

## Tropikal Tayleriyozisli Sığırlarda Hemoliz Üzerine Araştırmalar <sup>[1]</sup>

Onur BAŞBUĞ \* Yusuf GÜL \*\* 

[1] Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen (FÜBAP-Proje No: 1601) aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir

\* İlçe Tarım Müdürlüğü, TR-24700 Iliç/Erzincan - TÜRKİYE

\*\* Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, TR-23119 Elazığ - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-3664

### Summary

Bu çalışmada tropikal tayleriyozisli sığırlarda aneminin oluşumunda etkili olan hemolizin tipinin ve şiddetinin belirlenmesi amaçlandı. Araştırmada, 10 adet sağlıklı ve 30 adet *Theileria annulata* ile enfekte olduğu belirlenen toplam 40 adet kültür ırkı ve bunların melezleri olan sığırlar kullanıldı. Hasta hayvanlar aneminin derecesine göre hafif, orta ve şiddetli derecede anemili olmak üzere 3 eşit gruba ayrıldı. Eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değer, total lökosit ve retikülosit sayıları belirlendi. Serumda total bilirubin, indirekt bilirubin düzeyleri ile AST ve LDH aktiviteleri ölçüldü. Serum amiloid A ve haptoglobulin analizleri de yapıldı. İdrarın fiziki muayenesi ve kantitatif analizleri belirlendi. Ayrıca idrar sedimentinin bir karanlık saha mikroskobu ile leptospira yönünden muayenesi yapıldı. Çalışma hayvanlarının klinik (vücut sıcaklığı, kalp ve solunum frekansı ile rumen hareketleri), hematolojik (eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değer ve total lökosit sayısı) ve biyokimyasal (total ve indirekt bilirubin, LDH ve AST ile serum amiloid A ve haptoglobulin düzeyleri) parametreleri açısından gruplar arası önemli farklılıklar belirlendi. Retikülosit sayılarının orta ve şiddetli derecede anemi gruplarında istatistiksel açıdan önemli olmasa da arttığı gözlemlendi. Hastaların hiç birinde hemoglobinüri görülmedi. Sonuç olarak, *T. annulata*'nın neden olduğu tropikal tayleriyoziste oluşan aneminin patogenezinde rolü olan hemolizin ekstravasküler tipte olduğu ve hastalığın ilerlemesiyle şiddetinin arttığı kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Sığır, *Theileria annulata*, Tropikal tayleriyozis, Hemoliz, Anemi

## Investigations on Hemolysis in Cows with Tropical Theileriosis

### Summary

In this study, it was aimed to detect the severity and the type of the haemolysis that effect the anemia formation in the cows with tropical theileriosis. Totally 40 cultured strains and their crossbreeds as 10 healthy cattles and 30 cattles infected with *Theileria annulata* were used in this study. Patient cattles were separated into 3 equal groups according to the anemia level as mild, moderate and severe. Erythrocyte number, hemoglobin concentration, hematocrit value, total leukocyte numbers and reticulocyte counting were detected. Total bilirubine, indirect bilirubine, AST and LDH levels were measured in sera. Serum amyloid A and haptoglobin analysis were done. The physical and quantitatively examining of the urina were done. Urine sediment was also examined with a dark field microscope in tems of leptospria. The significant differences among the groups in terms of clinical (body temperature, heart and respiration frequencies, rumen movements), hematological (erythrocyte number, hemoglobin concentration, hematocrit value and total leukocyte numbers) and biochemical (total bilirubine, indirect bilirubine, AST and LDH, SAA and haptoglobin levels) parameters of the working animals were determined. Although it is not statistically significant, the reticulocyte numbers increased at the moderate and severe anemia groups. Hemoglobinuria was not seen in any of the diseased animals. As a result, hemolysis, which plays a role in the patogenesis of the anemia with the tropical theileriosis caused by *T. annulata*, is extravascular type and its severity increases as well as the disease progress.

**Keywords:** Cattle, *Theileria annulata*, Tropical theileriosis, Hemolysis, Anemia

## GİRİŞ

*Theileria annulata* (Dschunkowsky ve Luhs, 1904)'nın neden olduğu tropikal tayleriyozis kültür ırkı sığırlarda başta anemi olmak üzere önemli hematolojik değişikliklere

neden olmaktadır <sup>1-6</sup>. Ancak *T. annulata* enfeksiyonlarında aneminin patogenezi halen tartışmalıdır <sup>1,6</sup>. Aneminin oluşumu konusunda çok değişik mekanizmalar ileri sürülme-



İletişim (Correspondence)



+90 424 2370000



ygul@firat.edu.tr

sine rağmen, tam mekanizması henüz kesin olarak bilinmemektedir<sup>6-8</sup>.

Aneminin meydana gelmesinde intra-eritrositik piroplazmların<sup>7,9</sup>, otoimmün reaksiyonların<sup>4</sup>, parazitli eritrositlerin retikuloendotelial sistem (RES)'de tahribatının<sup>8,9</sup>, eritrositlerdeki oksidatif zararın<sup>6,7</sup> veya eritrositlerdeki kırılabilirliğin artışıının<sup>6-8</sup> etkili olduğu, ayrıca aneminin parazitine toksine bağlı olarak ortaya çıkan hemopoetik sistem blokajından ileri geldiği<sup>5</sup>, parazitin şizogonik çoğalması sırasında oluşan toksine bağlı olarak kapiller permeabiliteinin artması sonucunda oluştuğu<sup>10,11</sup> veya eritrositlerin diskler halinde kümeleşerek kılcal damarlar içinde yığılması sonucu<sup>12</sup> şekillendiği belirtilmiştir. Ayrıca eritrositleri işgal eden parazitlerin eritrositlerin yaşam süresini kısalttığı ve enfekte hücrelerin fagosit hücreler tarafından kandan uzaklaştırıldığını, buna bağlı olarak hastalıkta hemolitik aneminin geliştiği vurgulanmıştır<sup>9,12,13</sup>.

Hemolitik hastalıkların yaygın sınıflandırılması, hemolizin şekillendiği bölgeye göre intravasküler (dolaşımda) veya ekstravasküler (RES'de, özellikle kemik iliği, dalak ve karaciğerde) olarak iki biçimde yapılır<sup>14-16</sup>. İntravasküler hemoliz ekstravasküler hemolizden daha akut ve şiddetli gelişir, ayrıca hemoglobinemi ve hemoglobüri ile karakterizedir<sup>14-17</sup>. Ekstravasküler hemolizde plazma hemoglobin düzeyinde belirgin artış olmadığı için<sup>17</sup> hemoglobinemi ya da hemoglobüri beklenmez<sup>15,17,18</sup>.

Kaynaklarda<sup>14,18</sup> hemolitik aneminin tanısını koyabilecek tek bir testin olmadığı, bu nedenle birçok testin yapılması gerektiği ifade edilmektedir.

Hemolitik anemilerin tanısında kullanılan serum testlerinden biri olan haptoglobulin gibi taşıyıcı proteinlerin miktarının belirlenmesi önemlidir<sup>18,19</sup>. Özellikle intravasküler hemolize neden olan hastalıklarda hemolizin şiddetine göre haptoglobulin miktarı azalır veya tayin edilemeyecek derecede düşer<sup>16,18,19</sup>. Ancak, haptoglobulin bir akut faz proteini olduğu için yangı, enfeksiyon ve doku hasarı olaylarında miktarı artar<sup>16</sup>. Bu nedenle, bu durumlardan birisi ile birlikte hemoliz görüldüğünde haptoglobulin düzeyi normal bulunabilir<sup>19</sup>. Hemolitik anemilerde, haptoglobulin değerlendirilmesinde bu iki noktaya dikkat edilmelidir.

Hemoliz olaylarında eritrositler içinde bol bulunan bir enzim olan laktatdehidrojenaz (LDH) düzeyleri artmaktadır (hemoliz sonrasında plazmaya eritrosit enzimlerinin salınması nedeniyle). Özellikle intravasküler hemolizde LDH düzeyindeki artış, ekstravasküler hemolizden daha fazladır<sup>18</sup>.

Hemolizin tanısında indirekt bilirubin artışından da yararlanılır. Hem'in oksidatif katabolizması sırasında oluşan konjüge olmamış (indirekt) bilirubin, plazma yoluyla taşındığı karaciğerde konjüge (direkt) bilirubine dönüşür. Hemolizli hastalarda indirekt bilirubin artışı, karaciğerin konjüge etme kapasitesinin üstündeki hem katabolizmasını göstermesi bakımından değerli bir bulgudur<sup>20</sup>.

Önemli olan bir diğer noktada, tüm hemolitik anemilerde retikülositoz olayıdır ve kemik iliğinin hemolizin neden olduğu anemiye verdiği cevabı göstermektedir<sup>16</sup>. Özellikle rejeneratif cevabın oluşması için 2-3 günlük bir dönem gerekli olduğundan, erken dönemlerde bu rejeneratif cevap şekillenmeyebilir<sup>17</sup>. Retikülosit sayımı, kemik iliğinin eritrosit yapımını değerlendirmede rutin olarak kullanılan çok basit bir ölçüm metodudur<sup>16</sup>.

Bu çalışmada, tropikal tayleriyozisli sığırlarda aneminin oluşumunda etkili olan hemolizin tipinin ve şiddetinin belirlenmesi amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışma, 2008-2009 yıllarında Elazığ ve çevresinde Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğine getirilen veya bizzat mahallinde muayene ve tedavi edilen, doğal olarak *T. annulata* ile enfekte 30 adet hasta sığır (deney grubu) ile yine aynı bölgeden 10 adet sağlıklı sığır (kontrol grubu) olmak üzere toplam 40 hayvan üzerinde yürütülmüştür.

Deney grubundaki sığırlar Rosenberger (21)'e göre; eritrosit sayısı 5 milyon/mm<sup>3</sup>'ün altında olanlar hafif, 2.5-3.5 milyon/mm<sup>3</sup> arasında olanlar orta, 2.5 milyon/mm<sup>3</sup>'ün altındakiler ise şiddetli derecede anemili hastalar olarak değerlendirilmiştir. Buna göre sağlıklı ve hasta sığırlar aşağıdaki şekilde 4 gruba ayrılmıştır:

- Grup I:** Sağlıklı hayvanlar (Kontrol grubu, n=10),
- Grup II:** Hafif derecede anemili hastalar (n=10),
- Grup III:** Orta derecede anemili hastalar (n=10),
- Grup IV:** Şiddetli derecede anemili hastalar (n=10)

Araştırma hayvanları farklı ırk (5 Holstein, 16 Montafon, 11 Simental ve 8 bunların yerli melezleri), yaş (15 gün-10 yaş) ve cinsiyetteydi (25 dişi, 15 erkek).

Araştırmada kullanılan tüm hayvanların sistematik olarak klinik muayeneleri yapıldıktan<sup>21</sup> sonra, laboratuvar muayeneleri için kan (hematolojik muayeneler ve moleküler analizler için EDTA'lı kan, biyokimyasal muayeneler için kan serumu kullanıldı) ve spontan idrar örnekleri alındı.

Tüm hayvanlardan tekniğine uygun olarak kulak ucundan hazırlanan ince kan frotileri Giemsa metodu ile boyanıp mikroskopta incelendi. Hasta grubundaki sığırların frotilerinde eritrositler içerisinde *T. annulata*'nın piroplazm formları görülerek teşhisleri yapıldı. Ayrıca Reverse Line Blotting (RLB) testi ile tür tayini yapılarak etkenin *T. annulata* olduğu teyit edildi.

Hematolojik muayeneler (eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit yüzdesi ve total lökosit sayısı) Sysmex Kx 21-N (ABD) marka kan sayım cihazı ile belirlendi. Retikülosit sayımı ise Beckman Coulter Gen-S (ABD) ile yapıldı. Biyokimyasal muayenelerden total bilirubin, indirekt biliru-

bin, AST ve LDH düzeyleri Cobas 6000 otoanalizatörü (İsviçre) ile ölçüldü. Serum amiloid A ve haptoglobin analizleri ELISA kiti (Tridelta LTD, Ireland) ile prosedürlerine uygun olarak yapıldı.

Kanda DNA ekstraksiyonu ticari DNA ekstraksiyon kiti (Purelink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) ile kit protokolü uygulanarak yapıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) Thermo Sprint marka cihazda, Altay ve ark.'nın<sup>22</sup> bildirdiği hacim ve şartlarda yapıldı. Biodyne-C membran üzerine, PZR ürünleri ile hibridize olacak oligonükleotidlerin yerleştirilmesi Altay ve ark.<sup>22</sup>, Gubbels ve ark.'nın<sup>23</sup> bildirdiği şekilde yapıldı.

RLB testinde kullanılan probalar, 5'-uçlarında amino grubu N-(Trifluoracetamido)hexyl-eyanoethyl, N, N, - diisopropyl phosoramidite (TFA)-C<sub>6</sub> aminolinker içerecek şekilde sentezletti. Bu çalışmada Catchall (*Theileria* + *Babesia*, *Anaplasma* + *Ehrlichia*) ve soy spesifik (*Theileria* spp. ve *Babesia* spp.) probalar dahil toplam 14 farklı prob kullanıldı.

İdrarın makroskopik olarak rengi, bulanıklığı ve kokusu muayene edildikten sonra idrar test şeridiyle (Compur 10) dansitesi, pH'sı, protein, bilirubin, ürobilinojen, keton, glikoz, kan, hemoglobin ve lökosit miktarları kantitatif olarak belirlendi. İdrar sedimenti mikroskopta muayene edildi. Ayrıca idrar örneği leptospira yönünden karanlık saha mikroskobunda incelendi.

İstatistiksel hesaplamalar SPSS MS Windows Release 13.0 bilgisayar programı kullanılarak, gruplar arası farklılığın istatistiksel önemliliği varyans analizi ve Duncan testine göre yapıldı.

## BULGULAR

Kontrol hayvanların sağlıklı oldukları, hasta hayvanların ise sadece *T. annulata* ile enfekte oldukları yayma froti ve RLB testleri ile belirlendi.

Tüm gruplardaki hayvanların klinik (vücut sıcaklığı, kalp ve solunum frekansı ile rumen hareketi), hematolojik (eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit yüzdesi, retikülosit yüzdesi ve total lökosit sayısı) ve biyokimyasal (total bilirubin, indirekt bilirubin, AST, LDH, serum amiloid A ve haptoglobin düzeyleri) muayene bulgularının ortalamaları, minimum-maksimum değerleri ve gruplar arasındaki farkların önemi *Tablo 1*'de topluca verildi.

Kontrol grubu ile hafif derecede anemi grubundaki tüm hayvanların idrar muayenelerinde pH'nin alkali, dansitenin 1015-1030 arasında olduğu ve protein, bilirubin, ürobilinojen, keton, glikoz, kan, hemoglobin, lökosit negatif olarak tespit edildi. Bunlardan farklı olarak; orta derecede anemi grubundaki 2 hayvanda +1 düzeyinde protein, şiddetli derecede anemi grubundaki 9 hayvanda

+1 ile +2 arasında değişen düzeyde protein ve şiddetli derecede anemi gözlenen 5 hayvanda +1 oranında kan belirlendi. Ayrıca orta derecede anemi grubundan 2 ve şiddetli derecede anemi grubundan 9 hayvanda yapılan idrarın mikroskobik muayenesinde az sayıda eritrosit ve böbrek epitel hücresi saptandı.

İdrar sedimentinin karanlık saha mikroskobu muayenelerinde leptospiraya rastlanmadı.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

*T. annulata*'nın neden olduğu tropikal tayleriyozis, Akdeniz havzası (Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Anadolu yarımadası), Ortadoğu, Orta ve Güney Asya'da yaygın olarak görülür<sup>24,25</sup>. Hastalık son yıllardaki etkili tedavi ve yaygın aşı uygulamalarına rağmen Türkiye'de de bilhassa kültür ırkı hayvanlarda büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır<sup>1-3,26-28</sup>.

Hasta gruplarında gözlenen klinik bulgular, diğer çalışmalarda<sup>1-3,29-32</sup> bildirilen klinik bulgular ile paralellik göstermiştir. Bu grupta tespit edilen vücut sıcaklığı, kalp ve solunum frekansı ile rumen hareketi gibi klinik muayene bulgularının kontrol grubundaki hayvanlara göre önemli farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (P<0.001).

Tropikal tayleriyozisli sığırlarda önemli hematolojik değişikliklerin meydana geldiği ve en tipik değişikliğin ise anemi olduğu belirtilmektedir<sup>1-5,26,27,29-31,33</sup>. Bu ifadeyle uyumlu olarak hafif derecede anemi grubundan, şiddetli derecede anemi grubuna doğru eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı ve hematokrit değerlerinde istatistik olarak P<0.001 güven eşliğinde azalma belirlenmiştir.

Omer ve ark.<sup>34</sup> doğal olarak ve Laiblin<sup>5</sup> deneysel olarak *T. annulata* ile enfekte hayvanlarda retikülosite rastladıklarını ifade ederken, Can<sup>1</sup> çalışmasında, doğal olarak enfekte olmuş 46 hastadan 20'sinde az sayıda retikülosit bulunduğunu belirtmiştir. Singh ve ark.<sup>8</sup>, deneysel olarak *T. annulata* ile enfekte ettikleri melez buzağılarda, inokulasyondan 16 ve 20 gün sonra retikülosit yüzdesinin önemli derecede arttığını belirtmişlerdir. Çöl ve Uslu<sup>33</sup>, şiddetli tayleriyozisli sığırlarda belirgin bir retikülozis saptadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, doğal olarak *T. annulata* ile enfekte olmuş 30 sığırın 10'unda retikülosit yüzdesinin arttığı tespit edilmiştir. Özellikle orta ve şiddetli derecede anemi gruplarındaki bazı hayvanlarda artan retikülosit yüzdesi hemolitik aneminin önemli bir bulgusudur ve kemik iliğinin hemolize verdiği cevabı göstermektedir<sup>14-16</sup>.

*T. annulata* enfeksiyonlarında total lökosit sayısının arttığı<sup>1,26,27,30,35,36</sup>, değişiklik olmadığı<sup>4,29,30,32</sup> veya azaldığını belirten araştırmacıların<sup>1,3,5,26,30,31,33,34,36,37</sup> bildirimine uyumlu olarak, hasta hayvanların bazılarında lökopeni veya lökositoz saptandığı gibi normal fizyolojik sınırlarda kalan olgular da gözlenmiştir. Ancak hafif ve orta derecede

**Tablo 1.** Sağlıklı ve hasta sığırların genel klinik, hematolojik ve biyokimyasal muayene bulgularının ortalamaları, minimum-maksimum değerleri ve gruplar arasındaki farkların önemi

**Table 1.** The means of clinical, hematological and biochemical diagnosis symptoms of healthy and sick cattles, the minimum and maximum values and the significance of the differences between the groups

Parametre	Grup I X ± Sx	Grup II X ± Sx	Grup III X ± Sx	Grup IV X ± Sx	P
<b>Klinik Bulgular</b>					
Vücut Sıcaklığı (°C)	37.92±0.10 <sup>b</sup> (37.50-38.40)	40.22±0.23 <sup>a</sup> (39.00-41.70)	40.28±0.21 <sup>a</sup> (39.40-41.30)	40.30±0.18 <sup>a</sup> (39.40-41.20)	***
Kalp Frekansı (adet/dak)	69.00±0.87 <sup>c</sup> (64.00-72.00)	82.40±2.19 <sup>b</sup> (70.00-92.00)	80.80±2.57 <sup>b</sup> (70.00-96.00)	104.80±6.90 <sup>a</sup> (84.00-160.00)	***
Solunum Frekansı (adet/dak)	27.60±0.60 <sup>c</sup> (24.00-30.00)	34.60±1.40 <sup>b</sup> (30.00-44.00)	38.80±3.14 <sup>b</sup> (30.00-62.00)	44.60±1.86 <sup>a</sup> (38.00-56.00)	***
Rumen Hareketleri (adet/5 dak)	9.50±0.37 <sup>c</sup> (8.00-11.00)	4.10±0.41 <sup>b</sup> (2.00-6.00)	3.70±0.56 <sup>b</sup> (2.00-6.00)	2.20±0.53 <sup>a</sup> (0.00-5.00)	***
<b>Hematolojik Bulgular</b>					
Eritrosit Sayısı (milyon/mm <sup>3</sup> )	6.73±0.30 <sup>d</sup> (5.55-8.31)	4.28±0.08 <sup>c</sup> (3.91-4.82)	3.26±0.07 <sup>b</sup> (2.94-3.49)	2.03±0.14 <sup>a</sup> (1.09-2.45)	***
Hemoglobin Miktarı (% gr)	10.95±0.30 <sup>d</sup> (9.80-13.10)	8.15±0.20 <sup>c</sup> (7.40-9.50)	5.99±0.23 <sup>b</sup> (5.00-7.30)	3.98±0.25 <sup>a</sup> (2.10-4.80)	***
Hematokrit Değer (%)	32.83±0.80 <sup>d</sup> (30.20-38.60)	23.94±0.38 <sup>c</sup> (22.40-26.80)	18.76±0.70 <sup>b</sup> (16.30-22.50)	12.11±0.68 <sup>a</sup> (6.60-13.90)	***
T. Lökosit Sayısı (1000/mm <sup>3</sup> )	8.88±0.35 <sup>a</sup> (7.70-11.00)	5.34±1.07 <sup>b</sup> (1.90-12.30)	4.13±0.49 <sup>b</sup> (1.60-7.70)	7.17±1.77 <sup>ab</sup> (1.50-15.70)	*
<b>Biyokimyasal Bulgular</b>					
T. Bilirubin (mg/dl)	0.07±0.005 <sup>c</sup> (0.04-0.09)	0.40±0.12 <sup>c</sup> (0.09-1.38)	2.48±0.52 <sup>b</sup> (1.01-6.42)	3.66±0.44 <sup>a</sup> (1.60-5.25)	***
I. Bilirubin (mg/dl)	0.01±0.004 <sup>c</sup> (0.00-0.03)	0.25±0.091 <sup>c</sup> (0.00-0.93)	2.18±0.49 <sup>b</sup> (0.79-5.83)	3.37±0.48 <sup>a</sup> (0.76-4.89)	***
AST (IU/L)	70.90±2.09 <sup>b</sup> (58-78)	91.80±6.27 <sup>b</sup> (68-124)	337.40±41.14 <sup>a</sup> (129-477)	360.50±29.19 <sup>a</sup> (244-509)	***
LDH (IU/L)	994.2±11.71 <sup>d</sup> (945-1075)	1255.7±11.91 <sup>c</sup> (1209-1323)	1597.5±23.13 <sup>b</sup> (1505-1689)	2208.8±38.81 <sup>a</sup> (1945-2356)	***
SAA (mg/L)	31.62±1.98 <sup>c</sup> (22.35-39.87)	151.00±19.85 <sup>a</sup> (78.33-241.14)	109.97±9.41 <sup>b</sup> (75.26-159.27)	110.04±11.88 <sup>b</sup> (72.40-184.30)	***
Haptoglobin (mg/ml)	0.08±0.002 <sup>b</sup> (0.07-0.1)	0.59±0.16 <sup>a</sup> (0.08-1.32)	0.13±0.03 <sup>b</sup> (0.05-0.38)	0.08±0.007 <sup>b</sup> (0.04-0.11)	***

--: P>0.05, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

a, b, c: Aynı satırda farklı harfleri içeren grup ortalamaları arası farklar önemlidir (P<0.05)

Grup I: Sağlıklı hayvanlar, Grup II: Hafif derecede anemili hastalar,

Grup III: Orta derecede anemili hastalar, Grup IV: Şiddetli derecede anemili hastalar

anemili hastalarda ortalama lökosit değerlerinin önemli derecede azaldığı (P<0.05) belirlenmiştir.

*T. annulata* ile enfekte hayvanlarda, hastalığın başlangıcındaki lökositozisin periferik kan mononükleer lökosit sayısının ve oranlarının artmasıyla, son dönemlerde artan lökosit sayılarının ise periferik kan polimorfonükleer lökositlerin sayı ve oranlarının artmasıyla ilgili olabileceği bildirilmiştir<sup>35-37</sup>. Tropikal tayleriyozis ilk dönemlerinde artan lökosit sayısının protozoonların istilasına karşı bir savunma cevabı olarak lenfoid organlardaki lenfositlerin proliferasyonu sonucu şekillendiği, hastalığın son dönemlerinde oluşan lökopeninin ise vücudun çeşitli organlarına

lenfositlerin infiltrasyonu ve lenfoid organlarda şizogoni yoluyla lenfositlerin büyük ölçüde tahribatının bir sonucu olduğu belirtilmiştir<sup>36,37</sup>.

Çalışmada, orta ve şiddetli derecede anemi grubundaki hayvanlarda ortalama total ve indirekt bilirubin seviyelerinin, sağlıklı hayvanlar için bildirilen<sup>21,38</sup> fizyolojik değerlere (0.01-0.47 mg/dL, 0-0.3 mg/dL) kıyasla arttığı saptanmıştır. Araştırmada gruplar arasındaki fark incelendiğinde, özellikle Grup II den Grup IV'e doğru total ve indirekt bilirubin seviyelerinin istatistiki olarak önemli (P<0.001) düzeyde arttığı görülmektedir. Kaynaklarda<sup>4,8,36</sup>, *T. annulata* enfeksiyonlarında özellikle total ve indirekt bilirubin

arttığı ve bu durumun hemolitik aneminin karakteristik özelliği olduğu belirtilmiştir. Hemolizli hastalarda indirekt bilirubin artışı, karaciğerin konjuge etme kapasitesinin üstündeki hem katabolizmasını göstermesi bakımından önemli bir bulgudur<sup>20</sup>.

Ömer ve ark.<sup>39</sup>, *T. annulata* enfeksiyonlarında bilirubin konsantrasyonundaki önemli artışların muhtemelen hemolitik anemiden kaynaklandığını ve hepatik disfonksiyonların da katkı sağladığını bildirmektedir.

AST özellikle karaciğerde, kalp ve iskelet kasında yüksek, eritrositlerde ve böbreklerde ise az konsantrasyonda bulunan bir enzimdir. Sığırlarda karaciğer hasarını veya kaslardaki nekrozu takiben AST düzeyleri 7-10 gün süreyle dolaşımda yüksek seviyelerde bulunur<sup>16</sup>. Çalışmada, hasta hayvanların ortalama AST seviyelerinin hafif derecede anemi grubundaki hayvanlarda literatürlerde<sup>38</sup> ifade edilen fizyolojik sınırlarda (43-127 IU/L) olduğu, ancak orta ve şiddetli derecede anemi olan gruplarda belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Çalışma sonuçları araştırmacıların<sup>31,32,35,36</sup>, tayleriyozisli sığırlarda AST seviyelerinde belirgin artışların olduğuna dair bildirimleriyle uyum göstermektedir. Ortalama AST seviyeleri açısından kontrol ve hafif derecede anemi grupları arasındaki değişikliklerin önemli olmadığı ( $P>0.05$ ), ancak orta ve şiddetli derecede anemi gruplarındaki ortalama değerlerin kontrol grubuna göre önemli ( $P<0.001$ ) derecede arttığı saptanmıştır. Çalışmada, orta ve şiddetli derecede anemi gözlenen deney gruplarında AST düzeylerindeki artışların belirgin olması muhtemelen karaciğer tahribatı<sup>1,31,32,35,36,39,40</sup> ve eritrositlerin hemolizi<sup>32</sup> ile açıklanabilir.

Sandhu ve ark.<sup>36</sup> ve İssi ve ark.<sup>31</sup> tarafından, *T. annulata* enfeksiyonunda anemi sonucu şekillenen hipoksiye bağlı olarak hepatik doku hasarının olduğu ifade edilmektedir.

Gül ve Gründer<sup>40</sup> tarafından, sığırlarda AST ( $<100$  IU/L) ve total bilirubin ( $<8.5$   $\mu\text{mol/L}$ ) değerlerinin birlikte artışı karaciğer fonksiyon bozukluğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmadaki hasta hayvanların ortalama LDH seviyelerinin hafif derecede anemi grubundaki hayvanlarda literatürlerde ifade edilen<sup>21</sup> normal fizyolojik sınırlarda olduğu (500-1500 IU/L), ancak orta ve şiddetli derecede anemi olan gruplarda belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Gruplar arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli ( $P<0.001$ ) olduğu belirlenmiştir (Grup I den, Grup IV'e doğru). Hastalığın ilerlemesiyle görülen LDH düzeylerindeki değişmelerin muhtemelen iskelet kası, kalp kası ve karaciğer tahribatı<sup>1,10,39</sup> yanında, hemoliz sırasında plazmaya eritrosit enzimlerinin salınması sonucu oluşabileceği düşünülmektedir<sup>15</sup>.

Çalışmada, hafif derecede anemi grubundaki hayvanların ortalama haptogloblin düzeylerinin, sağlıklı hayvanlar için bildirilen fizyolojik değerlere<sup>41-44</sup> göre önemli

ölçüde ( $P<0.001$ ) arttığı, ancak orta ve şiddetli derecede anemi grubundaki ortalama haptogloblin düzeylerinin fizyolojik sınırlarda olduğu saptanmıştır. Özellikle haptogloblin düzeyleri açısından gruplar arasındaki fark istatistik olarak incelendiğinde, hafif derecede anemili hastalarda diğer gruplardan istatistik olarak  $P<0.001$  güven eşliğinde artmasına rağmen, diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemsiz değişiklikler olduğu görülmektedir. Çalışmada, hafif anemili hastalarda haptogloblin düzeylerinin artışı akut faz yanıtı ile açıklanabilir<sup>43,44</sup>. Haptogloblin akut yangısal durumlarda yüksek olmasına rağmen, hemolitik anemi olaylarında diğer yangısal durumlardan farklı olarak belirgin şekilde düşmektedir. Ancak bu düşüş intravasküler hemolizde, ekstravasküler hemolizden çok daha fazla olmakta, hatta belirlenemeyecek düzeylere düşmektedir<sup>45</sup>. Bu nedenle, çalışmadaki orta ve şiddetli derecede anemi grubundaki hastalarda akut faz yanıtın devam etmesine rağmen ortalama haptogloblin düzeylerinin kontrol grubundaki düzeyde kalması, normal değerlerin altına düşmemesi *T. annulata* enfeksiyonunda hemolizin tipinin ekstravasküler olduğunu (daha çok intravasküler bir hemoliz olmadığını ifade edebilir) ve de çok şiddetli olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmadaki, hasta hayvanların (Grup II, III ve IV) tümünde SAA seviyelerinin araştırmacılarca<sup>46,47</sup> sağlıklı hayvanlar için bildirilen fizyolojik değerlerin üzerinde olduğu saptanmıştır. SAA seviyelerinin kontrol grubu ile hafif, orta ve şiddetli derecede anemi grubundaki hastaların ortalama değerleri arasındaki farklılıkların  $P<0.001$  düzeyinde önemli olduğu, özellikle kliniğe erken getirilen hastaların bulunduğu hafif derecede anemi grubundaki artışın orta ve şiddetli derecede anemi gruplarından daha fazla olduğu görülmüştür. Bu da hastalığın başlangıcındaki akut faz yanıtın üst seviyede olduğunu ve enfeksiyonun devamında da akut faz yanıtın devam ettiğini göstermektedir.

Glass ve ark.<sup>19</sup> tarafından, sığırlarda deneysel olarak oluşturulan *T. annulata* enfeksiyonlarında SAA'nın ortaya çıkan akut faz proteinlerinden biri olduğu ve hastalığın başlangıç dönemi ile bazı klinik görünümlemlerle güçlü bir ilişki içinde olabileceği bildirilmiştir.

Nazifi ve ark.<sup>47</sup>, *T. annulata* enfeksiyonlarında ruminantlar için önemli pozitif akut faz proteinlerinden olan SAA düzeylerinde belirgin artışlar saptadıklarını ve yangısal reaksiyonun bir indikatörü olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Hastaların test şeridiyle kontrol edilen idrarlarının 11'inde +1 ya da +2 protein olduğu ve bunların 5'inde +1 kan bulunduğu görülmüştür. Bu hastaların idrarlarının mikroskopik muayenesinde ortalama her sahada 3-4 böbrek epitel hücresine, az sayıda eritrosit ve lökosit hücresine rastlanması, Gökçe ve ark.'nın<sup>29</sup> bildirişiyle tamamen uyumaktadır. Bu durumun, böbreklerde şekil-

lenen yangısal ve dejeneratif bozukluklardan ileri geldiği düşünülmektedir<sup>1</sup>.

Kaynaklarda<sup>14,15,17,38</sup> intravasküler hemolizin en önemli göstergesi olarak hemoglobüri (idrarın şarap kırmızısı renk alması, serbest hemoglobin) olduğu ifade edilirken, ekstrasvasküler hemolizde hemoglobüri'nin şekillenmediği bildirilmiştir. Altuğ ve ark.'nın<sup>35</sup> *T. annulata* ile enfekte hafif, orta ve şiddetli anemili hastaların hiç birinde hemoglobüri gözlemedikleri bildirimleriyle uyumlu olarak, çalışmadaki hasta hayvanların hiç birinde hemoglobüri'nin görülmemesi *T. annulata* enfeksiyonlarında hemolizin ekstrasvasküler olduğunu desteklemektedir.

Çoğu klasik bilgilerde<sup>2,9,12,13,35</sup> tropikal tayleriyoziste hemoglobüri'nin asla görülmediği ifade edildiği halde, bazı araştırmacılar<sup>7,10,11,24</sup> tarafından hemoglobüri görüldüğü bildirilmiştir. Bazı yazarlar da<sup>10,11,25,29,48</sup> hematüri görüldüğünü ifade etmektedir.

Sonuç olarak, hasta gruplarında görülen anemi ile hastalığın klinik seyri arasında bir paralellik görülmektedir. Tayleriyozisli sığırlarda hastalığın seyriyle artan total ve indirekt bilirubin ile AST, LDH seviyelerindeki artışlar karaciğerdeki patolojik değişikliklere ve eritrositlerin hemolizine bağlanabilir. Bu çalışmada hafif derecede anemi grubundaki haptoglobin ve SAA seviyelerindeki artış hastalığın başlangıcındaki akut faz yanıtın üst seviyede olduğunu ve enfeksiyonun seyrinde akut faz yanıtın devam ettiğini göstermekle birlikte, orta ve şiddetli derecede anemi grubundaki hayvanlarda hemolizin bir göstergesi olan haptoglobin düzeyindeki azalmalar, kontrol grubundaki hayvanlara göre önemsiz bulunmuştur. Ayrıca, çalışmadaki hastaların hiç birinde hemoglobüri görülmemiştir.

Araştırmanın tüm sonuçları bir arada değerlendirildiğinde; sığırlarda *T. annulata*'nın neden olduğu enfeksiyonlarda oluşan aneminin patogenezinde rolü olan hemolizin ekstrasvasküler tipte olduğu ve hastalığın ilerlemesiyle şiddetinin arttığı kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Can R:** *Theileria annulata* (Dschunkowsky et Luhs, 1904)'dan ileri gelen Theileriosis üzerinde klinik-patolojik çalışmalar ve tedavi denemeleri. *Doçentlik Tezi*, Fırat Üniv Vet Fak Elazığ, 1979.
- Gül Y:** Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları (Sığır, Koyun-Keçi). II. Baskı. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti, Malatya, 2006.
- Gül Y, Aksoy G, Özdemir H:** Elazığ ve çevresinde *Theileria annulata* ile enfekte sığırların buparvaquone (butalex)'la tedavisi üzerine araştırmalar. *Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg*, 2 (1-2): 97-116, 1991.
- Hoosmand-Rad P:** The pathogenesis of anaemia in *Theileria annulata* infection. *Res Vet Sci*, 20, 324-329, 1976.
- Laiblin Ch:** Klinische Untersuchungen zur *Theileria annulata*-infektion des rindes. II- haematologische Untersuchungen. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 91, 48-50, 1978.
- Rezaei SA, Dalir-Naghadeh B:** Evaluation of antioxidant status and

oxidative stres in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Parasitol*, 142, 179-186, 2006.

- Sahoo A, Patra RC, Pathak NN, Dwivedi SK, Dash PK:** Enhanced lipid peroxide levels in the erythrocytes of calves with haemoglobinuria. *Vet Res Com*, 25, 55-59, 2001.
- Singh A, Singh J, Grewal AS, Brar RS:** Studies on some blood parameters of crossbred calves with experimental *Theileria annulata* infections. *Vet Res Com*, 25, 289-300, 2001.
- Dhar S, Gautam OP:** Observations on anaemia in experimentally induced with *Theileria annulata* infection of calves. *Indian J Anim Sci*, 49 (2): 122-126, 1979.
- Ertürk E, Laiblin, Urman HK:** A Clinico-pathologic study on calves experimentally infected with *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) Wenyon 1926. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 23 (3-4): 352-367, 1976.
- Sergent E, Donatien A, Parrot L, Lestoquard F:** Etudes sur les Piroplasmoses Bovines. Inst Pasteur d'Algerie, Alger, 417, 1945.
- Aytuğ CN, Görgül S, Tuncer ŞD, Alaçam E, Gökçen H, Yılmaz K:** Sığır Hastalıkları. Revize Edilmiş ve Genişletilmiş İkinci Basım. Tüm Veteriner Hayvancılık ve Veteriner Hizmetleri San. Tic. Ltd Şti Yayın No: 3, İstanbul, 1991.
- Lal H, Soni JL:** Erythrophagocytosis in relation to anaemia in acute *Theileria annulata* infection in crossbred calves. *Indian J Anim Sci*, 55 (2): 85-90, 1985.
- Müftüoğlu E:** Klinik Hematoloji. Şahin Yayıncılık. 4. Baskı, s. 81-84, Bizim Büro Basımevi, Ankara, 1994.
- Stockham SL, Scott MA:** Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Second ed., Blackwell Publishing Ltd Oxford, *United Kingdom*, 2008.
- Turgut K:** Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis. Genişletilmiş 2. Baskı, Bahçivanlar Basım Sanayi AŞ, Konya, 2000.
- Duncan JR, Prasse KW, Edward AM:** Veterinary Laboratory Medicine (Clinical Pathology). Third ed., Iowa State University Press, Ames, ABD, 1994.
- Ünal A:** Hemolitik anemiler. <http://www.erciyes.edu.tr>. *Erişim tarihi:* 01.06.2007.
- Glass EJ, Craigmile S, Springbett A, Preston PM, Kirvar E, Wilkie GM, Eckersall PD, Hall FR, Brown CGD:** The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle that is associated with pathology. *Int J Parasitol*, 33, 1409-1418, 2003.
- Guyton AC:** Tıbbi Fizyoloji. Textbook of Medical Physiology, 7th ed., Nobel Tıp Kitabevi/Saunders, 1986.
- Rosenberger G:** Die klinische Untersuchung des Rindes Verlag. 3. Auflage Verlag Paul Parey, 1990.
- Altay K, Dumanlı N, Aktas M:** Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Vet Parasitol*, 147 (1-2): 161-165, 2007.
- Gubbels JM, De Vos AP, Van Der Weide M, Viseras J, Schouls LM, De Vries E, Jongejan F:** Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol*, 37, 1782-1789, 1999.
- Gründer HD:** Krankheiten durch protozoen. In, Rosenberger G (Ed): Krankheiten des Rindes. 3. Auflage, pp. 893-911, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 1994.
- Mimioğlu MM, Ulutaş M, Güler S:** Yurdumuz Sığırlarında Theileriosis Etkenleri ve Diğer Kan Parazitleri. Ajans Türk Matbaacılık Sanayi, Ankara, 1971.
- Dumanlı N, Keleştimur H, Nizamlioğlu M:** *Theileria annulata* ile deneysel olarak enfekte edilmiş danalarda hematolojik araştırmalar. *Doğa Tr Vet Hay Derg*, 11 (2): 108-114, 1987.
- Gül Y:** Theileriosis'li bir buağıda semptomatik burun kanaması. *Tr J Vet Anim Sci*, 23 (1): 209-212, 1999.
- Gül Y, İssi M:** Tropical theileriosismin newborn two calves-A case report. *e-Journal of New World Sciences Academy Veterinary Sciences*. 3B0005, 4 (3): 34-38, 2009.

29. **Gökçe G, Paşa S, Öcal N:** Theileriosis'li sığırlarda bazı kan parametreleri, kan gazları ve idrar analizleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 4 (1-2): 43-47, 1998.
30. **İssi M, Gül Y:** Sığırların bazı enfeksiyöz hastalıklarında serum vitamin C düzeyleri üzerine araştırmalar. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg*, 15 (1): 113-120, 2001.
31. **İssi M, Gül Y, Başbuğ O, Şahin N:** Tropikal Theileriozisli sığırlarda klinik, hematolojik ve bazı biyokimyasal parametreler ile serum kobalt ve B12 Vitamin Düzeyleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (6): 909-913, 2010.
32. **Paşa S:** Teheileriosisli sığırlarda buparvaquone (Buparvon)'un terapötik etkinliği. *Türk Parazitol Derg*, 32 (4): 317-321, 2008.
33. **Çöl R, Uslu U:** Haematological and coagulation profiles during severe tropical theileriosis in Cattle. *Türk J Vet Anim Sci*, 30, 577-582, 2006.
34. **Omer OH, El-Malik KH, Mahmoud OM, Haroun EM, Hawas A, Sweeney D, Magzoub M:** Haematological profiles in pure bred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. *Vet Parasitol*, 107,161-168, 2002.
35. **Altuğ N, Yüksel N, Ağaoğlu ZT, Keleş İ:** Determination of adenosine deaminase activity in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Trop Anim Health Prod*, 40 (6): 449-456, 2008.
36. **Sandhu GS, Grewal AS, Singh A, Kondal JK, Singh J, Brar RS:** Haematological and biochemical studies on experimental *Theileria annulata* infection in Crossbred calves. *Vet Res Com*, 22, 347-354, 1998.
37. **Preston PM, Darghouth M, Boulter NR, Hall FR, Kirvar RTE, Brown CG:** A dual role for immunosuppressor mechanisms in infection with *Theileria annulata* well-regulated suppressor macrophages help in recovery from infection; profound immunosuppression promotes non-healing disease. *Parasitol Res*, 88, 522-534, 2002.
38. **Smith BP:** Large Animal Internal Medicine. Fourth ed., United States, 2009.
39. **Omer OH, El-Malik KH, Magzoub M, Mahmoud OM, Haroun EM, Hawas A, Omar HM:** Biochemical profiles in Friesian cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. *Vet Res Com*, 27, 15-25, 2003.
40. **Gül Y, Gründer HD:** Estimation of bile acids in blood-serum and its diagnostic-value for liver disease in cattle. *Dtsch Tierarztl Wschr*, 95 (4): 140-146, 1988.
41. **Chan JPW, Chu C, Fung HP, Chuang ST, Lin YC, Chu RM, Lee SL:** Serum haptoglobin concentration in cattle. *J Vet Med Sci*, 66 (1): 43-46, 2003.
42. **Nazifi S, Razavi SM, Esmailnezhad Z, Gheisari H:** Study on acute phase proteins (haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen and ceruloplasmin) changes and their diagnostic values in bovine tropical theileriosis. *Parasitol Res*, 105 (1): 41-46, 2009.
43. **Nazifi S, Rezakhanı A, Koohimoghadam M, Ansari-Lari M, Esmailnezhad Z:** Evaluation of serum haptoglobin in clinically healthy cattle and cattle with inflammatory diseases in Shiraz, a tropical area in southern Iran. *Bulgarian J Vet Med*, 11 (2): 95-101, 2008.
44. **Nazifi S, Razavi SM, Reiszadeh M, Esmailnezhad Z, Ansari-Lari M, Hasanshahi F:** Evaluation of the resistance of indigenous Iranian cattle to *Theileria annulata* compared with Holstein cattle by measurement of acute phase proteins. *Comparative Clinical Pathol*, 19, 155-161, 2010
45. **Thompson D, Milford-Ward A, Whicher JT:** The value of acute phase protein measurements in clinical practice. *Ann Clin Biochem*, 26, 123-31, 1992.
46. **Çitil M:** Puerperal enfeksiyonlu ve abamasum deplasmanlı ineklerde serum amiloid-A ve haptoglobin düzeyleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 9 (2): 147-151, 2003.
47. **Nazifi S, Khoshvaghti A and Gheisari HR:** Evaluation of serum and milk amyloid A in some inflammatory diseases of cattle. *Iranian J Vet Res, Shiraz University*, 9 (3): 222-226, 2008.
48. **İssi M, Gül Y:** Bir buzağıda hematüri ile seyreden prenatal tropikal tayleriyozis olgusu. *Yüzcüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg*, 2, 67-69, 2008.