



**Kayseri Yöresindeki Sığırlardan Toplanmış Kene Türlerinde *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın Real Time PCR Yöntemiyle Araştırılması\***

Tuğba MEYİLLİ<sup>1</sup>, Önder DÜZLÜ<sup>1</sup>, Alparslan YILDIRIM<sup>1</sup>, Zuhâl ÖNDER<sup>1</sup>, Arif ÇİLOĞLU<sup>1</sup>, Abdullah İNCİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

**Özet:** Bu çalışma, Kayseri'nin farklı lokalizasyonlarındaki sığırlardan toplanmış erişkin ixodid kenelerden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında *Babesia bigemina* ve *B. bovis*'in real time PCR analizleriyle araştırılması ve izolatların filogenetik karakterlerinin saptanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Sığırlardan toplanmış 1115 erişkin ixodid keneden oluşturulmuş DNA havuzlarında, *B. bigemina* ve *B. bovis* için *rap-1a* ve *msa-2c* gen bölgelerini amplifiye eden primerlerle TaqMan prob bazlı ve Sybergreen tabanlı real time PCR analizleri yapılmıştır. Toplam 38 genomik DNA havuzunun ikisinde (%5.2) *B. bovis* ve sekizinde (%21) *B. bigemina* pozitifliği saptanmıştır. Miks enfeksiyon belirlenmemiştir. *Babesia bigemina* pozitiflerin dördü *Rhipicephalus annulatus*, ikisi *R. turanicus*, biri *Hyalomma marginatum* ve biri *H. anatolicum* havuzlarında, *B. bovis* pozitiflerin ikisi de *H. marginatum* havuzunda saptanmıştır. Ct (cycle threshold) (dR) değerleri *B. bigemina* ve *B. bovis* için ortalama 35.75 ve 37.71 belirlenmiştir. Moleküler karakterizasyon amacıyla nested PCR analizleriyle uygun DNA bant profilleri gösteren *B. bigemina* pozitif sekiz örnekten ikisi sekanslanmış ve GenBank kayıtları (KU680419-KU680420) gerçekleştirilmiştir. BbigrapKys1 ve BbigrapKys2 izolatlarının filogenetik analizlerinde kendi aralarında %100 identiklik, Dünyadaki ve Türkiye'deki diğer benzer izolatlarla %1±0.5 ve %0.7±0.4 genetik farklılık tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmayla, Kayseri yöresindeki sığırlardan temin edilmiş kenelerde *B. bigemina* ve *B. bovis*'in varlığı ve moleküler prevalansı ile pozitif bazı izolatların moleküler karakterizasyonu ve filogenileri hakkında bilimsel veriler elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Kayseri, kene, moleküler karakterizasyon, real time PCR

**Investigation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by Real Time PCR in Tick Species Collected from Cattle in Kayseri Province**

**Summary:** This study was performed to investigate *Babesia bigemina* and *B. bovis* via real time PCR analyses in genomic DNA pools constructed from adult ixodid ticks on cattle in different parts of Kayseri, and to detect the phylogenetic characters of the isolates. TaqMan and Sybergreen real time PCR analyses with *rap-1a* and *msa-2c* gene specific primers for *B. bigemina* and *B. bovis* were performed in DNA pools of 1115 adult ticks. *B. bovis* and *B. bigemina* were detected in two (5.2%) and eight (21%) out of 38 DNA pools. No mix infection was determined. *B. bigemina* was found in four *Rhipicephalus annulatus*, two *R. turanicus*, one *Hyalomma marginatum*, and one *H. anatolicum* pools whereas both two positive *B. bovis* samples were detected in *H. marginatum* pools. Ct (cycle threshold) (dR) values were determined as 35.75 and 37.71 for *B. bigemina* and *B. bovis*. Two *B. bigemina* positive samples were sequenced and deposited into GenBank (KU680419-KU680420). In phylogenetic analyses of BbigrapKys1 and BbigrapKys2 isolates, 100% identity amongst themselves and 1±0.5% and 0.7±0.4% genetic distances were found with other similar isolates from the world and Turkey. In conclusion, the scientific knowledge was obtained about the molecular prevalence of *B. bigemina* and *B. bovis* in ticks collected from cattle in Kayseri province and also about molecular characterization and phylogenies of some positive isolates.

**Key words:** *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Kayseri, molecular characterization, real time PCR, tick

**Giriş**

Türkiye'de hayvancılığın gelişmesini olumsuz yönde etkileyen barınak, bakım ve besleme gibi yetiştiricilik hatalarının yanında, bakteriyel, viral ve paraziter orijinli hastalıklar halen daha etkili

olmaktadır. Paraziter hastalıklar arasında coğrafi konumu itibarıyla subtropik iklim kuşağında yer alan Türkiye'de yaygın olarak görülen keneler ve kene kaynaklı enfeksiyonlar büyük önem taşımaktadır. Keneler ve kene kaynaklı enfeksiyonlar hayvan sağlığını tehdit etmesi, ölümlere ve verim kayıplarına sebep olması yanında, hayvanlardan insanlara taşıdığı enfeksiyon etkenleri ile insan sağlığını da ciddi ölçüde tehdit etmektedir (3,6,14,30,36).

Geliş Tarihi/Submission Date : 12.04.2016  
Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.05.2016

\*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2013-4305 kodu ile yüksek lisans tez projesi olarak desteklenmiştir.

Kene kaynaklı enfeksiyonların yayılmasında esas rol oynayan ixodid keneler Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir. Uzun yıllar birçok araştırmacı Türkiye'deki kene türleri ve coğrafi dağılımları üzerinde çalışmalar yürütmüşlerdir. Bu çalışmalara (3, 6, 10, 16, 17, 22-24, 30) göre İç Anadolu Bölgesi'nde, *Ixodes ricinus* (%0.2), *Dermacentor marginatus* (%0.5-3), *D. niveus* (%0.8-15.4), *Haemaphysalis concinna* (%3.1), *Hae. inermis* (%0.1-0.6), *Hae. numidiana* (%0.1), *Hae. otophila* (%1.7-59.8), *Hae. parva* (%0.6-20.5), *Hae. punctata* (%1.4-4.2), *Hae. sulcata* (%0.6-11.8), *Hyalomma anatolicum* (%0.4-19.6), *H. excavatum* (%0.2-24.7), *H. detritum* (%0.6), *H. marginatum* (%0.2-18.5), *Rhipicephalus annulatus* (%9-42.4), *R. bursa* (%4.5-93.1), *R. sanguineus* (%2.3-55.3) ve *R. turanicus* (%4.8-52) oranlarında tespit edilmiştir. Sığırlarda babesiosis'e özellikle *Babesia bigemina* ve *B. bovis* türleri sebep olmaktadır. Bu etkenlerden, *B. bigemina*; *R. microplus*, *R. decoloratus*, *R. annulatus* ve *R. evertsi*, *B. bovis* ise *R. calcaratus*, *R. microplus*, *R. geiyi* ve *I. ricinus* tarafından nakledilmektedir (14,36).

Tropik ve subtropik iklim kuşağındaki bölgelerde sığır babesiosis etkenlerinden olan *Babesia bovis* ve *B. bigemina*, endüstriyel sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara yol açan ve ixodid keneler tarafından nakledilen intraeritrositik apicomplexan protozoonlardır (4). *Babesia* türleri, suşlar arasında immunojenik T ve B hücre epitoplarına sahip merozoit yüzey antijenlerine (VMSA) ve roptri ilişkili proteinlere (*rap-1*) sahiptir (32,37). *B. bovis*'in yüzeyinde bulunan antijenlerden biri olan *msa-2c* proteini, VMSA ailesi içerisindeki diğer antijenlerine nazaran daha yüksek korunmuşluk özelliği göstermektedir (4). Benzer şekilde *B. bigemina rap-1* antijenleri de farklı bölgelerdeki suşlar arasında yüksek korunmuşluğa sahip bir gen bölgesi olarak dikkat çekmektedir (32).

Son yıllarda sığırlarda babesiosisin teşhisinde, mikroskopik ve serolojik teşhis yöntemlerine göre daha yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip bir teknik olan real time PCR yöntemi tercih sebebi olmaya başlamıştır. Bu teknik sayesinde çok düşük parazitemiye sahip hayvanlarda bile enfeksiyon tespit edilebilmekte ve böylelikle rezervuar hayvanlar belirlenebilmektedir (8,9,28). Bu çalışmada, Türkiye'den ve Dünya'dan daha önce GenBank'a girilmiş *B. bovis* ve *B. bigemina* sığır izolatlarıyla, vektör kenelerden elde edi-

len *B. bovis* ve *B. bigemina* izolatları arasında filogenetik olarak ne gibi farklılıkların olabileceği hipotez edilmiş ve bu hipotez doğrultusunda sığırlardan elde edilmiş kene örneklerinden oluşturulmuş DNA havuzlarında *B. bovis* ve *B. bigemina* varlığının Sybergreen ve TaqMan prob tabanlı real time PCR tekniği ile kantitatif olarak araştırılması ve pozitif izolatların moleküller karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Genomik DNA havuzu ve kene materyali

Bu çalışmanın materyalini, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş VA-05-05 kodlu ve "Sığırlarda Görülen Theileria ve Babesia Türlerinin Vektör Kenelerde Moleküler Biyolojik Teşhisi" konulu araştırma projesi kapsamında Mayıs-Ağustos ayları arasında Kayseri'nin farklı lokalizasyonlarındaki sığırlardan toplanmış toplam 1115 erişkin ixodid keneden (267 *R. annulatus*, 106 *Hae. parva*, 2 *Hae. sulcata*, 245 *H. marginatum*, 106 *H. anatolicum*, 53 *H. excavatum*, 68 *H. detritum*, 219 *R. turanicus*, 28 *R. bursa*, 1 *R. sanguineus*, 20 *D. marginatus*) elde edilmiş DNA havuzları oluşturmuştur. Havuzlar aynı türe ait erişkin dişi ve erkek kenelerden oluşturulmuştur. Örnek sayısı 10'un üzerinde olan havuzlar bölünerek DNA ekstrakte edilmiş ve elde edilen genomik DNA ekstraktları aynı havuzda birleştirilmiştir.

### Real time PCR analizleri

Erişkin dişi ve erkek kenelerden oluşan genomik DNA havuzlarında sığır *Babesia* etkenlerinin araştırılmasında Sybergreen ve TaqMan real time PCR yöntemleri kullanılmıştır. Sybergreen tabanlı real time PCR analizlerinde FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix (Roche Diagnostics, Germany) ve *B. bovis*'in *msa-2c* gen bölgesine ait 97 bp'lik bölgeyi çoğaltan *msa2c2F* (GGACAAATTA AGCAACCTA-TACAAA), *msa-2c2R* (AGCTTTCCTTGTTTCGAATTTTATAA) primerleri kullanılmıştır (28). TaqMan prob bazlı real time PCR analizlerinde ise Brilliant II qPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) ve *B. bigemina*'nın *rap-1a* geninin 95 bp'lik bölgesini çoğaltan *rap1F* (TCA GCGAC-TACGTCCATTTG) ve *rap1R* (AATCAACTTGGCAGGGTCAG) primerleri ile *rap1P* (HEX-CCG CGTACAAGAG GTGG TA-

CAGGAA-BHQ1) probu kullanılmıştır (20).

### ***Babesia bovis msa-2c* ve *Babesia bigemina rap-1a* genlerinin amplifikasyonu**

Moleküler analizler sonucu *B. bovis* pozitif olduğu saptanan örnekler üzerinde *msa-2c* genini çoğaltan *msa-2cF* (5'-ATGGTGTCTTTTAACATAATA-3') ve *msa-2cR* (5'-AAATGCAGAGAGAACGAAGTAGCA GA-GAGT-3') primerleriyle (5), *B. bigemina* pozitif örnekler üzerinde ise *rap-1a* genini amplifiye eden primerlerle sırasıyla konvansiyonel PCR ve nested-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Nested PCR analizinin ilk PCR basamağında (5'-GAGTCTGC CAAATCCTTAC-3') forward ve (5'-TCCTCTACAG CTGCTTCG-3') reverse primerleri (7), ikinci PCR basamağında ise (5'-AGCTTGCTTTCCAACTC GCC-3') forward ve (5'-TTGGTGCTTTGACCGACGACAT-3') reverse primerleri kullanılmıştır (27). *Babesia bovis* için reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM primer, 200 mM dNTP ve 1.5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/μl template olarak hazırlanmıştır. Isı profili; ön denatürasyon: 95 °C'de 30 s; 35 siklus, denatürasyon: 95 °C'de 30 s, bağlanma: 60 °C'de 1dk, uzama: 72 °C'de 1 dk; son uzama: 72 °C'de 10 dk olarak programlanmıştır (27). *Babesia bigemina* için reaksiyon karışımı: 10X PCR buffer, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM primer, 200 mM dNTP ve 2.5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/μL template şeklinde hazırlanmıştır. Isı profili her iki PCR için de ön denatürasyon: 94 °C'de 5 dk; 35 siklus, denatürasyon: 94 °C'de 1dk, bağlanma: (55 °C'de 1 dk 1. PCR; 58 °C'de 1 dk nPCR), uzama: 72 °C'de 1 dk; son uzama: 72 °C'de 10 dk olarak ayarlanmıştır (7, 34). Amplikonlar %1.5'luk agaroz jelde görüntülenip analiz edilmiştir.

### ***Babesia bovis msa-2c* ve *B. bigemina rap-1a* gen bölgelerinin sekansı ve filogenetik analizleri**

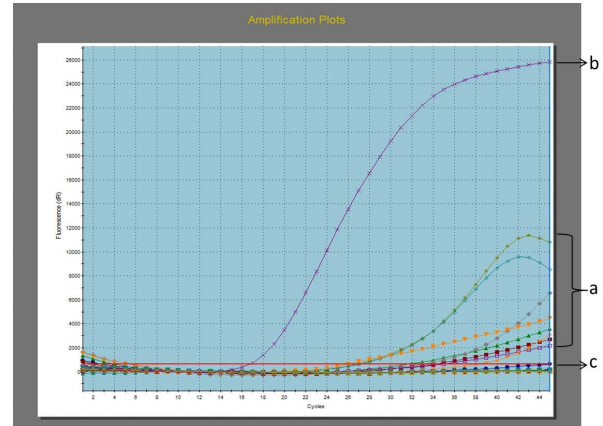
PCR analizleri sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen *B. bigemina* için iki izolata ait amplikon, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jelden pürifiye edilmiştir. Real time PCR analizleri sonucu pozitif belirlenen *B. bovis* izolatları çok düşük Ct (dR) değeri verdiği için PCR analizlerinde *msa-2c* gen bölgesi için uygun DNA bant profili elde edilememiştir. *Babesia bigemina* izolatları pürifikasyon sonrası ilgili gen bölgelerinin analizi için amplifikasyonda kullanılan primerlerle (*rap-1a* için nested primeri) çift yönlü olarak sekanslatıl-

mıştır. Kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 5.5.5 (12) yazılımı ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış son dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların, Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (33) ve Geneious 5.5.5 (12) yazılımlarında çoklu hizalamaları yapılarak filogenetik karakterleri ortaya konmuştur. Genetik farklılıkların saptanmasında Kimura two parameter modeli seçilmiştir (33). Neighbour-joining metodu ile filogenetik ağaçlar 1000 bootstrap değeri kullanılarak Mega 5.0 yazılımında (33) oluşturulmuştur. Elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

## **Bulgular**

### **Real time PCR sonuçları**

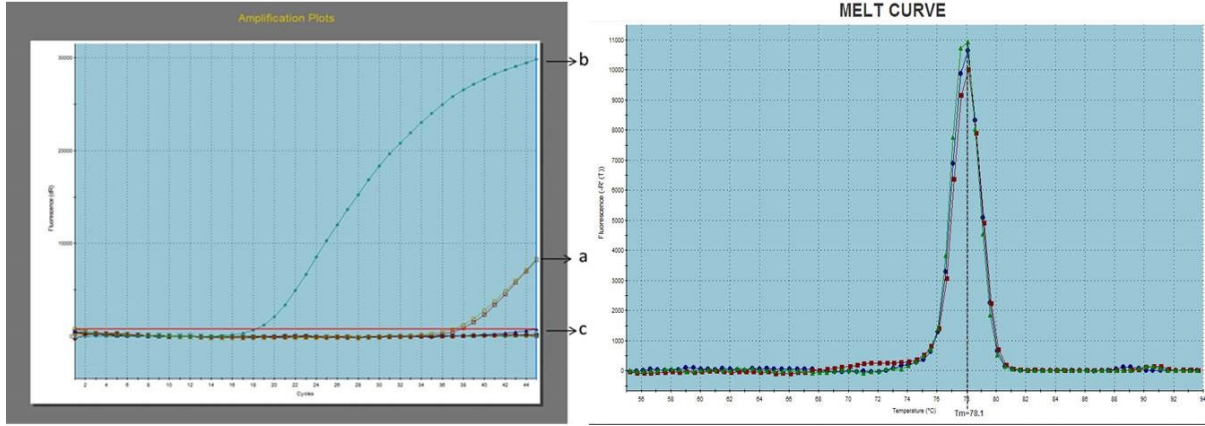
Real time PCR analizleriyle incelenen toplam 38 genomik DNA havuzundan sekizi (%21) *B. bigemina* (Şekil 1), ikisi (%5.2) *B. bovis* (Şekil 2) ile enfekte bulunmuştur. İncelenen örneklerde miks enfeksiyona rastlanmamıştır. *Babesia bi-*



**Şekil 1.** TaqMan Prob bazlı real time PCR analizleri sonucu *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri. a: *B. bigemina* pozitif örnekler; b: *B. bigemina* pozitif kontrol; c: No DNA ve negatif örnekler

*gemina* pozitif belirlenen sekiz örneğin dördü *R. annulatus*, biri *H. marginatum*, ikisi *R. turanicus* ve biri *H. anatolicum* havuzlarında saptanırken, *B. bovis* pozitif iki örnek de *H. marginatum* havuzunda saptanmıştır.

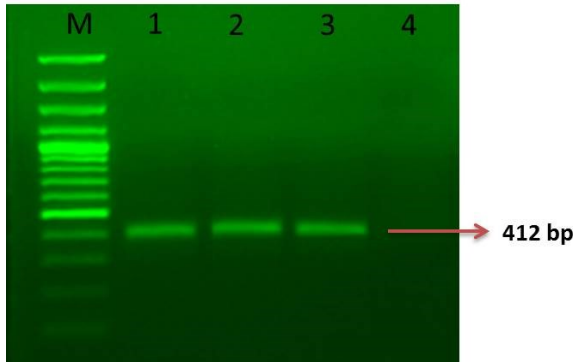
Sybergreen tabanlı qPCR analizlerinde pozitif örnekler için ortalama çözünme sıcaklığı (T<sub>m</sub>) 78.1 °C (±0.2 °C) olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Ct (dR) değerleri *B. bovis* ve *B. bigemina* için ortalama 37.71 ve 35.75 olarak belirlenmiştir.



Şekil 2. Sybergreen real time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri ve erime eğrileri (melting curve); Tm=78,1. a: *B. bovis* pozitif örnekler; b: *B. bovis* pozitif kontrol; c: No DNA ve negatif örnekler

### *Msa-2c* ve *rap-1a* gen bölgeleri sekans ve filogenetik analizleri

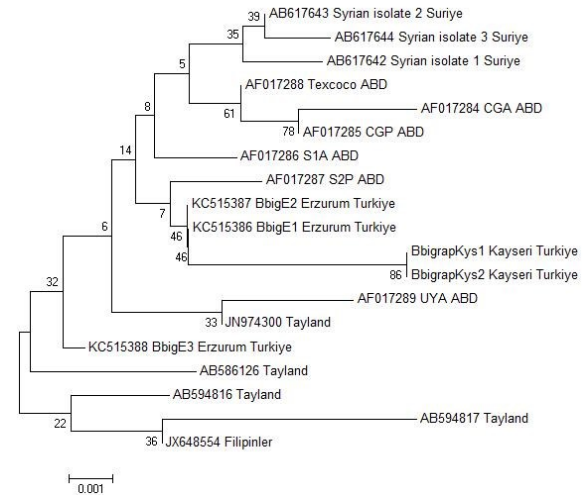
Sybergreen tabanlı Real time PCR analizlerinde *B. bovis* pozitif belirlenen iki örnekten, Ct (dR) değerlerinin çok yüksek, dolayısıyla parazitemi seviyesinin çok düşük olması nedeniyle agaroz jel üzerinde amplifikasyon elde edilememiştir. TaqMan prob tabanlı Real time PCR analizlerinde *B. bigemina* pozitif belirlenen iki örneğin agaroz jel üzerinde 412 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. *Babesia bigemina rap-1a* gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroferezde görünümü M: Marker (100bp); 1,2: Pozitif örnekler; 3: *B. bigemina* pozitif kontrol; 4: No DNA

Nükleotid dizileri tespit edilen izolatların *B. bigemina* için KU680419 (BbigrapKys1) ve KU680420 (BbigrapKys2) aksesyon numaraları ile GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Filoge-

netik analizlere GenBank'ta kayıtlı Suriye, Tayland, Amerika Birleşik Devletleri, Filipinler izolatları ile Türkiye'den benzer izolatlar da dahil edilmiştir. *Rap-1a* gen bölgesine göre saptanan *B. bigemina* izolatları arasında çeşitli nükleotid değişimleri belirlenmiştir. *B. bigemina* belirlenen izolatların (BbigrapKys1-BbigrapKys2) ikili kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identiklik, Dünyadaki diğer bazı izolatlarla %1±0.5 ve Türkiye'deki benzer izolatlarla %0.7±0.4 genetik farklılık tespit edilmiştir. Neighbor joining metodu ile oluşturulan filogenetik ağaçta (Şekil 4),



Şekil 4. Kayseri yöresinde kene havuzlarında saptanan *B. bigemina* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *B. bigemina* izolatlarının *rap-1a* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

BbigrapKys1 ve BbigrapKys2 izolatlarının Türkiye'den BbigE1 ve BbigE2 izolatlarıyla, Amerika Birleşik Devletleri'nden ise S2P izolatiyle yakın oldukları belirlenmiştir.

### Tartışma ve Sonuç

Keneler insanlarda ve hayvanlarda görülen ve zoonotik öneme sahip birçok paraziter, bakteriyel ve viral patojenlerin en önemli vektörlerindedir. Keneler ve kene kaynaklı patojenler özellikle son yıllarda tüm dünyada artış göstermektedir. Kenelerin dağılımı ve yaygınlığı direkt olarak halk sağlığı problemi olup özellikle çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerde keneler insan enfeksiyonlarının rezervuar konakları olabilmekte veya direkt olarak enfeksiyonları nakledebilmektedir. Konaklarından veya sahadan toplanan kenelerin ve bu kenelerde kene kaynaklı patojenlerin moleküler olarak belirlenmesi, coğrafik bir bölgede yeni ortaya çıkan kene kaynaklı hastalıkların risk faktörlerinin değerlendirilmesinde kullanışlı olmaktadır (11,19).

*Babesia bovis* ve *B. bigemina*'nın vektör kenelerde moleküler olarak araştırılmasıyla ilgili olarak ise Türkiye'de sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup bu çalışmaların konvansiyonel PCR, reverse line blotting (RLB) gibi moleküler teşhis yöntemleriyle yapıldığı dikkati çekmiştir. Mevcut çalışma kenelerde *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın Dünya'da, real time PCR ile araştırıldığı ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir. İça ve ark. (18) Kayseri yöresindeki sığırlardan ve barınaklardan toplanan kenelerden oluşturulmuş DNA havuzlarında RLB metodu ile inceleme yapmışlar ve %14 *B. bigemina*, %2.3 *Babesia* sp. ve %2.3 *T. annulata* + *B. bigemina* miks pozitifliği rapor etmişlerdir. Bu çalışmada (18) saptanan *Babesia* sp. (Kayseri 1) izolatının sekans analizlerinde Çin'den bildirilen *Babesia* türleri ile aynı clade'te yer aldığı tespit edilmiştir. Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada Aktaş ve ark. (2) Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan toplanmış toplam 2160 erişkin keneden oluşturdukları 224 DNA havuzunda RLB ile *Babesia* türlerini araştırmış ve %3.33'lük *Babesia* sp. pozitifliği belirlemişlerdir. Elde ettikleri *Babesia* sp. pozitif örneklerin sekans analizlerinde bu örneklerin İça ve ark. (18)'nin çalışmasında buldukları *Babesia* sp. pozitiflerde olduğu gibi isimlendirilmemiş *Babesia* türleriyle yüksek homoloji gösterdiğini saptamışlardır. Çalışmamızda ise İça ve ark. (18)'nin araştırdığı aynı kene havuzlarında *B. bovis* ve *B. bigemi-*

*na*'nın varlığı RLB metoduna göre daha duyarlı olan real time PCR metodu ile incelenmiş ve incelemesi yapılan 38 adet genomik DNA havuzunun sekizinde (%21) *B. bigemina*, ikisinde (%5.2) ise *B. bovis* pozitifliği saptanmıştır. Çalışmamızda *B. bigemina* varlığı İça ve ark. (18)'nin bulduğu prevalans oranına göre daha yüksek bulunmuş ve ayrıca iki örnekte de *B. bovis* pozitifliği belirlenmiştir. Dolayısıyla aynı kene havuzlarında farklı yöntemlerle yapılan çalışmalarda real time PCR tekniğinin RLB yöntemine göre daha duyarlı olduğu teyit edilmiştir. Türkiye'de sığırlardan toplanan kenelerden oluşturulmuş DNA havuzlarında yapılan araştırmalarda İça ve ark. (18) *B. bigemina* pozitifliğini *R. annulatus* ve *R. turanicus* kenelerinde, Aktaş ve ark. (2) ise *Babesia* spp. pozitifliğini *H. marginatum*, *H. excavatum* ve *R. annulatus* kenelerinde saptamışlardır. Bu çalışmada ise *B. bigemina* pozitiflikleri *R. annulatus*, *H. marginatum*, *R. turanicus* ve *H. anatolicum* havuzlarında belirlenirken, *B. bovis* pozitif örnekler ise *H. marginatum* havuzunda saptanmış ve böylelikle kenelerin sığır babesiosisi yönünden mevcut durumları ortaya konulmuştur.

Dünyada sığır babesiosisinin kenelerde moleküler olarak araştırılmasına dair çalışmalar sınırlıdır. Tsai ve ark. (35) Tayvan'da konvansiyonel PCR ile yaptıkları çalışmada sığırlardan toplanan toplam 254 kenenin hiçbirinde *Babesia* pozitifliği saptayamamışlardır. Mısır'da sığırlardan toplanmış 5243 ixodid ve argasid kenede PCR ile %55 *B. bovis* ve %66 *B. bigemina* pozitifliği saptanmış olup saptanan pozitiflerin hepsi de *R. annulatus* kenelerinden izole edilmiştir (1). Nijerya'da sığırlardan toplanan toplam 198 kenede [*Amblyomma variegatum* (n=153), *R. decoloratus* (n=45)] RLB ile yapılan bir çalışmada *A. variegatum* kenelerinde %3.9 *Babesia* spp., %1.3 *B. bigemina* ve %0.6 *B. divergens* pozitifliği saptanmıştır (25). Brezilya'da konvansiyonel PCR ve nested PCR ile yapılan çalışmada 27 buzağıdan toplanan toplam 258 *R. microplus* kenesinin 145'i *B. bigemina* ve 12'si *B. bovis* ve 25 sığırdan toplanan toplam 245 *R. microplus* kenesinin 43'ü *B. bovis* ve 39'u *B. bigemina* ile enfekte bulunmuştur (26). Etiyopya'da sığırlardan toplanan *Amblyomma*, *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* soylarındaki toplam 1246 kenede standart PCR ile yapılan bir çalışmada *Babesia* türlerine rastlanılmamıştır (21).

Apikal organellere sahip protozoon parazitlerin,

konak hücrelerine tutunmaları ve hücre içerisine girmeleri açısından bu organellerden salgılanan proteinlerin önem arz ettiği bildirilmiştir (29). Yapılan çalışmalarda *B. bovis* için yüzey antijenlerinden biri olan *msa-2c* geninin (38) ve *B. bigemina* için ise *rap-1* geninin (31) farklı suşlar arasındaki korunmuşluk oranlarının oldukça yüksek olduğu ve bu protozoonlara karşı yapılan aşı çalışmalarında tercih sebebi oldukları rapor edilmiştir. *Babesia bovis*'in yüzey antijenlerine özgü gen bölgeleriyle alakalı olarak Türkiye'de üç çalışma bildirilmiştir (13,15,39). Mevcut çalışmamızda ise real time PCR ile iki izolat *B. bovis* yönünden pozitif bulunmuş fakat Ct değerleri çok yüksek olduğundan agaroz jel üzerinde DNA bant profili elde edilememiştir. *Babesia bigemina* için ise real time PCR ile pozitif belirlenen sekiz örnekten sadece ikisi agaroz jel üzerinde DNA bant profili göstermiş olup bu izolatların (BbigrapKys1-BbigrapKys2) kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadaki benzer diğer izolatlarla %1±0.5 ve Türkiye'deki benzer izolatlarla ise %0.7±0.4 genetik farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz BbigrapKys1-BbigrapKys2 izolatlarının en yüksek identikliği Amerika Birleşik Devletleri'nden bildirilen Texcoco (AF017288), S2P (AF017287) ve S1A (AF017286) suşlarıyla (%99.93) gösterdikleri saptanmıştır. Filogenetik olarak oluşturulan ağaçta *B. bigemina* BbigrapKys1-BbigrapKys2 izolatlarının, Erzurum'dan bildirilen BbigE1 ve BbigE2 izolatları ve A.B.D'den bildirilen S2P izolatıyla birlikte aynı kümede yer aldığı görülmüştür. Hücre invazyonundan sorumlu *rap-1a* ve *msa-2c* gen bölgelerinin Dünya'dan bildirilmiş benzer izolatlar arasındaki benzerlik oranları kıyaslandığında *rap-1a* için bu oranın daha yüksek olduğu ve korunmuş bölge oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. Zira çalışmamızda, Kayseri'nin farklı yerleşim yerlerindeki sığırlardan elde edilmiş kenelerde saptanan *B. bigemina* BbigrapKys1-BbigrapKys2 izolatlarının *rap-1a* gen bölgesine ait aminoasit sekanslarının analizi sonucu protein profilleri bakımından %100 identik oldukları saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmayla, Kayseri yöresinin farklı lokalizasyonlarındaki sığırlardan temin edilmiş ixodid kene örneklerinden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında *B. bigemina* ve *B. bovis*'in mevcut durumu, diğer moleküler tabanlı teşhis yöntemlerine göre sensitivite ve spesifitesi oldukça yüksek olan real time PCR tekniği ile dünyada ilk kez ortaya konmuştur. *Babesia bi-*

*gemina rap-1a* gen bölgesi moleküler olarak karakterize edilerek GenBank'ta kayıtlı Türkiye'deki ve Dünyadaki benzer izolatlarla filogenetik kıyaslamaları yapılarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Ct (dR) değerlerine göre enfekte kenelerde her iki türün de düşük parazitemiye sahip olduğu görülmüştür. Bu açıdan özellikle rezervuar vektörlerin ve hayvanların belirlenmesinde real time PCR tekniğinin diğer yöntemlere göre çok daha avantajlı ve güvenilir bir yöntem olduğu kanaatine varılmıştır.

### Teşekkür

Yazarlar, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne verdikleri destek (Proje No: TYL-2013-4305) dolayısıyla teşekkür eder.

### Kaynaklar

1. Adham FK, Abd-el-Samie EM, Gabre RM, el-Hussein H. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I-*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Parasitol Res 2009; 105(3): 721-30.
2. Aktas M, Altay K, Ozubek S, Dumanlı N. A survey of ixodid ticks feeding on cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea region of Turkey. Vet Parasitol 2012; 187(3-4): 567-71.
3. Aydın L, Bakirci S. Geographical distribution of ticks in Turkey. Parasitol Res 2007; Suppl 2:163-6.
4. Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. Parasitology 2004; 129 (1): 247-69.
5. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, Falcon A, Alvarez JA, Camacho M, Figueroa JV. *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149:145-8.
6. Bursali A, Keskin A, Tekin S. A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Turkey: Species diversity, hosts and geographical distribution. Exp Appl Acarol 2012; 57(1): 91-104.
7. Cao S, Aboge GO, Terkawi MA, Yu L, Kamyingkird 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. Molecular detection and identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in Northern Thailand. Parasitol Res 2012; 111(3):1259-66.
8. Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, Beni-

- tez D, Florin-Christensen M, Gonzalez-Oliva A, Henriques G, Silva M, Alongi A, Agnone A, Torina A, Madrugá CR. Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet Parasitol* 2009; 162(3-4): 200-6.
9. Criado-Fornelio A. A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasmids. *Parassitologia* 2007(1); 49: 39-44.
  10. Çiçek H. Ankara yöresinde *Haemaphysalis* türleri üzerinde epizootiyolojik araştırmalar. *Türk J Vet Anim Sci* 2004; 28: 107-13.
  11. Dantas-Torres F, Chomel B, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: A OneHealth perspective. *Trends Parasitol* 2012; 28(10): 437-46.
  12. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S. Geneious v5.5 <http://www.geneious.com>, Erişim tarihi: 05.05.2014.
  13. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen *Babesia bovis* suşlarının moleküler karakterizasyonu. *Erciyes Üniv Sağlık Bil Derg* 2011; 20(1): 18-28.
  14. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Türkiye'de evcil ruminantlarda babesiosis. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci* 2012; 3(2): 27-34.
  15. Düzlü Ö, Yıldırım A, İnci A, Avciöğlü H, Balkaya İ. Sığırlarda *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın real-time PCR ile araştırılması ve izolatların moleküler karakterizasyonu, *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2015; 62: 27-35.
  16. Güler S. Ankara ve civarındaki koyun ve keçilerde kış Ixodidae'leri üzerine araştırmalar. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg* 1982; 1: 45-54.
  17. Hoffmann G, Hörchner F, Schein E, Gerber H. Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in des asiatischen provinzen der turkei. *Berl Münch Tierarztl Wschr* 1971; 84: 152-6.
  18. Ica A, Vatanserver Z, Yıldırım A, Duzlu O, İnci A. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. *Vet Parasitol* 2007; 148(2): 156-60.
  19. Ionita M, Mitrea I, Pfister K, Hamel D, Silaghi C. Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania. *Vet Parasitol* 2013; 196(1-2): 71-6.
  20. Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, Fujisaki K, Igarashi I. Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(5): 837-41.
  21. Kumsa B, Signorini M, Teshale S, Tessarin C, Duguma R, Ayana D, Martini M, Cassini R. Molecular detection of piroplasmids in ixodid ticks infesting cattle and sheep in western Oromia, Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 2014; 46(1): 27-31.
  22. Kurtpınar H. Türkiye Keneleri, Morfoloji, Biyoloji, Konakçı Yayılışları ve Medikal Önemleri. Ankara: Güven Matbaası, 1954; s. 96-112.
  23. Merdivenci A. Türkiye keneleri üzerine araştırmalar. İstanbul Cerrahpaşa Tıp Fak Yay. 1969; 1448-53.
  24. Mimioğlu M. Die schieldzecken (Ixoden) der haustiere in der turkei. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1954; 1: 20-35.
  25. Ogo NI, de Mera IG, Galindo RC, Okubanjo OO, Inuwa HM, Agbede RI, Torina A, Alongi A, Vicente J, Gortázar C, de la Fuente J. Molecular identification of tick-borne pathogens in Nigerian ticks. *Vet Parasitol* 2012; 187(3-4): 572-7.
  26. Oliveira-Sequeira TC, Oliveira MC, Araujo JP, Amarante AF. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol* 2005; 35(1): 105-11.
  27. Petrih R, Ruybal P, Thompson C, Neumann R, Moretta R, Wilkowsky S, Draghi G, Echaide I, de Echaide ST, Farber M. Improved molecular tools for detection of *Babesia bigemina*. *Animal biodiversity and emerging diseases. Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:155-7.
  28. Ramos CA, Araújo FR, Souza II, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, Oliveira RH, Soares CO, Rosinha GM, Alves LC. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 2011; 176(1): 79-83.
  29. Sam-Yellowe TY. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today* 1996; 12(8): 308-16.
  30. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, Yukarı BA, Eren H, Değer S, Nalbantoğlu S. Status of tick infestation in sheep and goats in Turkey. *Parassitologia* 1997; 39(2): 145-52.
  31. Shebish E, Vemulapalli R, Oseto C. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bi-*

- gemma* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. Vet Parasitol 2012; 188(1-2): 164-7.
32. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, McElwain TF. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. Mol Biochem Parasitol 1998; 93(2): 215-22.
33. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 2011; 28(10): 2731-9.
34. Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Jittapalapong S, Xuan X, Igarashi I. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. Vet Parasitol 2011; 178(3-4): 201-7.
35. Tsai YL, Chomel BB, Chang CC, Kass PH, Conrad PA, Chuang ST. *Bartonella* and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2011; 34(2): 179-87.
36. Uilenberg G. *Babesia* – A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 3-10.
37. Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, Torioni de Echaide S, Zamorano PI, Dominguez M, Suarez CE, Florin-Christensen M. *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 2003; 127(2): 133-41.
38. Wilkowsky SE, Farber M, Gil G, Echaide I, Mosqueda J, Alcaraz E. Molecular characterization of *Babesia bovis* strains using PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *msa2-a/b* genes. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149: 141-4.
39. Yavuz A, İnci A, Düzlü Ö, Bişkin Z, Yıldırım A. Molecular characterization of *Babesia bovis* *msa-2c* gene. Türkiye Parazitoloj Dergisi 2011; 35(3): 140-4.

**Yazışma Adresi:**

Doç. Dr. Önder DÜZLÜ  
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Parazitoloji Anabilim Dalı, 38039  
Kayseri-TÜRKİYE  
Tel: +90 (352) 2076666/29942  
E-posta: onderduzlu@erciyes.edu.tr