. bovis* and *B. bigemina*. No mix infection was found in the samples. Four of *B. bovis* and three of *B. bigemina* isolates were sequenced with respect to msa-2c and rap-1 gene regions for phylogenetic analyses. According to pairwise comparisons of *B. bovis* isolates, genetic distances were found as 0.6%, 2.3%, and 7.5%, among each other, some other isolates in Turkey, and in the world, respectively. In the phylogenetic analyses of *B. bigemina*, genetic differences were detected as 0.3% and 0.5% among each other and the other isolates in the world. In the statistical analyses of *B. bovis* and *B. bigemina* positive samples according to age, sex and breed of cattle no statistical significance ( $p>0.05$ ) was founded according to age and breed while the statistical difference according to sex was found significant for *B. bigemina* ( $p<0.05$ ), and not significant for *B. bovis* ( $p>0.05$ ). In conclusion, the molecular characterization and the prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle in Erzurum region were determined by Real Time PCR. This is the first report on the molecular characterizations of *B. bovis* and *B. bigemina* in Erzurum region.

Key words: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, cattle, Erzurum, molecular characterization, Real Time PCR.

### Giriş

*Babesia bovis* ve *B. bigemina*, tropik ve subtropik iklim bölgelerinde sığır babesiosisi'ne yol açan, sığır endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olan ve ixodid kenelerle nakledilen intraeritrositik apicomplexan protozoonlardır (5). Apicomplexan protozoonların eritrosit invazyon mekanizmaları, roptri ve merozoit

yüzey antijeni gibi proteinlerce yönetilmektedir. *Babesia* türleri, variable merozoite surface antigen [(VMSA) (msa-2a<sub>1</sub>, msa-2a<sub>2</sub>, msa-2b, msa-2c)] (33) ve rhoptry-associated protein-1 [(rap-1) rap-1a, rap-1b, rap-1c] (23, 26) antijenlerini ihtiva ederler. Her iki antijen de farklı *Babesia* suşları arasında yüksek immunojenik T ve B hücre epitoplarna sahip olup aşı çalışmalarında kullanıl-

maktadır. *B. bovis* yüzey antijenlerinden msa-2c geni, diğer yüzey antijenlerine göre farklı suşlar arasında yüksek korunmuşluk özelliği ile ön plana çıkmaktadır (3, 10, 14, 33). *B. bigemina* rap-1 proteinleri de benzer şekilde farklı coğrafyalardaki suşlar arasında yüksek düzeyde konservatif özellik gösteren antijenlerdir (25, 32).

Sığır babesiosisi'nin teşhisinde mikroskopik ve serolojik yöntemler yıllardan beri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin bazı dezavantajları sebebiyle teşhiste daha özgül ve duyarlı yöntemlere gereksinim duyulmuştur. Bu amaçla parazit DNA'sından teşhise yönelik moleküler teknolojik yöntemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (9). Bu yöntemlerden son yıllarda Real Time PCR yöntemi, duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması, eş zamanlı hızlı teşhis ve kantitasyona olanak sağlaması, parazitemi göstermesi yanında özellikle rezervuar hayvanların belirlenmesinde sağladığı avantajlar sebebiyle ön plana çıkmıştır (18, 22, 24).

Bu çalışma, Erzurum yöresinde klinik olarak sağlıklı görünümüne sığırlarda Real Time PCR ile *B. bovis* ve *B. bigemina* pozitifliğinin ve yaygınlığının saptanması, pozitif izolatlardan *B. bovis* için msa-2c, *B. bigemina* için ise rap-1 gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonları ile GenBank kayıtlarının gerçekleştirilmesi ve yörede sığır babesiosis'i üzerine moleküler epidemiyolojik verilerin elde edilmesi amacıyla yapılmıştır.

### Materyal ve Metot

*Hayvan materyali ve kan örnekleri:* Bu araştırma için etik kurul onayı Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınmıştır (13.10.2010 tarih ve 10/86 sayılı). Çalışmanın materyalini, 2011-2012 yılları arasında Erzurum'da meraya çıkmış ve sağlıklı görünümüne farklı yaş, cinsiyet ve ırkta toplam 300 sığıra ait tam kan örneği oluşturmuştur. Tekniğine uygun şekilde sığırların vena jugularis'inden EDTA'lı tüplere tam kan örnekleri alınmış, hayvanlara ait bilgiler protokol numarasıyla kaydedilmiştir. Örnekleme alınan hayvanların örnekleme merkezi, yaş, cinsiyet ve ırka göre dağılımları Tablo 1'de verilmiştir.

*Genomik DNA ekstraksiyonu:* DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon sisteminde

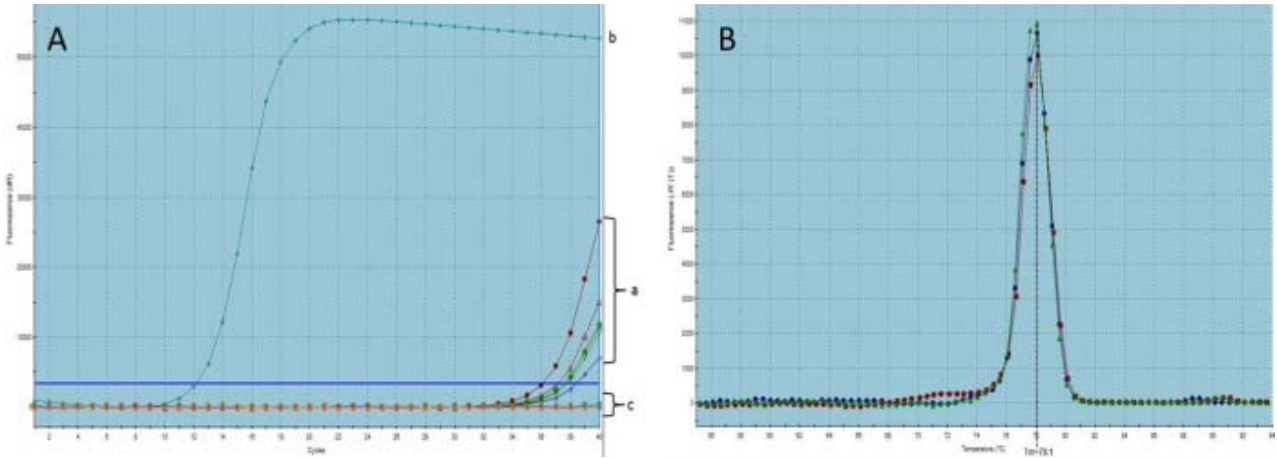
(Bioneer Exiprep™ 16) yapılmıştır. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmış ve elde edilen DNA miktarları Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılabildiği kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

*Real Time PCR analizleri:* *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın Real Time PCR'la araştırılmasında sırasıyla Sybergreen ve TaqMan prob bazlı qPCR kullanılmıştır. Sybergreen tabanlı qPCR'da FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics, Germany) ile *B. bovis*'in msa-2c gen bölgesinden 97-bp amplifiye eden msa-2c2F (5'-GGACAAATTAAGCAACCTATACAA A-3'), msa-2c2R (5'-AGCTTTCCTTGTTCGAATTTTATAA-3') primerleri (22); TaqMan qPCR'da Brilliant II qPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) ile *B. bigemina*'nın rap-1 gen bölgesinden 95-bp bölgeyi amplifiye eden rap1F (5'-TCAGCGACTACGTCCATTTG-3') ve rap1R (5'-AATCAACTTGGCAGGGTCAG-3') primerleri ve rap1P probu (Hex-CCGCGTACA AGAGGTGGTACAGGAA-Bhq1) (36) kullanılmıştır. Master mixler 25 µl hacimde olup termal profiller ilgili literatürlere göre belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak referans *B. bigemina* ve *B. bovis* izolatları, negatif kontrol ise steril deiyonize su kullanılmıştır.

*Sekans ve filogenetik analizler:* *Babesia bovis* örnekleri msa-2c genini (798 bp) amplifiye eden msa-2cF (5'-ATGGTGTCTTTTAACATAATA-3') ve msa-2cR (5'-AAA TGCAGAGAGAACGAAGTAGCAGAGAGT-3') primerleriyle (6) PCR, *B. bigemina* pozitifler ise rap-1 geninin yaklaşık 412 bp kısmını amplifiye eden primerlerle Nested-PCR analizlerine tabi tutulmuşlardır. Nested PCR'in ilk basamağında (5'-GAGTC TGCCAAA TCCTTAC-3') forward ve (5'-TCCTCTA CAGCTGCTTCG-3') reverse primerleri (7), ikinci basamağında ise (5'-AGCTTGCTTTCACAACCTCGCC-3') forward ve (5'-TTGGTGCTTTGACCGACGACAT-3') reverse primerleri kullanılmıştır (21). Reaksiyon karışımları 10X PCR buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 1,5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template olarak 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 °C'de 30s (*B. bovis*), 5dk (*B. bigemina*) 35 siklus, denaturation: 95 °C'de 30s (*B. bovis*), 1dk

Tablo 1. Erzurum yöresinde örneklenen sığırların toplama merkezi, yaş, ırk ve cinsiyete göre dağılımları  
Table 1. The distribution of the cattle sampled from Erzurum province according to research area, age, breed and sex.

Araştırma Merkezi	Sığır Sayısı									
	Yaş (yıl)			İrk				Cinsiyet		Toplam
	≤2	3-5	≥6	Simental	Holstein	Montofon	Melez	Erkek	Dişi	
Palandöken	50	30	20	4	-	61	35	17	83	100
Aziziye	55	30	16	1	6	69	25	28	73	101
Yakutiye	36	54	9	1	-	47	51	10	89	99
Toplam	141	114	45	6	6	177	111	55	245	300



Şekil 1. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri (A) ve erime eğrileri (B) ( $T_m=78,1$ ). a: *B. bovis* pozitifler; b: *B. bovis* pozitif kontrol; c: No DNA, Negatif örnekler

Fig 1. Amplification plots (A) and melting curves (B) ( $T_m=78,1$ ) of some *B. bovis* positive samples in Sybergreen Real Time PCR. a: *B. bovis* positive samples; b: *B. bovis* positives; c: No DNA, negative samples

(*B. bigemina*), annealing: 60°C'de 1dk (*B. bovis*); 55°C'de 1 dk 1. PCR; 58°C'de 1 dk nPCR (*B. bigemina*), extension: 72°C'de 1 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (6, 7, 29). Amplifikasyon sonunda PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programıyla görüntülenmiştir. Jelde uygun konsantrasyondaki *B. bovis* için 4, *B. bigemina* için 3 izolata ait ampikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) ile jel pürifiye edilerek ilgili primerlerle sekanslatılmıştır. DNA kromotogramları analiz edilip sekansların Mega 5.0 (28) ve Geneious 5.5.5 (11) yazılımlarıyla multiple alignmentları yapılarak filogenileri saptanmış ve elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

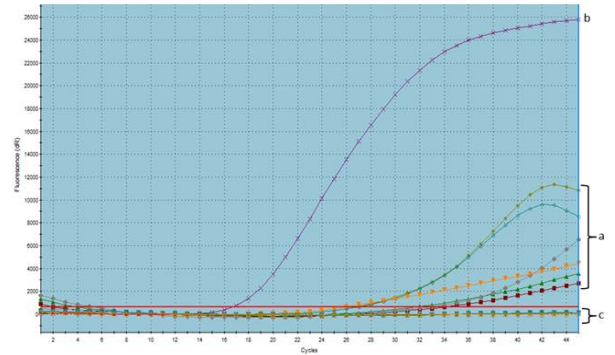
**İstatistiksel analiz:** İstatistik açıdan incelenen sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina* prevalansı ile yaş, cinsiyet ve ırk faktörlerinin ilişkisi, Fisher's Exact ve Pearson's Chi Square testleriyle araştırılmıştır. İstatistik hesaplamaları SPSS 15.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

## Bulgular

**Real Time-PCR sonuçları ve babesiosis prevalansı:** Toplam 300 sığırdan 17'si (%5,7) *B. bigemina*, 28'i (%9,3) *B. bovis* ile enfekte bulunmuştur. Örneklerde mikis enfeksiyona rastlanılmamıştır. Yörede sığır babesiosis'inin prevalansı %15,0 belirlenmiştir. Palandöken'de 100 sığırdan 2'si *B. bovis*, 6'sı *B. bigemina*, Aziziye'de 101 sığırdan 13'ü *B. bovis*, 8'i *B. bigemina* ve Yakutiye'de 99 sığırdan 13'ü *B. bovis*, 3'ü *B. bigemina* belirlenmiştir. *B. bovis* pozitiflerde Ct (dR) değeri  $35,42 \pm 0,21$  (min: 32,46; max: 36,87), *B. bigemina* pozitiflerde  $33,84 \pm 1,07$  (min: 26,00; max: 40,85) olarak belirlenmiştir. Sybergreen tabanlı qPCR'da *B. bovis*'in msa2c gen bölgesinden 97-bp bölgeyi amplifiye eden msa2c2F, msa2c2R primerleri ile Real Time PCR analizleri sonucu pozitif saptanan

bazı örneklerin amplifikasyon ve melting eğrileri Şekil 1'de gösterilmiştir. Pozitif örneklerde ortalama çözünme sıcaklığı ( $T_m$ ) 78,1 °C ( $\pm 0,2$  °C) belirlenmiştir.

TaqMan qPCR'da *B. bigemina*'nın rap-1 gen bölgesinden 95-bp bölgeyi amplifiye eden rap1 F ve rap1 R primerleri ve rap1 P probu ile pozitif belirlenen bazı örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. TaqMan Prob bazlı Real Time PCR'la *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri. a: *B. bigemina* pozitif örnekler; b: *B. bigemina* pozitif kontrol; c: No DNA ve negatif örnekler

Fig 2. Amplification plots of *B. bigemina* positive samples in TaqMan Probe Based Real Time PCR assay. a: *B. bigemina* positive samples; b: *B. bigemina* positive control; c: No DNA and negative samples

**Sığır babesiosisi'nin moleküler prevalansında bazı epidemiyolojik faktörlerin analizi:** *Babesia bovis* ve *B. bigemina* yönünden pozitif belirlenen örneklerin parazit türü temel alınarak sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımları ve istatistiksel verileri Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü üzere, sığırların yaş gruplarına göre *B. bovis* prevalansı en yüksek  $\leq 2$  yaş grubunda; *B. bigemina* prevalansı ise en yüksek  $\geq 6$  yaş grubunda bulunmuştur. Her iki parazit türü için yaşa bağlı istatistiksel bir farklılık görülmemiş-

Tablo 2. Sığırlarda babesiosis prevalansının *Babesia* türlerine göre yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisiTable 2. The correlation of the babesiosis prevalence in cattle with age, sex and race according to *Babesia* species

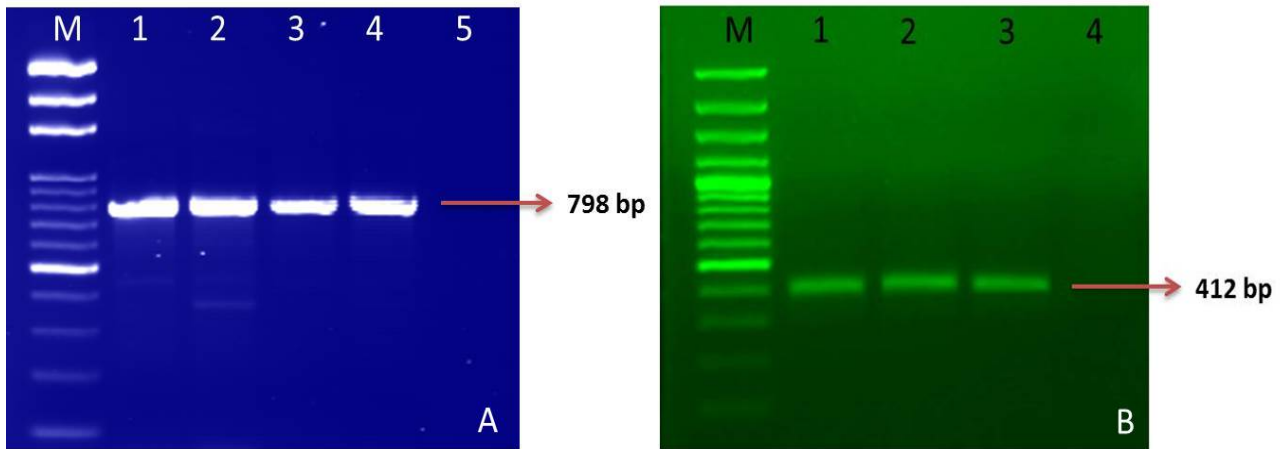
Faktör	İncelenen sığır sayısı	Tür	Enfektif sığır		$\chi^2$	P
			Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)						
≤2	141	<i>B. bovis</i> <sup>a</sup>	14	9,9	0,112 <sup>a</sup>	0,945 <sup>a</sup>
		<i>B. bigemina</i> <sup>b</sup>	8	5,7		
3-5	114	<i>B. bovis</i> <sup>a</sup>	10	8,8	0,119 <sup>b</sup>	0,942 <sup>b</sup>
		<i>B. bigemina</i> <sup>b</sup>	6	5,3		
≥6	45	<i>B. bovis</i> <sup>a</sup>	4	8,9	0,119 <sup>b</sup>	0,942 <sup>b</sup>
		<i>B. bigemina</i> <sup>b</sup>	3	6,7		
Cinsiyet						
Erkek	55	<i>B. bovis</i> <sup>a</sup>	8	14,5	2,162 <sup>a</sup>	0,195 <sup>a*</sup>
		<i>B. bigemina</i> <sup>b</sup>	8	14,5		
Dişi	245	<i>B. bovis</i> <sup>a</sup>	20	8,2	9,932 <sup>b</sup>	0,005 <sup>b*</sup>
		<i>B. bigemina</i> <sup>b</sup>	9	3,7		
İrk						
Simental	6	<i>B. bovis</i>	0 <sup>**</sup>	0	2,958 <sup>a</sup>	0,103 <sup>a*</sup>
		<i>B. bigemina</i>	0 <sup>**</sup>	0		
Holstein	6	<i>B. bovis</i>	0 <sup>**</sup>	0	2,958 <sup>a</sup>	0,103 <sup>a*</sup>
		<i>B. bigemina</i>	0 <sup>**</sup>	0		
Montofon	177	<i>B. bovis</i> <sup>a</sup>	13	7,3	1,581 <sup>b</sup>	0,304 <sup>b*</sup>
		<i>B. bigemina</i> <sup>b</sup>	8	4,5		
Melez	111	<i>B. bovis</i> <sup>a</sup>	15	13,5	1,581 <sup>b</sup>	0,304 <sup>b*</sup>
		<i>B. bigemina</i> <sup>b</sup>	9	8,1		
Toplam	300	<i>B. bovis</i> <sup>a</sup>	28	9,3	2,907	0,120 <sup>*</sup>
		<i>B. bigemina</i> <sup>b</sup>	17	5,7		

 $\chi^2$  : Pearson Chi-Square, Fisher

\* : Fisher's Exact Test

a,b : Grupların *Babesia* türüne göre istatistiksel verileri

\*\* : Örnek sayısının azlığı ve pozitiflik bulunmaması sebebi ile analiz dışı tutulmuştur

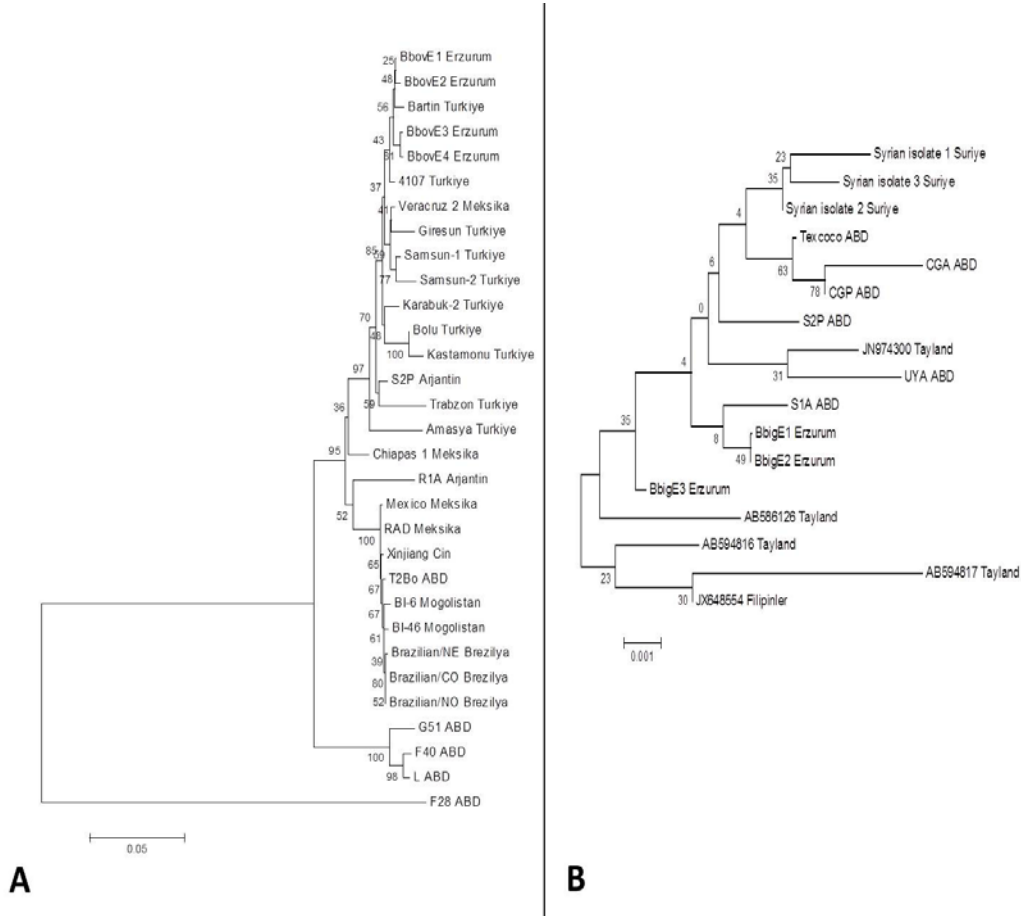
Şekil 3. PCR sonucu elde edilen *B. bovis* (A) ve *B. bigemina* (B) pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1, 2, 3, 4 (A), 1, 2, 3 (B): Pozitif örnekler; 5 (A), 4 (B): No DNAFig 3. *B. bovis* (A) and *B. bigemina* (B) positive samples on agarose gel. M: Marker (100bp); 1, 2, 3, 4 (A), 1, 2, 3 (B): Positive samples; 5 (A), 4 (B): No DNA

tır ( $p>0,05$ ). Enfeksiyon prevalansı her iki parazit türü için, erkeklerde daha yüksek tespit edilmiştir. Cinsiyete bağlı bu farklılık, *B. bigemina*'da istatistiksel açıdan önemli ( $p<0,05$ ), *B. bovis* için ise önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur. Irka bağlı istatistiksel analizlerde Simental ve Holstein ırkı sığırlarda örnek sayısının azlığı ve pozitiflik bulunmaması sebebiyle değerlendirmeye alınmamıştır. Enfeksiyon oranı *B. bovis* ve *B. bigemina* için melezlerde Montofon ırkına oranla daha yüksek belirlenmiştir. Bu ırklar arasındaki istatistiksel farklılık, her iki parazit türü için de önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Toplam 300 sığırdaki *B. bovis* prevalansı, *B. bigemina*'ya oranla daha yüksek belirlenmiştir (Tablo 2). İstatistiksel açıdan iki parazit türünün prevalansları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

**Sekans ve filogenetik analiz sonuçları:** *B. bovis* ve *B. bigemina* pozitiflerin sırasıyla msa2c ve rap-1 gen bölgelerini amplifiye eden primerlerle PCR analizleri sonucu elde edilen ampliconların jel üzerinde görünüşleri Şekil 3'de verilmiştir.

*Babesia bovis* ve *B. bigemina* tespit edilen örneklerde Ct (dR) değerleri ortalama  $35,42\pm 0,21$  ve  $33,84\pm 1,07$  olarak saptanmıştır. Bu değerler parazitemi

düzeylerinin çok düşük olduğunu göstermiştir. Nitekim konvansiyonel PCR analizlerinde *B. bovis* için 4, *B. bigemina* için de 3 izolat agaroz jel üzerinde sekans analizleri için uygun konsantrasyonda bant profilleri göstermiştir. *B. bovis* ve *B. bigemina* izolatlarına ait ampliconlar, pürifiye edildikten sonra sekans analizlerine tabii tutulmuştur. *B. bovis* BbovE1-BbovE4 (Aksesyon Numaraları: KC515389-92) izolatlarının pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %0,6, Türkiye'den diğer bazı izolatlarla %2,3 ve dünyadaki diğer izolatlarla aralarında %7,5 genetik farklılık saptanmıştır. *B. bigemina* BbigE1-BbigE3 (Aksesyon Numaraları: KC515386-88) izolatlarının ise kendi aralarında %0,3, dünyadaki izolatlarla aralarında %0,5 genetik farklılık belirlenmiştir. Erzurum *B. bovis* ve *B. bigemina* izolatlarıyla dünyadaki diğer bazı izolatların filogenetik ağaçlarında (Şekil 4) BbigE1 ve BbigE2 izolatlarının S1A ABD izolatına yakın olduğu, BbigE3 izolatının ise aynı filogenetik grupta bulunmasına karşın diğer iki izolattan farklı olduğu, BbovE1-BbovE4 izolatlarının ise Türkiye'den daha önce girilmiş izolatlarla ayrı filogenetik grupta yer aldığı belirlenmiştir.



Şekil 4. Erzurum yöresinde sığırlarda saptanan *B. bovis* (A) ve *B. bigemina* (B) izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer izolatların filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

Fig 4. Phylogenetic relationships of *B. bovis* (A) and *B. bigemina* (B) isolates with the other isolates available in GenBank (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter model). The scale line shows the nucleotide variation respect to region.

### Tartışma ve Sonuç

Sığır yetiştiriciliğinde babesiosis'in epizootiyolojisi, özellikle stabil ve unstabil bölgelerin bilinmesinde kritik öneme sahiptir. Günümüzde bu epidemiyolojik verilerin doğru şekilde elde edilebilmesi için ileri teknolojik moleküler tekniklerin kullanılmasına ihtiyaç vardır. Bu çerçevede sığır babesiosisi'nin moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesinde DNA tabanlı teknikler kullanılmıştır (1, 8, 15, 19, 34). Bunlardan Real-Time PCR tekniğinin; hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojenin kantitatif belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle avantajlı olduğu belirtilmiştir (8, 18). Dünya'da sığır babesiosisi'nin Real Time PCR'la teşhisinde sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (8, 18, 22, 24, 36). Shebish ve ark. (24) Real Time PCR'la sığırlarda %1,34 *B. bigemina* ve %0,45 *B. bovis* pozitifliği rapor etmişlerdir. Kim ve ark. (18), *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın 18S rRNA bölgesini hedef alan primer ve prolarla TaqMan tabanlı Real-Time PCR araştırmasında, *B. bovis* için sensitiviteyi %96,9, spesifiteyi %100; *B. bigemina* için hem sensitivite hem de spesifiteyi %100 saptamışlardır. Criado-Fornelio ve ark. (8), iki farklı qPCR yönteminin sığır babesiosisi'nin teşhisindeki etkinliğini araştırmışlar, TaqMan prob ve FRET prob bazlı qPCR denemelerinde iki tekniğin spesifitelerini %100 bulmalarına karşın sensitiviteyi TaqMan prob bazlı qPCR yönteminde daha yüksek belirlediklerini kaydetmişlerdir. Ramos ve ark. (22), *B. bovis*'in msa-2c gen bölgesini hedef alarak dizayn ettikleri sybergreen tabanlı qPCR tekniğinin sensitivitesini konvansiyonel PCR'a göre yüksek belirlemişler ve ortalama çözünme sıcaklığını (Tm) 77,41°C ( $\pm 0,25^\circ\text{C}$ ) bulmuşlardır. Yıldırım ve ark. (36), *B. bovis* için Sybergreen tabanlı, *B. bigemina* için de TaqMan prob tabanlı Real Time PCR tekniklerinin Nested PCR ve RLB tekniklerine oranla daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Mevcut çalışmada sığır babesiosisi'nin araştırılmasında Real Time PCR tercih edilmiş olup *B. bovis* ve *B. bigemina* pozitiflikleri ortaya konmuş, Ct (dR) değerleri belirlenerek örneklerdeki parazitemi hakkında veriler elde edilmiştir. Bu çalışmada *B. bovis* için melting curve analizinde belirlenen 78,1 °C ( $\pm 0,2$  °C) Tm değerinin Ramos ve ark. (22) ve Yıldırım ve ark. (36) tarafından bildirilen Tm değeri ile uyum gösterdiği belirlenmiştir. Real Time PCR ile pozitiflerden *B. bovis* için yalnızca 4, *B. bigemina* için ise 3 örneğin PCR ve Nested PCR analizlerinde jelde DNA bant profili göstermesi yukarıdaki araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir.

Türkiye'de direkt PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (27) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bildirilmiştir. Bunu takiben ilk kez RLB tekniği ile yapılan bir saha çalışmasında (30), Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır. Kayseri

yöresinde sığırlarda RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %0,6 (17) ve yine Kayseri'de sığır barınaklarından toplanan kenelerde RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %14 olarak tespit edilmiştir (16). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sığırlar üzerinde RLB tekniği ile yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında tespit edilmiştir (2). Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan diğer bir saha çalışmasında ise *B. bigemina* prevalansı %2,2 olarak bildirilmiştir (12). Diğer yandan Yıldırım ve ark. (36), Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş olan 400 adet kan örneğinde, RLB ile %14,75, Nested PCR ile %17,75 ve Real Time PCR ile %18,75 oranında *B. bigemina* pozitifliği belirlemişlerdir. Ayrıca RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 5'inin Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bigemina* 2'sinin ise *B. bigemina*+*B. bovis* miks olduğu aynı çalışmada (36) ortaya konmuştur. Bu çalışmada Erzurum yöresi sığırlarında *B. bigemina* moleküler prevalansı %5,7 olarak saptanmıştır. Bu oran, Ankara ve Burdur yöresinden bildirilen (27) prevalans oranlarından düşük bulunurken, Kayseri ve yine Ankara yöresinden bildirilen (27, 30) oranlara yakın, Karadeniz Bölgesi'nden bildirilen oranlardan (2, 12) ise yüksek belirlenmiştir.

Türkiye'de *B. bovis*'in moleküler prevalansı üzerine Türkiye'de sınırlı sayıda çalışma (13) olup; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (27); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (30) ve %3,6 (31), Trakya Bölgesi'nde %1,3 (4), Ege Bölgesi'nde %1,02 (35) *B. bovis* tespit edilmiştir. Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan diğer bir çalışmada (12) *B. bovis*'in moleküler prevalansı; Amasya'da %4; Bartın'da %2,3, Bolu'da %4,2, Giresun'da %1,6, Karabük'te %1,4, Kastamonu'da %5,6, Samsun'da %3,8 ve Trabzon'da %2,2 olarak belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada (12) genel olarak Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in moleküler prevalansı %1,8 olarak tespit edilmiştir. Diğer yandan Yıldırım ve ark. (36), Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş 400 adet kan örneğinde, RLB ile %4,50, Nested PCR ve Real Time PCR ile %5,75 oranında *B. bovis* pozitifliği bildirmişlerdir. Ayrıca söz konusu çalışmada (36) RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 9'unun Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bovis* olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada toplam 300 sığırdan 28'i (%9,3) *B. bovis* ile enfekte bulunmuştur. Elde edilen bu prevalans oranının Ankara yöresinden bildirilen prevalans oranından (27) düşük ve Burdur yöresindeki orana (27) paralel bulunurken diğer illerinden bildirilen prevalans oranlarından (4, 12, 31, 35) yüksek olduğu dikkati çekmiştir.

*Babesia bovis* ve *B. bigemina* yönünden pozitif belirlenen örneklerin parazit türü temel alınarak sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımları ve istatistiksel verileri değerlendirildiğinde sığırların yaş

gruplarına göre *B. bovis* prevalansının en yüksek  $\leq 2$  yaş grubunda, *B. bigemina* prevalansının ise en yüksek  $\geq 6$  yaş grubunda görüldüğü tespit edilmiştir. Ancak her iki türe bağlı enfeksiyonlarda yaşa bağlı istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). *B. bovis* ve *B. bigemina* prevalansına cinsiyetin etkisi incelendiğinde her iki tür için de enfeksiyon oranının erkeklerde daha yüksek tespit edildiği görülmektedir. Bu farklılık *B. bigemina*'da istatistiksel açıdan önemli ( $p<0,05$ ) bulunurken *B. bovis* için önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur. Irka bağlı istatistiksel analizlerde Simental ve Holstein ırkı sığırlarda örnek sayısının azlığı ve pozitiflik bulunmaması sebebiyle istatistiksel analizlerde değerlendirilmeye alınmamıştır. Enfeksiyon oranı her iki tür için de melezlerde Montofon ırkına oranla daha yüksek belirlenmiş ancak iki ırk arasındaki istatistiksel farklılık, her iki parazit türü için de önemsiz bulunmuştur. İstatistiksel analiz sonucu ortaya çıkan farklılıkların yörede vektör kene türlerine, yoğunluklarına ve aktivitelerine, sığırların meraya çıkarılmalarına (outdoor) ve/veya çıkarılmamalarına (indoor), hayvan hareketlerine ve sığırların dirençliliğine bağlı olabileceği düşünülmüştür. İncelemesi yapılan sığırlarda *B. bovis* prevalansının *B. bigemina*'ya oranla daha yüksek belirlenmesine karşın iki türün prevalansları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuş olup bu sonuçların Türkiye'de yapılmış diğer bazı çalışmaların (12, 27, 30) sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

Apicomplexan protozoonların apikal organellerinden salgılanan proteinlerin, parazitin konak hücresine invazyonunda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (23). Bugüne kadarki çalışmalarda parazitin eritrositlere invazyonunda VMSA'nın önemli olduğu bildirilmiş olup *B. bovis*'e özgü msa-2c geninin, diğer VMSA gen bölgelerine göre *B. bovis* suşları arasında yüksek oranda korunmuş olduğu ve aşı çalışmalarında tercih edildiği rapor edilmiştir (33). *B. bigemina* için rap-1 gen ailesinin; sahip olduğu çeşitli immünolojik epitoplarla spesifik antikörlerin oluşumuna yol açarak merozoitlerin sağlam eritrositlere invaze olmasını engellediği, *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde ve aşı çalışmalarında önemli olduğu bildirilmiştir (20, 23, 37). *B. bovis*'in VMSA gen bölgeleriyle ilgili Türkiye'de bugüne kadar iki çalışma rapor edilmiştir (12, 35). Mevcut çalışmamızda yöre sığırlarında karakterize edilen *B. bovis* izolatlarının (BbovE1-BbovE4) kendi aralarında %99,4, Türkiye'deki izolatlarla %97,7 ve dünyadaki izolatlarla %92,5 identiklik bulunmuştur. Erzurum BbovE1-BbovE4 izolatlarının en yüksek identikliği Türkiye'den %99,0-%99,5 ile Karadeniz Bölgesi sığırlarından izole edilmiş Bartın (GU647149) ve %98,7-%99,5 ile Karabük (GU004533) izolatlarıyla, dünyadan ise %98,6-%98,9 ile Meksika Veracruz2 (EF640963) ve %98,0-%98,2 ile Arjantin S2P (FJ422796) izolatlarıyla gösterdikleri belirlenmiştir. Nitekim filogenetik ağaçta da

Erzurum yöresinde saptanan izolatlar Türkiye'de farklı illerden bildirilen *B. bovis* izolatlarıyla ve Meksika ile Arjantin'den bildirilen izolatlarla aynı filogenetik branşta yer almıştır. *B. bovis* suşlarında diğer VMSA gen bölgelerine göre daha yüksek oranda korunmuş olarak nitelenen msa-2c geninin (10, 33) şimdiye kadar Türkiye'deki sığırlarda karakterize edilen izolatlar ve dünyadaki izolatlarla genetik kıyaslamaları göz önüne alındığında çok yüksek düzeyde korunmuş olmadığı ve genetik farklılığın var olduğu görülmektedir. Bu açıdan bu gen tabanlı aşı çalışmalarında izolatlar arasındaki antijenik farklılıklardan dolayı yöreye özgü *B. bovis* suşlarının gen haritalarının tam olarak ortaya konulması gerekliliği ortaya çıkmıştır. *B. bigemina* Erzurum izolatlarının ise (BbigE1-BbigE3) kendi aralarında %99,7, dünyadaki izolatlarla %99,5 identiklik gösterdikleri saptanmıştır. Erzurum BbigE1-BbigE3 izolatlarının Dünyadan en yüksek identikliği %99,8 ile Amerika'dan S1A (AF017286), S2P (AF017287) ve Texcoco (AF017288) izolatlarıyla gösterdikleri tespit edilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere *B. bigemina* BbigE1 ve BbigE2 izolatları A.B.D'de S1A izolatıyla birlikte aynı branşta yer almasına karşın, BbigE3 izolatı bu izolatlarla yakın olmakla birlikte ayrı bir filogenetik branşta yerleştiği görülmüştür. Rap-1 gen bölgesinin, msa-2c gen bölgesiyle kıyaslandığında Dünyadaki benzer izolatlar arasında identiklik oranlarının daha yüksek olduğu ve daha yüksek oranda korunmuş bölgeye sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte araştırma yöresinde belirlenen *B. bigemina* izolatlarının rap-1 gen bölgesine ait aminoasit sekanslarının analizi sonucu aynı yöreden elde edilmelerine karşın BbigE1 ve BbigE2 izolatları protein profilleri bakımından %100 identik bulunurken BbigE3 izolatı %0,7'lik farklılık göstermiştir. Benzer şekilde BbovE1-BbovE4 izolatlarının msa-2c gen bölgesine ait protein sekanslarında da aralarında %0,4-1,5 oranlarında farklılıklar belirlenmiştir. *B. bovis* ve *B. bigemina* izolatlarının aminoasit sekanslarındaki bu farklılıkların filogenetik analizlere dahil edilen dünyadaki benzer diğer izolatlar arasında daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç, aminoasit düzeyindeki farklılıkların epitop konformasyonunda değişikliklere yol açabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmayla *B. bovis* ve *B. bigemina* pozitifliği ve prevalansı Erzurum yöresi sığırlarında Real Time PCR'la ilk kez ortaya konmuş, *B. bovis* msa-2c ile *B. bigemina* rap-1 gen bölgeleri moleküler olarak karakterize edilmiş, filogenetik analizleri yapılarak GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada Real Time PCR'ın, sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında, eş zamanlı hızlı teşhis ve kantitasyona olanak sağlaması, parazitemiyi göstermesi gibi avantajlarla tedavi etkinliği, risk potansiyellerinin belirlenmesi gibi konularda kullanışlı bir teknik olduğu görülmüştür.

### Teşekkür

Araştırmacılar, TSA-10-3332 kod numaralı proje desteği için Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederler. Bu çalışma 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli) sunulmuştur.

### Kaynaklar

1. Almeria S, Castella J, Ferrer D, Gutierrez JF, Estrada-Pena A, Sparagano O (2002): *Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle*. Ann N Y Acad Sci, **969**, 78-82.
2. Altay K, Aydın MF, Dumanlı N, Aktas M (2008): *Molecular detection of Theileria and Babesia infections in cattle*. Vet Parasitol, **158**: 295-301.
3. Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, Bock RE, Lew AE, McElwain TF (2005): *Merozoite surface antigen 2 proteins of Babesia bovis vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats*. Infect Immun, **73**, 7180-7189.
4. Bilgin Z (2007): *Trakya'da sığırlarda bulunan Theileria ve Babesia türlerinin ve bunların sığırlarda yaygınlığının reverse line blotting (RLB) tekniği ile araştırılması*, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
5. Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W (2004): *Babesiosis of cattle*. Parasitology, **129**, 247-269.
6. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, Falcon A, Alvarez JA, Camacho M, Figueroa JV (2008): *msa-1 and msa-2c gene analysis and common epitopes assessment in Mexican Babesia bovis isolates*. Ann N Y Acad Sci, **1149**, 145-148.
7. Cao S, Aboge GO, Terkawi MA, Yu L, Kamyngkird K, Luo Y, Li Y, Goo YK, Yamagishi J, Nishikawa Y, Yokoyama N, Suzuki H, Igarashi I, Maeda R, Inpankaew T, Jittapalpong S, Xuan X (2012): *Molecular detection and identification of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle in northern Thailand*. Parasitol Res, **111**, 1259-1266.
8. Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, Benitez D, Florin-Christensen M, Gonzalez-Oliva A, Henriques G, Silva M, Alongi A, Agnone A, Torina A, Madruga CR (2009): *Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids*. Vet Parasitol, **162**, 200-206.
9. Criado-Fornelio A (2007): *A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for Babesia and Theileria, with emphasis on bovine piroplasms*. Parasitologia, **49**, 39-44.
10. Dominguez M, Echaide I, Echaide ST, Mosqueda J, Cetrá B, Suarez CE, Florin-Christensen M (2010): *In silico predicted conserved B-cell epitopes in the merozoite surface antigen-2 family of B. bovis are neutralization sensitive*. Vet Parasitol, **167**, 216-226.
11. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S: Geneious v5.5. <http://www.geneious.com>. (15.10.2013).
12. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A (2011): *Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen Babesia bovis suşlarının moleküler karakterizasyonu*. ERÜ Sağ Bil Derg, **20**, 18-28.
13. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A (2012): *Türkiye'de evcil ruminantlarda babesiosis*. Türkiye Klinikleri J Vet Sci, **2**, 27-34.
14. Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, Falcón A, Alvarez A, Camacho M, de Lourdes Muñoz M, Figueroa JV (2008): *Phylogenetic analysis of Mexican Babesia bovis isolates using msa and ssrRNA gene sequences*. Ann N Y Acad Sci, **1149**, 121-125.
15. 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. İca A, Vatansver Z, Yıldırım A, Duzlu O, İnci A (2007): *Detection of Theileria and Babesia species in ticks collected from cattle*. Vet Parasitol, **148**, 156-160.
17. İça A, İnci A, Yıldırım A (2007): *Parasitological and molecular prevalence of bovine Theileria and Babesia species in the vicinity of Kayseri*. Turk J Vet Anim Sci, **31**, 33-38.
18. Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, Fujisaki K, Igarashi I (2007): *Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of Babesia bovis and Babesia bigemina*. Am J Trop Med Hyg, **77**, 837-841.
19. Lau AO, Tibbals DL, McElwain TF (2007): *Babesia bovis: the development of an expression oligonucleotide microarray*. Exp Parasitol, **117**: 93-98.
20. Machado RZ, McElwain TF, Pancraccio HP, Freschi CR, Palmer GH (1999): *Babesia bigemina: immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia*. Exp Parasitol, **93**, 105-108.
21. Petrih R, Ruybal P, Thompson C, Neumann R, Moretta R, Wilkowsky S, Draghi G, Echaide I, de Echaide ST, Farbera M (2008): *Improved molecular tools for detection of Babesia bigemina. Animal biodiversity and emerging diseases*. Ann N Y Acad Sci, **1149**, 155-157.
22. Ramos CA, Araújo FR, Souza II, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, Oliveira RH, Soares CO, Rosinha GM, Alves LC (2011): *Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of Babesia bovis*. Vet Parasitol, **176**, 79-83.
23. Sam-Yellowe TY (1996): *Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival*. Parasitol Today, **12**, 308-316.
24. Shebish E, Vemulapalli R, Oseto C (2012): *Prevalence and molecular detection of Anaplasma marginale, Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica*. Vet Parasitol, **188**, 164-167.
25. Suarez CE, McElwain TF, Echaide I, Torioni de Echaide S, Palmer GH (1994): *Interstrain conservation of babesial RAP-1 surface-exposed B-cell epitopes despite rap-1 genomic polymorphism*. Infect Immun, **62**, 3576-3579.
26. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, McElwain TF (1998): *Structure, sequence, and transcriptional analysis of the Babesia bovis rap-1 multigene locus*. Mol Biochem Parasitol, **93**, 215-222.
27. Tanyüksel M, Vatansver Z, Karaer Z, Araz E, Haznedaroğlu T, Yukarı BA (2002): *Sığır babesiosisininin*



- epidemiolojisi ve zoonotik önemi*. T Parazitol Derg, **26**, 42-47.
28. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011): *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Mol Biol Evol, **28**, 2731-2739.
29. **Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Jittapalpong S, Xuan X, Igarashi I** (2011): *Molecular and serological prevalence of Babesia bovis and Babesia bigemina in water buffaloes in the northeast region of Thailand*. Vet Parasitol, **178**, 201-207.
30. **Vatansever Z, İça A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Sparagano O** (2003): *Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması*. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. Konya, p. 194.
31. **Vatansever Z, Nalbantoğlu S, Çakmak A** (2001): *Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'nin epidemiolojisi*. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Elazığ.
32. **Vidotto O, McElwain TF, Machado RZ, Perryman LE, Suarez CE, Palmer GH** (1995): *Babesia bigemina: identification of B cell epitopes associated with parasitized erythrocytes*. Exp Parasitol, **81**, 491-500.
33. **Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, Torioni de Echaide S, Zamorano PI, Dominguez M, Suarez CE, Florin-Christensen M** (2003): *Babesia bovis merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle*. Mol Biochem Parasitol, **127**, 133-141.
34. **Wilkowsky SE, Farber M, Gil G, Echaide I, Mosqueda J, Alcaraz E, Suarez CE, Florin-Christensen M** (2008): *Molecular characterization of Babesia bovis strains using PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the msa2-a/b genes*. Ann N Y Acad Sci, **1149**, 141-144.
35. **Yavuz A, İnci A, Düzlü Ö, Bişkin Z, Yıldırım A** (2011): *Molecular characterization of Babesia bovis msa-2c gene*. Türkiye Parazitol Derg, **35**, 140-144.
36. **Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A, Önder Z, Çiloğlu A** (2013): *Sığırlarda Babesia bovis ve Babesia bigemina'nın Reverse Line Blotting, Nested PCR ve Real Time PCR Teknikleri ile Karşılaştırmalı Tanısı*. Kafkas Univ Vet Fak Derg, **19**, 895-902.
37. **Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I** (2006): *Erythrocyte invasion by Babesia parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage*. Vet Parasitol, **138**, 22-32.

Geliş tarihi: 27.01.2013/ Kabul tarihi: 13.06.2014

**Yazışma adresi:**

Yrd. Doç. Dr. Önder Düzlü

Erciyes Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Parazitoloji Anabilim Dalı

Melikgazi, Kayseri

e-mail: onderduzlu@erciyes.edu.tr