

Sahada *Theileria annulata* ile Enfekte Sığırların Nested PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), IFA (İndirekt Floresan Antikor) Testi ve Kan Frotisi Bakısı ile Saptanması

Zati VATANSEVER, Serpil NALBANTOĞLU

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı, 06110 Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 29.03.2002

Özet: Bu çalışma ile sığırlarda *Theileria annulata* enfeksiyonlarının teşhisinde kan frotisi mikroskopik bakısı, IFAT ve nested PZR yöntemlerinin aynı zamanda kullanılması ve bu teşhis yöntemleri arasında duyarlılık ve özgüllük bakımından farklılığın karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunun için tropikal theileriosisin yaygın olarak görüldüğü Ankara İli Polatlı ilçesine bağlı 4 yerleşim merkezinden 147 sağlıklı sığırdan elde edilen örneklerin muayenesinde, testlere göre kan frotisi mikroskopik bakısında % 31,3, IFAT'de % 44,9 ve nested PZR tekniğinde ise % 61,2'lik pozitiflik tespit edilmiştir. Ayrıca testler arasındaki sonuçların farklılığı istatistik olarak karşılaştırılmış ve nested PZR tekniğinin diğer iki teşhis yöntemine göre daha duyarlı ve özgül olduğu anlaşılmıştır. Aynı zamanda bu çalışma ile tek aşamalı PZR'a göre iki aşamalı nested PZR tekniğinin duyarlılığı arttırdığı da belirlenmiştir. Bu çalışma ile nested PZR yöntemi, Türkiye'de *T. annulata* ile enfekte sığırların saptanması amacıyla ilk defa kullanılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Theileria annulata*, PZR, nested PZR, IFAT, epidemiyoloji

Detection of Cattle Infected with *Theileria annulata* in Fields by Nested PCR, IFAT and Microscopic Examination of Blood Smears

Abstract: The aim of this study was to diagnose *Theileria annulata* infected cattle by microscopy, IFAT and nested PCR and to compare the sensitivity and specificity of these diagnostic methods. A total of 147 blood and sera samples were collected from healthy cattle in four localities of Polatlı district, Ankara, where tropical theileriosis is prevalent. Examination results revealed positivity rates of 31.3%, 44.9% and 61.2% for microscopy, IFAT and nested PCR, respectively. It was shown that nested PCR is more sensitive and specific when compared to microscopical examination and serological findings. It was also shown that nested PCR is more sensitive than single step PCR.

This study, which is the first work utilising nested PCR in the detection of *T. annulata* in Turkey, showed that nested PCR is more sensitive and specific when compared to microscopy and IFAT and can be used in further epidemiological studies.

Key Words: *Theileria annulata*, PCR, nested PCR, IFAT, epidemiology

Giriş

Hyalomma soyuna bağlı keneler tarafından nakledilen ve sığırlarda tropikal theileriosis etkeni olan *Theileria annulata*, Akdeniz havzası (Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Anadolu yarımadası), Ortadoğu, Orta ve Güney Asya'da yaygın olarak görülmekte (1,2) ve yaklaşık 250 milyon sığırı tehtid etmektedir (3). Hastalık tedavi edilmediği durumlarda yüksek verimli ırklarda ölümle sonuçlanmaktadır. Hastalığın teşhisi, klinik semptomlar ışığında Giemsa ile boyanmış lenf yumrusu biyopsileri, veya kan frotilerinin mikroskopik bakısı ile yapılmaktadır. Hastalığı atlatan hayvanlar portör haline gelirler ve vektör keneler için en önemli enfeksiyon kaynağını oluştururlar. Bu gibi hayvanların tüm sığır popülasyonu içindeki oranı

hastalığın epidemiyolojisi açısından belirleyicidir. Bu nedenle, portör hayvanların ortaya konması hastalığın kontrolü ve epidemiyolojisinin belirlenmesinde en önemli kriterlerden biridir (4). Ancak, portör hayvanların Giemsa ile boyanmış kan frotilerinde etkenin piroplazmik formlarını görmek zaman ve deneyim gerektirmektedir. Ayrıca, mikroskopik bakı ile çeşitli *Theileria* türleri arasında ayırım yapmak neredeyse olanaksızdır. Bunun yanında dolaşımdaki antikorları ortaya koymak amacıyla İndirekt Floresan Antikor testi (IFAT) gibi serolojik testler kullanılmaktadır (5). Ancak, çeşitli *Theileria* türleri arasında çapraz reaksiyonların görülebilmesi, bu testlerin yeterince duyarlı olmasını engellemektedir (6). Yine bunun yanında, uzun süreli portörlük durumlarında kanda piroplazmik formlar bulunmasına rağmen, antikorlar her

zaman tespit edilemeyebilir (7). Son yıllarda, parazit DNA'sının ortaya konması ilkesine dayanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği, çeşitli *Theileria* ve *Babesia* türlerinin duyarlı ve özgül biçimde teşhisini olanaklı kılmıştır (8-13). *Theileria annulata*'nın 30 kDa'luk merozoit yüzey antijenini kodlayan gen bölgesinin bir bölümünü amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan saha çalışmalarında (14,15), portör sığırların duyarlı ve özgül olarak tespit edilebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda (14,15) kullanılan primerlerin (N516/N517) bütün *T. annulata* izolatlarını belirleyemediği konusunda kuşku (16) olsa da, Martin-Sanchez ve ark. (13), bu primerlerin amplifiye ettiği bölge içinden ikinci bir çift primeri (Ta300/Ta750) de kullanarak bir nested PZR yöntemi geliştirmişler ve PZR testinin duyarlılığını arttırmışlardır.

Bu çalışmada, sahada *T. annulata* ile enfekte sığırların saptanmasında nested PZR tekniğinin uygulanabilirliği, bu tekniğin mikroskopik bakı ve IFAT ile duyarlılık ve özgüllük bakımından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma materyali, Nisan-Kasım 2000 tarihleri arasında Ankara İli Polatlı ilçesine bağlı 4 yerleşim biriminde düzenli olarak meraya çıkan toplam 147 sağlıklı sığırdan elde edilmiştir. Her hayvandan DNA ekstraksiyonu için EDTA'lı ve IFA testinde kullanılmak üzere serum tüplerine kan alınmıştır. Mikroskopik bakıda kullanılacak sürme kan froteleri EDTA'lı tüplerden alınan bir damla kandan hazırlanmıştır.

PZR için elde edilen EDTA'lı kan örnekleri DNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. DNA ekstraksiyonu, santrifüj aşamasındaki bir kaç değişiklik dışında, d'Oliveira ve ark. (15)'nin belirttikleri şekilde yapılmıştır. Buna göre 200 µl kan, 500 µl Saponin liziz buffer (1 mM EDTA, % 0,22 NaCl, % 0,015 Saponin) ile karıştırılarak 3300 devir (rpm)'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant atılarak tortu 2 defa daha aynı işlemde geçirilmiştir. Son işlemde sonra elde edilen tortu üzerine 100 µl PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM TrisHCl [pH 8], % 0,5 Tween 20, 100 µg/ml Proteinase K) ilave edilerek karıştırılmış ve 56 °C'lik su banyosunda 1 saat tutulmuştur. Bunu takiben örnekler 95 °C'de 10 dk. tutulmuş ve daha sonra 13000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı kısım PZR reaksiyonunda kullanılmıştır.

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *T. annulata* DNA'sı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı'nda çeşitli zamanlarda sahadan izole edilmiş ve hücre kültüründe pasajlanmış *T. annulata* stoklarından (Ta Bala) elde edilmiştir. *Theileria orientalis* (= *T. buffeli*) DNA'sı ILRI (International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya), *B. bovis*, *B. bigemina* ve *B. divergens* DNA'ları ise CTVM (Centre for Tropical Veterinary Medicine, Edinburgh, UK)'den temin edilmiştir.

PZR testinde kullanılan primer dizileri Tablo 1'de verilmiştir. Test iki aşamalı nested PZR olarak yapılmıştır. İlk aşamada, d'Oliveira ve ark. (15) tarafından geliştirilen ve *T. annulata*'nın 30 kDa'luk merozoit yüzey antijenin 721 bp'lik bölümünü amplifiye eden N516 ve N517 primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır (N516/N517 PZR). Her reaksiyon, her primerden 0,5 µM, her dNTP'den 0,2 mM (SIGMA), 0,025 U Taq DNA polymerase (FERMENTAS), 3 mM MgCl₂ (FERMENTAS), 1x PCR buffer (FERMENTAS) ve 2,5 µl örnek DNA'sı içeren 25 µl'lik hacimlerde yapılmıştır. Elde edilen reaksiyon ürünlerinin bir kısmı (20 µl) sonuçları görüntülemek amacıyla jel elektroforezde kullanırken, bir kısmı da (1 µl) Martin-Sanchez ve ark. (13)'nin bildirdiği şekilde Ta300 ve Ta750 primerleri ile nested PZR'na tabi tutulmuştur. Bu aşamada her reaksiyon, her primerden 10 ng, her dNTP'den 0,2 mM (SIGMA), 0,025 U Taq DNA polymerase (FERMENTAS), 1,5 mM MgCl₂ (FERMENTAS), 1x PCR buffer (FERMENTAS) ve 1 µl N516/N517 PZR ürünü içeren 25 µl'lik hacimler halinde yapılmıştır. Reaksiyonlar ısıtıcı kapağı olan Biometra TGradient (Whatmann Biometra) PZR makinesinde yürütülmüştür. Birinci aşama PZR (N516/N517 PZR), her biri 94 °C'de 1 dk, 57 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk olmak üzere, toplam 30 döngü; nested PZR ise her biri 94 °C'de 50sn, 60 °C'de 30sn, 72 °C'de 50 sn olan, toplam 40 döngü olarak yapılmıştır. Her iki PZR'da da son döngüyü takiben örnekler ilave olarak 72 °C'de 10 dk. tutulmuştur.

Tablo 1. Çalışma süresince yapılan PZR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri.

Primer adı	Primer dizisi
N516	5' GTA ACC TTT AAA AAC GT 3'
N517	5' GTTACGAACATGGGTTT 3'
Ta300	5' CAC CTC AAC ATA CCC C 3'
Ta750	5' TGA CCC ACT TAT CGT CC 3'

Her iki PZR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünler 0.5 µg/ml Ethidium bromide içeren % 1,5 Agaroz jelde yürütülerek UVP jel dökümantasyon sisteminde spesifik bantların varlığı araştırılmış ve görüntülenmiştir.

Sahada hazırlanan sürme kan frotileri laboratuvara getirilerek % 5 Giemsa solusyonu ile tekniğine uygun olarak boyanmıştır. İmmersiyon objektif altında (x100) incelenen 50 mikroskop sahasında en az bir piroplazmik formun görülmesi portörlük kriteri olarak kabul edilmiştir.

Toplanan serumlar Pipano ve Cahana (5), Burrige (17) ve Çakmak (18)'in bildirdiği şekilde IFA testine tabi tutulmuştur. Bu test için gerekli *T. annulata* şizont ve piroplazm antijenleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde deneysel enfeksiyon sonucu elde edilen materyallerden hazırlanmıştır. Şizont antijeni için 1/40, piroplazm antijeni için 1/20 titreler pozitif olarak kabul edilmiştir(18).

Birinci aşama PZR (N516/N517 PZR), nested PZR, IFAT ve mikroskopik bakı sonuçlarının istatistiksel analizleri için χ^2 testi kullanılmıştır.

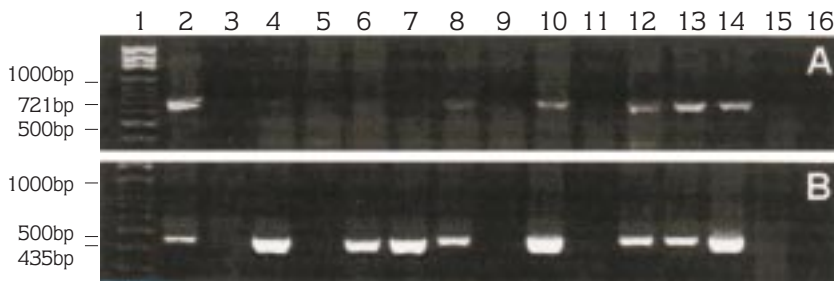
Bulgular

İlk aşamada yapılan N516/N517 PZR sonucunda, incelenen 147 örnekten 71 (% 48,3)'inden beklenen ölçülerde (721 bp) pozitif amplifikasyon ürünü elde edilmiş, bu ürünlerle takiben Ta300 ve Ta750 primerleri kullanılarak yapılan nested PZR sonucunda 147 örnekten 90 (% 61,2)'ından beklenen ölçülerde (453 bp) amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 1). N516/N517 PZR sonucu pozitif çıkan bütün örnekler nested PZR sonucunda da pozitif bant vermiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda iki test arasındaki farkın önemli olduğu ($p<0,05$), nested PZR temel alındığında, N516/N517 PZR testinin duyarlılığının % 78,9, özgüllüğünün ise % 100 olduğu görülmüştür. Her iki test

128 (% 87,1) örnekte uyumlu sonuç vermiştir. Hiç bir PZR testinde, reaksiyona kontrol olarak katılan *T. buffeli* (Şekil 1), *Babesia bovis*, *B. bigemina* ve *B. divergens* DNA'larından herhangi bir amplifikasyon ürünü elde edilmemiştir.

Sürme frotilerinin mikroskopik bakısında örneklenen 147 hayvanın 46 (% 31,3)'sında *T. annulata*'nın piroplazmik formları görülmüştür. Örneklerden 66 (% 44,9)'sı IFAT, 90 (% 61,2)'i ise nested PZR ile pozitif bulunmuştur. Nested PZR, *T. annulata*'nın ortaya konması açısından en duyarlı (% 61,2) test olurken, her üç testin sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Testler kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, gerek mikroskopik bakı ile IFAT ($p<0,05$), gerek mikroskopik bakı ile nested PZR ($p<0,05$) ve gerekse IFA ile nested PZR ($p<0,05$) arasındaki farkların önemli olduğu görülmüştür. Mikroskopik bakı, IFAT ile 103 (% 70,1), nested PZR ile 85 (% 57,8) örnekte; IFAT ile nested PZR ise 117 (% 79,6) örnekte uyumlu sonuç vermiştir. Her üç test, 79 (% 53,8) örnekte uyumluluk göstermiştir. Nested PZR temel alındığında, mikroskopik bakının % 41,1 oranında duyarlı ve % 84,2 oranında özgül, IFA testinin ise % 70 oranında duyarlı ve % 97,7 oranında özgül olduğu belirlenmiştir. Mikroskopik bakı ile pozitif bulunan 46 örneğin 9 (% 19,6)'undan ve IFA testi ile pozitif bulunan 66 örneğin 3 (% 4,5)'ünden nested PZR ile herhangi bir amplifikasyon ürünü elde edilmemiştir (Tablo 2).

Testlerden herhangi biri ile pozitif bulunan hayvan sayısı göz önüne alındığında, çalışmanın yapıldığı bölgede *T. annulata*'nın prevalansı % 69,4 (102/147) olarak hesaplanmıştır. Testler bireysel olarak ele alındığında prevalans değerleri, mikroskopik bakıya göre % 31,3 (46/147), IFAT'a göre % 44,9 (66/147) ve nested PZR testine göre de % 61,2 (90/147) olarak belirlenmiştir.



Şekil 1.

N516/N517 PZR (A) ve bundan elde edilen ürünlerle takiben yapılan nested PZR (B) sonuçları. Sıralar: 1. 100bp size marker, 2-13. Sahadan toplanan örnekler, 14. *T. annulata* (Ankara) kontrol DNA, 15. *T. orientalis* kontrol DNA, Negatif kontrol.

Tablo 2. Nested PZR, Mikroskopik bakı ve IFAT sonuçlarının karşılaştırılması.

	Nested PZR		Toplam
	-	+	
MB*-, IFAT -	45	24	69
MB-, IFAT +	3	29	32
MB +, IFAT -	9	3	12
MB +, IFAT +	0	34	34
Toplam	57	90	147

MB: Mikroskopik bakı

Tartışma

Tropikal theileriosis'in kontrolü konusunda yapılacak çalışmalar, büyük ölçüde etkenin vektör keneler ve portör hayvanlarda güvenilir şekilde teşhis edilmesine bağlıdır (4). Günümüze kadar *T. annulata*'nın teşhisine ve epidemiyolojisinin açıklanmasına yönelik çalışmalar mikroskopik bakı ve IFAT gibi yöntemlerle yapılmaktaydı (19,20). Ancak, son zamanlarda moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, PZR gibi yeni teşhis yöntemleri parazitolojide de yer bulmuş ve tropikal theileriosis ile ilgili çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (11-15). Yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, PZR'nun gerek mikroskopik bakı, gerekse IFAT'ne göre portör hayvanların belirlenmesinde çok daha duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir (13,15,16). Bu çalışmada kullanılan nested PZR yöntemi de portör hayvanların tespiti açısından mikroskopik bakı ve IFAT'a göre daha duyarlı bulunmuştur.

Bu çalışmada kullanılan testler arasında gözlenen farkların istatistiksel olarak önemli olduğu ve nested PZR'ın portör hayvanların tespiti açısından daha duyarlı olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, kontrol olarak kullanılan *T. orientalis* (= *T. buffeli*), *B. bovis*, *B. bigemina* ve *B. divergens* gibi kan parazitlerinin DNA'larından nested PZR sonucunda herhangi bir amplifikasyon ürünü elde edilmemiş, bu da testin özgül olduğunu göstermiştir.

Mikroskopik bakı sonucu pozitif bulunan örneklerden 9'u nested PZR sonucu negatif bulunmuştur. *Theileria* türlerinin morfolojik yapıları itibarı ile mikroskopik olarak

ayrıt edilmesinin zor olduğu göz önüne alındığında, nested PZR ile uyuşmayan mikroskopik bulguların *T. annulata* dışında bir tür (*T. buffeli*) olduğu söylenebilir. Aynı şekilde pozitif serolojik bulgulardan 3'ü de nested PZR sonucu negatif bulunmuştur. Bu durum da IFA testinin başka bir tür ile çapraz reaksiyon verme olasılığını akla getirmiş, ancak *T. annulata* dışında gerekli antijenler olmadığından, bu doğrulanmamıştır.

Geçmişte Ankara bölgesinde mikroskopik bakıya dayanan çalışmalarda portör sığırların oranının % 43,9 olduğu bildirilmiştir (21). Bu çalışmada ise mikroskopik bakı sonucunda bu oran % 31,3 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde geçmişte IFAT ile yapılan serolojik çalışmalarda (18,19) seropozitifliğin % 6,4 ile % 29 arasında değiştiği bu çalışmada ise bu oranın % 44,9 olduğu saptanmıştır. Bu bulgular ile daha önce İç Anadolu bölgesi için bildirilen prevalans değerleri arasındaki çelişkiler, yapılan çalışmaların her birinin Ankara'nın farklı endemik özelliklere sahip yerleşim birimlerinde yürütülmüş olması ile açıklanabilir.

Türkiye'de *T. annulata*'nın teşhisine yönelik PZR testi, ilk defa Aktaş ve ark. (14) tarafından Elazığ bölgesinde kullanılmıştır. Araştırmacılar (14), çalışmalarında d'Oliveira ve ark. (15)'nin kullandığı N516 ve N517 primerleri ile tek aşamalı PZR yapmışlardır. Bu çalışmada ise, N516 ve N517 primerlerinin bazı durumlarda bütün *Theileria* izolatlarını belirleyemediği (16) göz önüne alınarak, d'Oliveira ve ark. (15) ile Aktaş ve ark. (14)'nin uyguladığı yönteme ek olarak bir aşama daha PZR (nested PZR) ilave edilerek (13) testin duyarlılığı artırılmaya çalışılmıştır. Nitekim bu çalışmada N516 ve N517 primerleri ile yapılan ilk aşama PZR sonucunda 147 hayvandan 71'i pozitif bulunurken, sonuçların nested PZR'a tabi tutulması ile 19 örneğin daha pozitif olduğu görülmüştür. Bu durum, portör hayvanların tespiti için tek aşamalı PZR yerine, iki aşamalı nested PZR yapılmasının, daha duyarlı sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, *T. annulata*'nın teşhisi için Türkiye'de ilk defa kullanılan nested PZR tekniğinin, mikroskopik bakı ve IFA testine göre daha duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu ve saha çalışmalarında kullanılmasının yarar sağlayacağı kanısına varılmıştır. Çalışma sonucunda bölgede *T. annulata* enfeksiyonlarının prevalansının % 69,4 olduğu ortaya konmuştur.

Kaynaklar

1. Neitz, W.O.: Theileriosis, Gonderioses and Cytauxzoonoses: a review. Onderstepoort J. Vet. Res., 1957; 27: 275-381.
2. Norval, R.A., Perry B.D., Young A.S.: The Epidemiology of Theileriosis in Africa. 1992; Academic Press London, 481 p.
3. Tait, A., Hall F.R.: *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. Rev. Sci. Tech., 1990; 9: 387-403.
4. Brown, C.G.: Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. Parasitologia, 1990; 32: 23-31.
5. Pipano, E., Cahana M.: Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Theileria annulata*. J. Parasitol., 1969; 55: 765.
6. BurrIDGE, M.J., Brown C.G., Kimber C.D.: *Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. Exp. Parasitol., 1974; 35: 374-380.
7. Pipano, E.: Immunological aspects of *Theileria annulata* infection. Bull. Off Int. Epizoot., 1974; 81: 139-159.
8. de Kok, J.B., d'Oliveira C., Jongejan F.: Detection of the protozoan parasite *Theileria annulata* in *Hyalomma* ticks by the polymerase chain reaction. Exp. Appl. Acarol., 1993; 17: 839-846.
9. Gubbels, J.M., De Vos A.P., van der Weide M., Viseras J., Schouls L.M., de Vries E., Jongejan F.: Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. J. Clin. Microbiol., 1999; 37: 1782-1789.
10. Sparagano, O.A., Allsopp M.T., Mank R.A., Rijpkema S.G., Figueroa J.V., Jongejan F.: Molecular detection of pathogen DNA in ticks (*Acari: Ixodidae*): a review. Exp. Appl. Acarol., 1999; 23: 929-960.
11. Sparagano, O., Loria G.R., Gubbels M.J., De Vos A.P., Caracappa S., Jongejan F.: Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2000; 916: 533-539.
12. Georges, K., Loria G.R., Riilli S., Greco A., Caracappa S., Jongejan F., Sparagano O.: Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. Vet. Parasitol., 2001; 99: 273-286.
13. Martin-Sanchez, J., Viseras J., Adroher F.J., Garcia-Fernandez P.: Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. Parasitol. Res., 1999; 85: 243-245.
14. Aktaş, M., Dumanlı N., Çetinkaya B., Çakmak A.: Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infections in cattle in the east of Turkey. Vet. Rec., 2001, (Baskıda).
15. d'Oliveira, C., van der Weide M., Habela M.A., Jacquet P., Jongejan F.: Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J. Clin. Microbiol., 1995; 33: 2665-2669.
16. Kirvar, E., İlhan T., Katzer F., Hooshmand-Rad P., Zweggarth E., Gerstenberg C., Phipps P., Brown C.G.: Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. Parasitology, 2000; 120: 245-254.
17. BurrIDGE, M.J.: Application of the indirect fluorescent antibody test in experimental East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). Res. Vet. Sci., 1971; 12: 338-341.
18. Çakmak, A.: Ankara Yöresinde Bir Sığır Sürüsünde Hemoparazitlerin İnsidensinin Araştırılması. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 1990; 37 : 632-645.
19. Eren, H., Çakmak A., Yukarı B.A.: Türkiye'nin Farklı Bölgelerinde *Theileria annulata*'nın sero-prevalansı. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 1995; 42: 57-60.
20. Flach, E.J., Ouhelli H.: The epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection in cattle) in an endemic area of Morocco. Vet. Parasitol., 1992; 44: 51-65.
21. Göksu, K.: Ankara ve Civarı Sığırlarında Theileriosis Üzerinde Sistematik Araştırmalar. Tez. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay. No.115/60, 1959; Yeni Matbaa, Ankara, 73s.