

Türkiye'de Tropikal Theileriosis Üzerinde Araştırmalar*

5. Atenüye *Theileria annulata* Şizont Aşısının Düşük Dozlarının Tropikal Theileriosis'e Karşı Sığırları Korumadaki Etkileri

Fahri SAYIN, Serpil NALBANTOĞLU, Zafer KARAER, Ayşe ÇAKMAK, Şükran DİNÇER, Zati VATANSEVER
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı, Ankara - TÜRKİYE

Abdullah İNCİ

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri - TÜRKİYE

Bayram Ali YUKARI

Akdeniz Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Burdur - TÜRKİYE

Hasan EREN

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın - TÜRKİYE

Metin GÜNAY, Erkut ONAR, Hatice ALP

Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 15.02.2001

Özet: Türkiye'de bir yılda üretilen 150.000 dozluk atenüye hücre kültürü aşısının ihtiyacı karşılamaması nedeniyle bir aşı dozundaki hücre sayısının azaltılarak daha çok sayıda sığırın aşılabilmesi amacıyla, değişik sayıda aşı hücresi içeren dozların, sığırları tropikal theileriosis'den korumada etkileri incelenmiştir. Bunun için 2,5-3 aylık 50 Holstein ırkı buzağıdan yararlanılmış; 42'si aşı dozu denemelerinde, 8'i ise çelinç materyali patojenitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

Değişik sayıda aşı hücresi içeren dozların incelenmesi için 3 deney yapılmış, birincisi için herbirinde 4 buzağı olan 3 grup (1'i kontrol), ikincisi için herbirinde 3 buzağı olan 5 grup (1'i kontrol), üçüncüsü için ise 10 ve 5 (kontrol) buzağı bulunan 2 grup oluşturulmuş. Birinci deney gruplarında bulunanlar 10^6 ve 10^7 , ikinci deney gruplarındakiler 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 , üçüncü deney grubundakiler 10^6 aşı hücresi ile aşılansın, kontrol grubundakiler ise aşılansınmamıştır. Genellikle aşılansın buzağılarda aşuya bağı klinik bir reaksiyon şekillenmemiş, şizont ve piroplasm şekillerine rastlanmamış, kan hücreleri sayısında bir değişiklik olmamıştır.

Aşılandıktan 35 gün sonra birinci deney grubundakiler kontroller de dahil *Theileria annulata* Sarıoba *Hyalomma detritum* kene stabilatı (4 kenelik) ile, ikinci deney grubundakiler kontroller de dahil *T. annulata* Akdere *H. detritum* kene stabilatı (4 kene) ile, üçüncü deney grubundakiler kontroller de dahil *T. annulata* AKSA *Hyalomma anatolicum anatolicum* (4 kene/1 ml *T. annulata* Akdere + 4 kene/1 ml *T. annulata* Sarıoba) kene stabilatı (8 kene) ile çelinç yapılmıştır. Aşılı ve aşısız bütün buzağılarda çelinçden sonra enfeksiyon meydana gelmiş, şizont, piroplasm ve ateş görülmüş, ancak aşılı buzağılara göre aşısız buzağılarda parazitemi ve şizont yüzdeleri ile ateşin daha yüksek, klinik reaksiyonların daha şiddetli olduğu görülmüştür. Daha yüksek çelinç materyali ile enfekte edilen üçüncü deney grubundaki aşılı ve aşısız bütün buzağılarda ise enfeksiyon ilk iki deney grubundakilere göre daha şiddetli ortaya çıkmış, yüksek oranda şizont ve piroplasm görülmüş, aşılı buzağılardan 4'ü (% 40), kontrol buzağılarının ise hepsi (% 100) tropikal theileriosisden ölmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 ve 10^7 hücrelik dozlar halinde uygulanan aşının, sığırları hastalıktan koruduğu, korumada aşı dozları arasında belirgin bir farkın ortaya çıkmadığı, ancak kene çelinçinin yüksek dozda olduğu olaylarda 10^6 hücrelik aşı dozunun hastalıktan korumaya yeterli olmadığı anlaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Theileria annulata*, theileriosis, aşılama, sığır

* VHAG 799 nolu proje ile TÜBİTAK ve EEC TS2 0170 UK (JR) nolu proje ile Avrupa Topluluğu tarafından desteklenmiştir.

Studies on tropical theileriosis in Turkey

5. Studies on Various Numbers of Attenuated Vaccine Cells Used in Cattle Against Tropical Theileriosis

Abstract: Since the total of 150,000 doses of attenuated cell culture vaccine doses produced annually in Turkey does not meet the requirements of the country, by reducing the number of vaccine cells in a single dose, an increased number of vaccine doses was obtained for cattle, and doses consisting of different numbers of vaccine cells were tested according to their protective efficiency against tropical theileriosis in cattle. Fifty Holstein calves aged 2.5-3 months were used: 42 of them were used in vaccine dose trials while 8 were used in the determination of pathogenicity of the challenge material.

In order to examine doses consisting of different numbers of vaccine cells, 3 experiments were carried out. Three groups (including 1 control) consisting of 4 calves were formed in the first experiment while 5 groups (including 1 control) consisting of 3 calves were formed in the second experiment and 2 groups consisting of 10 and 5 (control) calves were formed in the third experiment. Calves in the first experiment groups were vaccinated with 10^6 and 10^7 vaccine cells, whereas calves in the second experiment groups were vaccinated with 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 and calves in the third experiment groups were vaccinated with 10^6 cells. Animals in the control groups were not vaccinated. Generally, significant reactions were not observed in vaccinated calves and neither schizonts in lymph node smears nor piroplasm forms in blood smears were detected in any of them. No difference was observed in blood cell levels.

Thirty-five days after vaccination, animal groups including the control groups were challenged with *Theileria annulata* Sarioba *Hyalomma detritum* tick stabilate (4 t.e.) in the first experiment, *T. annulata* Akdere *H. detritum* tick stabilate (4 t.e.) in the second experiment and *T. annulata* AKSA *H. anatolicum anatolicum* (4 t.e./1 ml *T. annulata* Akdere + 4 t.e./1 ml *T. annulata* Sarioba) tick stabilate (prepared from 8 ticks) in the third experiment. Infection developed in both vaccinated and non-vaccinated calves following challenge and schizonts, piroplasms and fever were observed. When compared to vaccinated calves, parasitaemia and schizont levels and body temperatures were higher and clinical reactions were more severe in non-vaccinated calves. Vaccinated and non-vaccinated calves in the third experiment groups, which were challenged with higher material levels, exhibited more severe infection symptoms compared to the first 2 experiment groups. Higher levels of schizont and piroplasms were detected in the animal groups in the third experiment, and 4 of the vaccinated calves (40%) and all control calves (100%) died from tropical theileriosis.

In conclusion, vaccines applied at 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^7 cell doses were found to protect cattle from infection in this research. No significant difference was detected between the protective efficiency of vaccine doses. However, in cases in which tick challenge was higher, the 10^6 cell vaccine dose was found to be insufficient regarding protection.

Key Words: *Theileria annulata*, theileriosis, vaccination, cattle

Giriş

Tropikal theileriosis sığırlarda *Theileria annulata* (Piroplasmida, Theileridae)'nin neden olduğu yaygın ve önemli bir hastalıktır (1,2). Son yıllarda tropikal theileriosis'e yakalanmış sığırların tedavisi için kısmen etkili görülen Butalex kullanıldığı gibi (3), bu hastalıktan sığırları korumak için değişik yöntemle elde edilen aşılardan da yararlanılmaktadır.

Önceleri hastalığın akut döneminde alınan kan ile veya enfekte edilen buzağuların homojen hale getirilmiş dalak, karaciğer veya kanı ile yapılan çalışmalardan deneysel olarak olumlu sonuçlar alınmış, ancak sahada serotip farklılığına bağlı olarak (4-7) sonuçlarının iyi olmadığı bildirilmiştir. Aynı şekilde önce enfeksiyon oluşturulup, daha sonra tedavi yöntemleriyle de sığırların tropikal theileriosis'den korunma çalışmaları yapılmış (8), uygulama zorluğu nedeniyle, sahada tatbik edilememiştir. Bağışıklık için enfekte kanın veya homojen dokunun kullanılmasıyla ortaya çıkan bu sorunlar, hücre kültürü

(şizont) aşısının elde edilmesiyle ortadan kaldırılmıştır. Başlangıçta *T. annulata*'nın hücre kültürü, enfekte buzağuların karaciğer, dalak ve lenf yumrusundan alınan parçalardan sağlanmıştır (9-11). Daha sonra karaciğer, dalak ve lenf yumrusunda bulunan *T. annulata* şizontlarıyla enfekte lenfositlerden kültür yapılmıştır (12). Nihayet *T. annulata* ile enfekte sığırdan, hastalığın akut döneminde perifer kandan izole edilen buffy coat kullanılarak hücre kültürü geliştirilmiştir (13). Neticede sahada virulent olan herhangi bir *T. annulata* serotipinin in vitro pasaj yapılarak atenüye edilebileceği ortaya konmuştur (12-15). Böylece İsrail (16), Hindistan (17), Çin (18) ve Rusya (19) gibi bir çok ülkede, *T. annulata*'nın lokal virulent serotipleri kullanılarak, tropikal theileriosis'e karşı atenüye şizont aşısı üretilmiş ve sahada kullanılmıştır. Atenüye şizont aşısının, aşı olarak kullanılan *T. annulata* ile enfekte kandan daha fazla güvenli olduğu, gebeler dahil herhangi bir sığırdan inokülasyondan sonra klinik reaksiyon veya diğer zararlı bir etki meydana getirmediği bildirilmiştir (20). Tropikal theileriosis'in

bulunmadığı ülkelerden ithal edilerek aşılandıktan sonra İsrail'in endemik bölgelerinde meraya bırakılan sığırların hiçbirinin tropikal theileriosis'e yakalanmadığı, keza atenüye şizont aşısıyla aşılanan duyarlı buzağuların tropikal theileriosis'den korundukları, bununla beraber kene enfeksiyonuna maruz bırakılan aşılanmış sığırlardan bazılarında Theileria enfeksiyonuna bağlı klinik reaksiyonların görüldüğü, bazılarının yavru attığı, bazılarında süt veriminin azaldığı kaydedilmiştir (21).

Türkiye'de de atenüye *T. annulata* şizont aşısı 1982 tarihinden itibaren Tarım Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsünde üretilmekte, likit nitrojende muhafaza edilen atenüye *T. annulata* şizontlarıyla enfekte lenfositler prosedürüne uygun olarak sahada çözdürülerek derialtı yolla sığırlara enjekte edilmektedir (22). Sığırlar hastalıktan korunma amacıyla İsrail (16) ve Türkiye'de (22) 107, Hindistan (17) ve Çin'de (18) 5 x 10⁶, Rusya'da (19) 10⁶ atenüye *T. annulata* şizontu ile enfekte lenfosit ile aşılanmaktadır.

Türkiye'de kullanılan canlı atenüye şizont aşısı, *T. annulata* Ankara stokunun doku kültüründe 250 defa pasaji yapılarak, stokta mevcut şizontların atenüye edilmesiyle elde edilmekte ve yılda yaklaşık herbiri 107 hücre içeren 150 bin doz aşı üretilmektedir (22). Ayrıca son yıllarda teknik donanımı ve kapasitesi ile üretim istikrarı belirli olmayan bazı özel laboratuvarlarda da aşı üretilmektedir. Ancak bunlardan kesin rakamlar alınmadığı için ihtiyaç dozu üzerindeki rolü tartışılır. Bundan dolayı üretim dozu olarak bakanlığın ürettiği aşı esas alındığında, Türkiye'de yaklaşık 12,5 milyon sığırın varlığı düşünülürse üretilen aşı dozunun ihtiyacı karşılamaktan uzak olduğu görülür. Bu nedenle kullanılan aşı dozunun içerdiği (10⁷) hücre sayısını azaltarak üretilen aşı dozunun artırılması düşünülmüş ve bunun için bu çalışma ile atenüye Theileria şizont aşısının 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ ve 10⁷ hücre içeren dozlarının tropikal theileriosis'e karşı koruyucu etkileri, duyarlı Holstein buzağularında deneysel olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma için TİGEM'e bağlı İnanlı ve Bala çiftliklerinden 2,5-3 aylık 50 buzağı satın alınmış ve duvarları, tavanı beton olan, keneden steril deney ahırında tutulmuşlardır. Deneylerden önce, birer hafta arayla 3 kez, her buzağıdan hazırlanan kan ve lenf yumrusu punksiyon materyali frotileri muayene edilmiş ve alınan

kanlardan ayrılan serumlarda IFA testiyle anti-*T. annulata* antikoru araştırılarak buzağuların *Theileria annulata* yönünden steril oldukları tespit edilmiş ve buzağulardan 42'si 3 deney için 3 gruba ayrılmış, 8'i ise çelinç materyalinin patojenitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

Birinci deneyde, 4'er buzağılık 3 grup kullanılmıştır (A, B, C grupları). A grubunda bulunan buzağular 10⁶, B grubunda bulunan buzağular 10⁷ atenüye aşı hücresi içeren dozlarla aşılanmışlardır. C grubunda bulunan buzağular aşılanmayıp duyarlı kontrol olarak bırakılmışlardır.

İkinci deneyde, 3'er buzağı içeren 5 grub ayrılmıştır (A, B, C, D ve E grupları). Buzağular, A grubunda 10⁶, B grubunda 10⁵, C grubunda 10⁴, D grubunda 10³ atenüye aşı hücresi içeren dozlarla aşılanmışlardır. E grubunda bulunan 3 buzağı ise aşılanmayıp duyarlı kontrol olarak bırakılmışlardır.

Üçüncü deneyde buzağular 2 gruba ayrılmış (A ve B grupları), A grubunda 10 buzağı 10⁶ atenüye aşı hücresi içeren dozla aşılanmış, B grubunda 5 buzağı aşılanmayıp duyarlı kontrol grubu olarak bırakılmıştır.

Deneylerde Pendik'te üretilen aşı kullanılmış, prospektüsüne uygun olarak aşı hücreleri, buzağuların preskapular lenf yumrusunun yukarisına, deri altına enjekte edilmiştir (22). Her üç deneyde de aşılama yapıldıktan sonra her gün, bütün buzağuların rektal ısıları ölçülmüş, palpasyonla preskapular lenf yumrusu kontrol edilmiş, kandan froti hazırlanmıştır. Preskapular lenf yumrusu büyüyen buzağulardan gün aşırı punksiyonla alınan materyalden froti yapılmıştır. Tüm frotiler, Giemsa ile boyanıp (23) *T. annulata*'nın piroplasm ve şizontları bakımından incelenmişlerdir. Ayrıca aşılamanın 17, 28, 35 ve 42'inci günlerinde yine bütün buzağulardan, kaolin içeren vakumlu tüplere 10'ar ml kan alınarak serumlarda IFA testiyle, anti-*T. annulata* antikoru araştırılmıştır (24). Aşı yapıldıktan 35 gün sonra bütün buzağulara (aşılı ve kontrol) çelinç inokülasyonu yapılmıştır.

Birinci deneyde kullanılan çelinç materyalini *Hyalomma detritum* kenelerinden hazırlanan ve 2 kene/1ml oranında, % 7,5 gliserolde, 2 ml'lik (4 kene) şişelere porsiyonlanarak likit nitrojende saklanan *T. annulata* Sarıoba kene stabilatı (GUTS) teşkil etmiştir (25). Bu stabilatlar kullanılmadan önce, 37 °C'de benmaride bekletilerek çözülmüş ve 30 dakika laboratuvar ısısında dinlendirilerek aşılı ve kontrol buzağuların herbirinin preskapular lenf yumrusunun

yukarisına, derialtına 2 ml (4 kenelik) enjekte edilmiştir. *T. annulata* Sarıoba kene stabilatı'nın, çelinç olarak kullanılmadan önce, duyarlı 4 Holstein ırkı buzağı üzerinde patojenite testi yapılarak patojenitesi tespit edilmiştir.

İkinci deneyde kullanılan çelinç materyalini yine *H. detritum* kenelerinden 2 ml (4 kenelik) dozlar halinde hazırlanarak porsiyonlanıp saklanmış, *T. annulata* Akdere kene stabilatı teşkil etmiştir (25). Duyarlı 2 Holstein buzağısında bu stabilatın da patojenitesi saptanmıştır.

Üçüncü deneyde çelinç materyali olarak *H. anaticum anaticum* kenelerinden hazırlanan *T. annulata* Akdere ve *T. annulata* Sarıoba kene stabilatları (25) birlikte kullanılmış, gerek aşılı ve gerekse kontrol buzağılarının her birine çelinç inokülasyonu olarak *T. annulata* Ak-Sa 8 kenelik stabilat uygulanmıştır. Çelinç inokülasyonlarından biri buzağının sağ preskapular lenf yumrusunun, diğeri sol preskapular lenf yumrusunun yukarisına deri altına inoküle edilmiştir. Ayrıca bu stoklarla duyarlı Holstein buzağılarında ayrı ayrı patojenite testleri yapılmıştır.

Her üç deneyde çelinç inokülasyonu yapıldıktan sonra aşılı kontrol buzağılarının hergün rektal ısıları ölçülmüş, preskapular lenf yumrularının, elle muayene edilerek büyüüp büyümediğine bakılmış ve buzağuların genel durumları izlenmiştir. Yine hergün buzağılardan kan frotisi yapılarak parazitemi durumu izlenmiş (23) ve büyüme başladıktan sonra, gün aşırı olarak, preskapular lenf yumrusu punksiyon materyalinden froti hazırlanıp şizont parasitosis durumu (23) kontrol edilmiştir. Ayrıca, haftada 3 gün her buzağıda lökosit sayımı yapılmış ve hematokrit değeri tayin edilmiştir. Haftada bir olmak üzere, herbir buzağıdan kaolinli tüplere 10 ml kan alınarak serumlarda buzağuların ölümüne veya nekahat döneminin sonuna kadar IFA testiyle anti-*T. annulata* antikor aranmıştır (24).

Bulgular

Birinci deneyde kullanılan kene stabilatının hazırlandığı *T. annulata* Sarıoba ile enfekte *H. detritum*'un erkek ve dişilerinin her ikisinin de enfeksiyon oranı % 100 olarak bulunmuş, dişilerde kene başına düşen ortalama enfekte asini sayısının 160, erkeklerde 157,7 olduğu görülmüştür. Bu stabilatın patojenitesini tayin için 4'er kenelik stabilat ile enfekte edilen 4 duyarlı Holstein buzağısının hepsi şiddetli tropikal theileriosis'e yakalanmıştır. Hastalanan 4 buzağıda vücut ısı

ortalaması 41 °C dereceye çıkmış ve ortalama 9,5 gün devam etmiştir. Maximum ortalama değerler, şizont parasitosis'i hücre sayısında % 56,2, perifer kanda enfekte eritrosit sayısında (parazitemi) % 23,3, hematokrit seviyesi düşüşünde % 54,1 ve lökosit sayısı azalmasında % 57,6 olmuştur. Buzağılardan ikisi tropikal theileriosis'den ölmüş, diğeri ikisi uzun bir nekahat dönemi geçirdikten sonra iyileşmiş fakat gelişme performansı gösterememiştir.

İkinci deneyde kullanılan kene stabilatının hazırlandığı *T. annulata* Akdere ile enfekte *H. detritum*'un erkek ve dişisinin her ikisinde de enfeksiyon oranı % 100 olarak saptanmıştır. Kene başına düşen ortalama enfekte asini sayısının erkeklerde 152,4, dişilerde 159,2 olduğu görülmüştür. Patojenite testi amacıyla herbirine 4 kenelik stabilatın inoküle edildiği 2 duyarlı Holstein buzağısı, şiddetli tropikal theileriosis'e yakalanmıştır. Buzağuların ateşi 41,5 °C'ye çıkmış, parazitemi maximum % 6 olmuş, hematokrit seviyesi % 44 nisbetinde düşmüştür. İki buzağıda da orta şiddette şizont parasitosis'i görülmüştür.

Üçüncü deneyde kullanılan kene stabilatının hazırlandığı *T. annulata* Akdere stoku ile enfekte *H. a. anaticum*'un dişi ve erkeklerinin, enfeksiyon oranı % 100 olarak bulunmuştur. Kene başına düşen enfekte asini ortalamasının dişilerde 329,3, erkeklerde 251,4 olduğu görülmüştür. *Theileria annulata* Sarıoba stoku ile enfekte *H. a. anaticum*'un dişisinde enfeksiyonun % 100, erkeğinde % 90 olduğu belirlenmiş, kene başına düşen ortalama asini sayısı dişide 296,1, erkekte 154,8 olarak saptanmıştır. Patojenite tesbiti için, enfekte *H. a. anaticum*'dan elde edilmiş 4'er kenelik *T. annulata* Sarıoba ve *T. annulata* Akdere kene stabilatı inoküle edilen 2 duyarlı Holstein buzağı şiddetli tropikal theileriosis'e yakalanmışlardır. Buzağuların birinde ateş 41,2 °C, diğesinde 41,5 °C'ye çıkmış; birinde 8, ikincide 10 gün devam etmiştir. Şizont parasitosis'inde enfekte hücre ve kanda parazitemi nisbetleri sırasıyla birinde % 17 ve % 6,3, diğesinde % 20 ve % 50 olmuştur. Hematokrit değerinde düşme birinci buzağıda % 52,9, ikinci buzağıda % 67,6, lökosit sayısında azalma ise sırasıyla % 47,4 ve % 64,2 olarak belirlenmiştir. İki buzağı da uzun bir nekahat dönemi geçirdikten sonra iyileşmişlerdir.

Birinci deneyde A ve B gruplarında bulunan, sırasıyla 10^6 ve 10^7 aşı hücresi dozlarıyla aşılacak buzağular aşılama sonrasında önemli bir reaksiyon göstermemiş, bu

2 grupdan 2'şer buzağının ateşleri, aşılandıktan 16 ve 22 gün sonra, 40 °C ye çıkmış ve 1-2 gün içinde kendiliğinden normale dönmüştür. Bütün buzağılarda, aşının inoküle edildiği tarafta bulunan lenf yumrusunda hafif bir büyüme görülmüştür. Buzağuların kan ve lenf yumrusundan hazırlanan frotilerde *T. annulata*'nın piroplasm ve şizont şekillerine rastlanmamıştır. Aşılamadan önce ve sonra, buzağuların lökosit sayısı ve hematokrit değerlerinde bir değişiklik olmamıştır. Aşılı buzağuların kan serumunda, aşılamadan sonra 17, 28, 35 ve 42'ci günlerde *T. annulata* piroplasm antijenine karşı, 28, 35 ve 42 günlerde şizont antijenine karşı antikor saptanmıştır. 35'ci günde şizont antijenine karşı en yüksek 1:160, piroplasm antijenine karşı en yüksek 1:640 titrede antikor oluştuğu görülmüştür.

Aşılamayı izleyen 35'ci günde aşılı ve kontrol buzağularına yapılan çelinç inokülasyonuna bağlı bulgular Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1'de görüldüğü gibi A ve B gruplarında bulunan aşılı bütün buzağular çelinç inokülasyonuna karşı çok hafif reaksiyon göstermiş ve hastalanmamışlardır. Buna karşılık C grubunda bulunan kontrol buzağularının hepsi çok şiddetli reaksiyon göstermişler ve hastalanmışlardır. Çelinç inokülasyonu sonrasında preskapular lenf yumrusundaki büyüme aşılı buzağılarda az, kontrol

buzağularında fazla olmuştur. Kan ve lenf yumrusundan hazırlanan frotilerde piroplasm ve şizont sayılarındaki azalma yüzdesi, aşılı buzağılarda çok düşük, kontrol buzağılarda çok yüksek olmuştur. Vücut ısısı çelinç yapılan aşılı buzağuların bazılarında hafif yükselmiş fakat kısa sürmüştür; kontrol buzağularının hepsinde çok yükselmiş ve uzun sürmüştür. Lökosit sayısı ve hematokrit değerindeki düşmeler çelinç yapılan aşılı buzağılarda çok az, kontrol buzağularında çok fazla olmuştur. Aşılı buzağular çelinçten sonra genellikle sağlıklı görünürken, kontrol buzağularında şiddetli seyreden tropikal theileriosis'den kondüsyon kaybı izlenmiştir. Diğer taraftan 10^6 ve 10^7 aşı dozları arasında, buzağuları tropikal theileriosis'den koruma açısından, belirgin bir fark görülmemiştir. Çelinç inokülasyonundan dolayı aşılı ve kontrol buzağularından hiçbiri ölmemiştir.

İkinci deneyde A, B, C, D gruplarında bulunan ve sırasıyla 10^6 , 10^5 , 10^4 ve 10^3 aşı hücreleriyle aşılanan buzağılarda, aşılamayı takiben, aşıya bağlı önemli bir reaksiyon görülmemiştir. Buzağuların vücut ısısı fizyolojik sınırlar içinde kalmış, preskapular lenf yumrusunda kısa süren hafif bir büyüme olmuştur. Preskapular lenf yumrusundan yapılan frotilerde şizont, perifer kan frotilerinde piroplasm görülmemiştir. Lökosit sayısında ve hematokrit değerlerinde bir değişiklik olmamıştır.

Tablo 1. 10^6 ve 10^7 aşı hücresi dozları ile aşılanan ve kontrol buzağularında, *Theileria annulata* Sarıoba kene stabilatı (4 kenelik) ile çelinçten sonra görülen ortalama klinik parametrik değerler.

Parametrik Değerler	Buzağı Grupları		
	A	B	C
Buzağı sayısı	4	4	4
Aşı hücresi dozu	10^6	10^7	0,0
Ateşin çıktığı gün	9,0	7,5	11,5
Ateşli gün sayısı	1,8	5,8	18,5
Maximum ateş (°C)	39,8	39,9	41,6
Lenf yumrusunda ilk reaksiyon	5,0	6,0	7,8
Şizontun ilk görüldüğü gün	16	14	14
Piroplasmın ilk görüldüğü gün	18,0	18,0	11,0
Maximum şizont (%)	0,5	8,5	62,2
Maximum parazitemi (%)	2,5	2,5	30,0
Hematokritte maximum düşme (%)	22,6	28,3	3,3
Lökositte maximum azalma (%)	20,5	25,5	4,7
Ölen buzağı sayısı	0,0	0,0	0,0

A, B: Aşılanmış gruplar, C: Kontrol grubu (Aşılanmamış)

Aşılandıktan 35 gün sonra buzağuların hepsinin kan serumunda 1: 640 ve 1: 1280 titrede sırasıyla anti-*T. annulata* şizont ve piroplasm antikorları bulunmuştur.

Aşılandıktan 35 gün sonra *T. annulata* Akdere kene stabilatı (4 kenelik) ile çelinç yapılan A, B, C, D gruplarında bulunan aşı ve E grubunda bulunan kontrol buzağularının hepsi *T. annulata* enfeksiyonuna yakalanmışlardır. Tablo 2'den anlaşılacağı gibi enfeksiyon aşı buzağularında hafif, kontrol buzağularında şiddetli seyretmiştir.

Çelinç inokülasyonu yapılan A, B, C, D gruplarında bulunan aşı buzağulardan biri hariç, diğerleri çelince direnç göstermişlerdir. B grubunda 10^5 aşı hücresiyle aşılanmış olan buzağulardan biri çelince karşı şiddetli reaksiyon göstermiş ve çelinçten 22 gün sonra ölmüştür. Çelinç yapılan aşı buzağularının vücut ısısı $40\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar çıkmış ve yaklaşık bir hafta kadar devam etmiş, preskapular lenf yumrusundan hazırlanan frotilerde birkaç şizont, kan frotilerinde birkaç piroplasm bulunmuş, lökosit sayısında azalma, hematokrit değerlerde düşme görülmüştür. 10^3 aşı hücresiyle aşılanan ve daha sonra çelinç yapılan D grubunda bulunan 2 buzağıda parazitemi ve şizont yüzdelerinin, B grubunda theileriosis'den ölen bir buzağı hariç, çelinç yapılmış diğer aşı buzağılardakinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

E grubunda bulunan kontrol buzağularında, çelinç inokülasyonu yapıldıktan sonra, şiddetli tropikal theileriosis meydana gelmiş, preskapular lenf yumrusu son derece büyümüş, lenf yumrusundan ve kandan hazırlanan frotilerde sırasıyla çok sayıda şizont ve piroplasm görülmüştür. Hematokrit değeri ve lökosit sayısında önemli derecede düşme meydana gelmiştir. Buzağuların vücut ısısı $41,6\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye çıkmıştır. Bütün buzağular hastalanmış, bir buzağı akut theileriosis'den ölmüş, diğerleri uzun bir nekahat dönemi geçirdikten sonra iyileşmişlerdir. Lenf yumrusu çelinç yapılan aşılanmış buzağularında hafif bir büyüme göstermiş, kontrol buzağularında ise aşırı derece büyümüştür. Çelinç yapılan aşı buzağularının ekserisinde az sayıda görülen lenfosit ve piroplasm'lara, kontrol buzağularında pek çok sayıda rastlanmıştır. Çelinç yapılan aşı ve kontrol buzağularının her ikisinde de ateş dönemi uzun sürmüş, lökosit sayısı ve hematokrit değerinde önemli düşme görülmüştür. B grubunda 10^5 aşı hücresi ile aşılanan ve akut theileriosis'den ölen bir buzağı hariç, 10^6 , 10^5 , 10^4 ve 10^3 aşı hücresiyle aşılanan buzağularında görülen klinik parametreler arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Diğer taraftan çelinç inokülasyonu yapıldıktan sonra aşı buzağularının *T. annulata* ile enfekte oldukları, fakat kontrol

Tablo 2. 10^6 , 10^5 , 10^4 ve 10^3 aşı hücresi dozları ile aşılanan ve kontrol buzağularında, *T. annulata* Akdere kene stabilatı (4 kenelik) ile çelinçten sonra görülen ortalama klinik parametrik değerler.

Parametrik Değerler	Buzağı Grupları				
	A	B	C	D	E
Buzağı sayısı	3	3	3	3	3
Aşı hücresi (doz)	10^6	10^5	10^4	10^3	0,0
Ateşin çıktığı gün	10,6	8,7	13,3	10,0	12,3
Ateşli gün sayısı	5,0	8,7	7,7	10,7	12,0
Maximum ateş ($^\circ\text{C}$)	40,4	40,7	40,4	40,6	41,6
Lenf yumrusunda ilk reaksiyon	5,0	5,7	5,7	5,7	5,3
Şizontun ilk görüldüğü gün	15,3	15,3	15,3	14,0	10,3
Piroplasmın ilk görüldüğü gün	17,3	16,6	16,0	16,0	14,0
Maximum şizont (%)	0,7	16,9	0,4	5,1	55,7
Maximum parazitemi (%)	0,7	27,8	2,0	9,7	66,7
Hematokritte maximum düşme (%)	34,8	51,5	33,8	30,1	58,6
Lökositte maximum azalma (%)	24,0	42,0	23,6	16,8	52,9
Ölü buzağı sayısı	0,0	1	0,0	0,0	1

A, B, C, D: Aşılanmış gruplar, E: Kontrol grubu (Aşılanmamış)

Tablo 3. 10^6 aşılı hücre ile aşılamanın ve kontrol buzağlarında *T. annulata* Ak-Sa kene stabilatları (8 kenelik) ile çelinçten sonra görülen ortalama klinik parametrik değerler.

Parametrik Değerler	Buzağı Grupları	
	A	B
Buzağı sayısı	10	5
Aşılı hücre (doz)	10^6	0,0
Ateşin çıktığı gün	5,7	7,0
Ateşli gün sayısı	14,2	9,2
Maximum ateş (°C)	41,7	41,4
Lenf yumrusunda ilk reaksiyon	5,4	5,0
Şizontun ilk görüldüğü gün	6,7	5,8
Piroplasmın ilk görüldüğü gün	9,8	10,0
Maximum şizont (%)	19,2	42,3
Maximum parazitemi (%)	30,8	73,7
Hematokritte maksimum düşme (%)	52,2	66,8
Lökositte maksimum azalma (%)	59,1	71,2
Ölen buzağı sayısı	4	5

A: Aşılama grubu, B: Kontrol grubu (Aşılama yapılmamış)

buzağlarıyla karşılaştırıldığında (E grubu buzağılar), çoğunlukla hafif klinik reaksiyon gösterdikleri ortaya konmuştur.

Üçüncü deneyde A grubunda bulunan ve 10^6 aşılı hücre dozu ile aşılamanın 10 buzağı, aşılı dönemde, aşılıya bağlantılı herhangi bir klinik reaksiyon göstermemiştir. Aşılama 35 gün sonra ve çelinç inokülasyonundan önce bu buzağılardan toplanan serumlarda *T. annulata* piroplasm antijenlerine karşı 1:160-1:5120 ve şizont antijenlerine karşı 0-1:1280 arasında değişen titlerde antikora rastlanmıştır. Aşılama 35 gün sonra herbiri 8 kenelik *T. annulata* Ak-Sa kene stabilatı ile çelinç yapılan 10 aşılı ve 5 kontrol buzağısında, çelinç sonrası görülen klinik reaksiyonlarla ilgili parametrik değerlerin ortalamaları Tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3'de görüldüğü gibi çelinç yapılan aşılı buzağının hepsi *T. annulata* enfeksiyonuna yakalanmış ve hastalanmışlardır. Bunlar vücut ısısının $41,7$ °C'ye çıkması, lenf yumrusunun büyümesi, hematokrit değerinin düşmesi ve lökosit sayısının azalması gibi önemli klinik reaksiyonlar göstermişlerdir. Ayrıca, bu buzağılarda yüksek oranda parazitemi ve oldukça fazla sayıda şizont görülmüştür. Sonunda 10 buzağıdan 4'ü akut theileriosis'den ölmüştür. Tablo'daki parametrik değerler,

10^6 aşılı hücre ile aşılı buzağılarda çelinç enfeksiyonuna karşı etkili bir korumanın meydana gelmediğini, çelinç inokülasyonuna bağlı olarak kontrol buzağılarında meydana gelen klinik reaksiyonların daha şiddetli olduğunu ve 5 buzağının tamamının akut tropikal theileriosis'den öldüğünü de göstermiştir.

Tartışma

Bir kısım araştırmacı (21,26-29) kültürlerde pasajı yapılarak atenüye edilen şizontların inoküle edildiği buzağılarda tropikal theileriosis'in klinik reaksiyonlarının görülmediği ve buna karşılık şizont ve piroplasm antikorlarının saptandığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da çeşitli dozlarda aşılama duyarlı buzağılarda klinik theileriosis görülmemiş, ancak IFA testi ile şizont ve piroplasm antikorları tespit edilmiştir.

Siğirilerin deneysel enfeksiyonunda *T. annulata*'nın gelişme döneminde görülen 3 ana safhanın (sporozoit, şizont, piroplasm) herbirinin kendilerine özgün bir bağışıklık oluşturduğu bildirilmiştir (26,30), bu parazitin piroplasm şeklinin buzağılarda, şizont şekline karşı koruma meydana getirmediği saptanmıştır (31). Şizont'un da virulansı yüksek sporozoit enfeksiyonundan buzağıları korumadığı belirtilmiş, fakat çoğu deneylerde bu tip enfeksiyonlardan kaynaklanan tropikal theileriosis'in şiddetli reaksiyonlarını ve buzağının ölümünü önlediği ileri sürülmüştür (32). Atenüye şizontlardan oluşan aşılamanın koruma gücünü ölçmek amacıyla yapılan testlerde, aşılama sonrası, kene çelincine (sporozoit) maruz kalan 22 Holstein buzağından 15'inde düşük düzeyde parazitemi ve hafif ateşin saptandığı, 7'sinde herhangi bir semptom görülmediği bildirilmiştir (33). Bu çalışmada yapılan birinci deneyde, 10^6 ve 10^7 aşılı hücreyle aşılama sonrasında, 4 kenelik *T. annulata* Sarioba kene stabilatıyla çelinç (sporozoit) maruz bırakılmış aşılı ve aşısız bütün buzağılarda enfeksiyon meydana gelmiş; şizont, piroplasm ve ateş görülmüştür. Fakat aşılı buzağılara nazaran, aşısız buzağılarda, parazitemi ve şizont yüzdeleri ile ateşin daha yüksek, klinik reaksiyonların daha şiddetli olduğu anlaşılmıştır. Aşılı buzağılar hastalanmadığı halde, kontrol buzağılarının hepsi şiddetli derecede hastalanmıştır. Bu bakımdan literatür bulgularıyla bu bulgular arasında bir benzerlik söz konusudur. Aynı şekilde ikinci deneyde 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 aşılı hücreyle aşılama sonrası, 4 kenelik *T. annulata* Akdere kene stabilatıyla çelinç yapılmış aşılı ve aşısız bütün buzağılarda

birinci deneyde olduğu gibi enfeksiyon meydana gelmiş; şizont, piroplasm ve ateş görülmüştür. Fakat aşıllara kıyasla kontrol buzağılarında ve aşılanmış B grubundaki 1 buzağıda parazitemi ve parasitosis (şizont) yüzdeleri ve ateş seviyesi çok yüksek, klinik reaksiyonlar çok şiddetli olmuş ve buzağılar hastalanmıştır. Aşılı ve kontrol buzağılarında birer tanesi ölmüştür. Görüldüğü gibi bu deneyden alınan sonuçlar da literatür bulguları ile kısmen de olsa uyusmaktadır. İlk iki deneyin A grubundakilerde olduğu gibi 10^6 aşı hücresiyle aşılanan, ancak daha sonra 8 kenelik *T. annulata* Ak-Sa stabilitesiyle çelinç (sporozoit) yapılmış olan üçüncü deneye gelince, bu deneyde aşılı ve aşısız bütün buzağılar çelinç sonrası,

enfeksiyona yakalanmıştır. Gerek aşılı buzağılarda ve gerekse kontrol buzağılarında yüksek oranda şizont ve piroplasm görülmüştür. Ateş yükselmiş, klinik reaksiyonlar şiddetli olmuş ve bütün buzağılar hastalanmış, aşılı buzağılardan 4'ü, kontrol buzağılarının ise hepsi tropikal theileriosis'den ölmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 ve 10^7 hücrelik dozlar halinde uygulanan aşının, sığırları hastalıktan koruduğu, korumada aşı dozları arasında belirgin bir farkın ortaya çıkmadığı, ancak kene çelincinin yüksek dozda olduğu olaylarda 10^6 hücrelik aşı dozunun hastalıktan korumaya yeterli olmadığı anlaşılmıştır.

Kaynaklar

- Barnett, S.F.: Theileria. In: Parasitic Protozoa IV. J.P. Kreier (Ed.): Academic Press, London, 1977; 77-113.
- Neitz, W.O.: Theileriosis, gonderioses and cytauxzoonoses. A review. Onderstepoort J. Vet. Res., 1957; 27: 275-430.
- McHardy, N.: Butalex (Buparvaquone): A new therapeutic for theileriosis in recent developments in the research and control of *Theileria annulata*. T.T. Dolan (Ed.): ILRAD, Nairobi. 1991; 133-140.
- Adler, S., Ellenbogen, V.: A note on the premunition of calves against *T. annulata*. Vet. Rec., 1934; 14: 91.
- Sergent, E., Donatien, A., Parrot, L., Lestoquard, F.: Etudes sur les piroplasmoses bovines. Inst. Pasteur d'Algérie, Algér. 1945; 243-259.
- Adler, S., Ellenbogen, V.: Observation on theileriosis in Pakistan. Arch. Inst. Pasteur Alger. 1935; 13: 451.
- Tsur, I.: Immunization against *Theileria annulata*. Refuah Vet., 1949; 5: 69.
- Gill, B.S., Bhattacharyulu, Y., Kaur, D.: Immunization against bovine tropical theileriosis (*T. annulata* infection). Res. Vet. Sci., 1976; 21: 146-150.
- Tsur, I.: Multiplication in vitro of Koch bodies of *Theileria annulata*. Refuah Vet., 1947; 4: 86.
- Tsur, I.: *Theileria annulata* et *Leishmania* en culture de tissu. 15th Int Veterinary Cong, Stockholm. 1954; 1: 26.
- Tsur, I., Tchermomoretz, I.: Multiplication in vitro of Koch bodies of *Theileria annulata*. Nature., 1945; 156: 391.
- Tsur, I., Adler, S.: Cultivation of *T. annulata* schizonts in monolayer tissue culture. Refuah Vet., 1962; 19: 224-225.
- Tsur, I., Adler, S.: The cultivation of lymphoid cells and *Theileria annulata* schizonts from infected blood. Refuah Vet., 1965; 22: 60-62.
- Pipano, E.: Experimental immunization against *Theileria annulata* with a tissue culture vaccine laboratory trials. Refuah Vet., 1966; 23: 194.
- Pipano, E.: Virulence and immunogenicity of cultured *Theileria annulata* schizonts. J. Afr. Vet. Ass., 1979; 50: 332.
- Pipano, E.: Bovine theileriosis in Israel. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 1989; 8: 79-87.
- Singh, D.K.: Recent developments in research and control of *Theileria annulata* in India. In: Dolan T.T. Ed. Recent Developments in the Research and Control of *Theileria annulata* ILRAD, Nairobi, Kenya. 1990; 11-13.
- Zhang, Z.H.: *Theileria annulata* in control in China. In: Recent Developments in the Research and Control of *T. annulata*. T.T.Dolan (Ed.): Proceedings of Workshop Held at ILRAD, 17-18 Sept, Nairobi, Kenya. 1990; 3-9.
- Zablosky, V.T.: Specific prevention of bovine theileriosis in the USSR. In: T.T.Dolan (Ed.): Recent Development in the Research and Control of *T. annulata*. Proceedings of Workshop Held at ILRAD, 17-18 Sept, Nairobi, Kenya. 1990; 29-31.
- Pipano, E., Klopfer, U., Cohen, R.: Inoculation of cattle with bovine lymphoid cell lines infected with *Theileria annulata*. Res. Vet. Sci., 1973; 15: 388.
- Pipano, E.: Basic principles of *Theileria annulata* control. In: J.B. Henson and M. Campbell (Eds.): Theileriosis. Report of Workshop Held in Nairobi, Kenya. 7-9 December. 1977; 55-65.
- Onar, E.: Türkiye'de Tropical Theileriosis'e (*Theileria annulata*) karşı aşı hazırlama ve uygulama çalışmaları. In: K. Demirözü, Y. Uysal, Ü.G. Nadas, J. Türkaslan, C. Altınel, H. Alp (Eds.): Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu. Pendik Hayv. Hast. Merk. Araş. Enst. Yay., 10. 1989; 47-52.

23. Sayin, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H., Ünsüren, H.: Ankara yöresinden elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar. 1. Duyarlı danalarda enfekte kanla oluşturulan tropikal theileriosis'den ileri gelen morbidite ve mortalite olayları. T. Parasitol. Derg., 1999; 23: 178-184.
24. Çakmak, A.: Untersuchungen zur inzidenz von Hamoparasiten in einer Rinderherde in der Provinz Ankara. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss, 1987; 133p.
25. Sayin, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H., Brown, C.G.D., Melrose, M.T.R.: Ankara yöresinden elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar. 4. Vektör Kenelerin *Theileria annulata* ile Deneysel Enfeksiyonları. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 1999; 46:127-135.
26. Brown, C.G.D. Theileridae. In: In vitro Methods for Parasite Cultivation. A.E.R. Taylor and J.R. Baker (Eds.): Academic Press, London. 1987; 230-253.
27. Pipano, E.: Sur quelques caractéristiques pathogéniques et immunologiques des schizontes de *Theileria annulata*. Proc 18th World Vet Cong, Paris, Vol II, Papers and Short Communications, 1967; 749.
28. Pipano, E., Chana, M.: Measurement of the immune response to vaccine from tissue culture of *Theileria annulata* by the fluorescent antibody test. J. Protozool. Suppl., 1968; 15: 45.
29. Pipano, E., Irail, V.: Absence of erythrocyte form of *Theileria annulata* in calves inoculated with schizonts from a virulent field strain grown in tissue culture. J. Protozool. Suppl., 1971; 19: 54.
30. Pipano, E.: Schizonts and tick stages in immunization against *Theileria annulata* infection. In: Advances in the Control of Theileriosis. A.D. Irvin, M.P. Cuningham, A.S. Young (Eds): Martinus Nijhoff, The Hague, 1981; 242-252.
31. Pipano, E.: Development of schizonts in calves inoculated with red blood cell forms of *Theileria annulata*. J. Protozool. Suppl., 1972; 19: 54.
32. Pipano, E.: Immunological aspects of *Theileria annulata* infection. Bull. Off. Inst. Epiz., 1974; 31: 139-159.
33. Pipano, E.: Control of bovine theileriosis and anaplasmosis in Israel. Bull. Off. Inst. Epiz., 1976; 86: 55-59.