

PAPER DETAILS

TITLE: SIGIRLARDA DOĞAL THEILERIA ANNULATA ENFEKSİYONLARINDA MONOSİT NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ

AUTHORS: Berrin AYERDEM, Abdullah İNCİ, Fatma UYANIK, Anil İÇİ, Ayşe ÇAKMAK, Alparslan YILDIRIM

PAGES: 116-122

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/692407>

**SIĞIRLARDA DOĞAL THEILERIA ANNULATA ENFEKSİYONLARINDA
MONOSİT NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ***
Monocyte Nitric Oxide Levels in Natural Theileria annulata Infections in Cattle

**Berrin AYERDEM¹, Abdullah İNCİ², Fatma UYANIK³, Anıl İÇA⁴,
Ayşe ÇAKMAK⁵, Alparslan YILDIRIM⁴**

Özet : Bu çalışma, Kayseri'nin tropikal theileriosis yönünden enzootik stabiliteye sahip Yeşilhisar ve İncesu yörelerinde Theileria annulata (T.annulata) ile doğal enfekte siğirlerde, enfeksiyon ile monosit nitrik oksit (NO) düzeyleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılmış olup bu konuda Türkiye'de yapılan ilk çalışmadır. Theileriosis sezonunda, theileriosis şüpheli siğirlerden kan örnekleri alınmış ve kene taşıdığı belirlenen siğirler üzerindeki keneler toplanmıştır. Negatif kontrol amacıyla Erciyes Üniversitesi Çiftliğindeki sağlıklı siğirlerden kan alınmıştır. T.annulata enfeksiyonu mikroskopik bakı (MB), İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ve moleküler metotlarla [Polymerase Chain Reaction (PCR), Reverse Line Blotting (RLB)] araştırılmıştır. Toplanan kenelerin türleri teşhis edilmiş ve T.annulata enfeksiyonu yönünden incelenmişlerdir. Kan örneklerinden lökositler izole edilmiş ve NO düzeyinin göstergesi olan nitrit konsantrasyonu kolorimetrik olarak belirlenmiştir. T.annulata prevalansı, mikroskopik bakı ile %53,33, IFAT ile %60,00, RLB ile %50,00 olarak belirlenmiş, belirlenen prevalans değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli fark olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır. Hayvanların % 31,6'sında ergin kene bulunmuştur. Toplanan keneler, Hyalomma anatolicum anatolicum, H.a.excavatum, H.marginatum marginatum ve H.detrutum detrutum olarak teşhis edilmiş ve bunlardan sadece H.a.anatolicum kenelerinde %20 oranında T.annulata enfeksiyonu saptanmıştır. Nitrik oksit düzeyleri değerlendirildiğinde; akut tropikal theileriosis'li ve agoni halindeki hayvanlarda subklinik ve sağlıklı hayvanlara oranla istatistiksel önemde yüksek ($p<0.001$) bulunmuştur. Hematokrit düzeyi (PCV), hastalık saptanamamış, subklinik enfekte, akut hasta, agoni halindeki hayvanlarda ve kontrol grubu siğirlerde değerlendirildiğinde akut tropikal theileriosis'li ve agoni halindeki hayvanlarda subklinik ve sağlıklı hayvanlara oranla düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Akut tropikal theileriosis'li ve agoni halindeki hayvanların PCV seviyeleri arasındaki farklılığın da istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Çalışma sonunda siğirlerin doğal T.annulata enfeksiyonlarında monositlerin NO düzeyinin arttığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Monosit, nitrik oksit, siğır, Theileria annulata

Summary : This study was performed to determine the monocyte nitric oxide (NO) levels in naturally infected cattle with Theileria annulata (T.annulata) in Yeşilhisar and İncesu districts of Kayseri where the disease is enzootic. This is the first field study investigate the NO levels in monocytes of cattle naturally infected with T. annulata in Turkey. Blood samples and ticks were collected from the animals which were suspected of theileriosis. Blood samples were also collected from the cattle on Erciyes University Farm as negative control. Theileria annulata infection was determined by microscopical examination (ME), Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT) and molecular (PCR, RLB) examinations. Ticks collected from the animals were identified and examined for the T. annulata infection. Leukocytes were isolated by buffy-coat method and nitrite levels as indicator of NO were determined with a colorimetric method using Griess reagent. The prevalence of T. annulata was 53.33% by ME, 60.00% by IFAT and 50.00% by RLB, and no statistically significant difference was found among these methods ($p>0.05$). Adult ticks were observed in 31.6% of the animals included in the study, and they were identified as Hyalomma anatolicum anatolicum, H. m. marginatum, H. d. detrutum, H. a. excavatum. Only 20% of H. a. anatolicum were found to be naturally infected with T. annulata. The NO levels in animals with acutely and severely infected were significantly higher ($p<0.001$) than the subclinically infected and control animals. When packet cell volume (PCV) levels were determined in uninfected, subclinically infected, acutely infected, severely infected (agony) and control animals, The PCV in acutely and severely infected animals were significantly lower ($p<0.001$) than the subclinically infected and control animals. Furthermore, with respect to PCV, the difference between acutely and severely infected animals was also significant ($p<0.001$). The results of this study to investigate that infected macrophages with T. annulata result in the induction of NO production compared to uninfected cells.

Key words: Cattle, nitric oxide, monocyte, theileria annulata

¹ Bilim Uz.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Vet.Parazit. AD, Kayseri

² Prof.Dr.Erc.Ün.Vet Fak.Parazitoloji AD, Kayseri

³ Doç.Dr.Erc.Ün.Vet Fak.Biyokimya AD, Kayseri

⁴ Yrd.Dç.Dr.Erc.Ün.Vet Fak.Parazitoloji AD, Kayseri

⁵ Prof.Dr.Ankara.Ün.Vet Fak.Parazitoloji AD, Ankara

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY.03.19 nolu proje ile desteklenmiş olup, 14.Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Theileria annulata'nın yol açtığı tropikal theileriosis, Avrupa'nın güneyinde, Kuzey Afrika, Ortadoğu, Orta Asya ve Hindistan'da, Rusya'nın güneyinde sığırlarda yaygın olarak görülür (1-3). Türkiye'nin bütün coğrafik bölgelerinde en önemli sığır hastalıklarından biri olarak bildirilen (4-8) hastalık, Kayseri yöresinde de çok sık görülmektedir (9,10). Hastalık etkeni *T. annulata*, *Hyalomma* soyuna bağlı kene türleri ile nakledilir (11). Türkiye'de yaygın olan kene türlerinden *H. a. anatolicum* ve *H.d. detritum* hayvan meskenlerine yerleşerek, ahırda tutulan buzağların erken enfeksiyonuna sebep olurlar. Orta Anadolu'da *T. annulata*'yı saha şartlarında, *H. a. anatolicum* *H. a. excavatum*, *H.d. detritum* ve *H. m. marginatum* kenelerinin taşıdığı bildirilmiştir (12).

Theileria annulata endemik bölgelerde, duyarlı sığırların bağışık hale getirilmesi çok önemlidir. *Theileria annulata*'ya karşı koruyucu immunitenin, doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık arasındaki işbirliğine bağlı olduğu gösterilmiştir (3,13-15). Doğal bağışıklıkta makrofajlar, sporozoit enfeksiyonu veya sporozoit verilerek oluşturulan bağışıklıktan sonra devamlı olarak anti-makroşizont aktivitesi gösterirler (16-19). Bağışık sığırlarda, asıl etkili olan hücrelerin, nitrik oksit (NO) üreten sitostatik-sitotoksik makrofajlar olduğu; NO sentezinin anti-paraziter etki meydana getirdiği ortaya konmuştur (20,21). Sığırlardan primer ve deneysel *T. annulata* enfeksiyonları sırasında alınan makrofajların TNF- α ve NO ürettikleri saptanmıştır. NO'nun, in vitro olarak, sporozoitlerin sığır hücrelerine invazyonunu ve trofozoitlerle enfekte hücrelerin makroşizontlarla enfekte hücre hatları haline dönüşmesini ve bu hatların çoğalmasını engellediği; hücreler içerisindeki makroşizontları yok ettiği ve konak hücrelerine apoptotik bir şekil kazandırdığı bildirilmiştir (21). Ancak, deneysel enfeksiyonlar ve in vitro çalışmalar dışında sığırlarda doğal theileriosis olgularında NO seviyesinin tespiti-ne dair herhangi bir literatür bilgisine rastlanılamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, Kayseri'nin tropikal theileriosis bakımından enzootik stabiliteye sahip Yeşilhisar ve İncesu yörelerinde *T. annulata* ile doğal enfekte sığırlarda, hücresel savunma mekanizmalarının bir ürünü olarak ortaya çıkan NO düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın hayvan materyalini, Kayseri'nin *T. annulata* yönünden enzootik stabiliteye sahip, Yeşilhisar ve İncesu ilçelerine bağlı köylerde, bir theileriosis döneminde rastgele seçilen 107'si theileriosis şüpheli (38'i akut hasta) ve 13'ü Erciyes Üniversitesi Çiftliğinde (kontrol grubu) olmak üzere toplam 120 baş sığır oluşturmuştur. Araştırmaya dahil sığırlar negatif (47 baş), subklinik (22 baş), akut hasta (24 baş), ölmek üzere olanlar (agoni) (14 baş) ve kontrol (13 baş) olarak gruplandırılmışlardır. Theileriosis döneminde her bir sığırın vena jugularis'inden antikoagülanlı [heparin monosit izolasyonu için, EDTA reverse line blotting (RLB) için] ve antikoagülanlı, steril vakumlu tüplere 10'ar ml kan örneği alınmıştır. Alınan kan örnekleri, perifer kan monosit (PBM) izolasyonu, indirekt floresan antikor testi (IFAT) ve RLB için kullanılmıştır. Eş zamanlı olarak akut theileriosis'li sığırların perifer kanından ve asimetrik büyümenin saptandığı bölgesel lenf yumrularından alınan biyopsi materyalinden yayma preparat hazırlanmış ayrıca hayvanlar üzerindeki mevcut keneler toplanmıştır.

Serolojik yoklamada serum örneklerinde *T. annulata*'ya karşı oluşan spesifik antikorlarını tespit edilebilmesi için, antijen olarak *T. annulata*'nın hem şizont hem de piroplasm gelişme formlarının kullanıldığı standart indirekt floresan antikor testi (IFAT) uygulanmıştır. Enfekte sığırlarda *T. annulata*'nın moleküler teşhisi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve RLB yöntemleri ile yapılmıştır (21,22).

Frotilerin mikroskopik muayenesi için şüpheli sığırların kuyruk ucundan hazırlanan sürme kan preparatları ve lenf yumrusu biyopsi materyalinden hazırlanan sürme frotiler, Giemsa boyama yöntemi ile boyanmışlar ve *T. annulata*'nın gelişme formları yönünden mikroskop altında immersiyon objektifi ile incelenmişlerdir.

Perifer kan monosit (PBM) izolasyonu için; sığırlardan antikoagülanlı, steril 10'ar ml hacimli vakumlu tüplere alınmış kanlar Ficoll-Paque (Pharmacia, Sweeden) ile muamele edilerek (altta 8 ml Ficoll-Paque üstte 10 ml heparinli kan birbiri-

ne karıştırılmamış şekilde) sırasıyla 15 °C’de 2800 rpm’de 35 dakika, 15 °C’de 1500 rpm’de 10 dakika ve 15 °C’de 1500 rpm’de 5 dakika olmak üzere sentrifüj edilmiş ve buffy-coat izolasyonu sağlanmıştır (20).

Nitrit tayini için; buffy-coat izolasyon tekniğine göre elde edilen monositlerin Griess reaktifi ile inkubasyonunu takiben NO’nun stabil metaboliti ve indikatörü olan nitritin fotometrik yöntemle 540 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. NaNO₂ ile hazırlanan standard çözelti ile elde edilen eğriye göre µmol/L cinsinden nitrit düzeyleri belirlenmiş ve dolaylı olarak NO düzeyi saptanmıştır (21).

Hayvanların üzerinden toplanan ergin kenelerin teşhisi, ilgili teşhis anahtarına göre yapılmıştır (24). Kenelerde *T. annulata* enfeksiyonu, metil green pyronin yöntemi ile araştırılmıştır (25).

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 13.0 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. MB, IFAT ve RLB sonuçlarının istatistiksel analizinde McNemar testi kullanılmıştır. Grupların NO ve hematokrit (PCV) düzeyleri arasındaki fark Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Gruplar arasındaki fark, önemli bulunduğu

Duncan’s Multiple Range Test uygulanmıştır. Değerler ortalama ve ortalamanın standard hatası olarak verilmiştir.

BULGULAR

Theileria annulata yönünden incelenen sığırların mikroskopik muayenesinde saptanan parazitemi, IFAT ile saptanan seropozitiflik ve spesifik parazit DNA’sının tespitine dayalı RLB sonuçları Tablo I’de verilmiştir.

Kene varlığı yönünden kontrolü yapılan 120 sığırın 38 (%31,6)’inde 61’i erkek, 36’sı dişi toplam 97 ergin kene bulunmuştur. Ergin keneler; *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *H. a. excavatum*, *H. d. detritum* ve *H. m. marginatum* olarak teşhis edilmişlerdir. Bu türlerden sadece *H. a. anatolicum*’da %20 oranında *T. annulata* enfeksiyonu saptanmıştır.

Theileria annulata endemik yörede sağlıklı, subklinik ve akut tropikal theileriosis’li sığırlarda saptanan monosit nitrit düzeyleri ve PCV değerleri Tablo II’de verilmiştir.

Tablo I. Mikroskopik bakı (MB), serolojik yoklama (IFAT) ve RLB sonuçları ile bunların istatistiksel analizleri

Yöntem	Negatif		Pozitif		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
RLB	60	50.00	60	50.00	120	100.00
IFAT	48	40.00	72	60.00	120	100.00
MB*	56	46.66	64	53.33	120	100.00

RLB ile IFAT karşılaştırıldığında $X^2 = 2.42$; $P = 0.11$

RLB ile MB karşılaştırıldığında $X^2 = 0.26$; $P = 0.60$

IFAT ile MB karşılaştırıldığında $X^2 = 1.09$; $P = 0.29$

*:Mikroskopik bakı

Tablo II. Çalışmaya alınan sığırlarda ölçülen monosit nitrit düzeyleri ve (PCV) değerleri

Grup (n)	Nitrit düzeyleri (µM/L)					PCV (%)				
	X±Sx	Min.	Max.	F	P	X±Sx	Min.	Max.	F	P
I (47)	73,50±64,97 ^b	13,00	270,00	36,125	<0,001	32,76±4,49 ^c	23,00	40,00	75,380	<0,001
II (22)	65,74±65,78 ^b	14,00	235,00			33,32±2,58 ^c	29,00	39,00		
III (24)	1087,20±1481,10 ^a	0,10	7800,00			25,07±4,91 ^a	19,00	34,00		
IV (14)	1771,74±1868,36 ^a	0,10	6300,00			13,71±4,43 ^b	5,00	22,00		
V (13)	41,91±30,77 ^b	6,85	97,00			34,31±3,01 ^c	29,00	39,00		

I: Negatif, II: Subklinik, III: Akut Hasta, IV: Agoni, V: Kontrol

^{a, b, c}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir.

TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları, Türkiye'nin çeşitli bölgeleri (4-8) ve Kayseri yöresi (9,10,26) için rapor edildiği gibi, Yeşilhisar ve İncesu yörelerinin de tropikal theileriosis bakımından enzootik stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Daha önce Türkiye (5) ve Kayseri yöresi (9) için bildirilen *T. annulata*'nın vektörlerine bu çalışmada da tesadüf edilmiştir. Bu çalışmada, *H. a.anatolicum* kenesinde saptanan *T. annulata* enfeksiyonu da daha önce bildirilenlerle paralellik göstermiştir.

Kenelerle doğal şekilde bulaşmayı takiben *T. annulata* enfeksiyonundan kurtulan hayvanlar, parazitin reenfeksiyonuna karşı bağışıklık kazanmaktadır (13-15). Sığırlarda *T. annulata* enfeksiyonunda; sporozoit, trofozoit, makroşizont ve merozoit olmak üzere parazitin bütün formlarına karşı immün yanıt oluşur. Spesifik olarak şekillenmiş antikorlar sporozoitleri nötralize eder veya fagosite edilmelerini artırır. Bununla beraber tropikal theileriosis'e karşı korumada hücrel bağışıklık çok daha önemlidir (13-15). Bağışıklıkta asıl etkili olan hücrelerin NO üreten sitostatik, sitotoksik makrofajlar olduğu, hastalığın üstesinden gelebilmenin, makrofaj ve salgılarının etkilerine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (16-19). Nitekim sığırlarda deneysel *T. annulata* enfeksiyonu sırasında, makrofajların TNF-α ve NO ürettikleri; bu iki faktörün üretiminin kültürdeki hücrelerin INF-γ'ya maruz kalmasıyla arttığı (20); *in vitro* olarak, IFN-γ, IFN-α ve IL-1, IL-2 gibi

sitokinlerin, trophozoitlerle enfekte hücrelerin makroşizontla enfekte hücre hatlarına dönüşmelerini engellediği ve şizontla enfekte hücrelerin çoğalmalarına ise etkisiz kaldığı ortaya konmuştur (21).

Diğer taraftan *T. annulata* makroşizontlarıyla enfekte hücreler, doğal öldürücü (NK) hücre aktivitesinin bir stimülatörü olan IFN-α'yı üretirler. Bu şekilde üretilen IFN-α ve çoğalmakta olan parazitlerle situmule olan NK hücreler ile T hepler/yardımcı-1 hücreleri, CD4⁺ ve CD8⁺ gibi reseptör taşıyan T hücrelerini, IFN-γ'yı üretirler. Bu şekilde üretilen IFN-γ ile aktive olan makrofajlar da TNF-α'yı ve NO'ü üretirler. NO, mikroorganizmalar üzerinde sitolitik ve sitostatik etki gösterebilmektedir. Nitekim *in vitro* olarak, NO'nun *T. annulata* sporozoitlerinin sığır hücrelerine invazyonunu engellediği, trofozoitlerle enfekte hücrelerin, makroşizontlarla enfekte hücre hatları haline dönüşmesine izin vermediği, makroşizontlarla enfekte hücre hatlarının da çoğalmasını inhibe ettiği ve hücreler içerisindeki makroşizontları da yok ettiği ortaya konmuştur (20). Bugüne kadar doğal *T. annulata* enfeksiyonlarında NO seviyesi rapor edilmemiştir.

Bu çalışmada ölçülen monosit NO düzeyleri; akut tropikal theileriosis'li ve bu hastalıktan ölmek üzere olan sığırlarda, subklinik ve sağlıklı hayvanlara oranla yüksek bulunmuş ve bu farklılığın istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmayla ilk defa doğal akut tropikal theileriosis olgularında monosit NO seviyesi ölçülmüş olup elde edilen bulgular literatür bilgileri (13-19) ışığında değerlendirildiğinde; doğal akut tropikal theileriosis olgularında hücrel savunma mekanizmalarının aktive edildiği ve *T. annulata* tarafından uyarılmış monositler makrofajlar tarafından çok yüksek oranlarda NO üretildiği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Uilenberg G. *Theilerial species of domestic livestock. Advances in the Control of Theileriosis*, In: Irvin AD, Cunningham MP and Young AS, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, London 1981, pp 4-37.
2. Norval RAI, Perry BD, Young AS. *The Epidemiology Theileriosis in Africa*. Academic Press, London 1992, pp 379- 403.
3. Gharbi M, Sassi L, Dorchie P, et al. *Infection of calves with Theileria annulata in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination*. *Vet Parasitol* 2006, 137: 231-241.
4. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, et al. *Tick borne diseases in Turkey*. *Trop Anim Health Prod* 1997, 29: 53.
5. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, et al. *Studies on the Epidemiology of Tropical Theileriosis (Theileria annulata Infection) in Cattle in Central Anatolia, Turkey*. *Trop Anim Health Prod* 2003, 35: 521- 539.
6. Dumanlı N, Aktas M, Cetinkaya B, et al. *Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey*. *Vet Parasitol* 2005, 133: 369-370.
7. Vatansever Z, Iça A, Deniz A, et al. *Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılımının Reverse Line Blotting (RLB) ve Indirekt Floresan Antikor testi (IFAT) ile saptanması. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Konya 8-12 Eylül 2003, s 194.*
8. Aktas M, Altay K, Dumanlı N. *A molecular survey of bovine Theileria parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey*. *Vet Parasitol* 2006, 138: 179- 185.
9. İnci A, Çakmak A, Çam Y, ve ark. *Kayseri yöresinde tropical theileriosis'e bağlı ekonomik kayıplar*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2002, 26: 156-160.
10. İnci A, Atasever A, Çam Y, ve ark. *Kayseri Yöresinde Sığırlarda Tropikal Theiliosis'in Epidemiyolojisi Üzerine Araştırmalar*. DPT Projesi Final Raporu 2003, s 347.
11. Robinson PM. *Theileriosis annulata and its transmission a review*. *Trop Anim Health Prod* 1982, 14: 3-12.
12. Sayın F, Karaer Z, Dinçer Ş, et al. *A comparison of susceptibilities to infection of four species of Hyalomma ticks with Theileria annulata*. *Vet Parasitol* 2003, 113: 115- 121.
13. Brown CGD. *Control of tropical theileriosis (Theileria annulata infection of cattle)*. *Parassitologia* 1990, 32: 23- 31.
14. Ahmed, JS, Mehlhorn H. *Review: the cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis*. *Parasitol Res* 1999, 85: 539-549.
15. Pipano E, Shkap V. *Vaccination against tropical theileriosis*. *Ann NY Acad Sci* 2000, 916: 484- 500.
16. Preston PM, Jackson LA, Sutherland IA, et al. *Theileria annulata: The expression of two novel macroschizont antigens on the surface of infected mononuclear cells differs during in vitro attenuation of a virulent cell line*. *Exp Parasitol* 1998, 89: 228- 240.
17. Preston PM, Hall FR, Glass EJ, et al. *Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against Theileria annulata*. *Parasitology Today* 1999, 15: 267-274.

18. Preston PM, Jackson LA, Sutherland IA, et al. *Theileria annulata*: Attenuation of a schizont-infected cell line by prolonged in vitro culture is not caused by the preferential growth of particular host cell types. *Exp Parasitol* 2001, 98: 188- 205.
19. Campbell JDM, Spooner RL. Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of immune responses to *Theileria annulata*. *Parasitology Today* 1999, 15: 10-16.
20. Visser AE, Abraham A, Sakyi LJ, et al. Nitric Oxide inhibits establishment of macroschizont-infected cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine Tropical Theileriosis or East Coast Fever. *Parasite Immunol* 1995, 17: 91-102.
21. Richardson JO, Forsyth LMG, Brown CGD, et al. Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. *Vet Res Commun* 1998, 22: 31- 45.
22. Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, et al. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 1782– 1789.
23. Georges K, Loria GR, Riili S, et al. 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.
24. Estrade-Pena A, Bouttaur A, Camicas JL, et al. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. A guide to identification of species, 2004, p 131.
25. Walker AR, McKellar SB, Bell LJ, et al. Rapid quantitative assessment of *Theileria annulata*. *Trop Anim Health Prod* 1979, 11: 21- 26.
26. İnci A, Çakmak A, İça A, ve ark. Kayseri Yöresinde Tropikal Theileriosis'in İstatiksel Analizi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2002, 26: 38- 41.

Sığırlarda doğal Theileria annulata enfeksiyonlarında monosit nitrik oksit düzeyleri